



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

López Murillo Ossiel Francisco

**Propuesta de un método para el análisis de nimesulida
por cromatografía de líquidos de alta resolución**

Carrera: Química Farmacéutico Biológica

Número cuenta: 09617577-4

**Diplomado en cromatografía de líquidos de alta
resolución**

Asesor: Dr. Juan Carlos Vázquez Lira

Proyecto PAPIME 203712



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A Dios

Por estar a mi lado en todo momento y en cada lugar.

A mis Padres

Su ejemplo me indicó el camino, su apoyo me ayudó a recorrerlo y su amor me inspiró para terminarlo. Gracias por todo.

A mi Familia

Con todo mi amor y cariño. No imagino donde estaría sin ustedes.

A mis Maestros y Amigos

Ustedes son la luz que me guía hasta en el momento más oscuro.

Agradecimiento especial para el Dr. Juan Carlos Vázquez Lira por la paciencia y el apoyo brindado a lo largo de este estudio y a la DGAPA a través del programa de apoyos a proyectos por la innovación y mejoramiento de la enseñanza PAPIME 203712.

GRACIAS

	RESUMEN.....	7
1	CROMATOGRAFÍA.....	8
1.1	Generalidades de la cromatografía.....	8
1.1.1	Componentes de un cromatograma.....	9
1.1.2	Parámetros cromatográficos.....	10
1.1.3	Adecuabilidad del sistema.....	12
1.2	Tipos de cromatografía.....	14
1.2.1	Cromatografía de Gases (CG).....	14
1.2.2	Cromatografía de Fluidos Supercríticos (CFS).....	15
1.2.3	Cromatografía de Líquidos (CL).....	18
2	CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).....	19
2.1	Sistema CLAR.....	19
2.1.1	Bomba.....	19
2.1.2	Inyector.....	20
2.1.3	Detectores.....	20
	2.1.3.1 Detector espectrofotométrico.....	22
	2.1.3.2 Dispositivo de diodos.....	22
	2.1.3.3 Detector de conductividad	23
	2.1.3.4 Detector electroquímico.....	23
	2.1.3.5 Detector de espectrometría de masas.....	24
	2.1.3.6 Detector evaporativo de dispersión laser.....	24
2.1.4	Fase móvil.....	25
2.1.5	Fases estacionarias.....	26
2.2	Mecanismos en CLAR.....	28
2.2.1	Cromatografía de adsorción.....	29
2.2.2	Cromatografía de intercambio iónico.....	30
2.2.3	Cromatografía de exclusión por tamaño.....	31
2.2.4	Cromatografía electrocinética micelar.....	33
2.2.5	Cromatografía de separación quiral.....	35
2.2.6	Cromatografía de reparto centrífugo.....	36
2.2.7	Cromatografía de afinidad.....	37
2.2.8	Cromatografía de interacción hidrofóbica.....	37
2.2.9	Cromatografía de reparto.....	38

2.3	Fase Ligada.....	39
2.3.1	Cromatografía de líquidos de fase normal.....	41
2.3.2	Cromatografía de líquidos de fase reversa.....	43
3	ANTI INFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINES).....	45
3.1	Generalidades.....	45
3.2	Clasificación de los AINES.....	46
3.3	Nimesulida.....	47
3.3.1	Propiedades fisicoquímicas de la nimesulida.....	47
4	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	50
5	OBJETIVOS.....	51
5.1	Objetivo general.....	51
5.2	Objetivos particulares.....	
6	JUSTIFICACIÓN.....	51
7	DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	52
8	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	53
9	CONCLUSIONES.	83
10	BIBLIOGRAFÍA.....	85

RESUMEN

En el presente trabajo se elaboró una propuesta de método analítico para la identificación y cuantificación de nimesulida y la determinación de sus productos de degradación como principio activo y forma farmacéutica utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

El estudio se realizó mediante una revisión bibliográfica de los mecanismos cromatográficos generales y las características fisicoquímicas y cromatográficas de la nimesulida, una investigación en artículos científicos en los cuales se haya llevado a cabo el análisis de nimesulida a través de un sistema CLAR en medicamentos o como materia prima, un análisis detallado de las condiciones del sistema y finalmente se planteó una propuesta de método cromatográfico para la detección y cuantificación del fármaco.

Los alcances de la propuesta analítica son únicamente las condiciones cromatográficas y simulación del método, quedando pendiente su implementación y validación.

1 CROMATOGRAFÍA

1.1 Generalidades de la cromatografía

La cromatografía es una técnica desarrollada a principios del siglo XX que permite la separación de sustancias que se encuentran en una muestra. El nombre de cromatografía (*kromos*: color, *graphos*: descripción) se debe a que las primeras separaciones se llevaron a cabo con pigmentos de plantas, los cuales se observaban como ondas coloridas. En general, la cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil (gas o líquido), y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido.¹

La cromatografía es probablemente la técnica analítica más potente y versátil disponible en la química moderna. Su importancia radica en la capacidad de determinar cuantitativamente una gran cantidad de componentes contenidos en una muestra en un solo procedimiento analítico.

La característica única de la cromatografía que la hace tan útil proviene de su capacidad de separar y medir una muestra dada. Primero, la muestra se separa en sus componentes individuales para luego, mediante el uso de un sensor con respuesta cuantitativa, obtener la cantidad de cada componente presente en la muestra.²

La cromatografía se puede definir como un proceso de separación que se obtiene mediante la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases, una estacionaria y otra móvil. Aquellos componentes que tengan una afinidad preferente a la fase estacionaria se retendrán por más tiempo en el sistema que aquellos que se distribuyan selectivamente en la fase móvil. Como consecuencia, los solutos eluyen a través del sistema en forma de concentraciones localizadas dentro de la fase móvil de acuerdo al incremento de sus coeficientes de distribución con respecto a la fase estacionaria; *ipso facto* se obtiene una separación.³

El soluto se distribuye entre la fase estacionaria y la móvil como resultado de las fuerzas que existen entre las moléculas del soluto y las de las dos fases. Entre más fuerte sea la interacción de las moléculas del soluto y la fase estacionaria, mayor será la cantidad de soluto retenido en condiciones de equilibrio. De manera inversa, una interacción más fuerte entre soluto y fase móvil resultará en una mayor cantidad de soluto retenido en dicha fase. De esta forma, el soluto solo podrá moverse a través del sistema cromatográfico mientras se encuentre en la fase móvil, por lo cual la velocidad en la que un soluto en particular pasa a través de la columna será directamente proporcional a la concentración del mismo disuelta en la fase móvil. La concentración de soluto en la fase móvil es inversamente proporcional al coeficiente de distribución del soluto en la fase estacionaria.²

1.1.1 Componentes de un cromatograma

Un cromatograma es el resultado de graficar la señal continuamente variante de un detector contra el tiempo. El eje x es representativo del tiempo de retención o del volumen de retención de un compuesto. El eje y es la representación directa de la señal del detector después de un proceso electrónico adecuado de los datos, para producir un voltaje de respuesta apropiado en graficadores, integradores o computadoras. La señal del detector se produce como respuesta a la medida de alguna de las propiedades de las moléculas de la muestra. La magnitud de la señal a cualquier tiempo dado es proporcional a la concentración o cantidad de moléculas de muestra presentes en el detector.⁴ En la figura 1 se representan las principales características que se obtienen a través de un cromatograma.

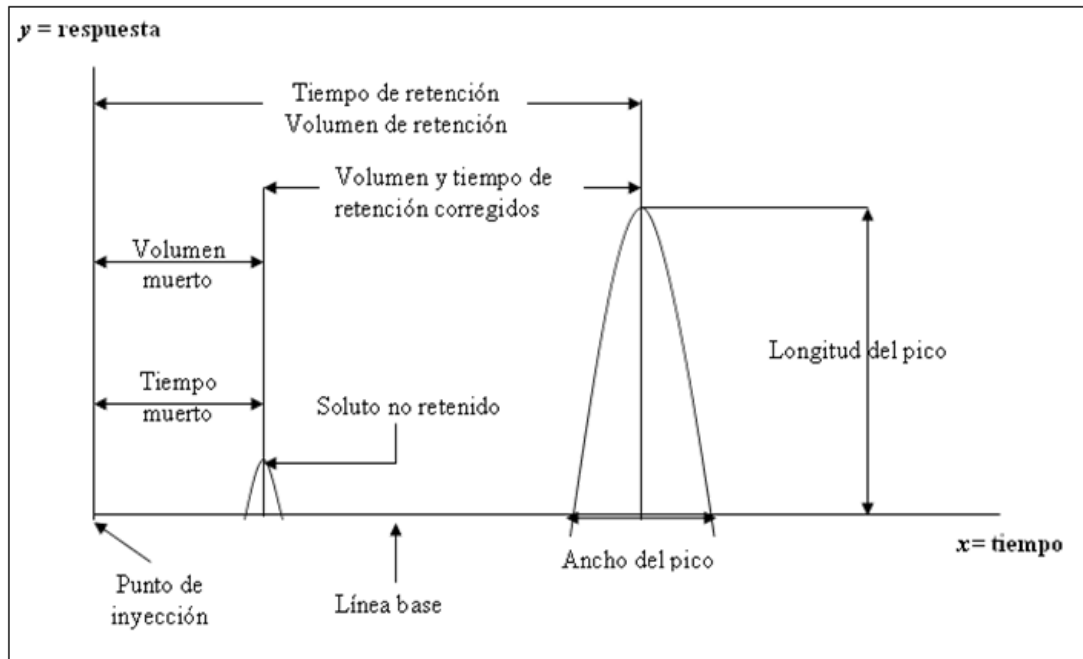


Figura 1. Cromatograma de elución de un soluto.

En el cromatograma existen tres locaciones importantes. La primera es el punto de inyección, el cual se localiza al comienzo del cromatograma y marca el principio del desarrollo cromatográfico. En segunda se encuentra un punto muerto que identifica la posición de un soluto no retenido, y por último, existe el máximo de soluto que identifica la posición del pico. La parte plana en que no se encuentra soluto eluyendo se conoce como línea base.²

Un cromatograma es una herramienta útil tanto para el análisis cualitativo como cuantitativo de uno o varios compuestos. La posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para identificar los componentes de la muestra y las áreas bajo los picos proporcionan una medida cuantitativa de la cantidad de cada componente.⁴

1.1.2 Parámetros cromatográficos

Un cromatograma proporciona solo un elemento de información cualitativa acerca de cada una de las especies de la muestra, a saber, su tiempo de retención o su posición en la fase estacionaria tras un cierto periodo de elución. Sin embargo, a partir de los cromatogramas obtenidos se pueden conseguir

datos adicionales del análisis. La cromatografía cuantitativa se basa en la comparación de la altura o del área del pico del analito con la de uno o más patrones. Una vez obtenido el tiempo de retención y el área o la altura de un pico se pueden calcular diversos parámetros cuantitativos de suma importancia en un análisis cromatográfico.

La tabla 1 muestra los principales parámetros obtenidos a partir del tiempo de retención y el área de un compuesto en un análisis cromatográfico.

Tabla 1. Parámetros cromatográficos de análisis.

Parámetro	Símbolo (unidades)	Descripción	Cálculo
Ancho del pico	W_h (min)	Anchura del pico a la mitad de la altura (2.353σ).	A través del pico cromatográfico de forma manual o automática
	W_b (min)	Anchura del pico en la base (4σ).	
Área	A (Unidades de área)	Área bajo la curva del pico cromatográfico. Se utiliza para fines cuantitativos.	Se obtiene por la integración manual o automática del pico.
Tiempo muerto	t_0 (min)	Es el tiempo de retención de una sustancia inmisible en la fase estacionaria. Tiempo que marca la señal de la fase móvil o de un soluto no retenido cuando el detector registra su máximo.	$t_0 = \frac{V_0}{F}$
Tiempo de retención	t_r (min)	Tiempo transcurrido desde la introducción de la muestra hasta que el detector registra el máximo del pico.	$t_r = \frac{V_r}{F}$
Flujo	F (mL/min)	Velocidad a la que se mueve la fase móvil del sistema.	$F = \frac{V_r}{t_r}$
Volumen de retención	V_r (mL)	Volumen de elución desde la introducción de la muestra hasta que el detector registra el máximo del pico.	$V_r = t_r F$
Volumen muerto	V_0 (mL)	Volumen de elución que marca la señal de la fase móvil o de un soluto no retenido.	$V_0 = t_0 F$
Coeficiente de reparto	K	Propiedad termodinámica del sistema soluto/fase estacionaria /fase móvil independiente del proceso cromatográfico. Concentración de soluto en la fase estacionaria frente a la concentración de soluto en fase móvil a temperatura constante.	$K = \frac{C_s}{C_m}$

Tabla 1. Parámetros cromatográficos de análisis (continuación).

Parámetro	Símbolo (unidades)	Descripción	Cálculo
Factor de capacidad	k' (adimensional)	Depende de las propiedades termodinámicas del sistema (K) y además es función de las características de la columna en particular. Probabilidad de encontrar una molécula determinada de soluto en la fase estacionaria o en la fase móvil. Relaciona la cantidad de soluto entre la fase estacionaria y móvil.	$k' = \frac{(t_r - t_0)}{t_0}$
Selectividad	α (adimensional)	Expresa la diferencia en los equilibrios de distribución entre dos solutos adyacentes.	$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'}$
Número de platos teóricos	N (adimensional)	Medida de la contribución cinética y de la eficiencia del empaque de la columna, así como del ensanchamiento de los picos.	$N = 16 \left[\frac{(t_r)}{W_b} \right]^2$
Resolución	R (adimensional)	Es el grado de separación entre picos adyacentes. Debe poseer un valor de al menos 1.5.	$R = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{W_{b2} - W_{b1}}$
Altura	H (cm)	Altura del pico desde la base hasta el máximo.	Se obtiene manualmente o por software.
Factor de asimetría	As (adimensional)	Se obtiene al 10% de la altura del pico, trazando una recta horizontal, dividida entre el máximo de la señal. Puede existir coleo o cabeceo.	$As = \frac{a}{b}$
Factor de Coleo	T	La relación de la distancia del ancho de pico, $W_{0.05}$, dividido entre dos veces la distancia, f, del máximo del pico hacia el lado izquierdo del pico.	$T = \frac{W_{0.05}}{2f}$

1.1.3 Adecuabilidad del sistema

El buen funcionamiento de un sistema cromatográfico (líquidos o gases) se verá reflejado en la calidad del análisis. Por esta razón es necesario considerar todos los componentes del sistema (columna, velocidad de flujo, flujo de la fase móvil, temperatura de operación, entre otros) para obtener resultados óptimos.¹

Es conveniente preparar una recta de calibración a concentraciones adecuadas, con las condiciones indicadas para el fármaco en análisis, así como inyectar blancos para detectar alguna interferencia.

Las especificaciones de la columna y los parámetros del instrumento en la monografía correspondiente no excluyen otras condiciones de operación adecuadas. Las variaciones normales en el equipo y en los materiales pueden requerir ajustes de las condiciones experimentales para obtener una operación aceptable.

Para asegurar la efectividad del sistema, es necesario realizar una prueba antes de utilizarse. La esencia de este tipo de pruebas es el concepto de que el equipo en general, las partes electrónicas, las operaciones analíticas y la muestra, constituyen un sistema analítico completo el cual puede someterse a una prueba general del funcionamiento del sistema. Se pueden obtener datos específicos de inyecciones repetidas (no menos de seis inyecciones) de una preparación ya sea de la muestra, el estándar de referencia o el estándar interno.

Estos datos se pueden comparar con valores máximos y mínimos especificados tales como eficiencia, precisión interna, resolución, tiempo de retención, naturaleza de la recta de calibración, respuesta y recobros (entre otros parámetros) de acuerdo a lo indicado en las monografías individuales.¹

Los parámetros más útiles para la verificación del sistema son la reproducibilidad de inyecciones repetidas de la solución analítica mezclada con la solución de estándar interno (CV), el factor de coeio para limitar el máximo permisible con relación a la asimetría del pico (T), la eficiencia de la columna calculada por el número de platos teóricos (N) y la medida de la eficiencia de una separación entre dos componentes en una mezcla llamada resolución (R).

1.2 Tipos de cromatografía

1.2.1 Cromatografía de gases (CG)

La cromatografía de gases es una técnica analítica que puede utilizarse para separar compuestos orgánicos en base a sus volatilidades. También provee información cualitativa y cuantitativa de los componentes presentes en una mezcla. Los componentes se distribuyen entre la fase móvil gaseosa y la fase estacionaria de la columna por sus diferenciales de partición, lo cual permite su separación en tiempo y espacio.⁵

En la cromatografía de gases (CG), la fase móvil es un gas y la estacionaria es un sólido (Cromatografía Gas-Sólido) o un líquido (Cromatografía Gas-Líquido). En la primera, la separación se lleva a cabo por la adsorción entre el gas que transporta al soluto y el soporte, que puede ser alúmina, gel de sílice, carbón, etc., y en la segunda, la partición se lleva a cabo entre una fase estacionaria líquida que cubre a un sólido inerte, tal como sílice, vidrio, etc. y el gas que transporta al soluto. Cuando se introduce una sustancia en la corriente de gas, ésta se volatiliza por la elevada temperatura y de esta manera se transporta con el gas acarreador a lo largo de la columna, donde se distribuye entre la fase sólida y la líquida. Este proceso de partición o reparto entre ambas fases está definido por el *factor de capacidad* (k'), determinado ya sea por la cantidad o por el tiempo de residencia de la sustancia en cuestión entre las respectivas fases. Entre mayor tiempo pase el soluto en la fase estacionaria, mayor será el valor de k' y, por lo tanto, mayor el tiempo de retención, por lo que el valor de k' dependerá del soluto, la cantidad y composición de la fase líquida, la temperatura y la velocidad de flujo del gas.¹

La CG es uno de los mecanismos de separación física más eficientes que se conocen; cada componente de una muestra proporciona tres unidades de información: posición, altura y anchura de los picos en el cromatograma. La posición, un parámetro expresado cuantitativamente como dato de retención, suministra la información cualitativa y los otros proporcionan la información cuantitativa.

