

13
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

EQUIVALENCIA DE COLUMNAS (C8 Y C18) PARA
CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA
RESOLUCION

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A:
RAFAEL CHARGOY NAVARRO



México, D. F.

1992



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

Página

INTRODUCCION	1
CAPITULO I. ANTECEDENTES TEORICOS	3
A. HISTORIA DE LA CROMATOGRAFIA	3
B. DEFINICIONES	6
C. COMPONENTES DE UN CROMATOGRAFO DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION	18
CAPITULO II. FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA ...	22
A. CARACTERIZACION CINETICA	22
B. CARACTERIZACION QUIMICA	24
CAPITULO III. OBJETIVOS	32
CAPITULO IV. HIPOTESIS	33
CAPITULO V. MATERIAL Y METODO	34
A. SELECCION DE LAS COLUMNAS DE PRUEBA	36
B. CARACTERIZACION	37
CAPITULO VI. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.....	49
A. CARACTERIZACION CINETICA	49
B. CARACTERIZACION QUIMICA	51
C. PREDICCION DE EQUIVALENCIA ENTRE COLUMNAS.....	61
D. PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA EVALUACION DE COLUMNAS	64
CAPITULO VII. CONCLUSIONES	68
CAPITULO VIII. PROPUESTAS	69
CAPITULO IX. BIBLIOGRAFIA	70

INTRODUCCION (1. 19)

Existen en el mercado una gran variedad de columnas cromatográficas con diferentes características, éstas influyen directamente en el comportamiento cromatográfico de principios activos analizados por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución. Por ello resulta conveniente contar con procedimientos que evalúen dichas características, las cuales pueden clasificarse como: actividad metálica, actividad hidrofóbica y actividad silanol, así como tipo de fase. Con esta información se puede ayudar en el desarrollo de métodos analíticos y para cambiar una columna de ciertas dimensiones y características por otra diferente cuando por alguna razón no se cuente con la especificada. También es posible seguir la vida efectiva de cada columna y detectar problemas en el sistema debido al deterioro de la misma.

Por lo anterior, el presente trabajo desarrolla un procedimiento para la caracterización de columnas cromatográficas de fase reversa (C₈ y C₁₈) que abarca la caracterización cinética y química, ésta última se realizó para determinar las actividades metálica, hidrofóbica y silanol. En dichas pruebas se utilizó una sustancia indicadora y una de referencia, en donde dependiendo de los parámetros cromatográficos (tales como factor de retención, factor de capacidad y factor de selectividad de los picos de la sustancia indicadora en comparación con la de

referencia) se pudo determinar la magnitud de las características evaluadas.

Con la información obtenida se encontraron columnas con actividad silanol, hidrofóbica y metálica, otras en menor grado o carentes de éstas. A partir de esto se analizaron principios activos en columnas indicadas en el método analítico y en columnas que, debido a sus características similares, pudieran presentar eficiencia equivalente.

A partir de este trabajo se desarrolló un procedimiento para columnas de fase reversa, con el que se puede determinar la actividad silanol de acuerdo al comportamiento cromatográfico de la anilina con respecto al fenol, la actividad metálica utilizando 2,2-bipiridina y la hidrofobicidad empleando benceno como sustancia de referencia y naftaleno como sustancia indicadora.

CAPITULO I. ANTECEDENTES TEORICOS (1. 2. 3)

A. HISTORIA DE LA CROMATOGRAFIA.

La técnica de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), ha contribuido significativamente en las industrias farmacéutica, bioquímica, clínica y análisis ambiental. La primera separación cromatográfica se la atribuye a un botánico ruso, Tswett, quien en 1903 separó pigmentos de plantas por adsorción cromatográfica. La técnica se retomó hasta la década de los treinta, cuando Khun y Lederer usaron la adsorción cromatográfica para la separación de productos naturales. En 1941, Martin y Synge, ganaron el Premio Nobel, por el descubrimiento de la cromatografía de partición líquido-líquido. Martin y Synge introdujeron el concepto de "altura de plato teórico", que ha sido adoptado para medir la eficiencia de las columnas.

En 1952, James y Martin descubrieron el uso de la cromatografía gas-líquido (CGL) y la técnica se desarrolló rápidamente durante la década.

En los años sesenta, Giddings mostró el marco teórico desarrollado para CGL aplicado de manera similar para cromatografía líquida y entre 1967-1969, Kirkland, Huber y otros, describieron el primer cromatógrafo de líquidos de alta resolución. Operado a alta presión, este instrumento sobrepuso el efecto de las altas viscosidades de líquidos en comparación a la

viscosidad de gases y daba tiempos de retención comparables con CGL.

En los instrumentos recientes, los detectores ultravioleta (UV) de longitud de onda fija o variable permiten detectar nanogramos de algunos compuestos, pero son insensibles a compuestos con poca o nula absorbancia UV, por lo cual se ha incrementado el uso de detectores de índice de refracción y sistemas de detección selectiva como espectrofluorómetros y sistemas electroquímicos. Siendo lo más novedoso las interfases de CLAR a la espectrometría de masas, hoy día otros acoplamientos se prueban a nivel experimental, ofreciendo esperanzas para su utilización a nivel industrial.

La clave para incrementar la eficiencia y optimizar tiempos de análisis en CLAR, se basa en el desarrollo de soportes adecuados, en donde el coeficiente de difusión intraparticular se mejore, reduciendo la distancia sobre la cual los solutos se difunden. Horvath y colaboradores unieron lechos de vidrio impermeable con una capa de resina de intercambio iónico, y Kirkland preparó un soporte muy eficiente para cromatografía de partición líquido-líquido, uniendo lechos de vidrio con partículas de diámetro mucho más pequeño ($40 \mu\text{m}$) que las utilizadas en CGL. Los materiales más recientes para CLAR pueden ser empacados reproduciblemente dentro de columnas por técnicas de empaque en seco.

Actualmente se ha incrementado la eficiencia reduciendo el tamaño de partícula a valores de $5 \mu\text{m}$ aproximadamente. Estos tamaños presentan una buena relación entre eficiencia, presión de gota, tiempos de análisis y reproducibilidad de empaque.

La investigación en CLAR se extiende hacia la preparación de fases estacionarias unidas químicamente en donde la naturaleza del adsorbente es modificada por unión de grupos orgánicos a la superficie. La primer fase unida para CLAR fue preparada por Halase y colaboradores, quien hizo reaccionar sílica con alcoholes y aminoras. Subsecuentemente, materiales con gran estabilidad hidrolítica fueron preparadas por unión de organosilanos a la superficie de la sílica, existiendo hoy día una gran variedad de fases comerciales.

Comparada con la cromatografía clásica eluida por gravedad, en donde la separación puede durar horas o hasta días, la CLAR ofrece tiempos de análisis de 5 a 30 minutos, tiempos comparables con la CGL. En CLAR se realizan análisis de compuestos que en CGL no es factible, hablamos de aquellos que son termolábiles, o altamente polares que pueden analizarse sin previa derivatización, y muestras poliméricas. La limpieza de muestras es usualmente mucho menos problemática en CLAR que en CGL y fluidos biológicos pueden ser inyectados en las columnas CLAR. La combinación de estos factores complementa a la industria farmacéutica, alimenticia, clínica, etc. por lo se ha manifestado un gran auge hacia la técnica.

B. DEFINICIONES (1.2.3)

1. CROMATOGRAFIA

Es un término aplicado a una amplia gama de técnicas de separación que esencialmente se basan en la distribución de los componentes a separar entre dos fases, la fase móvil, que puede ser un gas o un líquido, y la fase estacionaria, la cual puede ser un líquido o un sólido.

El proceso cromatográfico tiene lugar como resultado de repetidas adsorciones o repartos durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo del lecho estacionario, alcanzándose la separación gracias a las diferencias en los coeficientes de distribución de los distintos componentes de la muestra.

a. Clasificación.

En base al tipo de fase móvil, la cromatografía tiene dos divisiones, la cromatografía de gases y la cromatografía de líquidos, las que se subdividen de acuerdo a la fase estacionaria, como se observa en la figura No. 1.

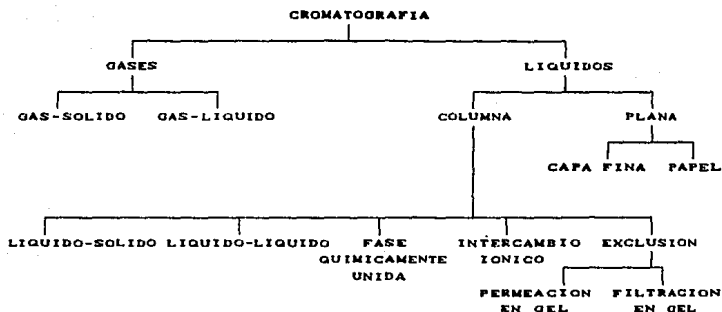


FIGURA 1. Diagrama de las divisiones en cromatografía.

Considerando los procesos de separación, se puede clasificar en cuatro tipos:

1) Cromatografía de adsorción. La fase estacionaria es un sólido que funge como adsorbente y la fase móvil puede ser un líquido o un gas, la separación se basa en repetidas etapas de adsorción desorción del soluto. El grado de separación depende, notablemente de la superficie activa de la fase estacionaria y, por lo tanto, el tamaño de partícula empleado debe ser lo más pequeño posible para aumentar la superficie de contacto con el soluto.

2) Cromatografía de partición. La fase estacionaria es un líquido que se mantiene fijo por adsorción sobre un sólido inerte y poroso, en tanto que la fase móvil es un gas o un líquido. En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria está saturada por la fase móvil y viceversa, de tal manera que la separación se efectúa entre dos fases, debido a las diferencias de

afinidad de los componentes por cada una de las dos fases, esto es, a sus diferencias en los coeficientes de reparto.

