

# **CAPITULO 3**

## **CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)**

*Pablo Quiroga*

### **Introducción**

Las técnicas de separación cromatográficas, son métodos de separación de múltiples etapas en los que los componentes de una muestra se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra móvil.

La cromatografía en capa fina, es una de las técnicas más ampliamente utilizadas para la separación, identificación y determinación de pureza de drogas en su estado puro, o formando parte de una especialidad medicinal, drogas vegetales, fitoterápicos y/o muestras biológicas. Es una técnica analítica de elección por su simplicidad, confiabilidad, bajo costo y versatilidad en la detección de sustancias, a través del uso de diversos procedimientos de localización.

La cromatografía en capa fina (TLC), es una forma de cromatografía de adsorción en la cual la fase móvil se mueve por capilaridad a través de la fase estacionaria (adsorbente) aplicada como una capa fina y uniforme sobre un soporte inerte (vidrio, plástico, lámina de aluminio). La TLC puede ser considerada como una cromatografía de lecho abierto, y el mecanismo de separación se basa generalmente en un proceso de adsorción, sin embargo, es factible que ocurra un proceso de partición o a una combinación de ambos efectos, dependiendo del tipo particular de adsorbente, su preparación y el uso con diferentes fases móviles. Si por ejemplo la fase móvil contiene agua, metanol, u otro solvente muy polar, este líquido puede ser adsorbido desde la fase móvil que está avanzando, convirtiendo así el sistema de adsorción en un sistema cromatográfico de partición.

Cuando una mezcla de drogas se siembra sobre la placa y se desarrolla el cromatograma, cada sustancia correrá distancias diferentes a través de la placa dependiendo de afinidad por cada una de las fases (determinada por su

polaridad), sus valores de pKa, su capacidad de formar uniones de hidrógeno, etc.

## Parámetros básicos en Cromatografía en capa fina - $R_f$ y $R_x$

Los parámetros cromatográficos utilizados en TLC son  $R_f$  (Relación de Frente) y  $R_x$ .  $R_f$  es la relación entre la distancia recorrida por la sustancia y la distancia recorrida por el frente de la fase móvil, ambas medidas desde el punto de siembra (aproximadamente a 2 cm. del extremo inferior de la placa) al centro de la mancha si esta es redonda o al centro del área de más intensidad si la mancha tiene cola.  $R_x$  se calcula como el cociente entre la distancia recorrida por la sustancia y la distancia recorrida por la sustancia de referencia eluida bajo condiciones idénticas, ambas distancias medidas de la misma manera que las distancias para calcular el  $R_f$ .

Los valores de  $R_f$  pueden estar comprendidos entre 0 y 1, mientras que los valores de  $R_x$  pueden ser mayores que 1.

### **$R_f$ varía con las condiciones experimentales. Los factores que afectan la reproducibilidad de $R_f$ son:**

*Fase estacionaria:* calidad del adsorbente, espesor de la capa, activación de la placa, distribución y tamaño de las partículas.

*Fase móvil:* calidad y pureza de los solventes. Debe prepararse para cada corrida debido a que los solventes pueden ser volátiles o higroscópicos.

*Cámara de desarrollo:* saturación de la misma (mínimo 30 minutos antes de la corrida).

*Temperatura:* la cámara de desarrollo no debe colocarse cerca de fuentes de calor, ni luz solar directa, ya que un aumento de temperatura aumenta la volatilidad de solventes, y  $R_f$  decrece ligeramente

*Cantidad de siembra:* aumentar la cantidad de masa sembrada frecuentemente produce un incremento de los valores de  $R_f$  especialmente por efecto de la cola de las manchas.

Para mejorar la reproducibilidad del Rf, es necesario cromatografiar en la misma placa la muestra problema y la sustancia de referencia.

## Aplicaciones de la TLC

En el Análisis Farmacéutico, se utiliza habitualmente para *identificación* de principios activos y determinación de *pureza cromatográfica* de los mismos. Bajo condiciones controladas puede ser empleada como *técnica de cuantificación*.

*Criterio de Identidad.* Consiste en cromatografiar simultáneamente la sustancia desconocida, la sustancia de referencia y una mezcla de cantidades aproximadamente iguales de ambas. De cada muestra deberá sembrarse aproximadamente la misma cantidad de material a cromatografiar. Si la sustancia desconocida y la referencia corren distancias iguales (igual Rf), si  $R_x = 1$  y si la mezcla de ambas se comporta como una sola sustancia (mancha única) puede presumirse que se trata de la misma sustancia, presunción que puede reforzarse si se ensaya en 3 o 4 condiciones cromatográficas distintas y los resultados son coincidentes. Muchos compuestos isoméricos no logran separarse. Por lo general se combina alguna prueba no cromatográfica (tal como historia de la muestra, UV, IR, reacciones coloreadas, etc.) con los datos de TLC para establecer la prueba de identidad.