La forma más usual de hacer cromatografía de gases es utilizando un líquido como fase estacionaria; recibe entonces el nombre de cromatografía gas-líquido (CGL). También se utilizan adsorbentes, dando lugar a la cromatografía gas-sólido (CGS), pero en mucho menor proporción.⁵

Un cromatógrafo de gases consta básicamente de:

- Fase móvil
- Puerto de inyección
- Horno de la columna
- Columnas
- Fase estacionaria
- Detector
- Sistema de registro de datos

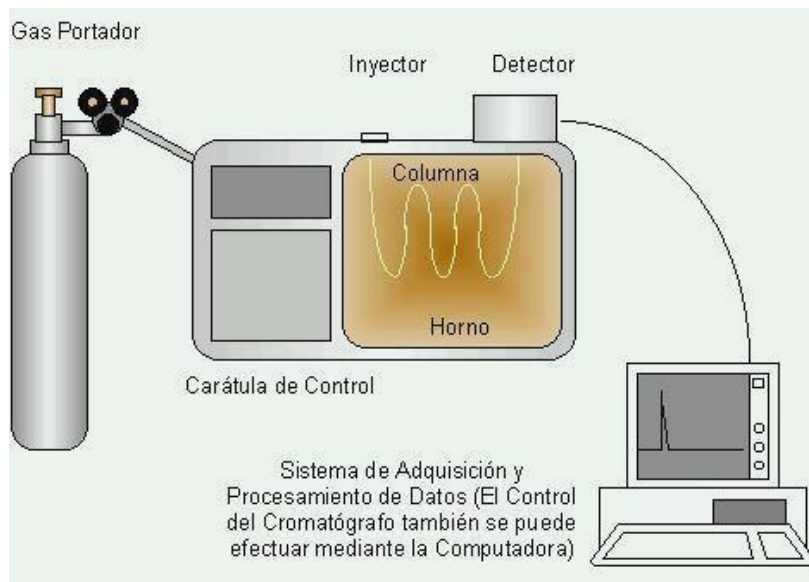


Figura 2. Componentes generales de un cromatógrafo de gases.⁶

1.2.2 Cromatografía de fluidos supercríticos (CFS)

Un fluido supercrítico se forma siempre que una sustancia se calienta por encima de su temperatura crítica. La temperatura crítica de una sustancia es aquella por encima de la cual no puede existir en fase líquida independientemente de la presión. La presión de vapor de una sustancia a su temperatura crítica es su presión crítica. Una sustancia a temperaturas por

encima de su temperatura y presión críticas (*punto crítico*) se denomina *fluido supercrítico*.⁴ En la Figura 3 se ejemplifica un diagrama de fases para un compuesto cualquiera en sus puntos críticos

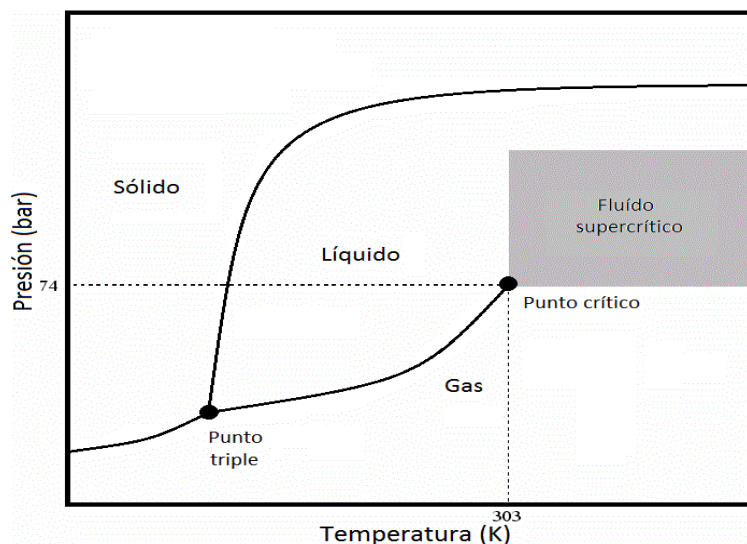


Figura 3. Diagrama de fases de una sustancia pura en el punto crítico.⁷

Los fluidos supercríticos tienen la propiedad de difundirse a través de los sólidos como un gas, y de disolver los materiales como un líquido. Además, pueden cambiar rápidamente su densidad con pequeñas variaciones en la temperatura o presión. Estas propiedades los hacen convenientes como sustitutos de los disolventes orgánicos en los procesos de extracción. El CO_2 es el fluido supercrítico más utilizado debido a que es no tóxico, no inflamable, no corrosivo, incoloro, no es costoso, se elimina fácilmente, no deja residuos, sus condiciones críticas son relativamente fáciles de alcanzar y se consigue con diferentes grados de pureza. El CO_2 se puede trabajar a baja temperatura y por lo tanto es posible separar compuestos termolábiles, se puede obtener a partir de procesos de fermentación alcohólica y ayuda a prevenir la degradación térmica de ciertos componentes químicos del alimento cuando se extraen.⁸

La cromatografía de fluidos supercríticos (CFS), en la cual la fase móvil es un fluido supercrítico, es un híbrido entre la cromatografía de gases y la cromatografía de líquidos donde se combinan algunas de las mejores

características de cada una. La CFS es de gran importancia porque permite la separación y determinación de un grupo de compuestos que no se manejan convenientemente por cromatografía de líquidos ni por CG. Las características generales de dichos compuestos son:

- 1) No volátiles o térmicamente inestables para los que la CG es inaplicable.
- 2) No contienen grupos funcionales que permitan su detección mediante técnicas espectrofotométricas o electroquímicas empleadas en cromatografía de líquidos.

Los instrumentos empleados para la CFS se parecen en muchos aspectos a los empleados en la cromatografía de líquidos de alta resolución, pero tienen dos diferencias importantes al sistema antes descrito. Primero, es necesario un horno de columna con termostato, similar al que se emplea en la CG, para proporcionar un control preciso de la temperatura de la fase móvil; segundo, se utiliza un restrictor o un dispositivo de contrapresión para mantener la presión de la columna en el nivel deseado y para convertir el eluyente de un fluido supercrítico en un gas y arrastrarlo al detector.⁴

Un cromatógrafo de fluidos supercríticos consta de:

- Tanque para fase móvil (1)
- Membrana (2)
- Manómetro y compresor (3)
- Manómetros de alta precisión (4 y 5)
- Válvulas de alta presión (6 a 8)
- Válvulas reguladoras de presión (9 y 10)
- Horno y columnas (11)
- Detector (12)
- Sistema de registro de datos (13)

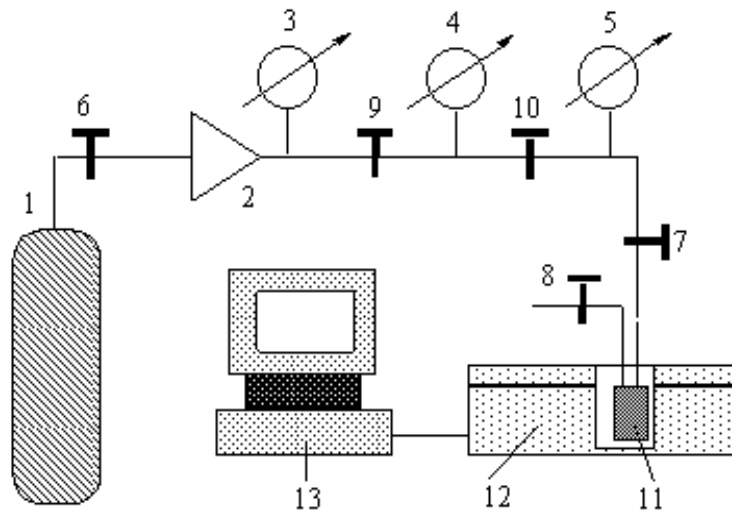


Figura 4. Componentes de un cromatógrafo de fluidos supercríticos.⁹

1.2.3 Cromatografía de líquidos (CL)

La cromatografía de líquidos (CL) es un mecanismo de separación basado en la diferencia de distribución de las especies químicas entre dos fases no miscibles, en la cual, la fase móvil es un líquido que se filtra a través de una fase estacionaria contenida en una columna.¹⁰

La CL es una técnica de separación analítica ampliamente utilizada. Las razones de su popularidad son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para automatizarla, su capacidad para separar sustancias no volátiles o termolábiles, pero sobre todo, su amplia aplicabilidad a sustancias que son importantes en la industria, muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general.⁴

La CL se basa principalmente en los mecanismos de adsorción, distribución, interacción hidrofóbica y formación de complejos entre otros.

2 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

2.1 Sistema CLAR

Un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR), también conocido como cromatógrafo de líquidos de alta presión, se compone básicamente de:

- Fase móvil
- Bomba de alta presión
- Inyector y loop
- Columnas
- Detector
- Sistema de registro de datos

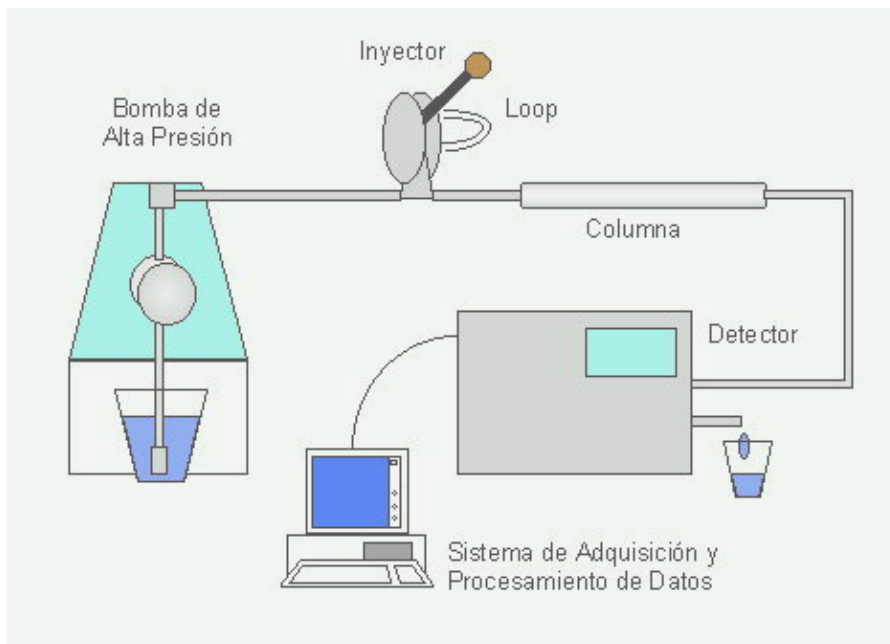


Figura 5. Componentes generales de un sistema CLAR.¹¹

2.1.1 Bomba

En los sistemas de bombeo para CLAR es necesario inyectar la fase móvil a una velocidad de flujo constante con el fin de mantener las fluctuaciones de presión al mínimo. Las tuberías y conexiones deben ser capaces de soportar la presión creada por el sistema de bombeo. Las bombas del cromatógrafo de

líquidos también pueden adaptarse a un sistema que permita purgar las burbujas de aire que puedan encontrarse en el sistema.

Los sistemas controlados por microprocesadores son capaces de inyectar la fase móvil de una manera precisa, ya sea en una proporción constante (flujo isocrático) o variando la composición (flujo por gradiente), de acuerdo a un programa predeterminado. En el caso de una elución por gradiente, el sistema de bombeo que inyecta los disolventes de los distintos reservorios puede mezclarlos tanto en el lado de baja como en el de alta presión de la bomba.¹⁰

2.1.2 Inyector

La solución muestra se inyecta al flujo de la fase móvil en la cabeza de la columna o cerca de ella mediante un sistema de inyección que opera a alta presión. También se utilizan un loop adaptado y diversos sistemas de volumen variable, los cuales operan por un muestreador manual o automático. Un llenado manual de los loops puede causar una baja precisión del volumen de inyección.¹⁰

2.1.3 Detectores

Uno de los primeros pasos en la CL moderna fue la automatización proporcionada por la adición de un detector en línea. Subsecuentemente, el desarrollo de materiales con un tamaño de partícula muy pequeño como fases estacionarias de alta resolución brindó sistemas de separación más eficientes, lo cual recibiría el nombre de cromatografía de líquidos de alta presión o de alta resolución.

Se ha empleado una gran variedad de instrumentos en el desarrollo de la cromatografía de líquidos moderna. Originalmente, los instrumentos estándar se modificaban para monitorear los eluyentes de una columna cromatográfica. En la actualidad, la investigación biomédica necesita la más alta sensibilidad y selectividad posible por parte de los detectores, lo cual ha derivado en la introducción de instrumentos dedicados a un alto desempeño cuantitativo en la

cromatografía. El mecanismo básico es el mismo que el de los instrumentos originales, pero se han realizado mejoras técnicas en la mecánica y electrónica de los mismos.¹²

Es bastante conveniente utilizar detectores de monitoreo continuo ubicados en la salida de la columna. Se han utilizado diversos diseños de detectores y éstos pueden clasificarse de manera general en los que monitorean una propiedad específica del soluto o en los que detectan cambios en una propiedad del conjunto que eluye de la columna.¹³ La tabla 2, muestra las especificaciones de algunos de los detectores más modernos empleados en CLAR.

Tabla 2. Especificidad de los detectores para CLAR

Detector	Límite de detección	Universal o selectivo	Observaciones
Ultravioleta-visible	100 pg - 1 ng	selectivo	Detector más común, la selección de la longitud de onda mejora la exactitud de un análisis cuantitativo, el escaneo de longitud de onda o el arreglo de fotodiodos permite un análisis cualitativo. Se puede adaptar una lámpara W o compleja para la región de detección visible.
Índice de refracción	100 ng - 1 µg	universal	Útil para cualquier análisis, emplea control de temperatura para una detección altamente sensible, se emplea regularmente en CL o en CL de exclusión por tamaños; la elución debe ser isocrática.
Fluorescencia	1 pg - 10 pg	selectivo	Alta sensibilidad para compuestos fluorescentes.
Conductividad Térmica	500 pg - 1 ng	universal	Es un instrumento sencillo y posee un amplio intervalo dinámico. Es no destructivo y se puede emplear en sustancias orgánicas e inorgánicas. La elución debe ser isocrática
Espectrometría de masas	1 pg - 10 pg	universal	Útil para cualquier análisis; es un detector cuantitativo y cualitativo.
IR con transformada de Fourier	1 µg - 10 µg	selectivo	Se utiliza en sustancias con bandas de absorción débiles o con muestras de tamaño muy pequeño. Presenta diversas ventajas contra los detectores IR dispersivos.

Tabla 2. Especificidad de los detectores para CLAR (continuación).

Detector	Límite de detección	Universal o selectivo	Observaciones
Electroquímico amperométrico	10 pg - 1 ng	selectivo	El compuesto a determinar debe ser electroactivo. La elución debe ser isocrática
Evaporativo de dispersión láser	10 ng - 50 ng	universal	Se considera detector universal para polímeros aunque pueden ocurrir diferencias en sensibilidad debido a los distintos tipos de disolventes y polímeros.
Quimio-luminiscencia	0.5 pg - 10 pg	selectivo	Son instrumentos sencillos y altamente selectivos debido a un número muy limitado de compuestos luminiscentes.
Arreglo de Diodos	10 ng - 50 ng	universal	Utilizan geometría óptica reversa en la cual toda la luz de la fuente se enfoca en la muestra.

2.1.3.1 Detector espectrofotométrico

Las moléculas con un cromóforo absorben la energía de los rayos de una fuente luminosa. Un espectrofotómetro de absorción utiliza este mecanismo donde la pérdida de energía depende de la concentración, la constante de absorción de las moléculas del analito y la longitud de onda del rayo de luz. El detector más popular, el de luz ultravioleta (UV), utiliza una lámpara de Deuterio como fuente de luz.¹²

2.1.3.2 Dispositivo de diodos

La tecnología de arreglo de fotodiodos tiene como principal característica el escaneo continuo del espectro de absorbancia del eluyente cromatográfico, por lo cual, elimina la necesidad de detener el flujo de la fase móvil. Los espectrofotómetros con arreglo de fotodiodos utilizan la geometría óptica reversa, en la cual toda la luz proveniente de la fuente se enfoca en la muestra, en lugar de dispersar la luz en un monocromador y transmitirla en longitudes de onda únicas a través de la celda. El espectro de luz completo emergido de la

celda de flujo se dispersa en longitudes de onda únicas mediante rejillas de difracción holográfica, las cuales se enfocan simultáneamente en detectores con arreglos de diodos lineales. El arreglo de fotodiodos es una fila de detectores, generalmente más de 1056, montada encima de un chip de silicón de 1 cm en el cual cada diodo recibe una longitud de onda diferente con resolución espectral 1.2 nm.¹⁴

2.1.3.3 Detector de conductividad

La detección por conductividad, la cual involucra la medida de cambios en la conductividad de una solución acuosa entre dos electrodos, se emplea en la cromatografía iónica para la detección de analitos polarizados. El sensor consiste en dos electrodos (los cuales pueden tener diversas formas geométricas) situados en el flujo del eluyente y una resistencia (o impedimento) la cual se mide por medio de un circuito electrónico adecuado. El detector de conductividad es sensible a una propiedad a granel y por lo tanto, responde a cualquier electrolito presente en la fase móvil (por ejemplo, amortiguadores) así como para los solutos. Por lo tanto, la fase móvil debe prepararse de manera en que no presente conductividad.¹⁴

2.1.3.4 Detector electroquímico

Este tipo de detectores se basan en la oxidación o reducción electroquímica del analito y se emplean en el análisis de compuestos selectos como los fenoles. Es físicamente simple, pero de gran importancia para las catecolaminas. De cualquier forma, la adsorción de moléculas reactivadas en la superficie de los electrodos puede reducir la conductividad. Para solucionar este problema se utiliza un voltaje pulsante, el cual limpia la superficie del electrodo entre cada determinación. La detección amperométrica pulsante también es sensible para carbohidratos.¹²

2.1.3.5 Detector de espectrometría de masas

El espectrómetro de masas es un instrumento altamente sensible y selectivo ya que permite identificar especies moleculares y atómicas a partir de los datos su espectro. Sin embargo, una de sus principales dificultades consiste en establecer cuáles son las distintas especies que pueden estar presentes en una mezcla de compuestos que se introduzca a la fuente, por lo que con frecuencia no se identifican los componentes que se eluyen. Por las ventajas y limitaciones complementarias de la espectrometría de masas en la cromatografía, probablemente en la actualidad una de las herramientas de análisis más poderosas es la aplicación del espectrómetro de masas como detector para identificar los componentes de mezclas desconocidas separadas por cromatografía.

La espectrometría de masas se emplea como detector de los productos que eluyen de las columnas de cromatografía de gases, de líquidos y de fluidos supercríticos. Desafortunadamente, el eluyente no se puede alimentar de manera directa al espectrómetro de masas sin una interfase entre la columna cromatográfica y dicho sistema. El objetivo de las interfases es eliminar en todo lo posible la matriz (fase móvil) y conservar al máximo los analitos. Dicha tarea no es sencilla y en general solo una parte por millón de los analitos que se eluyen en las columnas cromatográficas pasan al espectrómetro de masas.

2.1.3.6 Detector evaporativo de dispersión laser

Los detectores dispersores de luz reaccionan a la luz esparcida por un polímero o por algún analito de alto peso molecular presentes en el eluyente de la columna al pasar a través de la celda de un sensor adecuado mientras un rayo de luz de alta intensidad lo ilumina. Generalmente, la fuente de luz es un láser que genera luz a una longitud de onda apropiada para su detección. Existen dos formas básicas de detectores: el *detector de dispersión láser de ángulo bajo* y el *detector de dispersión láser de ángulos múltiples*. Ambos aparatos son de uso común, pero el de ángulos múltiples tiene una mayor versatilidad debido a que puede determinar las dimensiones moleculares así

como el peso molecular. Debido a que la luz dispersa se mide en un ángulo muy bajo con respecto a la incidencia de luz (prácticamente 0°), la señal del detector de ángulo bajo puede verse afectada por la dispersión de partículas contaminantes, las cuales generalmente se encuentran presentes en el eluyente. Lo anterior puede dar como resultado un ruido considerable, lo cual puede disminuir la selectividad del detector.¹⁴

2.1.4 Fase móvil

Para la cromatografía de fase normal se emplean disolventes de menor polaridad. La presencia de agua en los disolventes debe controlarse estrictamente con el fin de obtener resultados reproducibles. En los disolventes para CLAR de fase reversa se utilizan fases móviles de base acuosa, con o sin modificadores orgánicos.

Cada uno de los componentes de la fase móvil deben ser filtrados para remover partículas de un tamaño mayor a $0.45 \mu\text{m}$. Las fases móviles de multicomponentes deben prepararse midiendo exactamente los volúmenes requeridos (a menos que se especifiquen las masas) de los compuestos individuales. De manera alterna, los componentes de la fase móvil pueden inyectarse por medio de bombas individuales controladas por válvulas de proporción en las cuales el mezclado se realiza de acuerdo a la proporción deseada. Generalmente, los disolventes en CL se degasifican haciendo fluir helio, sonicando o empleando módulos en línea de membrana/vacío los cuales evitan la formación de burbujas dentro de la celda de detección.

