

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



TESIS DOCTORAL

**Separación y determinación de sustancias presentes en  
mezclas analgésicas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**María Isabel Rico Selas**

DIRECTOR:

**Segundo Jiménez Gómez**

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5326700132

T1  
660  
RIC

SEPARACION Y DETERMINACION DE SUSTANCIAS PRESENTES  
EN MEZCLAS ANALGESICAS.

Memoria presentada para optar al  
grado de Doctor, por Maria Isabel  
Rico Selas, Licenciada en Ciencias  
Químicas.

Madrid, Septiembre 1975

b16593376  
i27651699

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE - MADRID  
Facultad de Ciencias Químicas  
BIBLIOTECA  
Nº Registro...33508

En primer lugar, deseo agradecer muy sinceramente al Excmo. Sr. Prof. D. Angel Vian Ortuño, Decano y Catedrático de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, el padrinazgo de este trabajo para su presentación en la Facultad; esto es una prueba más de su reconocida dedicación universitaria y permanente magisterio.

Este trabajo ha sido realizado en la Cátedra de Química de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros - Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid, bajo la dirección de su titular Prof. Dr. D. Segundo Jiménez Gómez, quien sabe muy bien, y por encima de unas protocolarias palabras, que le agradezco profundamente sus orientaciones, directrices, enseñanzas y estímulo, así como todo el tiempo que me ha dedicado.

Asimismo, en este momento, no puedo omitir mi recuerdo de gratitud, para todos aquellos amigos y compañeros que de alguna forma me han ayudado a su realización, especialmente José Luis Torre Noceda.

# I N D I C E

	<u>Pág.</u>
I. OBJETO E INTRODUCCION .....	1
II. REVISION BIBLIOGRAFICA .....	11
III. CONSIDERACIONES PREVIAS	
III.1. Características de las sustancias en estudio .....	31
III.2. Técnicas aplicadas .....	36
III.3. El Sephadex y sus propiedades sepa- rativas .....	42
IV. SEPARACIONES EN MEDIO ETANOLICO	
IV.1. Elección del disolvente .....	50
IV.2. Separación con etanol .....	52
IV.3. Separación en presencia de un elec- trolito .....	66
IV.4. Separaciones con etanol-láctico ....	67
IV.5. Separaciones con Tris en etanol ....	78
IV.6. Determinaciones cuantitativas .....	84
V. SEPARACIONES EN ISOPROPANOL	
V.1. Elección del disolvente .....	92

	<u>Pág.</u>
V.2. Estabilidad de las sustancias en iso- propanol puro y con aditivos de áci- do láctico y de Tris .....	93
V.3. Separaciones en isopropanol puro ...	98
V.4. Separaciones con ácido láctico 1 % en isopropanol .....	101
V.5. Separaciones con Tris 0,05 M en iso- propanol .....	103
V.6. Determinaciones cuantitativas .....	105
 VI. SEPARACIONES EN MEDIO ACUOSO	
VI.1. Solubilización en medio acuoso ....	111
VI.2. Estabilidad de las sustancias en di- solución acuosa .....	114
VI.3. Separaciones en medio acuoso con -- láctico 0,5 % .....	118
VI.4. Separación con disoluciones acuosas de Tris .....	129
VI.5. Determinaciones cuantitativas .....	139
VII. CONCLUSIONES .....	148
VIII. BIBLIOGRAFIA .....	154

I. OBJETO E INTRODUCCION

De forma paralela con el desarrollo científico y técnico general, la industria quimico-farmacéutica ha experimentado en los últimos años un considerable crecimiento tanto en lo que se refiere a la creación de nuevos productos de síntesis como en la formulación de preparados de un mayor espectro de acción. En este aspecto, los tradicionales productos analgésicos presentan hoy una notable complejidad, no sólo por la presencia conjunta de varios principios activos sino también por la variedad de excipientes, estabilizantes o agentes de conservación utilizados. Las diferencias existentes entre diversos preparados no se basan únicamente en que contengan distintos principios activos o en la forma de su presentación, lo que sólo supondría usar diferentes excipientes o vehículos, sino que formulaciones que "a priori" podrían suponerse de composición análoga pueden no serlo, tanto cualitativa como cuantitativamente, como consecuencia de los diferentes objetivos que con la droga se pretendan, tales como mayor o menor rapidez de acción, efectos sinérgicos etc.

Todo ello obliga a una evaluación continua de productos muy diversos para asegurar calidad y uniformidad en el preparado comercial.

La consecuencia inmediata es que la Química Analítica, en la Industria Químico-Farmacéutica, se ha visto obligada al igual que en otros campos, a superar los tradicionales métodos analíticos, sustituyéndolos o complementándolos con métodos físico-químicos que permitan la valoración de varios principios activos presentes simultáneamente en la sustancia a analizar. La espectrofotometría infrarroja, la ultravioleta, la visible, la cromatografía en sus diferentes variantes, la espectrometría de masas etc, constituyen hoy instrumentos indispensables para el adecuado control y vigilancia de este tipo de productos.

Dentro de los fármacos, los de acción analgésica tienen actualmente un consumo muy cualificado, hasta el punto de que sólo en el mercado nacional existen más de doscientos preparados distintos en los que intervienen como productos activos especies químicas en número superior a cincuenta, que alcanzan desde el tradicional ácido acetil salicílico hasta compuestos de uso más reciente como pueden ser las pirazolonas.

De aquí que el objeto del presente trabajo sea la determinación analítica de mezclas de sustancias usualmente presentes en productos analgésicos comerciales. Ante la imposibilidad y carencia de objetivos --

prácticos de abordar el problema en la totalidad de las sustancias utilizadas en la actualidad para estos fines, el presente trabajo tiene por objeto la separación y valoración cuantitativa de: Acido 2 acetiloxibenzoico (ácido acetil salicílico), 3H Pirazol 3 ona 4 Dimetilamino 1,2 dihidro 1,5 dimetil 2 fenil (aminopirina), 3H Pirazol 3 ona 1,2 dihidro 1,5 dimetil 2 fenil (antipirina), 1 H Purina 2,6 diona 3,7 dihidro 1,3,7, trimetil (cafeina), Morfina 6  $\alpha$  ol 7,8 didehidro 4,5  $\alpha$  epoxi 3 metoxi 17 metil (codeina), Acido 2 hidroxibenzoico (ácido salicílico), p-acetofenetidina o acetamida N 4 etoxifenil (Fenacetina), acetaminofen 4 hidroxil (paracetamol), Acetanilida 4 hidroxil-paracetamol (o-etoxibenzamida) y 2 hidroxibenzamida (salicilamida), por ser las más usadas en las tradicionales - asociaciones analgésicas.

En ningún preparado se encuentran los diez productos juntos ya que, lo más frecuente, son mezclas - analgésicas de cuatro, o a lo sumo cinco, productos - activos. Lo que se pretende pues, no es un método de separación de los diez productos juntos, aunque sería ideal encontrarlo, sino un método fácil y versátil - que permita la determinación de un gran número de posibles asociaciones de tres o más de ellos.

5.

Conviene hacer notar que el ácido salicílico no se usa como analgésico, por sus efectos secundarios, pero sin embargo aparece como consecuencia de la hidrólisis del ácido acetil salicílico. El interés de su determinación, y el motivo de haberle incluido, radica -- pues en esta circunstancia.

Uno de los métodos analíticos que ofrece hoy mayores posibilidades separativas es sin duda, el cromatográfico, en sus diferentes variedades de cromatografía en columnas de adsorción, reparto, intercambio iónico y filtración molecular, así como la cromatografía de papel, cromatografía en capa fina y en fase gaseosa. Todos estos métodos están en constante mejora como consecuencia de la incorporación de equipos complementarios que facilitan su aplicación, al mismo tiempo que contribuyen a que la operación sea sencilla y rápida. Así ocurre con los detectores de alta sensibilidad para la cromatografía de gases, con los densitómetros que aplicados a la cromatografía en placa fina permiten la determinación de compuestos sobre la misma placa por - espectrofotometría o por espectrofotofluorometría, sin necesidad de previa extracción, o bien, en el caso de la cromatografía en columna, con la utilización de colectores de fracciones y espectrofotómetros con células

de flujo continuo, que permiten automatizar el análisis en columna.

Por otra parte los métodos cromatográficos no só lo tienen alcance separativo sino que pueden utilizarse con fines cuantitativos basándose en ciertos parámetros como son el volumen de elución, tiempo de retención,  $R_f$  etc.

Esto explica la frecuencia con que métodos croma tográficos se aplican en la actualidad, incluso a nivel de procedimientos normalizados, hasta el punto de que organismos supranacionales, como la C.E.E., los incluyan entre sus métodos analíticos para productos químicos de aplicación farmacéutica.

Como es lógico, cada una de las variantes croma tográficas tiene un campo de aplicación, como consecuencia del tipo de productos a separar y de la concentración de los mismos. Así, por ejemplo, la cromatografía gaseosa es de reciente utilización en el análisis de -- fluidos biológicos, en los que en general, los produc-- tos a valorar tienen una baja concentración. En nuestro caso presenta ,sin embargo, la limitación de que los pro ductos no son volátiles y requieren tratamientos previos a la inyección de la muestra.

La cromatografía en placa fina, quizá la más difundida por su fácil manejo, requiere soluciones cromatográficas concentradas por el pequeño volumen que se utiliza.

La cromatografía de papel, además de presentar iguales dificultades que la placa fina, es más lenta y proporciona separaciones menos netas.

Finalmente la cromatografía en columna es la que en principio ofrece mayores posibilidades para su aplicación al caso planteado. Para justificar su elección se disponía de antecedentes bibliográficos. Levine (1) ha recogido una extensa variedad de métodos cromatográficos en columna y pone de manifiesto la importancia de este tipo de cromatografía de partición en análisis farmacéutico.

De las diferentes clases de cromatografía de columna se eligió la de cromatografía de gel, de desarrollo relativamente reciente, utilizando como soporte los geles denominados Sephadex. Este soporte está constituido por geles de dextranos que, por sus características, parecían los más adecuados para separar los productos pretendidos.

Por otra parte el soporte carece prácticamente -

de impurezas por lo que los primeros volúmenes de eluido de la columna no presentan absorbancia ni siquiera - en la zona del ultravioleta, que es en la que se ha de efectuar la determinación cuantitativa de las diferentes sustancias una vez separadas, ya que todas ellas - tienen grupos cromóforos con máximos de absorbancia en la zona 230 - 310 m  $\mu$ .

El Sephadex ofrece además una serie de ventajas, tal como su estabilidad química, lo que permite el empleo de muy variados eluyentes, y no se compacta en exceso, pudiéndose utilizar flujos bastante altos.

Por último el propio mecanismo de separación hace posible que la columna quede regenerada en el mismo proceso separativo.

Normalmente estos geles se han usado para separaciones basadas en el tamaño molecular, sin embargo también se han observado fenómenos sobre las redes debido a la presencia de núcleos aromáticos cuya acción puede incrementarse por la coexistencia de grupos fenoles, --aminos, ácidos benzoicos y, en general, por grupos que contienen nitrógeno, oxígeno o ambos a la vez, circunstancia que concurre en la totalidad de los productos --elegidos.

En el presente trabajo no se pretende pues utili

zar el Sephadex en su sentido más tradicional, en el -  
que las separaciones se consiguen como consecuencia de  
los tamaños moleculares, ya que esto no sería posible -  
en este caso dada la escasa diferencia existente entre  
las masas moleculares de los diferentes compuestos. Por  
el contrario, se trata de intentar la separación a tra--  
vés de mecanismos de adsorción que pueden modificarse -  
en diferente cuantía para las distintas sustancias al -  
cambiar el tipo de disolventes, por la adición de elec-  
trolitos, o por la variación de acidez.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

Dada la amplia utilización de los productos analgésicos, se han desarrollado gran variedad de métodos - separativos y de determinación, si bien ninguno alcanza objetivos tan amplios como los que se pretenden en este trabajo.

La síntesis de los dextramos se inicia en 1954 - por Arond y Frank (2) pero las primeras aplicaciones -- analíticas se deben a Flodin e Ingelman (3) en 1959. Por esta circunstancia los antecedentes bibliográficos consultados no se remontan a fechas anteriores.

A partir de la fecha citada se ha realizado una revisión bibliográfica muy detallada, aunque, para evitar reiteraciones, sólo se recojan en este capítulo los aspectos más destacables de la misma. Globalmente considerada, se puede observar que existen trabajos relativos a la identificación, separación ó valoracion de sus tancias, tanto aisladas como en mezclas, aunque en ocasiones se pretenden los tres objetivos conjuntamente.

Los procedimientos empleados son muy diferentes, N. Kentzkam y col. (4) determinan ácido acetil salicílico en mezclas con otros compuestos por métodos alcalimétricos. E. Adamová (5) propone una valoración complexomé

trica, por retroceso, para la determinación de fosfato de codeína. M. Kranjelvic (6) y col. precipitan el fosfato de codeína con Kalignost a pH 4-5 y pH 10, -- aprovechando la circunstancia de que la aminopirina - precipita sólo a pH 4-5, separándolos, pues, por precipitación fraccionada. El procedimiento se puede utilizar, incluso, en presencia de fenacetina y cafeína. I. Bozsai y col. (7) aplican procedimientos volumétricos y gravimétricos para separar y determinar mezclas de ácido acetil salicílico, cafeína y fenacetina. Budesinsky (8) determina, a escala semimicro, codeína y brucina, por precipitación con complexonato de cadmio, valorando el exceso del mismo, con cloruro cálcico en presencia de azul de metiltimol.

Utilizando sulfato de cerio tretravalente, V. Laszlo (9) determina fenacetina en drogas, con indicador I-ferroina, en presencia de etilmorfina, cafeína, ácido acetil salicílico y fenobarbital.

La aminopirina ha sido determinada por J. Dick (10) mediante la formación de un quelato insoluble - con níquel, realizando después una valoración complejométrica, con murexida como indicador. Esta determinación es, sin duda, del mayor interés puesto que puede efectuarse en presencia de otros productos, aun --

cuando la precisión es sólo de  $\pm 0,8\%$ . N. Kreutzkamp (11) determina también aminopirina por medio de oxidimetrías, aplicable a muestras del orden de 30 a 40 mg., o bien por acidimetría, en el caso de muestras de unos 200 mg; sin embargo, carece de especificidad. Manzoni y col. (12) determinan, cualitativa y cuantitativamente, mezclas de aminofenazona, barbital, fenacetina y codeína, mediante volumetrías de formación de complejos con metavanadato, sal de plata,  $\alpha$ -naftol y fosfomolibdato.

Haciendo uso del reactivo Nessler, R. Vasilico y col. (13) identifican, entre otros compuestos, antipirina y amidopirina, ultimando la determinación cuantitativa por gravimetría y complexometría.

Entre las valoraciones realizadas en medio no acuoso destacan los trabajos de G. Ghielmetti y C. Me la (14) aplicados a la morfina y codeína, que previamente se han separado por cromatografía. Asimismo, en medio no acuoso, se ha determinado por volumetría aminopirina (15), aislada o en mezclas con cafeína y codeína (16).

En líneas generales, se puede observar que las tradicionales ventajas de comodidad y rapidez de los

métodos volumétricos, se ven sensiblemente disminuidas, en el caso que nos ocupa, por el elevado número de interferencias recíprocas, lo que obliga con frecuencia a laboriosos procesos de separación, previos a la propia determinación, ya que rara vez excede de dos el número de sustancias determinables simultáneamente.

La separación por extracción con disolventes ha sido utilizada para determinar fenacetina (17), ácido salicílico y paracetamol (18), pero siempre, y a pesar de las simplificaciones incorporadas, los procedimientos resultan muy laboriosos y de dudosa garantía. Por otra parte, y aun preéindiendo del problema de la separación, la aplicación de métodos volumétricos queda limitada a una cierta concentración mínima de la sustancia a analizar, no siendo utilizables, de manera directa, cuando se trata de concentraciones "micro" o "semi-micro".

Una mejora en cuanto a la sensibilidad de los métodos volumétricos la constituye la potenciometría, de la que se encuentran numerosos ejemplos de valoraciones, en medio no acuoso, de varios de los productos que nos ocupan. Así, Mahoric (19) analiza muestras en polvo que contienen codeína en anhídrido acético y acetofenetidina en cloroformo; ambas sustancias se valo-

ran con ácido perclórico 0,1 M en dioxano. También -  
 Georgesqui (20) utiliza ácido perclórico 0,1 M para -  
 valorar codeína, antipirina, cafeína, fenacetina y --  
 aminopirina, en anhídrido acético como disolvente. En  
 el mismo sistema de anhídrido acético Ya Gurevich(21)  
 determina pequeñas cantidades de codeína en presencia  
 de otras sustancias, con un margen de error comprendido  
 do entre  $\pm$  0,96 y 2,2 %, y en un sistema anhídrido --  
 acético benceno (1:1), Concharova (22) y col. valoran  
 aminopirina, fenacetina y cafeína con disolución de -  
 ácido perclórico en dioxano como reactivo valorante.

N.P. Dzyuba y col., por potenciometría y en un  
 medio eter etílico-benceno, (23) determinan fenaceti-  
 na, en presencia de fenobarbital y ácido acetil sali-  
 cílico, con ácido clorhídrico 0,1 N disuelto en eta--  
 nol. Izmailov y col. (24) aplican también la potenciome  
 tría a la determinación de mezclas binarias de ami-  
 nopirina, cafeína y fenacetina en éter con electrodos  
 de vidrio y platino. Song-Ling y Blake (25), finalmente  
 te, valoran por potenciometría, ácido acetil salicílico  
 co, fenacetina y cafeína.

Las potenciometrías no sólo mejoran la sensibili  
 dad sino que aumentan las posibilidades de los método  
 dos volumétricos más tradicionales mediante la adecuada

da elección de electrodos; no obstante, el número de mezclas de las sustancias en estudio que es posible determinar, es relativamente limitado.

También se han realizado valoraciones conducti métricas de ácido salicílico en disoluciones acuosas con concentraciones del 0,05% (26). El método consiste en formar un complejo de coordinación entre el hie rro III y los grupos carbonilos. El procedimiento es muy satisfactorio, aun cuando condicionado a que no existan otras sustancias con grupos carbonilo o capaces de dar compuestos de coordinación con el hierro - III.

A título indicativo merece señalar que también los métodos refractométricos han permitido obtener -- buenos resultados en la determinación de cafeína en -- presencia de otros compuestos (27), pero limitado -- siempre a mezclas binarias.

Desde el punto de vista cuantitativo los métodos más idóneos, tanto por su sensibilidad como por -- su precisión son los fotométricos, incluyendo en --- ellos, como es lógico, tanto colorimetrías como espec trofotometrías. Su utilización ha sido tan extensa -- que obliga a limitar las referencias a la simple enumeración de las sustancias objeto de este estudio.

La colorimetría se ha aplicado a la determinación de ácido salicílico (28), ácido salicílico en aspirina (29), codeína (30) a (33), codeína y fenacetina (34), cafeína (35), cafeína, fenacetina y ácido acetilsalicílico (36) (37) y paracetamol (38) (39). Como se puede observar, sólo en muy limitados casos es posible una determinación simultánea.

Métodos fotométricos se emplean para determinar aminopirina (40), fenacetina (41) y cafeína-antipirina (42) (43), y la espectrofotometría en visible, para ácido acetyl salicílico en tabletas (APC) (44) - paracetamol (45) y etoxibenzamida (46), entre otros.

Dentro de este tipo de métodos los más generalizados son los de espectrofotometría U.V. Entre ellos, algunos sirven para determinar una sola sustancia, por ejemplo, ácido salicílico (47), otros permiten valorar dos, como ácido acetyl salicílico y ácido salicílico (48 a 51), aunque en algunos casos las dos sustancias de tipo analgésico que se analizan, se encuentran en presencia de otras de características diferentes: antipirina y aminopirina (52) aminopirina y cafeína ó codeína (53) y fenacetina-codeína (54). También se encuentran métodos para determinar tres (salicílico-cafeína-fenacetina), cuatro, e incluso cinco -

sustancias (55 a 58) aun cuando, como es lógico, son menos frecuentes.