*Criterio de pureza.* Una sustancia es *cromatográficamente pura*, cuando al ser sometida a distintas condiciones cromatográficas se comporta en todos los casos como una única sustancia (única mancha). Aunque nunca es posible demostrar que un producto es puro, es posible afirmar que no contiene determinadas impurezas o si las hay están en cantidades menores a los límites detectables. Por ejemplo, el ácido acetil salicílico (AAS) y el ácido salicílico (AS) pueden separarse por TLC. Si una muestra de AAS se cromatografía con la aparición de una mancha única correspondiente al valor de Rf del AAS, entonces puede decirse que el AS, si lo hay en la muestra, es en cantidad menor que el límite de detección del método para AS.

*Ensayo de Pureza cromatográfica / Sustancias relacionadas.* Estos ensayos están codificados como: Ensayo de Pureza Cromatográfica en la Farmacopea de Estados Unidos (USP) y como Ensayo de Sustancias Relacionadas en Farmacopea Europea (EP) y Británica (BP), en diferentes monografías. Los mismos consisten en determinar que las impurezas que puedan acompañar a una determinada materia prima, no superen los límites codificados o preestablecidos; por debajo de estos límites se puede garantizar que la muestra cumple con los ensayos de calidad. Una impureza es un componente de la droga o de un producto terminado (excluyendo el agua) que no es la entidad química definida como la droga. Pueden ser por ej. subproductos de síntesis, productos de degradación, sustancias estructuralmente relacionadas con la droga, impurezas originadas en el proceso de manufactura.

Hay casos en los que no se requiere conocer la identidad de las impurezas, entonces el ensayo se realiza efectuando diluciones convenientes de la muestra problema y realizando una comparación visual de las intensidades de las manchas sobre la cromatoplaque, una vez reveladas. Cuando se necesita identificar y cuantificar alguna impureza en particular es necesario contar con la sustancia de referencia de la misma. Estos ensayos son aplicables tanto a materia prima como a producto terminado.

A continuación, se describen dos ejemplos de aplicación para este tipo de ensayo, uno aplicable a materia prima y otro a producto terminado:

*Ejemplo 1: Ensayo de Pureza Cromatográfica - Metoclopramida Clorhidrato  
Materia Prima - USP 34.*

*Condiciones Cromatográficas:*

Fase estacionaria: silicagel GF<sub>254</sub>

Fase móvil: cloroformo: metanol: tolueno: hidróxido de amonio (140:60:20:1)

Revelador: UV <sub>254nm</sub>

*Especificación:* ninguna mancha secundaria presente en el cromatograma de la muestra, debe ser más intensa o más grande que la mancha correspondiente al 0.5 % y la suma de las intensidades de todas las manchas secundarias presentes en el cromatograma de la muestra, no debe ser mayor que el 1.0%.

Nota: Se cuenta con Metoclopramida Clorhidrato Sustancia de Referencia (Título: 100 % sdtc)

*Resolución:*

Lo primero que debemos considerar es el cálculo del Límite de Detección (LD) de metoclopramida clorhidrato, utilizando la sustancia de referencia de dicho principio activo. A los fines de este capítulo, definimos Límite de Detección como *la menor cantidad de principio activo y/o impurezas o sustancias relacionadas en unidades de masa ( $\mu\text{g}$ ) que es detectable y cuantificable de manera reproducible en las condiciones de trabajo.*

Para este ejemplo consideraremos el LD = 0.5  $\mu\text{g}$

En este ejemplo, tenemos que responder a una especificación con dos criterios de aceptación, y no se exige la identificación de las impurezas o sustancias relacionadas, por lo cual no es necesario contar con sustancia de referencia de las mismas. Podemos proceder de acuerdo 2 opciones que se describen a continuación;

*Opción 1.* Considerar que el LD corresponde al 0.5 % de la cantidad a sembrar (en unidades de masa) de la materia prima bajo estudio (una de los criterios de aceptación de la especificación).

*Opción 2.* Considerar que el LD corresponde a un % de la cantidad a sembrar (en unidades de masa) de la materia prima bajo estudio menor al 0.5 %.

A continuación, desarrollaremos ambas opciones:

*Opción 1:*

Asignamos al LD (0.5  $\mu\text{g}$ ), el 0.5 % respecto de la cantidad a sembrar (en unidades de masa) de la materia prima bajo estudio (Muestra), al realizar esta consideración, nos aseguramos que todas aquellas impurezas o sustancias relacionadas que estén presentes en la materia prima en un %  $\geq$  a 0.5%, serán detectadas ya que corresponden a una cantidad igual o mayor al LD, teniendo en cuenta esto último, debemos calcular la cantidad en unidades de masa que debemos sembrar de materia prima en la placa, de manera que todas aquellas impurezas que estén presentes en un %  $\geq$  a 0.5 % puedan ser detectadas.

0.5%.....0.5  $\mu\text{g}$  (LD)

100%.....100  $\mu\text{g}$

Debemos sembrar 100 µg al menos de materia prima bajo estudio, para poder visualizar todas aquellas impurezas o sustancias relacionadas que estén presentes en la misma en un %  $\geq$  a 0.5 %.

*Preparación de las soluciones de trabajo:*

*Solución de Metoclopramida Sustancia de Referencia (Sol. SR 1):* 50 mg de la SR, se disuelven en 50 de metanol de manera de obtener una solución de 1 mg/ml – 1 µg/µl.

Sol. SR A: realizar una dilución 1 en 20 de la Sol. SR 1 en metanol: 0.05 mg/ml- 0.05 µg/µl.

