

19  
2 ej.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
ZARAGOZA

DETERMINACION DE CLORURO DE BENZALCONIO  
EN POMADAS POR CROMATOGRFIA DE LIQUIDOS  
A ALTA PRESION

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A ;

FRANCISCO FRANCO REYES

MEXICO, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1989



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

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

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

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

## INDICE GENERAL

	PAGINA
INTRODUCCION .....	1
CAPITULO PRIMERO	
GENERALIDADES DE LA CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION..	
1. Descripción del Sistema Cromatográfico .....	4
2. Sistemas Isocrático y de Gradiente en Cromatografía de Líquidos de Alta Presión .....	7
3. Columnas y Empaques en Cromatografía de Líquidos de Alta Presión .....	11
4. Fase Móvil en Cromatografía de Líquidos de Alta Presión ...	17
5. Mecanismo de la Cromatografía de Adsorción, Partición y la Cromatografía de Fases Ligadas .....	21
6. Detectores .....	26
7. Bombas en Cromatografía de Líquidos de Alta Presión .....	30
CAPITULO SEGUNDO	
ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	
1. Métodos Existentes para Valorar Cloruro de Benzalconio ....	33
2. Planteamiento del Problema.....	41
3. Objetivos Experimentales.....	42
4. Hipótesis .....	43
CAPITULO TERCERO	
DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	
1. Consideraciones Previas.....	44
a) Propiedades Farmacológicas del Cloruro de Benzalconio...	44
b) Propiedades Físicas del Cloruro de Benzalconio.....	46
c) Propiedades Químicas del Cloruro de Benzalconio.....	47
2. Antecedentes Experimentales.....	49
3. Mecanismo de Separación en la Columna de Adsorción .....	61
4. Mecanismo de Separación en la Columna del Cromatógrafo....	63
5. Material y Equipo.....	65
6. Método Analítico de Valoración del Cloruro de Benzalconio..	66

	PAGINA
CAPITULO CUARTO	
1. Resultados.....	69
2. Discusión de los Resultados.....	70
3. Conclusiones.....	75
4. Propuestas y Recomendaciones.....	76
ANEXOS	
ANEXO 1. FORMULACION DE LA POMADA DE ACETATO DE HIDROCORTIZONA..	78
ANEXO 2. VALIDACION DEL METODO ANALITICO.....	79
BIBLIOGRAFIA.....	90

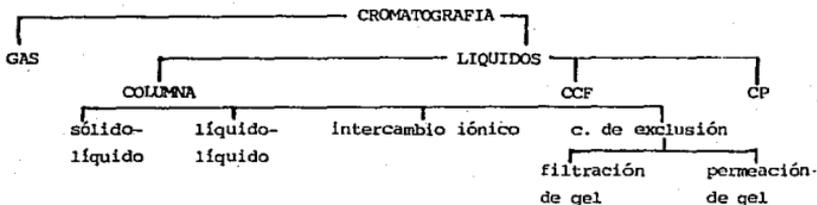
## INTRODUCCION

Inicialmente la cromatografía se uso como una técnica separativa y actualmente - se le ha dado un mayor margen de acción. Particularmente la Cromatografía de Líquidos es una técnica analítica que se emplea para separar, identificar y purificar una gran variedad de sustancias.

Este método físico tiene una gran versatilidad ya que podemos emplearlo en las siguientes áreas:

AREA INDUSTRIAL	FARMACOLOGIA	OTRAS APLICACIONES
Polímeros	Análisis de fármacos	Toxicología
Pesticidas	Clasificación de fármacos	Bioquímica
Aceites	cos	Química Orgánica
Antioxidantes	Materias Primas	Biomédica/Clínica
etc.	Control de Calidad	Contaminación
	etc.	Análisis de Agua
		Aminoácidos, Proteínas,
		Carbohidratos, Lípidos,
		etc.

La Cromatografía de Líquidos pertenece a una división de la Cromatografía en general de acuerdo al siguiente esquema:



De acuerdo al mecanismo de separación en un proceso cromatográfico en columna, - la cromatografía sólido-líquido se conoce también como de adsorción y la cromatografía líquido-líquido, de partición.

Enfocándonos a la Cromatografía de Líquidos en columna podemos hacer una distinción entre la cromatografía clásica en columna y la cromatografía en columna moderna. Esta última se le conoce como Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (CLAP) y es propiamente la misma cromatografía en columna pero dotada de grandes ventajas con respecto a la clásica.

Entre las ventajas que podemos mencionar estan, a grandes rasgos:

- a. Emplea columnas de diámetro pequeño (2-5 mm).
- b. Usa empaques de partículas pequeñas (3-50 micras).
- c. Control de la fase móvil debida a la presión.
- d. Introducción precisa de la muestra y de pequeñas muestras.
- e. Alta sensibilidad para detectar pequeñas muestras.
- f. Instrumentos automatizados y estandarizados.
- g. Rapidez de análisis.
- h. Alta resolución y precisión.
- i. Facilidad de operación.

La cromatografía de líquidos de alta presión CLAP, comprende también todos los modos de cromatografía en columna antes mencionados y los fundamentos para la cromatografía en columna clásica se aplica de igual forma para CLAP.

De acuerdo con estas ventajas podemos observar que la CLAP nos ofrece detectar pequeñas concentraciones de muestras. En este caso existe el problema de cuantificar cloruro de benzalconio, un antimicrobiano que esta presente en concentraciones de 0.005 % en una pomada.

Esta forma farmacéutica contiene otro tipo de principios activos aparte de los excipientes que interfieren para identificar y cuantificar a dicho antimicrobiano. El cloruro de benzalconio forma parte de un polifármaco que contribuye con su acción a la actividad antihemorroidal y antiflogística de la pomada.

Se desarrolló un método de limpieza de muestra con una columna de cromatografía empacada con óxido de aluminio y un posterior análisis por CLAP.

La eliminación de muchos excipientes permitió realizar la separación, identificación y cuantificación de estas bajas concentraciones del antimicrobiano.

El método de análisis desarrollado para el cloruro de benzalconio puede ser aplicado a otras pomadas que contengan el mismo contenido de este principio activo y con excipientes muy similares a los que contiene la pomada estudiada (producto fabricado por los Laboratorios Grupo Roussel).

El trabajo presentado aquí comprende a la cromatografía de líquidos de alta presión y a la cromatografía clásica de adsorción, por lo que solamente se hablará de estas técnicas en la exposición de esta Tesis.

Todo el desarrollo experimental se realizó en el Departamento de Control de Calidad de los Laboratorios Grupo Roussel, S.A.

El desarrollo de este método analítico se ajustó a los requerimientos y a los recursos materiales de esta empresa.

## CAPITULO PRIMERO

### GENERALIDADES DE LA CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION.

#### 1. DESCRIPCION DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO.

La cromatografía de alta presión difiere de la cromatografía clásica en el empleo de altas presiones para conducir la fase móvil a través de la columna.

En la cromatografía de adsorción o sólido-líquido tenemos que la fase estacionaria es un sólido o adsorbente y la fase móvil es un líquido de características no polares o de mediana polaridad. El adsorbente es de superficie altamente polar (por ejemplo la alúmina). La separación ocurre basada en pasos repetidos de fenómenos de adsorción y desadsorción.

En la cromatografía de partición o líquido-líquido ambas fases son líquidas. La separación ocurre debido a una partición de las sustancias a separar entre la fase móvil y la estacionaria.

La fase estacionaria de una cromatografía líquido-líquido es una capa muy delgada de solvente retenida como un recubrimiento adsorbido sobre finas partículas de un soporte reducido a polvo. El único cometido del sólido es sostener a la fase estacionaria. La fase móvil es un solvente inmiscible con la fase estacionaria.

Dentro de estas dos modalidades de cromatografía encontramos que si el proceso se desarrolla normalmente, es decir, que la fase estacionaria es la más polar de las dos fases, a ésta se le llama de fase normal; en cambio, si la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es polar, se le llama de fase inversa. Es to es, en la fase normal, la fase estacionaria es de naturaleza altamente polar como por ejemplo la superficie de la sílica gel o de la alúmina, la fase móvil en cambio es no polar como el hexano o el tetrahydrofurano. En este tipo de fase normal, el orden de elución o salida de los componentes es primero el menos polar y los no polares son arrastrados por la fase móvil no polar o de mediana polaridad.

En cambio la fase inversa usa como fase estacionaria una de polaridad baja es - decir, que la superficie de la sílica es recubierta o enlazada químicamente con grupos no polares. La fase móvil es polar como el agua o el alcohol y el orden de elución es primero el más polar, Figura 1.1 (bibliografía 1,2 y 4).

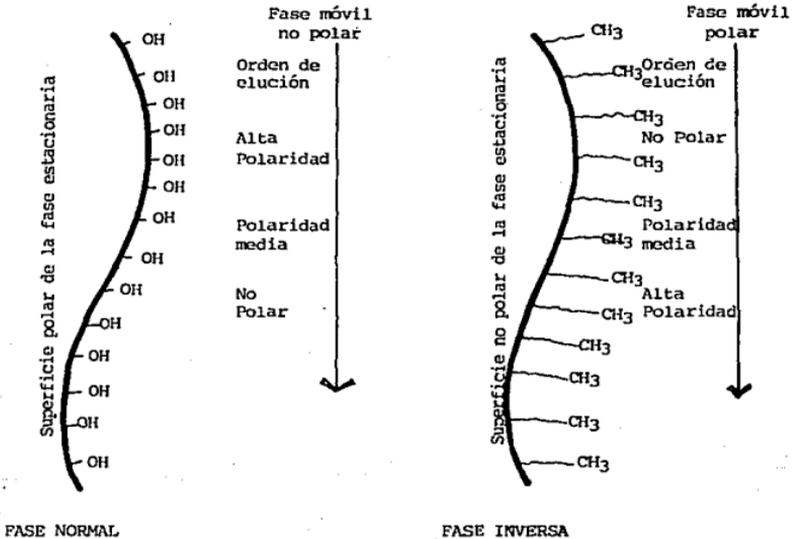


Figura 1.1.- Ilustración gráfica de una cromatografía líquida de fase normal y de fase inversa. Se observa el orden de elución de los compuestos en cada tipo de fase, así como la naturaleza de la fase móvil.

Un sistema de cromatografía de líquidos de alta presión consta de las partes indicadas en la figura 1.2.

Como se puede observar, es sistema esta compuesto básicamente por un depósito - de solventes, de una bomba que impulsa a la fase móvil a través de la columna. - Enseguida esta un dispositivo para la introducción de la muestra, esto es, un - inyector; contiene también la columna en donde se lleva a cabo todo el proceso de separación. El detector cuya función será identificar cada especie que, a-- través de una traducción de impulsos eléctricos será cuantificada gracias a un graficador.

El cromatógrafo de líquidos está equipado con sistemas de computación que auto- máticamente calcula los datos cromatográficos de los detectores y realiza todo el manejo de los datos obtenidos, tales como el trazo de los cromatogramas, cálculos de áreas y alturas de los picos, etc.

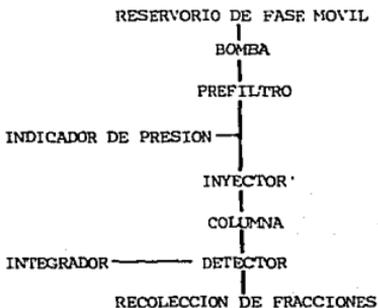


Figura 1.2.- Esquema de los componentes de un cromatógrafo de líquidos de alta presión.

## 2. SISTEMAS ISOCRÁTICO Y DE GRADIENTE EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA PRESIÓN.

En la cromatografía de líquidos, podemos usar un solvente solo como fase móvil durante un análisis de una mezcla de sustancias o podemos usar una mezcla de solventes para obtener una mejor separación de los componentes de una muestra. En un análisis en donde no hay cambio en la composición de la fase móvil durante el análisis, ver figura 1.3, podemos hablar de un sistema isocrático.

En cambio, si la composición de la fase móvil cambia en un análisis se denomina de-gradiente. Muchas veces, en un análisis, los componentes de una mezcla tienen diferente polaridad y así un cambio en la polaridad de la fase móvil se prefiere durante el análisis para mejorar la separación de los componentes, ver figura 1.4.

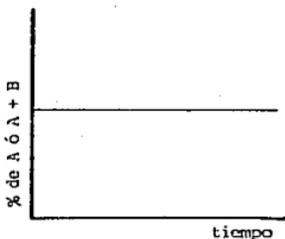


Figura 1.3.- La composición de un disolvente solo o de una mezcla de solventes no varía en un proceso cromatográfico isocrático en función del tiempo.

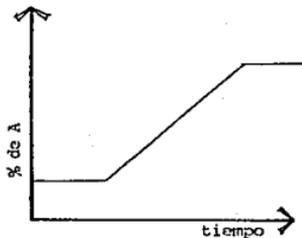


Figura 1.4.- La composición de la fase móvil cambia en función del tiempo en un sistema de gradiente.

En la figura 1.5 podemos ver una comparación de los dos sistemas en cuanto a la capacidad de separar una mezcla de 4 componentes. En una elución isocrática - los componentes salen en un poco juntos y el cuarto componente no sale en menos de 30 minutos. En cambio, en una elución de gradiente, los cuatro componentes salen a los 18 minutos totalmente separados.

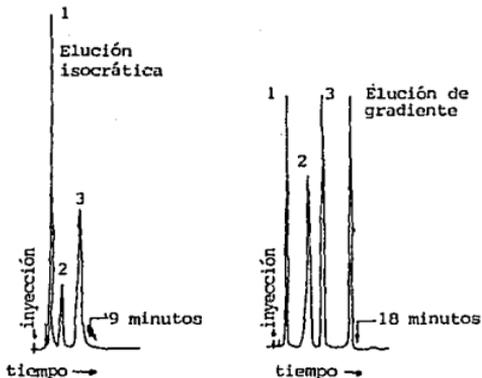


Figura 1.5.- Comparación de la resolución en una elución isocrática y de gradiente.

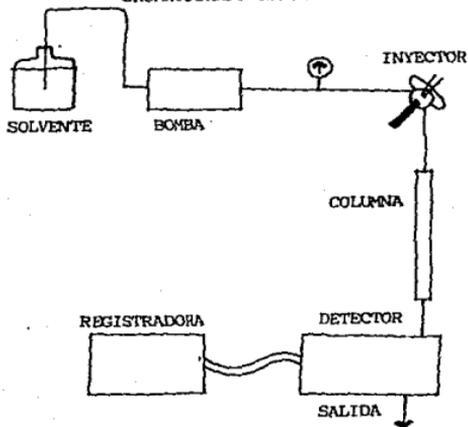
En la figura 1.6 se comparan los componentes de un sistema isocrático y de gradiente.

En el sistema gradiente se añade un disolvente A a otro disolvente B hasta que, eventualmente el sistema cromatográfico solo contiene disolvente A.

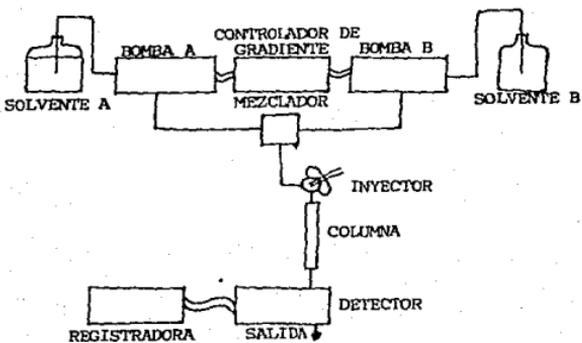
La variación de un disolvente es en función del tiempo y ésta variación comienza con un disolvente A que sea débil pero que dé resolución al principio del - cromatograma y posteriormente se va añadiendo un disolvente B más fuerte para -

Figura 1.6.- Componentes básicos de un cromatógrafo isocrático y de gradiente.

DIAGRAMA DEL SISTEMA ISOCRÁTICO  
CROMATOGRÁFO ISOCRÁTICO



CROMATOGRÁFO DE GRADIENTE



extraer el resto de la muestra con una resolución adecuada en un tiempo razonable.

El cambio de un disolvente en la fase móvil puede ser lineal o no lineal, en la figura 1.7 se ilustran las posibilidades de una elución de gradiente (bibliografía 1 y 4).

La curva convexa se obtiene cuando se utilizan dos disolventes de diferente polaridad, este cambio de composición en la fase móvil provoca un incremento en el valor de  $R_F$  (ver tabla I.3). Para obtener un gradiente lineal se debe emplear una corrida de dos solventes en forma cóncava, en este caso se adiciona un solvente menos polar a otro más polar.

En esta figura por ejemplo, se asume que el gradiente se completa en 20 minutos. A un tiempo  $t=0$  existe 0 % de cloroformo y 100 % de hexano, a un tiempo  $t=20$  minutos hay 100 % de cloroformo y 0 % de hexano.

En este caso en el punto A existe un cierto valor de  $R_F$  que corresponde al punto B con una composición de 11 % de cloroformo y 89 % de hexano.

La curva III se obtiene cuando el gradiente esta a  $t=20$  minutos y la adición de hexano es sobre cloroformo.

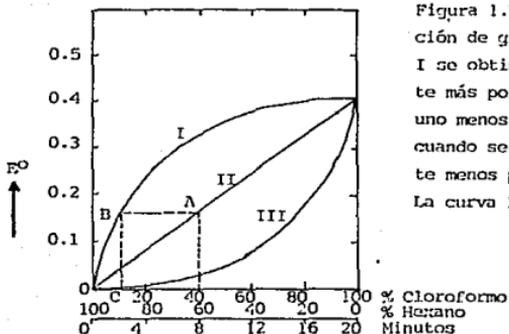


Figura 1.7.- Formas de elución de gradiente. La curva I se obtiene cuando un solvente más polar se adiciona a uno menos polar. La curva III cuando se adiciona un solvente menos polar a uno polar. La curva II es un equilibrio.

