



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS A LA  
IDENTIFICACION DE PRODUCTOS DE LA REAL  
FARMACOPEA ESPAÑOLA**

**Autor 1:** Sofía Quirós Viñuales

**Autor 2:** Sofía Antunes Martins

**Tutor:** M<sup>a</sup> Carmen Martín Gómez

**Convocatoria:** Junio 2017

## INDICE

1.	Resumen .....	3
2.	Abstract .....	3
3.	Introducción .....	4
3.1.	Métodos ópticos .....	5
3.2.	Métodos de separación .....	6
3.3.	Otros métodos .....	9
4.	Objetivos .....	9
5.	Metodología .....	9
6.	Resultados y discusión .....	10
6.1.	Métodos ópticos .....	10
6.1.1.	Métodos espectroscópicos .....	10
A)	Espectrofotometría de absorción en el infrarrojo (IR)... 10	
•	Transformada de Fourier .....	11
•	IR de reflectancia .....	11
B)	Espectrofotometría de absorción en el ultravioleta y en el visible (UV - visible) .....	12
6.1.2.	Métodos no espectroscópicos .....	13
A)	Refractometría .....	13
B)	Polarimetría .....	14
6.2.	Métodos de separación .....	15
6.2.1.	Cromatografía en capa fina (CCF) .....	15
6.2.2.	Electroforesis .....	16
6.3.	Otros métodos .....	18
•	ELISA .....	18
7.	Conclusiones .....	19
8.	Bibliografía .....	20

## 1. RESUMEN

Los métodos analíticos constituyen un aspecto clave para la identificación, ensayos y valoración de múltiples sustancias, productos y fármacos, los cuales se encuentran recopilados en la Real Farmacopea Española (RFE), así como en otras farmacopeas como la Farmacopea Europea (FE). Dichos métodos se utilizan para conocer todas las especificaciones que deben cumplir los productos objeto de estudio.

Nuestro trabajo de fin de grado se ha basado en una profunda revisión de las técnicas analíticas más utilizadas para dicha identificación. El objetivo principal ha sido conocer además de qué métodos analíticos son los más empleados, cuál es el fundamento de cada uno de ellos, y adquirir las competencias necesarias para seleccionar el método más adecuado según el tipo de sustancia que queramos identificar.

Las técnicas analíticas se pueden clasificar de forma general en métodos ópticos como son la Espectrometría de absorción en el Infrarrojo, Espectrofotometría de absorción en el UV-visible, Polarimetría y Dicroismo circular, y Refractometría; o métodos de separación como, por ejemplo, la Cromatografía en capa fina (CCF o thin layer chromatography (TLC)) y el HPLC. Existen también otros métodos más específicos para ciertos tipos de sustancias como ocurre con los productos biológicos identificados por Electroforesis, y las vacunas que son identificadas por técnicas inmunoanalíticas como el ELISA.

Concluimos que existen diversos tipos de técnicas analíticas, no siendo todas de igual utilidad pues según qué sustancia queramos identificar recurriremos a una u otra. Además, hemos observado que las más utilizadas son la CCF y la espectrometría de absorción en el infrarrojo.

## 2. ABSTRACT

The analytical methods had been a great support for the identification of multiple substances, products and drugs. These methods are collected in the Real Spanish Pharmacopeia. The analytical methods are used to find those specific characteristics which allow the identification of the products studied.

Our End-of-degree project is based on a deep review of the analytical methods used to identify substances, products and drugs as the Real Spanish Pharmacopeia indicate.

The principal aim was to know which analytical methods are more important and more specific for such identification, to understand the foundation of each method and to acquire the

competence to select by an appropriate way the best method according to the substance that we want to identify.

To gather all the information we have obtained, we made a bibliographic review using the Real Spanish Pharmacopeia as the basic tool.

The Analytical Methods are used to discover some specific characteristics about the object of study. The analytical methods can be classified by optical methods like IR, visible-UV, optical rotation and refraction or separation methods like TLC and electrophoresis. There are more specific methods for certain substances like for example the vaccines and other biological drugs which are identify by the ELISA technique.

The main conclusions that we have obtained are that they are various analytical methods, all that methods are not equally as useful depending on the substance we want to identify. The last conclusion that we reached is that the most used methods are the TLC and the IR absorption spectrometry.

### 3. INTRODUCCION

Una técnica analítica es aquel principio científico adaptado a uno o varios instrumentos, que nos es útil o necesario para obtener información sobre la composición de la muestra.

La Ley 25/90 del Medicamento define a la **Real Farmacopea Española** (RFE) como “el código que deberá respetarse para asegurar la uniformidad de la naturaleza, calidad, composición y riqueza de las sustancias medicinales y excipientes.”

La Farmacopea incluye monografías, con exigencias mínimas de obligado cumplimiento, sobre el carácter de la sustancia medicinal, excipientes, métodos de ensayo y análisis, y procedimientos de preparación, esterilización, conservación y acondicionamiento

Cada monografía que viene definida en la RFE, está dividida en tres principales partes en las cuales son utilizados los métodos analíticos. Estas tres partes son la identificación, los ensayos y la valoración.