3) Cromatografía de intercambio iónico. El lecho estacionario tiene una superficie cargada iónicamente con carga contraria a la de la muestra. Esta técnica se usa casi exclusivamente con muestras iónicas o ionizables. Cuanto mayor sea la carga de la muestra, más fuerte será atraída hacia la superficie iónica y por tanto, más tiempo tardará en ser eluida.

La fase móvil es una solución reguladora acuosa, en la que el pH y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de retención del soluto en la columna.

4) Cromatografía de exclusión. El relleno de la columna es un material que posee poros de dimensiones comprendidas entre ciertos límites, con lo que la muestra es retenida o filtrada según su tamaño molecular.

Si el material estacionario es un gel reticulado, se le denomina filtración en gel y si es un polímero rígido, se denomina permeación en gel.

Por otro lado, la cromatografía de líquidos se clasifica según la polaridad relativa de las dos fases en:

1) Cromatografía en fase normal. El lecho estacionario es de naturaleza fuertemente polar (ej. sílice) y la fase móvil es apolar. Las muestras polares quedan retenidas en la columna durante tiempos mayores que los no polares.

2) Cromatografía en fase inversa. La fase estacionaria es de naturaleza apolar (hidrocarburos) y la fase móvil es de tipo polar, mientras más apolar sea la muestra mayor será su retención.

2. CROMATOGRAMA

Es un registro gráfico de los componentes de una muestra, así como la concentración en que están presentes, éstos se eluyen de la columna a un tiempo determinado, son percibidos por un detector, la señal se incrementa por un amplificador y trazada por un registrador.

3. TIEMPO DE RETENCION (T_R)

Es una medida de la retención del compuesto y es el tiempo que transcurre desde la inyección hasta el ápice del pico, este valor siempre será similar en la misma columna y bajo las mismas condiciones de trabajo, siempre y cuando la columna no haya perdido sus características químicas.

4. TIEMPO MUERTO (T_0)

Es el tiempo que tarda la fase móvil en trasladarse de un lado a otro de la columna, éste se puede determinar con un soluto que no tenga interacción con la fase estacionaria.

5. TIEMPO DE RETENCION CORREGIDO (T_r)

El tiempo de retención corregido es el tiempo de retención menos el tiempo muerto ($T_r = T_R - T_0$).

En cromatografía de líquidos el tiempo de retención está

dado por el flujo de la fase móvil, su interacción con la muestra y la fase estacionaria y dependiendo del tipo de separación, por ejemplo, adsorción, intercambio iónico, etc.

6. VOLUMEN DE RETENCION

Es otra manera de expresar la retención del compuesto y es el volumen necesario de fase móvil para que el soluto eluya, se puede obtener multiplicando el tiempo de retención por el flujo de la fase móvil.

A continuación se presenta un cromatograma típico en donde se aprecian los términos descritos anteriormente.

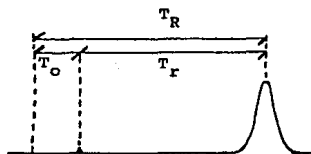


FIGURA 2. Cromatograma típico. T_0 : tiempo muerto, T_R : tiempo de retención absoluto, T_r : tiempo de retención corregido.

7. FACTOR DE CAPACIDAD (K ')

Es la relación de la cantidad total de la muestra en la fase estacionaria a la cantidad de la muestra en fase móvil en equilibrio.

$$K' = \frac{\text{cantidad de la muestra en la fase estacionaria}}{\text{cantidad de la muestra en la fase móvil}}$$

Dicho de otra manera, es el tiempo adicional (o volumen) que un soluto necesita para eluir respecto a un soluto no retenido. Se expresa de la siguiente manera:

$$K' = \frac{T_R - T_0}{T_0} = \frac{T_R}{T_0} - 1$$

En cromatografía líquida K' está controlado por la fuerza del solvente, debiéndose encontrar el más adecuado para una separación utilizando desde un solvente de fuerza baja hasta uno de mayor fuerza; dependiendo de que tan rápido sale el primer componente de la muestra, los valores recomendables son de 2 a 6 y en muestras con más de dos componentes el intervalo óptimo es de 1 a 10.

8. FACTOR DE SELECTIVIDAD (α)

Es la relación del tiempo que dos picos permanecen en la fase estacionaria. Aquí se realiza la separación y de acuerdo a la interacción que haya con un compuesto y otro se realiza la selección, saliendo de la columna en tiempos diferentes. Si el

valor de $\alpha = 1$, los dos solutos tienen la misma solubilidad o interaccionan de manera similar con la fase estacionaria, y no se realiza la separación, así entre más elevado sea el valor de α , es mayor la selectividad de la fase estacionaria realizándose la separación. El factor de selectividad está dada por:

$$\alpha = \frac{Tr (B)}{Tr (A)} = \frac{Tr (B) - T_0}{Tr (A) - T_0}$$

Para mejorar la selectividad se puede:

- a) Cambiar la polaridad, pH y/o fuerza iónica de la fase móvil para el caso de cromatografía líquida (CL).
- b) Cambiar la fase estacionaria, columna o dimensiones de la misma para el caso de CL y cromatografía de gases (CG).
- c) Modificar la temperatura (mediante un horno para columnas) para CL y CG.

9. NUMERO DE PLATOS TEORICOS (N)

La eficiencia de la columna se mide por los platos teóricos N, éstos miden el ensanchamiento de la banda del soluto de la muestra a medida que pasa a través de la columna. Los platos teóricos se calculan directamente del cromatograma.

Como un pico cromatográfico presenta la forma de una curva normal, ésta tiene una desviación estándar, σ , la cual indica que tan agudo es el pico; debido a que este parámetro depende de varios factores, entre ellos el flujo, la longitud de la columna,

tamaño de partícula, etc. se ha optado utilizar un valor relativo calculado por la siguiente fórmula:

$$N = 5.54 (Tr/Wh)^2$$

Los datos se obtienen del pico cromatográfico como se observa en la figura 3.

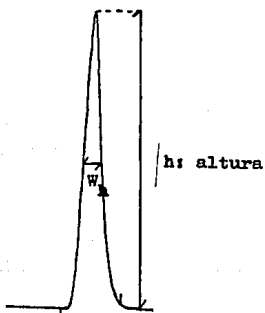


FIGURA 3. Wh: ancho del pico medido al 50% de su altura.

Existen diversos métodos para calcular N, el descrito anteriormente no se ve afectado con la presencia de picos asimétricos, ya que los coleos del pico están por debajo de la mitad y por lo tanto no se afecta sensiblemente la medida de eficiencia por el coleamiento.

10. ALTURA EQUIVALENTE A UN PLATO TEORICO (H)

Indica valores teóricos de las etapas de partición que sufren las moléculas de la muestra al pasar a través de la columna, representado como la longitud de la columna necesaria para generar un plato teórico.

$$H = \frac{L}{N}$$

La altura de plato de una columna varía con la velocidad lineal, u , del eluyente, donde:

$$u = \frac{L}{T_0} \quad \begin{array}{l} L: \text{Longitud de la columna (mm)} \\ T_0: \text{Tiempo muerto (seg)} \end{array}$$

La gráfica de dependencia de H sobre u se conoce como curva de altura de plato y un ejemplo típico se muestra en la figura 4. Las curvas de altura de plato proporcionan una medida para comparar la eficiencia entre diferentes columnas y materiales de empaque. Sin embargo, H depende del tamaño de partícula, dp , provocando curvas diferentes para columnas de material de empaque igual pero diferente tamaño de partícula. Para solucionar este problema se utilizan parámetros adimensionales o reducidos, tales como: altura de plato reducido (h) y velocidad de flujo reducida (v).

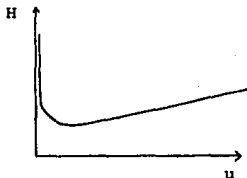


FIGURA 4. Dependencia de altura de plato H, sobre la velocidad lineal, u. Empaque de columna: Lichrosorb S1 60.

El diagrama de Van Deemter demuestra una ecuación de tres términos, donde cada uno de ellos describe un efecto físico, que relaciona los parámetros operacionales de la columna con su eficiencia, donde:

$$H = B / u + A u^{0.5} + C u$$

El primer término es importante a flujos bajos y da dispersión debida a difusión axial (B aproximadamente 2). El segundo término es una medida de la calidad del empaque de la columna, con A menor de 1 en los mejores casos. El tercer término predomina a alta dispersión y es desde baja transferencia de masas entre la fase móvil y la estacionaria. El valor mínimo teórico de C para partículas porosas es de 10^{-2} , pero es típico entre 0.05 y 0.1 para materiales microparticulados modernos. Para materiales

con poca transferencia de masa h aumenta al aumentar la velocidad reducida, siendo el punto mínimo el de mayor eficiencia de la columna a un flujo óptimo, esto se observa en la figura 4.

La eficiencia de una columna se refleja en la forma de los picos cromatográficos, esto es, entre más agudos y largos sean, la columna es más eficiente, generalmente entre más tiempo permanezca el soluto dentro de la columna, mayor será el ensanchamiento del pico, perdiendo eficiencia.

El pico cromatográfico indica la dispersión de la muestra durante su paso a través de la columna. Esto es importante para distinguir entre la dispersión debida a la columna y la dispersión debida a efectos extracolumna como : mezclado anterior o posterior a la columna, en el inyector, la tubería y el detector, estos efectos deben estar bajo control para no culpar a la columna de una mala eficiencia.

Entre los factores debidos a la columna se tiene:

1. Difusión turbulenta. Este término se refiere a las diferentes trayectorias que las moléculas pueden tomar dentro de la columna al ser eluidas, lo anterior debido a su empaquetamiento, provocando que algunas moléculas tomen rutas más cortas que otras, y con ello el ensanchamiento de banda, en la figura 5 se observa la difusión turbulenta.