### 3. COLUMNAS Y EMPAQUES EN CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION.

Una columna para cromatografía de líquidos consiste normalmente en un tubo de acero inoxidable o de un material resistente a la alta presión, este tubo está lleno de partículas apropiadas según la aplicación cromatográfica. Las partículas son generalmente de 5-15 micras de forma esférica o irregular.

Las dimensiones de una columna son usualmente de diámetro interno de 2-5 mm y de 10-50 cm de longitud. Las paredes internas de una columna son extremadamente lisas y pulidas.

Los materiales de empaque pueden separarse en dos tipos: de tipo poroso o de tipo pelicular. El material de tipo poroso tiene poros de forma esférica o irregular, en los empaques de tipo pelicular se tiene un centro sólido recubierto con una fina película de un material poroso.

En los empaques de tipo poroso, los poros causan que el proceso de difusión de los componentes de la muestra dé picos anchos en los cromatogramas y que con ello disminuya la eficiencia y la resolución de la columna. En el caso de los materiales peliculares llamados también de superficie porosa controlada, elimina la profundidad de los poros y se establece rápidamente la transferencia de masa del soluto en la superficie, eliminando así el efecto de ensanchamiento de los picos.

Los materiales peliculares de forma regular están disponibles en relativamente grandes tamaños y no son tan eficientes como los empaques de partículas muy pequeñas totalmente porosas.

Los materiales porosos de tamaño de partícula de 40 micras o más tienen la ventaja de poseer gran área de superficie por lo que poseen gran capacidad de carga, pero su desventaja es que causan ensanchamiento de las bandas.

En la figura 1.8 se observa el efecto del tamaño de las partículas y de su forma en los picos de un cromatograma; en (A) se observa que se obtienen bandas anchas cuando se usa material poroso de gran tamaño, en (B) el material pelicular permite que las moléculas únicamente migren a través de esta capa fina, re-

sultando unos picos estrechos y, en (C) la teoría de la cromatografía indica - que partículas pequeñas aumentan la velocidad de intercambio entre las fases móvil y estacionaria de los solutos de una muestra de tal forma que se obtiene poca altura entre los platos a velocidades relativamente altas de flujo.

Estos empaques pequeños son de cuerpo poroso y debido a su pequeño tamaño, la migración de la muestra es rápida, además de esto admiten alta capacidad de carga.

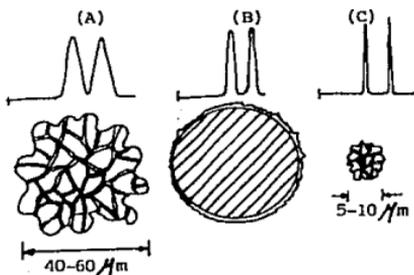


Figura 1.8.- Esquema de los tipos de materiales de empaque para cromatografía líquida y los picos resultantes en cada caso.

Un gran inconveniente de las partículas pequeñas es que el líquido de la fase móvil no puede ser bombeado a presiones prácticas de trabajo, siendo ésta una limitante para este tipo de partículas.

En la tabla I.1 se mencionan algunos empaques y sus características.

Tabla I.1.- Tipos de materiales de empaque para cromatografía de líquidos de alta presión.

Diámetro de partículas	Forma de las partículas	Tipo	Ventajas	Desventajas
40-60 micras	irregular	cuerpo poroso	económico, de baja presión	baja eficiencia
40 micras	regular	pelicular	fácil de empaacar, baja presión	mediana eficiencia y de baja capacidad
5-13 micras	irregular	cuerpo poroso	alta eficiencia y alta capacidad	dificultad para empaacar, alta presión.
10 micras	regular	pelicular	alta eficiencia, relativamente fácil de empaacar	baja capacidad, muy costosa
10 micras	regular	cuerpo poroso	alta eficiencia, capacidad media	difícil para empaacar

Fuente bibliográfica: Yost R. W. Ettore, L. S. Practical Liquid Chromatography, An Introduction, first edition 1980, Perkin-Elmer Ltd - USA

Efectos causados por el diámetro de la columna.

- a) En columnas de diámetro pequeño de 2-5 mm, la capacidad de aceptar muestra es pequeña.
- b) En columnas con diámetro pequeño de 2-5 mm, el análisis posterior de las fracciones que se requieran dificulta un ensayo posterior ya que se tendrían que cromatografiar grandes cantidades de muestra.

- c) Puesto que la capacidad de carga es función de la cantidad de empaque presente, en algunos análisis como cromatografía preparativa, se prefiere usar una columna de mayor diámetro o sea una columna de 4-6 mm que contiene arri la de tres veces más empaque que una columna de 2-2.6 mm.
- d) En columnas de diámetro de 2-5 mm, se emplean volúmenes pequeños de fase mó vil y permiten la detección de pequeñas concentraciones de muestra.
- e) Recientes observaciones hechas en columnas de muy pequeño diámetro revelan que decrece la eficiencia de estas columnas. Cuando se incrementa el diámetro de una columna y se aumenta la velocidad de la fase móvil para tener la misma velocidad lineal, la eficiencia de la separación mejora.

Una explicación de esto es que, en columnas estrechas quedan espacios sin empa-car y por los cuales las moléculas de la muestra viajan libremente sin que sufran partición, estos espacios vacíos se encuentran alrededor de las paredes de la columna y este "volumen abierto" contribuye grandemente al ensanchamiento del pico. Naturalmente este "efecto de pared" también existe en columnas de diámetro grande, ahí la proporción relativa del empaque con sección cruzada al área correspondiente de este volumen abierto es grande, particularmente cuando se usan partículas de diámetro pequeño de 5-10 micras para empa-car bien las áreas de las paredes.

f) Limitaciones del detector (ver sección 6, Detectores).

g) Las cuestiones de uso de líquidos grado HPLC repercute en la selección de una columna de cierto diámetro.

Efectos causados por la longitud de la columna.

Las columnas para cromatografía son usualmente de 25 cm de largo. Si se requieren de más platos teóricos que los que una columna puede ofrecer, se pueden conectar dos o más columnas en serie.

La razón para preferir una columna corta a una larga esta relacionada a la tecnología de empaques de columnas.

Es más difícil preparar una columna larga que una columna corta de alta eficiencia, así unas columnas conectadas en serie proporcionan la misma eficiencia que una columna de longitud similar.

En la tabla I.2 se mencionan algunos soportes para recubrirse con alguna fase estacionaria para uso en cromatografía líquida-líquida.

Tabla I.2.- Soportes para recubrir con fase estacionaria en CLL

Tipo de Soporte	Nombre	Area de Superficie (m <sup>2</sup> /g)	Tamaño de Partícula (micras)	Rango en % de Peso de Líquido para Recubrir
<u>Soporte Poroso</u>				
Tierra de diatomeas	Chromosorb LC-1	10	37-44	5-30
Cuentas de sílica porosa	Porasil C	50-100	37-75	5-15
	Spherosil XOA-075	50-100	40	5-15
	Zorbax-PSM 1000	15	6	10-30
Sílica gel	LiChrosorb SI-100	250	5,10,30	10-30
<u>Soportes Películas</u>				
"Sílica inactiva"	Zipax	1	25-37	0.5-2
	Liqua-Chrom	10	44-53	0.6-1.8
	Corasil I	7	37-50	0.5-1.5
"Sílica activa"	Perisorb A	10	30-40	0.5-1.5
	Adsorbente Vydac	12	30-44	1.5-3

Fuente Bibliográfica: Leon Roberto, Ph. D. El libro básico para Cromatografía - de Líquidos. Primera Edición 1982, Miltron Roy Company, St. Petersburg, Florida. USA.

Tabla I.3.- Sistemas Cromatográficos Líquido-Líquido

FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL
<u>CLL de Fase normal</u>	
B,B'-oxidipropionitrilo	Pentano, ciclopentano, hexano, heptano, isoctano
1,2,3-tris(2-cianoetoxi)propano	
Carbovar: 600	Los mismos, pero modificados - con 10-20 % de cloroformo, diclorometano, tetrahidrofurano, acetonitrilo, dioxano, etc.
Trietilenglicol	
Trimetilenglicol	Di-n-butil eter
Etilenglicol .....	
Dimetilsulfóxido .....	Isoctano
Agua/etilenglicol .....	Hexano/tetracloruro de carbono
Etilendiamina .....	Hexano
Agua .....	n-Butanol
Etilenglicol .....	Nitrometano
Nitrometano .....	CCl <sub>4</sub> /Hexano
<u>CLL de Fase inversa</u>	
Cianoetilsilicona .....	Metanol/Agua
Dimetilpolisiloxano .....	Acetonitrilo/Agua
Heptano .....	Metanol acuoso
Polímeros de Hidrocarbóno .....	Metanol/Agua

Fuente bibliográfica: Snyder L.R. Introduction to Modern Liquid Chromatography. Second Edition. A Wiley-Interscience Publication; John Wiley & sons. Inc. Englan 1979.

#### 4. FASE MOVIL EN CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION.

Los disolventes que se utilizan como fases móviles deben reunir ciertas características:

- a) El solvente debe estar libre de partículas, antes de entrar al sistema, una de las razones para ello es que puedan tapan la columna. Se deben filtrar por filtros de 0.2 - 0.45 micras.
- b) Deben estar libres de gases que tengan disueltos. las burbujas de aire pueden causar señales erróneas en el detector; se debe colocar la fase móvil en un baño de ultrasonido.
- c) El agua que se usa como fase móvil debe estar exenta de material orgánico, libre de dióxido de carbono ya que altera su pH y debe ser agua redestilada o de grado HPLC.

La selección de los líquidos para una fase móvil depende de muchos parámetros; la polaridad juega un papel muy importante, pero la viscosidad y otras características propias de cada solvente influyen en un proceso cromatográfico.

#### Propiedades de los solventes:

Es necesario conocer la longitud de onda a la que un solvente absorbe luz, es decir conocer su "cutoff" o en otros casos su índice de refracción.

La viscosidad y el punto de ebullición son dos propiedades que se acompañan en un solvente. Se prefieren solventes que ebullican a 20° - 50° C, arriba de la temperatura de trabajo y que su viscosidad no exceda de 0.5 centipois, a la misma temperatura. Los solventes de bajo punto de ebullición son difíciles de usar en bombas reciprocantes ya que tienen la tendencia de formar burbujas en el compartimiento del pistón.

Por otro lado, las mezclas de este tipo de solventes son muy volátiles por lo que su composición cambia en la fase móvil. Los solventes de alto punto de ebullición tienen excesiva viscosidad y con ello reducen la transferencia de masa

en las fases estacionaria y móvil, además de que requieren de altas presiones para bombearlos.

La miscibilidad de los solventes es importante en cromatografía de partición y en procedimientos de limpieza de muestra en donde se aplican comunmente técnicas de separación extractivas.

Otras características a considerar son: los solventes deben ser compatibles con el detector, por ejemplo los solventes aromáticos son incompatibles con detectores UV-visible y con los de fluorescencia. Deben ser capaces de disolver la muestra, la reactividad de los solventes es también un factor a considerar debido a que muchos solventes tienen la tendencia a reaccionar con la muestra o a polimerizarse en presencia de algunas fases estacionarias.

Las propiedades de toxicidad y de flamabilidad son factores que hay que tomar en cuenta para elegir un solvente como fase móvil, además de las cuestiones de costos y de disponibilidad.

Las velocidades de flujo de la fase móvil se prefieren pequeñas porque aumentan la eficiencia, en columnas de 2-5 mm de diámetro se usan velocidades de 1-2 ml/min. Al aumentar la velocidad de flujo se aumenta la presión linealmente; la presión por sí misma no ayuda en nada al sistema de separación por lo que es un parámetro pasivo.

La fase móvil, muchas veces hace que se involucren varios mecanismos de separación en un proceso cromatográfico, por ejemplo en una columna con fase estacionaria ligada se involucran mecanismos de adsorción y de partición a la vez.

Algunas otras características de los solventes que se usan como fases móviles deben tomarse en cuenta. En la tabla I.4 se mencionan otros parámetros de los solventes.

Los valores de  $E^o$  son un parámetro de la fuerza del solvente. Estos valores son relacionados al calor generado cuando son adsorbidos por la alúmina.

El parámetro  $P'$  es un índice de su polaridad de cada solvente y este parámetro es muy importante en procesos de adsorción o de partición (bibliografía 1-8).

Tabla I.4.- Propiedades de solventes para uso en cromatografía de líquidos

Solvente <sup>a</sup>	Cutoff <sup>b</sup> UV	IR <sup>c</sup>	Punto de Ebullición (°C)	Viscosidad (cp, 25°C)	p <sub>d</sub>	ρ <sub>0</sub> e	Solubilidad en agua <sup>f</sup>	Constante Dieléctri- ca, ε <sub>g</sub>
Isoctano*	197	1.389	99	0.47	0.1	0.01	0.011	1.94
n-Heptano*	195	1.385	98	0.40	0.2	0.01	0.010	1.92
n-Hexano*	190	1.372	69	0.30	0.1	0.01	0.010	1.88
n-Pentano**	195	1.355	36	0.22	0.0	0.00	0.010	
Ciclohexano	200	1.423	81	0.90	-0.2	0.04	0.012	2.03
Ciclopentano*	200	1.404	49	0.42	-0.2	0.05	0.014	1.97
Tetracloruro de Carbono	265	1.457	77	0.90	1.6	0.18	0.008	2.24
Etil éter**	218	1.350	35	0.24	2.8	0.38	1.3	4.3
Cloroformo*	245	1.443	61	0.53	4.1	0.40	0.072	4.8
Etanol	210	1.359	78	1.08	4.3	0.88	miscible	24.6
Acetonitrilo*	190	1.341	82	0.34	5.8	0.65	miscible	37.5
Dioxano	215	1.420	101	1.2	4.8	0.56	miscible	2.2
Tetrahidrofu- rano*	212	1.405	66	0.46	4.0	0.57	miscible	7.6
Metanol*	205	1.326	65	0.54	5.1	0.95	miscible	32.7
Agua		1.333	100	0.89	10.2			80.0

Fuente bibliográfica: Snyder L.R. Introduction to Modern Liquid Chromatography, Second Edition, A Wiley - Interscience Publication, England 1979.

a (\*) De baja viscosidad ( $\leq 0.5$  cp) y de p. ebullición conveniente ( $> 45^\circ\text{C}$ ); (\*\*) de baja viscosidad y -- bajo punto de ebullición.

- b Longitud de onda aproximada, abajo de ésta el solvente es opaco.
- c Índice de refracción a 25°C
- d Parámetro de polaridad del solvente
- e Parámetro de fuerza del solvente para CSL en alúmina
- f Por ciento de agua
- g a 20°C

5. MECANISMO DE LA CROMATOGRAFIA DE ADSORCION, PARTICION Y LA CROMATOGRAFIA DE FASES LIGADAS.

ADSORCION

La polaridad de una molécula surge de la presencia de ciertos grupos funcionales, en general si una molécula tiene más de un grupo funcional, el más polar es el que mayor afecta la elución.

En la figura 1.9 se considera una columna empacada con sílica gel, una fase móvil de acetona y la muestra que es una amina. Las moléculas de la muestra son adsorbidas por la superficie polar de la sílica, ésta adsorción es constantemente bombardeada por el movimiento de la corriente de la fase móvil.

Este flujo debilita el enlace muestra-empaqué permitiendo que la corriente de fase móvil casi iguale la carga de la muestra, desalojando a las moléculas que fueron adsorbidas y que son arrastradas por la corriente del solvente. Posteriormente, estos sitios vacíos son ocupados por moléculas de solvente que, cuando se acercan moléculas de soluto son más afines de adsorberse estas moléculas de soluto. Ahora, nuevamente la corriente de fase móvil desaloja a las moléculas de soluto que fueron adsorbidas y así en etapas sucesivas se lleva a cabo la adsorción y desadsorción de muestra y solvente.

Se puede entender que es muy grande el número de estos pasos o etapas y que, dependiendo de la polaridad de los componentes invertirán mayor o menor tiempo en estas etapas (bibliografía 1,4,6,8,14 y 15).

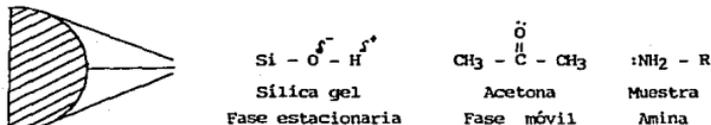


Figura 1.9.- Mecanismo de la adsorción

## PARTICION

El proceso es una partición de un soluto en dos líquidos inmiscibles. El coeficiente de partición se define como:  $K = \frac{C_s}{C_m}$ , donde:

$C_s$  es la concentración del soluto en la fase estacionaria y,

$C_m$  es la concentración del soluto en la fase móvil.

Supóngase que la muestra es una mezcla de los componentes A y B y que la fase - móvil y estacionaria se han seleccionado para que los coeficientes de partición sean diferentes. Admítase que  $K_B$  es mayor que  $K_A$ , ver figura 1.10.

Esta situación se representa en la figura 1.10 (a) donde la zona contiene a A y B. Después se añade la fase móvil a la columna y se permite que fluya. Conforme esta fase móvil penetra en la zona de la muestra, el equilibrio de distribución requiere que una fracción de cada A y B pase a la fase móvil para satisfacer las expresiones para  $K_A$  y  $K_B$  y, puesto que  $K_A$  es más pequeño que  $K_B$ , entrará mayor proporción de A que de B en la fase móvil.