Por lo general, los disolventes en la CL están libres de estabilizadores y son transparentes a la longitud de onda en la que se programa el sistema, si es que se trata de un detector ultravioleta. Los disolventes y componentes empleados para CL deben ser de una calidad apropiada (grado HPLC, por sus siglas en inglés). Los ajustes de pH, si es que son necesarios, se realizan empleando únicamente el componente acuoso de la fase móvil y no en la mezcla de disolventes. Si se emplean soluciones amortiguadoras, el acondicionamiento

del sistema se lleva a cabo con una mezcla de la fase acuosa y el modificador orgánico dentro de la fase móvil (5 % v/v) para prevenir la cristalización de las sales después del desarrollo del cromatograma. Las fases móviles pueden contener otros componentes, por ejemplo, la contraparte para una cromatografía de pares iónicos o en el caso de selectividad quiral empleando una fase estacionaria quiral.¹⁰

2.1.5 Fases estacionarias

En la CL se emplea una gran cantidad de fases estacionarias (FE), las cuales incluyen:

- **Sílice, alúmina o grafito poroso**, empleados en la cromatografía de fase normal, en la cual la separación se basa en las diferencias de adsorción y/o distribución de masas.
- **Resinas o polímeros** con grupos ácidos o básicos, empleados en la cromatografía de intercambio iónico, en donde la separación se basa en la competencia de los iones para asociarse con aquellos que se encuentran en la fase móvil.
- **Sílice poroso o polímeros**, empleados en la cromatografía de exclusión por tamaño, donde la separación se basa en las diferencias de los volúmenes de las moléculas, correspondientes a su exclusión estérica.
- Una variedad de **soportes químicamente modificados** preparados a base de polímeros, sílice, grafito poroso y óxidos de zirconio y titanio empleados en la cromatografía de líquidos de fase reversa, donde la separación se basa en la disociación de la especie molecular entre la fase móvil y la fase estacionaria.
- **Fases estacionarias especiales** químicamente modificadas, (por ejemplo, celulosa o derivados de la amilosa, proteínas o péptidos, ciclodextrinas, etc.), empleadas en la separación de enantiómeros (cromatografía quiral).

La mayoría de las separaciones se basan en el mecanismo de disociación de los compuestos utilizando sílice químicamente modificada como fase estacionaria y disolventes polares como fase móvil. La superficie del soporte, por ejemplo los grupos silanol de la sílice, reacciona con varios reactivos sileno para producir un enlace covalente, el cual cubre un diverso número de sitios activos en la superficie del soporte. La naturaleza de la fase ligada es un parámetro importante para determinar las propiedades de separación del sistema cromatográfico.

Las fases ligadas más comúnmente utilizadas son las siguientes:

- Octil $\text{O-Si-(CH}_2\text{)}_7\text{-CH}_3$
- Octadecil $\text{O-Si-(CH}_2\text{)}_{17}\text{-CH}_3$
- Fenil $\text{O-Si-(CH}_2\text{)N-C}_6\text{H}_5$
- Cianopropil $\text{O-Si-(CH}_2\text{)}_3\text{-CN}$
- Aminopropil $\text{O-Si-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH}_2$
- Diol $\text{O-Si-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-CH(OH)-CH}_2\text{-OH}$

A menos que se especifique por el fabricante, las columnas de fase reversa a base de sílice se consideran estables en un rango de pH de 2.0 a 7.5. Las columnas a base de grafito poroso y de compuestos poliméricos, tal como el estireno-divinilbenzeno son estables a un mayor rango de pH.

Para separaciones analíticas, el tamaño de partícula más común en la mayoría de fases estacionarias varía entre 3 μm y 10 μm . Las partículas pueden ser esféricas o irregulares, de porosidad variable y área superficial específica. Dichos parámetros contribuyen al comportamiento cromatográfico de cada fase estacionaria en particular. En el caso de la fase reversa, la naturaleza de la fase estacionaria, la extensión de la cadena y el hecho de que la cadena tenga una terminación con *end capping* (por ejemplo, residuos de grupos silanol) son factores determinantes adicionales. El coqueo en los picos de un cromatograma, particularmente en el análisis de sustancias básicas, puede ocurrir debido a la presencia de grupos silanol en la columna.

A menos que se indique en la monografía, las columnas de acero inoxidable de longitud y diámetro interno (DI) variables son las indicadas para la cromatografía analítica. Columnas con menos de 2 mm de diámetro interno se conocen como columnas capilares.

La temperatura de la fase móvil y de la columna debe mantenerse constante durante el análisis. A pesar de que la mayoría de las separaciones cromatográficas se realizan a temperatura ambiente, es recomendable calentar ligeramente la columna para dar una mayor eficiencia al sistema, siempre y cuando no se eleve la temperatura a más de 50 °C, ya que puede afectar el potencial de degradación de la fase estacionaria o producir cambios en la composición de la fase móvil.¹⁰

2.2 Mecanismos en CLAR

La amplia definición de cromatografía de líquidos abarca diversas técnicas y muchas de ellas se clasifican con más de un nombre. Los diversos nombres se enfocan en los distintos aspectos de los mecanismos de CL. Los distintos tipos de CL también se clasifican según el tipo general de interacción que se produce entre la fase estacionaria y los solutos en el eluyente. Por lo tanto, la elección de un mecanismo para el análisis cromatográfico de un soluto dependerá principalmente de la interacción que se presente entre el soluto en la fase móvil y los distintos tipos de fases estacionarias empleadas en CLAR.

En la figura 6 se presenta un esquema general para la selección de técnicas de CLAR tomando como base la polaridad y el peso molecular del un soluto. Dicho esquema pone de manifiesto que los distintos mecanismos que utiliza la CL tienden a ser complementarios en cuanto a sus campos de aplicación se refiere.⁴

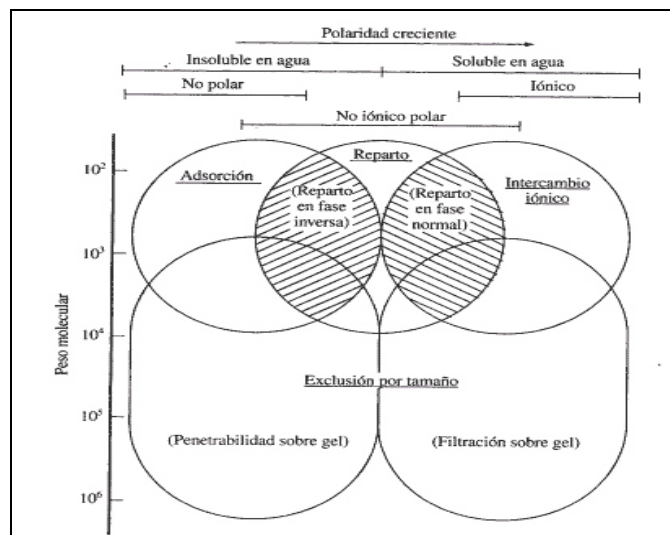


Figura 6. Selección de técnicas de CLAR en base a características fisicoquímicas del soluto.¹⁵

2.2.1 Cromatografía de adsorción

La adsorción, o cromatografía líquido-sólido, es la más antigua de todas las técnicas de separación cromatográficas y fue el pilar de la cromatografía hasta el desarrollo de las sílices derivadas. Los adsorbentes más comúnmente utilizados son el gel de sílice y la alúmina, siendo la sílice el más popular hasta el momento. La cromatografía con fases estacionarias polares y fases móviles no polares se conoce como cromatografía de *fase normal*, la cual recibe su nombre debido a la técnica originalmente descrita por Tswett.¹⁶

En general, la cromatografía líquido-sólido es más adecuada para muestras que son solubles en disolventes no polares, y que por lo tanto, tienen una solubilidad limitada en los disolventes acuosos utilizados en los procedimientos de reparto en fase reversa. Como en cromatografía de reparto, los compuestos que tienen distintos grupos funcionales por lo general se pueden separar. Una característica particular de la cromatografía de adsorción que no comparte con otros mecanismos es su capacidad para diferenciar compuestos isoméricos.

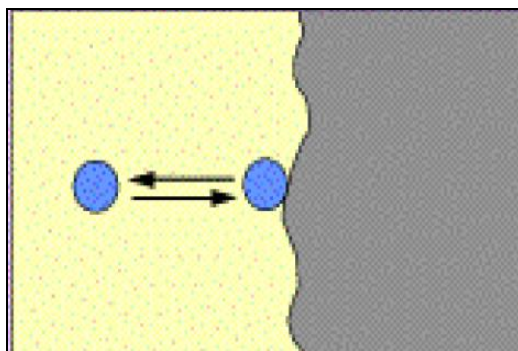


Figura 7. Cromatografía de Adsorción: la FE es un sólido. La separación se produce por etapas sucesivas adsorción/desorción.¹⁷

2.2.2 Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía iónica o de intercambio iónico está relacionada con los métodos modernos y eficaces para la separación y determinación de iones basados en el uso de resinas de intercambio iónico. La cromatografía iónica empezó a desarrollarse a mediados de los años setenta, cuando se demostró que mediante las columnas de CLAR empacadas con resinas de intercambio catiónico o aniónico, se podían resolver fácilmente mezclas de cationes o aniones. En ese entonces, la detección se realizaba por lo general con medidas de conductividad.

Los procesos de intercambio iónico se basan en los equilibrios de intercambio entre los iones de una solución y los iones del mismo signo que están en la superficie de un sólido de elevada masa molecular y esencialmente insoluble. Durante varias décadas se han utilizado intercambiadores iónicos naturales como las arcillas y las zeolitas. A mediados de los años treinta se fabricaron por primera vez resinas de intercambio iónico sintéticas para eliminar la dureza del agua, la deionización del agua y la purificación de las soluciones. Los puntos activos más comunes en las resinas de intercambio catiónico son los grupos de ácido sulfónico $-SO_3^-H^+$ (ácido fuerte) y los grupos de ácido carboxílico COO^-H^+ (ácido débil). Los intercambiadores aniónicos contienen grupos de amina cuaternaria $-N(CH_3)_3^+OH^-$ o grupos de amina ternaria primaria $-NH_3^+OH^-$, los primeros son de base fuerte y los últimos de base débil. Cuando un intercambiador iónico de ácido sulfónico entra en contacto con un disolvente

acuoso que contiene cationes M^+ , se establece un equilibrio de intercambio entre este catión y el H^+ de los grupos sulfónicos de la resina. De forma semejante, se comporta un intercambiador de ácido débil. En el caso de los intercambiadores aniónicos, el equilibrio se establece entre el anión del disolvente acuoso y los OH^- de los grupos amina de la resina polimérica.¹⁸

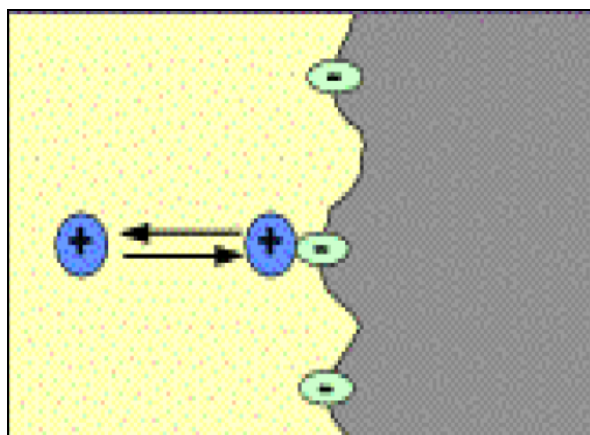


Figura 8. Cromatografía de Intercambio Iónico: la FE tiene una superficie cargada iónicamente, con cargas iónicas opuestas a las de los eluyentes.¹⁷

2.2.3 Cromatografía de exclusión por tamaño

La cromatografía de exclusión por tamaño, que también se ha denominado cromatografía en geles permeables o de filtración en gel, es una técnica muy valiosa que se aplica particularmente a especies de alto peso molecular. Los empaques para la cromatografía de exclusión por tamaños están constituidos por pequeñas partículas (de aproximadamente $10\ \mu\text{m}$) poliméricas o de sílice que contienen una red uniforme de poros en los que las moléculas del soluto y del disolvente se pueden difundir. En los poros, las moléculas quedan atrapadas eficazmente y se eliminan del flujo de la fase móvil. El tiempo de residencia medio en los poros depende del tamaño efectivo de las moléculas de los analitos. Las moléculas que son más grandes que el tamaño medio de poros del empaque se excluyen y de esta forma, esencialmente, no se retienen y son las primeras en eluir. Las moléculas que tienen diámetros significativamente menores que los poros, pueden penetrar a través del laberinto de poros y así quedan atrapadas durante más tiempo; éstas son las

últimas en eluir. Entre estos dos extremos, están las moléculas de tamaño intermedio cuya penetración media en los poros depende de su diámetro. Dentro de este grupo tiene lugar la separación, la cual está directamente relacionada con el tamaño molecular y en cierto modo con la forma molecular.

Las separaciones por exclusión difieren de los otros procedimientos que se han considerado en que no implican una interacción química o física entre los analitos y la fase estacionaria. De hecho, se procura evitar este tipo de interacciones dado que originan una mala eficiencia de la columna.

El *límite de exclusión* lo determina el peso molecular de una especie por encima del cual no existe retención. Todas las especies que tengan pesos moleculares mayores que el límite de exclusión son tan grandes que no se retienen y eluyen conjuntamente para dar un mismo pico. El *límite de permeabilidad* es el peso molecular por debajo del cual las moléculas del soluto pueden penetrar completamente en los poros. Por debajo de este peso molecular, todas las moléculas del soluto son tan pequeñas que eluyen en una sola banda. A medida que los pesos moleculares disminuyen con respecto al límite de exclusión, las moléculas del soluto pasan cada vez más tiempo promedio en los poros de las partículas y de esta forma se mueven cada vez con mayor lentitud. Es en la región de permeabilidad selectiva en la que tiene lugar el fraccionamiento, dando lugar a picos de soluto individuales. Las rectas de calibración experimentales se obtienen fácilmente a partir de productos estándar. En muchas ocasiones estas rectas las proporcionan los fabricantes de los materiales de empaque.¹⁸

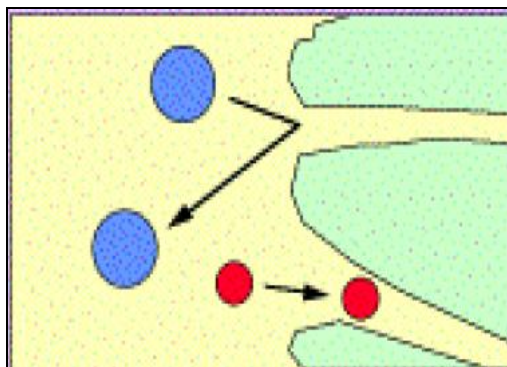


Figura 9. Cromatografía de exclusión por tamaño: la separación se basa en el tamaño molecular. La FE es un material de tamaño de poro definido.¹⁷

2.2.4 Cromatografía electrocinética micelar

La cromatografía electrocinética micelar (CEM) es una técnica híbrida entre la electroforesis capilar y la cromatografía de líquidos. Desde su introducción en 1984 por Terabees, uno de los mecanismos más utilizados es la electrocromatografía, ya que permite separar tanto analitos neutros como cargados. La separación de compuestos neutros por CEM se basa en la adición al electrolito de referencia (BGE, por sus siglas en inglés) de un tensoactivo (sufractante) cargado en una concentración suficiente para formar micelas (concentración micelar crítica). Estos analitos neutros se distribuyen entre la fase micelar y la fase acuosa del BGE en diferente extensión dando paso a su separación. Las moléculas neutras interactúan con la micela en diferente grado en función de su hidrofobicidad y de esta manera adquieren movilidad electroforética.¹⁹

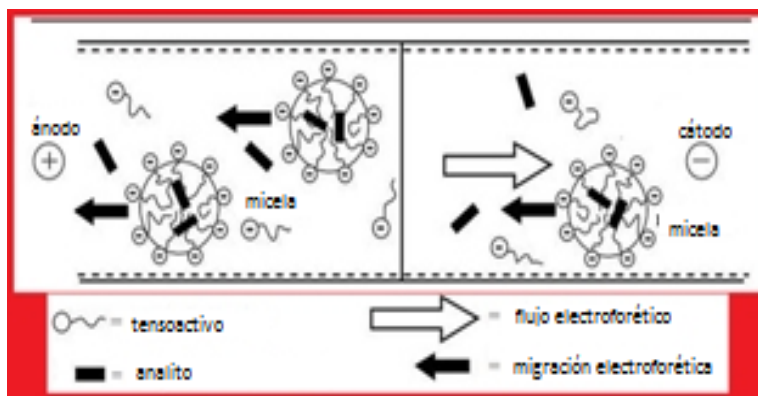


Figura 10. Cromatografía electrocinética micelar: los analitos neutros se distribuyen entre la fase micelar.²⁰

El mecanismo de separación en CEM emplea una fase micelar que funciona como una fase pseudo estacionaria, de esta forma el factor de capacidad puede obtenerse de la siguiente manera:

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0 \left(1 - \frac{t_r}{t_m}\right)}$$

donde t_r es el tiempo de retención del soluto, t_0 el tiempo de retención de un soluto que se mueve con el eluyente y t_m es el tiempo de retención de la micela. Esta ecuación es una modificación de la definición clásica del factor de capacidad que incluye el factor de movimiento de la micela. Obsérvese como en caso de que la micela fuera realmente estacionaria, t_m sería infinito y el factor de capacidad se reduciría a su expresión convencional.

Los compuestos neutros separados por CEM migran en un intervalo de tiempo conocido como ventana de elución comprendido entre t_0 y t_m . Los compuestos hidrofílicos que no interaccionan con la micela eluyen con el frente de elución mientras que aquellos compuestos que están totalmente solubilizados en la fase micelar eluyen con la micela. Desde el punto de vista de la resolución, interesa una ventana de elución grande la cual se puede conseguir utilizando condiciones de elución moderadas y micelas de gran movilidad.

La selectividad de la separación en CEM se puede manipular con facilidad empleando diferentes tensoactivos. Estos cambios en la selectividad son comparables con los que se obtendrían si se modificara la fase estacionaria en CL. Los surfactantes más habituales en CEM son los aniónicos, en especial el dodecilsulfato sódico (DSS) aunque se han utilizado otros tensoactivos catiónicos, neutros (en combinación o cargados) o zwitteriónicos.¹⁹

2.2.5 Cromatografía de separación quiral

La quiralidad ocurre en una gran cantidad de moléculas debido a la presencia de un carbono tetraédrico con cuatro sustituyentes diferentes. De cualquier forma, la presencia de dichos átomos en una molécula no representa una condición forzosa de quiralidad. Se dice que un compuesto es quiral si es que no es traslapable (superponible) con su imagen en el espejo, y aquiral si es que su reflejo es traslapable.

Una pareja quiral se puede distinguir a través de su interacción con otras moléculas quirales para formar diastereómeros de larga o corta duración. Un diastereómero es una molécula que contiene dos o más centros estereoquímicos o quirales y que tiene la misma composición química y conectividad. Ambos difieren en su estereoquímica en uno o más centros quirales. La extensión en la cual un enantiómero puede interactuar con una fase estacionaria depende en que tan cerca pueda aproximarse a sus moléculas.

Si la fase estacionaria también es quiral por naturaleza, es más probable que un enantiómero en la muestra encaje en la superficie de fase estacionaria mientras el otro sería estéricamente excluido al tener menos superficie con la cual interactuar. El uso de la CL para la separación implica una mayor facilidad y eficiencia. Un gran número de mezclas racémicas puede separarse fácilmente utilizando una columna de fase reversa y una fase móvil adicionada con un reactivo quiral. En algunos casos, el reactivo se adsorbe fuertemente a la fase estacionaria y en otros, la selectividad quiral reside en la fase misma.

De manera inversa, si el reactivo predomina en la fase móvil, la selectividad se encontrará en el eluyente. Los métodos más comúnmente utilizados para obtener una selectividad quiral parten de ligar compuestos quirales selectivos (excluyentes) a la sílica de la misma forma que se utiliza en la cromatografía de líquidos de alta resolución de fase reversa.