*Solución SR para identificación (Sol SR I):* realizar una dilución 1 en 2 de la Sol. SR 1 en metanol: 0.50 mg/ml- 0.50 µg/µl.

*Solución de la Muestra en estudio (Sol. M):* 500 mg de la materia prima bajo estudio, se disuelven en 50 de metanol de manera de obtener una solución de 10 mg/ml – 10 µg/µl.

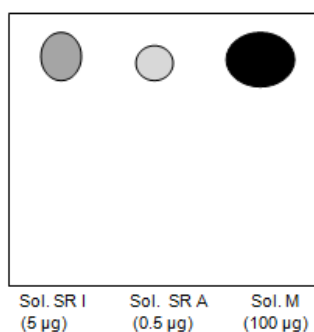
Se siembran 10 µl de cada una de las soluciones, resultando:

Sol. SR I:  $0.50 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10 \mu\text{l} = 5 \mu\text{g}$

Sol. SR A:  $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10 \mu\text{l} = 0.5 \mu\text{g}$

Sol. M:  $10 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10 \mu\text{l} = 100 \mu\text{g}$

A continuación se muestra la placa cromatográfica resultante:



En este caso, luego de revelar la placa, como no aparece ninguna mancha secundaria en el cromatograma de la muestra y como 0.5 µg, representa el 0.5 % de los 100 µg sembrados de la muestra de la materia prima en estudio,, podemos concluir que ninguna mancha / impureza está presente en un %  $\geq$  al 0.5%, pero no podemos decir nada acerca de la especificación que indica que, la suma de las intensidades de todas las manchas secundarias

presentes en el cromatograma de la muestra no debe ser mayor que el 1.0 %. Por lo tanto la opción desarrollada anteriormente, no es la más adecuada o la más correcta para evaluar el cumplimiento de la especificación tal cual como la hemos planteado. Para responder a la misma y utilizando una sola placa cromatográfica desarrollaremos a continuación la opción 2.

Opción 2: consideraremos que nuestro LD = 0.5 µg, corresponde al 0.1 % respecto del total a sembrar de la materia prima bajo estudio, al proponer esta relación, nos aseguramos que todas aquellas impurezas o sustancias relacionadas que estén presentes en la materia prima en un % ≥ a 0.1 %, serán detectadas/ cuantificadas, ya que corresponden a una cantidad igual o mayor al LD, teniendo en cuenta esto último, procederemos a calcular la cantidad en unidades de masa que debemos sembrar de la materia prima bajo estudio en la placa, de manera que todas aquellas impurezas que estén presentes en un % ≥ a 0.1 % puedan ser detectadas / cuantificadas.

0.1 %.....0.5 µg (LD)

100 %.....500 µg

Debemos sembrar al menos 500 µg de la materia prima, para poder detectar / cuantificar aquellas impurezas o sustancias relacionadas que estén presentes en la misma en un % ≥ a 0.1 %.

*Preparación de las soluciones de trabajo:*

*Solución de Metoclopramida Sustancia de Referencia (Sol. SR 1):* 50 mg de la SR, se disuelven en 50 de metanol de manera de obtener una solución de 1 mg/ml – 1µg/µl.

*Solución SR para identificación (Sol SRI):* realizar una dilución 1 en 2 de la Sol. SR 1 en metanol: 0.50 mg/ml- 0.50 µg/µl.

A partir de la Sol. SR 1 realizamos las diluciones en metanol, que se describen en la siguiente Tabla:

Sol. SR	Dilución	Conc. µg/µl	Porcentaje (%) respecto de la cantidad sembrada de MP
A	1 en 4	0.25	0.5
B	3 en 20	0.15	0.3
C	1 en 20	0.05	0.1

**Tabla 1.** Diluciones correspondientes a la Solución SR1

*Solución de la Muestra en Estudio (Sol. M):* 500 mg de la materia prima bajo estudio, se disuelven en 10 ml de metanol de manera de obtener una solución de 50 mg/ml – 50 µg/µl.

Se siembran 10 µl de cada una de las soluciones, resultando:

Sol. SR1:  $0.50 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10 \mu\text{l} = 5 \mu\text{g}$

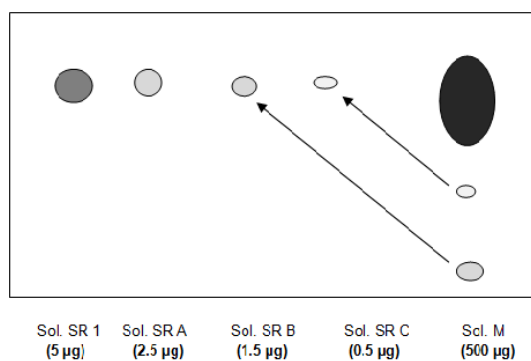
Sol. SR A:  $0.25 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10 \mu\text{l} = 2.5 \mu\text{g}$

Sol. SR B:  $0.15 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10 \mu\text{l} = 1.5 \mu\text{g}$

Sol. SR C:  $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10 \mu\text{l} = 0.5 \mu\text{g}$

Sol. M:  $50 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10 \mu\text{l} = 500 \mu\text{g}$

A continuación en una placa cromatográfica, se ejemplifica uno de los resultados posibles:



A partir de la placa anterior, observamos que aparecen dos manchas secundarias en el cromatograma de la muestra, para comprobar el cumplimiento o no de la especificación, procederemos de la siguiente manera: comparamos el tamaño e intensidad de cada una de las manchas secundarias presentes en el cromatograma de la muestra, con el tamaño e intensidad de las manchas de las soluciones de referencia, en este caso, observamos que ambas manchas secundarias tienen un tamaño e intensidad menor que la mancha de la Sol. SR A (0.5%), por lo tanto podemos confirmar, que ninguna impureza está presente en un %  $\geq$  al 0.5 % en la muestra evaluada, las otras manchas secundarias presentes, corresponden al 0.3 % y al 0.1 %, resultando la suma de todas las manchas secundarias presentes en el cromatograma de la muestra igual al 0.4%, lo cual es menor que el límite máximo permitido del



1% de la especificación. Procediendo de acuerdo a lo descrito en la opción 2, podemos responder a la especificación y podemos concluir que la materia prima bajo estudio, cumple con el Ensayo de Pureza Cromatográfica.

*Ejemplo 2: Ensayo de Sustancias Relacionadas Paracetamol Comprimidos – British Pharmacopoeia - 2005.*

*Condiciones Cromatográficas:*

Fase estacionaria: sílica gel GF<sub>254</sub>

Fase móvil: tolueno: acetona: cloroformo (10:25:65)

Revelador: UV<sub>254nm</sub>

*Especificación:* Ninguna mancha correspondiente a 4'cloroacetanilida, presente en el cromatograma de la solución Muestra 1 no debe ser más intensa que la intensidad de la mancha obtenida con la solución 3. Ninguna mancha secundaria obtenida en el cromatograma de la solución Muestra 2 con R<sub>f</sub> menor que la 4'cloroacetanilida debe ser más intensa que la mancha obtenida con la solución 3. El ensayo es válido si el cromatograma obtenido con la solución 4, muestra claramente la separación entre las dos manchas principales y la mancha correspondiente a la 4'cloroacetanilida, tiene mayor valor de R<sub>f</sub>.

Formula cuali-cuantitativa - Paracetamol comprimidos:

Paracetamol .....1000 mg

Excip. Csp.....1350 mg

En la monografía correspondiente se describe el siguiente procedimiento para la preparación de las distintas soluciones.

*Preparación de las soluciones de trabajo:*

*Solución Muestra 1 (Sol. M1):* se pesan 10 comprimidos de paracetamol, se pulverizan en mortero y a partir del polvo se pesan 1350 mg, equivalentes a 1000 mg de paracetamol, se transfieren a un tubo de centrifuga de 20 ml y se adicionan 5 ml de éter libre de peróxido, se agita durante 30 minutos, se centrifugan a 1000 r.p.m. durante 15 minutos y a partir de sobrenadante se siembran 200 µl.

*Solución Muestra 2 (Sol. M2):* diluir 1 ml del sobrenadante de la solución Muestra 1 a un V<sub>f</sub> de 10 ml con etanol 96%.

*Solución 4'cloroacetanilida (Sol. 3):* 50 mg de 4'cloroactenailida Sustancia de Referencia (SR) se transfieren a matraz de 10 ml y se completa a volumen con etanol al 96%, posteriormente se realiza una dilución 0.1:10 con el mismo medio (Solución 3: 0.005% P/V) - se siembran 40 µl

*Solución 4 (Sol.4):* se pesan 0.25 g de 4'cloroacteanilida (SR) + 0.1 g paracetamol y se disuelven en 100 ml de etanol 96%. Se siembra 40 µl

Sol. M1:  $200 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 200 \mu\text{l} = 40000 \mu\text{g}$

Sol. M2:  $20 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 40 \mu\text{l} = 800 \mu\text{g}$

Sol. 3:  $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 40 \mu\text{l} = 2 \mu\text{g}$

Sol. 4:  $(2.5 \mu\text{g}/\mu\text{l} + 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}) \times 40 \mu\text{l} = 100 \mu\text{g} + 40 \mu\text{g}$

En este ejemplo, si necesitamos contar con sustancia de referencia de 4'cloroacetanilida ya que debemos identificar y cuantificar la misma. Si transformamos la especificación en unidades correspondientes al porcentaje (%) máximo de sustancias relacionadas presentes en la muestra bajo estudio resulta:

4'Cloroacetanilida:

40000 µg.....100 %

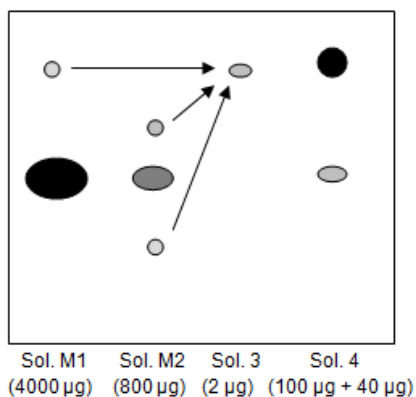
2 µg.....0.005 %

Otras sustancias relacionadas, diferentes de 4'Cloroacetanilida:

800 µg.....100 %

2 µg.....0.25 %

A continuación en una placa cromatográfica, se ejemplifica uno de los resultados posibles:



Analizando la placa anterior, podemos concluir, que el ensayo es válido ya que la 4'cloroacetanilida y el paracetamol se separan perfectamente entre sí, y el  $R_f$  de la 4'cloroacetanilida es mayor que el  $R_f$  del paracetamol (validación in situ), y que la muestra de comprimidos de paracetamol analizada cumple las especificaciones.