Conforme más fase móvil entra en el empaque, la proporción del solvente arrasando a A y B va entrando a la región del empaque. Ahora, el equilibrio de - distribución requiere el paso del soluto de la fase móvil a la estacionaria, - puesto que en esta región de la columna la fase estacionaria no contiene soluto.

Así, ambos A y B se ven obligados a descender por la columna y, puesto que el - soluto únicamente puede avanzar por la columna mientras está en la fase móvil, el soluto que invierte más tiempo en la fase móvil migrará más rápidamente de - la columna. El compuesto A evidentemente será el que migre más rápido puesto - que tiene el coeficiente de partición o distribución más pequeño. Este efecto se ilustra en la figura 1.10 (b) que muestra la zona de A desplazándose ligeramente hacia adelante de B. Mientras tanto el proceso de partición ha despojado de soluto las partes de cabeza del solvente y la fase móvil que obviamente se - mueve más rápido que el soluto A, se adelantará más todavía, como se observa en la figura 1.10 (b).

El proceso del paso de la fase móvil através de la columna continua con los resultados que se observan en la figura 1.10 (c) y (e). Por último, las zonas -

que viajan a diferentes velocidades quedan por completo separadas.

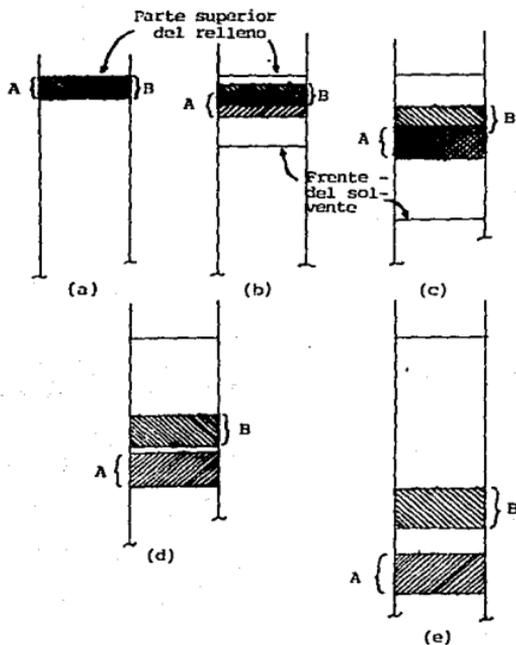


Figura 1.10.- Progreso de la separación por partición de dos solutos A y B. (bibliografía 5 y 6).

## FASES LIGADAS

Debido a los problemas que se tienen en una cromatografía de partición clásica, de que la fase estacionaria es desalojada por la fase móvil, la cromatografía de alta presión utiliza fases estacionarias ligadas químicamente al soporte de la columna.

El mecanismo de separación en este tipo de cromatografía no está bien establecido, más bien se han propuesto que existen dos mecanismos en una separación: un mecanismo de adsorción y un mecanismo de partición.

El proceso de adsorción es de los solutos de la muestra en la superficie o en los poros del soporte delimitado por el recubrimiento orgánico.

El proceso de partición es entre los sustituyentes dimetilalquílicos que forman el empaque y la fase móvil, en el caso de una fase inversa.

Se ha sugerido que los sustituyentes que forman el empaque actúan como cristales líquidos formando una fase líquida ordenada y que estos recubrimientos orgánicos presentan más o menos una fase líquida estacionaria como en el caso de una cromatografía líquido-líquido clásica.

En la tabla I.5 se mencionan las fases ligadas más frecuentemente usadas en CLAP.

Tabla I.5.- Fases ligadas más frecuentemente usadas en CLAP

Modo	Grupo Funcional Terminal	Estructura del Grupo Ligado
Fase Normal	Amino	-NH <sub>2</sub>
	Ciano (nitrilo)	-CN
	Diol	$  \begin{array}{c}  \text{-Si-O-CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-OH} \\    \qquad \qquad   \\  \text{O} \qquad \qquad \text{OH} \\    \\  \text{-Si-O-CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-OH} \\    \qquad \qquad   \\  \text{O} \qquad \qquad \text{OH} \\    \\  \text{-Si-O-CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-OH} \\    \qquad \qquad   \\  \text{O} \qquad \qquad \text{OH}  \end{array}  $
Fase Inversa	Octadecilsilano	$\text{>Si-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_{16}\text{-CH}_3$
	Dimetilsilano	$  \begin{array}{c}  \text{CH}_3 \\  \diagdown \text{Si} \diagup \\  \text{CH}_3  \end{array}  $
	Octilsilano	$\text{Si-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-CH}_3$
	Fenilsilano	$\text{>Si-} \langle \text{---} \rangle \text{-OH}$

## 6. DETECTORES

Lo que tratamos de obtener através del detector es sensibilidad, rango de señal y linealidad. La alta sensibilidad es esencial cuando se realizan análisis de trazas.

Un detector universal medirá características de todas las moléculas mientras - que un detector selectivo medirá solo las moléculas con ciertas características.

Las variaciones en la intensidad de la luz causadas por la absorción de luz ultravioleta, emisión de fluorescencia o cambio en el índice de refracción son monitoreados como cambios en la producción de voltaje. Estos cambios de voltaje son graficados en una carta y frecuentemente alimenta a un integrador o computadora para producir los tiempos de retención y las áreas de los picos.

Requerimientos básicos de un detector:

### a) Eficiencia de la celda.

Los detectores son sistemas de flujo conectado y continuamente monitorean ciertas características de los eluatos de la columna. Es muy importante seleccionar la celda para que las bandas separadas y sus impurezas no se ensanchen, de otro modo es inútil emplear una columna que separe diez componentes en dos minutos si estos componentes se mezclan otra vez en la celda del detector.

El término eficiencia de la celda se usa para definir la capacidad de la celda para mantener fuertemente separados los componentes con un mínimo de dilución en la celda. Esta dilución puede dar origen a picos anchos, reducción de las alturas, picos traslapados o picos coleados en el cromatograma.

Un pico ancho es debido a la difusión longitudinal, es decir que la misma cantidad de muestra ocupa un gran volumen de fase móvil. La reducción de la altura se debe a que una misma cantidad de muestra con un pico ancho disminuye la altura para corresponder a la misma área bajo la curva.

Se habla de picos traslapados cuando los máximos de los picos de dos componentes están en la misma posición, lo cual se debe a que el incremento de la anchura

ra es tal que se encima con el área del otro pico.

Los picos coleados se presentan si las partes de la celda son bañadas insuficientemente por la corriente de la fase móvil y las moléculas de los solutos en esas áreas son capaces de absorber otra vez.

Cabe mencionar que los detectores utilizan celdas de bajo volumen (10 microlitros) para hacer eficiente el lavado y prevenir estos problemas.

b) Ruido y desvíos de la línea base.

Los picos que se obtienen son deflecciones de la línea base y si estos son lo suficientemente largos no hay problemas para distinguirlos, después de un pico es importante que la línea base sea horizontal, libre de ruidos y de pulsaciones.

El ruido de la línea base es una variación corta de tiempo sobre la misma línea continua, aparece como una serie de pequeños picos, ondas o líneas verticales, algunas veces llamadas "pasta o hierba". La importancia práctica del ruido se debe a que limita la sensibilidad del detector.

Se considera que el límite para la altura de un pico de interés es de dos veces la señal de ruido causada por el detector, figura 1.11.

La posible desviación de la línea base es llamada impulso, ver figura 1.11. A un límite de tiempo marcado por las especificaciones de un detector no debe haber impulsos de la línea base, esto es una medida de este factor (bibliografía 1-4).

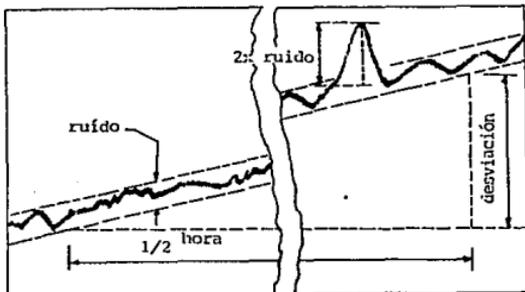


Figura 1.11.- Esquema del ruido producido por el detector, la desviación de la línea base y el tamaño límite de un pico de interés.

## DETECTORES UV/VISIBLE

La utilidad de un detector no solo es monitorear los efluentes de la columna a una u otra longitud de onda, sino que también permiten que el flujo sea detenido atrapando al compuesto aislado en la celda de tal manera que se puede obtener un espectro completo del compuesto u otro tipo de información, figura 1.12.

Los detectores de onda fija utilizan una lámpara de vapores de mercurio a baja presión para una longitud de 254 nm, estos detectores son capaces de detectar nanogramos de materiales que absorben fuertemente. Muchos detectores de onda fija tienen filtros para leer a longitudes diferentes de 254 nm pero su utilidad es limitada.

También están disponibles detectores de onda fija a 214 y 280 nm.

Los detectores de onda variable ofrecen varias ventajas sobre los de onda fija: mejor sensibilidad que a 254 nm y mejor señal que la que se obtiene con filtros para leer a otras longitudes de onda. Debido a que los compuestos tienen diferente absorptividad a diferentes longitudes de onda, estos detectores tienen la facilidad de cambiar su longitud para indicar en donde se encuentra la absorción máxima.

La operación de paro del flujo combinada con el barrido de un pico adiciona una nueva capacidad para obtener mejor información de la obtenida con un tiempo de retención, con ello se puede evaluar una mejor longitud de onda para un análisis o para hacer un cambio de longitud cuando existen compuestos que absorben a la misma longitud de onda pero con diferente intensidad.

En los detectores, la sensibilidad se expresa en unidades de absorbancia en toda la escala AUFS, éstas unidades se relacionan al ajuste del detector "setting" para representar un pico en la carta del graficador.

En cromatografía un pico representa una señal cuantitativa de un componente. La señal grabada en el papel puede tener diferentes magnitudes: de partes por millón a concentraciones en por ciento. Se pueden seleccionar varios rangos de amplificación dependiendo de la concentración, es decir que podemos hacer que la exhibición visual de un pico represente pequeñas o altas concentraciones.

Debido a la naturaleza linealizante del amplificador, el rango que se usa para detectar la señal es expresado de diferente manera para dar la absorbancia correspondiente a un particular punto de toda la escala del graficador. Este valor se llama unidades de absorbancia (correspondientes a) en toda la escala - AUFS.

Con este valor la absorbancia de un pico se calcula fácilmente, por ejemplo, si la clave es 0.01 AUFS, entonces un pico que representa el 40% de toda la escala corresponde a 0.004 unidades de absorbancia, en cambio a una puesta (setting) de 0.04 AUFS, un pico con 25% de toda la escala, corresponde a 0.01 unidades de absorbancia (bibliografía 1-4).

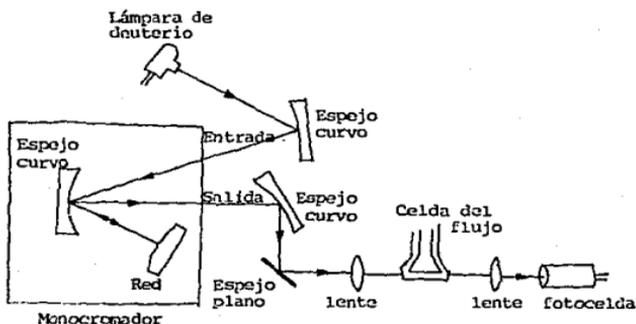


Figura 1.12.- Esquema óptico de un típico detector UV para cromatografía de líquidos.

## 7. BOMBAS EN CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION.

Se requiere de una bomba con un máximo de presión de 6000 psi, además debe reunir otras características:

- a) Debe ser flujo continuo.
- b) Estar libre de pulsaciones.
- c) Que tenga un apagado automático cuando se exceda mucho la presión.
- d) De fácil manejo, bajo costo y que tenga control de gradiente automático.

Las bombas pueden clasificarse en dos grupos:

- 1.- Bombas de presión constante o bombas de presión positiva.
- 2.- Bombas de flujo continuo o constante o bombas de flujo positivo.

Las bombas de flujo constante son las usadas actualmente.

Las bombas de flujo continuo son de dos tipos: reciprocantes y de desplazamiento positivo (tipo jeringa).

Las ventajas de estos sistemas son inherentes a la capacidad que tengan de reproducir el volumen, sin hacer caso de los cambios en la viscosidad de la fase móvil, de bloqueos en la columna o de cualquier acontecimiento que se tenga en el límite de presión de la bomba.

Bombas reciprocantes: este tipo de bombas son de pistón solamante, es una palanca con rotación excéntrica que forza al pistón para impulsar el líquido através de una llave o válvula de paso. La velocidad de bombeo se ajusta controlando la distancia del pistón retractante, limitando así la cantidad de líquido empujado por cada golpe del pistón.

El propósito de la válvula de paso es asegurar que el líquido se mueva en una sola dirección.

Es obvio que estas bombas liberan una serie de "pulsaciones" en la fase móvil. -- Si el flujo através del detector es también de esta manera entonces es seguro que se distribie, especialmente cuando se manejan altas sensibilidades.

Estas bombas estan equipadas con un dispositivo que absorbe estas pulsaciones, pero estos reguladores retienen una cantidad significativa de fase móvil por lo que

es necesario hacer una purga en los cambios de fase móvil.

Otra variante de estas bombas es que tienen un medidor de presión, el cual también tiene un regulador de las pulsaciones.

Un sistema más eficiente para disminuir las pulsaciones es el que tienen las bombas reciprocantes de doble pistón o cabeza. Ambos compartimientos de los pistones son movidos por un solo engrane o palanca hidráulica.

Este mecanismo permite que los dos pistones compensen sus pulsaciones, es decir, que los dos flujos se solapen reduciendo la pulsación.

Las ventajas de estas bombas son ilimitadas ya que su capacidad de bombeo es de largos períodos, sin embargo su capacidad está limitada a la limpieza de las fases móviles y del sellado de las válvulas.

Las bombas existentes están equipadas con sistemas sofisticados para eliminar o disminuir estos defectos:

- Están equipadas con sistemas computarizados para mover los pistones y solamente para al máximo los golpes de la bomba, haciendo que las pulsaciones sean indetectables.
- Emplean válvulas de paso de pequeño volumen para permitir un funcionamiento confiable a flujos hasta de 0.1 ml/min.
- Cada válvula de paso tiene doble sello con un balón de reserva en caso de que el primero se interfiera con impurezas.
- Tienen pocas partes en movimiento y de fácil mantenimiento.
- Están disponibles en rangos de flujo de 0.1 - 30 ml/min.

En la figura 1.13 se esquematiza una bomba de un solo pistón y una válvula de paso.

es necesario hacer una purga en los cambios de fase móvil.

Otra variante de estas bombas es que tienen un medidor de presión, el cual también tiene un regulador de las pulsaciones.

Un sistema más eficiente para disminuir las pulsaciones es el que tienen las bombas reciprocantes de doble pistón o cabeza. Ambos compartimientos de los pistones son movidos por un solo engrane o palanca hidráulica.

Este mecanismo permite que los dos pistones compensen sus pulsaciones, es decir, que los dos flujos se solapen reduciendo la pulsación.

Las ventajas de estas bombas son ilimitadas ya que su capacidad de bombeo es de largos períodos, sin embargo su capacidad está limitada a la limpieza de las fases móviles y del sellado de las válvulas.

Las bombas existentes están equipadas con sistemas sofisticados para eliminar o disminuir estos defectos:

- Están equipadas con sistemas computarizados para mover los pistones y solamente para al máximo los golpes de la bomba, haciendo que las pulsaciones sean indetectables.
- Emplean válvulas de paso de pequeño volumen para permitir un funcionamiento confiable a flujos hasta de 0.1 ml/min.
- Cada válvula de paso tiene doble sello con un balón de reserva en caso de que el primero se interfiera con impurezas.
- Tienen pocas partes en movimiento y de fácil mantenimiento.
- Están disponibles en rangos de flujo de 0.1 - 30 ml/min.

En la figura 1.13 se esquematiza una bomba de un solo pistón y una válvula de paso.

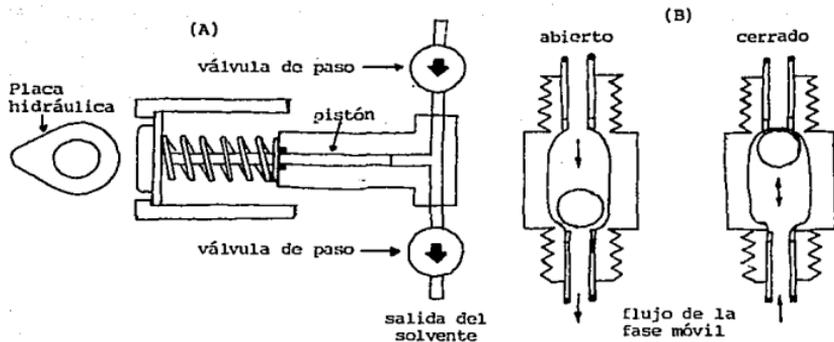


Figura 1.13.- En (A), se esquematiza una bomba recíproca de un solo pistón y en (B), la operación de una válvula de paso.

CAPITULO SEGUNDO

ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1. METODOS EXISTENTES PARA VALORAR CLORURO DE BENZALCONIO.

El análisis del cloruro de benzalconio por CLAP ya ha sido reportado (27). Este método se desarrolló para sistemas oftálmicos, en donde el cloruro de benzalconio está en niveles de concentración de 0.004%; ésta concentración es muy cercana a la que se tiene en la pomada (0.005%). Este método reporta la cuantificación de los homólogos de C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub> y C<sub>18</sub>, indicando que éstos se encuentran en mayor proporción y que son fácilmente visibles en los cromatogramas.