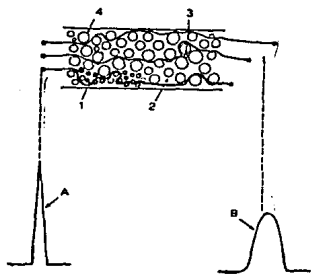


FIGURA. 5. Ensanchamiento de banda debido a la difusión turbulenta. A. Concentración inicial. B. Perfil de concentración final. 1) Partículas finas, 2) Distribución normal de partículas, 3) Partículas aglomeradas, 4) Baja densidad de empaque cercano a la pared de la columna.

2. Difusión longitudinal. En CG este término tiene considerable efecto y, expresa la dispersión de la banda de la muestra bajo la influencia de difusión molecular. Los altos coeficientes de difusión en la fase gaseosa provocan bandas de muestra dispersas longitudinalmente a lo largo de la columna, particularmente a velocidades de flujo bajas, provocando ensanchamiento del pico y como consecuencia ineficiencia. En principio, el mismo efecto es posible en la fase líquida y puede llegar a ser importante a velocidades de flujo muy bajas, provocando la disminución de la eficiencia.

3. Transferencia de masa. Si una muestra es retenida en un material de empaque, entonces la muestra pasa a través de la columna interaccionando con el material de empaque. Esta interacción puede ser una adsorción de la muestra o una partición dentro del empaque, seguido posteriormente, cuando la fase móvil fresca entra en contacto con el empaque, la muestra regresa a la fase móvil. Dichas interacciones de intercambio ocurren repetidamente con todas las moléculas de la muestra durante su paso a través de la columna. La contribución de la transferencia de masa, sobre todo en la altura de plato, incrementa con la velocidad de la fase móvil. Este también depende del tipo de cromatografía y de la viscosidad de la fase móvil.

C. COMPONENTES DE UN CROMATOGRÁFO DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

En cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), la fase móvil es filtrada en un reservorio, presurizado y bombeado a través de la columna. Una mezcla de solutos es inyectada al inicio de la columna y separada en sus componentes al paso por la columna y los solutos individuales son monitoreados por un detector, posteriormente registrados como picos por un graficador. De tal manera que los componentes básicos de un equipo cromatográfico son: reservorio de fase móvil, bomba de alta presión, inyector, columna, detector, integrador y colector de desechos, la figura 6 muestra como van unidos los diferentes módulos del cromatógrafo.

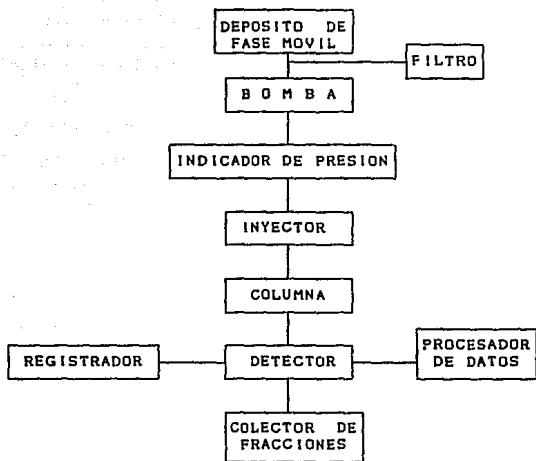


FIGURA. 6. Esquema de las partes de un equipo cromatográfico.

1. BOMBAS

La bomba en cromatografía líquida es una de las partes más importantes del equipo, ya que ésta proporciona la fuerza necesaria para impulsar la fase móvil a presiones elevadas a través de la columna.

Las especificaciones generales que debe cumplir una bomba son: repetibilidad, precisión, exactitud baja pulsación y mantenimiento del ruido.

Existen diversos tipos de bombas que se clasifican según su funcionamiento, por lo que tenemos bombas de flujo constante y de presión constante.

2. INYECTORES

Para obtener buenos resultados de cuantificación, es importante contar con un inyector que introduzca a la columna la muestra y que se encuentre en buenas condiciones para evitar la distribución de solutos como bandas anchas y cortas, para evitarlo, el inyector debe contar con una zona pequeña que pueda ser barrida totalmente por la fase móvil evitando la difusión de la muestra y la dilución exponencial.

Los inyectores se pueden clasificar en aquellos en donde la inyección se hace a través de " septum ", con paro de flujo y por medio de válvulas.

3. DETECTORES

Uno de los mayores requisitos instrumentales en la cromatografía de líquidos es un detector sensitivo para un monitoreo continuo de los efluentes de la columna.

Algunas características que debe cumplir un detector son:

- Alta sensibilidad
- Respuesta a todos los solutos
- Amplio intervalo de linealidad
- No contribuir a el ensanchamiento de banda
- No ser destructivo
- Respuesta rápida

Si los componentes de una muestra difieren demasiado en sus propiedades, pueden conectarse más de un detector consecutivamente para registrar los solutos de interés de la muestra.

4. REGISTRADORES E INTEGRADORES

Un registrador mide la señal eléctrica enviada por el detector, transformando la señal en el desplazamiento de una plumilla que graba sobre una banda de papel, su magnitud depende de la intensidad de la señal original.

Por otro lado, el integrador tiene el mismo principio, solo que cuenta con un programa que proporciona el área bajo la curva del pico, la cual puede relacionar con la concentración de cada soluto presente en la muestra, además puede proporcionar entre otras cosas, ancho del pico, y tiempos de retención.

CAPITULO II. FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA

La caracterización de columnas se hizo con aquellas que presentaron una buena eficiencia, ésta se evaluó con respecto a las especificaciones de cada fabricante. Es importante trabajar con columnas que presenten una buena eficiencia para que los resultados obtenidos puedan atribuirse a la propiedad que se está analizando y no sean producto del mal estado de la columna.

En este trabajo el análisis incluye los aspectos que se explican a continuación, se consideran los más importantes que pueden afectar el comportamiento cromatográfico de la mayoría de los principios activos utilizados en la industria farmacéutica.

Dos características importantes que deben cumplir los solutos de prueba son:

- Ser solubles en disolventes polares.
- Tener absorbancia al espectro en la región ultravioleta.

Además en cada caso se explicarán otros factores que deben de cumplir los solutos de ensayo.

A. CARACTERIZACION CINETICA (4.5)

Se calcularon parámetros reducidos debido a que éstos permiten comparar columnas con diferentes dimensiones, un parámetro reducido es aquel que involucra en su cálculo las

dimensiones de cada columna proporcionando valores que se consideran propios de la fase estacionaria sin importar su tamaño, entre ellos se evaluó: altura equivalente a un plato teórico, altura de plato reducido y velocidad reducida (v), las fórmulas para su cálculo se encuentran en el primer capítulo de este trabajo. También se obtuvo información que indica la calidad de la columna con el número de platos teóricos y otros parámetros que dan información general acerca de su estado como: resistencia de flujo (ξ), impedimento de columna (E) y factor de coleo, sus fórmulas de cálculo son las siguientes:

$$\xi = (dp^2/L) * (\Delta P t_0 / \eta)$$

$$v = L dp / t_0 D_m$$

$$E = h^2 \xi$$

donde dp es el diámetro de partícula, L es la longitud de la columna, ΔP es la presión de gota de columna, t_0 es el tiempo muerto, η es la viscosidad de la fase móvil, D_m es el coeficiente de difusión del soluto.

La resistencia de flujo es un indicativo de una excesiva presión de gota en el sistema que sirve para el cálculo del impedimento de columna. Valor que se relaciona inversamente con la calidad de la columna, esto es, entre más bajo sea el valor de E la calidad de la columna se verá aumentado. El valor de E es independiente del diámetro de partícula y su aumento puede deberse a que la columna no sea eficiente (valores altos de h), o bien a

una excesiva presión de gota (valores altos de \dot{Q}).

Esta prueba se debe realizar a cada columna con la misma fase móvil y soluto de prueba. El soluto debe cumplir con las siguientes características:

- Ser una molécula de estructura sencilla.
- No presentar grupos funcionales que puedan interaccionar con la fase estacionaria.

A tales características se ajusta el tolueno cuya estructura química se observa en la figura 7, motivo por el cual se empleó en el desarrollo del presente trabajo.



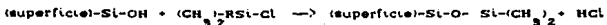
FIGURA 7. Estructura química del tolueno.

B. CARACTERIZACION QUIMICA

Dentro de las características químicas más importantes para evaluar a una columna cromatográfica se encuentran las siguientes:

- a) Actividad Silanol de una columna (6,7,8,9,10).

En la síntesis de fase reversa se lleva a cabo una reacción entre los grupos silanol de la superficie de la sílica con cadenas hidrocarbonadas, la reacción general es la siguiente:



Dado a que esta reacción es incompleta, algunos grupos silanol (-Si-OH) quedan libres, los cuales le dan la actividad a la columna.

Estos grupos pueden interaccionar con fármacos que tengan grupos funcionales de carga positiva al momento de ser eluidos por la columna, presentando cromatogramas deformados o bien con tiempos de retención demasiado elevados afectando directamente en la cuantificación del principio activo. Bajo otras circunstancias esta actividad puede ayudar a la separación de dos o más sustancias. Debido a esto, es importante conocer la actividad de cada columna con que se trabaje.

El método usual para sintetizar una fase estacionaria octadecil, involucra la reacción de la sílica con un octadecilclorosilano por agitación, algunas veces con calentamiento o reflujo, de una suspensión de las partículas de sílica con una solución de silano. El silano es atacado en la superficie via formación de un siloxano (Si-O-Si) unido entre la superficie de grupos silanol (Si-O-H) y el clorosilano, liberando ácido clorhídrico (HCl) en el proceso. Una base débil, como piridina, se adiciona para remover el HCl y conducir la reacción hacia productos. Este paso es frecuentemente seguido por la reacción de un trimetilclorosilano más pequeño para desactivar los grupos silanol residuales, a este paso se le denomina recubrimiento final ("end-capping"). Los grupos silanol de la superficie de la sílica se encuentran en una gran variedad de formas (unidas por hidrógeno, disociados, etc.) con diferente reactividad química y accesibilidad física (impedimento estérico).