*Análisis cuantitativo.* Cuando se aplica TLC al análisis cuantitativo, se deben remover cuidadosamente las manchas desde la cromatoplaqa, luego eluirlas con un solvente adecuado y posteriormente aplicar un método cuantitativo que permita detectar pequeñas cantidades (ej. Espectrofotometría UV), o bien medir intensidades de manchas por densitometría sin necesidad de removerlas de la cromatoplaqa. Una estimación semicuantitativa puede realizarse por comparación visual del tamaño e intensidad de las manchas.

## Técnica general

La técnica de TLC comprende diferentes etapas:

- Preparación de la cámara de desarrollo
- Activación de la placa
- Siembra de las muestras
- Corrida de la placa
- Revelado o localización de las manchas

*Ver descripción de las mismas en FA. VII ed. (pág. 63); USP 23 (pág. 1770/71); Farmacopea Británica 93 (pág. A92/A93).*

Además de la forma de cromatografía convencional, descrita en la bibliografía mencionada, donde se corre la fase móvil en dirección ascendente, hasta que la misma haya recorrido las tres cuartas partes de la placa, existen otros tipos de desarrollo:

*Desarrollo Múltiple.* Consiste en correr primero con una fase móvil, secar y correr luego con la misma fase o con otra más polar o de diferente pH, en la misma dirección. Este proceso puede repetirse cuantas veces sea necesario

para lograr la separación. Esta técnica es particularmente útil para separar compuestos de polaridades diferentes.

*Cromatografía bidimensional*: consiste en correr la placa en una dirección con la primera fase móvil, secar, girar la placa 90° y correr nuevamente usando una fase móvil diferente.

## Materiales

*Fase Estacionaria*: La fase estacionaria (FE) se adhiere convenientemente a una placa de vidrio, lámina de aluminio, o plástico. La adherencia se logra con el agregado de sulfato de calcio a la FE. Si bien el vidrio es el soporte más conocido, los otros dos tienen la ventaja de poder cortarlos en placas menores por su flexibilidad. Muchas de las FE son adsorbentes (ej. silicagel, alúmina) y la separación ocurre por interacción de las sustancias con la FE. Otras (ej. celulosa) operan primariamente por partición de la muestra entre FE y FM, aunque generalmente es un proceso combinado. Cuando la FE es más polar que la FM el sistema se denomina de *fase normal* (ej. silicagel con solventes orgánicos no polares); cuando la FE es la menos polar de las dos fases, el sistema se denomina de *fase reversa* (ej. placa impregnada de parafina usando una FM acuosa). Las Fases Estacionarias pueden ser inorgánicas, orgánicas o mixtas.

*Inorgánicas*: silicagel; alúmina; silicato de magnesio (Florisil); etc. La silica gel o  $\text{SiO}_2$ , es el más usado de los adsorbentes: contiene grupos silanoles responsables de actividad adsorbente y es de naturaleza débilmente ácida. Las placas tienen una distribución uniforme de tamaño de partícula normalmente alrededor de 20  $\mu\text{m}$  de diámetro. Puede contener sulfato de calcio hidratado ( $\text{SO}_4\text{Ca} \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ ) como aglutinante (en proporción 5%-15%), en cuyo caso se denomina silicagel G. La silicagel H no contiene  $\text{SO}_4\text{Ca} \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ , ni otro aglutinante. También existe silicagel G o H con indicador de fluorescencia ( $F_{254}$ ), la materia fluorescente es un silicato de Zn activado con Mn. La alúmina o  $\text{Al}_2\text{O}_3$  es otro adsorbente bastante empleado; puede ser neutro (pH 7.5),

alcalino (pH 9) o ácido (pH 4). Su actividad de adsorción es menor que la silicagel y necesita ser activada para obtener mejores separaciones. Tiene el inconveniente de producir reacciones colaterales, como por ej. hidrólisis, apareciendo entonces dos manchas cuando en realidad la sustancia no estaba impurificada.

*Orgánicas:* celulosa, urea, poliamida, carbón, sacarosa, etc. La celulosa imita muy bien a la cromatografía en papel, el mecanismo de separación es partición. La velocidad de corrida es mayor que con la silicagel a igual espesor.

*Mixtas:* Resultan de la combinación de las fases anteriores.

Otras fases estacionarias:

#### *Fases Reversas*

Los sistemas de fase reversa consisten en placas de silicagel impregnadas con materiales tales como parafina, siliconas, grasas, con fases móviles acuosas. Estos sistemas tienen una buena separación para un rango amplio de sustancias, pero tiene la desventaja de su lenta velocidad de corrida, y pobre reproducibilidad. Otros sistemas de fase reversa, consisten en placas de sílica modificada, por unión de cadenas hidrocarbonadas de distinta longitud, a los grupos silanoles libres; estos sistemas tienen alta resolución. Las más conocidas son las fases con cadenas de C<sub>18</sub> (octadecyl). Pueden ser usadas como fases móviles Metanol : Agua o Acetonitrilo : Agua.