Sin embargo, los excipientes que existen en una solución oftálmica no se comparan con los de una pomada: el cloruro de benzalconio está en solución en un sistema de este tipo, en cambio, en una pomada está disuelto en una emulsión de excipientes grasos e hidrofílicos, además de que la concentración de los excipientes en la pomada son tan altas que pueden en un momento dado enmascarar al cloruro de benzalconio.

El método por CLAP para sistemas oftálmicos involucra la inyección directa de la solución oftálmica. Este procedimiento no sería aplicable a nuestra pomada debido a la gran cantidad de excipientes y de otros principios activos que absorben fuertemente al ultravioleta.

Otro método (28) involucra el análisis del cloruro de benzalconio en sistemas oftálmicos, en los cuales se hace un tratamiento previo de las muestras. Forman un complejo entre el cloruro de benzalconio y el anaranjado de metilo y una posterior extracción con 1,2-dicloroetano. Este método hace la sugerencia de hacer una extracción previa a la inyección al CLAP, ya que hace la observación de que existen interferencias al inyectar directamente al CLAP.

El método involucra la preparación de los homólogos C<sub>10</sub> y C<sub>18</sub> para favorecer la recuperación y la precisión del método. La síntesis de estos homólogos comprenden un tiempo de preparación de más de 48 horas, por lo que es inapropiado para un análisis de control, además de los inconvenientes que se explicaron antes.

Se ha reportado el análisis de cloruro de benzalconio por CG, en el cual se degrada la molécula para formar aminas terciarias de cada homólogo y se compara con estándares para su identidad y composición.

El análisis está desarrollado para una concentración de 0.5 % de principio activo, que es una concentración muy alta comparada con la que se dispone en nuestro problema.

El método por CG está probado para muestras sencillas y no reporta si es aplicable para formas farmacéuticas más complejas, (29).

También se han establecido métodos de análisis por espectroscopía de ionización de masas o de láser de masas (30 y 35).

Existen otros métodos de valoración para el cloruro de benzalconio, los métodos de titulación directa (40, 42, 43 y 44).

Estos métodos utilizan un agente tensoactivo de tipo aniónico en una titulación en medio acuoso. Se utiliza azul de bromofenol como indicador.

Para el caso del cloruro de benzalconio se emplea lauril sulfato de sodio, dicotil sulfamato de sodio o tetrafenilborato como agentes titulantes.

Estos métodos directos pueden emplear una titulación con indicadores o con un electrodo adecuado en una valoración potencimétrica.

Las titulaciones se reportan para soluciones de cloruro de benzalconio de 0.1 % o más. Evidentemente una titulación directa a la pomada no es posible.

Otros métodos emplean titulaciones con yodato de potasio con muestras de cloruro de benzalconio de alrededor de 1 % y son aplicables al principio activo como materia prima, (21).

Método de Extracción: Este método se basa en la formación de un par iónico colorido entre la sal de amonio cuaternario y un anión colorido como el azul de bromofenol o el anaranjado de metilo. Este complejo es extraído de soluciones alcalinas por un solvente no polar como el benceno o el dicloroetano.

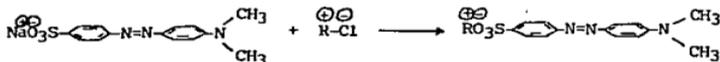
El método es aplicable para soluciones diluidas de cloruro de benzalconio ya que puede detectar hasta 1 ppm de la sal de amonio cuaternario.

La intensidad del color formado es leída en un espectrofotómetro y se obtiene una relación lineal entre la absorbancia del complejo y la concentración usada.

En el caso del cloruro de benzalconio se emplea como anión colorido el anaranjado de metilo, el complejo colorido es extraído de soluciones acuosas de pH 8-10, con 1,2-dicloroetano y una posterior lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 422 nm.

Otro compuesto formador de par iónico que puede usarse es el azul de bromofenol en medio alcalino con carbonato de sodio y una posterior extracción con dicloroetano.

Esta reacción del compuesto de amonio cuaternario se puede representar para el cloruro de benzalconio como sigue:



R<sup>⊕</sup> = catión de amonio cuaternario

En este tipo de métodos no se incluye las interferencias con otro tipo de componentes que pudiera tener una solución, por lo que se trató experimentalmente de aplicar dicho método al cloruro de benzalconio en la pomada, pero el complejo colorido se extraía con otros excipientes que también daban color. Posteriormente se encontró que los excipientes como los polietilenglicoles y las vaselinas interferían haciendo que el anaranjado de metilo fuera extraído aún sin haber formado el complejo.

Debido a esto, las lecturas de absorbancia de la muestra problema no correspondían con las absorbancias de una curva estándar, (32, 33, 36 y 37).

Existe un método de valoración por cromatografía de par-iónico (45) para cloruro de benzalconio, el cual utiliza como ión counterion al ácido heptanosulfónico, el

cual es adicionado a la fase móvil. Aquí ocurre la neutralización de la carga positiva del cloruro de benzalconio y la cadena alquílica del ácido heptanosulfónico que se orienta a la superficie de la fase estacionaria de la columna de fase inversa. Esta cadena sufre un proceso de partición y así se logra la detección del cloruro de benzalconio.

La bibliografía no reporta la aplicación de este método a formas farmacéuticas, además de emplear una fase móvil diferente a la usada en el presente trabajo.

#### PARAMETROS CROMATOGRAFICOS

En un cromatograma podemos describir un pico en base a varias características: El tiempo de retención  $t_R$ , el cual se define como el tiempo total que invierte un compuesto desde el momento en que se inyecta al cromatógrafo y en alcanzar una altura máxima.

El tiempo real en que un compuesto está en la fase estacionaria es  $t_R'$ , el cual considera el tiempo en que sufre las interacciones con la fase estacionaria y la fase móvil.

Una indicación de que tanto un compuesto es retenido en la columna, nos lo da el parámetro  $k$  o  $k'$  llamado factor de capacidad

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

donde  $t_M$  es el tiempo de retención de la fase móvil.

Este parámetro nos indica que valores menores de 1 pueden obtenerse para que un compuesto pueda ser separado de la fase móvil y de sus impurezas; estando en una mezcla de compuestos los demás componentes deberán tener factores de capacidad mayores de 1 pero no tan grandes que alarguen el tiempo de análisis, se recomienda entre 10 y 15.

Las características más importantes de la forma de un pico son: anchura del pico la cual es la distancia medida por trazado de líneas de los puntos de inflec

ción de la línea base del pico, ésta anchura es  $W_b$ .

La anchura del pico al 50 % de su altura es  $W_h$ , la cual es el ancho a la mitad del pico.

Otra anchura de un pico es la denominada anchura a los puntos de inflexión del pico.

La medición de estas dimensiones puede hacerse manual considerando el pico como una curva Gaussiana en donde cada anchura es una función de la desviación estándar.

Otros parámetros de medición del pico son: el área total que es directamente -- proporcional a la concentración del compuesto y que se emplea en el análisis - cuantitativo.

La altura máxima es una buena estimación para la evaluación de la concentración de un compuesto puesto que es una indicación de la máxima concentración cuando el pico representa una curva ideal de distribución Gaussiana.

La eficiencia de una columna cromatográfica está influenciada por el número de platos teóricos, la cual puede definirse como una etapa o paso en que las moléculas de un soluto sufren partición en la columna. El número total de etapas o procesos de partición constituyen el número de platos teóricos, en otras palabras, las moléculas del soluto avanzan a lo largo de la columna de acuerdo a -- sus afinidades a la fase estacionaria y fase móvil.

Como una semejanza podemos describir un plato teórico en un proceso de destilación como una evaporación y una condensación y en cromatografía como una separación y una retención de la fase estacionaria.

El número de platos teóricos se obtiene como:

$$n = 16 \left( \frac{t_R}{W_b} \right)^2$$

El número de platos teóricos depende de la longitud de la columna y en base al

número de platos teóricos podemos saber la altura de un plato teórico HETP:

$$h = \frac{L}{n}$$

Una columna se considera más eficiente si la altura de cada plato teórico es más pequeña y si su número es mayor que los de otra columna.

Existe otro factor que describe la separación de dos picos adyacentes, el factor de separación  $\alpha$  nos indica la posición relativa de dos picos. Se define como la razón de los tiempos de retención en la fase estacionaria de los picos A y B:

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

Para valores mayores de 1 existe separación, en cambio, para valores de  $\alpha$  iguales no hay separación puesto que los tiempos de retención son idénticos.

Este factor, sin embargo, solo nos indica la posición relativa de los dos picos y no proporciona información de la separación. La separación depende de la eficiencia de la columna; así, si dos componentes tienen semejante  $\alpha$ , la resolución será dada por la eficiencia de la columna.

Otro factor que afecta la eficiencia de una columna y por lo tanto la separación, es la velocidad de flujo. Por ejemplo, si la velocidad de flujo es demasiado pequeña, se favorece la difusión longitudinal de las moléculas del soluto puesto que invierten mucho tiempo en la fase móvil, provocando ensanchamiento del pico, en el lado contrario si es bastante rápido, las moléculas no alcanzan a interactuar con los sitios de acción de la fase estacionaria, por lo tanto, la separación se afecta notablemente.

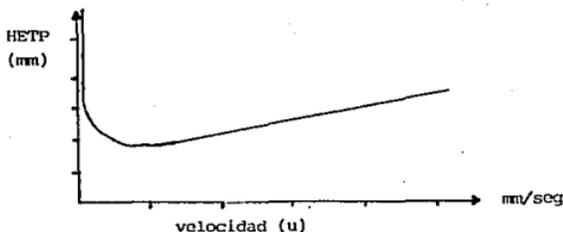
Podemos establecer la velocidad de flujo en base a la longitud de la columna y al tiempo de retención de un compuesto no retenido (frente del solvente) de acuerdo a la ecuación siguiente:

$$u = L / t_M$$

La velocidad de flujo afecta la eficiencia de la columna, a mayores velocidades

de flujo, la eficiencia de la columna disminuye; este efecto podemos observarlo en las llamadas curvas de Van Deemter que implican la velocidad de flujo y la altura de un plato teórico HETP, figura 2.1.

Figura 2.1.- Curva de Van Deemter



En la curva podemos observar que existe una velocidad de flujo en donde se obtiene una alta eficiencia de la columna, con HETP de 0.5 - 1.0mm. En la actualidad el desarrollo de empaques a base de pequeñas partículas y de porosidad controlada puede favorecer la eficiencia de la columna a altas velocidades.

En cromatografía líquida, la meta a seguir es la separación adecuada de una mezcla de componentes o resolución  $R_S$ , la cual se define como la distancia entre los dos centros de las bandas dividida por el promedio de la anchura de la banda.

$$R_S = \frac{(t_2 - t_1)}{(1/2)(tw_1 + tw_2)}$$

donde  $t_2$  y  $t_1$  son los tiempos de retención del componente 1 y 2; y  $tw_1$  y  $tw_2$  son el ancho de la banda.

Cuando  $R_S$  es igual a 1, las dos bandas son razonablemente separadas; para valores mayores a 1, la separación es total y para menores de 1, la separación es pobre.

En condiciones experimentales, la resolución se ve afectada por parámetros como  $k'$  y  $N$  (número de platos teóricos).

En la siguiente ecuación se involucran parámetros experimentales, además de los ya mencionados tal como  $\alpha$  factor de separación. Todos estos parámetros son independientes y podemos optimizar uno antes de continuar con los demás;

$$R_g = (1/4) (\alpha - 1) \sqrt{N} \quad (k' / k' + 1)$$

El factor de separación  $\alpha$  varía por cambios en la composición de la fase móvil y de la fase estacionaria; la eficiencia de la separación representada como  $N$ , - varía con cambios en la longitud de la columna o velocidad del solvente y el término  $(k' / k' + 1)$ , factor de capacidad, varía por cambios en la fuerza del solvente, la disponibilidad de la fase móvil para proveer valores grandes o pequeños de  $k'$  para una muestra dada.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cloruro de benzalconio está presente en la pomada de acetato de hidrocortisona (producto fabricado por la Empresa) en una concentración de 5 mg por 100 g de pomada; ésta cantidad está en contacto con los excipientes y demás principios activos de la pomada. Esta concentración no permite hacer un análisis de este principio activo por métodos volumétricos como el de la USP XXI que involucra una valoración con yodato de potasio.

La presencia de los otros componentes en la pomada imposibilita el uso de este método debido al alto contenido de ellos y a la baja concentración del cloruro de benzalconio presente. Las interferencias de los excipientes no hacen posible el uso de métodos directos de análisis para el principio activo problema.

Los métodos existentes por CLAP ofrecen la limpieza de la muestra de los componentes que afectan a un cierto compuesto de interés, es decir, hacen una separación de los componentes de una mezcla y permiten identificar y cuantificar cada componente. Sin embargo, estos métodos ya existentes son aplicables para formas farmacéuticas líquidas como una solución oftálmica o en una solución donde el cloruro de benzalconio está disuelto junto con otro tipo de constituyentes.

La existencia de grandes cantidades de excipientes provoca un enmascaramiento del cloruro de benzalconio debido a subaja concentración, de esto podemos deducir que no es posible aplicar un método de valoración directo y que es necesario hacer una limpieza de muestra, esto es, hacer una separación de nuestro principio activo de todas las posibles interferencias que tenga.

No se ha reportado un método de separación del cloruro de benzalconio de una forma farmacéutica semisólida, por lo que el problema a resolver es separar el cloruro de benzalconio de los componentes de la pomada pero teniendo en cuenta que no solo la separación es necesaria sino que hay que implementar un análisis capaz de detectar esa mínima cantidad existente del principio activo. La CLAP es un método capaz de detectar mínimas cantidades de una sustancia, pero también esta técnica tiene limitaciones como el que no acepta una mezcla compleja de componentes como los de una pomada, sino que es necesario hacer un tratamiento previo antes de emplear CLAP. En resumen, se requiere de una limpieza de muestra y un posterior análisis cuantitativo del cloruro de benzalconio por CLAP.

### 3. OBJETIVOS EXPERIMENTALES

- a.- Implementar un método de extracción para separar el cloruro de benzalconio de los constituyentes de la pomada.
- b.- Desarrollar un método de análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Presión del cloruro de benzalconio extraído de los componentes de la pomada.
- c.- Validar el método de análisis para determinar cloruro de benzalconio en la pomada problema.

#### 4. HIPOTESIS

Los componentes de la pomada pueden ser separados por una cromatografía en columna de acuerdo a sus afinidades con la fase móvil y a la fase estacionaria. - Así, en un subsecuente análisis cromatográfico por CLAP, es posible identificar y cuantificar al cloruro de benzalconio en las concentraciones existentes en la pomada.

## CAPITULO TERCERO

### DESARROLLO EXPERIMENTAL

#### 1. CONSIDERACIONES PREVIAS.

##### a) Propiedades Farmacológicas del Cloruro de Benzalconio.

Los compuestos de amonio cuaternario se emplean mucho en la industria y en el hogar como agentes detergentes y emulsionantes. Los agentes de acción superficial como el cloruro de benzalconio son bactericidas en bajas concentraciones - in vitro; son activos para gran variedad de microorganismos grampositivos y - - gramnegativos. Algunas bacterias como Pseudomona cepacia son resistentes y se han producido epidemias por el uso de instrumentos que supuestamente se esterilizaron con compuestos de amonio cuaternario. El Mycobacterium tuberculosis es también relativamente resistente. Muchos hongos y virus son susceptibles. El etanol aumenta la actividad germicida, de modo que las tinturas son más efectivas que las soluciones acuosas.

Los agentes aniónicos de actividad superficial antagonizan el efecto de los - - agentes catiónicos (cloruro de benzalconio). Así es que dentro de ciertos límites de tiempo, las acciones bacteriostáticas de los compuestos catiónicos pueden revertirse con jabones y otros agentes aniónicos. La actividad germicida - se reduce también con materia orgánica y otras sustancias reactivas; tales materias son por ejemplo el algodón, la goma (caucho) y otros materiales porosos. Esta adsorción reduce la concentración efectiva del agente y por lo tanto su - eficiencia germicida.

Los antisépticos de amonio cuaternario son relativamente no irritantes para los tejidos en concentraciones efectivas. Humedecen y penetran la superficie de - los tejidos y poseen acciones detergentes, queratolíticas y emulsionantes. Su toxicidad sistémica es relativamente baja, pero se han producido envenenamientos por ingestión oral.

Su actividad es antagonizada por jabones, constituyentes tisulares y pus. Además, cuando se aplican sobre la piel tienden a formar una película por debajo - de la cual las bacterias pueden seguir viables; la superficie interna de la pe-

lícula tiene poco poder bactericida y la superficie externa tiene fuerte poder bactericida. El cloruro de benzalconio no mata esporas, su acción es bastante lenta comparada con la del yodo. Una solución al 0.1 % de cloruro de benzalconio aplicada sobre la piel requiere unos 7 minutos para disminuir la población bacteriana en solo 50 %, la tintura al 0.1 % tiene acción más lenta que el etanol al 70 %.

Los agentes tensoactivos catiónicos interactúan con la queratina y causan daños epidérmicos, aunque los mismos son menores excepto durante el uso continuo. En último término éstas drogas pueden causar respuestas alérgicas ocasionales con el uso crónico, como ocurre con algunas preparaciones desodorantes y lavapañales que pueden causar necrosis cutánea.

#### Mecanismos de Acción.

Los agentes de amonio cuaternario son detergentes y agentes de saneamiento. En medicina se han usado como antisépticos para la piel, los tejidos y las mucosas y como desinfectante de materiales médicos y quirúrgicos.

Los detergentes son bactericidas porque destruyen la integridad de la membrana celular, precipitando o desnaturalizando las proteínas y rompiendo las interacciones de los lípidos de la membrana bacteriana.