Esta heterogeneidad es muchas veces la mayor razón de la distribución y homogeneidad de las moléculas unidas a la superficie de la sílica, afectando directamente en la eficiencia y resolución de la fase estacionaria.

Por otro lado, se debe evaluar esta característica periódicamente, ya que con el uso puede incrementarse.

Algunos productores le dan un tratamiento especial a las columnas, llamado recubrimiento final, consistente en hacer pasar a través de la columna una sustancia que reacciona con los residuos silanol, desactivándolos, entre ellos tenemos trimetilclorosilano, hexametildisilano, trimetilmtoxosilano, por lo cuál una columna con recubrimiento servirá como parámetro de referencia para la clasificación que se pretende realizar. El fabricante de la columna μ Bondapack especifica que su fase estacionaria ha sido sometida a un recubrimiento final, por tal motivo una columna de este tipo será empleada como parámetro de referencia.

Esta característica se evalúa con dos sustancias de tamaño similar para regular el carácter hidrofóbico, una con carga positiva y otra negativa o neutra, el orden de su elución indica que tanto están desactivados los grupos silanol de la fase estacionaria, esperando en columnas con recubrimiento final que primero eluya la sustancia con carga positiva y luego la negativa o neutra, debido a la interacción de cargas que se presenta.

Las sustancias que se ajustan a las especificaciones anteriores son la anilina y el fenol cuyas estructuras químicas se observan en la figura 8.



FIGURA 8. Estructuras químicas de anilina y fenol.

b) Hidrofobicidad (11, 12, 13)

La hidrofobicidad está dada por la cantidad total de carbón presente en la columna, característica que es importante tomar en cuenta cuando se trate con fármacos de gran tamaño ya que dependiendo de las características del análisis es necesario trabajar con columnas de alta o baja carga de carbón para llevar a cabo separaciones a tiempos de análisis aceptables.

La fase móvil tiene influencia predominante sobre la fase estacionaria en la retención, sin embargo, se ha observado que el factor de capacidad aumenta conforme se aumenta la longitud de cadena unida, también dependiendo del tamaño del soluto. Este aumento tiene un límite en la longitud de cadena, conocido como longitud crítica de cadena, el cual es independiente de la composición de la fase móvil.

La teoría que expresa correctamente la retención se refiere a la competencia entre el soluto con las moléculas de la fase móvil por interaccionar y la interacción mutua de las moléculas de la fase móvil, en donde las moléculas del soluto son desplazadas por

la fase móvil y forzadas a entrar a la fase estacionaria.

Un factor importante en la retención de solutos dependerá del tamaño y naturaleza del soluto, esto se puede observar en la figura 9 en donde se representan dos moléculas de tamaño diferente interaccionando con cadenas unidas a la fase estacionaria, en donde al aumentar el tamaño del soluto se requiere también un aumento de la longitud de cadena para obtener una mayor interacción. En el esquema a y b el soluto más chico tiene mayor interacción con las cadenas de la fase. En c ambos solutos se encuentran totalmente interaccionando con la fase. De tal manera que la selectividad de solutos dependerá de la longitud de las cadenas y de la cantidad de ellas presentes en la fase, a este último efecto se le conoce como hidrofobicidad.

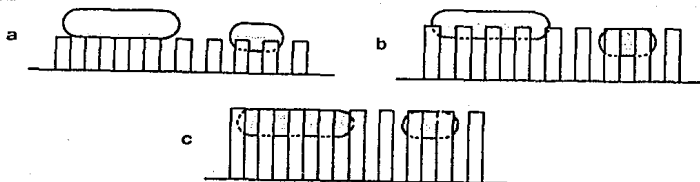


FIGURA 9. Representación esquemática de la hidrofobicidad.

La hidrofobicidad se evalua utilizando dos sustancias con un momento dipolar igual a cero pero con diferencia significativa en tamaño. en donde su orden de elución será un indicio de la cantidad de carbón en la fase estacionaria, esto es, entre mayor carga de carbón, el compuesto más grande tendrá un tiempo de retención mayor, debido a la interferencia de las cadenas de carbón unidas a la fase estacionaria. Para la realización de esta prueba se puede utilizar benceno y naftaleno, sus estructuras químicas se encuentran en la figura 10.



BENCENO



NAFTALENO

FIGURA 10. Estructuras químicas de benceno y naftaleno.

c) Tipo de fase (14).

En la síntesis de fases, al unir las cadenas de carbón a los grupos silanol, puede existir una reacción de polimerización, ésta se lleva a cabo en presencia de agua; si es excluida el agua de la síntesis se obtiene una fase de tipo monomérico.

Esta propiedad actua de forma similar a la hidrofobicidad, en donde dependiendo del tamaño de las cadenas de carbón unidas a la fase se verá afectado el orden y el tiempo de elución de fármacos de gran tamaño.

Para evaluar el comportamiento de la fase estacionaria, es

decir, si se comporta como fase monomérica o polimérica, se utilizan tres sustancias, una con forma espacial de silla, una planar y otra con forma helicoidal; para una fase polimérica se espera un orden de elución de la sustancia helicoidal, de silla y por último la planar, alterándose el factor de capacidad de estas sustancias en una fase de tipo monomérico, lo anterior se debe a la interacción que presentan las cadenas de carbón con las diferentes estructuras de las moléculas propuestas.

Estas sustancias deben tener una polaridad similar para asegurar que la diferencia en el orden de elución no sea debido a efecto de polaridad.

d) Actividad Metálica (15, 16)

Algunas sustancias tienen la propiedad de que a través de la acción de pares electrónicos, se combinan con un ión metálico y forman compuestos quelatos, en general de cinco o seis miembros.

Casi todos los metales pueden formar quelatos. Los principales átomos donadores de electrones son N, O y S. Conforme al número de grupos donadores, las moléculas ligantes pueden ser bidentadas, tri o polidentadas. Los agentes quelantes hidrosolubles reciben el nombre de agentes secuestrantes.

Los principales grupos químicos que pueden formar quelatos son las aminas, oximas, cetonas, etc.

Numerosas sustancias presentes en sistemas biológicos son quelatos: insulina, hemoglobina, mioglobina, clorofila, vitamina B₁₂, además de varias enzimas. Ellas desempeñan funciones vitales en el organismo: catálisis de reacciones redox, transporte de oxígeno, hidrólisis y síntesis de proteínas, descarboxilación y transporte de CO₂.

La superficie de los metales se considera que tienen uno o más orbitales disponibles para coordinación con solvente o soluto.

Al fabricar las fases estacionarias puede presentarse impurezas metálicas, las cuales interactúan con grupos funcionales electrodonadores, por lo cual fármacos que presenten esta característica mostrarán gran interacción, dando como resultado cromatogramas deformes y coleados.

De tal manera que esta característica es evaluada con una sustancia quelante; si la fase estacionaria contiene impurezas metálicas, el cromatograma resultante será deformado y coleado debido a la interacción del quelato con los metales presentes.

El agente quelante que se utilizó fue la 2,2-bipiridina, en la figura 11 se encuentra su estructura química.

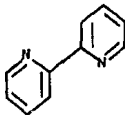


FIGURA 11. Estructura química de 2,2-bipiridina.

CAPITULO III. OBJETIVOS.

1. Desarrollar un protocolo de evaluación experimental con fundamentación teórica para Columnas Cromatográficas de Líquidos de Alta Resolución.

1.1. Obtener una clasificación Cinética y Química de columnas.

1.2. Establecer las características que debe cumplir la columna para su elección frente a principios activos con grupos funcionales definidos.

2. A partir de la información obtenida en la caracterización, proponer experimentos para predecir el comportamiento cromatográfico y comprobarlo experimentalmente.

CAPITULO IV. HIPOTESIS.

Al realizar el análisis cromatográfico de sustancias con características indicadoras, se podrá según su comportamiento cromatográfico, tener una caracterización de las columnas, con esta información y con la elaboración de un protocolo experimental se podrá ayudar a optimizar y sistematizar el desarrollo de métodos analíticos para la cuantificación de principios activos de interés farmacéutico.

CAPITULO V. MATERIAL Y METODO.

MATERIAL

- Viscosímetro Cannon.
- Vasos de precipitado.
- Probetas.
- Matraces erlenmeyer.
- Termómetro.

EQUIPO

Baño de ultrasonido.

Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución con las siguientes características:

- Bomba de Alta Presión capaz de suministrar un flujo constante.

MOELO

MARCA

510

Waters

- Detector de absorbancia capaz de suministrar un haz de luz constante de 254 nm.

MODELO	MARCA
334	Beckman
160	Beckman

- Inyector capaz de introducir a la columna un volumen de 20 µl de muestra.

MODELO	MARCA
U6K	WATERS

- Integrador compatible con el equipo.

MODELO	MARCA
745	Waters

- Controlador de temperatura de columnas

MODELO	MARCA
TCH	Waters

Columnas cromatográficas de acero inoxidable unidas químicamente de las siguientes marcas:

µBondapack, Ultrasphere octyl, Versapack, Ultrasphere XL ODS, Econosphere, Ultrasphere IP.