- Identificación: es el proceso mediante el cual se hace un análisis cualitativo.
- Ensayos: tiene como finalidad detectar impurezas estableciendo límites permitidos.
- Valoración: se basa en un análisis cuantitativo de productos o impurezas toleradas.

En nuestro caso, nos centramos en los métodos que se utilizan en la identificación, pero es importante destacar que algunos de las técnicas que se utilizan para la identificación no son exclusivas de ésta, sino que también se utilizan en los ensayos y en la valoración. Algunos ejemplos son, la prueba inmunológica ELISA, la cual se utiliza principalmente en la fase de valoración, pero, sin embargo, también se puede utilizar en la identificación de vacunas; y la rotación óptica y el índice de refracción se utilizan en la identificación y en los ensayos.

Los métodos analíticos pueden ser clasificados de forma general en:

- Métodos ópticos
- Métodos de separación
- Otros métodos

### **3.1. MÉTODOS ÓPTICOS**

Los métodos ópticos de análisis cubren un amplio campo de aplicación, encontrándose todos aquellos que implican la medida de la radiación electromagnética emitida por la materia o que interacciona con ella.

Podemos clasificar los métodos ópticos en:

- Espectroscópicos
- No espectroscópicos.

#### **• Métodos espectroscópicos:**

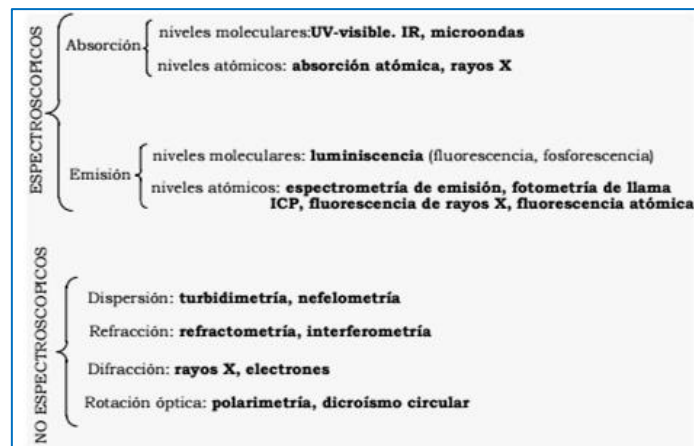
Aquellos en los que existe intercambio de energía entre la radiación electromagnética y la materia.

Se basan en procesos de absorción y emisión.

#### **• Métodos no espectroscópicos:**

Aquellos en los que no tiene lugar intercambio de energía como consecuencia de la interacción materia–radiación electromagnética. Lo que realmente ocurre son cambios en la dirección o en las propiedades físicas de la radiación electromagnética.

Se basan en mecanismos de interacción de la REM y la sustancia, como son la dispersión, difracción, refracción y polarización



Posteriormente procederemos al desarrollo de los métodos analíticos ópticos más utilizados, siendo estos:

- Métodos espectroscópicos:
  - Espectrometría de absorción en el infrarrojo (IR)
    - Con transformada de Fourier (IR-FT)
    - Reflectancia (IR-R)
  - Espectrofotometría de absorción en UV-Visible
- Métodos no espectroscópicos:
  - Refractometría
  - Polarimetría y dicroísmo circular

### 3.2. MÉTODOS DE SEPARACIÓN

Los métodos de separación hacen uso de propiedades físicas o fisicoquímicas de los componentes de una mezcla para conseguir su separación. Después de la separación se determinan individualmente los compuestos, bien cuantitativamente o bien cualitativamente.

Existen dos grandes tipos de sistemas de separación:

- Estáticos
- Dinámicos: Los sistemas dinámicos se pueden disponer físicamente de modo que el desplazamiento de flujo sea perpendicular o paralelo al desplazamiento relativo.

Algunas veces el mismo instrumento permite la separación y la determinación analítica (instrumento analítico). Otras veces el instrumento solo hace separación (instrumento separativo) y la determinación analítica se realiza con otra técnica instrumental.

Las más importantes para la identificación son:

- Cromatografía → la más utilizada y por lo tanto la más importante es la Cromatografía en Capa Fina (CCF) o Thin Layer Chromatography (TLC) Existen otros tipos de cromatografía que se utilizan fundamentalmente en la identificación como son la cromatografía de líquidos (CL), la cromatografía de gases (CG), la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y la cromatografía de exclusión por tamaño molecular.
- Electroforesis → para productos biológicos

El término **cromatografía** se refiere a toda técnica de separación en la cual se hacen pasar los componentes de una muestra a analizar a través de una columna a diferentes ritmos de velocidad. En toda separación cromatográfica hay una fase estacionaria (sólido, gel o líquido sobre un soporte sólido) y una fase móvil (fase móvil: gaseosa, líquida o fluido supercrítico) la cual percola a través de la primera.