Resumiendo, la acción de estos agentes de tensión superficial es solamente sobre la superficie de la membrana bacteriana. Por ejemplo, los compuestos de amonio cuaternario pueden mezclarse con detergentes no iónicos que tienen buena acción solubilizante para proporcionar un agente de limpieza antibacteriano, eliminando por acción mecánica a las bacterias.

#### Usos y Preparados.

Se usan como desinfectantes para esterilizar instrumentos y otros materiales como torundas de algodón y guantes de goma. Sin embargo, la piel, los guantes de goma, las esponjas quirúrgicas de diversos materiales, los endoscopios y los objetos de polietileno o polipropileno absorben a los antisépticos de amonio cuaternario en tal grado que la concentración de la solución puede reducirse apreciablemente.

Colirios con 5 mg de cloruro de benzalconio por 100 ml de solución.

Pomadas con 0.005 - 0.010 g de cloruro de benzalconio por cada 100 g.

Ovulos con 7 mg de cloruro de benzalconio por cada 100 g.

Soluciones con 0.05 mg, tinturas y vaporizadores con 0.133 % de antiséptico y - soluciones para limpieza de lentes de contacto con un contenido de 0.004 g de cloruro de benzalconio por cada 100 ml de solución.

b) Propiedades Físicas del Cloruro de Benzalconio.

Es un polvo amorfo blanco o de color amarillento. Puede ser una masa gelatinosa amarillenta o blanca. Es de sabor amargo, una solución en agua es clara, incolora o amarilla pálido. Las soluciones acuosas son ligeramente alcalinas al papel litmus y hacen espuma cuando se agitan. Es de olor aromático, su coeficiente de fenol es de 429 para Eberthella typhosa a 37° C, para Staphylococcus aureus es de 407. Para su solubilidad ver la tabla III.1.

Tabla III.1.- Solubilidad del cloruro de benzalconio

Solvente	Solubilidad
Agua	muy soluble <sup>a</sup>
Acetonitrilo	muy soluble <sup>a</sup>
Etanol	muy soluble <sup>a</sup>
Metanol	muy soluble <sup>a</sup>
Acetona	muy soluble <sup>a</sup>
Cloroformo	muy soluble <sup>a</sup>
Glicerina	muy soluble <sup>a</sup>
Eter	poco soluble <sup>b,1,2</sup>
Benceno	ligeramente <sup>c</sup>
Hexano	insoluble <sup>d</sup>

a una parte en una parte de solvente o menos.

b una parte en 100 partes de solvente; USP XXI

c una parte en 100-1000 partes de solvente

d una parte en más de 10000 partes de solvente

1 prácticamente insoluble: Farmacopea Martindale 1977

2 insoluble: Farmacopea Francesa 1965.

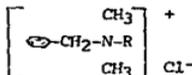
El cloruro de benzalconio es una mezcla de alquilbenzildimetilamonio cloruros - de fórmula general  $(C_6H_5-CH_2-N(CH_3)_2R)Cl$ , donde R es usualmente  $n-C_{12}H_{25}$ , - -  $n-C_{14}H_{29}$ ,  $n-C_{16}H_{33}$ .

Peso molecular promedio 360

c) Propiedades Químicas del Cloruro de Benzalconio.

Los compuestos de amonio cuaternario constituyen un grupo de aminas que pueden considerarse derivadas del cloruro de amonio en el cual diversos radicales sustituyen a los hidrógenos. De ordinario, uno es una cadena alifática de  $C_8$  a -  $C_{18}$ , los demás son grupos alifáticos más cortos, grupos fenílicos, etc.

El cloruro de benzalconio pertenece al grupo de sustancias detergentes tensoactivas. Del tipo catiónicas. Ver figura 3.1



donde R representa una mezcla de alqu coastos de  $C_8H_{17}$  a  $C_{18}H_{37}$ . Los homólogos - -  $C_{12}H_{25}$ ,  $C_{14}H_{29}$  y  $C_{16}H_{33}$  son los que están en mayor proporción.

Figura 3.1.- Estructura del Cloruro de Benzalconio y los homólogos más comunes.

Es incompatible con los detergentes aniónicos y compatible con los no iónicos. Su acción es debida al grupo de amonio cuaternario.

Espectro de absorción al ultravioleta.

El cloruro de benzalconio exhibe en agua los siguientes picos máximos y mínimos: máximo a cerca de 250 nm, 256 nm, 262 nm, 210 nm<sup>a</sup>.  
mínimos a 232 nm, 259 nm, 266 nm.

En acetonitrilo grado HPLC: máximo de interés 262 nm<sup>a</sup> y 210 nm<sup>a</sup>.  
mínimos no se determinaron, aproximadamente los mismos que en agua<sup>a</sup>.

a datos experimentales.

Fase móvil (ver método analítico), máximo de interés 210 nm<sup>3</sup> (bibliografía - - 8-16, 20-26,27,39 y 41).

## 2. ANTECEDENTES EXPERIMENTALES.

En la formulación de la pomada se observa (ver Anexo 1) que el cloruro de benzalconio se encuentra presente en muy pequeña cantidad: 5 mg/100 g de pomada y que existen muchos excipientes que están en muy altas cantidades. Debido a ésta situación fué necesario hacer una limpieza de muestra.

Las cantidades presentes de los excipientes interfieren con la detección del cloruro de benzalconio, además de que existen otros principios activos en la pomada que enmascaran a nuestro principio activo de interés, debido a que también se encuentran en altas concentraciones con respecto al cloruro de benzalconio.

Los métodos reportados (21 y 27), son útiles para cuando éste principio activo se encuentra como:

- principio activo solo
- en concentraciones mayores de 200 mg
- en formulaciones donde el cloruro de benzalconio está en solución (oftálmico) a concentraciones de 0.004 %.

Estos métodos reportan buenos resultados en sus problemas pero al tratar de aplicarlos a nuestro problema, ninguno resultaba satisfactorio.

La necesidad de llevar a cabo una limpieza de muestra y debido a que el método de extracción reportado se aplicó pero no dió resultados satisfactorios, se determinó hacer entonces una cromatografía de adsorción en columna por flujo de gravedad.

El adsorbente que se eligió fué óxido de aluminio. Esta alúmina reunía varias características que la hicieron útil a nuestros propósitos:

- a) Su poder adsorbente es mayor que el de la sílica gel.
- b) Es apropiada para adsorber compuestos muy polares como los polietilenglicol presentes en nuestra pomada.
- c) Estaba disponible para uso en cromatografía de columna. Debido a su tamaño de partícula impedía que se obtuvieran columnas empacadas muy compactas y que hicieran difícil el flujo através de ellas. En cambio, la sílica gel estaba disponible para uso en CCF y presentaba un tamaño de partícula

- muy pequeño que hacía que se produjera un flujo demasiado lento.
- d) La alúmina puede variar su poder adsorbente dependiendo de su activación - con la temperatura.
  - e) Es de fácil manejo para empacar columnas de adsorción.
  - f) Es muy estable, comparada con la estabilidad de la sílica gel que puede actuar como intercambiadora de iones dependiendo del pH.
  - g) Se requería de una cromatografía en columna que ocupara poco tiempo de análisis y que, en cambio, en una columna de partición, el tiempo y los problemas técnicos impedían su uso.
  - h) Se disponía en cantidades suficientes en el laboratorio de control de calidad para llevar a cabo los experimentos necesarios.

En base a todas las características anteriores, se empacaron columnas de óxido de aluminio. Esta alúmina se activó por 2 horas a 110°C, ésto con el fin de eliminar la posible humedad que tuviera y de aumentar su poder adsorbente. El tiempo elegido para su activación fué al azar.

Las fases móviles se eligieron de acuerdo a su polaridad: fases móviles altamente polares como el agua o los alcoholes tienen gran afinidad por los sitios activos de la alúmina, causando que sean retenidos y por ende que no fluyan o que lo hagan a muy bajas velocidades de flujo. Esto aplicado a nuestro problema no era conveniente.

Por otro lado, las fases móviles no polares como el hexano, arrastrarían rápidamente los componentes de la pomada. Los componentes polares de la pomada como son los polietilenglicoles, tienen gran afinidad por los sitios activos de la alúmina, entonces se requería de una fase móvil que arrastrara a estos componentes de tal manera que los fuera separando del cloruro de benzalconio y que a la vez no los retuviera demasiado tiempo.

Cabe mencionar que la separación del principio activo de los demás compuestos se hizo enfocándose a eliminar los excipientes que estaban en gran cantidad como los polietilenglicoles y las vaselinas. Esta manera de atacar el problema se hizo debido a que la proporción de estos dos componentes es muy alta con respecto al cloruro de benzalconio, 79 % y 0.005 %, respectivamente.

Como se trataba de separar al cloruro de benzalconio para permitir un análisis

Los primeros ensayos se hicieron exclusivamente con estándar.

Se pasaron cantidades apropiadas de estándar de principio activo através de la columna, se eluyó con cloroformo y se fueron obteniendo fracciones de 10 ml de disolvente que salía por la columna. Todo el seguimiento de la identificación del cloruro de benzalconio en los eluatos de realizó por lectura de las soluciones al espectro a una longitud de onda de 262 nm.

La lectura al espectro era solo una forma de seguir el desarrollo de la separación del cloruro de benzalconio, es decir, para ver si era retenido o eluido de la columna. Como el espectro de un compuesto permite leer a varias longitudes de onda aunque no sean picos máximos o mínimos y solo esta sujeto a la resolución que se tenga en el cromatógrafo, entonces se aprovechó de esta situación para leer a 262 nm y no en su otro máximo a 210 nm, figura 3.2.

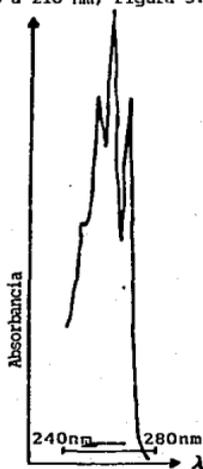


Figura 3.2.- Espectro UV del cloruro de benzalconio en etanol. Espectro corrido de 280-240 nm, existe otro máximo a 210 nm que no se indica aquí. A cualquier  $\lambda$  de este rango existe absorción del Cloruro de benzalconio.

Los resultados de estas primeras experiencias fueron muy favorables debido a - que se observó que el cloruro de benzalconio era retenido en la columna y no se eluía con cloroformo a volúmenes de 100 ml. Todas las lecturas de las fracciones de cloroformo daban identidad negativa.

Ahora era necesario eluir el principio activo de la columna y se usó un solvente con mayor fuerza que el cloroformo. El etanol es el solvente que permite leer a longitudes de onda de hasta 210 nm, además de que no se retiene en la columna tan fuerte como el metanol o el agua y debido a criterios de usar solventes baratos y fácilmente disponibles, se optó éste.

A la columna anterior que tiene retenido al principio activo, se adicionó etanol y se fueron recolectando fracciones de 10 ml. Con volúmenes de 20, 30 y 40 ml se obtuvo identidad positiva del cloruro de benzalconio, ver figura 3.3.

Más allá de 40 ml de etanol se obtuvieron trazas del principio activo y con un volumen de elución de 50 ml ya no se apreciaba la presencia del activo.

Cabe indicar que el seguimiento del cloruro de benzalconio se hizo solamente de forma cualitativa ya que se estaba manejando solo estándar para encontrar a los solventes que nos servirían para separar al cloruro de benzalconio, además, las concentraciones de estándar que se estaban aplicando no eran las reales puesto que se realizaba el seguimiento por espectro y no por HPLC. Una vez que se encontró el sistema de solventes se aplicó a un problema con pomada.

Las concentraciones existentes en la pomada no permitían por sí solas leer al espectro ya que eran muy bajas.

De acuerdo a lo antes expuesto, se obtuvieron los siguientes resultados:

Al lavar con cloroformo, el principio activo es retenido pero al eluir con etanol era expulsado de la columna.

Estos resultados permitieron probar el método con las siguientes mezclas de componentes de la pomada:

- a) Polietilenglicoles + estándar.

- b) Polietilenglicoles + vaselinas + estándar.
- c) Polietilenglicoles + vaselinas + sólidos + estándar.

Las cantidades de estos compuestos se manejaron para muestras de 3g de pomada, (con un equivalente de 150 microgramos de principio activo en la pomada).

Es muy importante indicar que las concentraciones de estándar leídas en el espectro son mayores de 100 microgramos/ml, éstas concentraciones dan lecturas de absorbancia de 0.1. Estas concentraciones están muy por arriba de la que puede detectar el cromatógrafo, pero se hizo esto solo para visualizar la presencia del activo en las fracciones recolectadas.

Más adelante se hablará de las concentraciones mínimas que detecta el cromatógrafo.

#### Presencia del Cloruro de Benzalconio

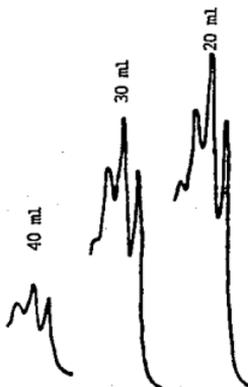


Figura 3.3.- La elución con etanol arrastra al principio activo a los 10 ml y más allá de 50 ml solo hay trazas.

Las mezclas que se prepararon se trataron de igual forma que el estándar y los resultados fueron similares, figura 3.4.

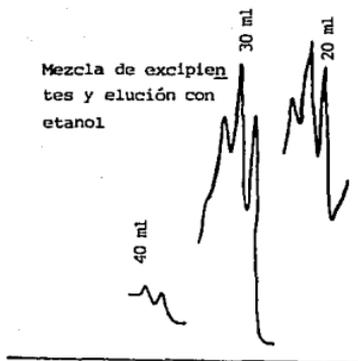


Figura 3.4. Elución de una muestra de excipientes con St de cloruro de benzalconio. Observe las trazas de p.a. después de 40 ml de etanol, observe también la interferencia, la línea base está arriba.

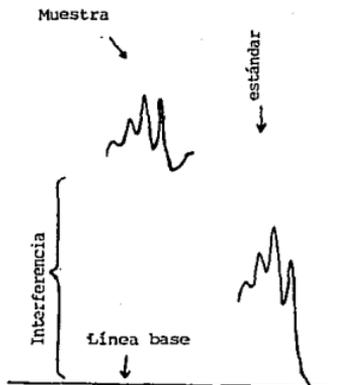


Figura 3.5. Espectros UV de una muestra de pomada y estándar. Observe la interferencia en la muestra, la línea base está muy arriba de la línea base del estándar.

En la última mezcla (c) se tienen casi todos los constituyentes de la pomada. - Se observó que a medida que se aumentaban los componentes, había interferencia en el espectro, figura 3.4. Finalmente se probó una muestra de placebo cargado a una concentración tal que se pudiera leer al espectro (alrededor de 100 mcg/ml). Los lavados de cloroformo no se checkaron al espectro porque salían muy turbios. Los eluatos de etanol después de 20 ml y hasta 50 ml dieron identidad positiva para el cloruro de benzalconio, figura 3.5, pero con interferencia.

Se deduce que la columna de óxido de aluminio elimina gran parte de los componentes de la pomada que interfieren con el principio activo. En base a esto, - el método de limpieza de muestra dió resultados satisfactorios y con el cromatógrafo el método de análisis estaba preparado, claro está, que a las concentraciones reales de la pomada.

Todas las condiciones del cromatógrafo de líquidos empleadas para análisis del cloruro de benzalconio estan basadas en una técnica analítica que se usa para - valorar este mismo principio activo pero en otra forma farmacéutica fabricada - en la empresa.

Se modificó la composición de la fase móvil y la velocidad de flujo, ver método analítico de valoración, página 66.

El cloruro de benzalconio como ya se indicó (ver propiedades físicas y químicas) es una mezcla de componentes con cadenas alquílicas de C<sub>18</sub> a C<sub>16</sub>. Los homólogos de cadena C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub> y C<sub>16</sub> están en mayor proporción de acuerdo con los antecedentes (ver métodos existentes para valorar cloruro de benzalconio) y la técnica que se disponía, pero para otra forma farmacéutica, los homólogos de C<sub>12</sub> y C<sub>14</sub> solo aparecían en nuestros cromatogramas, por lo tanto, la suma de estos - dos picos se consideró como del 100 % de principio activo.

La identidad de estos homólogos no se verificó de acuerdo a la cantidad presente en el estándar, es decir, los homólogos que están en mayor proporción (ver - discusión de los resultados, página 70), representan el primer pico más grande - en el cromatograma seguido del homólogo de menor proporción con el pico de menos tamaño y así sucesivamente.

La composición de la fase móvil se cambió, debido a que cuando se aplicaba la fase móvil ya reportada se obtuvieron problemas. La fase móvil contenía acetónitrilo y agua ajustado a pH 3-4. Como ya se indicó en otras secciones, en una cromatografía de fase inversa, la polaridad de los solventes juega un papel con trario al de una fase normal. El agua que es más polar que el acetónitrilo re-- tiene más fuertemente a los componentes polares, en cambio, el acetónitrilo los eluye más rápidamente de la columna.

Esto se observó cuando se probó la fase móvil ya existente. Se eluían muy rápi-- do y se juntaban los picos de impurezas con los de interés. Se redujo la con-- centración de acetónitrilo para permitir que los picos se separaran (ver figura 3.6).

Las proporciones de los solventes en la fase móvil se ajustaron a nuestro pro-- blema y así se obtuvo la fase móvil que se reporta en el método de valoración -

(página 60 ).

La velocidad de flujo fué inicialmente de 2.5 ml/min. En la teoría de la cromatografía se explica que una velocidad de flujo alta, trae como consecuencia una baja eficiencia de la columna, así que se redujo la velocidad de flujo a 2 ml/min., para aumentar un poco la eficiencia de la columna, a pesar de que el tiempo de análisis se aumentó ligeramente. El tiempo de análisis para la salida de los picos de interés es menor a los 10 minutos.