REACTIVOS

REACTIVO	MARCA
- Anilina grado reactivo (GR)	BAKER ANALYZED
- Acido nítrico	BAKER ANALYZED
- Fenol GR	BAKER ANALYZED
- Antraceno GR	BAKER ANALYZED
- 2,2'-bipiridina GR	MERCK

- Benceno CLAR	BAKER ANALYZED
- Tolueno CLAR	BAKER ANALYZED
- Metanol CLAR	MERCK
- Acetonitrilo CLAR	MERK
- Agua CLAR	
- Acido pipemídico	
- Nicotinamida	
- Enantato de estradiol	

M E T O D O

A. SELECCION DE LAS COLUMNAS DE PRUEBA

Para poder caracterizar las columnas primero fue necesario confirmar que se encontraban en condiciones de uso con el fin de que los resultados obtenidos fueran motivo de la propiedad que se estuviera evaluando y no al mal estado de la columna. Lo anterior se hizo determinando la eficiencia de cada columna siguiendo las especificaciones del fabricante, éstas varían en la composición de fase móvil, sustancias de prueba y método de medición, dependiendo de la marca de ésta.

A las columnas que no cumplieron las especificaciones de calidad de su fabricante, se les realizó una regeneración consistente en lavar los filtros en ultrasonido con ácido nítrico, abundante agua y metanol; cuando fue necesario se reemplazó la columna y por último se hizo pasar disolventes cada vez con menor polaridad y regresando a la original para eliminar las impurezas contenidas en la columna, que afectan directamente en su calidad.

Una vez terminada la regeneración, se evaluó nuevamente la

eficiencia de cada columna siguiendo las especificaciones del fabricante.

A partir de lo anterior se seleccionaron las columnas que cumplieran las especificaciones mínimas de eficiencia establecidas por el fabricante. Entre ellas quedaron columnas con empaque μ Bondapack, Ultrasphere 1P, Econosphere y Ultrasphere octyl, Ultrasphere XLQDS, Versapack.

B. CARACTERIZACION

Con la finalidad de homogenizar las condiciones de prueba y poder realizar la comparación entre las diferentes columnas se tomaron en cuenta los siguientes puntos:

La temperatura de ensayo, que es un factor determinante en la eficiencia de una columna debido a la variación de la viscosidad de la fase móvil y los coeficientes de distribución de los solutos entre la fase móvil y estacionaria, fue controlada utilizando un horno para columnas programado para mantener una temperatura de 25 ± 2 °C. Este valor se eligió considerándola como temperatura normal o promedio en un laboratorio.

Para el cálculo del número de platos teóricos se utilizó la fórmula que considera el ancho del pico al 50% , con el fin de evitar variaciones si se presentaban picos coleados, ya que a esta altura dicho efecto se ve minimizado.

Con lo que respecta al factor de coileo se decidió emplear el

ancho del pico al diez por ciento de su altura, esto con la finalidad de facilitar la medición ya que para picos de tamaño pequeño el cinco por ciento (que es el otro método común de medición) se manifiesta en milímetros, lo cual podría ser una fuente de variación al realizar el trazo y medición del factor de coileo.

En cada prueba se estableció realizar seis inyecciones ya que en la literatura este número se considera como mínimo representativo de una población de datos.

Para elegir la longitud de onda se tomó en cuenta que la mayoría de los principios activos utilizados en la industria farmacéutica tienen absorbancia a 254 nm.

1. CARACTERIZACION CINETICA.

Como se explicó en la fundamentación del tema, para esta prueba se requiere un soluto que sea de estructura sencilla, es decir, de tamaño pequeño y que no posea grupos funcionales que pudieran interaccionar con la fase estacionaria características a las que se ajusta el tolueno, que absorbe a una longitud de onda de 254 nm.

Para encontrar las condiciones cromatográficas idóneas se experimentó con fases móvil de carácter polar, se escogieron metanol y agua por ser algunos de los disolventes más frecuentes en cromatografía de fase reversa y se probaron a diferente concentración. La que presentó picos más simétricos y a un tiempo de retención aceptable fue la compuesta por metanol-agua 60:40 (V/V).

Para determinar la concentración adecuada de tolueno se hicieron diferentes inyecciones variando la concentración siendo de 1.4 $\mu\text{l/ml}$ la que proporcionó picos de un tamaño adecuado.

Dado que se requiere conocer el tiempo muerto de la columna, para el cálculo de varios parámetros cinéticos, se utilizó al nitrito de sodio a una concentración de 2.8 $\mu\text{g/ml}$, esta concentración fue elegida entre varias ya que proporcionaba los mejores picos. Su elección se basó en las propiedades de absorber a 254 nm, y ser un compuesto muy polar, motivo por el cual es arrastrado por la fase móvil y no presenta interacción con la fase estacionaria, por lo cual se considera que sale de la columna al mismo tiempo que la fase móvil. Con lo anterior, al registrarse su pico en el cromatograma, es posible conocer el tiempo muerto de la columna. En la figura 12 se observa un cromatograma con los picos correspondientes al nitrito de sodio y al tolueno.

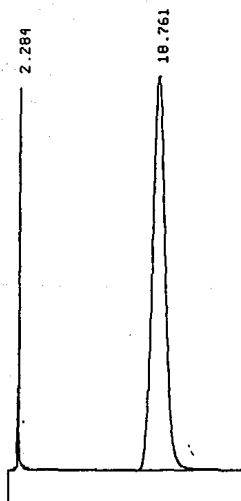


FIGURA 12. Cromatograma de una inyección de tolueno y nitrito de sodio. Fase móvil metanol:agua 60:40 v/v; $\lambda=254$ nm.

Por otro lado, se requirió conocer la viscosidad de la fase móvil para el cálculo del coeficiente de difusión del soluto, dato que a su vez es necesario para el cálculo de la velocidad reducida de la columna. Debido a que en la literatura solo se encontró el valor de la viscosidad a una temperatura de 20°C y como el análisis se realizó a 25°C fue necesario conocer el nuevo valor a esta temperatura.

Para lograr lo anterior se utilizó un viscosímetro tipo Cannon, empleando agua para el cálculo de la constante de viscosidad, primero a la temperatura de 20°C con el fin de corroborar el valor obtenido experimentalmente con el reportado en literatura, obteniéndose un valor de 1.7003 cp experimentalmente en comparación de 1.69 cp reportado. A partir de esto se consideró adecuado el sistema de medición realizándose a 25°C , en donde se obtuvo un valor de 1.5735 cp, el cual se empleó para los cálculos respectivos.

2. CARACTERIZACION QUIMICA.

a. Actividad silanol.

En esta prueba se empleó anilina ($1 \mu\text{l}/\text{ml}$), fenol ($0.6 \text{ mg}/\text{ml}$), y nitrito de sodio ($2.8 \mu\text{g}/\text{ml}$), las dos primeras por que cumplen con las especificaciones descritas en la fundamentación del tema, esto es, son dos solutos que su tamaño no varía significativamente entre sí y la única diferencia importante es su carga polar. El nitrito de sodio también se utilizó como indicativo de tiempo muerto.

Las concentraciones de inyección se eligieron a partir de

probar varias de ellas y las reportadas anteriormente fueron las que proporcionaron los picos más adecuados. Esto se puede observar en la figura 13 donde se presenta un cromatograma de una inyección de anilina, fenol y nitrito de sodio.

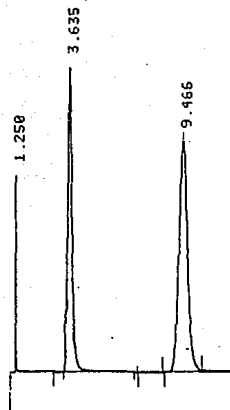


FIGURA 13. Cromatograma de una inyección de anilina, fenol y nitrito de sodio. Fase móvil metanol:agua 60:40 v/v.

Para todas las columnas se empleó una fase móvil compuesta de metanol:agua 60:40 (V/V). Esta fase móvil se escogió con la finalidad de simplificar el desarrollo de la caracterización de las columnas, ya que en la caracterización cinética presentó buenos resultados, al momento de probar en la actividad silanol los picos resultantes presentaron buena forma y buen factor de capacidad.

En algunas columnas los picos correspondientes a la anilina y fenol, no se alcanzaron a resolver (este comportamiento se explica en Resultados y Análisis de Resultados), motivo por el cual se hicieron seis inyecciones de cada una de ellas y seis inyecciones de nitrito de sodio. Para aquellas columnas que presentaron resolución de las sustancias de prueba se efectuaron seis inyecciones de una mezcla conteniendo fenol, anilina y nitrito de sodio a las concentraciones anteriormente descritas.

Con la finalidad de poder realizar la comparación entre columnas se utilizaron velocidades reducidas lo más cercanas posible, esta se ajustó modificando la velocidad de flujo de la fase móvil y se calculó de igual manera que en la caracterización cinética.

Una vez que se tuvieron los cromatogramas correspondientes se calculó, para cada columna, los factores de selectividad capacidad y coeol.

b. Actividad Metálica.

En esta prueba se pretendía emplear la misma fase móvil reportada para el caso de la caracterización cinética e hidrofobicidad, pero los picos resultantes presentaron un deformamiento y coeol muy pronunciado, por lo cual se optó emplear

la fase móvil reportada en la literatura (referencia 15), que consistió de metanol:solución 0.5% de acetato de sodio 60:40 (V/V) pH = 7, preparada de la siguiente manera: 40 volúmenes de una solución al 0.5 % de acetato de sodio se mezclaron con 60 volúmenes de metanol CLAR. Posteriormente a la mezcla se le ajustó el pH = 7 con ácido acético al 10 % con un potenciómetro, y fue filtrada a través de membrana Millipore tipo GV de 0.22 μ m de tamaño de poro, con ayuda de vacío y agitación mecánica.

Por otro lado se probaron diferentes concentraciones del agente quelante, 2,2-bipiridina, y la que proporcionó picos de tamaño adecuado fue de 0.104 mg/ml, tal como se observa en la figura 14.