El proceso cromatográfico se da como resultado de repetidos procesos de sorción-desorción durante el movimiento de los componentes de la mezcla arrastrados por la fase móvil a lo largo del lecho estacionario (elución), produciéndose la separación debido a las diferencias en las constantes de distribución de los componentes de la mezcla entre la fase estacionaria y la móvil.

La separación se puede producir mediante adsorción, distribución másica o intercambio de iones, o por diferencias en las propiedades fisicoquímicas (tamaño, masa, volumen).

Los procesos cromatográficos pueden clasificarse por estados físicos de las dos fases. La fase estacionaria puede ser líquida o sólida y la fase móvil gas o líquido.

	<b>Sólido</b>	<b>Líquido</b>	<b>Gas</b>
<b>Fase estacionaria</b>	X	X	
<b>Fase móvil</b>		X	X

Así el proceso puede clasificarse como: cromatografía líquido-líquido, cromatografía sólido-líquido, cromatografía líquido-gas, y cromatografía sólido-gas, siendo el segundo nombre se refiere al estado de la fase móvil.

Basándose en el mecanismo por el cual se distribuyen los componentes, se distinguen tres clases mayores de separaciones cromatográficas:

• **Cromatografía de adsorción** → Depende de los equilibrios de adsorción-desorción de los componentes de la mezcla, entre la fase estacionaria sólida y la fase móvil líquida o gaseosa. La fuerza con que es adsorbido un componente depende de la polaridad de este, de la actividad del adsorbente y de la polaridad de la fase móvil. Es una técnica que está particularmente bien adaptada para la separación de compuestos de polaridad baja y media

• **Cromatografía de reparto** → basada en la separación de una mezcla de sustancias mediante el reparto existente entre la fase móvil (líquido o gas) y la fase estacionaria (líquida) soportada o ligada sobre un sólido adecuado. Se utiliza para la separación de mezclas de compuestos de polaridad media y alta.

– **Cromatografía de reparto en fase normal:** la fase móvil es un disolvente apolar o poco polar (como el hexano o el isopropiléter) y la fase estacionaria presenta puntos activos de alta polaridad siendo las interacciones que se producen con el soluto específicas del grupo activo. El componente menos polar se eluye primero ya que es más soluble en la fase móvil, por tanto, si aumentamos la polaridad se producirá una disminución del tiempo de elución.

– **Cromatografía de reparto en fase inversa:** la fase móvil es un disolvente relativamente polar (disoluciones acuosas con etanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano) y la fase estacionaria es apolar (el grupo R es un n-octilo, C<sub>8</sub>, o n-octadecilo, C<sub>18</sub>) siendo las interacciones inespecíficas (efecto solvóforo). Los componentes más polares aparecerán primero y un aumento de la polaridad de la fase móvil supone un aumento en el tiempo de elución.

• **Cromatografía de intercambio iónico** → se utilizan materiales insolubles y porosos, los cuales presentan grupos reactivos asociados a iones lábiles capaces de intercambiarse con los del medio que les rodea. Se realiza en medio líquido, siendo muy útil para la separación de sustancias iónicas tanto inorgánicas como orgánicas.

• **Cromatografía por tamaño molecular** → se basa en la separación de las moléculas según su tamaño. Las fases estacionarias son de tipo inorgánico como zeolitas o geles orgánicos compatibles con disolventes acuosos u orgánicos.



Al tratarse de un método de separación tiene que ir seguida de la medición correspondiente haciéndose bien la identificación cualitativa o la determinación cuantitativa.

### **3.3. OTROS MÉTODOS**

Dentro de esta clasificación, los métodos inmunoanalíticos son alguno de los más utilizados. Estos métodos son de elección en muchas ocasiones para productos de origen biológico dado que son más específicos. Uno de los más utilizados es el ELISA, de aplicación en vacunas.

## **4. OBJETIVOS**

El objetivo de nuestro trabajo ha sido una revisión bibliográfica de las diferentes técnicas analíticas que se emplean para la identificación de los productos que se recogen en la Real Farmacopea Española (RFE), estudio que se ha completado con la última edición de la Farmacopea Europea (FE) y todo ello a fin de:

- Conocer la importancia de los diferentes métodos analíticos para la identificación de sustancias o productos de uso farmacológico
- Revisar los principios en que se basan los principales métodos analíticos para la identificación de sustancias incluidas en la RFE.
- Definir los parámetros que se utilizan para dicha identificación.
- Identificar técnicas utilizadas, aunque no estén incorporadas en los “métodos generales” en la RFE como ocurre con la técnica ELISA.

## **5. METODOLOGÍA**

Se ha realizado una exhaustiva revisión bibliográfica para conocer los diferentes métodos analíticos que se utilizan con mayor frecuencia para la identificación de sustancias o productos que se incluyen en la RFE y FE.