El mayor problema que presentan este tipo de métodos es que al tratarse de sustancias de estructuras relativamente parecidas las interferencias son -- muy considerables. Sin embargo, en ocasiones se obtienen buenos resultados, ya sea por determinación directa de los componentes juntos (58) o utilizando diversos disolventes (57). En el primer caso, el cálculo que resulta es laborioso pues requiere utilizar sistemas de ecuaciones y las simplificaciones son aproximadas. Por otra parte, su posibilidad de aplicación es limitada, ya que requiere, al menos, una pequeña diferencia en las longitudes de onda en que presentan máximos en el espectro U.V los compuestos a determinar.

En caso de utilizar varios medios disolventes, el problema radica en el gran número de manipulaciones que exige el método y, además, en la escasa selectividad de las diversas extracciones. Todo ello obliga a establecer correcciones derivadas de la existencia, aun en pequeña concentración, de los demás productos presentes en la mezcla.

19.

Junto a los métodos espectrofotométricos se pueden incluir, por su relativa analogía, las fluorimetrías. Su aplicación al análisis de este tipo de sustancias ha sido realizada por Shane (59) y Soul L. (60), especialmente en lo que se refiere a la determinación de pequeñas cantidades de ácido salicílico y ácido acetil salicílico en tabletas y en sangre(61) (62). La operación se realiza en una sola etapa, eliminando previamente las interferencias, lo que supone un notable avance en relación con otros métodos de análisis directos. Posteriormente se ha aplicado también un método fluorométrico a la determinación de codeína y cafeína en tabletas, que contienen además ácido acetil salicílico y fenacetina, obteniéndose resultados del 99,7% para codeína y 98,9% para cafeína (63).

Dentro de los métodos espectroscópicos se emplea también la espectroscopia de I.R. para determinar pares de compuestos (64) y (65) y la R.M.N. para alcaloides (66) y mezclas de ácido acetil salicílico, fenacetina y cafeína (67), pero su uso no está muy difundido.

Los métodos espectroscópicos permiten identi-

ficar las sustancias o al menos determinar su pureza.

Para la identificación se han propuesto también otros variados procedimientos como es el de Nikolies (68) que se aplica a nivel microscópico para ácido acetyl salicílico, aminopirina, antipirina, cafeína y fenacetina, o bien el de V.G. Rubins (69) en el que por adición de unas gotas de cloroformo consigue formar mezclas complejas de microcristales a través de los cuales se pueden identificar cafeína y fenacetina, entre otros. Así mismo Lyndmila (70) identifica fenacetina, cafeína, antipirina, aminopirina, - ácido acetyl salicílico y codeína, a través de un proceso muy complejo en el que se emplean microreacciones con reactivos selectivos. En el aspecto qualitativo, probablemente este procedimiento es el que más se acerca al objeto pretendido en este trabajo, aun cuando en este caso se limita sólo a la fase de identificación.

Los métodos espectroscópicos ofrecen la dualidad de ser cualitativos y cuantitativos. El principal inconveniente, por otra parte común a los fotométricos y espectrofotométricos, es, como ya se indicó, sus interferencias. Por esta causa, en la mayor parte

de los casos han de ir precedidos de una obligada separación para la que, en general, se utilizan métodos cromatográficos.

Los métodos cromatográficos son, probablemente, los más indicados para separar, e incluso determinar, algunos de estos compuestos.

Mediante cromatografía sobre papel, R. Bourrichsen y col. (71), han separado e identificado cafeína, antipirina y fenacetina en tejidos humanos, realizando después la valoración por espectrofotometría U.V. De modo análogo, Mc. Connell y col. (72) separan ácido acetil salicílico y fenacetina utilizando disoluciones ácidas y diversos eluyentes, ácidos, básicos o neutros. J. Zamack (73) consigue separar codeína de otros alcaloides, y J. Vecerkova y col. (74) estudian el comportamiento de aminopirina, antipirina, fenacetina y cafeína frente a diferentes eluyentes, consiguiendo buenas separaciones. Seidlein (75) separa paracetamol de ácido acetil salicílico, fenacetina y salicilamida.

Merece también destacar la aportación de Michelina (76) en cuanto a aplicar la electroforesis sobre papel en la separación de ácido acetil salicí-

lico, cafeína y fenacetina. La identificación de los distintos compuestos se realiza después por medio de reveladores tales como vapor de yodo, ácido fosfomolibdico y vapor de yodo en medio nítrico, respectivamente.

Análogamente, sobre capa fina con silice, -- Gänshirt y Malzacher (77) separan cafeína, fenacetina y ácido acetil salicílico, logrando buenas separaciones cuando se eluye con mezcla ciclohexano-acetona (78). La separación se pone de manifiesto con luz ultravioleta, mientras que la determinación cuantitativa se realiza por espectrofotometría.

Combinando distintos métodos, Soeterboc H.M. y Van Thiel (79) analizan, cualitativa y cuantitativamente, cafeína, fenacetina y salicilamida; los compuestos se separan por cromatografía en capa fina sobre gel de silice G F-254, utilizando como eluyente etanol. Después de la elución las sustancias aisladas se extraen con eter etílico y se identifican por espectrofotometría, consiguiéndose resultados con un error máximo de 1 a 2 %. Igualmente, sobre láminas o microplatos, impregnados con formamida, Radulovic y col (80) separan cafeína, fenacetina y codeína; la extracción se hace con benceno y tolueno, utilizando

como reveladores fluoresceinato de sodio, cloruro-yoduro férrico y yoduro-nitrato mercurico, todos ellos - en disolución etanólica.

Por cromatografía en capa fina, Lieu van T. -- (81) consigue separar, en medio metanólico, ácido acetil salicílico, fenacetina y codeína, realizando la valoración cuantitativa por espectroscopía ultravioleta. Fellein y col (82), de forma parecida, separan y determinan fenacetina, aminopirina, cafeína y antipirina. Symonds (83) propone un método de identificación para ácido acetil salicílico, paracetamol y salicilamida por medio de los valores de Rf obtenidos después de una elución sobre capa fina.

Vukeevic y col. (84) realizan una cromatografía bidimensional, con posterior determinación cuantitativa, de mezclas que contienen ácido acetil salicílico, aminopirina, antipirina, cafeína, codeína y fenacetina. T. Bican (85) propone un procedimiento de separar aminopirina, fenetidina, codeína, cafeína, ácido acetil salicílico y otros, pero sólo logra separarlos en grupos. Los resultados obtenidos por G. -- Szasz y col. (86) son análogos, aunque utilizan distintos eluyentes para realizar separaciones en peque

ños grupos.

La cromatografía en capa fina, combinada con los procesos posteriores de extracción y la espectroscopia U.V., ha constituido un notable avance en cuanto a las posibilidades analíticas, no sólo por el nº de especies separables sino por la cantidad absoluta de sustancia que es posible determinar. Sin embargo, realizar con aceptable precisión determinaciones cuantitativas por cromatografía en capa fina exige disponer de un densitómetro, pues el desprendimiento mecánico de la sustancia separada y la posterior extracción de la misma no siempre proporcionan resultados absolutamente correctos. Por otra parte, aunque las posibilidades de separación aumentan con este procedimiento de forma considerable, se está muy lejos de haber llegado a un método analítico que comporte un mínimo grado de generalización, ya que cada caso requiere unas condiciones operativas concretas. Todo ello sin olvidar que la pequeña cantidad de muestra aplicada en las separaciones por capa fina obligan, en muchos casos, a que esta sea previamente concentrada mediante tratamientos específicos.

La cromatografía en columna tiene cada vez ma-

23.

yor difusión en todas sus variantes. El análisis por cromatografía gaseosa se ha utilizado, entre otros, por J. Hoffman y H. Mitchell (87) para separar ácido acetil salicílico, fenacetina y cafeína en preparados farmacéuticos, por R.C. Crippen y H.C. Freimuth (88) para separar y determinar ácido acetil salicílico y ácido salicílico. Los resultados que se obtienen son buenos, pero las posibilidades de aplicación son limitadas en cuanto al número de sustancias a analizar.

La cromatografía gas-líquido ha sido aplicada con éxito por Watson J.R. (89) para la determinación cuantitativa de ácido acetil salicílico en presencia de codeína, siendo posible, mediante previa metilación, determinar simultáneamente ácido acetil salicílico y salicílico (90). La cromatografía de líquido, se considera en la actualidad como un procedimiento adecuado y útil para analizar ácido acetil salicílico (91) así como para su separación de codeína (92). Con fines de control de calidad de drogas, Brendell (93), utiliza una cromatografía de líquido a bajas presiones para determinar fenacetina y codeína; la fase móvil está formada por cloroformo y la presión varía entre 32 - 33at.

La cromatografía de intercambio iónico también

ha sido bastante utilizada. En efecto, mediante un doble juego de resinas aniónicas y catiónicas, W. Kamp (94) separa la cafeína de un extracto líquido de semilla de cola, determinándola por gravimetría previa -- eliminación del disolvente. De forma análoga, es decir mediante resinas aniónicas y catiónicas, se separan -- fracciones de grupos de compuestos de carácter neutro, ácidos débiles y fuertes y bases, que después se someten a posteriores separaciones selectivas ultimando -- la determinación por espectrofotometría de U.V.; Yoshi no (97) ha determinado los coeficientes de distribu-- ción de varios alcaloides en resinas aniónicas, consiguiendo separar aminopirina, antipirina y cafeína -- bien por intercambio iónico o por exclusión iónica; -- el trabajo aporta referencias bastante amplias de los valores de Kd. También por cambio iónico Haberli (98) utilizando la resina Dowex 50-X-2 retiene antipirina, ácido salicílico, cafeína y fenacetina, que después -- se eluyen de forma diferencial con disoluciones de -- distintos pH. La fenacetina, cafeína y aminopirina se han separado de manera muy eficaz, por Reisch (99) a través de un doble proceso de cambio iónico con Ambe-- lita IR-120 y cromatografía de capa fina.

También se encuentran métodos de cromatografía

de partición y de adsorción, aunque a veces no se pueda establecer una clara diferenciación. Tal es el caso del procedimiento propuesto por Levine (100) que, aun con gran complejidad, permite separar ácido acetil salicílico, fenacetina y cafeína, que también es aplicable a mezclas de ácido acetil salicílico y ácido salicílico (101) (102). Este procedimiento se ha modificado de forma notable, con el fin de adsorber componentes ácidos (103). Empleando "Celita" impregnada con hidróxido sódico, se fijan grandes cantidades de ácido acetil salicílico y de ácido salicílico, que si bien no se eluyen con cloroformo ni con etanol, se pueden determinar directamente sobre el adsorbente o después de eliminar fenazona y aminopirina. Chmil (104), también por cromatografía de partición separa cafeína y codeína, eluyendo la cafeína con agua y la codeína con un tampón de pH 1,2.

El ácido acetil salicílico, la cafeína y la fenacetina también se han determinado mediante una nueva modificación del método de Levine (105). James, (106) utilizando columnas de Celita impregnadas con ácidos o bases, separa fenacetina y salicilamida, efectuando después la valoración por espectrofotometría U.V., y de forma muy parecida Pollino (107) separa fe

nacetina, cafeína y ácido acetyl salicílico que después valora por espectrofotometría U.V. Una vez más se pone de manifiesto que las posibilidades cromatográficas, en este caso las de cromatografía de partición, ofrecen mayor posibilidad separativa que los otros métodos en uso; sin embargo no se llega a procedimientos sencillos y el número de sustancias separadas sigue siendo relativamente pequeño.

Utilizando cromatografía de columna con soporte de alumina, M. Sarsunova y V. Schwarz (108) separan e identifican antipireticos y analgésicos. La identificación se hace mediante los valores de  $R_f$  realizando la separación por elución diferencial, con eluyentes selectivos de las especies separadas. De esta manera la cafeína se identifica y valora en mezclas de 2, 3 o 4 compuestos, pero interfiere la aminopirina. L.G. Andreeva (109) propone una separación cuantitativa de pares de sustancias por medio de una cromatografía de adsorción a través de una columna rellena con sílice, verificando las eluciones a distintos pH. En el trabajo figuran diagramas de desorción en función del pH para distintos eluyentes. El error de estas determinaciones es de 2%.

La cromatografía en columna, o por cambio ióni

co, tampoco resuelve pues, el problema de forma sencilla.

La utilización de los diferentes tipos de Sephadex se ha limitado, en relación con los productos - objeto de este estudio, a la separación de codeína, - juntamente con otros alcaloides procedentes del opio, empleando el tipo LH-20 y disoluciones acuosas (110). Para el resto de las sustancias consideradas no se han encontrado antecedentes, excepto para el ácido salicílico (111) y (112), pero nunca en presencia de las -- otras sustancias analgésicas cuyo estudio se pretende. Las complicaciones de los métodos propuestos, la difícil generalización de los mismos y el número relativamente limitado de especies que es posible separar, -- planteaban la necesidad de abordar el estudio de un - procedimiento que de forma sencilla permitiera realizar separaciones con la subsiguiente determinación de mezclas muy variables de sustancias presentes en preparados analgésicos. En este sentido, y como ya se anticipaba en la Introducción, la cromatografía con Sephadex tenía que ofrecer, necesariamente, nuevas posibilidades sobre todo al haber comprobado en el mismo el denominado "efecto aromático" de adsorción.

### III. CONSIDERACIONES PREVIAS

### III.1. CARACTERISTICAS DE LAS SUSTANCIAS EN ESTUDIO

Se recogen a continuación (Tablas I y II) aquellas propiedades de las sustancias objeto de este estudio que pueden ser de utilidad para los fines propuestos. Son las siguientes (113) (114):

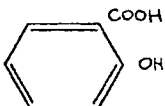
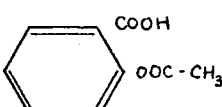
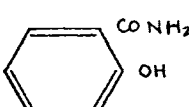
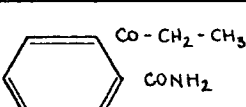
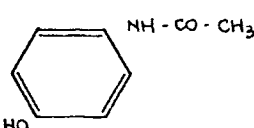
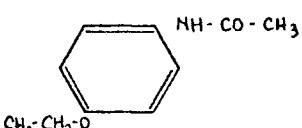
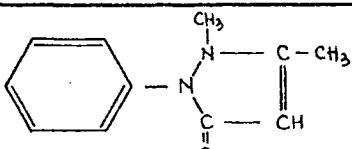
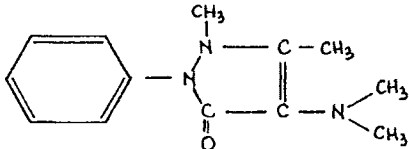
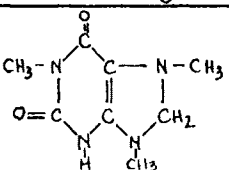
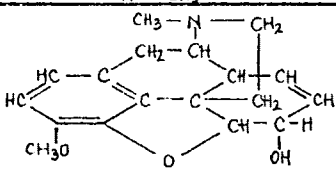
a) Fórmula estructural, en la que se observa la presencia de grupos funcionales que pueden motivar adsorciones.

b) Peso molecular, para justificar, dada su escasa diferencia, que el mecanismo separativo no es debido a filtración molecular.

c) Solubilidad en diferentes disolventes, a fin de elegir el más adecuado.

d) Longitud de onda a que presentan la máxima absorción, para comprobar la imposibilidad de su determinación simultánea.

TABLA I

Compuesto	Fórmula estructural	Pm	$\lambda_{m\mu}$
Acido salicílico		138,12	300
Acido acetil salicílico		180,15	275
Salicilamida		137,13	300
Etoxibenzamida		165,13	292
Paracetamol		151,16	242
Fenacetina		179,21	246
Antipirina		188,22	242
Aminopirina		217,22	256
Cafeína		194,19	272
Codeína		299,37	286

35.  
TABLA II

Compuesto	Solubilidades de: 1 gr en:				
	Agua	Etanol	Cloroformo	Eter	Otros
Acido salicílico	460 - 25° 15 - 100°	2,7	42	3	135 benceno 3 acetona
Acido acetil salicílico	300 - 25° 100 - 37°	5	17	10 - 15	--
Salicilamida	500 - 30° 125 - 47°	Soluble	Soluble	Soluble	--
Etoxibenzamida	11g sol a 100°	Soluble	Soluble	11g. soluble	Sol. acetona
Paracetamol	Difícil-fría Mas Sol - caliente	Soluble	--	Poco soluble	Insol-benceno Sol-acetona
Fenacetina	130 - caliente 82 - 100°	15- caliente 2,8 - 100°	14	90	Soluble Glicerina
Antipirina	< 1	1,3	1	43	--
Aminopirina	18	1,5	1	13	12 benceno
Cafeína	46 5,5 - 80° 1,5 - 100°	66 22 - 60°	5,5	530	100 benceno
Codeína	120 60 - 30°	2	0,5	18	13 benceno

En primer lugar se puede apreciar que todas las moléculas tienen un núcleo bencénico, excepto la cafeina que presenta un ciclo hexagonal y puede considerarse con una cierta aromaticidad.

Por otra parte, entre algunos compuestos existen analogías estructurales muy grandes, de manera que se podrían agrupar de diversas formas. Así, el ácido salicílico, el ácido acetil salicílico, la salicilamida y la etoxibenzamida son bencenos disustituídos en orto y además tienen grupos comunes. El paracetamol y la fenacetina son también bencenos disustituídos con un grupo común, pero la sustitución es en para. Finalmente, la antipirina y aminopirina sólo se diferencian en el grupo dimetilamino de la segunda.

Todo esto unido al hecho de que entre los grupos sustituyentes hay fenoles, grupos carboxilo, aminas, amidas, etc, hace suponer que estas sustancias deben ser adsorbidas por el Sephadex de forma más o menos preferente.

Las masas moleculares son todas menores de 300, y muy próximas entre sí, lo cual indica que la separación no puede hacerse por filtros moleculares, al me--nos con los tipos de relleno elegidos para la columna.

Las longitudes de onda a que se han medido los máximos de absorbancia, que se recogen en la tabla I, son los correspondientes al espectro obtenido con disoluciones alcohólicas y naturalmente resultan afectados al cambiar de disolvente.

De todos modos se puede observar que aunque algunos pares de sustancias podrían valorarse juntas, esto no es válido para valoraciones de grupos más numerosos, pues forzosamente los máximos han de coincidir prácticamente para la mayoría, por la pequeña amplitud de la zona del espectro en que se encuentran (242 a 300 m $\mu$ ).

En cuanto a la solubilidad se observa que todos son difícilmente solubles en agua, mientras que son solubles en etanol y cloroformo. En eterbenceno, y otros disolventes orgánicos, unos son solubles y otros no.

Con estos datos previos habrá que hacer la elección del disolvente más adecuado, ya que la totalidad de las sustancias en estudio han de estar en disolución para la cromatografía de gel. Por otra parte tampoco es viable la separación cuantitativa utilizando las diferencias de solubilidad, ya que ninguno es totalmente insoluble en los diferentes disolventes.

## III.2. TECNICAS APLICADAS

### III.2.1. Cromatografía de gel

La cromatografía de gel en medio acuoso fue desarrollada por Flodin y Porath. (115) en los años 1958-60, siendo su característica principal la de separar las -- sustancias según su tamaño molecular. Su utilización ha sido muy amplia debido a que ofrece las ventajas de poder cromatografiar sustancias lábiles sin degradación y de aplicarse a muestras muy concentradas por la linealidad de las isothermas de partición (116) (117).

Los geles cromatográficos son, en general, macromleculas con distinto grado de entrecruzamiento (cross-linking), naturales o sintéticas, con gran afinidad por determinados disolventes. Antes de ser utilizados deben impregnarse con el mismo disolvente que se vaya a utilizar para la elución.

Su uso para los fines indicados requiere que cumplan las siguientes condiciones:

Han de ser químicamente estables, tanto para evitar que se impurifiquen las fracciones de eluido como -

para su reutilización sin previa regeneración.

No deben contener grupos iónicos o, en todo caso, que la concentración sea mínima para evitar que se produzcan retenciones totales o parciales de los solutos con carga.

El tamaño de partícula debe estar cuidadosamente seleccionado y, así mismo, los granos han de tener una buena rigidez y resistencia mecánica, para evitar que se compacte el lecho y que , como consecuencia, - se modifique la velocidad de flujo.