#### *Resinas de Intercambio Iónico*

Estas placas de TLC poseen resinas de intercambio catiónico o aniónico unidas a su superficie. Las resinas son de estireno-divinilbenceno con grupos amonio cuaternario o ácido sulfónico para el intercambio iónico.

El contenido de agua juega un papel importante en la actividad del adsorbente ya que por ej. en el caso de la sílicagel se solvatan los grupos silanoles que son los sitios activos, impidiendo la unión a los mismos de las sustancias a cromatografiar, afectando consecuentemente la reproducibilidad del sistema.

La Alúmina se presenta en cinco grados de activación, de I a V según su contenido acuoso; la de grado I no contiene agua por lo tanto es la de mayor actividad y el contenido acuoso aumenta hasta llegar a la de grado V.

## Determinación de la actividad de los adsorbentes.

Existen métodos para medir la actividad del adsorbente por ej. el Método de Brockman y Schodder que utiliza para determinar el grado de actividad de una alumina, una serie de azo-colorantes que ordenados de acuerdo a su creciente adsorbibilidad son:

1. Azobenceno
2. p- Metoxiazobenceno
3. Benceno-azo-2-naftol (Amarillo Sudan)
4. Rojo Sudan (Sudan III)
5. p-Aminoazobenceno
6. p-Hidroxiazobenceno

Para ello se siembra un volumen determinado de una mezcla de estos colorantes en solución, en distintas columnas que contienen alúmina con distinto grado de activación, dado por su % de agua y luego se hace pasar por todas ellas un mismo volumen del mismo eluyente. La velocidad de corrida de cada colorante dependerá de la actividad del adsorbente. Por ej. la alúmina de mayor actividad , es decir la que no contiene agua adsorberá azobenceno, o sea el colorante de menor adsorbibilidad, en la parte inferior de la columna, en la parte superior de la misma se adsorberá p-metoxiazobenceno, es decir el que le sigue en poder adsorbente y no eluye fuera de la columna ningún colorante, todos los demás quedarán retenidos en el punto de siembra. En la de grado II (3% de agua) el azobenceno se eluye fuera de la columna, el metoxiazobenceno es retenido en la parte inferior, el amarillo sudan queda en la parte superior de la columna y el resto en el punto de siembra y así sucesivamente. La alúmina de grado III tiene un 6% de agua, la de grado IV un 10% y la de grado V 15% de agua. La actividad I se logra por calcinación, mientras que las otras se consiguen por exposición prolongada al aire. Si tenemos una alúmina de actividad desconocida, rellenamos con ella una

columna y sembramos la mezcla de colorantes, según el comportamiento de los mismos podremos deducir su actividad.

En lugar de columnas pueden utilizarse placas de TLC determinando el Rf de cada colorante.

Otro método es el Índice de Azobenceno: se mezclan 0.5 g de adsorbente con 3 ml de una solución 0.1 M de azobenceno puro en ciclohexano puro, en un recipiente de tapa hermética y se agita repetidamente. Al cabo de una hora el líquido sobrenadante se centrifuga y se lee su absorbancia determinándose la pérdida de azobenceno mediante el uso de curvas de calibración. Se calcula la cantidad adsorbida en moles/ gramo de adsorbente por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Moles/gramo} = a/m (C1 - C2)$$

a = volumen de la solución del colorante.

m = gramos de adsorbente

C1 y C2 = concentración inicial y final del colorante

*Fase Móvil (Eluyente):* La elección de la fase móvil (FM), dependerá de las sustancias a cromatografiar. Puede estar constituida por un solvente orgánico o mezcla de los mismos, pudiendo también agregarse ácidos o bases para controlar la elución. Los solventes usados deben ser secados y redistilados, estables al aire, no tóxicos y no reaccionar con la sustancia a separar.

Existen series que indican la diferencia de poder eluyente y se denominan series eluotrópicas, las mismas se describen en la Tabla 2.

Según Wohleben	Según Strain
n-pentano	Éter de petróleo (30-50 C)
Éter de petróleo	Éter de petróleo (50-70 C)
n-hexano	Éter de petróleo (70-100 C)
n-heptano	Tetracloruro de carbono
Ciclohexano	Ciclohexano
Tetracloruro de carbono	Sulfuro de carbono
Tricloro etileno	Éter dietílico
Benceno	Acetona
Diclorometano	Benceno
Cloroformo	Tolueno
Dietiléter	Ésteres de ácidos orgánicos
Acetato de etilo	1,2 dicloro etano
Piridina	Cloroformo
Acetona	Alcoholes
n-propanol	Agua
Etanol	Piridina
Metanol	Ácidos orgánicos
Agua	Mezcla de ácidos con bases, agua, alcohol o piridina

AUMENTO DE POLARIDAD ↓

**Tabla 2.** Series eluotrópicas

*Muestra a cromatografiar:* En términos generales si la sustancia a cromatografiar es poco polar, se trabajará con adsorbentes fuertes y eluyentes débiles. Para sustancias polares se trabajará con adsorbentes débiles y eluyentes fuertes.