Se utilizaron herramientas como:

- Búsqueda sistematizada en la RFE tanto de los métodos analíticos que se utilizan como en las monografías de los diferentes productos a estudiar.
- Se identificaron los parámetros que permiten la “Identificación”.
- A partir de las ideas sustraídas, se ha procedido a la redacción atendiendo a la estructura establecida para la realización del Trabajo de Fin de Grado por la Facultad de Farmacia.

- Por último, se ha añadido al final del trabajo la bibliografía utilizada, siguiendo la aparición cronológica en el texto.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. MÉTODOS ÓPTICOS

#### 6.1.1. Métodos espectroscópicos

##### A) **Espectrofotometría de absorción en el infrarrojo (IR)**

Se trata de una de las mejores herramientas para resolver problemas de análisis estructural y de identificación molecular.

La espectrometría infrarroja se basa en el hecho de que los enlaces químicos de las sustancias tienen frecuencias de vibración específicas, que corresponden a los niveles de energía de la molécula. Estas frecuencias dependen de la forma de la superficie de energía potencial de la molécula, la geometría molecular, las masas atómicas y, posiblemente, el acoplamiento vibracional.

Para el análisis cualitativo y estructural utilizando esta técnica, partimos de muestras lo más puras posibles para obtener resultados adecuados. Una vez realizado el espectro de absorción IR se seleccionan las bandas más intensas y se procede a la identificación de los grupos funcionales a partir de las bandas características. Se intenta identificar las bandas de intensidad moderada y/o débil. Una vez identificadas se compara el espectro obtenido con los pertenecientes a una colección de sustancias estándares.

Se realiza mediante la utilización de espectrofotómetros que miden espectros en la región de 4000-650  $\text{cm}^{-1}$ .

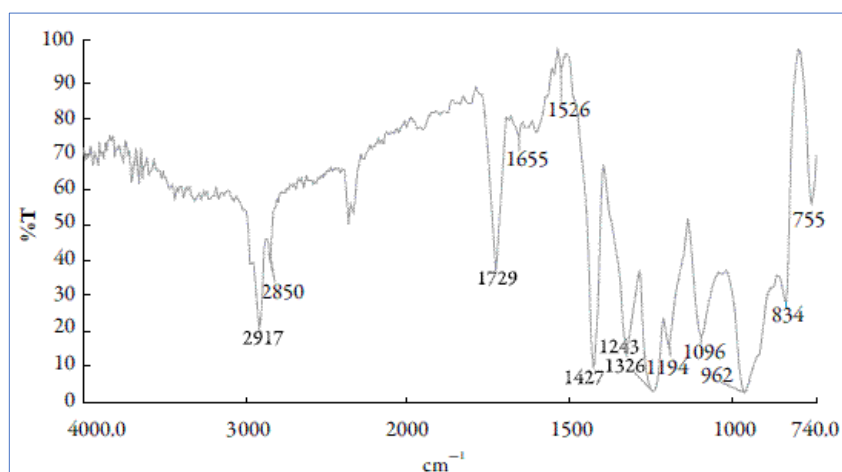
El espectro registrado se presenta en función de la absorbancia (A) siendo ésta el logaritmo decimal del inverso de la transmitancia (T) como indica la siguiente fórmula:

$$A = \log_{10} (1/T) = \log_{10} (I_0/I)$$

Donde  $I_0$  es la intensidad de la radiación monocromática incidente, I es la intensidad de la radiación monocromática transmitida y  $T = I/I_0$ .

Para la identificación de sustancias, se prepara una muestra de la sustancia que se quiere examinar y una muestra de una sustancia de referencia, siendo ambas preparadas según el mismo procedimiento.

También se recurre con mucha frecuencia a la utilización de espectros de referencia para dicha identificación. En definitiva, se compara el espectro obtenido con el espectro de una sustancia patrón o con espectros procedentes de una base de datos aceptada por la FE.



Dentro de las técnicas de absorción en el IR diferenciamos dos tipos. Los equipos instrumentales dispersivos están siendo desplazados por los espectrómetros con transformada de Fourier (IR-FT).

• Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier

En un instrumento FT-IR generalmente se incluye un interferómetro que permite trabajar con un espectro en el dominio del tiempo para posteriormente mediante un algoritmo matemático (Transformación de Fourier) transformarlo en un espectro en el dominio de la frecuencia que se puede interpretar más fácilmente. La ventaja es que estos instrumentos proporcionan una información mucho más sensible que los equipos clásicos.

• IR de reflectancia

La espectroscopia de IR de reflectancia también se utiliza en la identificación.

El parámetro que se mide es la intensidad de reflectancia relativa  $f(R'_{\infty})$ . Se determina mediante la fórmula:

$$f(R'_{\infty}) = \frac{(1 - R'_{\infty})^2}{2R'_{\infty}} = \frac{k}{s}$$

Donde  $R'_{\infty}$  es el cociente entre la intensidad reflejada por la muestra y la de un patrón no absorbente;  $k$  es el coeficiente de absorción molar del analito y  $s$  es el coeficiente de dispersión.