Experimentalmente se realizó la verificación del máximo a 210 nm del cloruro de benzalconio, esta verificación se realizó efectuando barridos en la región del espectro UV de cada uno de los solventes que acompaña la fase móvil: agua, acetonitrilo, agua-acetonitrilo y fase móvil a pH = 3-4 y de una solución de cloruro de benzalconio en fase móvil. A 210 nm se obtuvo un pico que corresponde al cloruro de benzalconio en la fase móvil y en los demás solventes no se obtuvo ningún espectro, solo una línea base completamente horizontal.

La elección de 210 nm se debe a que el coeficiente de extinción es mayor que a otras longitudes de onda.

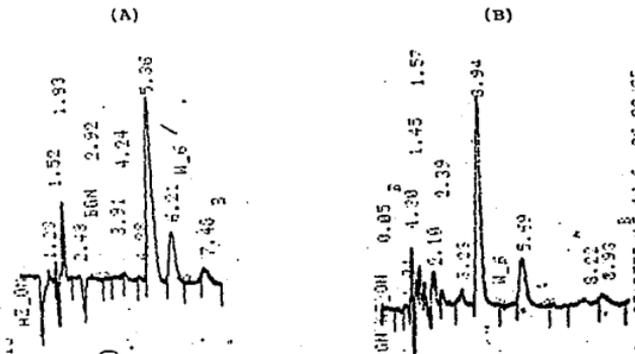


Figura 3.6.- En (A) se observa la resolución de los picos del cloruro de benzalconio con una fase móvil de 90% de acetnitrilo y 10% de agua y en (B) con 80% de acetnitrilo y 20% de agua. Ver explicación en el texto.

En el cromatógrafo de líquidos también se corrió un blanco empleando solamente fase móvil. La comprobación al cromatógrafo de que 210 nm daba la máxima respuesta, se realizó con estándar de cloruro de benzalconio. Se comprobó que a esa longitud de onda se obtenían los picos más grandes que a cualquier otra longitud de onda diferente, ver figuras 3.7 y 3.8.

Para calcular la mínima cantidad detectable de cloruro de benzalconio en el cromatógrafo, se hicieron corridas de estándar a diferentes concentraciones, es decir, se desarrolló una linealidad para conocer los rangos de concentración que dan respuestas mínimas y máximas aceptables.

Se encontró un rango de 6-25 mcg/ml, ver figura 3.9.

En base a esta concentración se debían ajustar nuestros problemas. Pero hay que tomar en cuenta que para propósitos de control de calidad, se establece un límite de valoración para cualquier principio activo.

En este caso, se estableció un % de pureza de 90-110%. De acuerdo con esto y con la facilidad de manejar pequeñas muestras en el cromatógrafo, además de todo lo que involucra el manejo de pequeñas muestras, se estableció el tamaño de muestra de 3g de pomada equivalente a 150 microgramos de cloruro de benzalconio.

Ya establecido el tamaño de muestra para los análisis posteriores, se prosiguió a ajustar nuestro método de limpieza de muestra a esta cantidad de pomada.

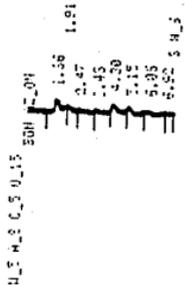
La concentración final del activo en la solución final para inyectar al cromatógrafo fué de 18 mcg/ml.

En la figura se observan algunos cromatogramas obtenidos con muestras de pomada.

Mecanismos de separación:

- a) En la columna de adsorción.
- b) En el cromatógrafo de líquidos.

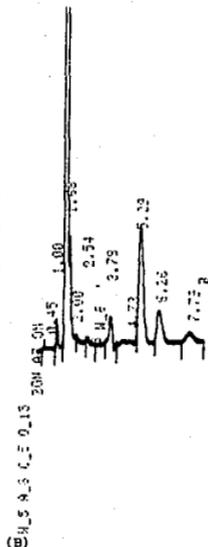
FILE 5 30M 3 STARTED 17:05.8 25/08/01 12 MCG/ML  
 1 107-00 1 BENCHALK ENHANC LAST EDITED 15:06.9 25/08/01



(A)

Figura 3.7.- Cromatogramas obtenidos en corridas de cloruro de benzalconio estandar a dos longitudes de onda diferentes. En (A) a 263 nm, en (B) a 210 nm. En estas dos  $\lambda$  existen máximos del principio activo. Observe la ausencia de picos a 263 nm. Condiciones: fase móvil 80% acetonitrilo y 20% agua, pH = 3-4, velocidad de flujo 2 ml/min.

FILE 5 30M 3 STARTED 17:05.8 25/08/01 12 MCG/ML  
 1 107-00 1 BENCHALK ENHANC LAST EDITED 15:06.9 25/08/01



(B)

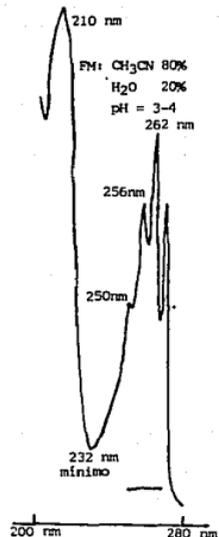


Figura 3.8.- Espectro UV del cloruro de benzalconio. A 262 nm y 210 nm están los mayores picos.

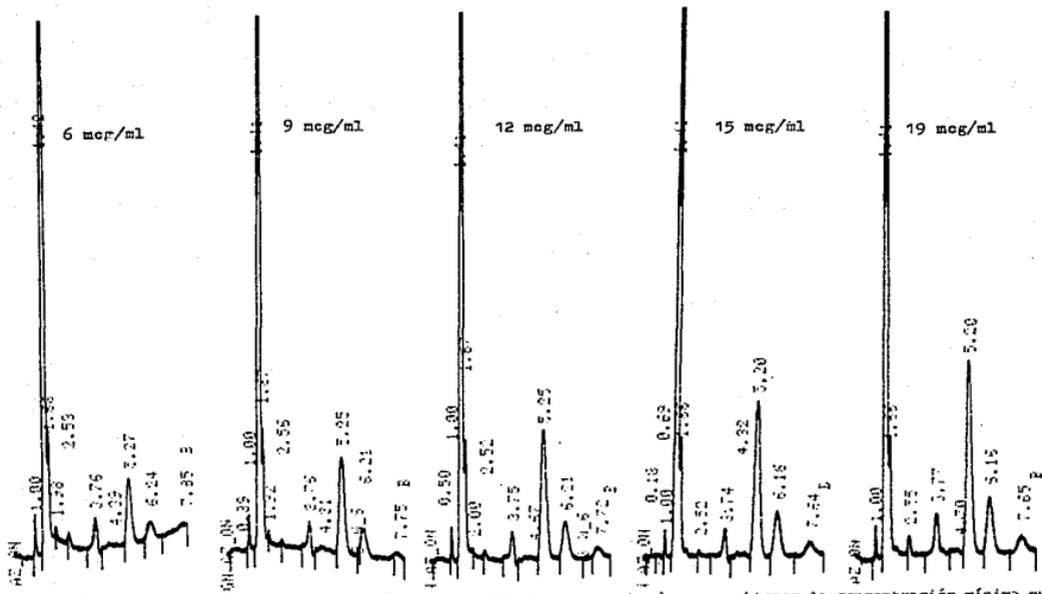


Figura 3.9.- Cromatogramas obtenidos al correr una curva estandar para obtener la concentración mínima que podemos utilizar. El rango esta ajustado para la cantidad de pomada a utilizar en el análisis. Observe la identidad de cada pico en base al tiempo de retención. Condiciones: fase móvil 80% acetonitrilo, 20% agua, 210 nm, velocidad de flujo 2 ml/min, tiempo de retención 5.2 y 6.2 min.

### 3. MECANISMO DE SEPARACION EN LA COLUMNA DE ADSORCION.

La estructura del cloruro de benzalconio posee un centro hidrofílico respresentado por el amonio cuaternario y un centro lipofílico representado por las cadenas alquílicas de  $C_{12} - C_{16}$ , de acuerdo con la figura 3.10

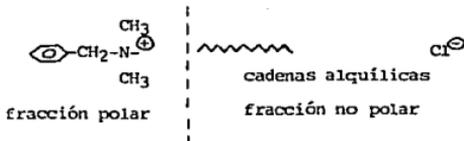


Figura 3.10. Fracciones polares y no polares de la molécula de cloruro de benzalconio

La superficie de la alúmina tiene sitios activos polares, estos sitios tienen gran afinidad por sustancias polares como los polietilenglicoles y el propilenglicol presentes en la pomada. En cambio, con las vaselinas estos sitios polares no tienen afinidad por estos compuestos.

En el caso del cloruro de benzalconio, la polaridad de esta molécula es quizá menos que la de los compuestos con grupos OH que tienen los polietilenglicoles y el propilenglicol, debido a esto los componentes anteriores son más fuertemente retenidos por la superficie polar del óxido de aluminio.

Ahora, la fase móvil tiene un papel muy importante en la separación; el cloroformo que es el solvente que primero se usa, arrastra a todos aquellos compuestos que no sufren adsorción por la superficie del empaque. Tales compuestos son las vaselinas y componentes similares. Por otro lado, este solvente no es lo suficientemente polar como para ser retenido por los sitios activos de la alúmina, en cambio como ya se dijo, los polietilenglicoles y similares son adsorbidos pero también son solubles en la fase móvil, siendo arrastrados a menor velocidad.

De acuerdo a esto, el orden de elución es: los menos polares primero y enseguida los de polaridad creciente o los que estan menos fuertemente adsorbidos.

En el caso del cloruro de benzalconio es posible que se haya retenido en la superficie del empaque o que se este eluyendo más lentamente; la adsorción de la molécula al empaque se debe a una atracción del empaque con la carga positiva - de la molécula del cloruro de benzalconio.

Esta interacción no es rota por la fuerza del solvente ( $\sigma_E = 0.40$ ), en cambio, cuando se utiliza un solvente con más fuerza como el etanol ( $\sigma_E = 0.88$ ) (ver - tabla I.2) esta interacción será superada y el cloruro de benzalconio será - - arrastrado cuando se eluye con etanol.

Los demás componentes de la pomada que no se arrastraron con el cloroformo, es - posible que se hayan eluido con etanol y aquellos que no lo hicieron se queda-- ron retenidos en la columna, como en el caso de un principio activo que dió una coloración amarilla a la alúmina y que se adsorbió fuertemente (el esculósido).

No se estableció la identificación de los componentes que se retuvieron o que - fueron eluidos (diferentes al cloruro de benzalconio) debido a que no estan dentro de los objetivos del presente trabajo de Tesis.

#### 4. MECANISMO DE SEPARACION EN LA COLUMNA DEL CROMATOGRFO

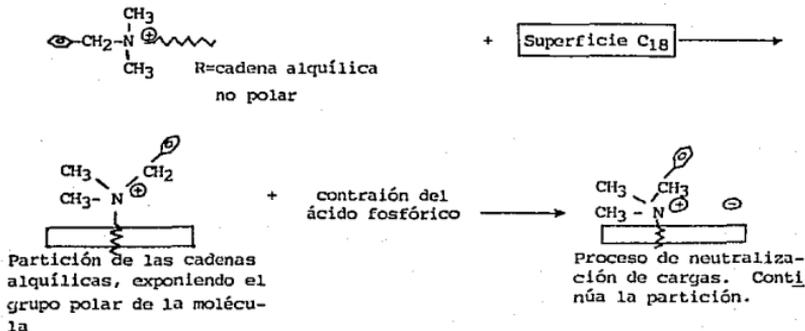
En esta etapa del análisis del cloruro de benzalconio, el paso de ésta molécula a través de la columna (Bondapak C<sub>18</sub>) sufre un proceso de interacción de su catión con un contraión negativo presente en la fase móvil. El contraión negativo es el ión PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> del ácido fosfórico. Al pH ácido de la fase móvil (pH 3-4) el cloruro de benzalconio está completamente ionizado exponiendo su carga (+) - que es atraída por la carga (-) del ión PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>, ésta atracción produce una molécula neutra que sufre partición en la columna de fase inversa. Este tipo de - cromatografía se llama cromatografía de par-iónico.

El proceso de partición se lleva a cabo entre la fase estacionaria, la porción no polar del complejo neutro es decir, las cadenas alquílicas del cloruro de - benzalconio y la fase móvil.

La única función del contraión es neutralizar la carga catiónica del cloruro de benzalconio y permitir el proceso de partición. El agua favorece la ionización de la molécula y del ácido fosfórico.

El acetonitrilo es el disolvente que controla el proceso de partición del complejo.

Este mecanismo puede ser representado como sigue:



Las cadenas alquílicas son las que se solubilizan en la fase estacionaria exponiendo la carga positiva polar del cloruro de benzalconio para que pueda ser neutralizada por la carga negativa del contraión.

La concentración de éste en la fase móvil es de 0.004 M y es suministrado por el ácido fosfórico al preparar la fase móvil, la concentración es suficiente para llevar a cabo el proceso de par-iónico con la molécula de cloruro de benzalconio.

## 5. MATERIAL Y EQUIPO.

### MATERIAL

6 vasos de precipitados de vidrio Pyrex de 100 ml.  
2 matraces volumétricos de 25 ml Pyrex.  
2 pipetas graduadas de 10 ml Pyrex.  
2 pipetas volumétricas de 15 ml Pyrex.  
2 vasos de precipitados de vidrio Pyrex de 250 ml.  
2 columnas para cromatografía de vidrio, de 42 cm x 1.4 cm de DI.  
Papel filtro Watman # 51.  
Portafiltros de plástico o acero inoxidable.  
Membranas de 0.45 micras para solventes y para agua.  
Papel pH indicador.  
Filtro Millipore para filtración de fases móviles.

### REACTIVOS Y SOLVENTES

Acido fosfórico para análisis.  
Acetonitrilo grado HPLC  
Agua destilada.  
Cloroformo para análisis.  
Etanol para análisis.  
Oxido de aluminio para cromatografía.

### REACTIVOS

#### Sistema cromatográfico:

Detector de onda variable Perkin-Elmer LC-85 UV autocontrol.  
Bomba Perkin-Elmer series 10 de 0.1-9,99 ml/min, con límite de -  
presión de 6000 psi.  
Integrador LC-100 Perkin-Elmer  
Columna microBondapack C<sub>18</sub> de 10 micrones de partícula y de 30 cm  
x 4.1 mm de DI. Perkin-Elmer.  
Baño de ultrasonido.

## 6. METODO ANALITICO DE VALORACION DEL CLORURO DE BENZALCONIO.

Finalmente, el método para cuantificar cloruro de benzalconio en pomada queda - como a continuación se expone:

Cada 100 gramos de pomada contienen 5 mg de cloruro de benzalconio.

### Preparación del estándar:

Preparar una solución de cloruro de benzalconio en cloroformo de alrededor de - 150 mcg/ml conocidos exactamente.

Transferir un ml de esta solución de estándar en un vaso de precipitados de - 100 ml, adicionar 20 ml de cloroformo y calentar lentamente a ebullición por - 2 minutos. Enfriar y filtrar directamente con ayuda de un portafiltros y de pa pel filtro # 51 a un matraz volumétrico de 25 ml. Enjuagar el vaso de precipitados con pequeñas porciones de cloroformo y finalmente aforar a la marca con - el mismo solvente.

### Preparación de la muestra:

Pesar en un vaso de precipitados exactamente alrededor de 2.5 g de pomada, adicionar 20 ml de cloroformo, calentar lentamente a ebullición en un baño de va-- por por 2 minutos. Cuidar que se mantenga el volumen de la solución, adicionan-- do si es necesario, más cloroformo. Agitar esta solución al ultrasonido por - 1 minuto, enfriar y filtrar directamente con cuidado a un matraz volumétrico - de 25 ml, ayudarse de un portafiltros y de papel filtro # 51.

Enjuagar el filtro con pequeñas porciones de cloroformo, adicionando los lava-- dos al matraz de 25 ml, finalmente aforar a la marca con cloroformo.

### Procedimiento:

Tomar 15 ml exactamente, de cada una de las soluciones estándar y muestra y adi-- cionarlos respectivamente en cada columna empacada en las mismas condiciones de óxido de aluminio, (se puede usar una sola columna, ver nota (1)).

Abrir la llave de la columna y permitir que pase la solución hasta que el nivel superior de la solución llegue a la cama de algodón. Lavar con cloroformo en -

porciones de 10 ml, dejando pasar cada porción hasta el nivel de la cama de algodón. Continuar lavando con cloroformo hasta recoger de 60 a 70 ml de lavados de cloroformo, asegurarse que no quede cloroformo más arriba del nivel de la cama de algodón, procurar que no se seque la columna.

Desear los lavados de cloroformo y entonces eluir con etanol, adicionando porciones de etanol de 10 ml. Asegurarse que también el nivel del etanol llegue - hasta el nivel del algodón entre porción y porción de etanol adicionada. Cuando se hayan recogido 30 ml de eluatos de etanol, agregar etanol hasta llenar la columna completamente, entonces recoger de 60 a 70 ml de eluatos de etanol, ver nota (2).

Evaporar en un baño de vapor ambas soluciones a sequedad, redissolver en 2 ml de acetonitrilo HPLC, vaciarlos cuidadosamente a matraces volumétricos de 5 ml. - Enjuagar cada vaso con 2 porciones de 1 ml cada una y vaciar los enjuagues a - los matraces volumétricos, finalmente aforar a la marca con acetonitrilo. Filtrar ambas soluciones sobre membrana 0.45 micras e inyectar al cromatógrafo de líquidos.