1. Los hidrocarburos saturados son poco adsorbidos. La introducción de dobles enlaces en la molécula, aumenta la polaridad de las moléculas y con esto la fuerza adsortiva sobre el adsorbente.

2. Si se introducen grupos funcionales en una cadena hidrocarbonada aumenta la afinidad de adsorción. La serie de adsorción descendente es:

$-\text{COOH} > \text{CONH}_2 > \text{NHCOCH}_3 > \text{NH}_2 > \text{OCOCH}_3 > \text{N}-(\text{CH}_3)_2 > \text{NH}_2 > \text{OCH}_3 > \text{H} > \text{Cl}$

3. En una molécula en la que se encuentran presentes varios grupos funcionales, la afinidad por el adsorbente la da el grupo funcional más hidrófilo no existiendo aditividad con respecto a su influencia sobre la afinidad de adsorción.



*Reveladores:* Muchas sustancias pueden ser localizadas examinando la placa conteniendo un indicador de fluorescencia, bajo luz UV a longitudes de onda corta (254 nm); los compuestos que absorben en la región del UV pueden verse entonces como manchas oscuras sobre un fondo verde fluorescente.

Puede también usarse para revelar luz UV de longitud de onda larga (360 nm), las sustancias de naturaleza fluorescente podrán visualizarse. Algunas sustancias no absorben luz UV, porque se encuentran en su forma iónica en la placa debido al pH de la FE o de la FM. Por ej., los barbituratos no son visibles si la placa es ácida, pero pueden rápidamente detectarse si se somete a la placa a vapores de amoníaco. Similarmente muchas bases pueden ser localizadas si se cambia el pH de la placa por exposición a vapores de ácido clorhídrico. Muchas sustancias que no presentan color propio, absorción al UV, ni fluorescencia se detectan con reactivos específicos que se pulverizan sobre la placa. La aspersion no debe ser excesiva con objeto de que no difundan las manchas. Se pueden usar reactivos agresivos como ácido sulfúrico concentrado, ácido sulfocrómico, ácido sulfúrico- ácido nítrico, y carbonizar las sustancias orgánicas por calentamiento a temperaturas elevadas.

Agregando 0.5% de aldehidos (p-dimetilaminobenzaldehído, vainillina, aldehído anísico, aldehído salicílico o formaldehído) al ácido sulfúrico se obtiene en frío colores intensos y calentando a temperaturas entre 100° y 300° C son visibles un amplio espectro de compuestos. Muchas sustancias son detectadas con I<sub>2</sub>. El I<sub>2</sub> se une físicamente a los compuestos, por lo tanto puede luego eliminarse. En la bibliografía de referencia se describen más métodos específicos para determinados grupos funcionales (ej. ninhidrina para aminas primarias) o grupos de compuestos (ej. Reactivo de Dragendorff para alcaloides).

## Técnicas especiales

*Cromatoplasmas con zonas de concentración.* Tienen dos zonas en la misma placa, la primera contiene un adsorbente inerte o de poca capacidad adsorbente, por ej. Kieselgur (tierra de diatomeas) y la segunda un adsorbente

activo ej. silicagel. Se utiliza cuando la muestra es compleja, por ej. formas farmacéuticas con excipientes, cuando las sustancias se degradan al sembrar, o cuando tienen muchas impurezas de tipo orgánicas, y de esta manera se limpian (clean up), pues son retenidas en el Kieselgur. En estas placas no es necesario sembrar en punto o banda, puede colocarse la placa directamente en la solución de siembra porque todas corren en forma de bandas.

*Cromatografía en Capa Fina de Alta Performance HPTLC.* Esta técnica utiliza placas de silicagel con tamaño de partícula de aproximadamente  $5\mu\text{m}$ , mientras que las comunes el tamaño es de  $20\mu\text{m}$ . Para el desarrollo de estas placas se usan cámaras de desarrollo horizontal, con las cuales se puede sembrar en ambos extremos de la placa y el solvente corre desde ambos extremos hacia el centro. La cámara posee dos pequeñas cubetas en los extremos para colocar el solvente, y esto posibilita el uso de dos solventes distintos, las placas se ponen con el adsorbente para abajo, en forma horizontal. Para la cuantificación, este tipo de técnica permite el uso solamente de Densitometría. Los densitómetros miden la intensidad de la mancha, pueden trabajar en modo transmitancia, fluorescencia o reflexión, es decir se mide la cantidad UV o Visible transmitida, fluorescente o reflejada, luego se transforman estos valores en áreas que son proporcionales a la concentración. Un densitómetro consta de una fuente luminosa, un filtro, un colimador, una fotocélula y un galvanómetro. La cromatoplaqa se coloca entre la fuente luminosa y la fotocélula y la radiación se mide usando como referencia un lugar de la placa sin muestra. Las señales se transmiten a un registrador donde las manchas aparecen en forma de picos cuya área es proporcional a la concentración de la sustancia.

*Ventajas de la HPTLC:* mayor resolución debido al menor tamaño de partícula lo cual implica mayor superficie expuesta, mayor sensibilidad, tiempos más breves, recorridos más cortos y mayor reproducibilidad. Las propiedades cromatográficas de este tipo de TLC correlacionan muy bien con los sistemas de HPLC que usan la misma fase estacionaria.