2.2.6 Cromatografía de reparto centrífugo

La cromatografía de reparto centrífugo (CRC) pertenece a los métodos basados en cromatografía de contra-corriente (CCC). La separación se basa en el comportamiento de partición de los componentes de la muestra entre dos líquidos inmiscibles. Así como en CLAR, la fase retenida en la columna se denomina fase estacionaria, la otra recibe el nombre de fase móvil. En la CCC existen dos mecanismos de equilibrio para las dos fases inmiscibles. Ambas dependen de las características del campo de fuerza centrífuga el cual permite la retención de la fase estacionaria dentro de la columna. Los dispositivos que equilibran las fases de acuerdo al denominado *modo hidrodinámico*, emplean una fuerza centrífuga la cual varía en intensidad y dirección. Zonas alternadas de agitación y asentamiento de ambas fases tienen lugar a lo largo de la columna. En contraste, la CRC emplea el llamado *modo hidrostático* el cual posee una fuerza centrífuga constante en intensidad y dirección. Por lo tanto, la fase móvil penetra en la fase estacionaria formando gotas pequeñas, chorros o aerosoles. La mayor o menor agitación de ambas fases depende de la intensidad de la fuerza centrífuga, la velocidad de flujo de la fase móvil y de las propiedades físicas del sistema de disolución. Las separaciones cromatográficas obtenidas en el modo hidrostático son menos eficientes que las obtenidas en el modo hidrodinámico. De cualquier manera, la retención en la fase estacionaria es menos sensible para las propiedades físicas del sistema disolvente, tales como la viscosidad, densidad y tensión superficial (interfacial). Lo anterior justifica la amplia aplicación de la CRC.¹⁸

2.2.7 Cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad (CA) es un mecanismo relativamente recién desarrollado específicamente para el análisis de muestras biológicas. La fase estacionaria esta formada por un péptido o proteína, la cual cuenta con una ligadura de afinidad específica para un analito en particular. La fase estacionaria se encuentra covalentemente enlazada a un ligando, ya sea un ácido nucleico o alguna enzima contenida en una matriz abierta inerte de celulosa o agar. Solo analitos con una afinidad específica por el ligando serán retenidos y separados. La CA se utiliza en un amplio rango de análisis bioquímicos, incluida la separación de moléculas de proteína.

En la CA el ligando con la afinidad específica por un compuesto se une a la matriz de gel y se empaca de manera normal. La muestra se aplica en la parte superior de la columna con la ayuda de un eluyente amortiguado de manera adecuada. Durante el análisis, los compuestos afines al ligando se enlazan (aunque no de manera irreversible) y se retienen. Los compuestos no retenidos eluyen directamente a través de la columna. Finalmente, el pH o la composición del eluyente se modifican con el fin de debilitar el enlace entre el ligando y el compuesto, promoviendo así la disociación y facilitando la elución del compuesto retenido.¹⁸

Las condiciones experimentales en las cuales la CA se lleva a cabo deben ser estables para el enlace gel-ligando; el enlace ligando-sustrato debe ser específico y reversible.

2.2.8 Cromatografía de interacción hidrofóbica

La cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH) es una herramienta poderosa tanto para el análisis como para la separación preparativa de biomoléculas. La CIH toma ventaja de las áreas hidrofóbicas localizadas en la superficie de las proteínas y es un excelente complemento para las cromatografías de exclusión por tamaño y de intercambio de iones en separaciones difíciles, especialmente

en aquellas en las cuales las impurezas constan de un punto isoeléctrico o peso molecular similar a los del analito.

En la CIH, las proteínas y moléculas con propiedades de superficie hidrofóbica se atraen a la superficie de resina medianamente hidrofóbica (comparada con la superficie fuertemente hidrofóbica de las resinas de fase reversa) bajo condiciones acuosas con alto contenido en sales y se liberan mediante el decrecimiento de la concentración de sal en la fase móvil. Bajo una concentración salina igual a cero la mayoría de los componentes se liberarán. La compatibilidad entre la hidrofobicidad de la resina y la del analito es crítica para la selección de la resina más adecuada para la separación.^{21 y 22}

2.2.9 Cromatografía de reparto

La cromatografía de reparto se puede subdividir en *cromatografía líquido-líquido* y *cromatografía con fases químicamente enlazadas* (fases ligadas). La diferencia entre dichas técnicas radica en la forma en cómo se retiene la fase estacionaria sobre las partículas de soporte del empaque. En líquido-líquido, la fase estacionaria líquida se retiene sobre la superficie del soporte por adsorción física. En fase ligada químicamente, la fase estacionaria se une químicamente a la superficie del soporte.⁴

En la cromatografía de reparto uno de los disolventes, por lo general el agua, permanece en la fase estacionaria, la cual consiste en una columna o película de material inerte. La otra fase consiste en un disolvente orgánico móvil, saturado con agua, que fluye en relación con la fase estacionaria. Los componentes de una mezcla se separan si los coeficientes de reparto entre los disolventes son suficientemente diferentes.

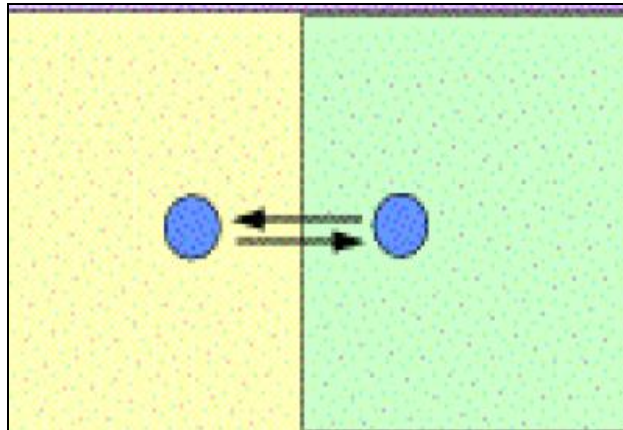


Figura11. Cromatografía de reparto: la separación se da por el reparto del soluto entre dos fases líquidas (solubilidad relativa).¹⁷

2.3 Fase ligada

En su forma primaria, el flujo gravitacional eluía la fase móvil a través de una columna empacada por lo general con un adsorbente sólido, tal como el óxido de silicio hidratado (sílice o gel de sílice) o polímeros de óxido de aluminio hidratado (alúmina). Se agregaba un líquido de alto peso molecular en las partículas solidas para brindar diferentes tipos de selectividad. Bajo dichas circunstancias, las columnas empleadas eran similares a aquellas utilizadas en la CG, donde la fase estacionaria líquida se retenía solo por fuerzas físicas. En la CG el requisito para que la fase estacionaria permanezca en su lugar durante un largo periodo de tiempo es su baja volatilidad. En la CL, el requisito para su permanencia es la insolubilidad en la fase móvil. De cualquier manera, con el desarrollo de bombas de alta presión más confiables que pueden producir un flujo más estable por periodos de tiempo mayores, la insolubilidad con la fase móvil no es suficiente. A las presiones empleadas para eluir los solventes a lo largo del empaque de una columna de CLAR (de decenas a pocas centenas de atmósferas), las interacciones desarrolladas en la interfase entre la fase móvil y la estacionaria son lo suficientemente fuertes como para remover los compuestos insolubles de la superficie de un soporte sólido. Entonces, la fase estacionaria se extrae fuera de la columna como una gota insoluble. La salida de la fase estacionaria fuera de la columna se conoce como *sangrado de columna*. Por lo tanto, fue necesario desarrollar métodos para fijar

la fase estacionaria en el soporte sólido a través de una ligadura química. Si la unión química entre la superficie del soporte sólido y el compuesto empleado como fase estacionaria es estable bajo las condiciones experimentales del ensayo cromatográfico (temperatura y composición de fase móvil) se evitará el sangrado de columna.²³

Afortunadamente, el material más comúnmente utilizado como fase estacionaria en experimentos cromatográficos es la sílice. La composición de la sílice se ha investigado durante muchos años, por lo cual se encuentra disponible una gran cantidad de información acerca de las posibles interacciones químicas en su superficie. Se puede considerar a la sílice como un polímero del ácido sílico (H_2SiO_3). Los grupos terminales del polímero localizados en la superficie del sólido son grupos hidroxilo, los cuales se conocen como silanoles. Debido a que provienen de precursores ácidos, son ácidos por naturaleza y poseen un valor de pK_a aproximado a 5. Dicho valor es variable, dependiendo de otros componentes de la matriz de la sílice tales como los metales. Las unidades poliméricas constan de una serie de ligaduras siloxánicas (-Si-O-Si-) las cuales son hidrofóbicas por naturaleza. Lo que generalmente se reconoce como su característica más prominente es un grupo silanol en la superficie, aunque en algunos casos la superficie de una molécula de silicón interactúa con dos grupos, lo cual se conoce como silanol germinal.

Los silanoles existen en dos formas. En la primera pueden ser independientes de otras entidades alrededor de ellos y se conocen como silanoles libres o aislados. En la segunda, si están lo suficientemente cercanos como para interactuar con un silanol vecino, dichas porciones se unen por puentes de hidrógeno lo cual se conoce como silanoles asociados. Todas las formas de silanoles son especies polares hidrofílicas. El número relativo de silanoles libres contra los asociados tiene una gran influencia en el valor de la sílice. Por último, debido a la característica de polaridad y de los puentes de hidrógeno presentes en los silanoles, el agua se adsorbe fuertemente en la superficie de la molécula. El agua no se puede remover fácilmente, incluso calentándola por encima de los 100 °C durante un tiempo prolongado. Por lo tanto, esta matriz tan compleja debe someterse a una reacción química con el fin de fijar la

porción de una molécula a la superficie en forma de una fase estacionaria. De acuerdo a los resultados de investigaciones previas acerca de la reactividad de la sílice, se determinó que los grupos silanol son el sitio para una modificación en la superficie de la molécula.²³

2.3.1 Cromatografía en fase normal

En la cromatografía de fase normal (CFN), la fase estacionaria es más polar que la fase móvil. En dicho contexto, la palabra polar se emplea del mismo modo que al hablar de enlaces polares en las moléculas: los enlaces de la fase estacionaria tienen momentos dipolo más grandes que los enlaces en las moléculas del disolvente. Las fases estacionarias en la CFN suelen ser polímeros inorgánicos que cuentan con un gran número de poros de tamaño molecular pequeño (desde varios nm a décimas de nm) de modo que sus áreas superficiales son grandes. Los materiales más comunes son la sílice o la alúmina. Cuando se forman enlaces fuertes entre estos soportes y los componentes de la muestra, se dice que el soporte es activo. Su actividad depende de los grupos hidroxilo en la superficie y de la forma química que tengan (es decir, si están o no deprotonados). Se podría esperar que los grupos Si-O se hidrolizaran mejor en medios básicos; de hecho, la sílice se disuelve con lentitud en las fases móviles de pH alto. Pero en general, a cualquier pH conviene hacer más lenta la disolución de la columna analítica colocando una columna de guarda (precolumna) en la parte frontal de la misma. Dicha precolumna contiene el mismo material de la columna analítica y su empaque se sacrifica; sus productos disueltos ayudan a preservar el empaque de la columna analítica.¹⁶

En la CFN la polaridad del disolvente es el principal factor que determina los volúmenes de elución. Cuando los disolventes son más polares, los solutos se desplazan con mayor rapidez y se eluyen más pronto. La explicación es sencilla: los disolventes polares compiten mejor por los solutos que los disolventes menos polares. De aquí se deduce que sería más conveniente predecir las propiedades de elución de los disolventes para desarrollar ensayos de separación en CFN. Por ejemplo, si la elución es demasiado lenta, se podría

buscar en una lista de disolventes más polares del que se empleó. Las listas de este tipo se llaman series eluotrópicas, y en ellas, los disolventes están clasificados en un orden semicuantitativo según su capacidad para eluir solutos en una fase estacionaria específica. En la tabla 3, se presenta la serie eluotrópica para la alúmina.

Tabla 3. Parámetros de fuerza de disolvente (ϵ^0) para soportes de alúmina.

Disolvente	ϵ^0	Disolvente	ϵ^0
Pentano	0.00	Dicloruro de etileno	0.49
Éter de petróleo	0.01	Metietilacetona	0.51
Hexano	0.01	Dioxano	0.56
Ciclohexano	0.04	Acetona	0.56
Tetracloruro de carbono	0.18	Acetato de etilo	0.58
Xileno	0.26	Dimetilsulfóxido	0.62
Tolueno	0.29	Acetonitrilo	0.65
Clorobenceno	0.30	Piridina	0.71
Benceno	0.32	<i>iso</i> -Propanol	0.82
Éter etílico	0.38	<i>n</i> -Propanol	0.82
Cloroformo	0.40	Metanol	0.95
Cloruro de metileno	0.42	Ácido acético	1.0
Tetrahidrofurano	0.45	Agua	Grande

Se utiliza principalmente un orden de polaridad de las moléculas del disolvente. El hexano tiene baja polaridad, el éter se encuentra en un rango intermedio y el agua al extremo superior. Sin embargo, la polaridad del disolvente no es el único factor que permite mejor solvatación y una elución más rápida. Otro factor podría ser la capacidad de formación de puentes de hidrogeno del disolvente y otra característica más específica serían los factores que afectan la adsorción.

Estos mecanismos no se limitan a separaciones que dependen de interacciones con sílice y alúmina: prácticamente cualquier compuesto puede enlazarse covalentemente con partículas sólidas. Por ejemplo, en los soportes de sílice, los enlaces entre el silicio y el oxígeno sobre la superficie anclan los compuestos de carbono a ella. Los empaques con grupos superficiales unidos a ellas se denominan fases ligadas.¹⁶

2.3.2 Cromatografía de fase reversa

En la cromatografía de fase reversa (CFR), la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. Se emplean dos tipos fundamentales de fases estacionarias y las más comunes son grupos no polares enlazados a la sílice. Entre ellos los que se utilizan más a menudo son los grupos orgánicos $-CH_3$, $-C_8H_{17}$ y $-C_{18}H_{37}$. De los anteriores, el más utilizado es la cadena de carbono de 18 átomos (grupo octadecilo). Este tipo de fase estacionaria se abrevia como ODS y C_{18} . Los grupos orgánicos enlazados ejercen un efecto similar al que produciría una capa sumamente delgada de disolvente orgánico en la superficie de las partículas de sílice. De este modo, los solutos se reparten entre el recubrimiento superficial y la fase móvil, a semejanza de una extracción líquido-líquido. Además, a medida que la cadena de carbonos es más larga, dichas capas se vuelven "más orgánicas". Como resultado, las cadenas más prolongadas interactúan con más fuerza con los solutos que se disuelven preferencialmente en una fase orgánica.

El segundo tipo de fase estacionaria que se emplea en CFR está compuesto de perlas de polímeros orgánicos. Un polímero característico es una resina de poliestireno y divinilbenceno. El divinilbenceno forma enlaces cruzados entre las cadenas de polímero de poliestireno. Dichos enlaces provocan una rigidez física en el polímero; la mayor densidad de enlaces cruzados se asocia con un material más rígido. La rigidez es necesaria para resistir la deformación a altas presiones.¹⁶

La CFR es bastante popular ya que los picos obtenidos en el cromatograma son más finos y simétricos y las reacciones de equilibrio de adsorción y desorción tienden a ser más rápidas.

En contraste con las series eluotrópicas para las fases estacionarias como la sílice y la alúmina, los disolventes menos polares son eluyentes más poderosos en las separaciones de CFR. En general, el poder de elución de fase reversa es opuesto al orden de la tabla 3 para la elución de CFN. Este poder de elución de fase reversa se indica mediante una escala numérica llamada índice de polaridad.

Recientemente se ha empleado cierta forma de grafito como fase estacionaria: el material se llama carbón grafitico poroso (PGC, por sus siglas en inglés) y es esencialmente carbón puro con superficies molecularmente planas. Contiene pocos átomos que no sean carbono y los presentes están ubicados en los bordes de grandes placas (a nivel molecular). El PGC es menos polar que los disolventes en general y por lo tanto se le clasifica entre los soportes de fase reversa. Sin embargo, la propiedad más interesante del PGC es que su fuerza de interacción con las moléculas del soluto depende casi exclusivamente del área molecular en contacto con la placa. Como resultado, las moléculas de mayor tamaño tienden a enlazarse con más fuerza que las pequeñas, las moléculas flexibles se enlazan más que las rígidas. La carga iónica no afecta el enlace. Y por último, es posible separar enantiómeros cuando la estructura de alguno de ellos permite el acercamiento de gran número de átomos a la superficie, diferenciándolo así de la otra forma enantiomérica. Este mecanismo mixto de interacción ofrece una alternativa a las fases normales y enlazantes para ciertos tipos de compuestos.¹⁶

3 ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINES)

3.1 Generalidades

Los antiinflamatorios no esteroideos, conocidos con las siglas AINES, son compuestos que, a pesar de ser heterogéneos y no presentar una relación química entre sí (aunque la mayoría son ácidos orgánicos), comparten ciertas acciones terapéuticas y algunos efectos adversos, ya que todos actúan como antipiréticos, analgésicos y antiinflamatorios.

Los AINES actúan inhibiendo la producción de enzimas sintetizadoras de la prostaglandinas G/H, comúnmente conocidas como ciclooxigenasas (COX). La inhibición de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) esta principalmente relacionada a regular, en gran parte, las reacciones antipiréticas, antiinflamatorias y analgésicas de los medicamentos AINES, mientras una inhibición simultanea de la ciclooxigenasa 1 (COX-1) influye principalmente en una reacción adversa en cuanto a problemas en el tracto gastrointestinal.²⁴

En la actualidad, los AINES son el grupo de medicamentos más utilizado en el cuidado de la salud humana ya que pueden consumirse sin necesidad de una prescripción médica para el tratamiento de la fiebre y dolores leves,²⁵ pero tienen la desventaja de producir diversos efectos adversos, tales como la gastritis, úlceras estomacales y formación de cálculos renales. Ante los recientes avances tecnológicos en la industria farmacéutica, es necesario buscar nuevas opciones que reduzcan dichos efectos adversos sobre los pacientes de uso recurrente y los más susceptibles.

3.2 Clasificación de los AINES

Los antiinflamatorios no esteroideos se clasifican en cinco grupos principales:

Tabla 4. Clasificación de los AINES

Grupo	Subgrupos	Ejemplos
Ácidos carboxílicos	Derivados del ácido salicílico	Ácido acetilsalicílico Ácetil salicilato de lisina Salicilato de sodio Trisalicilato de colina magnésica Sulfazalacina Olsalazina Salsalato Berorilato Diflunisal
	Derivados del ácido acético	Indometacina Sulindaco Bencidamida
	Derivados heteroaril acéticos	Diclofenaco Aceclofenaco Ketorolaco
	Derivados del ácido propiónico	Ibuprofeno Naproxeno Ketoprofeno
Ácidos enólicos	Pirazolonas.	No aplica
	Oxicamos	Piroxicam Tenoxicam Meloxicam
Alcalonas	Nabumetona	No aplica
AINES básicos	Derivados de la anilina	Paracetamol Sulfonanilidas (Nimesulida)
Inhibidores selectivos de la COX2	Celecoxib	No aplica
	Rofecoxib	No aplica

3.3 Nimesulida

La nimesulida es un AINES del grupo de las sulfonanilidas con acción inhibitoria selectiva sobre la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2) la cual inhibe la síntesis de las prostaglandinas, las cuales inducen el proceso inflamatorio, respetando la síntesis de las prostaglandinas que desempeñan un papel fisiológico, lo que le confiere una gran efectividad terapéutica y un excelente perfil de tolerabilidad, especialmente a nivel gastrointestinal. Se administra en dosis de 200 mg dos veces al día, por vía oral o rectal, en procesos inflamatorios, fiebre y dolores. La nimesulida betadex (complejo formado por nimesulida y β -ciclodextrina) se utiliza de manera similar.

La nimesulida es un compuesto de sulfonamida disponible en Europa que muestra selectividad para la COX-2 similar al celcoxib en todos los análisis sanguíneos. Es un antiinflamatorio, analgésico y antipirético identificado con bajo índice de efectos adversos gastrointestinales. Los efectos adicionales incluyen la inhibición de la activación de los neutrófilos, descenso en la producción de la citoquina, descenso en la producción de enzimas degradativas y una activación en los receptores glucocorticoidales.²⁴



Figura 12. Presentaciones comerciales de nimesulida.²⁶

3.3.1 Propiedades fisicoquímicas de la nimesulida

Nombre genérico: Nimesulida

Nombres químicos:

- 4-Nitro-2-fenoximetanosulfonamida
- N-(4-Nitro-2-fenoxifenil) metanosulfonamida
- 4-Nitro-2-fenoximetanosulfonamida
- (Metilsulfonil)(4-nitro-2-fenoxifenil)amina

Fórmula condensada: C₁₃H₁₂N₂O₅S

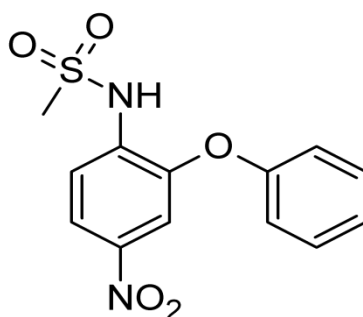
Estructura molecular:

Figura 13. Estructura molecular de la Nimesulida

Peso molecular: 308.31 g/mol

Descripción: polvo cristalino, de color amarillo claro, prácticamente inodoro; presenta polimorfismo. Prácticamente insoluble en agua; poco soluble en alcohol absoluto; fácilmente soluble en acetona.