La aplicación inicial de la cromatografía de - gel, y la que sigue teniendo más amplia difusión, es la de separar sustancias por su tamaño molecular. La mayor o menor retención de las sustancias en la columna es consecuencia del coeficiente de reparto entre - la fase gel y la fase líquida, y este, a su vez, viene determinado por factores estéricos (118). Al pasar a través del lecho una disolución que contiene moléculas de diferente tamaño, las grandes discurren entre las esferas del gel y en el coeficiente de reparto sólo interviene la fracción de líquido que ocupa los intersticios. Las moléculas pequeñas, por el contrario, pasan entre la red y en el coeficiente de partición - interviene la totalidad del líquido empleado.

La forma de operar en cromatografía de gel es la normal dentro de cualquier tipo de cromatografía en columna; la muestra en disolución se incorpora por la parte superior de la columna y se eluye con el disolvente elegido.

Para una interpretación correcta de resultados es necesario conocer las variables correspondientes a la columna y al flujo, así como las que condicionan el comportamiento del gel y del soluto o solutos.

En cromatografía de gel se han definido una serie de parámetros que utilizados en la expresión de resultados dan uniformidad a los mismos. A continuación se indican y definen los que se usan en el presente -- trabajo, que son los que se emplean con más frecuencia en la bibliografía.

En relación con la columna interviene su diámetro, la altura del lecho, el volumen total del mismo,  $V_t$ , y el volumen de los intersticios entre los granos,  $V_0$ . La medida de  $V_t$  no ofrece dificultades;  $V_0$  se determina cromatográficamente utilizando una sustancia que no sea retenida por el gel ni siquiera mínimamente, ya que, como consecuencia de su alto peso molecular, obligadamente pasa entre las esferas. Como tal se suele utilizar el Blue Dextran 2000 cuyo peso molecular

es del orden de  $2 \cdot 10^6$  (119).  $V_0$  será, pues, el volumen de elución de esta sustancia.

El volumen real de gel,  $V_x$ , en el lecho se obtiene por diferencia entre  $V_t$  y  $V_0$ .

Finalmente interesa conocer también el volumen de líquido en la fase gel, que se denomina volumen "inner",  $V_i$ , y que viene dado por  $V_i = V_x - m_g V_g$ , -- donde  $m_g$  representa el peso del gel y  $V_g$  es el volumen parcial específico del gel. Sin embargo, entre las características de los geles proporcionados por las casas suministradoras figuran los c.c de agua que pueden ser absorbidos por gramo de gel seco,  $W_r$ , con lo que el cálculo de  $V_i$  es inmediato:  $V_i = W_r m_g$ .

El flujo ha de mantenerse constante por razones obvias, ya que de lo contrario, los resultados no serían ni comparativos ni reproducibles. Las unidades de medida son las usuales c.c/min ó cc/hora; sin embargo, en el caso de variar el diámetro de la columna la comparación de resultados puede hacerse mediante el caudal másico por unidad de superficie, expresado en cc/hora . cm<sup>2</sup>. Para conseguir la constancia de flujo se utilizan cualquiera de los dispositivos conocidos que mantienen constante la presión durante todo el tiempo que dura el proceso.

El control de la presión no sólo es necesario para mantenerla constante, sino también porque su cuantía no debe exceder ciertos límites para evitar que -- los geles blandos se compacten.

El comportamiento de los solutos y sus posibilidades de separación entre sí, se estudian mediante las curvas de elución, que, no se diferencian sustancialmente de las obtenidas en otros tipos de cromatografía en columna o de cambio iónico.

La variable, pues, a determinar es el volumen de elución necesario para transportar las diferentes sustancias fuera de la columna. En el caso ideal el volumen de elución debiera ser independiente del flujo aunque en la práctica no resulta así y puede, incluso, manejarse este factor para conseguir separaciones más netas. Como volumen de elución se toma el que corresponde al punto máximo de la curva, ya que estas presentan casi siempre una buena simetría. Sin embargo, este valor no proporciona información suficiente sobre las posibles separaciones ya que las curvas de elución pueden, en parte, solaparse. Por ello hay que determinar además  $T_V(120)$  que es el volumen total en el que tiene lugar la elución de cada sustancia. No obstante, en -- cromatografía de reparto existe una correlación entre

el volumen de elución de una sustancia y su coeficiente de reparto, que en el caso de considerar sólo el volumen  $V_i$  de líquido que embebe el gel viene dado por  $V_e = V_o + K_d \cdot V_i$

Las posibilidades separativas pueden estudiarse mediante los  $K_d$  correspondientes, para cuyo cálculo basta, pues, disponer de los antecedentes  $V_o$  y  $V_i$  y del resultado experimental de la elución  $V_e$ .

Finalmente, en lo que a los geles se refiere, es preciso conocer el valor de  $W_r$  que, como ya queda indicado, habitualmente se facilita por la casa suministradora.

### III.2.2. Espectrofotometría de U.V. e I.R.

Se ha utilizado la técnica de espectrofotometría de I.R. con fines cualitativos y la de U.V. con fines cualitativos y cuantitativos.

Ambos métodos analíticos son suficientemente conocidos, lo que releva de comentarios más explícitos.

### III. 3. EL SEPHADEX Y SUS PROPIEDADES SEPARATIVAS

El Sephadex, cuyas características se mencionan anteriormente de forma muy breve, es uno de los productos más utilizados en cromatografía de gel en columna, aunque se emplea también en cromatografía en placa fina e incluso en electroforesis (121). Los geles de Sephadex fueron los primeros para los que se estableció una estrecha relación entre el tamaño molecular y el volumen de elución. Estos geles están constituidos por redes de dextranos que se obtienen por fermentación de la sacarosa y son capaces de absorber agua, u otros disolventes, en cantidades que varían según el tipo de Sephadex. Asimismo, son estables en medios ácidos y alcalinos y pueden calentarse hasta 110°C sin perder sus propiedades; sin embargo, dada su naturaleza orgánica son atacados por agentes oxidantes, bacterias y hongos (122)(123). Todos son insolubles en agua, mientras que su solubilidad en otros disolventes varía según la clase de Sephadex. Por otra parte, cumplen las condiciones de reversibilidad que son exigidas a esta clase de soportes cromatográficos.

Además de los cambiadores de iones, hay dos clases

de Sephadex, los de la serie G y el LH-20. Los primeros son hidrofílicos y su uso con disolventes orgánicos es muy restringido; el número que sigue a la letra G, varía según intervalo de pesos moleculares para cuya separación pueden utilizarse y su estructura no difiere más que en el grado de entrecruzamiento. El LH-20 es lipofílico e hidrofílico y su grado de hinchamiento se modifica con el disolvente empleado.

Las características separativas de las dos clases de geles son ligeramente diferentes, ya que el LH-20 se obtiene modificando la estructura del G-25; concretamente, aquel es un hidroxipropil derivado de este.

En un principio los geles de Sephadex se utilizaron exclusivamente para separar sustancias de diferentes masas moleculares, e incluso para la determinación de las mismas, por un mecanismo análogo a los filtros moleculares. Sin embargo y como ya se anticipó, se ha observado la existencia de otro tipo de interacciones, derivadas de la estructura molecular, -- que permiten utilizar el Sephadex en la separación de sustancias que no presentan grandes diferencias en sus pesos moleculares, hasta el punto de que utilizando el G-10 se han separado diversos isómeros cis-trans

(124). En efecto en 1960 Porat y Gelote (111)(125) observan que gran número de sustancias se comportan de forma diferente a la que, en virtud de su tamaño molecular, era de esperar. Se ha comprobado que en una serie homóloga los términos superiores tienen mayores volúmenes de elución que los inferiores (126). Esta anomalía no podía justificarse solamente por una difusión restringida, a través y en el interior del gel, cuyo origen estuviera en impedimentos estéricos. Por otra parte las desviaciones de comportamiento no sólo suceden en el sentido de retrasar la elución, sino que existen también sustancias que aparecen en el eluido antes de lo previsible. En este caso, que resulta ser el menos frecuente, el fenómeno puede explicarse por exclusión iónica o por la formación de complejos o agregados.

Si la elución de las sustancias se demora, puede deberse a fenómenos de adsorción o a interacciones electrostáticas. Estas últimas se justifican porque las redes de dextranos contienen algunos grupos carboxílicos terminales (117), circunstancia que parece confirmarse en la separación de proteínas ácidas con -- Sephadex G-50 (127) que no son eluidas con agua y sin embargo se eluyen con disoluciones diluídas de sales.

o bien con ácido clorhídrico. Todo ello induce a pensar que, si las proteínas no se retienen, ha de ser debido a la existencia de grupos negativos en el gel. Análogo fenómeno de repulsión se ha observado trabajando en capa fina con ácidos no proteínicos (128). El fenómeno es más acusado con geles de mayor grado de entrecruzamiento, sobre todo cuando se usa como eluyente agua desionizada (128). La explicación posible de este fenómeno puede ser el que la retención tenga lugar en proporción a la cantidad de dextrano en el gel hinchado (129).

Asimismo se ha observado que las sustancias aromáticas, y gran parte de las heterocíclicas, se retienen mucho más que otras de tamaño similar pero no aromático.

La mayor adsorción en el caso de las sustancias aromáticas frente a las no aromáticas es un fenómeno que no es exclusivo del Sephadex. Existen otros antecedentes como es el caso de Alumaa y Palm (130) quienes han encontrado que la adsorción es distinta en electrodos de mercurio y bismuto y que, incluso, varía con los sustituyentes en el núcleo aromático. Por su parte Soporer y Trueblood (131) con co

45.

lumnas de ácido silícico-celite, observan el mismo do -  
ble fenómeno, tanto de la aromaticidad como de los -  
sustituyentes. Análogamente ocurre trabajando en co-  
lumna con adsorbentes tales como carbón activo, celu-  
losa, sílice, alúmina y poliacrilamida (132) o bien -  
con grafito, titanio, etc. (133). No obstante, es en el  
Sephadex donde estos efectos aromáticos de adsorción  
son más acusados, habiéndose comprobado, incluso, que  
no sólo varía con los sustituyentes sino también con  
su situación relativa en el núcleo (134)(135).

Para justificar la retención se admitió ini- -  
cialmente que, además de la que se produce por la ma-  
sa de la sustancia, hay otra adicional cuyo origen es  
está en la existencia de fuerzas especiales, tipo puen-  
te, entre solutos con electrones  $\pi$  y la matriz del --  
Sephadex, siendo el grupo eter presente en la misma -  
el responsable principal(129). Posteriormente, otros  
autores han justificado la retención, en el caso de -  
diferentes fenoles monosustituidos, por la formación  
de puentes de hidrógeno lo que se apoya además por el  
hecho de que la acidez del medio ejerce una influen-  
cia decisiva. Esta explicación se ha extendido a ani-  
linas y ácidos benzoicos, tratándose en todos los ca-  
sos de derivados m- y p- sustituidos. Si tal mecanismo

es cierto según estos autores, los valores de  $K_d$  varían en función de los sustituyentes, lo que en efecto comprueban, con excepción de los fenoles halogenados (135). También se han separado polipéptidos según su peso molecular utilizando Sephadex G-75 y como eluyente fenol - ácido acético - agua; este disolvente se emplea para extraer proteínas de tejidos, para lo que es necesario romper los puentes de hidrógeno (136). El hecho apoyaría, pues, la hipótesis de la retención -- por puentes de hidrógeno.

Cuando se comparan las retenciones obtenidas - en los distintos geles de la serie G, todos los autores parecen estar de acuerdo en que la retención aumenta con el grado de entrecruzamiento del gel. Brook y Munday (135) han estudiado el comportamiento de una serie de fenoles, anilinas y ácidos benzoicos m- y p-sustituídos frente a G-10 y LH-20 encontrando que las retenciones son mayores, o al menos iguales, en el -- primero que en el segundo, lo cual parece indicar que las consecuencias establecidas para la serie G puede generalizarse al LH-20. Sin embargo Determan (129) -- afirmaba que la afinidad del LH-20 es mayor que la de cualquier gel de la serie G por haber en aquel mayor número de grupos eter.

De todo lo expuesto se deduce que la retención no puede justificarse aisladamente por ninguno de los mecanismos indicados ya que existen excepciones, no explicables, a la normativa que podría formularse de cada uno de ellos.

Streuli (137) (138) (112) ha estudiado el comportamiento de gran número de sustancias aromáticas y heterocíclicas frente a Sephadex LH-20, utilizando diversos disolventes y llega a la conclusión de que los tres mecanismos citados, filtración molecular, puentes de hidrógeno y puentes a través de la nube electrónica, pueden tomar parte en la adsorción y -- que de hecho no puede excluirse totalmente ninguno -- de ellos (excepto en casos muy especiales), si bien, en cada caso, hay uno predominante que depende en -- gran manera del disolvente utilizado.

IV. SEPARACIONES EN MEDIO ETANOLICO

#### IV.1. ELECCION DEL DISOLVENTE

El agua es el disolvente en el que, de forma más acusada, se pone de manifiesto el "efecto aromático", responsable de las retenciones totales o parciales. Sin embargo, y según se deduce de los datos recogidos en la Tabla II, la totalidad de las sustancias objeto de este estudio son muy poco solubles en agua. Resultaba, pues, necesario buscar otro disolvente, común a todas ellas, que presentara cierta analogía con el agua, y en el que, por este motivo, fuera previsible que el efecto aromático no disminuyera de manera notable. Eliminados por esta causa los disolventes apolares, se centró la atención en los alcoholes de bajo peso molecular, y más concretamente el etanol, no sólo por su polaridad sino también por otras propiedades físicas como son la constante dieléctrica, el punto de ebullición, la viscosidad y la densidad. Por otra parte se disponía de antecedentes bibliográficos sobre la existencia del citado efecto aromático en isopropanol (138) (139) (140) y metanol por lo que era presumible que ocurriera de forma análoga con el etanol.

De entre los demás disolventes comunes a las --

sustancias en estudio, el cloroformo podría conducir a resultados positivos, pues aunque el efecto de retención de compuestos aromáticos no es demasiado apreciable (139), se ha comprobado que la presencia de -- grupos carboxilo e hidroxilo en las especies a separar ejercen una acción análoga. En efecto, en disoluciones de cloroformo se han separado dipalmitinas a través de los grupos hidroxilos primarios o secundarios (116). En contrapartida el cloroformo presenta dificultades para su manejo (122). No obstante, antes de descartarle, se hizo una experimentación exploratoria cuyos resultados no fueron satisfactorios, pues al no disponer del equipo para operar con este disolvente, el Sephadex flota en el mismo, siendo absolutamente imposible mantener las condiciones exigidas para una correcta operación cromatográfica.

Por todo ello se eligió el etanol, procediéndose, antes de iniciar los ensayos de separación, a estudiar la estabilidad de las diferentes sustancias en el medio etanólico y frente al soporte de separación.

## IV.2. SEPARACION CON ETANOL

### IV.2.1. Estabilidad de las sustancias en solución etanólica

A través de los espectros ultravioleta se pudo comprobar que todas las sustancias objeto de estudio, excepto el ácido acetilsalicílico son estables en disolución etanólica durante 24 horas. No se continuó el estudio de la estabilidad para tiempos superiores, por carecer de significado práctico para los fines pretendidos.

En el caso del ácido acetyl salicílico se observa, que aparece un incremento de absorción, que aumenta con el tiempo, en la zona correspondiente al máximo del ácido salicílico, lo cual prueba que este se forma por hidrólisis del primero. No es nada extraña la hidrólisis del ácido acetyl salicílico en medio etanólico pues, aunque se utiliza etanol absoluto, se tolera en el mismo un 0,3% de agua que es la responsable de las pequeñas cantidades de ácido salicílico que aparecen.

La hidrólisis del ácido acetyl salicílico es un

fenómeno ampliamente conocido, siendo muchos los estudios realizados en este sentido no sólo con fines analíticos sino también con objeto de definir los agentes que pueden contribuir a su estabilización. En medios no acuosos muy diversos, se ha comprobado que la presencia de pequeñas cantidades de agua origina degradaciones y fenómenos hidrolíticos, sobre cuya cuantía influyen un gran número de variables tales como el pH, presencia de sustancias iónicas o no iónicas, la temperatura e incluso la propia concentración del ácido acetyl salicílico (141) (142). Como estabilizantes se utilizan sustancias superficialmente activas de carácter no iónico, habiéndose comprobado, asimismo, que disoluciones acuosas de citrato, ascorbato y glutamato sódico, cálcico y magnésico, si bien disminuyen la inestabilidad no la inhiben totalmente (143). Es un hecho -- significativo que en presencia de citrato potásico el ácido acetyl salicílico se hidroliza considerablemente mientras que el ácido cítrico, en concentración análoga a la del citrato potásico, prácticamente inhibe la hidrólisis (144). El fenómeno se observa, igualmente, con ácido tartárico (145). Los últimos trabajos parecen inclinarse por el hecho de que la estabilidad es consecuencia del bloqueo de los grupos hidroxilos libres en la molécula (146).

Los gráficos de la fig.1 corresponden a los espectros U.V. de cada una de las sustancias en estudio. Los registros, que se han realizado transcurridos los intervalos de tiempo que se indican, coinciden en su totalidad por lo que sólo se ha representado el ini--cial.

Unicamente en el caso del acetyl salicílico se han representado para diferentes tiempos, (fig. 2) pu diendo observarse la modificación indicada. Los valo res de la absorción, correspondientes a los máximos - en función del tiempo, se recogen en la Tabla III, -- aunque hay que destacar que la estabilidad debe com--probarse a través de la totalidad del espectro U.V. y no sólo por la constancia del máximo, pues esta puede mantenerse, compensada por la absorción que a esa lon gitud de onda presenta la sustancia que aparece en la descomposición. Esto es precisamente lo que ocurre - con el ácido acetyl salicílico cuyo máximo de absor--ción a  $278 \text{ m}\mu$  se mantiene prácticamente constante, - mientras el ácido salicílico, cuyo máximo aparece a --  $300 \text{ m}\mu$  crece a medida que lo hace el tiempo.

En el caso de haber conseguido una separación de los ácidos acetyl salicílico y salicílico que per mitiera su valoración directa por espectrofotometría,



hubiera sido necesario determinar cuantitativamente la descomposición, en función del tiempo, para realizar la corrección debida a la hidrólisis.

#### IV.2.2. Estabilidad frente al medio separativo

Análogamente convenía tener la seguridad de - que las sustancias, en disolución etanólica, eran estables frente al Sephadex o, lo que es igual, durante el proceso cromatográfico. Para ello se prepararon disoluciones de las mismas en etanol pasándolas a través de una columna de Sephadex LH-20. Este tipo de Sephadex se eligió por ser el más indicado para - trabajar con disolventes orgánicos.