Algunos de los productos que se identifican utilizando esta técnica son: **Azitromicina, Ebastina y Omeprazol**

### **B) Espectrofotometría de absorción en el ultravioleta y en el visible (UV - visible)**

Los espectros de absorción UV y visible son menos útiles con fines cualitativos que los espectros en la región infrarroja ya que las bandas son más anchas aportándonos menos características.

La utilización del espectro de absorción en las regiones UV y visible puede ser de utilidad para la detección de ciertos grupos funcionales, aunque siempre deben confirmarse los datos en combinación con los obtenidos a partir de espectros en el IR, de resonancia nuclear o cualquier otra información analítica de la que se disponga.

En cuanto a lo que al método se refiere, también se basa en la determinación de la absorbancia según la ecuación:

$$A = \log_{10} (1/T) = \log_{10} (I_0/I)$$

La absorbancia  $A$  corresponde a una relación logarítmica entre la intensidad incidente ( $I_0$ ) y la transmitida ( $I$ ).

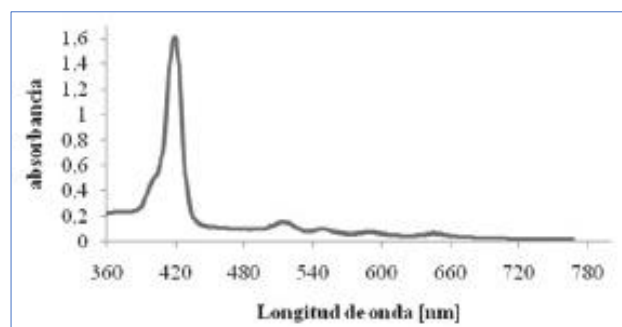
Se ha visto, que si no existen otros factores fisicoquímicos que den lugar a errores, la absorbancia ( $A$ ) es proporcional al espesor de la capa ( $b$ ) que atraviesa la radiación, es decir, a la anchura de la cubeta, y a la concentración ( $c$ ) de la sustancia en disolución, siguiendo esta ecuación:

$$A = \epsilon c b$$

Donde  $\epsilon$  es la absorptividad molar, si  $b$  se expresa en centímetros y  $c$  en moles por litro.

A su vez, se puede medir la absorbancia específica de una sustancia disuelta. Esta absorbancia específica se refiere a la absorbancia de una disolución de 10 g/L en una cubeta de 1 cm de medida a una longitud de onda definida:

$$A_{1 \text{ cm}}^{1 \text{ por ciento}} = 10\epsilon / M_r$$



El coeficiente de absorción molar ( $\epsilon$ ) está relacionado con la longitud de onda de la radiación, el disolvente utilizado y el índice de refracción de la disolución.

Por ello, la RFE establece que es importante que en el espectrofotómetro se realicen controles de ciertos parámetros como son las longitudes de onda, la absorbancia, la resolución, la anchura de la rendija espectral y la cubeta.

Algunos de los productos que se identifican utilizando esta técnica son: **Ibuprofeno**, **Codeína** y **Alopurinol**.

### 6.1.2. Métodos no espectroscópicos

#### A) Refractometría

La refractometría se basa en la medición del índice de refracción de sustancias líquidas o sólidas, definiéndose éste como el cociente entre el seno del ángulo de incidencia ( $\text{sen } i$ ) y el seno del ángulo de refracción ( $\text{sen } r$ ) de la luz monocromática, al pasar de un medio menos denso generalmente aire a un medio más denso.

$\frac{n_2}{n_1} = \frac{v_1}{v_2} = \frac{\text{sen } i}{\text{sen } r}$	En el vacío: $n_1 = 1$	y	$v_1 = C$
Entonces se obtiene: $n_2 = \frac{C}{v_2} = \frac{\text{sen } i}{\text{sen } r}$			
En general: $n_i = \frac{C}{v_i} = \frac{\text{sen } i}{\text{sen } r}$			
Donde:			
$n_i$ = Índice de refracción de la sustancia			
$C$ = Velocidad de propagación en el vacío (es constante)			
$v_i$ = Velocidad de propagación en el medio			

El índice de refracción depende fuertemente de la composición de la muestra, de la temperatura y de la longitud de onda de la luz utilizada, se suele medir  $n$  a una  $\lambda$  que corresponde a la línea D= 589nm y a T=20, 25 o 40°C y se denota como:  $n_D^t$ .

La refractometría, por tanto, puede ser utilizada cualitativamente para identificar y caracterizar una especie química, para identificar sustancias desconocidas por comparación con

valores tabulados en la literatura, o bien para la identificación de compuestos puros, correlacionado con los puntos de ebullición y fusión

Algunos de los productos que se identifican utilizando esta técnica son: **Alcohol bencílico, Acetato de etilo y Cineol.**

## **B) Polarimetría**

La polarimetría nos permite medir el cambio que sufre el plano de luz polarizada cuando atraviesa un medio transparente formado por sustancias ópticamente activas.