Identificación: por espectrofotometría de absorción infrarroja.

Absorbancia máxima: 0.50 a 450 nm

Impurezas y sustancias relacionadas: por cromatografía de líquidos.

Fotoestabilidad: estable a la luz.

Punto de fusión: de 148 a 150°C

pKa: 6.5

Higroscopicidad: Baja.

Solubilidad: La nimesulida es soluble en disolventes moderadamente polares como el diclorometano y la acetona. La solubilidad disminuye en disolventes de alta polaridad como el metanol. Aunque la solubilidad en agua se reporta como 0.01 mg/mL, esta depende del pH de la solución acuosa, es decir, al aumentar el pH la solubilidad aumenta. Lo anterior se debe principalmente a la deprotonación de la molécula y a la ionización del grupo sulfonamida.²⁷

En la tabla 5 se presenta la solubilidad de la nimesulida en amortiguadores con rango de pH de 4 a 11 y en diferentes disolventes.

Tabla 5. Solubilidad de la nimesulida

Matriz	SOLUBILIDAD (mg/mL)
pH 4.0	0.068
pH 5.0	0.0078
pH 6.0	0.0091
pH 7.0	0.021
pH 8.0	0.152
pH 9.0	0.666
pH 10.0	1.03
pH 10.5	1.41
pH 11.0	2.03
Metanol	9.43
Diclorometano	163.0
Acetona	162.4
Acetonitrilo	92.7
Etanol (95%)	3.6
Etilacetato	89.3

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad, las normas internacionales dictaminan que se deben monitorear los productos de degradación en todas las formas farmacéuticas. La norma oficial mexicana NOM-073, en el punto 9.3, menciona que para fármacos y medicamentos, debe vigilarse que los productos de degradación que se observen durante los estudios de estabilidad, no rebasen los límites establecidos en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos y sus suplementos.²⁸ Así mismo, la conferencia internacional de armonización (ICH, por sus siglas en inglés) menciona que el responsable de un medicamento debe reportar las impurezas reales y potenciales que puedan surgir durante la síntesis, purificación y almacenamiento de un fármaco nuevo.²⁹

Una tendencia actual dentro de la industria farmacéutica es la de desarrollar metodologías analíticas indicativas de estabilidad, las cuales identifiquen y cuantifiquen la concentración de principio activo dentro del medicamento, así como sus productos de degradación. Lo anterior tiene como ventaja la optimización de recursos dentro de la empresa.

Otro factor que debe tomarse en cuenta es que los medicamentos producidos en un país son comercializados a nivel mundial, por lo tanto, deben cumplir no solo con las normas locales para su liberación y distribución, si no también para las de las regiones donde se planea distribuir el producto. Dicho lo anterior, las ventajas de un método analítico para la identificación y cuantificación del principio activo de un medicamento que sea indicativo de estabilidad son considerables.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Proponer una metodología analítica para la identificación y cuantificación de nimesulida y sus productos de degradación por cromatografía de líquidos de alta resolución de fase reversa, tomando como base las propiedades fisicoquímicas del fármaco.

5.2 Objetivos particulares

5.2.1 Profundizar en la investigación bibliográfica acerca de las propiedades fisicoquímicas y cromatográficas de la nimesulida con el fin de aportar argumentos para su análisis.

5.2.2 Encontrar las condiciones óptimas para el análisis de nimesulida y sus productos de degradación por CLAR a través de consulta bibliográfica.

5.2.3 En base a la información encontrada, proponer y simular un método analítico por CLAR-FR para la identificación y cuantificación de nimesulida y sus productos de degradación.

6 JUSTIFICACIÓN

La metodología de análisis para nimesulida incluida en la más reciente edición de la FEUM (10ª Ed, 2011) contiene identificaciones por infrarrojo (IR) y ultravioleta (UV), valoración por titulación convencional y determinación de sustancias relacionadas por CLAR. Por lo tanto, proponer una metodología indicativa de estabilidad para la nimesulida en materia prima y producto terminado ofrece múltiples ventajas tales como la optimización de recursos y reducción en el tiempo de análisis.

7 DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

El estudio se realizó mediante la revisión de diversos artículos científicos que utilizaron análisis por CLAR de nimesulida publicados durante los últimos 10 años con el fin de obtener la información más actual dentro de la investigación de dicho medicamento. Solo se tomaron en cuenta los métodos que utilizaron cromatografía de líquidos de alta resolución por fase reversa ya que las propiedades fisicoquímicas de la nimesulida permiten un análisis específico y cuantitativo mediante dicho mecanismo.

Para la propuesta de método cromatográfico se hizo énfasis en las principales características de un sistema de CLAR (velocidad de flujo, columna, proporción y composición de fase móvil, etc.) así como el tratamiento que se le dio a la muestra en la metodología de acuerdo al tipo de matriz.

Los alcances de la propuesta analítica son únicamente las condiciones cromatográficas y simulación del método, quedando pendiente su implementación y validación.

8 RESULTADOS Y ANÁLISIS

Se consultaron diversos métodos analíticos para identificación y cuantificación de nimesulida en diferentes matrices y se compararon sus condiciones cromatográficas, obteniendo los siguientes resultados:

Método 1 ¹⁰

Compuestos relacionados de nimesulida

En la tabla 6 se presenta un resumen de las condiciones cromatográficas del método para la determinación de productos de degradación de nimesulida incluido en la Farmacopea Europea.

Tabla 6. Condiciones cromatográficas del Método 1.

Parámetro	Especificación
Columna	Octadecilsilano de 0.125 m x 4.0 mm (DI)
Fase móvil	ACN/solución acuosa de 1.15 g/L de fosfato de amonio dihidrogenado ajustado a pH de 7 con amoniaco (35:65)
Velocidad de flujo	1.3 mL/min
Detector	UV/visible a 230 nm
Volumen de inyección	20 µl
Tiempo de análisis	7 veces el tiempo de retención de la nimesulida.
Software	No se menciona.

Solución de prueba: se disuelven 20 mg de la sustancia a analizar en 8 mL de acetonitrilo (ACN) grado reactivo y se aforan a 20.0 mL con agua.

Solución de referencia (a): se disuelven 10 mg de impureza de nimesulida C CRS y 10 mg de impureza de nimesulida D CRS en 20 ml de ACN y se aforan a 50.0 mL con agua. Se toma una alícuota de 1.0 mL de la solución y se lleva a volumen de 50.0 mL con fase móvil.

Solución de referencia (b): se diluye 1.0 mL de solución de prueba a 10.0 mL con fase móvil. Se toma 1.0 mL de dicha solución y se diluye a 100.0 mL con fase móvil.

Límites:

- Resolución: mínimo 2.0 entre los 2 picos principales obtenidos en el cromatograma de la solución de referencia (a).
- Cualquier impureza: no mayor al área del pico principal en el cromatograma obtenido con la solución de referencia (b) (0.1 %).
- Total de impurezas: no más de 5 veces el área del pico principal en el cromatograma obtenido con la solución de referencia (b) (0.5%).
- Límite de error: 0.1 veces el área del pico principal en el cromatograma obtenido con la solución de referencia (b) (0.01 %).

La columna se debe equilibrar con la fase móvil y la velocidad de flujo elegida, a temperatura ambiente o a la temperatura indicada en la monografía, hasta conseguir una línea de base estable. Se deben preparar soluciones individuales de las sustancias a analizar así como de sus soluciones de referencia. Toda solución a inyectar en el cromatógrafo debe estar libre de partículas sólidas.

La columna de C₁₈ es de uso recurrente en la CLAR-FR. En el caso del tiempo de retención indicado (7 veces el tr de la nimesulida) se justifica con la presencia de productos de degradación en el fármaco. El uso de fosfato de amonio como amortiguador proporciona un rango de pH moderado pero suficiente como para permitir la disociación de la nimesulida. La resolución entre los picos de impurezas y el pico principal debe ser mayor a 2.0 para garantizar una separación eficiente de los compuestos. A pesar de no ser un método de cuantificación, las condiciones cromatográficas establecidas por la Farmacopea Europea se deben tomar como base para la propuesta del método analítico. La más reciente edición de la FEUM se basa en el método antes descrito.

Método 2 (Manmode R, Dhamankar A, et. al.)³⁰

Se desarrolló un método CLAR de fase reversa para la determinación simultánea de metocarbamol y nimesulida en una formulación de tabletas, obteniendo un tiempo de retención de 3.81 y 5.93 min respectivamente. La validación del método propuesto incluyó linealidad, exactitud y precisión. El rango dinámico del metocarbamol y la nimesulida fue de 0 a 0.5 mg/mL y de 0 a 0.05 mg/mL; el porcentaje de recobros obtenido fue de 100.39 y 99.74 respectivamente. Se encontró que el método desarrollado fue simple, preciso y exacto, y se puede utilizar para análisis rutinarios de control de calidad de ambos fármacos en tabletas combinadas.

Para el tratamiento de la muestra se pesaron y pulverizaron 20 tabletas hasta conseguir un polvo fino. Se pesó una cantidad de polvo equivalente a 0.2 mg de metocarbamol y 0.02 mg de nimesulida dentro de un matraz volumétrico de 100 mL y se disolvieron en aproximadamente 50 mL de metanol. Se agitó el matraz durante 20 minutos y se llevó al aforo con metanol. La solución se filtró mediante una membrana de 0.45 μm y se utilizó el filtrado para el análisis. Como sistema cromatográfico se utilizó un equipo Shimadzu con software Csw, detector UV/Vis e inyector universal Rheodyne 77251i con loop de 20.0 μL .

En la tabla 7 se presenta un resumen de las condiciones cromatográficas del método 2.

Tabla 7. Condiciones cromatográficas del Método 2

Parámetro	Especificación
Columna	Supelcosil LC-8 de 250 mm x 4.6 mm (DI)
Fase móvil	Metanol/agua (60:40)
Velocidad de flujo	1.0 mL/min
Detector	UV/Vis a 276 nm
Volumen de inyección	20µL
Tiempo de análisis	8 min
Software	Csw

El método descrito es adecuado para la cuantificación de nimesulida como producto terminado en combinación con otro principio activo. La separación de los compuestos es adecuada ($R=4.724$) y el tiempo de análisis brinda la posibilidad de analizar múltiples muestras a un costo relativamente bajo debido a que emplea únicamente metanol como modificador orgánico. Llama la atención la falta de un modificador de pH, sin embargo, de acuerdo al cromatograma presentado en la figura 14, los picos se observan eficientes, sin coleo o cabeceo importante, lo cual garantiza una buena reproducibilidad. Las condiciones cromatográficas descritas deben ser tomadas en cuenta al momento de sugerir el método de separación final.

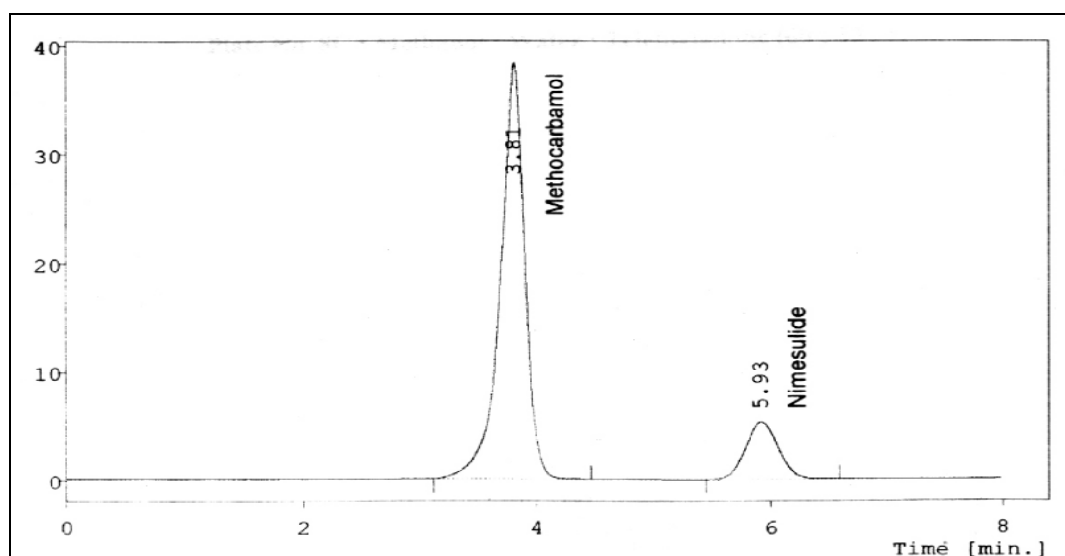


Figura 14. Cromatograma de la separación de metocarbamol y nimesulida en tabletas.

Método 3 (Mokrý M, et al) ³¹

El reporte descrito aborda la cuantificación de nimesulida, 2-fenoxi-4-nitroanilina (principal producto de degradación de la nimesulida), metilparabeno (MP) y propilparabeno (PP), y eventualmente de ácido 4-hidroxibenzoico en jarabe. El tratamiento de la muestra se llevó a cabo diluyendo el jarabe que contenía 10 mg/mL de nimesulida con fase móvil hasta obtener una concentración final de 10 µg/mL. La cantidad de estándar interno adicionada (Fenacetina, FAC) fue equivalente a 50 µg/mL.

En la tabla 8 se presenta un resumen de las condiciones cromatográficas del método 3.

Tabla 8. Condiciones cromatográficas del Método 3.

Parámetro	Especificación
Columna	Discovery C ₁₈ de 150 mm x 4.6 mm, 5 µm
Fase móvil	Metanol/fosfato de amonio dibásico 0.01 M, pH 4.0 (60:40)
Estándar interno	Fenacetina (FAC)
Velocidad de flujo	1.0 mL/min
Detector	UV Spectra Physics 100 a 276 nm
Bomba	Solvent Delivery system 8700
Volumen de inyección	20µL
Tiempo de análisis	15 min
Software	SW/Data Clarity

La cuantificación de los productos de degradación de la nimesulida es un factor de suma importancia en el control de la calidad de jarabes. El método descrito es indicativo de estabilidad debido a que cuantifica los productos de degradación de la hidrólisis de la nimesulida y de los conservadores incluidos en la formulación, por lo que debe tomarse en cuenta por su similitud con el método de la Farmacopea Europea. Se utilizó un pH de 4.0 con fosfato de amonio dibásico en la fase acuosa. El tratamiento de la muestra es simple, ya

que se trató únicamente de diluciones hasta alcanzar una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$. Se adicionó un estándar interno (EI) y se realizó una recta de calibración para compensar las posibles pérdidas inherentes a la matriz. A pesar de que no se indica un tiempo de corrida específico, el último compuesto de la preparación termina de eluir antes de los 15 minutos. Es necesario considerar una corrida más larga si es que se cuantifican productos de degradación ya que en ocasiones eluyen compuestos desconocidos en la muestra, sobre todo si se trata de un jarabe.

El cromatograma de la figura 15 muestra una separación eficiente y selectiva, una resolución adecuada y baja deformidad del pico cromatográfico.

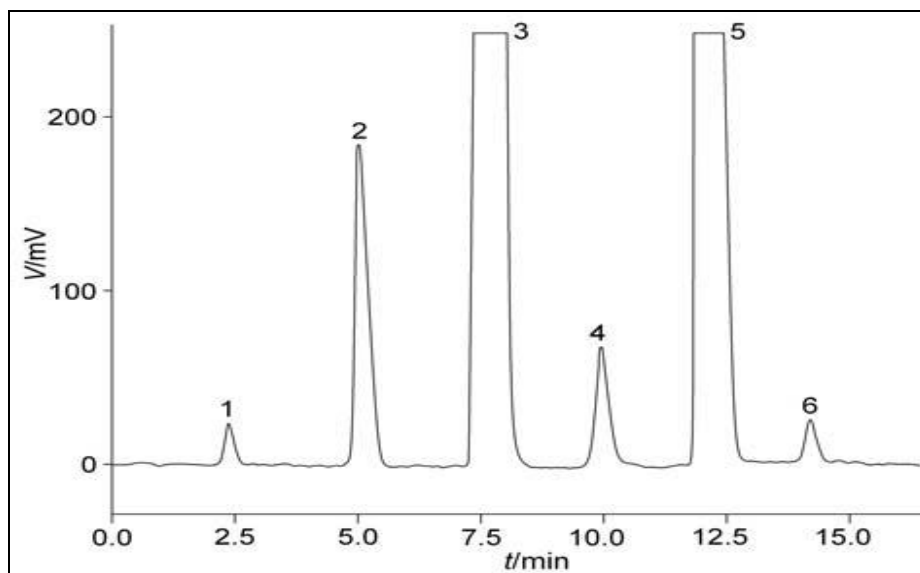


Figura 15. Cromatograma del jarabe analizado después de su hidrólisis a 90°C durante 2 hrs: 4-HBA (1), MP (2), PAC (3), PP (4), nimesulida (5) y PNA (6).

Método 4 (Prasanna R.B)³²

Se desarrolló un método de cromatografía de líquidos de alta resolución simple, específico, exacto y preciso para la determinación simultánea de nimesulida y paracetamol a partir de tabletas. En el tratamiento de la muestra se utilizaron 20 tabletas Nimupain® plus (Cipla). Se pesó individualmente cada tableta con 100 mg de nimesulida y 325 mg de paracetamol, se molieron y se pesó con exactitud el polvo equivalente a 25 mg de paracetamol, el cual se depositó en un matraz volumétrico de 25 mL. Se agregó acetonitrilo para disolver la muestra y se aforó con el mismo disolvente. Se agitó la solución en un vortex y se filtró a través de una membrana de 0.45 µm. A partir de ésta solución se tomaron alícuotas y se diluyeron con fase móvil hasta alcanzar una concentración final igual a 3 µg/mL de nimesulida y 15 µg/mL de paracetamol.

En la tabla 9 se presenta un resumen de las condiciones cromatográficas del método 4.

Tabla 9. Condiciones cromatográficas del Método 4.

Parámetro	Especificación
Columna	Inertsil C ₁₈ de 150 mm x 4.6 mm (DI), 5 µm
Fase móvil	ACN/metanol/amortiguador de ácido Ortofosfórico pH 4.5 (40:40:20)
Velocidad de flujo	1.0 mL/min
Detector	UV a 276 nm
Bomba	Sistema Shimadzu LC2010
Volumen de inyección	20 µL
Tiempo de análisis	15 min
Software	LC2010

El método descrito emplea un pH de 4.5 el cual permite una separación óptima (R= 4.5) de los compuestos de la formulación. La fase móvil consta de la combinación de los dos principales modificadores orgánicos (metanol y ACN), lo cual puede ser un factor que garantice una mejor selectividad; la eficiencia

observada en la figura 16 es bastante efectiva, ya que se obtienen picos cromatográficos estrechos con una resolución adecuada.