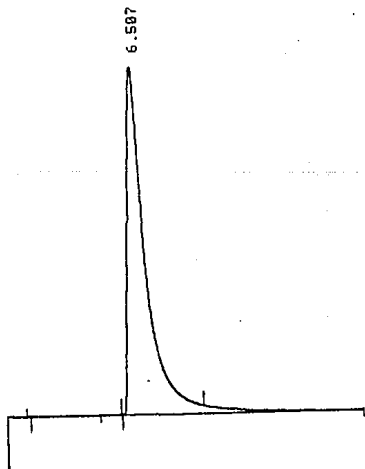


FIGURA 14. Cromatograma de una inyección de 2,2-bipiridina. Fase móvil metanol:solución 0.5% de acetato de sodio 60:40 v/v pH=7.

A los picos resultantes se les calculó su factor de coileo el cual se empleó para determinar el grado de la actividad metálica que presenta cada columna.

c. Actividad hidrofóbica.

La fase móvil empleada en la caracterización cinética se trató de utilizar en esta prueba, pero los picos no presentaron buena forma, por ello se cambió al metanol por acetonitrilo dando buenos resultados tal como se observa en la figura 15, es decir se cambiaron los disolventes para modificar la selectividad pero se mantuvo constante la fuerza de elución de la fase móvil (ref. 3).

Para determinar el carácter hidrofóbico de las columnas se emplearon naftaleno (0.2 mg/ml), benceno (1 μ l/ml) y nitrito de sodio (2.8 x 10⁻³ mg/ml) eluidos con una fase móvil de acetonitrilo:agua 65:35 (V/V) la cual se preparó mezclando 65 volúmenes de acetonitrilo y 35 de agua, ambos grado cromatográfico, medidos por separado en una probeta graduada, se filtró a través de membrana Millipore tipo GV con tamaño de poro de 0.22 μ m con ayuda de vacío y agitación mecánica.

A los picos obtenidos se les determinaron los factores de coileo, capacidad y selectividad.

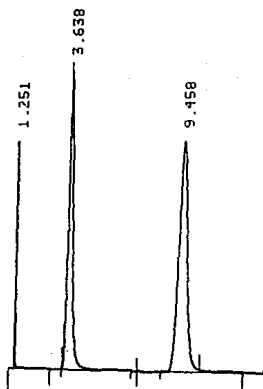
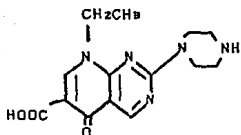


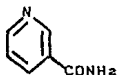
FIGURA 15. Cromatograma de una inyección de naftaleno, benceno y nitrito de sodio.

3. PREDICCIÓN (CARACTERIZACIÓN CRÍTICA).

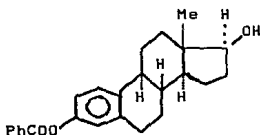
En la predicción se utilizó la información recopilada en la caracterización cinética y química de las columnas, analizando principios activos que fueran afectados por las actividades silanol, metálica e hidrofóbica. En base a ésta se escogieron al ácido pipemídico, nicotinamida y enantato de estradiol respectivamente. Sus estructuras químicas se pueden observar en la figura 16.



ACIDO PIPEMIDICO



NICOTINAMIDA



ENANTATO DE ESTRADIOL

FIGURA 16. Estructuras químicas de los principios activos elegidos para la predicción.

La elección del ácido pipemídico para evaluar la actividad silanol se basó en la gran cantidad de aminas que presenta la molécula suponiendo que interaccionarían con los grupos silanol activos.

La nicotinamida se eligió para evaluar la actividad metálica debido a su capacidad de formar quelatos (16).

Por último, el enantato de estradiol se escogió para evaluar la hidrofobicidad por su gran tamaño.

Además los tres principios activos anteriores se pueden evaluar por medio de cromatografía líquida de alta resolución que lógicamente fue otra característica que influyó en su elección.

Estos principios se analizaron primero con la columna que especifica su método de análisis, posteriormente se eligió una columna diferente, pero que de acuerdo a las propiedades evaluadas en la caracterización pudiera presentar una eficiencia equivalente, y además, se ajustó la velocidad reducida para poder realizar un veredicto confiable.

Las fases móvil empleadas contienen agua y metanol a diferentes proporciones y el volumen de inyección fue de 20 μ l.

CAPITULO VI. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

Los empaques de las columnas utilizados fueron μ Bondapak (30 X 3.9 X 10), Ultrasphere octyl (15 X 4.6 X 5), Ultrasphere XLODS (7 X 4.6 X 3), Versapak (15 X 4.1 X 10), Econosphere (15 X 4.1 X 3), Ultrasphere IP (15 X 4.6 X 5), Ultrasphere IP (25 X 4.6 X 5).

NOTA: Los números entre paréntesis se refieren a las dimensiones de la columna: (longitud en cm X diámetro interno en mm X tamaño de partícula en μ).

Los resultados que se encuentran en las tablas siguientes se obtuvieron de las fórmulas descritas en el Capítulo I y se reporta el promedio de las seis inyecciones que se hicieron para cada caso.

A. CARACTERIZACION CINETICA

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en la caracterización cinética de columnas, para inyecciones de una solución de tolueno.

COLUMNA	N	H	h	ξ	ϵ	v	u	T
A	6756	4.44	4.44	7016.7	13.8	14.58	0.92	1.50
B	3345	4.48	8.96	424.19	3.41	6.15	0.78	1.34
C	3407	2.05	6.84	859.44	4.02	3.24	0.64	1.17
D	3883	3.86	3.86	1614.2	2.47	15.47	0.90	1.20
E	8733	1.71	5.72	774.71	2.53	8.11	1.74	1.14
F	11325	1.32	2.64	990.10	0.69	14.52	1.80	0.90
G	9480	1.58	3.16	2230.3	2.23	13.29	1.64	1.06
H	19869	1.25	2.51	1271.4	0.80	14.65	1.86	0.94

Tabla 1. Resultados de la caracterización cinética. N: número de platos teóricos, H: altura de plato teórico ($\times 10^{-2}$ m), h: altura de plato reducido, ξ : resistencia de flujo, ϵ : impedimento de columna, v: velocidad reducida, u: velocidad lineal (mm/s), T: factor de coleo.

El número de platos teóricos es un parámetro de comparación que puede emplearse solo para columnas con las mismas dimensiones y material de empaque, la altura de plato teórico puede utilizarse para aquellas columnas con el mismo material de empaque pero de diferente longitud. Por lo anterior, el parámetro más importante para comparar la calidad de dos columnas es la altura de plato teórico reducido, el cual en su cálculo contempla las dimensiones de la columna. Otro parámetro importante es la velocidad reducida que presenta cada columna, ya que ajustando el valor de este parámetro, variando la velocidad de flujo de la fase móvil, es posible provocar que se tenga la misma velocidad de la fase móvil a través de la columna, sin que quiera decir esto que se tenga el mismo flujo. De tal manera que ajustando este parámetro reducido es factible realizar una comparación de los demás parámetros de análisis. En algunos casos no fue posible igualar las velocidades

reducidas ya que al variar el flujo daba un valor mayor o menor al deseado. esto se debe a que la bomba tiene una escala con división mínima de décimas de mililitro, por lo cual se requiere divisiones más pequeñas para poder realizar un ajuste más preciso.

B. CARACTERIZACION QUIMICA.

En las siguientes tablas se encuentran los resultados de la caracterización de columnas referente a la parte de actividad química.

1. Actividad Silanol.

COLUMNA	FACTOR DE COLEO		FACTOR DE CAPACIDAD		FACTOR DE SELECTIVIDAD DE LA ANILINA CON RESPECTO AL FENOL
	ANILINA	FENOL	ANILINA	FENOL	
A	1.87	1.40	0.63	0.63	0.99
B	1.82	1.56	0.58	0.82	1.39
C	1.51	1.18	0.53	0.64	1.21
D	1.50	1.23	0.65	0.68	1.04
E	2.44	1.48	2.59	0.45	0.17
F	2.07	1.14	0.95	0.89	0.91
G	1.35	1.26	0.96	0.70	0.72
H	1.09	1.07	0.54	0.70	1.27

Tabla 2. Resultados de actividad silanol.

Como se explicó anteriormente, el parámetro que indica la magnitud de la actividad silanol en una columna es el factor de selectividad entre la anilina y fenol, los factores de coileo y capacidad dan información complementaria.

Todos los productores de las columnas empleadas indican en sus especificaciones que sus columnas han sido sometidas a recubrimiento final.

En la tabla 2 se aprecia que la columna E presentó el factor de selectividad (de la anilina con respecto al fenol) menor, esto significa que la anilina, en comparación con el fenol, permaneció más tiempo dentro de la columna, efecto que se atribuye a la interacción con los residuos silanol activos con el grupo amino de la anilina, mientras que el fenol tardó menos tiempo en salir de la columna provocando con ello un factor de selectividad menor a 1.0. Un cromatograma que ejemplifica esta situación se encuentra en la figura 17.

Al evaluar el factor de coileo para ambos picos, el correspondiente a la anilina tuvo un valor de 2.44 en comparación de 1.48 para el fenol, valores que indican una mayor interacción de la anilina con la fase estacionaria con respecto al fenol. Lo anterior reafirma que la fase presenta grupos silanol activos capaces de interaccionar con la anilina.

La columna B, presentó el factor de selectividad mayor (1.38). De tal manera que se consideró que tiene la actividad silanol menor de todas las columnas experimentadas. Se considera así debido a que el fenol sale de la columna después que la anilina, como se puede observar en la figura 18. En el caso de columnas sin actividad silanol se esperaba que el factor de

selectividad fuera igual o mayor a uno (1), debido a que las dos sustancias tienen un tamaño muy similar, además de que el oxígeno es más electronegativo que el nitrógeno situación que proporcionaría al fenol un carácter de polaridad mayor a la anilina. Sin embargo en la práctica se encontraron valores por debajo de lo esperado es decir que se invirtió el orden de elución, saliendo de la columna primero la anilina y después el fenol. Lo anterior hizo que se buscara información al respecto y se encontró que la anilina tiene un momento dipolar mayor que el fenol, provocando con esto que sea eluido más rápidamente por la fase móvil que es de tipo polar.