Se recoge el eluido en un matraz de destilación al que se añaden 500 mg de BrK. Se evapora después, a sequedad en vacío, a fin de que la temperatura no supere nunca los 60°C, y con el residuo, previamente transformado en pastillas de la forma habitual en I.R, se obtienen los correspondientes espectros, que resultan ser significativamente iguales a los de los productos puros (Fig. 3 a 22). El patrón del ácido acetyl salicílico, supuesto que ya se conocía su descomposición en medio etanólico, se preparó a par-



Fig. 1

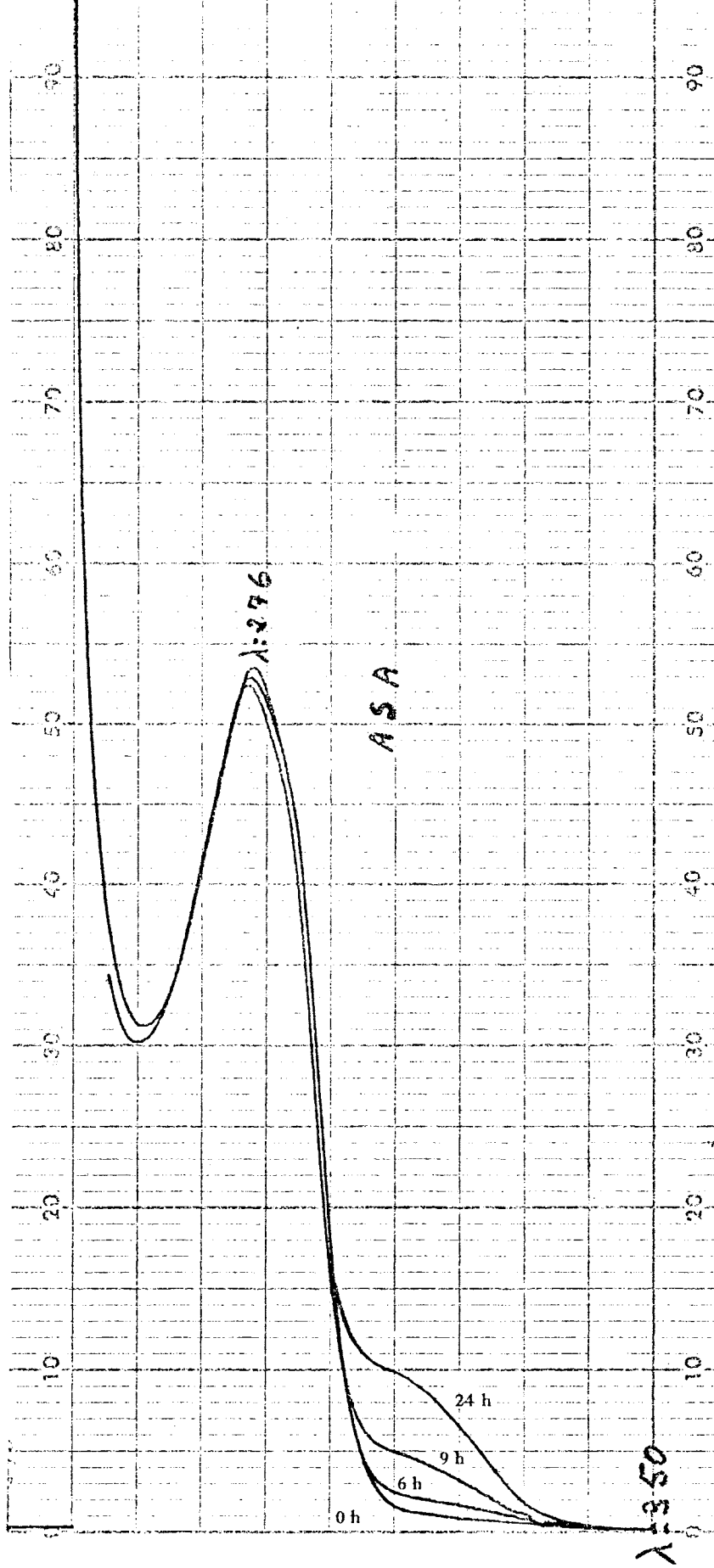


Fig. 2

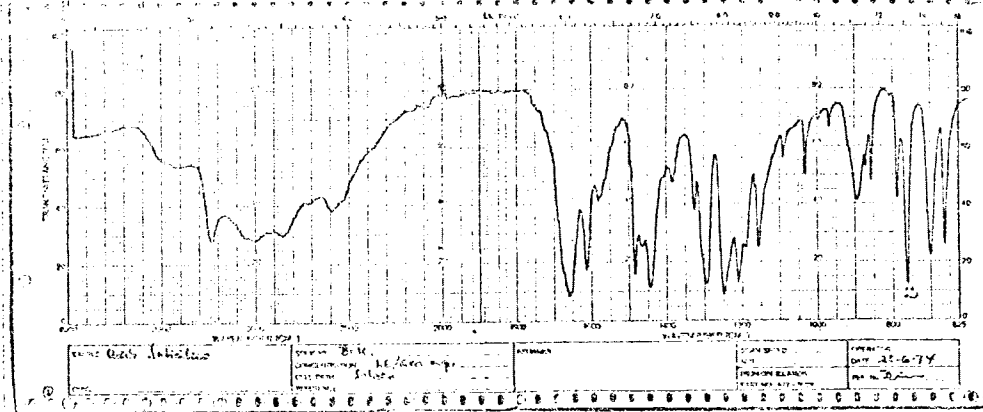


Fig. 3

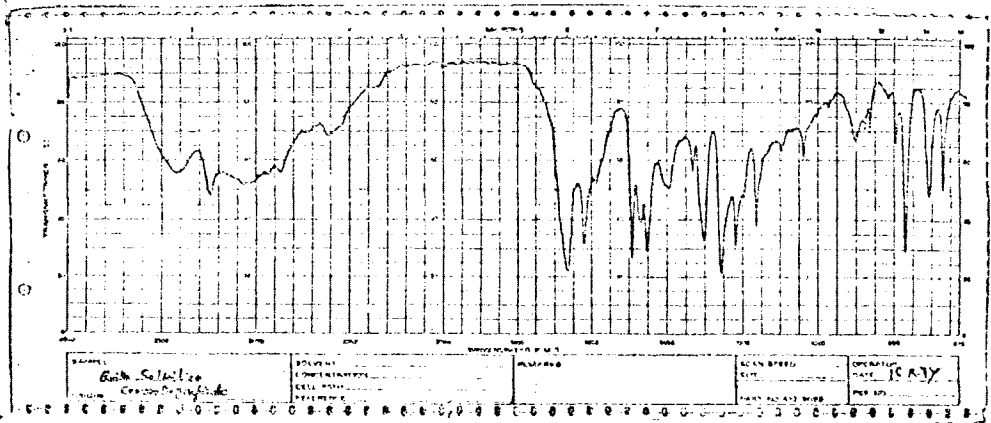


Fig. 4

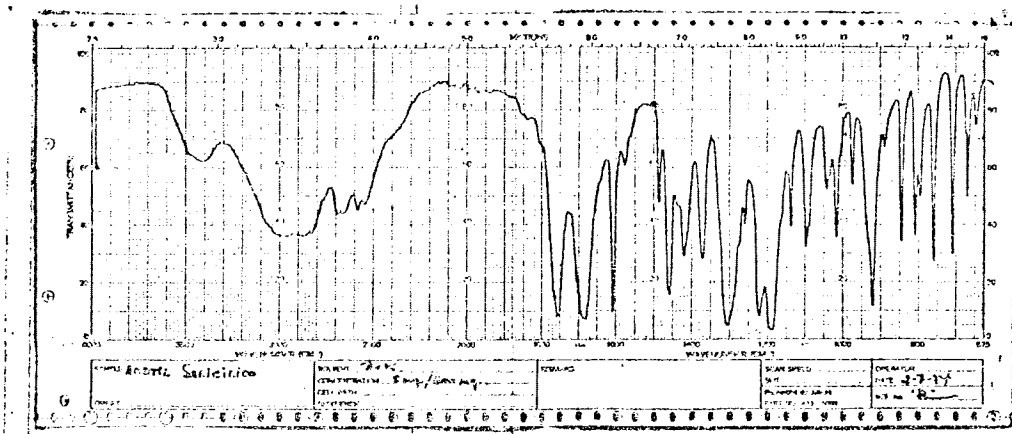


Fig. 5

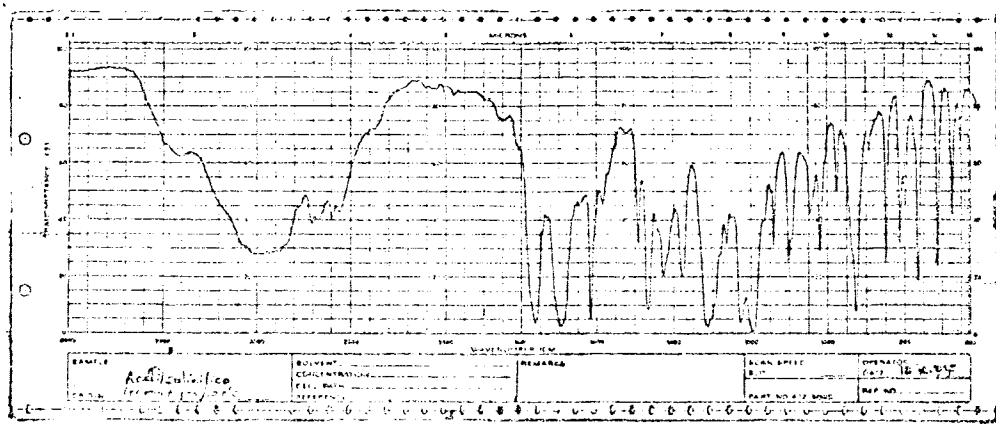


Fig. 6

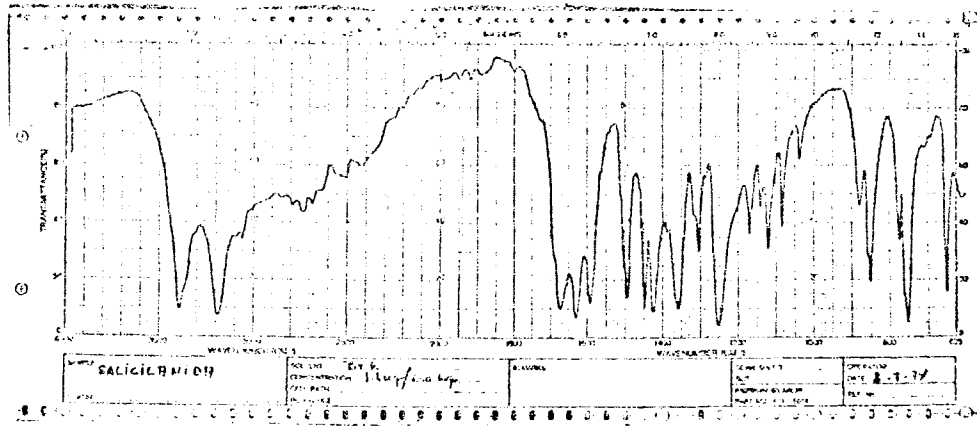


Fig. 7

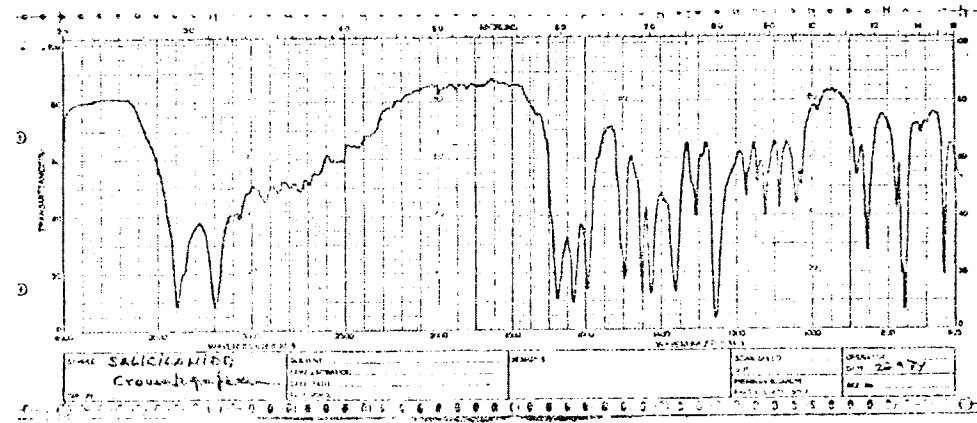


Fig. 8

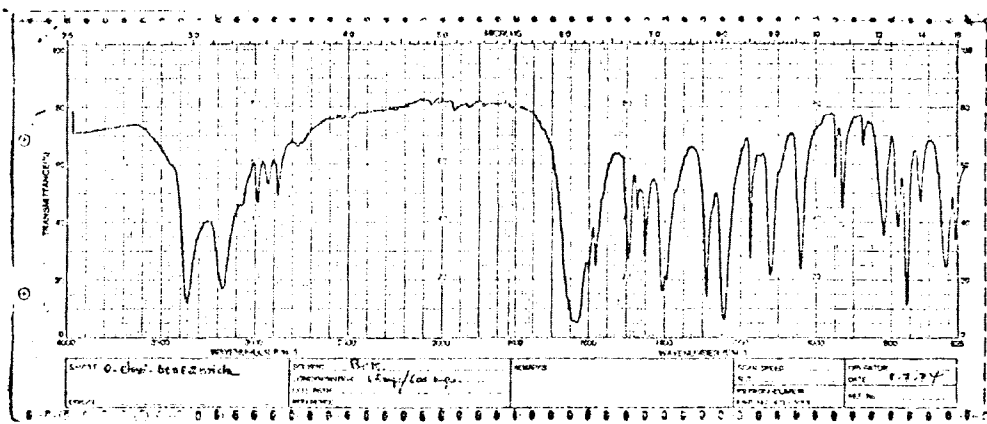


Fig. 9

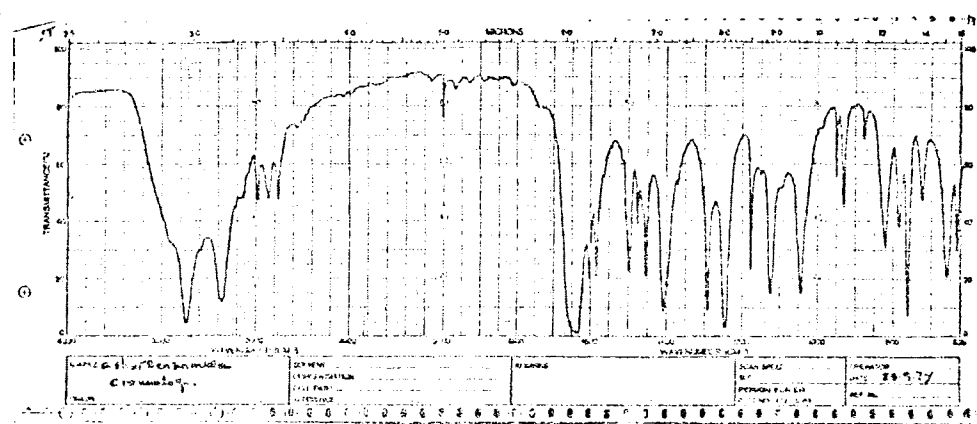


Fig. 10

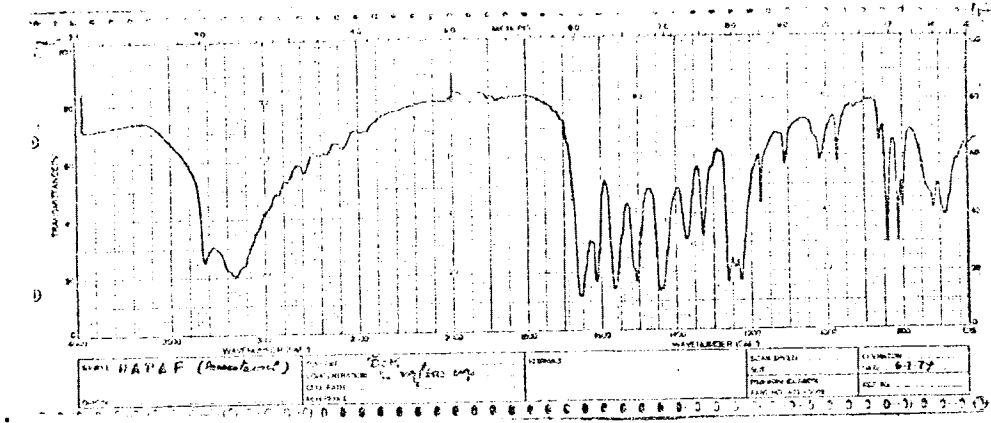


Fig. 11

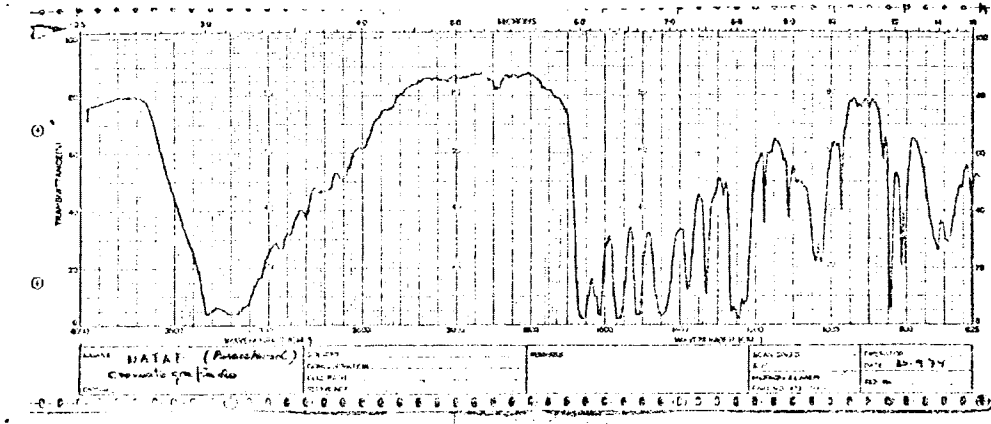


Fig. 12

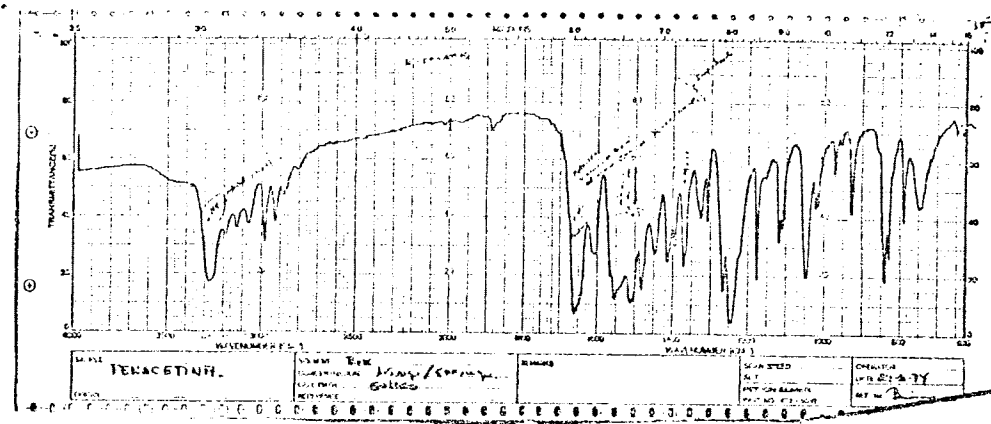


Fig. 13

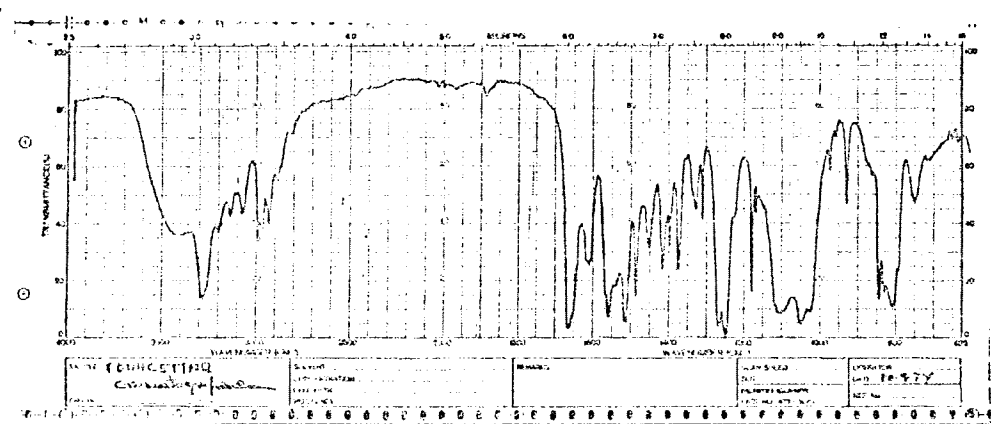


Fig. 14

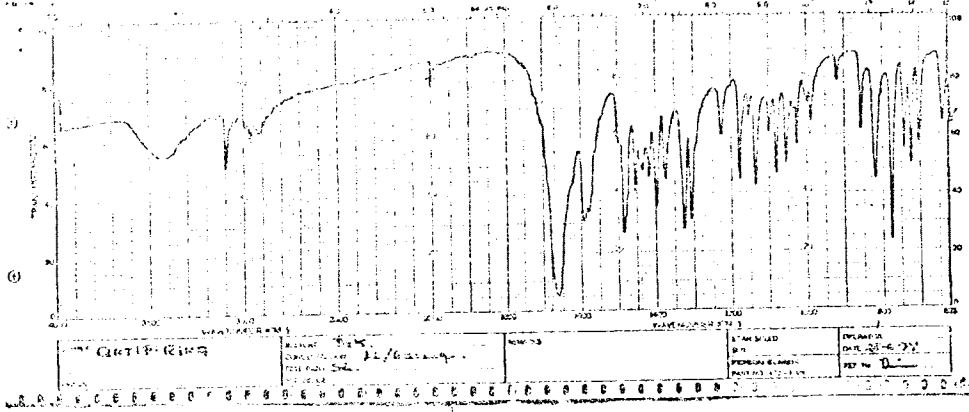


Fig. 15

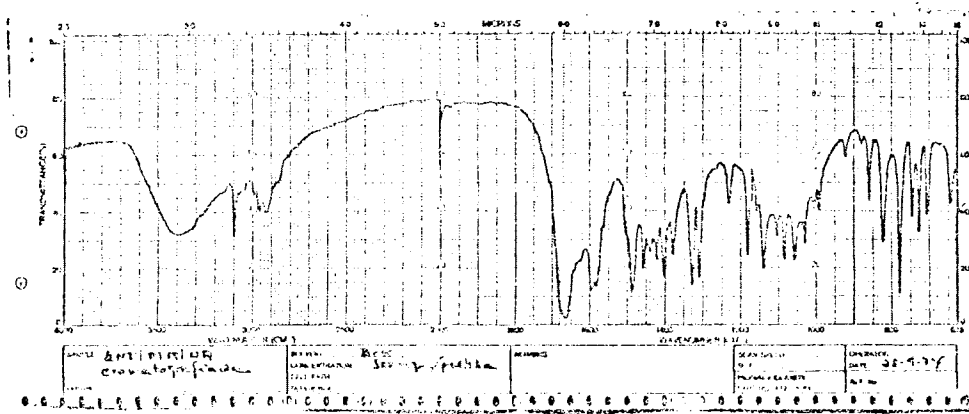


Fig. 16

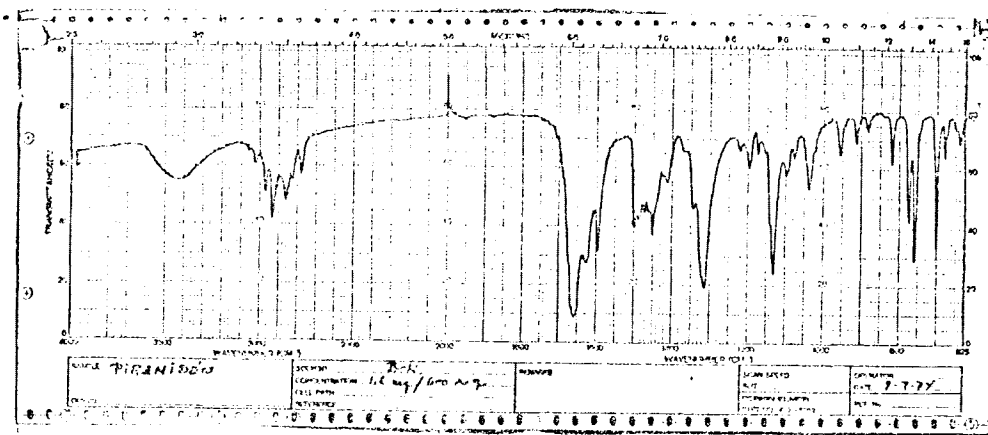


Fig. 17



Fig. 18

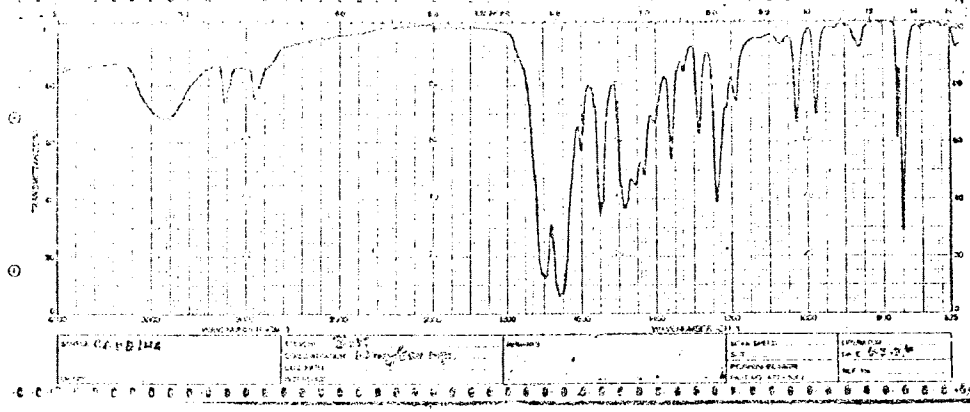


Fig. 19

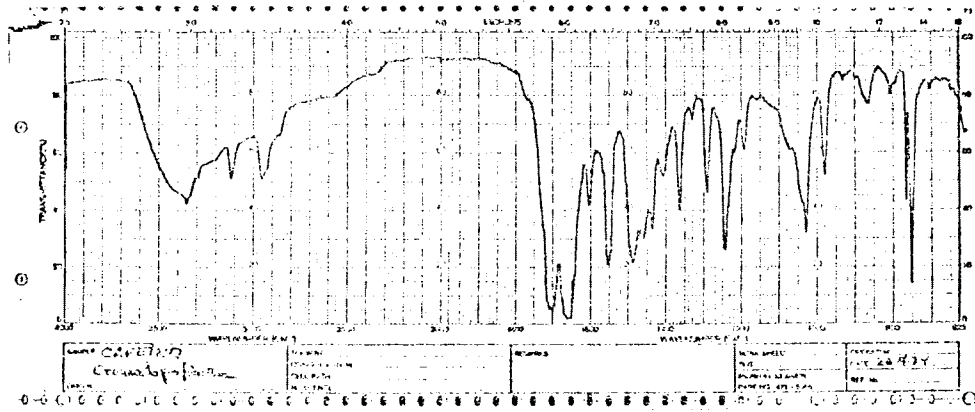


Fig. 20

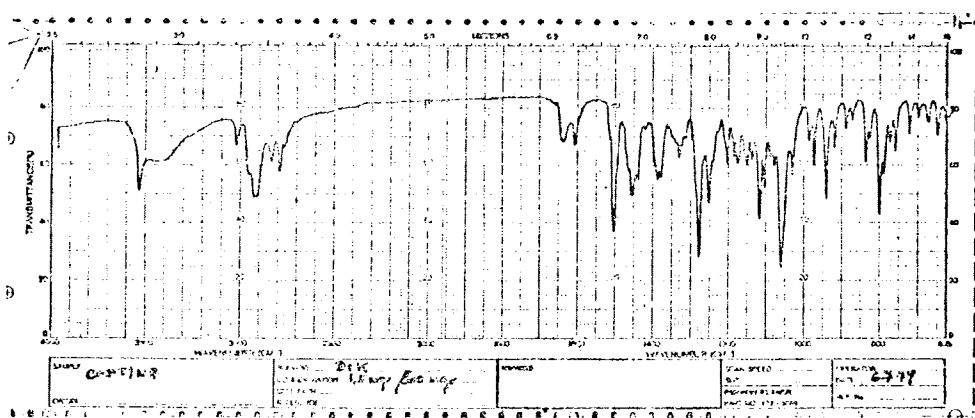


Fig. 21

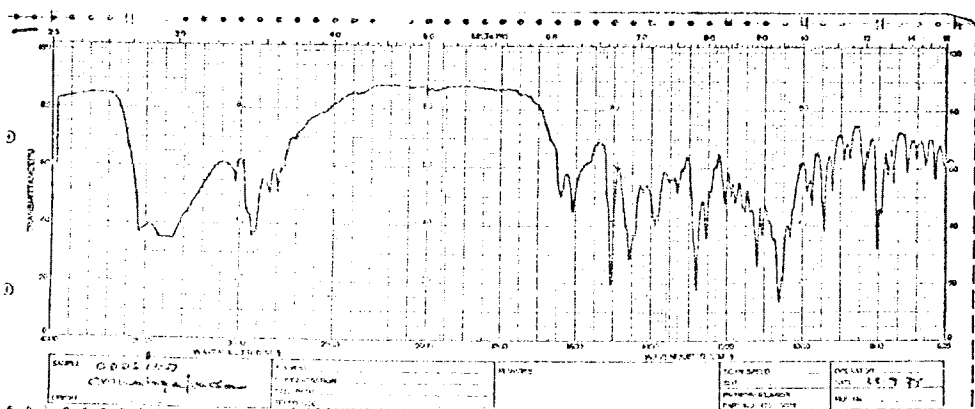


Fig. 22

tir de la disolución empleada para la cromatografía, de forma tal, que se lleven paralelas dos muestras - de la misma magnitud, con la única diferencia entre ambas de que una se pasa a través del soporte cromatográfico y la otra no.

Por otra parte se obtuvieron los espectros -- U.V. de la disolución del ácido acetyl salicílico -- cromatografiada y el de otra preparada simultáneamente que no había estado en contacto con el Sephadex. Ambos espectros, procedentes de soluciones de la misma concentración (fig. 23) son análogos, lo que prueba que la pequeña descomposición observada depende sólo del tiempo de contacto con el disolvente pero no del medio separativo.

IV.2.3. Resultados de la elución con etanol

Se prepararon disoluciones de cada una de las sustancias en etanol, incorporando a la columna partes alicuotas de las mismas. Las concentraciones de cada una de las soluciones así como la fracción de las mismas incorporada a la columna se recopilan en la Tabla IV. A continuación se eluyó con etanol y se

SIN CROMATOGRAFIAR

CROMATOGRAFIADO

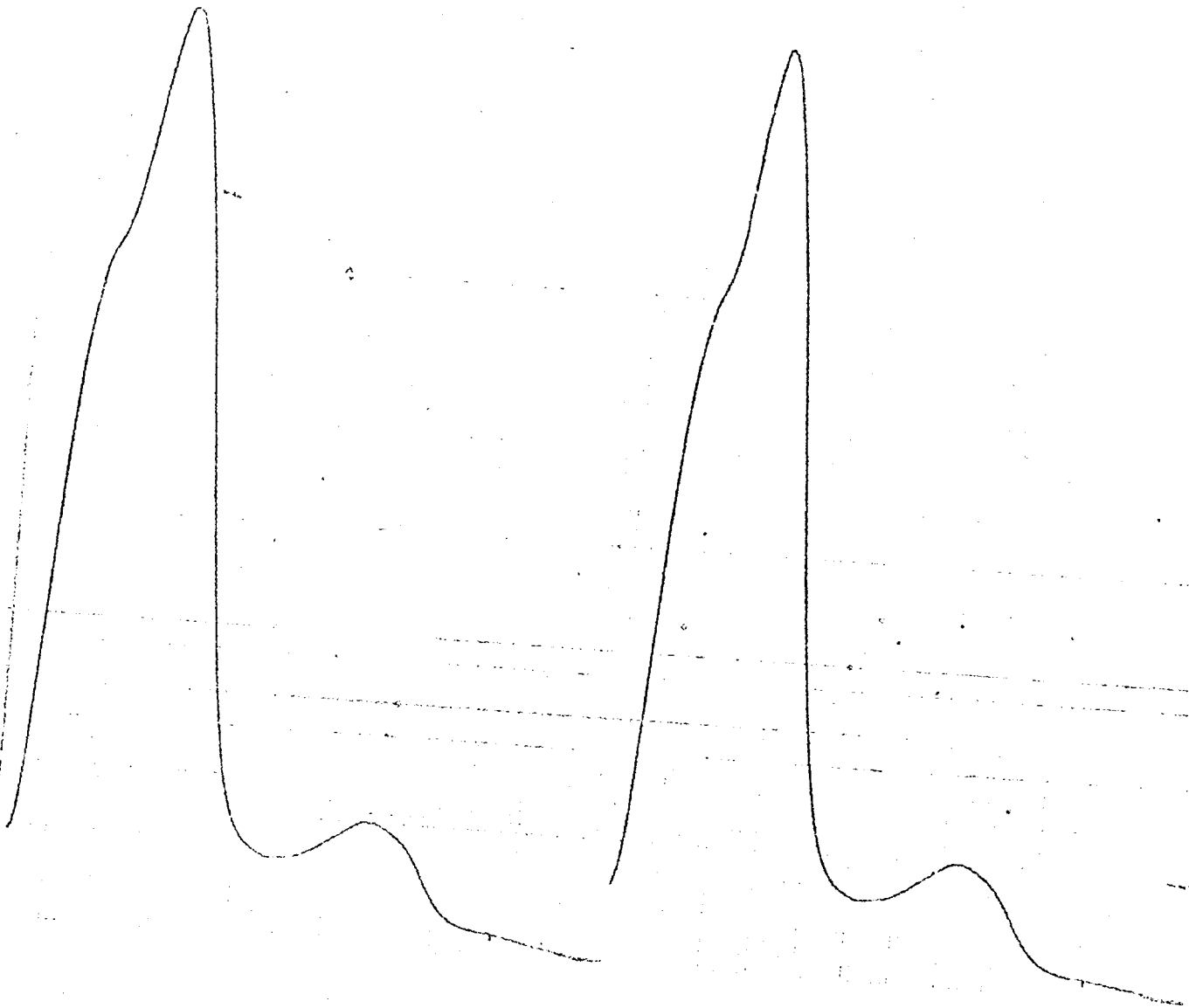


Fig. 23

TABLA IV

Compuesto	Con. mg/cc.	Volumen incorporado en cc.
Acido salicilico	0,25	1
Acido acetil salicilico	1	1
Salicilamida	0,25	1
Etoxibenzamida	0,5	1
Paracetamol	0,125	1
Fenacetina	0,125	1
Antipirina	0,125	1
Aminopirina	0,125	1
Cafeina	0,125	1
Codeina	1	1

recogieron fracciones de 2,4 cc. manteniéndose en todos los casos un caudal constante de 0,8 cc./min.