Condiciones del cromatógrafo de líquidos:

Fase móvil: 80 % de acetonitrilo grado HPLC.

20 % de agua destilada.

pH = 3-4 con ácido fosfórico.

Columna: microBondapak C<sub>18</sub>, longitud 30 cm x 4.1 mm de DI de 10 micrones de partícula.

Longitud de

onda: 210 nm.

Velocidad

de flujo: 2 ml/min.

Volúmen de

inyección: 20 microlitros.

Temperatura: ambiente.

Sensibilidad: 0.05 AUFS.

El cromatograma del cloruro de benzalconio es característico por la aparición -

de dos picos (los homólogos C<sub>12</sub> y C<sub>14</sub>), para el cálculo ambos se suman tanto para el estándar como para el problema.

El cloruro de benzalconio que se emplea para la fabricación de la pomada debe ser usado como estándar.

NOTAS:

(1) Preparación de la columna de óxido de aluminio.

Pesar 12 g de óxido de aluminio para cromatografía previamente activada a 110 °C por 2 horas. Hacer una suspensión en etanol y vaciarla a la columna lavar la columna con cloroformo hasta eliminar todo el etanol, entonces colocar un poco de algodón en la parte superior del empaque de óxido de aluminio para evitar turbulencias. Cuidar que la columna haya quedado bien empacada y que no se haya fraccionado el empaque.

(2) Después de cada muestra que se pase por la columna, se debe regenerar la columna, lavando con cloroformo hasta eliminar completamente el etanol. Antes de pasar una muestra por la columna, ésta debe contener cloroformo exclusivamente.

CAPITULO CUARTO

1. RESULTADOS

Los resultados que a continuación se exponen (tabla IV.1) se obtuvieron al aplicar el método anteriormente descrito sobre muestras de placebo cargado. Los últimos seis datos son resultados del analista 2 que nos servirán para establecer la reproducibilidad del método.

TABLA IV.1

CANTIDAD ADICIONADA (MICROGRAMOS)	CANTIDAD RECUPERADA (MICROGRAMOS)	SUMA DE LOS 2 PICOS (ALTURA)	% DE RECOBRO
159.11	154.68	112.7260	97.21
162.76	165.97	120.9563	101.97
162.90	161.15		98.93
159.36	162.73	121.6212	102.11
192.59	183.96	48.4056	95.52
166.41	163.44	92.9967	98.21
157.60	157.86	89.8252	100.17
162.35	170.28	41.9214	104.88
164.37	164.78	43.0211	100.25
165.41	159.28	41.1365	96.30
169.97	165.29	43.1404	97.25
171.88	170.79	47.8778	99.37
161.80	158.84	45.3076	98.17
162.52	158.57	44.4493	97.56

Enseguida se exponen algunos cromatogramas obtenidos en el análisis de muestras problema.

## 2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Las concentraciones presentes de cloruro de benzalconio en la pomada no permitieron la valoración de este principio activo por algún método espectrofotométrico o volumétrico, además de todos los componentes que interfieren para su análisis. El uso de una columna empacada con óxido de aluminio permitió hacer una limpieza de muestra para eliminar los excipientes lipofílicos e hidrofílicos de la pomada.

Los compuestos no polares son eliminados así, por arrastre de la fase móvil (cloroformo). Estos componentes, debido a su carácter no polar, se solubilizan en la fase móvil y además no son adsorbidos por la superficie altamente polar de la alúmina.

El carácter no polar de estos compuestos se debe a grupos alquílicos, como en el caso de los petrolatos (vaselinas) que tienen largas cadenas de estos grupos y que se solubilizan en solventes de mediana polaridad o no polares. La no retención de estos compuestos separa al cloruro de benzalconio de estos excipientes hidrófobos, eliminando por lavado a compuestos similares como el colesterol. La actividad polar del óxido de aluminio adsorbió a los constituyentes más polares como los que tienen grupos OH, ésta atracción se rompió con el flujo de cloroformo que disolvía a estos componentes y otros que no eran los suficientemente adsorbidos.

El cloruro de benzalconio se retuvo fuertemente y la corriente no lo arrastró a pesar de ser soluble en cloroformo, como se observó anteriormente.

La adición de una solución de pomada en cloroformo a la columna "lavó" a nuestro principio activo de la mayor parte de los excipientes que contiene la forma farmacéutica. En la pomada, el cloruro de benzalconio forma parte tan solo en un 0.005 %, mientras que los excipientes hidrófobos y los hidrofílicos de un 14 y 65 %, respectivamente.

Es obvio que la concentración tan baja pudiera ser enmascarada por tan grandes cantidades de estos excipientes, por lo que el método de limpieza de la muestra era un proceso fundamental para tener éxito en la identificación y cuantifica-

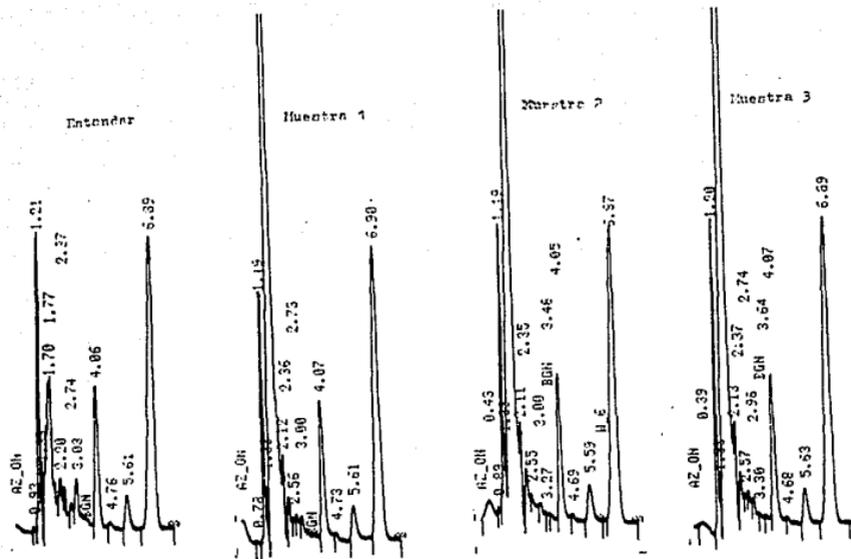


Figura 4.1.-  
 Algunos cromatogramas obtenidos en el análisis para determinar cloruro de bonzalconio en la panna proble-  
 ma. Condiciones: Columna microbondapak C<sub>18</sub> 30 cm x 4.1 mm, fase móvil: 80% acetonitrilo y 20% agua desti-  
 lada, ajustada a pH 3-4, longitud de onda 210 nm, velocidad de flujo 2 ml/min, tiempos de retención 4.0-5.6  
 min. Concentración 18 mcg/ml.

ción de este antimicrobiano.

La cromatografía de adsorción resultó ser apropiada para separar al cloruro de benzalconio, mientras era retenido por la columna, el cloroformo "lavaba" a esta sustancia de los demás componentes como son los anestésicos, el esculósido, un tensoactivo y compuestos sólidos que están en porcentajes relativamente altos (alrededor del 1 %).

De estos constituyentes no se analizó su proceso de separación, puesto que algunos eran insolubles como el talco y un poco solubles como el acetato de hidrocortisona, pero la separación de los componentes diferentes al cloruro de benzalconio sigue un proceso muy similar de adsorción a lo antes expuesto.

Cuando el cloruro de benzalconio se analizó por CLAP, se observó que todavía existían impurezas, ya que se obtenían también picos diferentes a los de interés. La evaporación a sequedad de la muestra para ser redisuelta en acetoni-trilo arrastró impurezas del propio solvente de elución (etanol) y de trazas de constituyentes de la formulación. A pesar de esto, la resolución fue buena, se lograba separar tales impurezas en la columna Bondapack y ninguna impureza se interponía con el tiempo de retención del cloruro de benzalconio.

La mayor fuerza del etanol arrastró al principio activo retenido inmediatamente después de tener contacto con él y a un volumen de 50 ml todavía había trazas de este compuesto, por lo que se decidió seguir eluyendo hasta 70 ml para asegurar que todo el principio activo fuera eliminado de la columna.

El tiempo de análisis para cada muestra fue de 8 minutos en el cromatógrafo y de 1 a 2 horas de tratamiento previo.

Como ya se indicó, sólo 2 picos (cadenas de C<sub>12</sub> y C<sub>14</sub>) se identificaron y se estableció que la suma de estos picos fuera del 100 %; el pico mayor de los cromatogramas comprende a las cadenas alquílicas de 12 carbonos, seguido de las cadenas con C<sub>14</sub> que corresponden al segundo pico (debido a que están en mayor proporción, ver propiedades químicas).

La USP XXI reporta que la suma de los homólogos de C<sub>12</sub> y C<sub>14</sub> comprenden no me--

nos del 70 % del total de los cloruros de alquilbenzildimetilamonio totales.

La estimación de solo dos homólogos se considera del 70 % de la totalidad de homólogos presentes. Una razón para solo haber determinado dos homólogos es que la mínima cantidad detectable fue de 6 mcg/ml al máximo ajuste (setting) de sensibilidad. Y la cantidad final presente en los análisis fue de 18 mcg/ml, esto da tres veces más la respuesta del cromatógrafo (ver figura 3.9). Como se observa, el segundo pico tiene una altura apreciable a esa concentración y si la disminuimos se aprecia todavía, pero para el homólogo siguiente ésta respuesta sería muy poca y casi no se observaría a nuestras concentraciones de trabajo.

En realidad si se observaba un tercer pico en los estándares, pero en los problemas debido a las impurezas aún presentes no se observaba a veces por lo que solo se consideraron solo dos picos.

La cromatografía de par-iónico que se lleva a cabo en la columna del cromatógrafo, no requirió que el ión couterión tuviera cadenas alquílicas para que se llevara a cabo el proceso de partición (como en el caso del ácido heptano sulfónico que es un reactivo que se utiliza como formador de par-iónico para analizar compuestos catiónicos, en el cual la cadena de 7 carbonos es la que se orienta en la columna de fase inversa) sino que solo neutralizará la carga ya que la molécula de cloruro de benzalconio tiene cadenas lipofílicas que son las que sufrirán la partición en la columna de fase inversa.

El por ciento de recuperación en el proceso de lavado y de análisis por CLAP se comparó con un estándar al que no se le hizo ningún tratamiento, obteniéndose que no hay pérdida durante el tratamiento de la muestra.

Para compensar cualquier pérdida durante el análisis, se estableció que el estándar y el problema fueran tratados de igual forma.

Todo el desarrollo del método analítico se corrió con lotes de pomada fabricados a escala piloto y de una concentración exactamente conocida (placebo cargado), siguiendo el proceso de fabricación establecido a escala industrial por la compañía. Se siguieron todos los procedimientos de fabricación para tener lotes de pomada representativos.

La finalidad de usar este tipo de muestras era la de asegurar que teníamos la - concentración exacta de cloruro de benzalconio indicada en el marbete y que se eliminaran las posibles pérdidas de este activo durante su fabricación a escala industrial.

Los resultados indicados en la tabla IV.1 reportan porcentos de recobro dentro del límite inicialmente establecido para valoración de este producto, que es - del 90-110 % de contenido de cloruro de benzalconio.

En base a los resultados obtenidos (tabla IV.1) y analizándolos estadísticamente, se establece que el porcentaje de recobro experimental es de  $99.875 \pm 2,532\%$ .

Una vez habiendo establecido el método, este fué validado, encontrando que es - un método exacto, preciso y reproducible (ver anexo 2).

### 3. CONCLUSIONES

- a) Se estableció que una columna empacada con óxido de aluminio activada a 110 °C por 2 horas elimina los excipientes hidrofílicos e hidrófobos en la pomada.
- b) Los disolventes empleados para cromatografiar la muestra problema en la columna de alúmina fueron etanol y cloroformo.
- c) Las condiciones del cromatógrafo de líquidos para el análisis se establecieron como sigue:
- |   |  |
|---|--|
| Fase móvil:                                     | 80 % de acetonitrilo grado HPLC.<br>20 % de agua destilada.<br>Ajustar la fase móvil a pH 3-4 con ácido fosfórico.                             |
| Columna:  | MicroBondpack C <sub>18</sub> , con una longitud de 30cm x 4.1 mm de diámetro interno y de 10 micrones de tamaño de partícula.                 |
| Longitud de onda:                               | 210 nm.  |
| Velocidad de flujo:                             | 2 ml/min.  |
| Volúmen de inyección:                           | 20 microlitros.  |
| Temperatura:                                    | Ambiente.  |
| Sensibilidad:                                   | 0.05 AUFS  |
| Dimensiones de la Columna de Óxido de Aluminio: | De vidrio Pyrex de 42 cm x 1.4 cm de DI con 12 gramos de óxido de aluminio activada. Velocidad de flujo: abrir completamente la llave de paso. |
- d) El límite máximo de tamaño de la muestra para análisis es de 3 g y el mínimo es de 1.5 g.
- e) El volúmen de retención en la columna de alúmina es de 60 ml de etanol para el cloruro de benzalconio.
- f) Para cuantificar al cloruro de benzalconio se consideraron dos picos solamente de C<sub>12</sub> y C<sub>14</sub>.

#### 4. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES

El óxido de aluminio que se empleó está activado a 110 °C por 2 horas, estas condiciones se establecieron al azar, por lo que no se conoce el comportamiento de la alúmina para con los componentes de la formulación de la pomada en condiciones diferentes a las establecidas aquí. Se propone variar estas condiciones de activación para conocer su comportamiento.

No se conoce el comportamiento de separación de este principio activo con otros solventes diferentes al cloroformo y al etanol en la columna de alúmina, por lo que el método solo se diseñó con estos solventes. El uso de otro tipo de solventes no garantizaría la separación del cloruro de benzalconio. Se propone efectuar un estudio con solventes de polaridad semejantes a los usados aquí, para conocer la separación del cloruro de benzalconio con diferentes solventes.

Existe un método analítico reportado para el cloruro de benzalconio, el cual no reporta para qué forma farmacéutica es aplicable, dicho método (ver bibliografía 45) emplea cromatografía de par-iónico, usando reactivo PIC B-7 (Cia Waters Associates) con una fase móvil de metanol/agua 50/50.

Este método se basa en el mismo fundamento que el método desarrollado en esta Tesis, con las variantes de que emplea una fase móvil diferente y a otra longitud de onda (254 nm). Se propone realizar un estudio para verificar la posible aplicación de este método a nuestro problema, con el fin de tener un método alternativo para el análisis del cloruro de benzalconio en la pomada.

Es recomendable que no se utilice más de 3 g de pomada en un análisis, se recomienda que la cantidad a usarse este alrededor de 2.5 g.

Se recomienda que la columna empacada con óxido de aluminio se utilice para 3 - muestras solamente por columna y después volver a usar columna nueva.

- g) El tiempo de análisis para el tratamiento con la columna de óxido de aluminio es de 2 horas.
- h) Los tiempos de retención para el cloruro de benzalconio fueron de alrededor de 5 y 6 minutos para el primero y segundo picos, respectivamente.
- i) Como estándar de comparación se empleó la materia prima usada para la fabricación de la pomada.
- j) Los límites de valoración se establecieron en 90-110 %.
- k) El método analítico es exacto y preciso con un porcentaje de recobro experimental de  $99.875 \% \pm 2.5322 \%$ .
- l) El tiempo de análisis total fué de 3-4 horas.

ANEXO 1

FORMULACION DE LA POMADA DE ACETATO DE HIDROCORTIZONA

PRINCIPIOS ACTIVOS:

Acetato de hidrocortizona .....	1.000 %
Cloruro de benzalconio .....	0.005 %
Anestésicos locales .....	2.000 %
Esculocido .....	1.000 %

EXCIPIENTES HIDROFILICOS:

Polietilenglicol 300 .....	
Polietilenglicol 1500 .....	53.000 %
Polietilenglicol 4000 .....	
Propilenglicol .....	12.000 %

EXCIPIENTES HIDROFOBOS:

Vaselina sólida .....	
Vaselina líquida .....	14.000 %
Colesterol .....	

OTROS EXCIPIENTES:

Talco .....	
Tensoactivo .....	16.995 %
Agua .....	

ANEXO 2

VALIDACION DEL METODO ANALITICO

Exactitud del Método: Es el acercamiento de los datos obtenidos con respecto a un valor teórico establecido.

Datos de porcentaje de recobro:

97.21 %	$\bar{Y} = 99.875 \%$
101.97 %	
98.93 %	Desviación estándar (S) = $\pm 3.029$
102.11 %	Desviación estándar
95.52 %	relativa (DER) = 3.032
98.21 %	DER = $\frac{S}{Y} \times 100$
100.17 %	
104.88 %	

$$"t" \text{ calculada; } t = \frac{(\bar{Y} - 100) (n)^{1/2}}{S} = - 0.1167$$

$$"t" \text{ de tablas } t (n-1; 0.975) = 2.3646$$

Si "t" calculada es mayor que "t" de tablas, el método no es exacto.

Si "t" calculada es menor que "t" de tablas, el método es exacto.

- 0.1167 es menor que 2.3646

POR LO TANTO EL METODO ES EXACTO

Intervalo de confianza para el % de recobro IC = 99.875  $\pm$  2.5322 %

Repetibilidad del método de medición REP =  $\pm 7.1623$

Cuando se evalúan medidas efectuadas sobre la misma muestra, por el mismo operador y con el mismo equipo, se habla de repetibilidad.