En base a lo explicado anteriormente se considera a una columna con residuos silanol activos cuando el factor de selectividad sea menor de 1.0, tal es el caso para las columnas A, E, F y G. Para las columnas B, C, D y H se considera que no tienen actividad silanol ya que el factor de selectividad obtenido es mayor a 1.0.

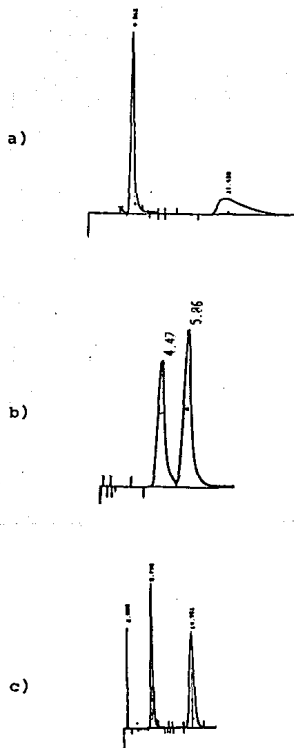


FIGURA 17. Cromatogramas que indican la actividad silanol de una columna. a) Columna con actividad silanol. b) Columna sin actividad silanol. c) Columna con actividad silanol intermedia.

Para las columnas F, G y H que son del mismo tipo de empaque pero de diferente fabricante y dimensiones, podemos observar un carácter silano! diferente. lo anterior puede deberse a la diferencia de uso a la que han sido sometidas, siendo la más vieja la columna G, posteriormente la F y al último la H, en donde la eficiencia disminuye respectivamente. Con lo anterior se aprecia la importancia de seguir la vida de las columnas para conocer el grado de deterioro que sufren con el uso.

2. Actividad Metálica.

COLUMNA	FACTOR DE COLEO 2,2-BIPYRIDINA
A	Indeterminado
B	2.1131
C	2.7244
D	4.3122
E	Indeterminado
F	Indeterminado
G	Indeterminado
H	4.3645

Tabla 3. Resultados de actividad metálica.

A partir de los resultados reportados en la tabla 3, se observa que las columnas A, E, F y G tienen gran actividad metálica, debido a que los cromatogramas presentaron un enorme coleamiento, a tal grado que no fue posible calcular el factor de coleo. En comparación con las columnas B, C, D y H se reportan valores de factor de coleo mucho menor, pero aún así se consideran picos con coleamiento, debido a que su factor es superior a 2, valor que se considera como máximo permitido para un pico cromatográfico, siendo el más pequeño de 2.11 para la columna E, y el mayor registrable fue de 4.36 para la columna H, estos valores se tomarán como referencia y para aquellas columnas que los sobrepasen podrá decirse que presentan actividad metálica.

Debido a que ningún proveedor especifica si su columna presenta o no actividad metálica, se propone realizar una desactivación de metales presentes en la fase por medio de un reflujo con ácidos orgánicos y posteriormente determinar su actividad metálica, el valor que resulte se podría tomar como referencia para que columnas con valores superiores a éste se consideren con actividad metálica.

En la figura 18 se presentan cromatogramas de columnas que se consideran con y sin actividad metálica.

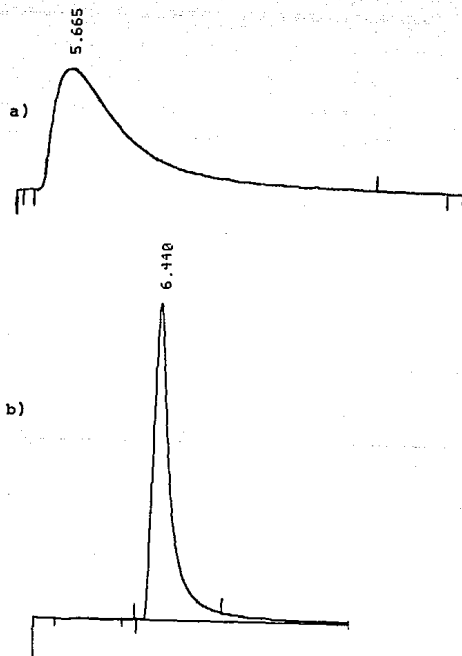


FIGURA 18. Cromatogramas que indican la actividad metálica de una columna. a) Columna con actividad metálica. b) Columna con poca actividad metálica.

En las columnas F, G y H que son del mismo tipo de empaque pero de dimensiones y fabricante diferente, se aprecia que dos de ellas presentan actividad metálica y una de ellas no. Resultados que reafirman la importancia de conocer las características de cada columna con la que se trabaja, ya que a pesar de ser columnas similares no presentan las mismas propiedades. Este fenómeno pudo deberse a las características o a posibles diferencias en el procedimiento de síntesis de la fase estacionaria de cada fabricante.

3. Hidrofobicidad.

COLUMNA	FACTOR DE COLEO		FACTOR DE CAPACIDAD		FACTOR DE SELECTIVIDAD DEL ACENAFTENO RESPECTO AL BENCENO
	ACENAFTENO	BENCENO	ACENAFTENO	BENCENO	
A	1.48	1.40	3.10	1.32	2.34
B	1.24	1.03	3.89	1.50	2.59
C	1.05	1.14	3.56	1.05	3.39
D	1.13	1.13	3.53	1.38	2.54
E	1.13	1.13	2.18	0.91	2.37
F	0.96	1.12	6.57	1.90	3.44
G	1.26	0.98	3.68	1.14	3.23
H	1.08	0.95	6.17	1.77	3.47

Tabla 4. Resultados de hidrofobicidad.

Con respecto a la hidrofobicidad, en la tabla 4 se localizan los resultados, se puede decir que la columna con mayor carácter hidrofóbico es la H, mientras que la A tiene menos acentuada esta característica. Las columnas F, G y H tuvieron valores similares, con lo cual a pesar de tener ciertas diferencias, lo que respecta a la hidrofobicidad son muy parecidas, causa posible o ser al mismo tipo de empaque.

La evaluación de la hidrofobicidad consistió en que entre más pequeño sea el factor de selectividad, mejor es el carácter hidrofóbico que presenta la columna, ya que reflejado en los cromatogramas indica el orden de los picos correspondientes al naftaleno y al benceno los cuales se pueden observar en la figura 19.

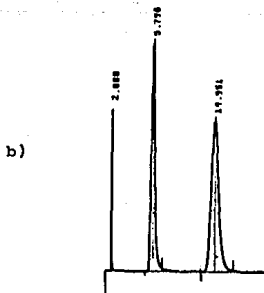
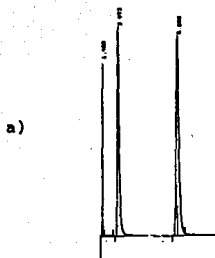


FIGURA 19. Cromatogramas que ejemplifican la actividad hidrofóbica de columnas cromatográficas. a) Columna con mayor caracter hidrofóbico. b) Columna con menor caracter hidrofóbico.

C. PREDICCIÓN DE EQUIVALENCIA ENTRE COLUMNAS.

En las siguientes tablas se encuentran los resultados obtenidos en la equivalencia de columnas, entre la especificada en el método analítico y la de prueba.

Como se mencionó al inicio de este trabajo, uno de los factores más importantes para evaluar la eficiencia entre columnas es la altura de plato reducido, por tal motivo al analizar los resultados referentes a la predicción, se tomó mayor énfasis en este parámetro de comparación.

Se trató de ajustar las velocidades reducidas lo más posible modificando el flujo de la fase móvil.

1. Actividad Silanol.

Sustancia de prueba: ácido pipemídico.

COLUMNA	N	H	h	T	K'	α	ν
PRUEBA	1401	0.21	21.41	1.56	1.83	1.79	24.94
ESPECIFICADA	1731	0.14	28.88	1.92	2.11	2.47	25.52

Tabla 5. Resultados de la predicción de actividad silanol

En la predicción de equivalencia para la actividad silanol podemos observar, en la tabla 5, que las velocidades reducidas son muy similares, pero no totalmente iguales, esto debido a limitaciones en el equipo mencionadas anteriormente, a pesar de ello las condiciones del sistema se consideraron adecuadas para la comparación. Como se puede ver el número de platos teóricos y la altura de plato teórico entre las dos columnas son muy diferentes debido a que las columnas de experimentación son de dimensiones

diferentes, mientras que los valores de altura de plato reducida tienen mayor similitud, lo anterior indica que las columnas tienen una eficiencia equivalente a pesar de sus diferencias.

Por otro lado, el factor de coleo para ambas columnas es menor de 2.0, valor que se considera como límite aceptable, es decir que con respecto al factor de coleo también son equivalentes, aunque la columna de prueba presentó menor interacción con los residuos silanol.

Con respecto al factor de capacidad y al factor de selectividad, se puede apreciar que son valores muy distintos, debido a las diferentes dimensiones que presenta cada columna.

2. Actividad Metálica.

Sustancia de prueba: nicotinamida.

COLUMNA	N	H	h	T	K	ν
PRUEBA	53081	0.05	5.65	1.65	0.84	16.32
ESPECIFICADA	3150	0.47	9.52	1.04	0.66	15.84

Tabla 6. Resultados de la predicción de actividad metálica.

La velocidad reducida en el caso de la actividad metálica tampoco se pudo ajustar exactamente, por la razón mencionada anteriormente.