Es útil para trabajos preparativos y su uso se ha incrementado a partir de la aplicación de muestras con sembradores automáticos y la cuantificación por

medio de densitómetros. En la Tabla 3 se resumen las diferencias entre TLC y HPTLC.

Condiciones Típicas	TLC	HPTLC
Dimensiones de la placa (cm)	20 x 20	10x10
Tamaño de partícula (silicagel) ( $\mu\text{m}$ )	Alrededor de 20	Alrededor de 5
Espesor de la placa ( $\mu\text{m}$ )	100 - 250	150 - 200
Volumen de muestra ( $\mu\text{l}$ )	1 - 10	< 0.1
Diámetro de la mancha antes de corrida (mm)	< 4	< 1.5
Diámetro de la mancha después de corrida (mm)	5 - 10	2 - 5
Distancia de corrida (cm)	10 - 15	3 - 6
Tiempo de corrida (min)	30 - 120	5 - 15
Número de muestras por placa	10 - 15	30 - 40
Límite de detección (Absorción) (ng)	10 - 100	30 - 40
Límite de detección (fluorescencia) (ng)	0.1 - 1	0.01 - 1.0
Reproducibilidad de Rf	Alrededor 3%	Alrededor 1%
Reproducibilidad de cuantificación	Alrededor 5%	2 % - 3%

**Tabla 3.** Diferencias Principales entre TLC y HPTLC

En la figura 1 se describe de manera esquemática el procedimiento para el desarrollo de HPTLC.



**Figura 1.** Procedimiento para el desarrollo de HPTLC

*TLC Preparativa.* Como técnica preparativa TLC es usada por ej., para el aislamiento de componentes de mezclas para su posterior estudio como para la obtención de materiales puros para ser usados como sustancias de referencia.

En TLC preparativa el espesor de la capa de adsorbente es mayor (0,5 a 2mm), lo cual permite sembrar mayor cantidad de muestra. Es mejor aplicar la muestra en forma de banda que de punto, (se puede cromatografiar más muestra al mismo tiempo) La visualización de las manchas debe hacerse por métodos no destructivos, por ejemplo UV.

**Agradecimiento:** A la Lic. Analía Nolasco por el diseño de las figuras y gráficos incluidos en el presente capítulo.

## Preguntas Orientadoras

1. Describa los factores que influyen o afectan la reproducibilidad del  $R_f$ .
2. Describa las diferencias fundamentales entre TLC y HPTLC.
3. Que mecanismo/s se pone/n en juego en la separación por TLC.
4. Describa en que consisten los sistemas de fase reversa.
5. Detalle el procedimiento para el análisis cuantitativo por TLC. Utilizaría un método Volumétrico para cuantificar las manchas?. Justifique

## Test de Autoevaluación

1. En este capítulo se define el Límite de Detección como:
  - (a) La menor concentración de principio activo y/o impurezas o sustancias relacionadas en unidades de masa ( $\mu\text{g}$ ) que es detectable y cuantificable de manera reproducible en las condiciones de trabajo.

- (b) La menor cantidad y concentración de principio activo y/o impurezas o sustancias relacionadas en unidades de masa ( $\mu\text{g}$ ) que es detectable y cuantificable de manera reproducible en las condiciones de trabajo.
  - (c) La menor cantidad de principio activo y/o impurezas o sustancias relacionadas en unidades de masa ( $\mu\text{g}$ ) que es detectable y cuantificable de manera reproducible en las condiciones de trabajo.
2. Durante el ensayo de Pureza Cromatográfica o Sustancias relacionadas siempre debo:
- (a) Contar con sustancia de referencia del principio activo y de todas las impurezas o sustancias relacionadas.
  - (b) Nunca debo contar con sustancia de referencia de las impurezas o sustancias relacionadas.
  - (c) Siempre debo contar con sustancia de referencia del principio activo.
  - (d) Ninguna es correcta
3. La cromatografía en Fase reversa está constituida por:
- (a) Fase Estacionaria Polar y Fase Móvil Polar
  - (b) Fase Estacionaria Polar y Fase Móvil No Polar
  - (c) Fase Estacionaria No Polar y Fase Móvil Polar
  - (d) Ninguna es correcta.
4. Cual o cuales de las siguientes opciones son correctas:
- (a) La HPTLC, posee menos resolución y utiliza menor tamaño de partícula de la sílica menor que la TLC.
  - (b) La reproducibilidad para el  $R_f$  en TLC es menor que en HPTLC.
  - (c) La reproducibilidad para la cuantificación y el tiempo de corrida es menor en HPTLC que en TLC.

(d) El límite de detección (absorción) es mayor en TLC que en HPTLC.

## Bibliografía

1. Kurt Randerath (1969). *Cromatografía de capa fina*. Bilbao: Urmo.
2. K.A.Connors (1980). *Curso de Análisis Farmacéutico*. 2da. Ed. 1980.
3. Ministerio de Salud – ANMAT. *Farmacopea Argentina*. VII ed. (2003) Buenos Aires.
4. Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 34) (2011) Rockville.
5. Farmacopea Británica (2003)
6. ManMonham, Srrivastava (2011) *High-Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)*. Springer – Verlag Berlin Heidelberg.