Se realizaron tres series de ensayos. En la primera se utilizó como lecho 6 g. de Sephadex LH-20 en columna de 1,5 cm de diámetro, en la segunda 12 g. de Sephadex e igual columna y en la tercera 6 g. de Sephadex pero en columna de 0,75 cm de diámetro.

Se pretendía con ello observar la influencia de la altura de la columna y la de la cantidad absoluta de Sephadex; sin embargo no se apreciaron diferencias acusadas en cuanto a las posibilidades separativas. Para la determinación de  $V_0$  se utilizó Blue Dextran 2000 disuelto en alcohol al 50% en agua y se eluyó con alcohol del 90%. Aunque al cambiar el eluyente se produjo un ligero incremento en el volumen del lecho, el error que por este motivo se introduce en la determinación de  $K_d$  carece de significado. Como ya se indicó anteriormente, el cálculo de  $K_d$  se realiza mediante la expresión

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_i}$$

donde  $V_i$  viene dado por:

$$V_i = V_t - V_0 - m_g v_g$$

siendo

$V_t$  el volumen total del lecho, calculado suponiendo la columna un cilindro regular;  $m_g$  la masa de gel en el lecho y  $v_g$  el volumen parcial específico de la matriz del gel, cuyo valor, facilitado por la casa suministradora, es de 0,6 cc/g aprox.

Los valores de  $V_e$  y  $T_v$  obtenidos en la elución así como los de  $K_d$  calculados se recogen en las Tablas V, VI y VII y las curvas de elución en las figuras 24 a 26.

El control de los eluidos se realiza por espectrofotometría U.V. a las longitudes de onda correspondientes para cada una de las sustancias. Se puede observar que las curvas de elución presentan buena simetría y que los volúmenes de elución aumentan, como es lógico, con la masa de Sephadex utilizada, prácticamente en la misma proporción. Asimismo, la altura de la columna para una misma masa de Sephadex sólo determina que se anticipe muy discretamente la elución, -- sin duda por efecto de pared. En cuanto a los  $T_v$  prácticamente no se diferencian cuando se utilizan masas iguales de gel y experimentan un ligero incremento al aumentar esta.

TABLA V  
ELUCION CON ETANOL

Columna: K 15/30 (diámetro interno 1,5 cm y altura 30 cm)

Relleno: 6 g. de Sephadex LH-20

$V_0 = 8,5 \text{ c.c.}$   $V_t = 24,5 \text{ c.c.}$

Compuesto	$V_e \text{ c.c.}$	$T_V \text{ c.c.}$	Kd
Acido salicílico	27	16	1,49
Acido acetil salicílico	22	11	1,09
Salicilamida	31	11	1,81
Etoxibenzamida	17	14	0,68
Paracetamol	18	15	0,77
Fenacetina	19,5	12	0,89
Antipirina	18	12	0,77
Aminopirina	18,5	9	0,81
Cafeína	23	10	1,17
Codeína	21	13	1,01

TABLA VI

ELUCION CON ETANOL

Columna: (diámetro interno 0,75 cm)

Relleno: 6 g. de Sephadex LH-20

$V_0 = 8$  c.c.  $V_T = 24,5$  c.c.

Compuesto	$V_e$ c.c.	$T_V$ c.c.	Kd
Acido salicílico	25	14	1,32
Acido acetil salicílico	20	12	0,93
Salicilamida	28	12	1,55
Etoxibenzamida	15	15	0,54
Paracetamol	14	15	0,47
Fenacetina	17	12	0,70
Antipirina	16	14	0,62
Aminopirina	18	9	0,78
Cafeína	21	11	1,01
Codeína	18	14	0,78

TABLA VII

ELUCION CON ETANOL

Columna: K 15/30 (diámetro interno 1,5 cm y altura 30 cm)

Relleno: 12 g. de Sephadex LH-20

$V_0 = 17$  c.c.  $V_t = 49,5$  c.c.