La luz polarizada se obtiene cuando se logra que la radiación vibre en un solo plano con respecto al haz de la trayectoria. La luz polarizada se obtiene por reflexión y por refracción.

La rotación óptica es la propiedad que presentan las sustancias quirales de rotar el plano de polarización de la luz polarizada. Se va a considerar positiva (+) en el caso de las sustancias dextrógiras (es decir, las que rotan el plano de polarización en el sentido de las agujas del reloj) y negativa (-) en el caso de las sustancias levógiras.

La capacidad rotatoria de una molécula ópticamente activa es constante para unas condiciones determinadas por lo que se utiliza en su caracterización. Además, la capacidad rotatoria sirve para determinar la concentración, cuando existe proporcionalidad con respecto a la concentración de la sustancia en disolución y si la medida se realiza a espesor de capa constante

La rotación óptica específica es la rotación, expresada en radianes (rad), medida a la temperatura  $t$  y a la longitud de onda  $\lambda$  dada por una capa de 1 m de espesor de un líquido o de una disolución que contiene  $1 \text{ kg/m}^3$  de sustancia ópticamente activa. Por razones prácticas, la rotación óptica específica se expresa normalmente en miliradianes-metro cuadrado por kilogramo ( $\text{mrad} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$ ).

En el sistema convencional adoptado por la Farmacopea, la rotación óptica específica se expresa por su valor sin unidades; se sobreentienden las unidades reales, grados-mililitro por decímetro y por gramo [ $(^\circ) \cdot \text{ml} \cdot \text{dm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ].

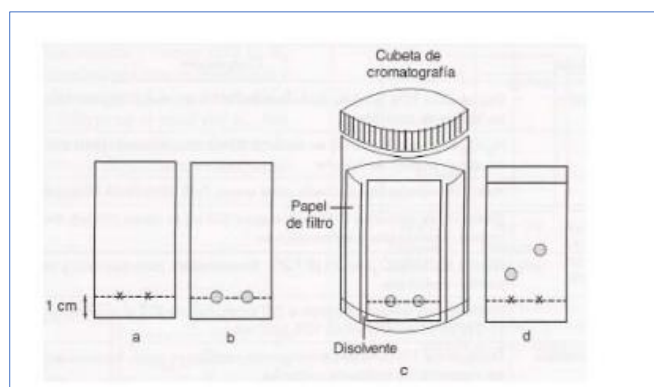
Son numerosos los productos que se identifican utilizando esta técnica, siendo alguno de estos la **Simvastatina, Levonorgestrel y Fenilefrina.**

## 6.2. MÉTODOS DE SEPARACIÓN

### 6.2.1. Cromatografía en capa fina (CCF) o Thin Layer Chromatography (TLC)

La CCF es un método de separación cromatográfica que se utiliza para separar moléculas relativamente pequeñas. Al igual que en otras cromatografías encontramos una fase estacionaria y una fase móvil. La fase estacionaria se encuentra extendida en una capa fina sobre un soporte, mientras que la fase móvil estará en estado líquido en la cámara donde se llevará a cabo la cromatografía.

La muestra con la sustancia que queremos identificar se depositará en pequeñas gotas sobre la base estacionaria marcando donde se ha depositado. En la fase estacionaria también se depositarán las sustancias de referencia. La sustancia de interés se adhiere a la fase estacionaria o se mueve con la fase móvil desplazándose a una distancia inversamente proporcional a su afinidad por la fase estacionaria.



Esta técnica se puede realizar mediante dos desarrollos:

#### • **Desarrollo vertical:**

El método se debe realizar durante con la cámara cromatográfica saturada. Para ello, se deberá colocar papel de filtro en el interior de la cámara. Antes de colocar la fase estacionaria dentro de la cámara, se debe dejar reposar la cámara cerrada durante 1 hora a 20-25°C. Una vez transcurrido este tiempo, se introduce la fase estacionaria dentro de la cámara y ésta se cierra dejando que la fase móvil ascienda por la fase estacionaria arrastrando así los analitos.

#### • **Desarrollo horizontal:**

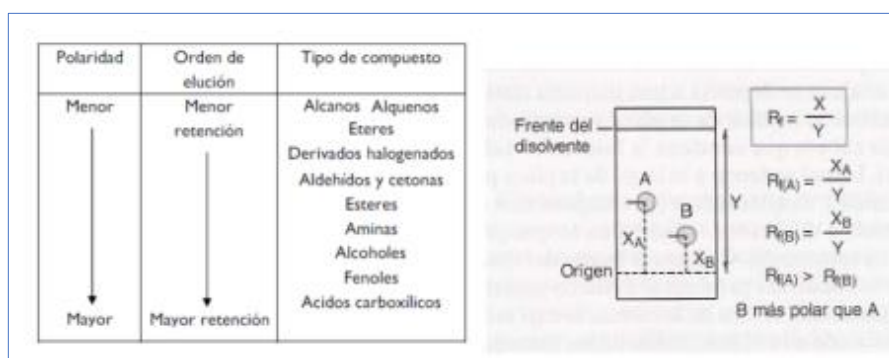
En este caso, la fase estacionaria se situará de forma horizontal y será un dispositivo el que ayude a que se mueva la fase móvil.