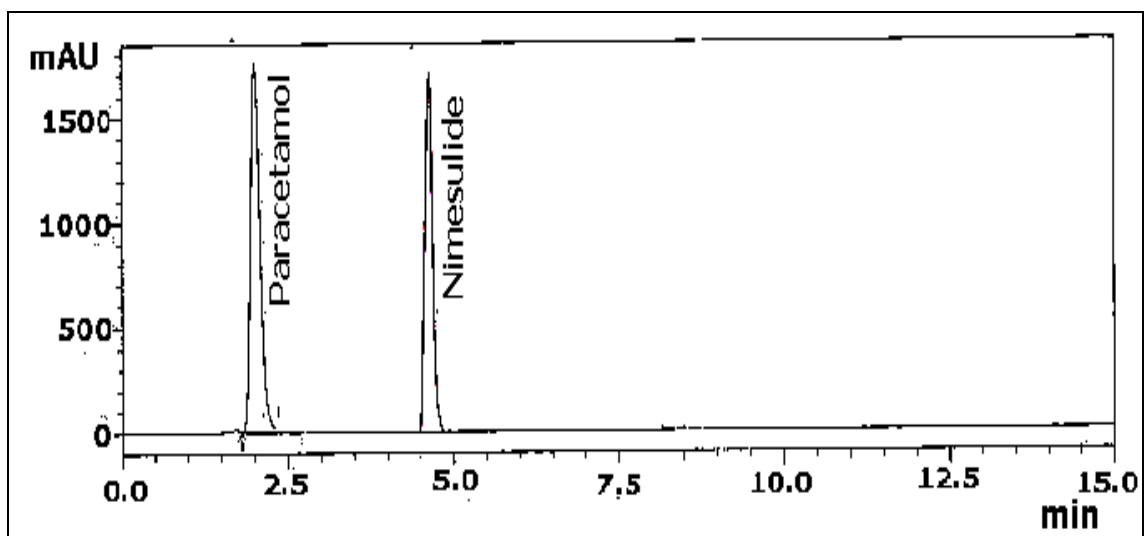


Figura 16. Cromatograma de la separación de paracetamol y nimesulida en tabletas de nimupain.

Método 5 (Dellis D, Giaginis C, et al) ³³

Se investigó el perfil de lipofilicidad y solubilidad de la nimesulida en un amplio rango de pH. Se revisó la lipofilicidad mediante experimentos de reparto directo en un sistema de octanol-agua utilizando el método de agitación de frasco, así como mediante CLAR de fase reversa utilizando metanol como modificador orgánico con o sin la adición de n-octanol. En el siguiente caso se consideró a los factores de retención $\log k_w$ extrapolados como índices de lipofilicidad. La presencia de n-octanol en la fase móvil comprobó ser un factor crucial para establecer un perfil $\log k_w/\text{pH}$ muy similar al perfil de $\log D/\text{pH}$ de la nimesulida. La solubilidad se determinó mediante el método de agitación de frasco utilizando soluciones amortiguadoras saturadas. Los perfiles de lipofilicidad y solubilidad-pH de la nimesulida mostraron desviaciones del comportamiento teórico esperado de acuerdo a la ecuación de Henderson-Haselbalch.

En la tabla 10 se presenta un resumen de las condiciones cromatográficas del método 5.

Tabla 10. Condiciones cromatográficas del Método 5.

Parámetro	Especificación
Columna:	BDS C-18 de 250 x 4.6 mm (DI) con Octadecilsilano de 5 μm
Fase móvil	Metanol/amortiguador de ácido 3-morfolinepropanosulfónico (MOPS) pH 7.4 (60:40) con o sin adición de n-octanol.
Detector	UV/Visible (celda de flujo de 8 μL) a 254 nm
Bomba	bomba GBC modelo LC1120
Inyector	Rehodyne modelo 7725i con loop de 25 μL
Volumen de inyección	20 μL
Tiempo de análisis	No se menciona
Software	WinChrom

El método anterior abarca diversos parámetros que se deben considerar en el desarrollo de una metodología analítica. Primero, toman como base el grupo sulfonamida de la nimesulida como ácido débil, el cual le otorga una lipofilicidad y solubilidad dependiente del pH. Segundo, durante el desarrollo del método se observó que la adición de n-octanol a la fase móvil reducía la retención del compuesto. Lo anterior lo atribuyen a que el n-octanol actúa como agente enmascarante de los grupos silanol libres, los cuales tienden a incrementar la retención de compuestos básicos principalmente. Al considerar la nimesulida como un ácido débil, y al adicionar el n-octanol a la fase móvil, la retención del compuesto se reduce al ocurrir un efecto de end capping sobre dichos grupos silanol, lo cual ayuda a optimizar los tiempos de análisis.

Se puede sugerir el uso de una columna comercial con end capping para evitar el uso de otro componente orgánico en la fase móvil y reducir la retención no específica si es que se desea analizar compuestos básicos.

Método 6 (Tubic B, Ivkovic B, et al) ³⁴

Se desarrolló un método por cromatografía de líquidos de alta resolución de fase reversa simple, rápido y reproducible para el análisis de nimesulida y sus impurezas en graneles y formas farmacéuticas. El método es adecuado para monitorear la estabilidad de la nimesulida debido a que se pudo observar la presencia de impurezas. La resolución para la nimesulida y la impureza D fue de 3.20, y para la impureza D y la C fue de 2.40, lo cual indica que los compuestos tuvieron una buena separación; la evaluación de los parámetros de linealidad, exactitud, precisión, selectividad, sensibilidad y robustez del método fue satisfactoria. El método desarrollado se aplicó exitosamente en el ensayo de nimesulida en diferentes formas farmacéuticas.

El tratamiento de la muestra consistió en el ensayo de diversas presentaciones de nimesulida (Tenaprost®, Ventor®, Nimulid®, Aulin® y Nimesulid®, todas con 100 mg del fármaco), se eligieron al azar 20 tabletas de cada una y se pulverizaron. Se pesó una cantidad equivalente a 25 mg de nimesulida del polvo y se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL, se disolvió en 15 mL de fase móvil en un baño ultrasónico y posteriormente se llevó a volumen y se filtró. Se tomó una alícuota de 1 mL y se aforó en un matraz volumétrico de 10 mL con el mismo disolvente. Cada solución se preparó antes de realizar el análisis y se inyectó 3 veces en el sistema cromatográfico.

En la tabla 11 se presenta un resumen de las condiciones cromatográficas del método 6.

Tabla 11. Condiciones cromatográficas Método 6.

Parámetro	Especificación
Columna	Agilent Zorbax Extend C ₁₈ (150 x 4.6 mm DI, 5 µm) a 40°C
Fase móvil	ACN/TEA/agua (45:0.5:54.5 v/v/v), pH de 5.2 (ácido fórmico)
Velocidad de flujo	1 mL/min (isocrático)
Detector	Detector UV-Vis 1100 a 265 nm

Tabla 11. Condiciones cromatográficas Método 6 (continuación).

Parámetro	Especificación
Bomba	Binaria 1100
Volumen de inyección	20 µL
Tiempo de análisis	10 min
Software	Chem Station.

En el método descrito se ajustaron diversos parámetros con el fin de obtener una separación adecuada en el monitoreo de impurezas de nimesulida. Se comenzó con una mayor proporción de ACN en la fase móvil (60%) pero se observó una pérdida de selectividad en los picos del producto terminado. Se redujo la proporción a 45%, se modificó el pH de 4.3 a 5.2 agregando TEA en la fase acuosa y se aumentó la temperatura de la columna de ambiental a 40°C, con lo que se observó una mejor resolución de los picos de nimesulida y sus impurezas D y C ($R = 3.2$ y 2.4 respectivamente). Lo anterior se debe a que un aumento en la temperatura asegura una mejor transferencia de masa y en muchas ocasiones mejora la eficiencia. Se agregó TEA para disminuir el efecto de retención no específica y mejorar la asimetría del pico. Al proponer el método se debe tomar en cuenta el uso de temperatura controlada en el sistema. En la figura 17 se presenta el cromatograma obtenido del método 6.

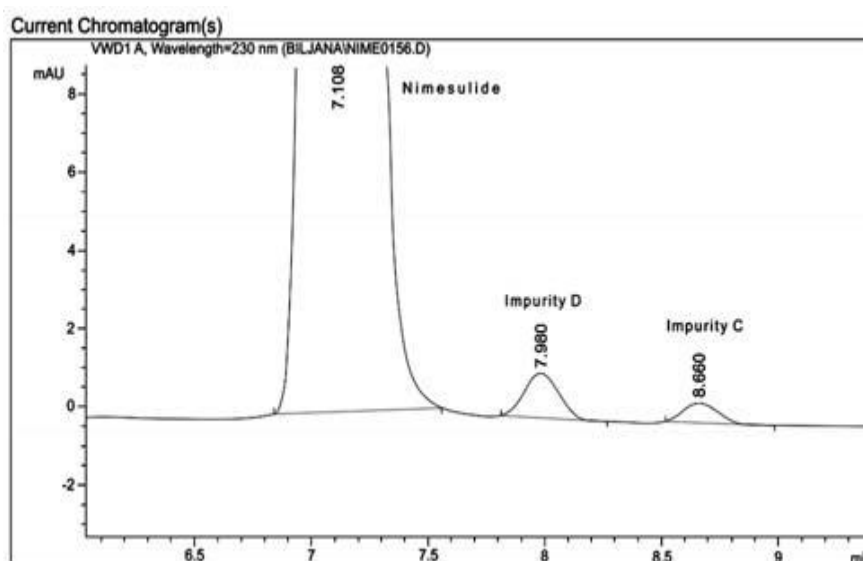


Figura 17. Cromatograma representativo obtenido a partir de las soluciones de trabajo de nimesulida y sus impurezas C y D.

Método 7 (Paraskevas D, Demetrius G, et al) ³⁵

El estudio reportó un ensayo por CLAR para el análisis de disolución de tabletas que contienen nimesulida (Lizepat® 100 mg/tab, Cosmopharm Ltd., Korinthos, Grecia). El análisis de muestras en alta proporción es la clave en el análisis farmacéutico moderno, especialmente durante el desarrollo de nuevos productos y validaciones de procesos de manufactura a escala industrial, por lo que el ensayo se validó en términos de selectividad contra potencial de impurezas del ingrediente activo, detección y límites de cuantificación, linealidad, exactitud y precisión intra/entre días. A continuación se reportan los parámetros cromatográficos y los resultados de la aplicación del método CLAR a la disolución de tabletas Lizepat control de estabildades aceleradas y de largo plazo.

En el tratamiento de la muestra, se preparó una solución stock estándar de 1000 mgL⁻¹ de nimesulida disolviendo en ACN una cantidad pesada con exactitud del analito. La solución se conservó en refrigeración y se protegió de la luz durante el estudio. Las soluciones de trabajo se prepararon diariamente mediante diluciones apropiadas del stock en medio de dilución, el cual consistía en amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7.4) con un 2.5% de polisorbato 80 (w/w). En la tabla 12 se presenta un resumen de las condiciones cromatográficas del método 7.

Tabla 12. Condiciones cromatográficas del Método 7.

Parámetro	Especificación
Columna:	Cromolith SpeedRod (monolítica) de 50mm x 4.6mm
Fase móvil	ACN/amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.0 (34:66)
Velocidad de flujo	4 mL/min
Detector	UV/Vis a 265 nm
Bomba	Cuaternaria (G1311A)
Volumen de inyección	20 µL
Tiempo de análisis	5 min (aproximadamente)
Software	Chem Station

El parámetro a destacar en el método descrito es el uso de una columna monolítica para CLAR-FR. De acuerdo con los autores, las columnas con material de empaque particulado de 3 a 5 μm (las más comunes) no se pueden manejar a velocidades de flujo mayores a 2 mL/min debido a la alta presión generada. Con el uso de la columna monolítica, la velocidad de flujo pudo ascender hasta 4 mL/min con una presión de 90 bar, con la cual, el tiempo de retención de la nimesulida fue de 60 seg con una resolución mayor a 2.0 con respecto a la impureza A.

La columna monolítica permite una mayor cantidad de platos teóricos en el sistema, pero aumenta el tiempo de equilibrio del mismo. Las columnas monolíticas son más frágiles ya que tienden a fracturarse ante altos impactos. Sin embargo, la ventaja que presentan dichas columnas es su alta porosidad y el control de la misma, lo cual se traduce en una menor presión en el sistema. En la figura 18 se presentan los cromatogramas obtenidos en las variaciones del método 7.

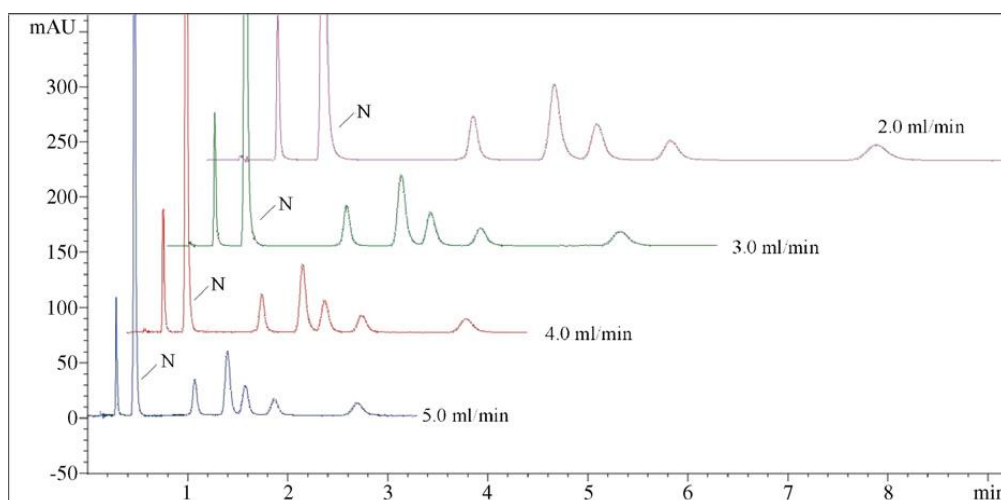


Figura 18. Efecto de la velocidad de flujo en la separación de nimesulida (N, 100 mgL^{-1}) de sus impurezas (A-F ca. 10 mgL^{-1} cada una).

Método 8 (Panusa A, Multari G, et al) ³⁶

Se desarrolló un método simple de CLAR con detección UV y espectrometría de ionización de masas de dispersión láser (EIM- DL) para la determinación de siete compuestos farmacéuticos en productos homeopáticos apócrifos: naproxeno, ketoprofeno, ibuprofeno, diclofenaco, piroxicam, nimesulida y paracetamol en modo de ionización negativa a excepción del paracetamol, el cual se detecto en modo de ionización positiva. Se utilizó ácido benzoico como estándar interno (EI). El método se aplicó exitosamente al análisis de productos homeopáticos como tinturas madre, soluciones, tabletas, granulados, cremas y supositorios. La linealidad se determinó con detección UV en un rango de 50 a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y un rango de 0.1 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para EIM-DL. Se obtuvieron buenos coeficientes de correlación en ambos detectores. Los rangos de límites de detección se encontraron entre 0.18 a 41.5 ng para UV y de 0.035 a 1.00 ng para EIM-DL.

En el tratamiento de las muestras se utilizó ácido benzoico como EI y se prepararon soluciones estándar stock de multicomponentes con metanol en una concentración de masa equivalente a 1 mg mL^{-1} .

En la tabla 13 se presenta un resumen de las condiciones cromatográficas utilizadas en el método 8.

Tabla 13. Condiciones cromatográficas del Método 8.

Parámetro	Especificación
Columna	Agilent Zorbax Eclipse XBD C-18 de 150 x 4.6 mm, 5 μm
Fase móvil	ACN/amortiguador de ácido acético 0.1%, pH 3.16. Elución por gradiente (A:B, v/v): 3 min 15:85 7 min 30:70 20 min 90:10

Tabla 13. Condiciones cromatográficas del Método 8 (continuación).

Parámetro	Especificación
Velocidad de flujo	1 mL/min
Estándar interno	Ácido benzóico
Detector	UV con arreglo de diodos a 245 nm EIM-DL en ionización negativa y positiva (paracetamol)
Bomba	Binaria
Inyector	Automuestreador con termostato
Volumen de inyección	5 μ L
Tiempo de análisis	30 min
Software	Software Agilent Chemstation Rev. A.08.04 (1008)

Cabe destacar que, de acuerdo al cromatograma de la figura 19, existe una pobre selectividad entre el ketoprofeno y el naproxeno bajo las condiciones del método descrito, lo cual seguramente se podría resolver si se agrega un tercer disolvente en la fase móvil (dioxano, THF o metanol).

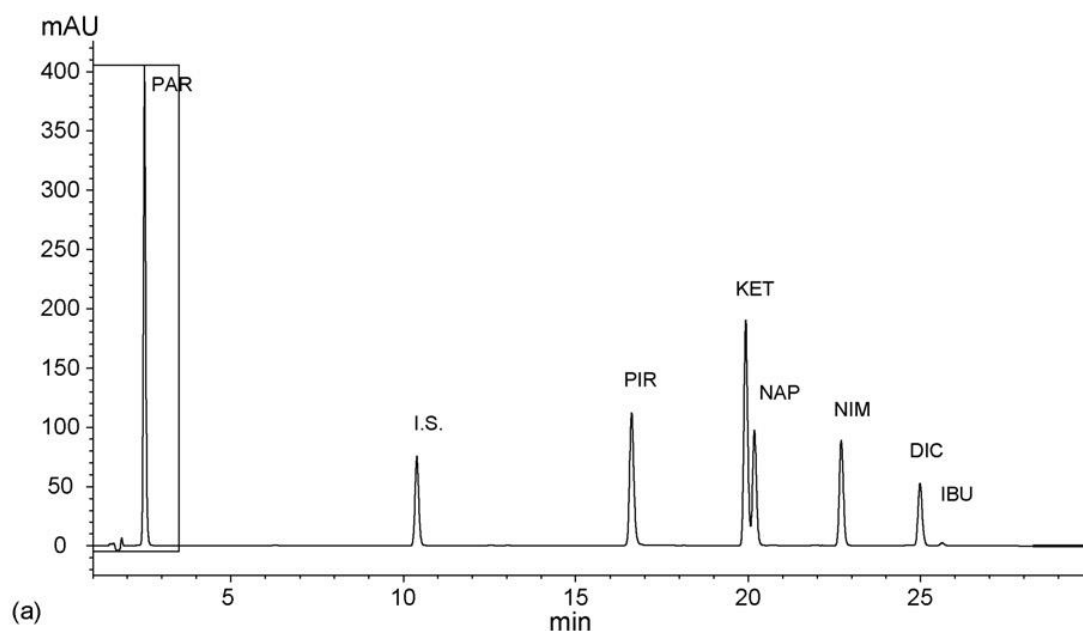


Figura 19. Cromatograma de muestra de crema adicionada con paracetamol (PAR), ácido benzóico (I.S.), piroxicam (PIR), ketoprofeno (KET), naproxeno (NAP), nimesulida (NIM), diclofenaco (DIC) e ibuprofeno (IBU).

Método 9 (Maltese A, Maugeri F, Bucolo C, et al) ³⁷

Se desarrolló un método para la rápida cuantificación de nimesulida en humor acuoso de conejo. Los análisis se realizaron mediante cromatografía de líquidos de alta resolución utilizando una columna C18. El tiempo de retención fue de 4.5 minutos utilizando un pre-tratamiento simple con acetonitrilo para deproteinizar las muestras en humor acuoso. El límite de cuantificación fue de 50 ng/mL. El recobro fue mayor al 90%. La relación entre el área de los picos y las concentraciones fue lineal en el rango de 0.05 y 2.5 µg/mL, con valores de r^2 por encima de 0.99. El ensayo brindó buena reproducibilidad y precisión y comprobó ser adecuado para estudios farmacocinéticos de nimesulida.

Para el tratamiento de la muestra se transfirió una alícuota de 100 µL de humor acuoso de conejo (extraído del compartimento anterior del ojo a través de la córnea), se colocó en un tubo Eppendorf y se agregaron 100 µL de ACN con el fin de precipitar proteínas. La muestra se agitó vigorosamente con un vortex durante 60 segundos y se centrifugó a 10,000 g durante 5 min. El sobrenadante se extrajo con una jeringa capilar, se filtró a través de un acrodisco de 4mm con membrana de nylon de 0.2 µm (Altech, Italia) y se inyectó en el sistema.

En la tabla 14 se presenta un resumen de las condiciones cromatográficas del método 9.

Tabla 14. Condiciones cromatográficas del Método 9.

Parámetro	Especificación
Columna	Ultracarb ODS (30) de 150 x 4.6 mm, 5 µm
Fase móvil	ACN/amortiguador pH 3.2 con ácido ortofosfórico y 1.0% de Trietilamina (TEA) (60:40)
Velocidad de flujo	1 mL/min
Detector	UV con arreglo de diodos a 300 nm
Bomba	Binaria
Volumen de inyección	20 µl
Tiempo de análisis	6 min
Software	HP Chem Station

Cabe señalar que en el método descrito se utiliza TEA para reducir la retención no específica de los silanoles residuales con el fin de evitar el coleo de los picos y de esta forma optimizar la reproducibilidad del área.