Compuesto	$V_e$ c.c.	$T_V$ c.c.	Kd
Acido salicílico	51	22	1,35
Acido acetil salicílico	40	12	0,92
Salicilamida	53	16	1,43
Etoxibenzamida	42	13	0,99
Paracetamol	45	19	1,12
Fenacetina	36	11	0,76
Antipirina	33	17	0,64
Aminopirina	33	15	0,64
Cafeína	48	15	1,24
Codeína	38	13	0,84

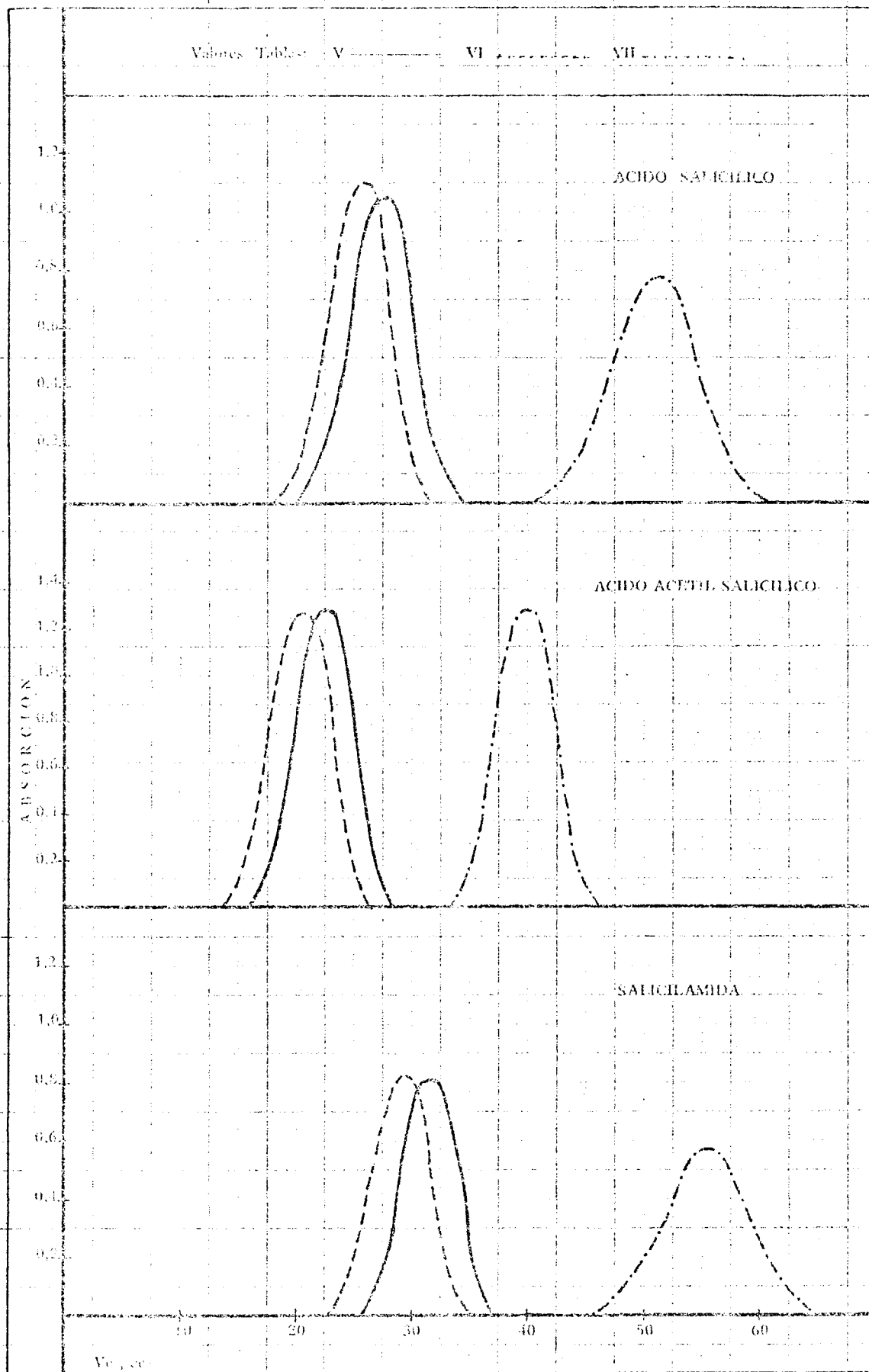


Fig. 24

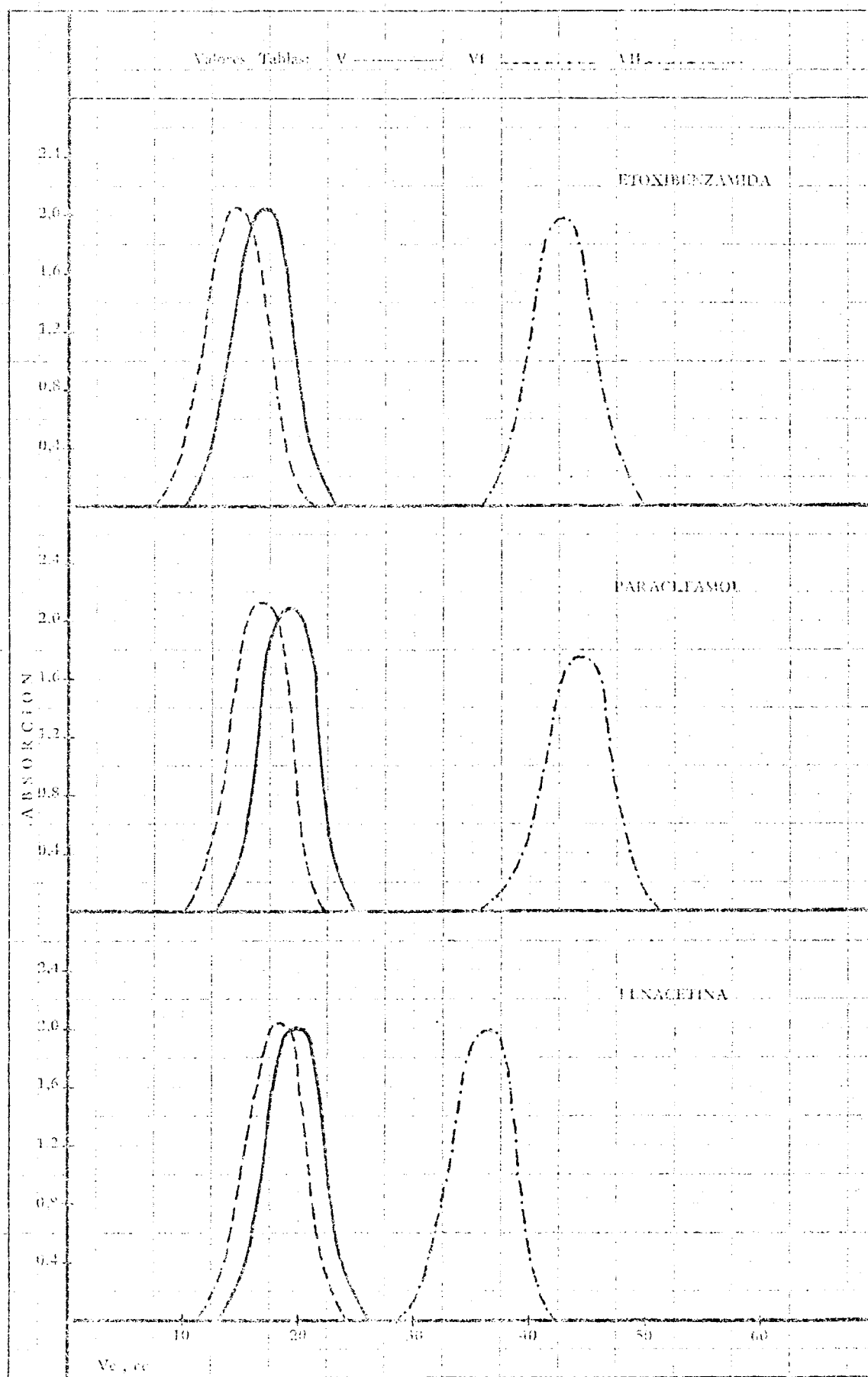


Fig. 25

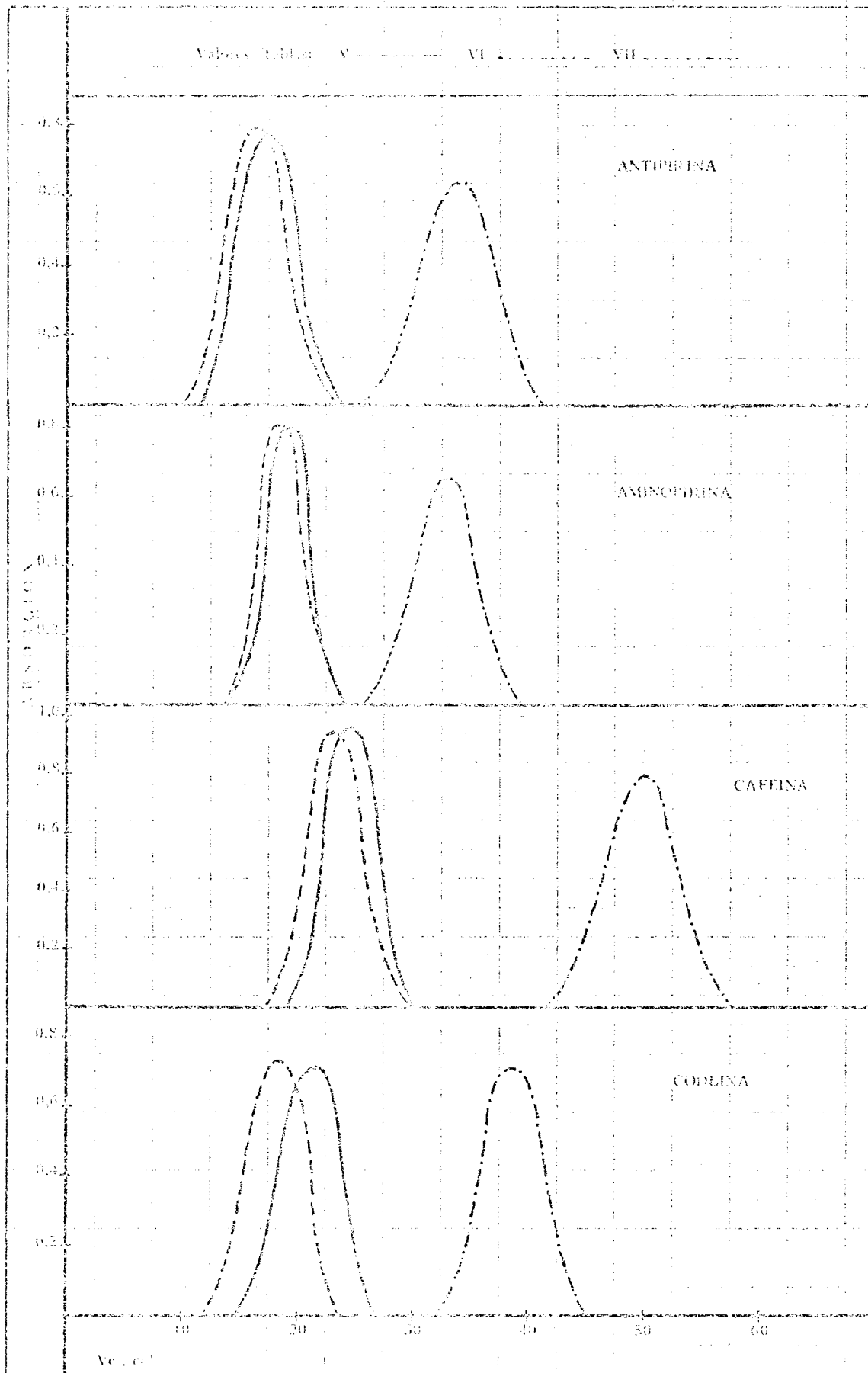


Fig. 26

De la observación de los valores de  $K_d$  se pueden deducir las siguientes consecuencias:

- a) El efecto aromático se manifiesta sólo en parte de las sustancias en estudio, y en aquellas en que lo hace no es muy importante.
- b) En general, los valores de  $K_d$  de cada una de las sustancias se modifican muy poco al cambiar la altura o el volumen de soporte, por lo que estos factores tienen sólo una influencia muy discreta en cuanto a mejorar las posibilidades.

En los gráficos de las figs. 27, 28 y 29 se -- han representado los intervalos en que se eluyen los diferentes productos. De los mismos se deduce que -- cuando se trabaja en columna de 6 g se logran separar los siguientes pares de compuestos:

Salicilamida - Aminopirina  
Salicilamida - Antipirina  
Salicilamida - Etoxibenzamida  
Salicilamida - Paracetamol  
Salicilamida - Fenacetina

Las separaciones obtenidas son análogas para ambas -

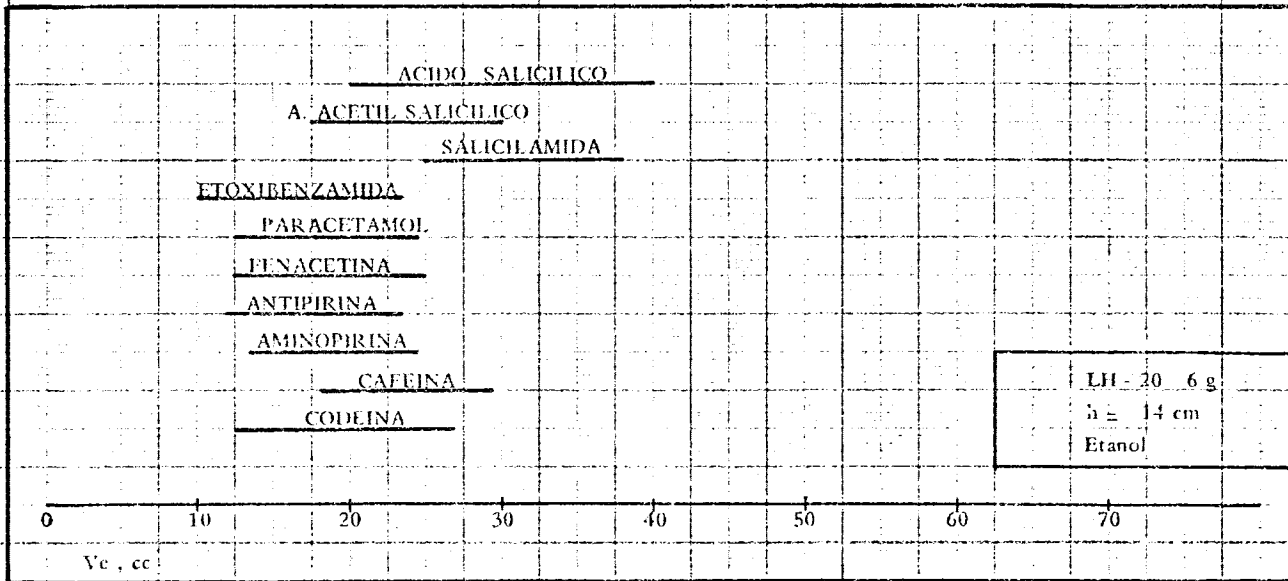


Fig. 27

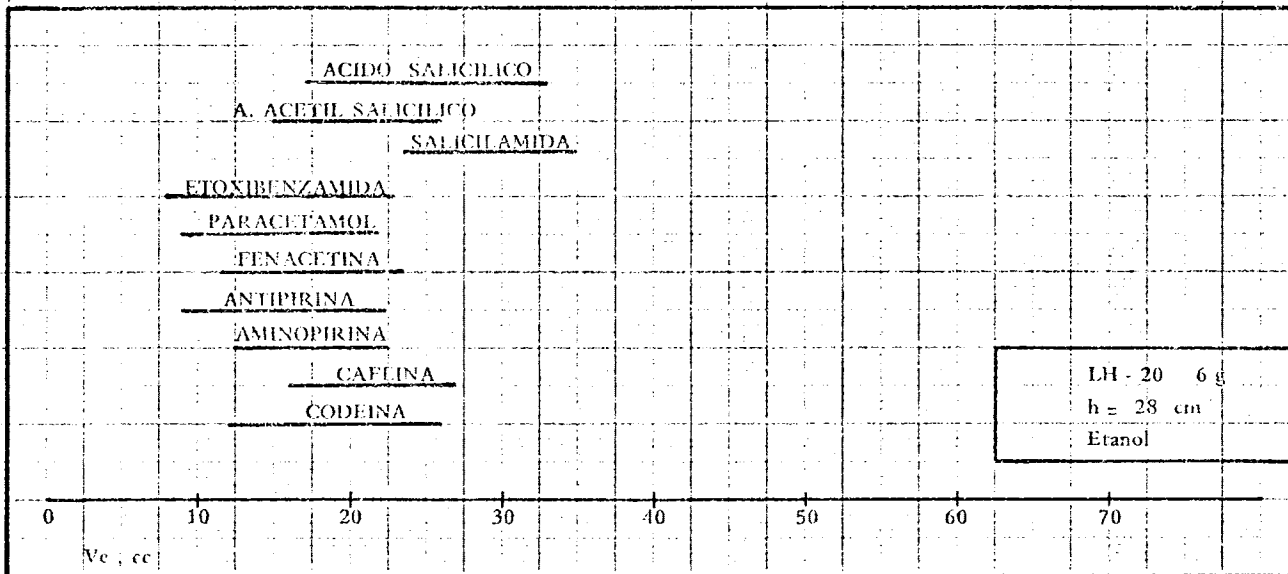


Fig. 28

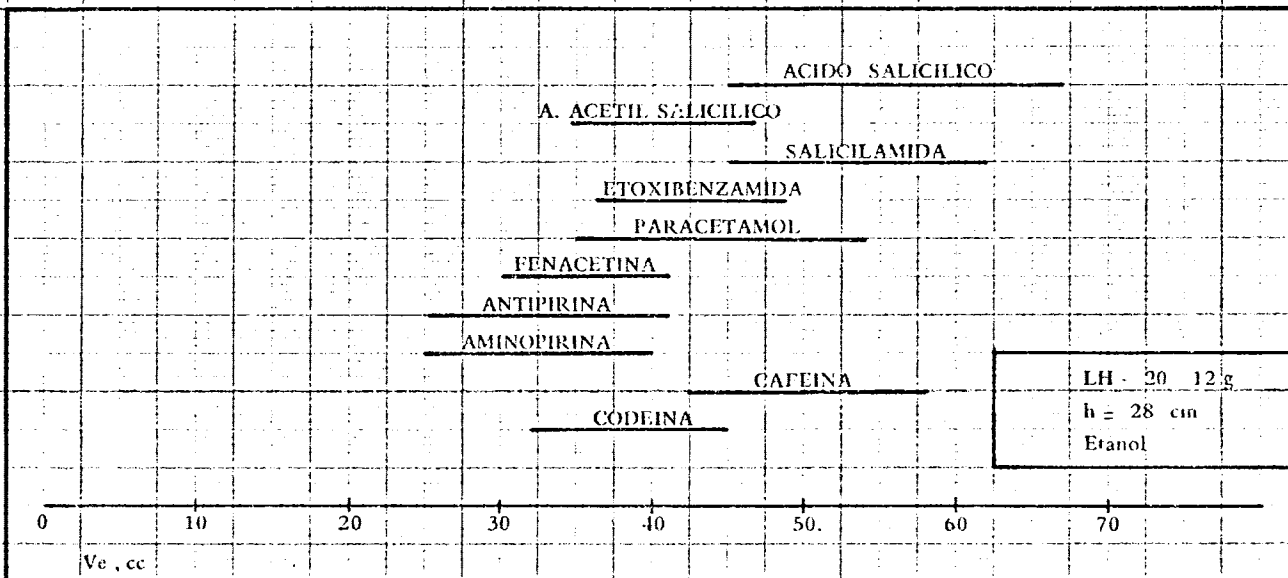


Fig. 29

columnas de 1,5 y 0,75 cm de diámetro respectivamente.

Cuando se trabaja con 12 g. de Sephadex, pueden separarse, además de las anteriores, excepción hecha de salicilamida - paracetamol, otros dos pares de sustancias:

Salicilamida - Codeina

Amidopirina - Cafeina

Por otra parte, se puede señalar, también que la resolución de las separaciones aumenta, circunstancia lógica, si se tiene en cuenta que los incrementos de  $T_V$  son pequeños en relación con los experimentados por  $V_e$ .

#### IV.3. SEPARACION EN PRESENCIA DE UN ELECTROLITO

Es un hecho comprobado (111) que en medio acuoso la retención de moléculas en el Sephadex se afecta por la presencia de electrolitos, por su concentración (117) y por la variación del pH. La influencia de estas variables no es análoga para todas las moléculas, por lo que el manejo adecuado de las mismas puede permitir mayores posibilidades de separación. Aunque se carecía de antecedentes sobre si el fenómeno tiene lugar también en medios no acuosos, supuesto que el etanol tiene también un cierto carácter polar, era conveniente estudiar si se modificaba el comportamiento cromatográfico de las sustancias al incorporar al etanol pequeñas cantidades de electrolitos o bien un agente que permitiera variar la acidez del medio.

Con tal fin y supuesto que el medio es orgánico se proyectó añadir a las disoluciones etanólicas de las diferentes sustancias pequeñas cantidades de ácidos y bases orgánicas, puesto que de esta forma se conseguía el doble objeto de modificar la acidez e incorporar electrolitos. En los dos epígrafes siguientes se recogen los resultados obtenidos al añadir a las disoluciones etanólicas, ácido láctico o tris-hidroximetil-amino-metano.

#### IV.4. SEPARACIONES CON ETANOL-LACTICO

##### IV.4.1. Elección del ácido láctico

Para la elección del ácido se comenzó por eliminar los aromáticos ya que podrían ser adsorbidos -- por el Sephadex. Por otra parte, se requería que tuvieran bajo peso molecular para que las moléculas pasen a través de los poros del gel. Finalmente, su -- constante de disociación debía ser del mismo orden de magnitud que las de los ácidos presentes entre los -- productos a separar para evitar interferencias o modi ficaciones de su estabilidad.

Teniendo en cuenta que los pK de los ácidos -- acetil salicílico y salicílico valen respectivamente 3,56 y 3, se fijó la atención en el ácido láctico cuyo pK vale 3,1. Análogos pK tienen el ácido cítrico, el fórmico, el maleico y el tartárico (113). Sin embargo el cítrico y el tartárico son poliacidos y presentan, además, varias posibilidades isoméricas del tipo cis-trans, que dan lugar a notables modificaciones en el valor de  $pK_{II}$  como consecuencia de las interacciones entre los grupos carboxilos. El maleico se descarta -

por análogo motivo y además por presentar doble enlace. Por último, se prescindió también del ácido fórmico por la incomodidad que presenta su manejo.

#### IV.4.2. Estabilidad de las sustancias en etanol-láctico

De forma análoga a como se hizo en el caso de etanol puro, se estudió la estabilidad de las sustancias en el nuevo medio disolvente mediante los espectros U.V. comprobándose que todas ellas eran estables, pues incluso las pequeñas anomalías observadas para el caso del ácido acetil salicílico en la disolución etanólica, desaparecen por la presencia del ácido láctico.