Una vez la fase móvil haya recorrido la fase estacionaria hasta la distancia fijada, se dejará secar y después se observarán las manchas a simple vista y con algún sistema de revelado como puede ser con radiación ultravioleta.

Para identificar la sustancia, se calculará el factor de retardo ( $R_f$ ) mediante la fórmula:

**$R_f = \text{distancia a la que se encuentra el punto central de la mancha} / \text{distancia recorrida por la fase móvil}$**

Comparando este valor, podremos identificar la sustancia de la que se trata.

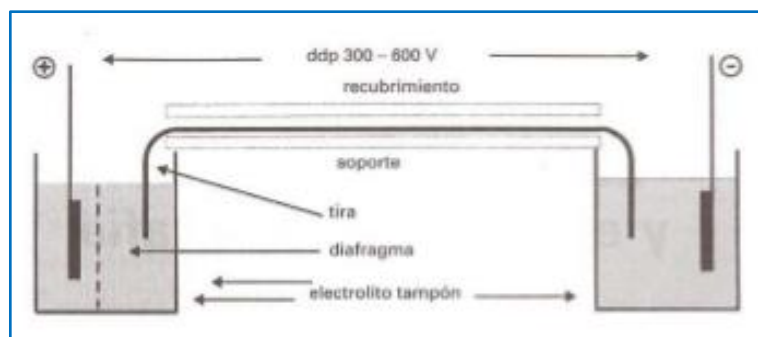


Algunos de los productos que se identifican utilizando esta técnica son: **Amoxicilina sódica, Ampicilina sódica y Fenobarbital.**

### 6.2.2. Electroforesis

Se trata de una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico a través de una matriz porosa impregnada de un electrolito. La separación será por tamaños moleculares o por carga eléctrica dependiendo de la técnica que se use.

Bajo la acción de un campo eléctrico, las partículas cargadas disueltas o dispersadas en una disolución electrolítica migran hacia el electrodo de polaridad opuesta.



Las interacciones opuestas de la fuerza eléctrica y del tamiz molecular dan lugar a velocidades de migración diferenciales según el tamaño, la forma y la carga de las partículas.



Debido a sus diferentes propiedades fisicoquímicas, las diversas macromoléculas de una mezcla migrarán a diferentes velocidades durante la electroforesis, y serán así separadas en fracciones discretas.

Las separaciones electroforéticas se pueden realizar en sistemas sin fase soporte (por ejemplo, la separación por electroforesis capilar libre en disolución) o en medios estabilizantes tales como placas de capa fina, películas o geles.

Aunque existen varias técnicas electroforéticas, las más utilizadas son:

#### • **Electroforesis libre o de frente móvil**

Este método se utiliza principalmente para la determinación de la movilidad, empleándose sustancias de masa molecular relativa alta y de baja difusibilidad.

Los frentes se localizan inicialmente por un procedimiento físico tal como refractometría o conductimetría. Después de la aplicación de un campo eléctrico definido durante un tiempo exactamente medido, se observan los nuevos frentes y sus posiciones respectivas.

Las condiciones de operación deben hacer que sea posible determinar tantos frentes como componentes hay.

#### • **Electroforesis de zona utilizando un soporte**

Este método requiere el uso de muestras pequeñas. La naturaleza del soporte, tal como papel, gel de agar, acetato de celulosa, almidón, agarosa, metacrilamida, gel mixto, introduce una serie de factores adicionales que modifican la movilidad.

La velocidad de migración va a depender de cuatro factores principales:

- La movilidad de la partícula cargada
- El flujo electroosmótico
- El flujo de evaporación
- La intensidad del campo.



Por ello, es necesario operar en condiciones experimentales claramente definidas y utilizar, siempre que sea posible, sustancias de referencia.

Dentro de las electroforesis de zona utilizando un soporte, podemos diferenciar:

- Electroforesis en tiras

La tira soporte se humedece previamente con la disolución conductora y con cada extremo sumergido en un compartimento de los electrodos, se tensa apropiadamente y se fija sobre un portasoportes adecuado diseñado para evitar la difusión del electrolito conductor.

- Electroforesis en gel

Consiste en una placa de vidrio en la que se deposita, sobre toda su superficie, una capa de gel firmemente adherente de espesor uniforme. La conexión entre el gel y la disolución conductora se realiza de diferentes maneras, debiéndose tomar precauciones para evitar la condensación de la humedad o el secado de la capa sólida.

- Otras: electroforesis capilar electrocinética micelar (MECK), isoelectroenfoque capilar (CIEF)

Algunos de los productos que se identifica utilizando esta técnica es la condroitina.