En la figura 20, se muestra el cromatograma obtenido en el método 9.

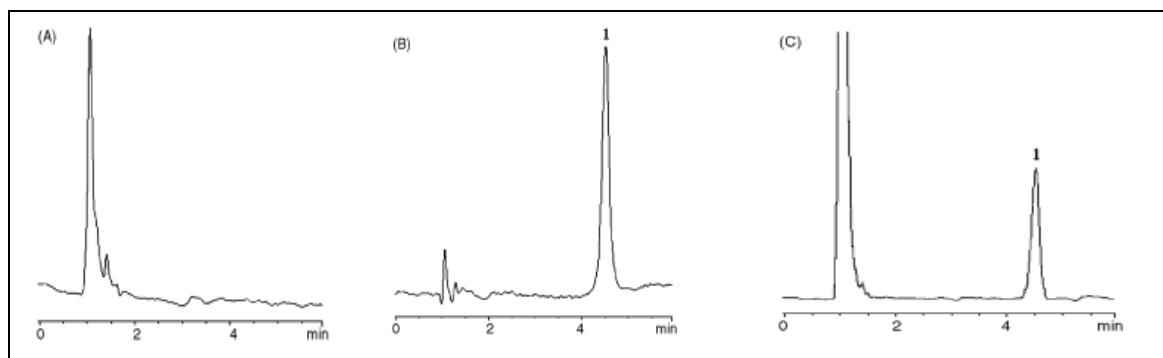


Figura 20. Cromatogramas representativos de (A) blanco de humor acuoso (B) estándar de nimesulida (1) y (C) muestra adicionada con nimesulida de humor acuoso (1)

Método 10 (Kovaríková P, Mokry M, et al)³⁸

Se desarrollaron métodos por CLAR y de cromatografía en capa fina (CCF) para el monitoreo de la estabilidad fotoquímica de la nimesulida. Se expuso una solución de la sal sódica de nimesulida a una fuente de luz a 254 nm. Se observó la presencia de productos de degradación (2-fenoxi-4-nitroanilina y ácido metasulfónico). El área de respuesta del estándar fue lineal con respecto a la concentración de nimesulida en un rango de 150 a 500 µg/mL. Como validación del método se realizó la exactitud y precisión día a día del sistema obteniendo un límite de detección para la 2-fenoxi-4-nitroanilina de 0.12 µg/mL.

Para el tratamiento de la muestra, se expuso una solución de sal sódica de nimesulida (3 mg/mL) a luz continua con longitudes de onda de 254 nm (intensidad de radiación de 1200 µW/cm²) durante 80 horas mediante una lámpara UV colocada a 40 cm de la muestra. Después de la exposición se llevó a sequedad la muestra y se disolvió en metanol para su análisis por CLAR. De manera simultánea se preparó una solución la cual se almacenó en refrigeración durante 80 horas con el fin de comparar la degradación con y sin exposición a luz UV. Se preparó una solución stock de nimesulida con una concentración de 1 mg/mL en metanol así como una solución stock de estándar interno de propilparabeno con 1 mg/mL.

En la tabla 16 se presenta un resumen de las condiciones cromatográficas del método 10.

Tabla 16. Condiciones cromatográficas Método 10.

Parámetro	Especificación
Columna	Separon SGX C ₁₈ de 250 x 4.6 (DI) mm y 7 µm
Fase móvil	ACN/fosfato de amonio 0.02 M, pH 7.9 (35:65)
Velocidad de flujo	0.6 mL/min
Estándar interno	Propilparabeno
Detector	LCD 2084 a 245 nm
Bomba	LCD 2084

Tabla 16. Condiciones cromatográficas Método 10 (continuación).

Parámetro	Especificación
Volumen de inyección	20 µl
Tiempo de análisis	25 min
Software	CW, versión 1.7

En el método descrito se utiliza una columna larga para una mejor separación, y para evitar que se retenga mucho en el sistema se trabajó a un pH de 7.9 en el cual la nimesulida se encuentra ionizada. Cabe señalar que el uso de pH 7.9 no es común en columnas con soporte de sílice, a menos que el empaque derivatizado sea de origen polimérico, el cual puede soportar un mayor rango de pH (de 2 a 10). En la figura 21, se presenta el cromatograma obtenido en el cual se observa una adecuada resolución, selectividad y eficiencia del método cromatográfico.

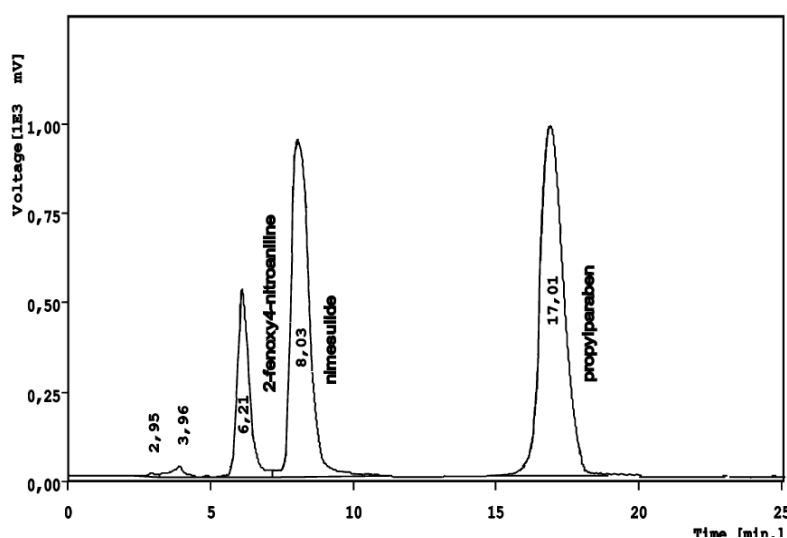


Figura 21. Cromatograma de la degradación de la nimesulida después de 80 horas de exposición a radiación UV.

Método 11 (P Ptacek, J Macek, et al) ³⁹

Se presentó un método de cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación de nimesulida en plasma humano. El método se basó en la precipitación de las proteínas con metanol y la cromatografía de fase reversa con detección espectrofotométrica a 404 nm. Se utilizaron 250 µL de plasma para la preparación de la muestra y no se requirió agregar estándar interno. El límite de cuantificación es de 80 ng/mL y la recta de calibración es lineal hasta 10000 ng/mL. Con el método propuesto, se pueden analizar más de 20 muestras en el lapso de 1 hora. La precisión del mismo día y de días diferentes expresada por la desviación estándar relativa fue menor a 5% y la imprecisión no excedió el 8%. El ensayo se utilizó para estudios farmacocinéticos.

Para el tratamiento de la muestra se transfirieron 250 µL de plasma humano en un tubo de ensayo y se agregó 1 mL de metanol. Se agitó el tubo durante 30 segundos a 2000 rpm y posteriormente se centrifugó a 3500 rpm. Se transfirió una alícuota de 500 µL del sobrenadante a un vial de automuestreador y se agregaron 500 µL de amortiguador (15 mM de KH₂PO₄, pH ajustado a 7.3 utilizando KOH 1 M). Se agitó brevemente el vial y se inyectaron 50 µL en el cromatógrafo de líquidos.

En la tabla 17 se presenta un resumen de las condiciones cromatográficas del método 11.

Tabla 17: Condiciones cromatográficas del Método 11.

Parámetro	Especificación
Columna	Nucleosil 120-5 C ₁₈ de 50 x 4 mm DI
Fase móvil	ACN/metanol/amortiguador de fosfato de potasio dihidrogenado pH 7.3 (30:5:65)
Velocidad de flujo	1 mL/min
Detector	UV2000 a 404 nm
Bomba	Constametric 4100
Volumen de inyección	50 µl

Tabla 17. Condiciones cromatográficas del Método 11 (continuación).

Parámetro	Especificación
Tiempo de análisis	2 min
Software	PC1000 datastation, versión 2.5

El método descrito se basa en la precipitación de proteínas mediante el uso de metanol en lugar de soluciones de pH ácido. La longitud de la columna permite tiempos de retención muy cortos (2 minutos para la nimesulida) lo cual es conveniente cuando se trata con muestras biológicas o fácilmente degradables. Cabe mencionar que el tiempo de análisis es de suma importancia cuando se trata de separar compuestos de degradación (en este caso metabolitos) ya que se tiene que dar un lapso de tiempo mayor para permitir la detección de los compuestos así como una mejor resolución.

Por otro lado, en el cromatograma obtenido (figura 22) destaca que a pesar de existir un gran frente de la muestra, la cuantificación de nimesulida no se ve afectada ya que se resuelve satisfactoriamente sin asimetría importante que afecte la reproducibilidad del área.

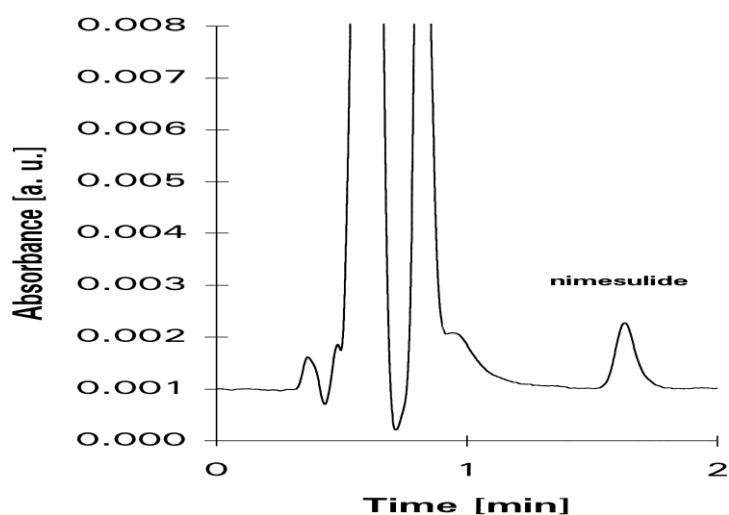


Figura 22. Cromatograma de una muestra de plasma de un voluntario 12 horas después de la administración de 100 mg de nimesulida.

En la tabla 18, se presenta una comparación de los métodos cromatográficos analizados y se intenta establecer las ventajas y desventajas de cada uno de ellos.

Tabla 18. Comparación de las condiciones cromatográficas de las metodologías analíticas.

MÉTODO	MATRIZ	ESTANDAR INTERNO	CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS					
			COLUMNA	FASE MÓVIL	VEL. FLUJO mL/min	λ (nm)	VOL. INYECCIÓN (μ L)	TIEMPO DE ANÁLISIS (min)
1	Materia prima y formas farmacéuticas.	-	Octadecilsilano (125 x 4.0 mm; 5 μ m)	ACN/agua (solución Acuosa de 1.15 g/L de fosfato de amonio dihidrogenado) ajustado a pH de 7.0 con amoniaco (35:65)	1.3	230	20	No se menciona
2	Tabletas	-	Supelcosil LC-8 (250 x 4.6 mm)	Metanol/agua (60:40)	1.0	276	20	8
3	Jarabe	Fenacetina (FAC)	Discovery C ₁₈ (150 x 4.6 mm, 5 μ m)	Metanol/amortiguador de fosfato de amonio dibásico 0.01 M, pH 4.0 (60:40).	1.0	276	20	18
4	Tabletas	-	Inetrsil C ₁₈ (150 x 4.6 mm, 5 μ m)	ACN/Metanol/amortiguador de ácido Ortofosfórico pH 4.5 (40:40:20)	1.0	254	20	15
5	Materia Prima	-	BDS C-18 (250 x 4.6 mm, 5 μ m)	Metanol/amortiguador de ácido 3-morfolinepropanosulfónico (MOPS) pH 7.4 (60:40).	No se menciona	254	20	No se menciona
6	Tabletas	-	Agilent Zorbax Extend C ₁₈ (150 x 4.6 mm, 5 μ m)	ACN/TEA/agua (45:0.5:54.5 v/v/v), pH de 5.2 (ácido fórmico)	1.0	265	20	No se menciona

Tabla 18. Comparación de las condiciones cromatográficas de las metodologías analíticas (continuación).

MÉTODO	MATRIZ	ESTANDAR INTERNO	CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS					
			COLUMNA	FASE MÓVIL	VEL. FLUJO mL/min	λ (nm)	VOL. INYECCIÓN (μ L)	TIEMPO DE ANÁLISIS (min)
7	Tabletas	-	Cromolith SpeedRod monolítica (50mm x 4.6mm)	ACN/amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.0; (34:66)	4	265	20	No se menciona
8	Productos homeopáticos	Ácido benzóico	Agilent Zorbax Eclipse XBD C-18 (150 x 4.6mm, 5 μ m)	ACN/amortiguador de ácido acético 0.1%, pH 3.16. Elución por gradiente: 3 min 15:85 (A:B, v/v) 7 min 30:70 20 min 90:10	1	245	5	30
9	Humor acuoso de conejo		Ultracarb ODS (30) (150 x 4.6 mm, 5 μ m)	ACN/amortiguador con 1.0% de Trietilamina (TEA) pH 3.2 con ácido ortofosfórico (60:40)	1	300	20	6
10	Solución de sal sódica	Propil parabeno	Separon SGX C ₁₈ (250 x 4.6 mm, 7 μ m)	ACN/amortiguador de fosfato de amonio 0.02 M, pH 7.9 (35:65)	0.6	245	20	25
11	Plasma Humano	-	Nucleosil 120-5 C ₁₈ (50 x 4 mm)	ACN/metanol/amortiguador de fosfato de potasio dihidrogenado pH 7.3 (30:5:65)	1	404	50	2

Uno de los puntos más importantes en el desarrollo un método analítico en CLAR-FR es el comportamiento de la molécula por cuantificar en soluciones acuosas a diferente pH, por lo cual, es necesario construir un diagrama de distribución de especies para la nimesulida. Si se toma en cuenta que el pKa reportado de la nimesulida es de 6.5,³³ y se toma como base la ecuación de Henderson-Hasselbalch, se obtienen los porcentajes de ionización presentados en la tabla 19 y la figura 23.

Tabla 19. Porcentaje de disociación de la nimesulida a diferente pH.

pH	% Disociado	% No Disociado
1.5	0.00	100.00
2.5	0.01	99.99
3.5	0.10	99.90
4.5	0.99	99.01
5.5	9.09	90.91
6.5	50.00	50.00
7.5	90.91	9.09
8.5	99.01	0.99
9.5	99.90	0.10
10.5	99.99	0.01
11.5	100.00	0.00
12.5	100.00	0.00
13.5	100.00	0.00

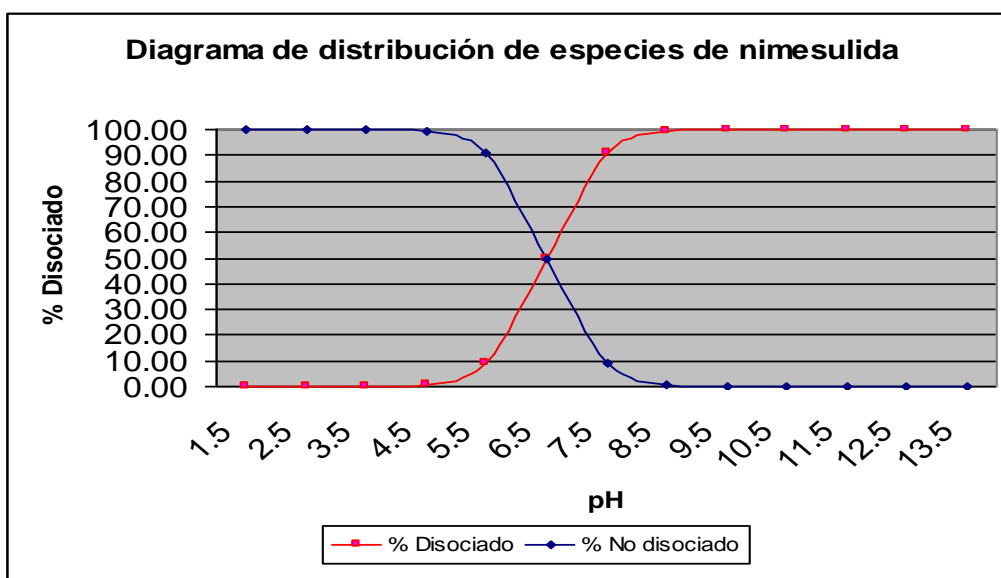


Figura 23. Diagrama de distribución de especies de la nimesulida.

De acuerdo al diagrama de distribución de especies, el pH ideal para el análisis de la nimesulida es 8.5 ya que se encuentra disociado en un 99.0%, lo cual facilita su elución en la CLAR-FR. Vale la pena mencionar que las columnas cromatográficas utilizadas en este tipo de análisis soportan hasta un pH 7.5, por lo tanto, el pH del método propuesto tendrá que mantenerse debajo de dicho valor, el cual deberá ser suficiente para ionizar la nimesulida y a su vez proteger la columna.

Otro parámetro a considerar es la solubilidad de la nimesulida en solución acuosa y disolventes orgánicos polares. Si se desea utilizar menores cantidades de disolvente orgánico, es necesario ionizar la nimesulida con la precaución de utilizar columnas de fase reversa con soporte de sílice de tipo polimérico, las cuales soportan pH entre 2 a 10; de esta forma la cantidad de disolvente orgánico se reduciría a una proporción similar a la del Método 10.

Por otro lado, con respecto a la columna cromatográfica, se sugiere utilizar una columna corta para obtener un menor tiempo de análisis con una velocidad de flujo adecuado para que la presión del sistema no rebase los 3500 psi, lo cual compromete la eficiencia de la separación. En cuanto al empaque se sugiere un C₁₈ de tipo polimérico debido a su gran versatilidad.

La detección no presenta mucho inconveniente, ya que es posible detectar y cuantificar a la nimesulida en el rango de UV; sería conveniente realizar un barrido de longitud de onda a un pH determinado para obtener una máxima de absorbancia óptima.

La fase móvil podría ser tan sencilla como en el método 2 (metanol/agua) o acetonitrilo/amortiguador de fosfatos con pH menor a 7.5 (para columnas de fase reversa) o pH 8 (para columnas poliméricas). La velocidad de flujo se daría en función de las dimensiones de la columna y de la presión registrada en el sistema cromatográfico, pero de forma convencional se sugiere 1.0 mL/min.

El volumen de inyección se da en función de la eficiencia del sistema, pero podría ensayarse de acuerdo a la relación

$$V_{\text{inyección}} = 0.2 \left(\frac{V_r}{\sqrt{N}} \right)$$

donde V_r es el volumen de retención y \sqrt{N} es la eficiencia del sistema. Si el sistema presenta una gran eficiencia, podrían inyectarse volúmenes pequeños (entre 5 y 20 μL).

En caso de que el método vaya a ser utilizado para determinar nimesulida en muestras biológicas, es necesaria la adición de un estándar interno para compensar las pérdidas ocasionadas por el tratamiento de la muestra. Se sugiere fenacetina debido al parecido estructural del compuesto con respecto a la nimesulida.

Otro punto importante es la adecuabilidad del sistema, la cual garantiza que las partes electrónicas, las operaciones analíticas y la muestra, constituyen un sistema analítico estable, el cual puede someterse a una prueba general del funcionamiento del sistema a partir de datos específicos de inyecciones repetidas. Los parámetros del método propuesto deberán cumplir con los criterios de adecuabilidad descritos en la tabla 20.

Tabla 20. Parámetros de adecuabilidad del sistema.

Parámetro	Criterio de aceptación
C.V.	$\leq 2\%$
R	≥ 1.5
N	≥ 2000
T	≤ 1.5
k'	≥ 2 (dependiendo de la limpieza del cromatograma)

La ventaja que se obtiene con la propuesta diseñada es que el método analítico tentativo puede ser utilizado para identificación, ensayo de nimesulida y la determinación de sus productos de degradación como materia prima, producto terminado o muestras biológicas bajo un mismo sistema, lo cual proporciona

una mayor aplicación con adecuaciones mínimas dependiendo de la matriz de la muestra.