Teniendo en cuenta que para la elución se emplean dos concentraciones de ácido láctico, 0,5% y 1%, la estabilidad se estudió en ambos casos, obteniéndose idénticos resultados. En la Tabla VIII se recogen los valores obtenidos con la concentración 1%. No figuran los resultados para el caso del ácido láctico al 0,5% para evitar reiteración. Así mismo se comprobó también la estabilidad de las diferentes

TABLA VIII

ESTABILIDAD EN ETANOL CON ACIDO LACTICO AL 0,1%

Compuesto	Valores de la absorción después de un tiempo: (horas)					
	0	1	3	6	9	24
Acido salicílico	0,575	0,575	0,575	0,575	0,580	0,575
Acido acetil salicílico	0,150	0,150	0,150	0,155	0,155	0,150
Salicilamida	0,595	0,595	0,600	0,595	0,600	0,595
Etoxibenzamida	0,810	0,810	0,805	0,815	0,815	0,810
Paracetamol (N-acetil p-amino fenol)	0,930	0,930	0,935	0,930	0,935	0,925
Fenacetina	0,910	0,910	0,915	0,915	0,915	0,910
Antipirina	0,610	0,610	0,610	0,615	0,620	0,610
Aminopirina	0,420	0,420	0,420	0,425	0,425	0,415
Cafeína	0,485	0,485	0,485	0,490	0,485	0,485
Codeína	0,130	0,130	0,130	0,130	0,135	0,130

sustancias en el nuevo medio disolvente frente al soporte de separación.

Aunque el estudio de estabilidades no es, en nuestro caso, un fin sino sólo un medio, se hace preciso destacar la favorable influencia del ácido láctico en la estabilidad del ácido acetil salicílico, sobre el que no se disponía de antecedentes bibliográficos, y que viene a confirmar los resultados obtenidos, por otros autores, con ácido cítrico y ácido tartárico.

#### IV.4.4. Resultados de la elución

Se prepararon disoluciones de cada una de las sustancias en etanol-láctico, de concentración igual a la indicada en la Tabla IV, incorporando a la columna partes alicuotas de las mismas. Se realizó la elución con etanol-láctico y se recogieron fracciones de 2 cc.

Se efectuaron, también, tres series de ensayos: la primera con 6 g. de Sephadex y ácido láctico en -- etanol al 0,5%; la segunda con 12 g. y con el mismo

eluyente, y la tercera con 6 g. de Sephadex y ácido láctico en etanol al 1%; todas ellas en columna de 1,5 cm de diámetro.

Se pretendía con ello observar la influencia de la concentración del electrolito, y la posible existencia de adsorción, ya que, esta se pondría de manifiesto en mayor grado al aumentar la cantidad de lecho adsorbente.

Los resultados obtenidos se recogen en las Tablas IX, X y XI y en las figuras 30 a 32.

La influencia del electrolito, hasta concentraciones de láctico de 0,05%, es prácticamente -- despreciable, pues los volúmenes de elución son muy análogos a los encontrados con etanol puro. Las pequeñas diferencias que se observan, en unos casos - positivas y en otros negativas, carecen de significado práctico. Lo mismo sucede con el  $T_V$ . Sin embargo al elevar la concentración de ácido láctico al 1% los incrementos de los volúmenes de elución son considerables pues los  $V_e$ , en algunos casos, y a pesar de utilizar sólo 6 gramos de soporte, llegan a ser de igual magnitud que cuando se opera con 12 g.

72.

TABLA IX

ELUCION CON ACIDO LACTICO EN ETANOL AL 0,5%

Columna: K 15/30

Relleno: 6 g. de Sephadex LH-20

$V_0 = 8 \text{ c.c.}$   $V_t = 24 \text{ c.c.}$

Compuesto	$V_e \text{ c.c.}$	$T_v \text{ c.c.}$	Kd
Acido salicílico	22	14	1,13
Acido acetil salicílico	23	14	1,21
Salicilamida	33	15	2,02
Etoxibenzamida	20	11	0,97
Paracetamol	24	22	1,29
Fenacetina	18	12	0,80
Antipirina	20	12	0,97
Aminopirina	16	11	0,64
Cafeína	24	10	1,29
Codeína	18	15	0,80

TABLA X

ELUCION CON ACIDO LACTICO EN ETANOL AL 1%

Columna: K 15/30

Relleno: 6 g. de Sephadex LH-20

$V_0 = 8$  c.c.  $V_T = 24$  c.c.

Compuesto	$V_e$ c.c.	$T_v$ c.c.	Kd
Acido salicílico	32	14	1,93
Acido acetil salicílico	42	13	2,74
Salicilamida	53	16	3,63
Etoxibenzamida	32	13	1,93
Paracetamol	37	25	2,34
Fenacetina	35	20	2,17
Antipirina	28	17	1,61
Aminopirina	25	20	1,37
Cafeína	37	14	2,34
Codeína	30	19	1,77

TABLA XI

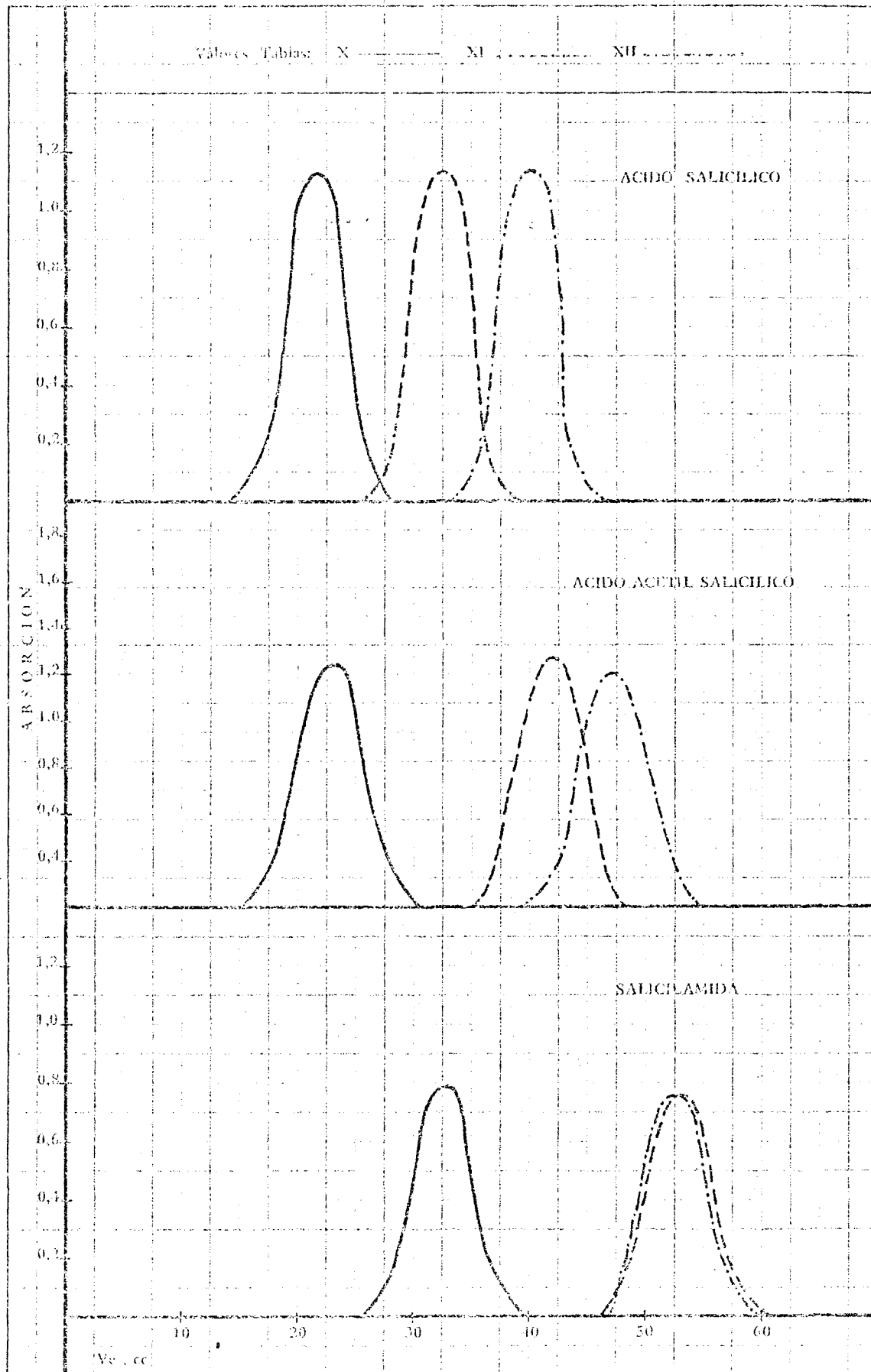
ELUCION CON ACIDO LACTICO EN ETANOL AL 0,5%

Columna: K 15/30

Relleno: 12 g. de Sephadex LH-20

$V_0 = 18$  c.c.  $V_t = 48,5$  c.c.

Compuesto	$V_e$ c.c.	$T_v$ c.c.	Kd
Acido salicílico	40	13	0,95
Acido acetil salicílico	47	16	1,22
Salicilamida	53	15	1,46
Etoxibenzamida	37	12	0,83
Paracetamol	44	25	1,11
Fenacetina	34	14	0,71
Antipirina	35	21	0,75
Aminopirina	33	15	0,67
Cafeína	45	20	1,15
Codeína	33	21	0,67



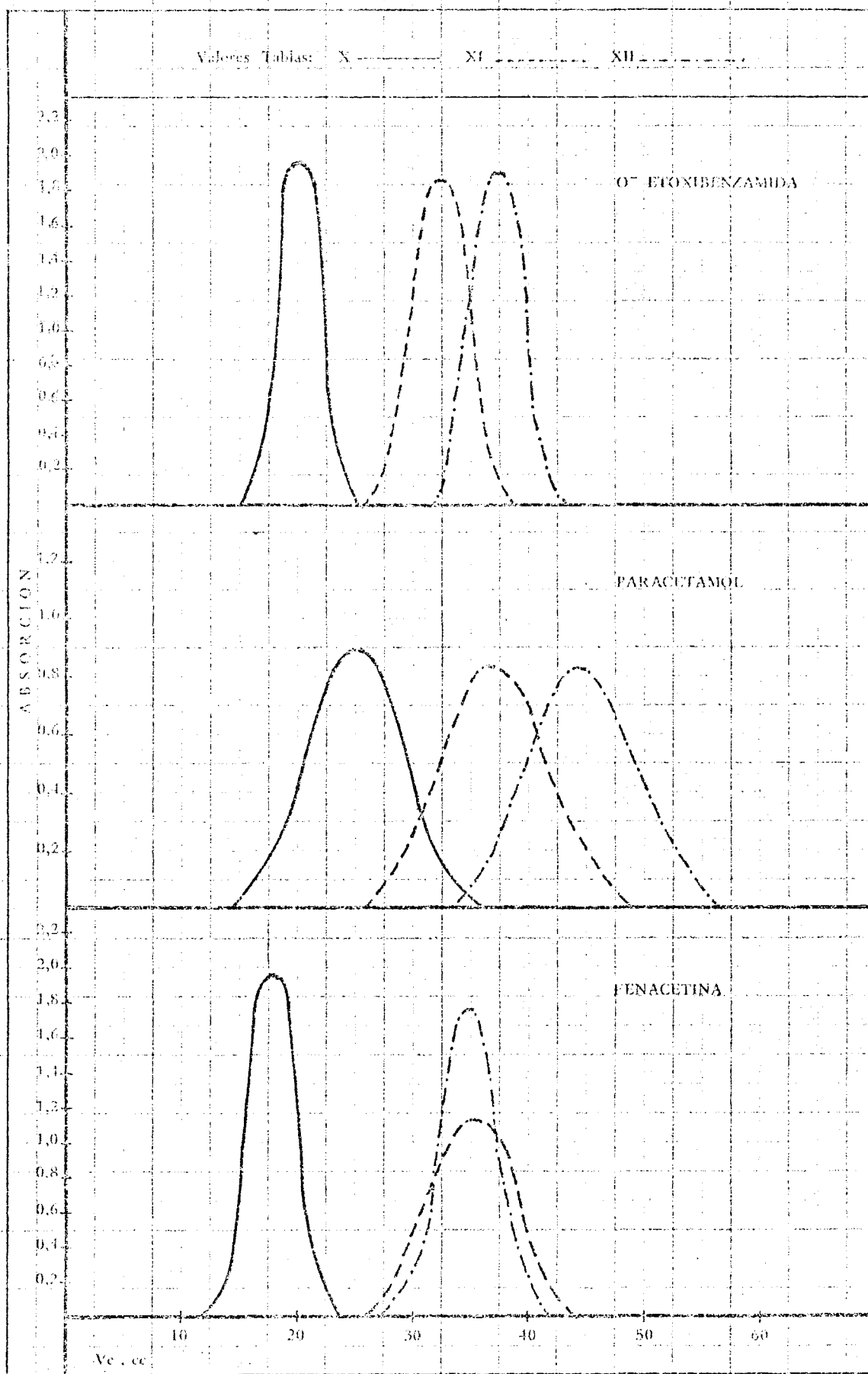


Fig. 31

CURVAS DE ELUACION OBTENIDAS CON ETANOL - LACTICO

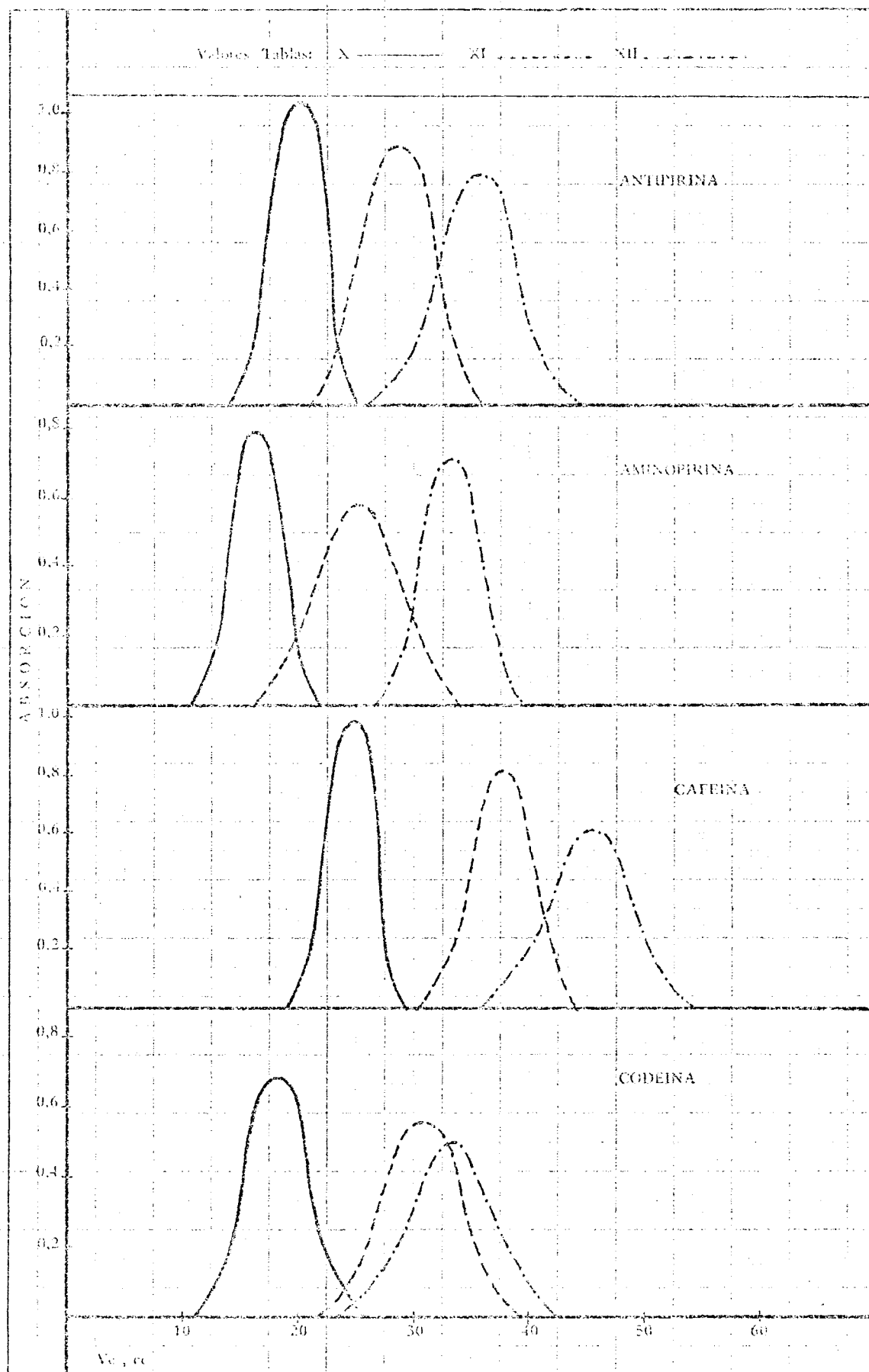


Fig. 32

de LH-20 y ácido láctico al 0,5 %. Simultáneamente  $T_v$  se modifica también como consecuencia de las mayores adsorciones que tienen lugar.

Con respecto a las  $K_d$ , su variación con la masa de gel no es muy significativa; sin embargo, la influencia de la concentración del ácido láctico es fundamental, hasta el punto de que al duplicar su concentración se obtienen valores que, en la mayor parte de los casos, superan el doble de los obtenidos con la concentración de 0,5%.