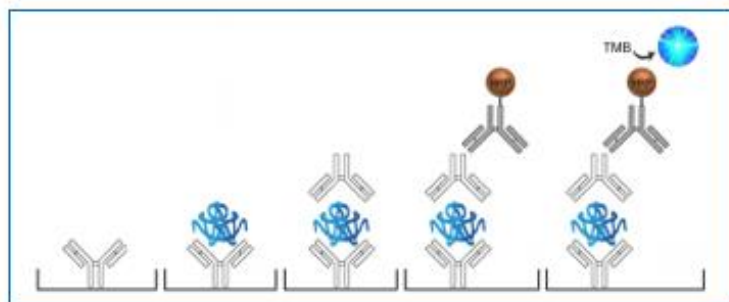
### **6.3. OTROS MÉTODOS**

#### **6.3.1 ELISA**

Los ensayos inmunológicos son procedimientos en los cuales se utilizan anticuerpos como reactivos enlazantes “específicos” teniendo como la determinación o cuantificación de fármacos terapéuticos y no terapéuticos, diversas sustancias biológicas, sustancias infecciosas o anticuerpos de respuesta del huésped en el suero, en la orina, en el líquido cefalorraquídeo en saliva y en cualquier líquido biológico donde se encuentre la sustancia a investigar.

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utiliza un enzima como marcador para mediar la formación de complejos antígeno-anticuerpo. Son ensayos en fase sólida en los cuales se adsorbe un antígeno o un anticuerpo sobre un soporte sólido.

Se requiere de un paso de separación para eliminar el conjugado enzimático libre antes de proceder a determinar la cantidad de conjugado enzimático enlazado. Esto se realiza a través de la adición de un sustrato enzimático y se mide la reacción catalítica entre la enzima y el sustrato.



La prueba ELISA se basa en varias teorías:

- El antígeno y anticuerpo pueden enlazarse a una superficie portadora insoluble y retener su reactividad inmunológica
- Las enzimas tienen actividad específica alta y convierten una cantidad relativamente grande de sustrato en producto detectable, lo que permite detectar concentraciones muy bajas del ligando
- La actividad enzimática o reactividad inmunológica de los conjugados se preserva y permanece estable durante el análisis y el almacenamiento
- Las enzimas no están presentes en el líquido biológico que se va a analizar.

Los anticuerpos utilizados en el método ELISA son de origen monoclonal o policlonal, suministrándose como antisuero no fraccionado o fracciones de inmunoglobulina purificada pudiendo ser solubles o estar inmóviles en un soporte sólido.

## **7. CONCLUSIONES**

Las principales conclusiones que hemos obtenido son:

- La utilización de los métodos analíticos es esencial para la identificación de múltiples productos, los cuales no pueden ser identificados por otras vías.
- Los métodos analíticos utilizados para la identificación de sustancias activas son muy diversos. Muchos de estos métodos que se utilizan para la identificación también son aplicados a los ensayos para identificar impurezas admitidas y desconocidas y establecer sus límites, así como para la valoración.
- No todos los métodos son igual de útiles para dicha identificación, sino que depende del grupo y tipo de sustancia a identificar.
- Los métodos más utilizados son la cromatografía en capa fina (CCF) y la espectrofotometría de absorción en el infrarrojo.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- España. Ministerio de Sanidad y Consumo. **Real farmacopea Española**. 5ª ed. [Madrid]: Ministerio de Sanidad y Consumo, Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios; 2015.
- **European pharmacopoeia**. 9<sup>th</sup> ed. Strasbourg: Council of Europe; 2017.
- Fischer R, Peters D. **Compendio de análisis químico cuantitativo**. 1st ed. Mexico: Centro Regional de Ayuda Técnica, Agencia para el Desarrollo Internacional; 1970.
- Harris D, Balahura R. **Análisis químico cuantitativo**. 3rd ed. [Barcelona]: Reverté; 2010.
- Fischbach R. Book Review: **Non-Chromatographic Continuous Separation Techniques**. By M. Valcárel and M. D. Luque de Castro. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1992;31(4):484-484.
- Ródenas de la Rocha S, Martín Gómez C, Sánchez-Paniagua López M. **Manual de química analítica II**. 1st ed. [Madrid]: Compañía Española de Reprografía y Servicios; 2012.
- Günzler y Gremlich, W. **IR Spectroscopy, an introduction**, 2002
- B.Stuart John Wiley & Sons, **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**, 2004
- Braithwaite, A. **Métodos cromatográficos**, 4ª ed., ED. Chapman & Hall, Londres, 1985. Páginas 216- 217, 271-272.
- Guzmán-Vázquez, E. V. **Las pruebas de Elisa**. *Gac Méd Méx* Vol. 140, Suplemento No. 3, 2004
- Rouessac, F., Rouessac, A. and Cuadros Rodríguez, L. (2010). **Análisis Químico**. 1st ed. Madrid: McGraw-Hill.