Con respecto a los valores de N y H no son parecidos para ambas columnas debido a la diferencia en sus dimensiones. Para el caso de h no son tan similares como se esperaba que fueran, pero aún así se considera que la columna de prueba puede utilizarse en ciertas situaciones ya que la diferencia no es demasiado

significativa, además de que T y K' son muy similares para ambos casos lo cual quiere decir que presentan una interacción similar con la fase estacionaria. Por lo anterior se puede atribuir la diferencia en la altura de plato teórico reducido a la eficiencia de las columnas, es decir, la columna de prueba pudo tener mejor calidad que la especificada y no precisamente a la actividad metálica que presenta cada una, que según la caracterización deberían de ser iguales.

3. Hidrofobicidad.

Sustancia de prueba: enantato de estradiol.

COLUMNA	N	H	h	T	K	ν
PRUEBA	3040	0.02	7.65	1.28	13.6	27.63
ESPECIFICADA	3585	0.06	13.94	1.21	13.9	25.90

Tabla 7. Resultados de la predicción de actividad hidrofóbica.

Para este caso se observan valores de N muy similares pero no los de H y h por lo que se considera que las columnas no son equivalentes a pesar de que los valores de T y K' si lo son. Las diferencias anteriores pudieron ser objeto a los diversos grupos funcionales que presenta el enantato de estradiol motivo por el cual varió el comportamiento cromatográfico entre las dos columnas.

D. PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA EVALUACION DE COLUMNAS

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se estructuró el siguiente protocolo experimental para la caracterización de columnas cromatográficas de fase reversa (C₈ y C₁₈), que permite obtener información para conocer el deterioro sufrido por el uso de cada columna ; así como tomar una decisión en cuanto a la equivalencia de columnas.

1. DETERMINAR LA EFICIENCIA DE LA COLUMNA

Para calcular la eficiencia de la columna se debe seguir el procedimiento de evaluación propuesto por el fabricante, si cumple con las especificaciones mínimas de calidad podrá ser utilizada, si no las cumple debe regenerarse como indica cada fabricante y nuevamente determinar su eficiencia, si aún no cumple con las especificaciones mínimas de calidad, la columna no podrá ser utilizada.

2. CARACTERIZACION CINETICA

a. Preparar una solución con tolueno y nitrito de sodio a una concentración de 1.4 $\mu\text{l/ml}$ y 2.8 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

b. Inyectar por sextuplicado 20 μl de la solución anterior al cromatógrafo utilizando una fase móvil compuesta por metanol:agua 60:40 v/v y un detector a una longitud de onda de 254 nm.

c. Una vez registrados los cromatogramas calcular los parámetros siguientes:

- Número de platos teóricos (N).
- Altura de plato teórico (H):
- Altura de plato reducido (h).
- Resistencia de flujo (ξ).
- Impedimento de columna (ϵ).
- Velocidad reducida (v).
- Velocidad lineal (u).
- Factor de coleo (T).

3. CARACTERIZACION QUIMICA

I. Actividad Silanol

Con las mismas condiciones cromatográficas utilizadas para la caracterización cinética, inyectar por sextuplicado 20 μ l de una solución con anilina (1 μ l/ml), fenol (0.6 mg/ml) y nitrito de sodio (2.8 μ g/ml). Si no hay resolución entre los picos se deberán inyectar por separado las dos primeras sustancias anteriores conteniendo nitrito de sodio.

Establecer la velocidad reducida con la que se trabajará para todas las columnas de prueba.

Calcular los factores de selectividad capacidad y coleo.

II. Actividad metálica.

Preparar una solución de 2,2-bipiridina a una concentración de 0.104 mg/ml, inyectarla por sextuplicado a la columna utilizando como fase móvil una mezcla de metanol:solución 0.5% de acetato de sodio 60:40 v/v, ajustando el pH a 7.0.

Calcular el factor de coleo de los picos registrados en los cromatogramas.

III. Actividad hidrofóbica

Preparar una solución con naftaleno (0.2 mg/ml), benceno (1 μ l/ml) y nitrito de sodio (2.8×10^{-2} mg/ml), inyectarla al cromatógrafo por sextuplicado, empleando comofase móvil una mezcla de acetonitrilo:agua 65:35 v/v.

Determiar a los picos obtenidos los factores de coleo, capacidad y selectividad.

4. Predicción

Cuando se requiera cambiar una columna por otra de características diferentes, se tendrá que seleccionar aquella que presente características cinéticas y químicas similares.

Por otro lado se recomienda tomar en cuenta las siguientes consideraciones para el desarrollo de un método analítico por medio de cromatografía líquida de alta resolución.

Una fase reversa presenta actividad silanol cuando el factor de selectividad del fenol respecto a la anilina es menor de uno, por lo que columnas con esta característica ofrecerán mayor interacción con principios activos electrodonadores, pudiendo resultar picos deformes o tiempos de retención elevados.

Se considera una columna con actividad metálica cuando el factor de coleo del pico correspondiente a la 2,2-bipiridina es mayor de cuatro, por lo tanto se recomienda no utilizar este tipo de columnas con principios activos capaces de formar quelatos con metales, debido a que presentarán demasiada interacción con la fase estacionaria.

Una fase estacionaria presenta mayor hidrofobicidad cuando el factor de selectividad entre benceno y naftaleno es menor de uno,

es por ello que se recomienda no utilizar principios activos demasiado grandes estructuralmente para evitar que se obtengan tiempos de retención elevados.

CAPITULO VII. CONCLUSIONES

Fue posible establecer las condiciones de prueba para la caracterización de columnas cromatográficas de fase estacionaria unidas químicamente a cadenas C₈ y C₁₈, utilizando parámetros unificados, y desarrollando con ello un protocolo de evaluación experimental con fundamento teórico.

Se obtuvo una clasificación cinética y química para columnas de fase reversa, la cual puede emplearse para la selección de una columna en el desarrollo de un método analítico, de acuerdo a las propiedades del principio activo a analizar, ahorrando tiempo en el desarrollo del método y como consecuencia una disminución de costos.

Efectuando un análisis adecuado, se podrá cambiar una columna de cierta marca o dimensiones por otra diferente, utilizando las características cinéticas y químicas, para obtener resultados equivalentes entre las dos columnas.

CAPITULO VIII. PROPUESTAS

Se recomienda determinar el tipo de fase de las columnas con respecto al comportamiento cromatográfico entre sustancias con forma espacial de silla, planar y heliética con el fin de incrementar la información respecto a las columnas con que se trabaje.

CAPITULO IX. BIBLIOGRAFIA

1. A. Fryde, M.T. Gilbert. Applications of High Performance Liquid Chromatography. Chapman and Hall, London 1979. pp. 3-53.
2. N.A. Parris. Instrumental Liquid Chromatography. Journal of Chromatography, volume 27. ELSEVIER. Second Edition. Amsterdam 1984. pp.7-55.
3. L.R. Snyder, J.J. Kirkland. Introduction to modern Liquid Chromatography. John Wiley and Sons Inc. Second Edition. New York, 1979. pp 255-267.
4. R.E. Pauls, R.W. McCoy. Testing Procedures for Liquid Chromatographic Columns. Journal of Chromatographic Science. 24, 66-69 (1986).
5. Brisrow, P.A. Knox, J.H. Standarization of test Conditions for High Performance Liquid Chromatographic Columns. Chromatographia. 10, 6 (1977).
6. C.H. Lochmuller and D.B. Marshall. The effect of end-capping reagent on liquid chromatographic performance. Anal. Chim. Acta. 142, 63 (1982).
7. P.C. Sadek and P.W. Carr. A simple test for characterizing silanophilic interactions of reversed-phase columns based on the chromatographic behavior of cyclic tetraaza compounds. J. Chromatogr. Sci. 21:314(1983).

8. C.H. Lochmuller, A.S. Colborn, M.L. Hunnicutt, and J.M. Harris. Organization and distribution of molecules chemically bound to silica. Anal. Chem. 55:1344(1983).
9. D.B. Marshall, C.L. Cole, and A.D. Norman. The use of trimethylsilylphosphine as an end-capping reagent in RP-HPLC. J. Chromatogr. Sci. 25:262(1987).
10. H. Engelhardt and H. Muller. Chromatographic characterization of silica surfaces. J. Chromatogr. 218:395(1981).
11. G.E. Berendsen and L. de Galan. Role of the chain length of chemically bonded phases and retention mechanism in reversed phase liquid chromatography. J. Chromatogr. 196:21(1980).
12. L.C. Sander, S.A. Wise. Effect of Phase Length on Column Selectivity for the Separation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Reversed-Phase Liquid Chromatography. Anal. Chem. 59,2309(1987).
13. N.Tanaka, K. Sakagami, M. Araki Effect Of Alkyl Chain Length of the Stationary Phase on Retention and Selectivity in Reversed-Phase Liquid Chromatography. Journal of Chromatography. 10,327(1980).
14. L. C. Sander and S.A. Wise. Synthesis and characterization of polymeric C₁₈ stationary phases for liquid chromatography. Anal. Chem. 56:504(1984).
15. M. Versele and C. Dewaele. Stationary phase characterization in high performance liquid chromatography. A test for trace metal activity in octadecyl bonded silica gel. J. Chromatogr. 217:399(1981).
16. P.C. Sadek, C.J. Koester, and L.D: Bowers. The investigation of the influence of trace metals in chromatographic retention processes. J. Chromatogr. Sci. 25:489-93(1987).

17. J.W. Carr and J.M Harris. Fluorecence studies the estacionary phase chemical enviroment in reversed-phase liquid chromatography. Anal. Chem. 58:626(1986).

18. E.C. Jennings, Jr. and R.G. Brownlee. Silica surface activity before and after bonding with silanes. Anal. Chem. 58:2895(1986).

19. L.C. Sander. Evaluation of Column Performance in Liquid Chromatography. Journal of Chromatographic Science. 26.380(1988).