Los parámetros del método propuesto se ingresaron a un programa simulador de análisis cromatográfico (ACD/LC Simulator 2012, ACD/Labs) en donde se ensayaron distintas proporciones de fase móvil de de amortiguador pH 7.5/fase orgánica (acetonitrilo o metanol). En la Figura 24 se observa el cromatograma teórico obtenido con la proporción 80:20 de fase acuosa (Solvente A)/fase orgánica (solvente B) con el que se obtienen resultados favorables para el análisis.

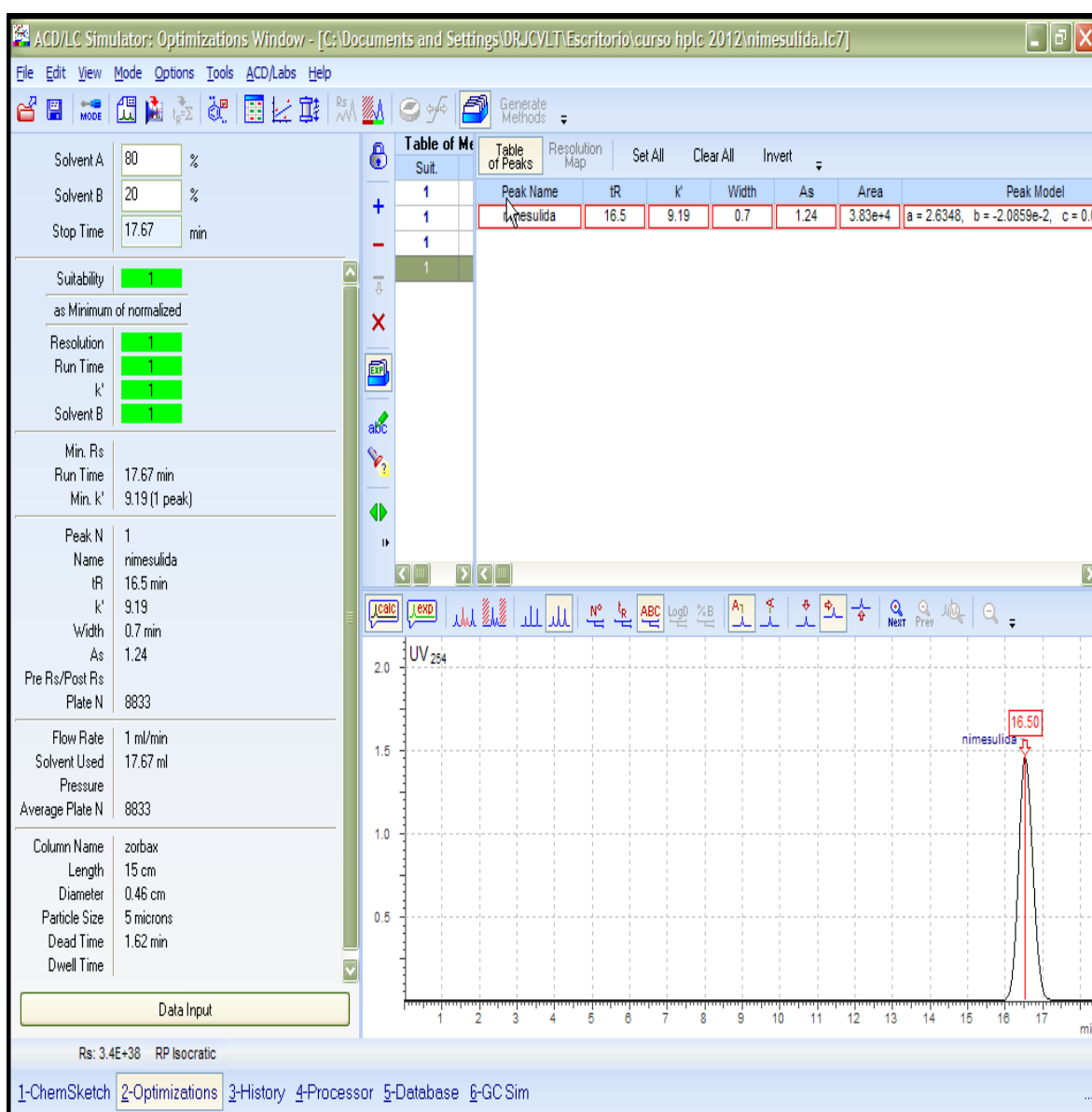


Figura 24. Simulación del método analítico propuesto.

Se simularon tres diferentes proporciones de fase móvil (70:30, 60:40 y 40:60 fase acuosa/fase orgánica) bajo las mismas condiciones cromatográficas (columna, velocidad de flujo, volumen de inyección) para determinar el comportamiento de la nimesulida en el sistema propuesto. En la Figura 25 se observa la relación lineal entre el método experimental y el calculado, obteniendo datos muy favorables de coeficiente de correlación ($R= 0.9923$) y desviación estándar ($StD= 0.4884$)

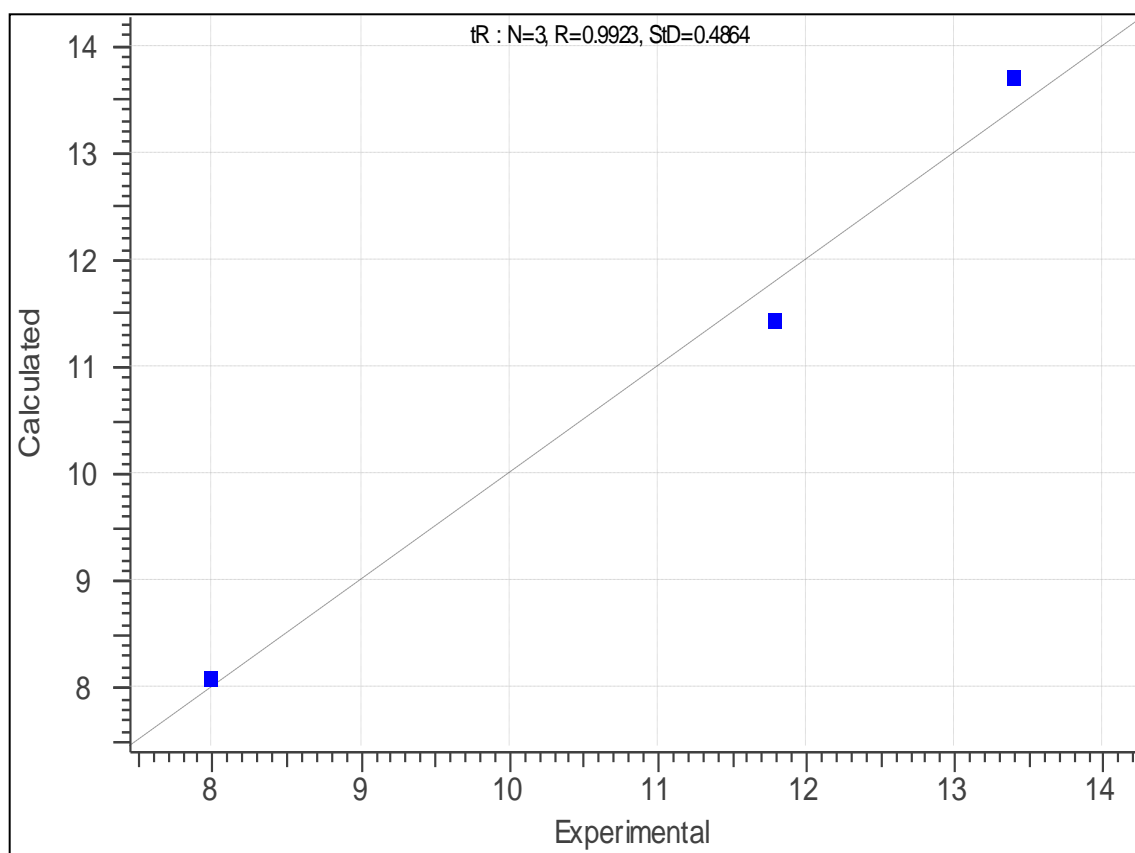


Figura 25. Linealidad de la simulación del método analítico propuesto.

Por último, el modelo matemático obtenido en la simulación es el siguiente:

$$\ln k' = a + bX + cX^2$$

En la Figura 26 se observa una correspondencia lineal al momento de graficar $\ln k'$ contra el porcentaje de solvente B (fase orgánica) contenido en la fase móvil. Se puede apreciar que el factor k' aumenta ($\ln k'$ disminuye) al incrementar la proporción de disolvente orgánico en la fase móvil. La gran utilidad del modelo matemático obtenido es que facilita la formulación de la fase móvil y evita ensayos innecesarios al momento de implementar el método propuesto.

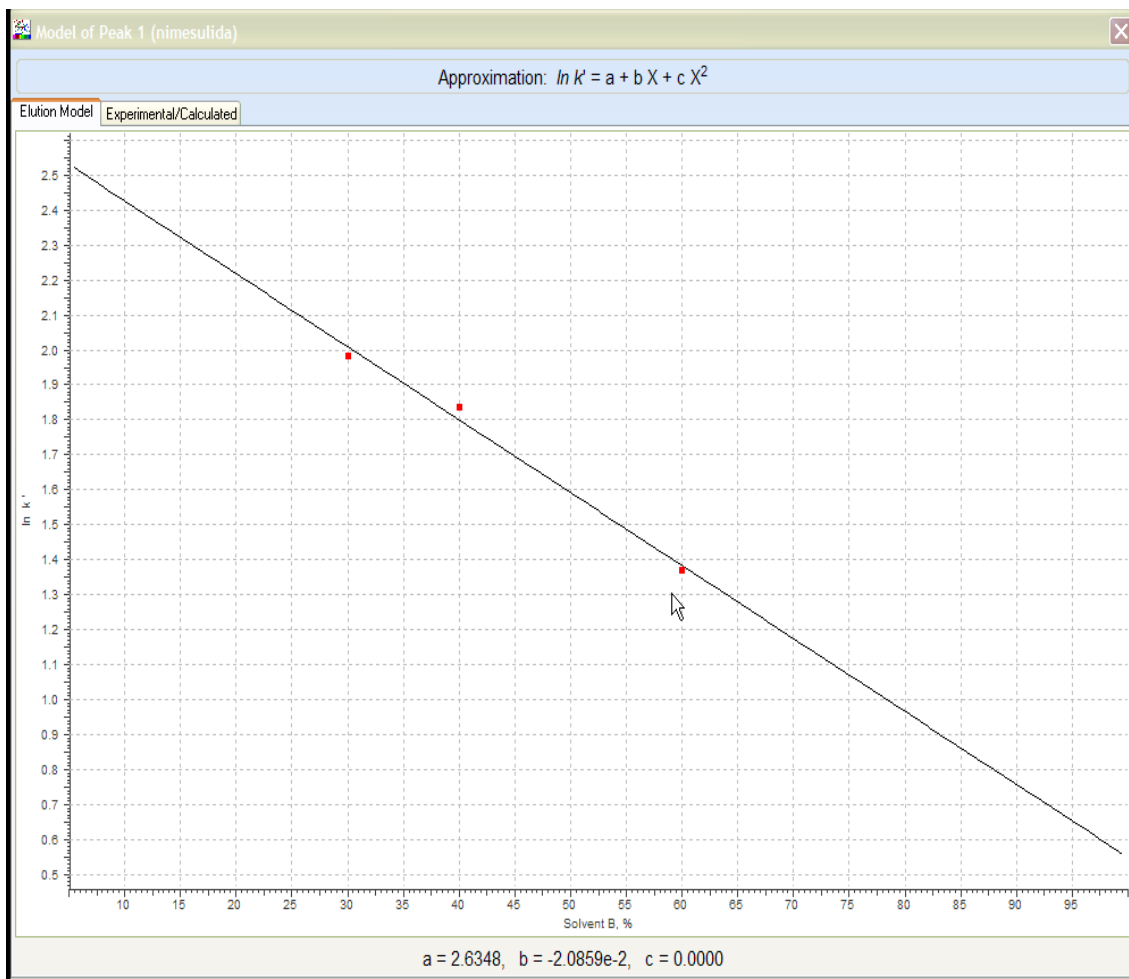


Figura 26. Modelo matemático obtenido en la simulación del método propuesto.

9 CONCLUSIONES

De acuerdo a las metodologías analíticas descritas, las condiciones cromatográficas para el análisis de nimesulida por CLAR-FR son las siguientes: la columna cromatográfica debe tener empaque C₁₈ con dimensiones tentativas de 150 mm x 4.6 mm DI, el tamaño de partícula del empaque puede variar entre los 3 y 10 µm, aunque se recomienda el de 5 µm con end capping y forma esférica; la fase móvil debe contener acetonitrilo o metanol como modificadores orgánicos y una solución amortiguadora de fosfato de sodio con pH de 7.5; las proporciones óptimas así como el volumen de inyección de la muestra se deben determinar durante la implementación del método. La longitud de onda se debe determinar a partir de un barrido espectrofotométrico del compuesto, pero se estima que estará dentro del rango de los 230 a los 300 nm; la velocidad de flujo debe ser de 1.0 mL/min sin gradiente y controlada a temperatura ambiente.

Como precauciones se sugiere disolver las muestras y estándares en acetonitrilo y diluirlas en la mezcla de fase móvil final, sonicar antes de llevar a volumen y colocar en viales con septa autosellable para evitar pérdidas de disolvente. También se sugiere filtrar la fase móvil a través de una membrana de 0.45 µm de tamaño de poro, acondicionar la columna hasta observar una línea base estable y almacenarla con fase móvil para evitar su deterioro.

Todos los reactivos, estándares y muestras utilizados durante la implementación del método deben encontrarse dentro de su fecha de caducidad para evitar señales de interferencia

En la tabla 21 se presenta un resumen de las condiciones cromatográficas propuestas.

Tabla 21. Condiciones cromatográficas del método propuesto para el análisis de nimesulida y sus productos de degradación.

Parámetro	Criterio de aceptación
Columna	C ₁₈ polimérica de 150 x 4.6 mm (DI) con tamaño de partícula de 5µm
Velocidad de flujo	1 mL/min
Fase móvil	Fase orgánica/Amortiguador de Fosfatos en proporción teórica inicial de 60:40.
Amortiguador	Fosfatos 0.01M, pH ajustado a 7.5
Fase Orgánica	Acetonitrilo o metanol (se puede utilizar una mezcla de ambos en caso de tener problemas de selectividad)
Volumen de inyección	5 a 20 µL
Detector	UV-Vis (230 a 300 nm)

10 BIBLIOGRAFÍA

1. SSA. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 10ª ed. México: Secretaría de Salud; 2011.
2. Scott R. Liquid chromatography for the analyst. New Cork: Marcel Dekker Inc.; 1994.
3. Scott R. Principles and practice of chromatography. Amsterdam: Elsevier Publishing Co.; 2003.
4. Skoog D, Nieman T. Principios de análisis instrumental. 5ª ed. Madrid: McGraw-Hill; 2001.
5. Olguín L, Rodríguez H. Cromatografía de gases. México: Instituto de Biotecnología, UNAM; 2004.
6. http://www.equiposylaboratorio.com/sitio/contenidos_mo.php?it=1342 Consultado el 25 de mayo, 2013.
7. <http://bpnalimentos.blogspot.mx/2010/08/fluidos-supercriticos-en-la-industria.html>. Consultado el 25 de mayo de 2013.
8. Velasco R, Villada H. Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria. Colombia: Universidad del Cauca, Departamento de Agroindustria, Facultad de Ciencias Agropecuarias; 2007.
9. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66322000000300008 Consultado el 25 de mayo, 2013.
10. European Directorate for the Quality of Medicines. European Pharmacopoeia. 5ª ed. Nördlingen: EDQM Publications; 2005.
11. http://www.rabfis15.uco.es/labquimica/tutorial/marco_inferior.htm Consultado el 25 de mayo, 2013.
12. Hanai T. HPLC: a practical guide. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 1999.
13. Braithwaite A, Smith F. Chromatographic methods. 5th ed. Norwell: Kluwer Academic Publishers; 1999.
14. Scott R. Chromatographic detectors design, function, and operation. New York: Marcell Dekker, Chromatographic series Vol. 73; 1996.
15. http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/apquim-an-instr-14/skoog/28.html. Consultado el 25 de mayo de 2013.

16. Ohannesian L, Streeter A. Handbook of pharmaceutical analysis. New York: Marcel Dekker; 2002.
17. <http://elchem.kaist.ac.kr/jhkwak/AnalChem/09/04/gif2.htm>. Consultado el 25 de mayo de 2013.
18. Meyer V. Practical high performance liquid chromatography. 4ª ed. New York: John Wiley and Sons; 2006.
19. <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3141/ivm04de14.pdf;jsessionid=ACB85A847A510C21351257E79300A305.tdx2?sequence=4> Consultado el 25 de mayo de 2013.
20. <http://submission.jbcs.sbg.org.br/> Consultado el 25 de mayo, 2013.
21. http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/HCIC/TOSOH_HIC.pdf Consultado el 25 de mayo, 2013.
22. http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/life-science/proteomics-and-protein/proteomics/protein-chromatography.Par.0001.File.tmp/chromatography_affinity.pdf Consultado el 25 de mayo, 2013.
23. Cazes J. Encyclopedia of chromatography. 3ª ed. New York: CRC Press; 2010.
24. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 10ª ed. México: McGrawHill; 2003.
25. Satarek M, Krzek J. A review of analytical techniques for determination of oxicams, nimesulida and nabumetone. Polonia: Talanta No. 77; 2008.
26. https://www.victory-enterprises.com/prod_Analgesicos.aspx Consultado el 25 de mayo, 2013.
27. Florey K. Analytical profiles of drug substances. New York: Academic press Inc; 2001.
28. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/073ssa105.html> Consultado el 25 de mayo, 2013.
29. <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html> Consultado el 25 de mayo, 2013.

30. Manmode R, Dhamankar A. Stability indicating HPLC method for simultaneous determination of methocarbamol and nimesulide from tablets matrix. *Der chemical sinica* No. 2, vol 4; 2011.
31. Mokřý M, Klimes J, Pechova J. HPLC analysis of a syrup containing nimesulide and its hydrolytic degradation products. *Chemical Papers* 64, vol. 3, 2010. p 405-408.
32. Prasanna R.B. Simultaneous RP-HPLC determination of nimesulide and paracetamol in tablets. *International Journal of PharmTech Research* vol.1, No.3; July-Sept 2009. p 514-516.
33. Dellis D, Giaginis C. Physicochemical profile of Nimesulide exploring the interplay of lipophilicity, solubility and ionization. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 44; 2007. p 57-62.
34. Tubic B, Ivkovic B. Simultaneous determination of nimesulide and its impurities in pharmaceutical formulation by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Acta Chim.* 54; 2007.
35. Paraskevas D, Demetrius G. Validated high throughput HPLC assay for nimesulide using a short monolithic column. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 43; 2007. p 1483-1487.
36. Panusa A, Multari G. High-performance liquid chromatography analysis of anti inflammatory pharmaceuticals with ultraviolet and electrospray-mass spectrophotometry detection in suspected counterfeit homeopathic medicinal products. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 43; 2007. p 1221-1227.
37. Maltese A, Maugeri F, Bucolo C. Rapid determination of Nimesulide in rabbit aqueous humor by liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 804; 2004.
38. Kováříková P, Mokřý M. Photochemical stability of nimesulide. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 31; 2003. p 827-832.
39. P Ptacek, J Macek. Rapid and simple high-performance liquid chromatographic determination of nimesulide in human plasma. *Journal of Chromatography B* 758; 2001. p 183-188.

40. Bennett A, Villa G. Nimesulide: an NSAID that preferentially inhibits COX-2, and has various unique pharmacological activities. London: Ashley Publications Ltd; 2000.
41. Harry G. Analytical profiles of drug substances and excipients, Vol 20. New York: Academic press 1994.
42. Adamovics J. Chromatographic analysis of pharmaceuticals. New York: Marcel Dekker; 1990.
43. Springer V. Modern Advances in Chromatography. Berlin: Springer- Verlag; 2002.
44. Snyder L. Practical HPLC method development. 2^a ed. Berlin: Springer- Verlag; 2002.
45. Kitson F. Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide. San Diego: Academic press 1996.