En este caso, el valor obtenido de  $\pm 7.1623$  % indica que este porcentaje de mediciones no concuerdan o no estan dentro de la exactitud del método.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION:

Cantidad adicionada (mcg/ml)	Propiedad medida (altura de los picos)
6.20	8.85
9.30	12.58
12.40	17.45
15.51	21.06
18.61	26.11

Cálculo de la pendiente:

$$m = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$m = \frac{5 (1200.7917) - (62.02) (86.05)}{5 (865.5822) - (62.02)^2} =$$

$$m = 1.385739$$

Cálculo de la ordenada al origen:

$$b = \frac{\sum y - m \sum x}{n}$$

$$b = \frac{86.05 - (1.385739) (62.02)}{5}$$

$$b = 0.021284$$

(Ver gráfica 1)

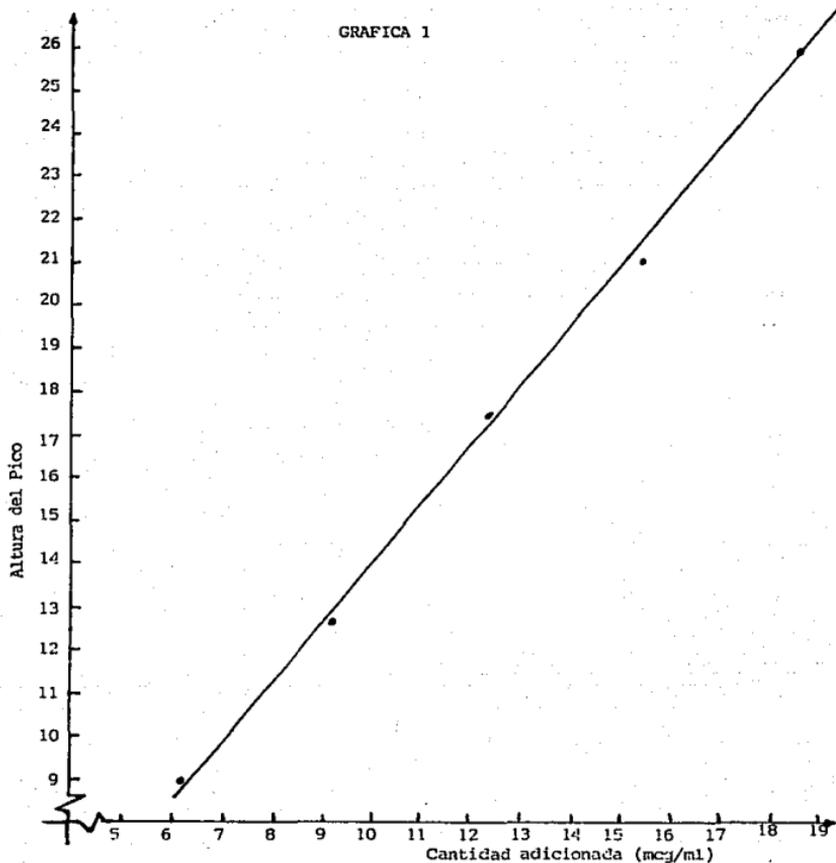
Cálculo del coeficiente de determinación  $r^2$ :

$$r^2 = \frac{(n \sum xy - \sum x \sum y)^2}{(n \sum x^2 - (\sum x)^2)(n \sum y^2 - (\sum y)^2)}$$

$$r^2 = \frac{(5(1200.7917) - (62.02)(86.05))^2}{(5(865.5822) - (62.02)^2)(5(1666.3371) - (86.05)^2)}$$

$$r^2 = 0.997191$$

GRAFICA 1



Gráfica que muestra la linealidad del sistema de medición para valorar cloruro de benzalconio en la pomada.

Cálculo de la Desviación Estándar de la regresión  $Sy.x$ :

$$Sy.x = \frac{(Sy^2) - m(Sxy) - b(Sy)^2}{n - 2}$$

$$Sy.x = \left( \frac{1666.3371 - 1663.984742 - 1.831543788}{3} \right)^{1/2}$$

$$Sy.x = 0.416659$$

Cálculo del error estándar para la ordenada al origen  $Sb$ :

$$Sb = Sy.x \frac{1}{n} + \left( \frac{\bar{x}}{n(Sy^2) - (Sx)^2} \right)^{1/2}$$

$$Sb = 0.416659 \frac{1}{5} + \left( \frac{12.04}{5(865.5822) - (62.02)^2} \right)^{1/2}$$

$$Sb = 0.243846$$

Cálculo del error estándar para la pendiente  $Sm$ :

$$Sm = Sy.x \left( \frac{1}{(Sx^2) - (Sx)^2/n} \right)^{1/2}$$

$$Sm = 0.416659 \left( \frac{1}{865.5822 - (62.02)^2/5} \right)^{1/2}$$

$$Sm = 0.042461$$

Intervalo de confianza para la ordenada al origen:

$$IC b = b \pm t_{(n-2, 0.975)} (Sb)$$

$$IC b = 0.021284 \pm 3.1825 (0.243846)$$

$$IC b = 0.021284 \pm 0.776040$$

Intervalo de confianza para la pendiente:

$$IC m = m \pm t_{(n-2, 0.975)} (Sm)$$

$$IC m = 1.385739 \pm 3.1825 (0.042461)$$

$$IC m = 1.385739 \pm 0.135134$$

Línealidad del Método:

Cantidad adicionada (mcg)	Cantidad recuperada (mcg)
129.81	128.83
128.56	121.72
161.08	152.04
164.12	154.46
192.59	183.90
195.41	183.96

Cálculo de la pendiente m :

$$m = \frac{6 (153577.2485) - (971.57) (924.91)}{6 (161536.4267) - (971.57)^2}$$

$$m = 0.904171$$

Cálculo de la ordenada al origen b:

$$b = \frac{924.91 - 0.904171 (971.57)}{6}$$

$$b = 7.740672$$

Cálculo del coeficiente de determinación  $r^2$ :

$$r^2 = \frac{(6 (153577.2485) - (971.57) (924.91))^2}{(6 (161536.4267) - (971.57)^2) (6 (146047.4721) - (924.91)^2)}$$

$$r^2 = 0.991972$$

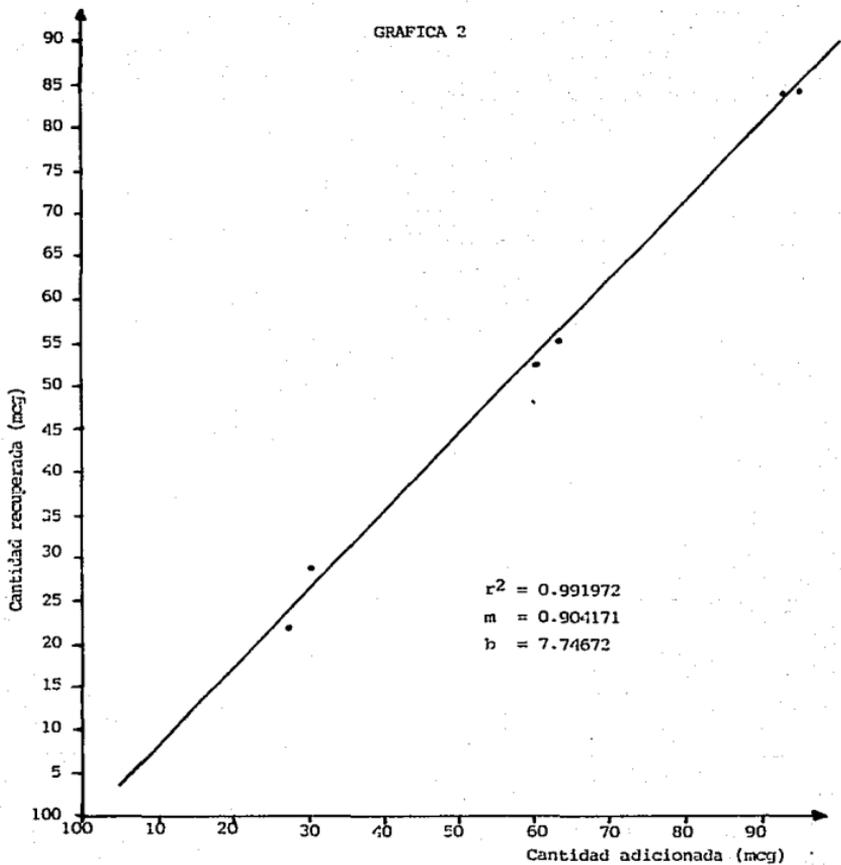
(Ver gráfica 2)

Cálculo de la desviación estándar de la regresión  $Sy.x$ :

$$Sy.x = \left( \frac{146047.4721 - 0.904171 (153577.2485) - (7.740672)(924.91)}{4} \right)^{1/2}$$

$$Sy.x = 2.642603$$

GRAFICA 2



Gráfica que muestra la linealidad del método de medición para valorar cloruro de benzalconio en la pomada.

Cálculo del error estándar para la ordenada al origen  $S_b$ :

$$S_b = 2.642603 \frac{1}{6} + \left( \frac{161.9283}{6(161536) - (971.57)^2} \right)^{1/2}$$

$$S_b = 0.520482$$

Cálculo del error estándar para la pendiente  $S_m$ :

$$S_m = 2.642603 \left( \frac{1}{161536.4267 - \frac{(971.57)^2}{6}} \right)^{1/2}$$

$$S_m = 0.040719$$

Intervalo de confianza para la ordenada al origen:

$$IC_b = 7.740672 \pm 1.776 (0.520482)$$

$$IC_b = 7.740672 \pm 1.444860$$

Intervalo de confianza para la pendiente:

$$IC_m = 0.904171 \pm 2.776 (0.040719)$$

$$IC_m = 0.904171 \pm 0.113037$$

La linealidad para este método de medición nos indica que si existe una relación entre la cantidad adicionada de principio activo y la respuesta obtenida por el método de análisis, es decir, que la cantidad adicionada es proporcional a la respuesta. La linealidad para este método esta comprendida entre 6 y 19 mcg/ml de principio activo.

Otra información que nos proporciona la linealidad es la sensibilidad que se define como la variación mínima que es preciso aplicar al tamaño medido (por ejemplo una concentración) para obtener una variación significativa del resultado de la medición (por ejemplo una área o una altura) para este caso 6 mcg/ml es la mínima cantidad para medir.

PRECISION DEL METODO

DIA	ANALISTA	
	1	2
1	97.21	100.25
	101.97	96.30
	98.93	97.25
2	105.55	99.37
	104.88	98.17
	102.71	97.56

Cálculo de la suma de cuadrados del analista SCa:

$$SCa = \frac{719696.6325}{6} - \frac{1438920.203}{12} = 39.42184$$

Cálculo de la media de cuadrados del analista MCa:

$$MCa = \frac{39.42184}{1} = 39.42184$$

Cálculo de la suma de cuadrados del día anidado en el analista SCd:

$$SCd = \frac{359953.2737}{3} - \frac{719696.6325}{6} = 34.98581$$

Cálculo de la media de cuadrados del analista MCD:

$$MCD = \frac{34.98581}{2} = 17.492905$$

Cálculo de la suma de cuadrados del error SCe:

$$SCe = 120012.8933 - \frac{359953.2737}{3} = 28.4687$$

Cálculo de la media de cuadrados del error MCE:

$$MCE = \frac{28.4687}{8} = 3.5585$$

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA (ANADEVA)

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS
Analista	1	39.4218	39.4218
Día	2	34.9858	17.4929
Error	8	28.4687	3.5585

Repetibilidad del método:

$$\text{Rep} = \pm 3.6973 \%$$

Reproducibilidad interdía para un analista:

$$\text{Rep-d} = \pm 4.2241 \%$$

Reproducibilidad interanalista:

$$\text{Rep-a} = \pm 3.7470 \%$$

Precisión del método:

La precisión del método nos permite estimar la repetibilidad y la reproducibilidad. Cuando se evalúa la precisión con análisis de la misma muestra por el mismo operador y con las mismas condiciones se habla de repetibilidad.

Cuando se evalúa la precisión con series de mediciones y en condiciones diferentes (por ejemplo en días diferentes y con analistas diferentes) se habla de reproducibilidad.

La repetibilidad del método establece que tiene una variación del 3.6973%. En el análisis de una muestra por un analista en diferente día, existe una variación del 4.2241%, en otras palabras, el método se reproduce dentro del intervalo indicado para un analista en día diferente.

En el caso de analistas diferentes, del método se reproduce dentro del intervalo señalado.

Con los datos obtenidos se tiene:

Análisis de Varianza:

F calculada pra el analista:

$$\frac{39.4218}{17.4929} = 2.2535$$

F tablas 0.995

18.51

F calculada para el día:

$$\frac{17.4929}{3.5585} = 4.9158$$

F tablas 0.995

4.46

Si F calculada es mayor que F tablas, existe efecto por analista, por lo tanto, no existe efecto por analista.

Si F calculada es menor que F de tablas, no existe efecto por día, por lo tanto, el método tiene variación por día.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Yost R.W. and Etre L.S. Practical Liquid Chromatography, An Introduction - First edition 1980, Perkin - Elmer Ltd. USA.
- 2 Snyder L.R. Introduction to Modern Liquid Chromatography. Second Edition, - A Wiley-Interscience Publication; John Wiley & Sons. Inc. England 1979.
- 3 Brown Phyllis R. High Pressure Liquid Chromatography. Biochemical and Biomedical Applications. First edition 1973. Academic Press, Inc. New York USA.
- 4 Leon Roberto, Ph. D. El Libro Básico para Cromatografía de Líquidos. Primera edición 1982. Milton Roy Company, St. Petersburg, Florida, USA.
- 5 Knevel Adalbert M. Ph. D. and DiGangi Frank, Ph. D. Jenkins'. Quantitative Pharmaceutical Chemistry. Seventh edition 1979. McGraw-Hill Book Company - USA.
- 6 Connors, K.A. A Textbook of Pharmaceutical Analysis. Second edition, John - Wiley & Sons, Inc. New York 1975.
- 7 Higuchi, T., and E. Brockmann-Hanssen. Pharmaceutical Analysis. John Wiley & Sons, Inc. New York 1961.
- 8 Morrison R.T. and Boyd R.N. Química Orgánica. Tercera edición, Fondo Educativo Interamericano S.A. E.U.A., 1976.
- 9 Goodman L. Gilman A. y Goodman A. Las Partes Farmacológicas de la Terapéutica. Sexta edición, Editorial Médica Panamericana. México 1982.
- 10 Burrows William. Tratado de Microbiología. Vigésima edición, Editorial Interamericana. México 1974.
- 11 Connors Kenneth, Kennon Lloyd and Amidon G. Chemical Stability of Pharmaceu-

- tical. A Handbook for Pharmacists. A Wiley Interscience Publication. John Wiley & Sons. 1979 USA.
- 12 Clarke E.G.C. Isolation and Identification of Drugs. The Pharmaceutical - - Press, London 1978. Volume 2.
  - 13 Añche J.M. Biofarmacia. Editorial El Manual Moderno, México 1983.
  - 14 Helman José. Farmacotecnia Teórica y Práctica. Primera edición. Compañía - Editorial Continental, S.A., México 1980.
  - 15 Merck & Co., Inc. The Merck Index. Ninth edition, New York, USA, 1976.
  - 16 Diccionario de Especialidades Farmacéuticas PLM, 32a. edición. México 1986.
  - 17 Remington's Pharmaceutical Sciences. Editor Arthur Osal, 16th edition, 1980. Mack Publishing Company Easton, Pennsylvania USA.
  - 18 Lachman Leon, Ph. D. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy. Third - edition, Lea & Febiger 1986., Philadelphia USA.
  - 19 Temington Richard D. Estadística Biométrica y Sanitaria. Editorial Prentice Hall Internacional 1977 USA.
  - 20 Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 14th edition 1984. AOAC, Virginia USA.
  - 21 The United States Pharmacopeia XX and XXI and National Formulary 16th edition, 1980 y 1985. Mack Publishing Co., Easton Pennsylvania USA.
  - 22 Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos. Cuarta edición SSA, México 1974.
  - 23 British Pharmacopeia 1980. England 1980 Vol. I y II.
  - 24 The Extra Pharmacopeia. Martindale, edited by Norman W. Blacov. Twenty sixth

edition. London 1972.

- 25 Farmacopea Europea. Traducción de la versión francesa de la Farmacopea Europea. Editada por el Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Madrid-España.
- 26 Pharmacopée Française. Elaborée sous la Direction Scientifique de la Commission Nationale de Pharmacopée. Paris.
- 27 Meyer Roger Carey. Journal of Pharmaceutical Sciences. 69, 1148-1150, (1980).
- 28 Marsh Dennis and Takahashi Lloyd, *ibid.*, 72, 521-525 (1983).
- 29 Cybulski Z.R., *ibid.*, 73, 1700-1702 (1984).
- 30 Daoud N.N. et.al., *ibid.* 72, 290-292 (1983).
- 31 Baley G.J. et.a., *ibid.*, 66, 696-699 (1977).
- 32 Rader Bobby R., *ibid.*, 60, 475-477 (1971).
- 33 Chatten L.G., and Okamura K.O., *ibid.*, 62, 1328-1331 (1973).
- 34 Brown M.R. and Tomlinson E., *ibid.*, 68, 146-149 (1979).
- 35 Hércules David M. et. al. Anal. Chem. 55, 145-146 (1983).
- 36 Auerbach M.E. Anal. Chem. 15, 492-493 (1943).
- 37 Colichman E.L. *ibid.*, 19, 430-431 (1947).
- 38 Laycock H.H. and Mulley B.A. J. Pharm. Pharmac. 18, suppl., 9S-11S (1966).
- 39 Richards R.M.E., *ibid.*, 23, suppl 136S-140S: (1971).
- 40 Pinzauti S, and Porta E., *ibid.*, communications, 31, 123-124 (1979).

41 Richardson N.E. et. al., *ibid.*, 29, 717-722. (1977).

42 Brown E.R., *ibid.*, 15, 379-395 (1963).