A fin de observar con claridad las posibilidades separativas, en las figuras nº 33, 34 y 35, se han representado los intervalos en que se eluyen los diferentes productos, de manera semejante a como se hizo en el apartado anterior. Los pares de sustancias que ahora se consigue separar son:

a) Con 6 g. de LH-20 y ácido láctico al 0,05%

Salicilamida - Codeina

Salicilamida - Aminopirina

Salicilamida - Antipirina

Salicilamida - Etoxibenzamida

Salicilamida - Fenacetina

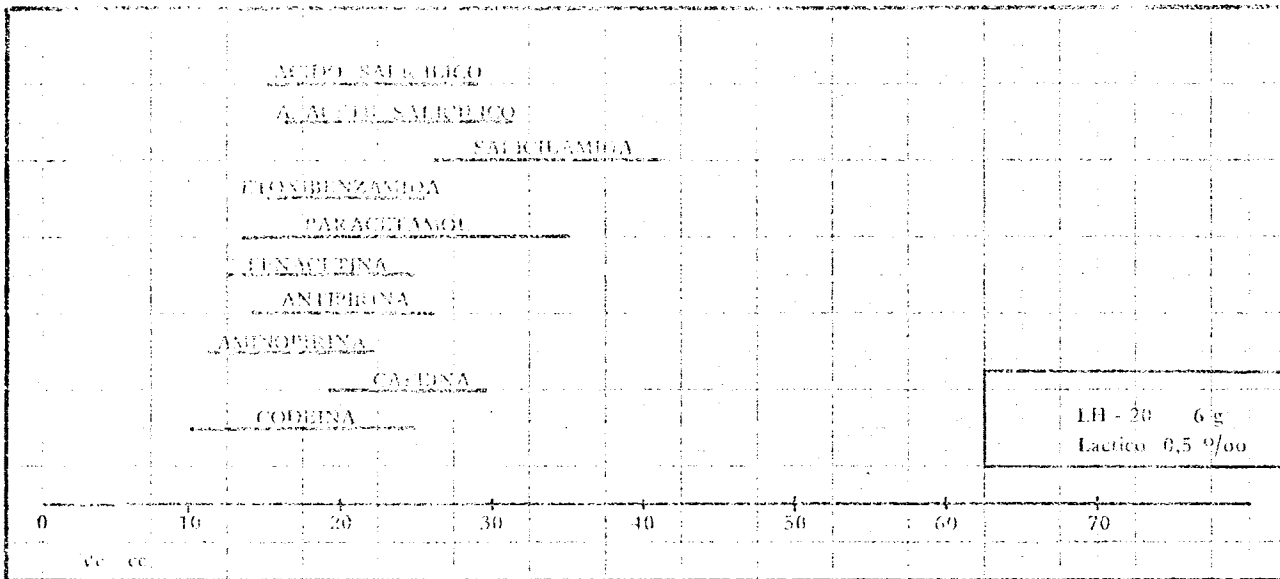


Fig. 33

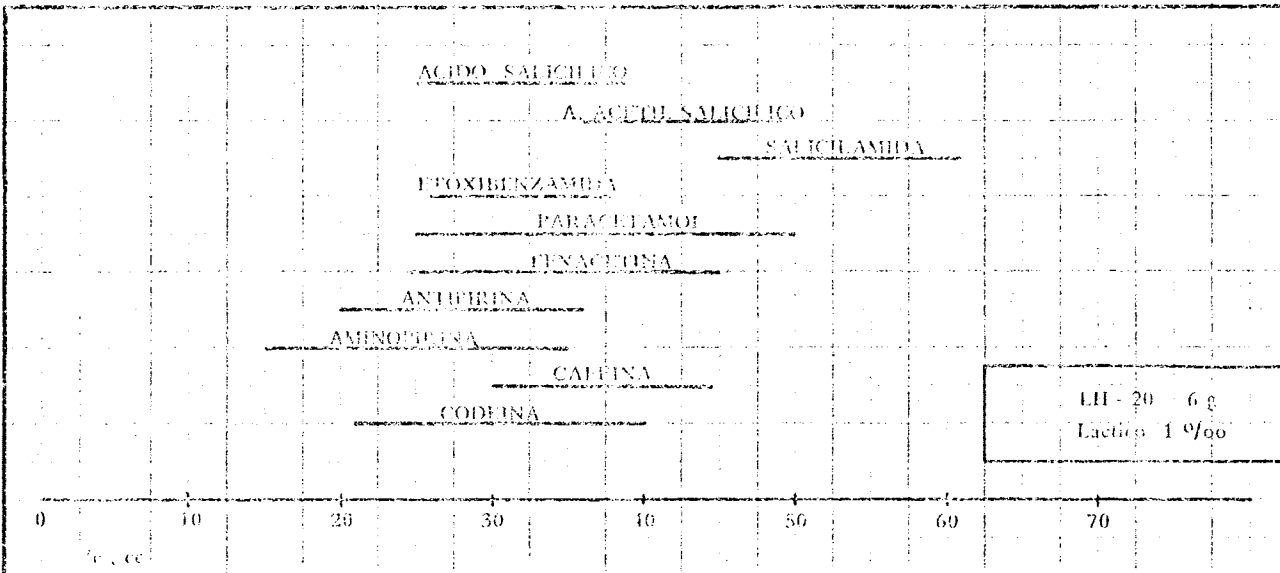


Fig. 34

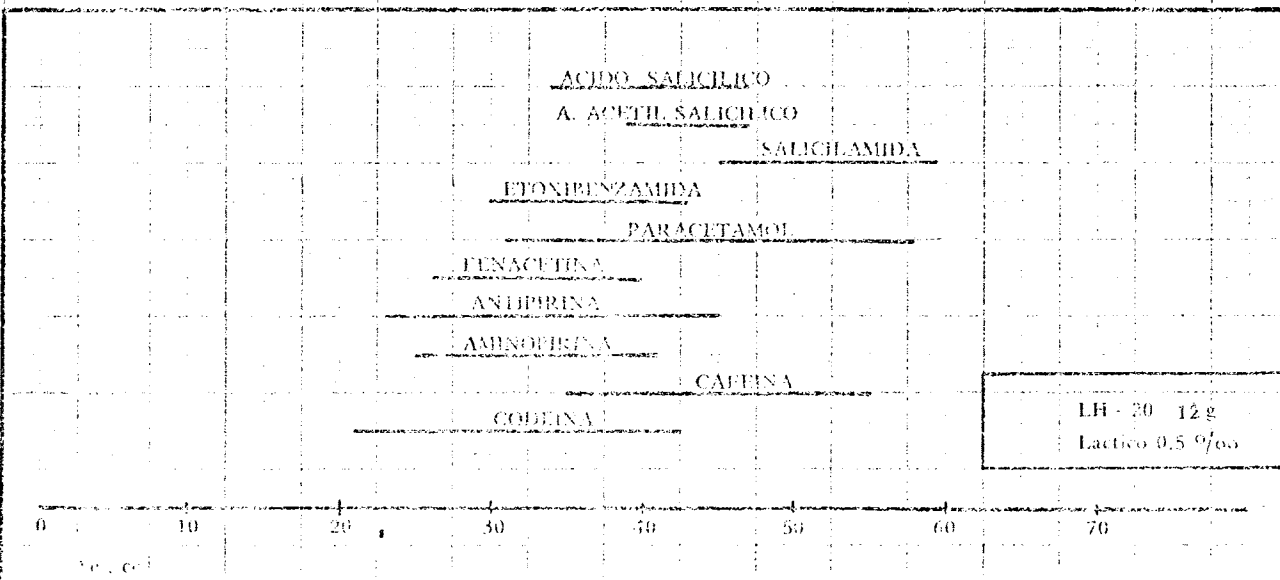


Fig. 35

b) Con 6 g. de LH-20 y ácido láctico al 1%o

- Salicilamida - Codeína
- Salicilamida - Aminopirina
- Salicilamida - Antipirina
- Salicilamida - Etoxibenzamida
- Salicilamida - Fenacetina
- Salicilamida - Cafeína
- Salicilamida - Acido Salicílico
- Acido acetil salicílico - Aminopirina
- Acido acetil salicílico - Antipirina

c) Con 12 g. de LH-20 y ácido láctico al 0,5 %o

- Salicilamida - Codeína
- Salicilamida - Aminopirina
- Salicilamida - Antipirina
- Salicilamida - Etoxibenzamida
- Salicilamida - Fenacetina
- Salicilamida - Acido acetil salicílico

Es decir, con el eluyente de ácido láctico al 0,5%o las posibilidades separativas se incrementan - discretamente al incrementar la cantidad de relleno,

11.

aun cuando sin duda, la mayor ventaja que de ello se infiere no es el número de sustancias que se separan, sino el que la resolución conseguida en las separaciones es mucho mejor. Sin embargo, al trabajar con disoluciones de ácido láctico al 1% el número de separaciones es mayor, ya que pueden fraccionarse hasta 12 pares de sustancias, aunque en algunos casos la resolución disminuya.

#### IV.5. SEPARACIONES CON TRIS EN ETANOL

##### IV.5.1. Elección del Tris-hidroximetil aminometano

Para proporcionar un medio básico se eligió el Tris-hidroximetil aminometano, denominado habitualmente TRIS, por tratarse de una base orgánica. Sobre la utilización del Tris en cromatografía de gel existen multitud de antecedentes, aun cuando siempre en medio acuoso y como agente tamponante (147) (148) (149) .En este caso se utiliza sólo como base, y no como estabilizador de pH, con objeto de alcalinizar el medio de forma discreta, ya que con una base más fuerte se favorecería la hidrólisis del ácido acetil salicílico.

##### IV.5.2. Estabilidad de las sustancias en Tris en etanol

El estudio de la estabilidad se realizó de manera similar a los casos anteriores, obteniéndose los resultados que se indican en la Tabla XII. Al igual - que en etanol se observa que el ácido acetil salicílico es la única sustancia inestable (fig. 36).

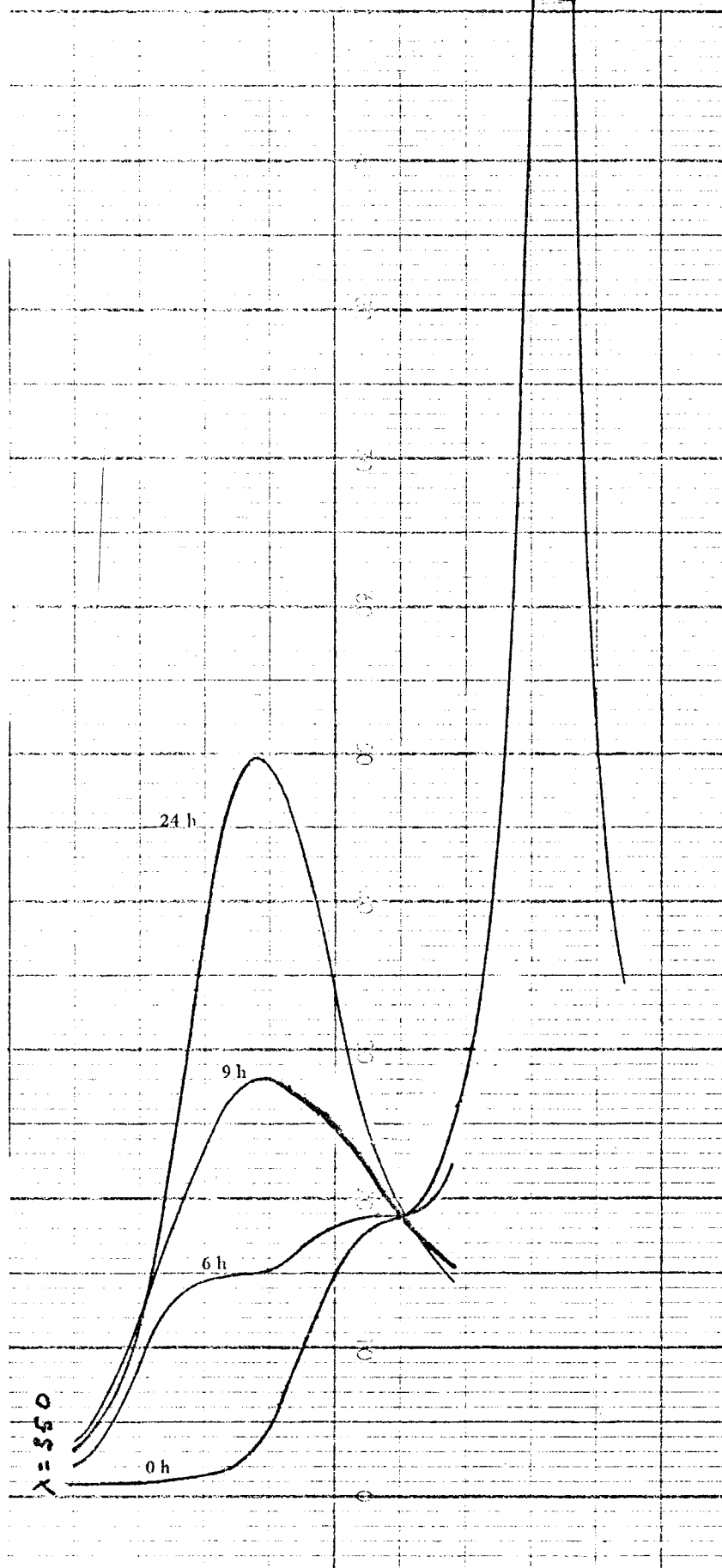


Fig. 36

TABLA XII  
ESTABILIDAD EN TRIS 0,05 M EN ETANOL

Compuesto	Valores de la absorción después de un tiempo (horas)					
	0	1	3	6	9	24
Acido salicílico	0,565	0,565	0,565	0,570	0,570	0,565
Acido acetil salicílico	0,365	0,365	0,360	0,365	0,360	0,365
Salicilamida	0,585	0,585	0,580	0,585	0,585	0,580
Etoxibenzamida	0,825	0,825	0,825	0,820	0,820	0,825
Paracetamol	0,530	0,530	0,530	0,530	0,525	0,525
Fenacetina	0,520	0,520	0,525	0,525	0,520	0,520
Antipirina	0,540	0,540	0,545	0,540	0,540	0,545
Aminopirina	0,430	0,430	0,425	0,425	0,425	0,435
Cafeína	0,515	0,515	0,510	0,510	0,515	0,510
Codeína	0,290	0,290	0,290	0,295	0,290	0,290

#### IV.5.3. Resultados de la elución

Utilizando como eluyente Tris 0,05 M en etanol, y empleando disoluciones en el mismo, de cada una de las sustancias en estudio, iguales en concentración y cuantía a las que se indican en la Tabla IV, se realizaron dos series de ensayos que se diferencian entre sí por la cantidad de Sephadex LH-20 contenido en la columna: en un caso 6 gramos y en otro 12 gramos. El resto de las condiciones operativas se mantienen -- constantes.

Los resultados obtenidos se recogen en las Tablas XIII y XIV. Las curvas de elución (fig. 37 a 39) siguen conservando una buena simetría y los solutos se recogen en un sólo pico, lo que indica que no existe descomposición en la columna. Como al estudiar la influencia del ácido láctico se observó que las posibilidades separativas aumentan con la concentración del electrolito, se utilizó ahora, desde el principio, una concentración elevada de Tris, (0,05 M). La solubilidad de Tris en etanol, a la temperatura ambiente, es de unos 10 g./l por lo que la concentración empleada fué la máxima posible.

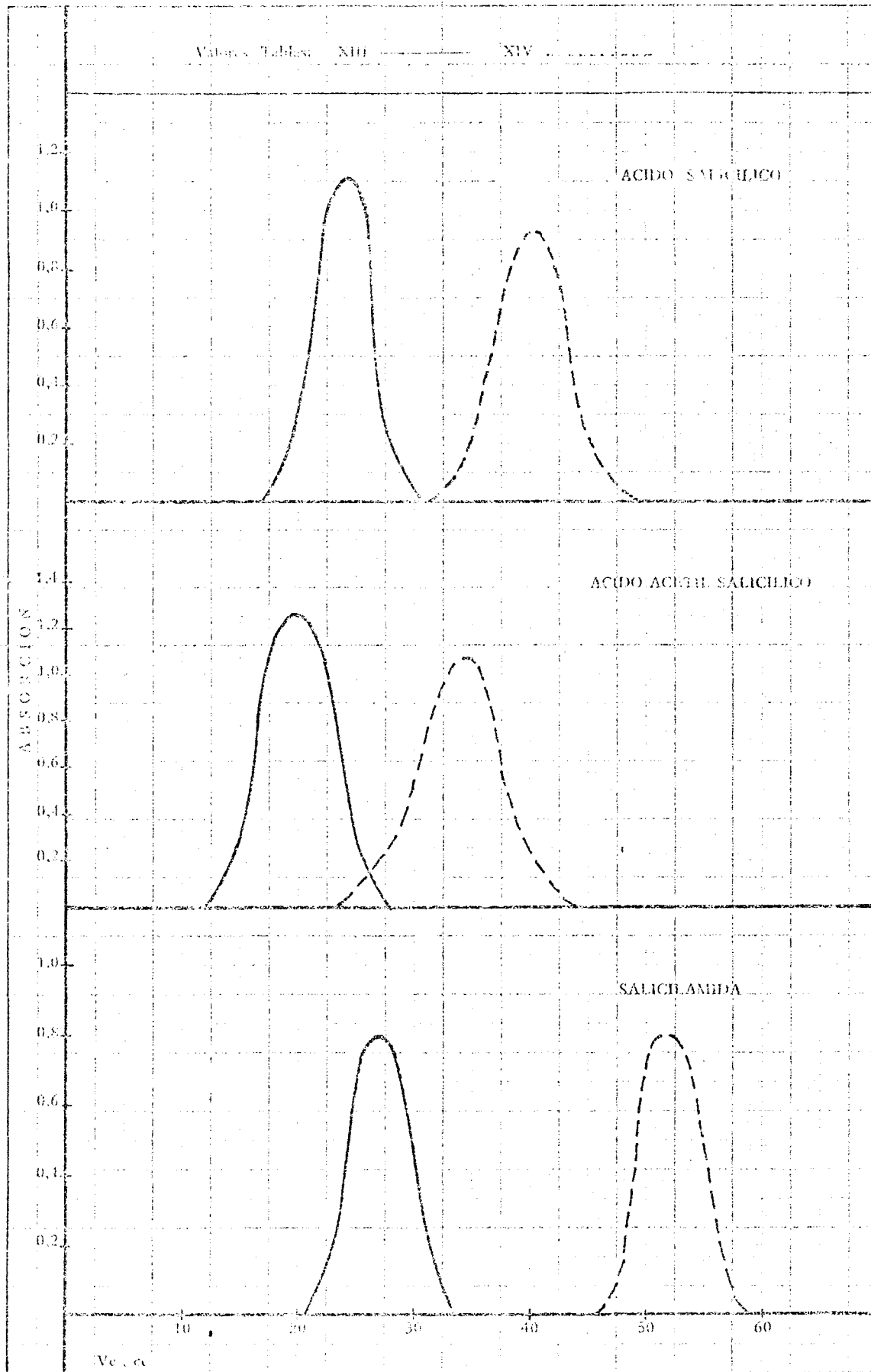


Fig. 37

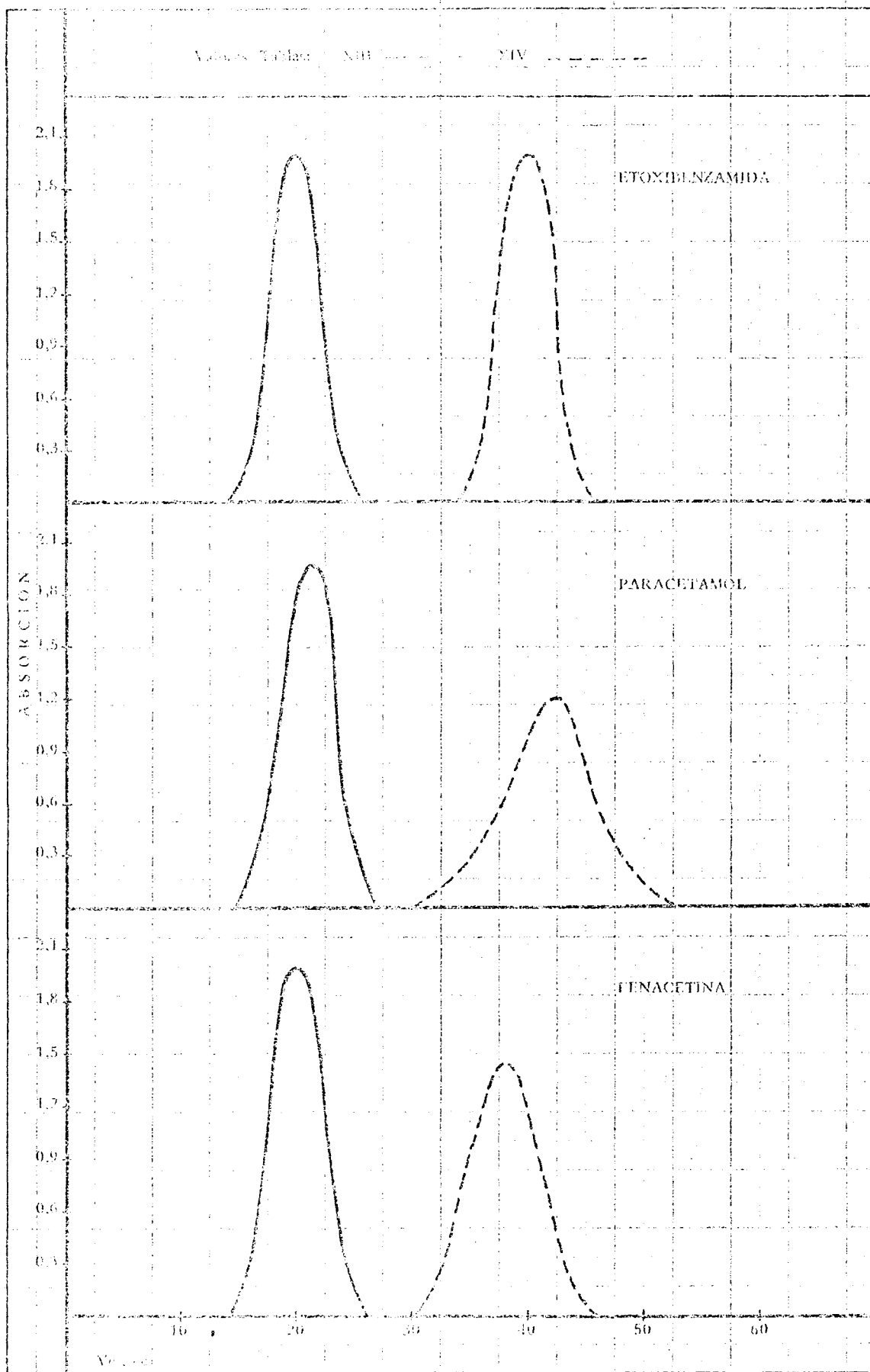


Fig. 38

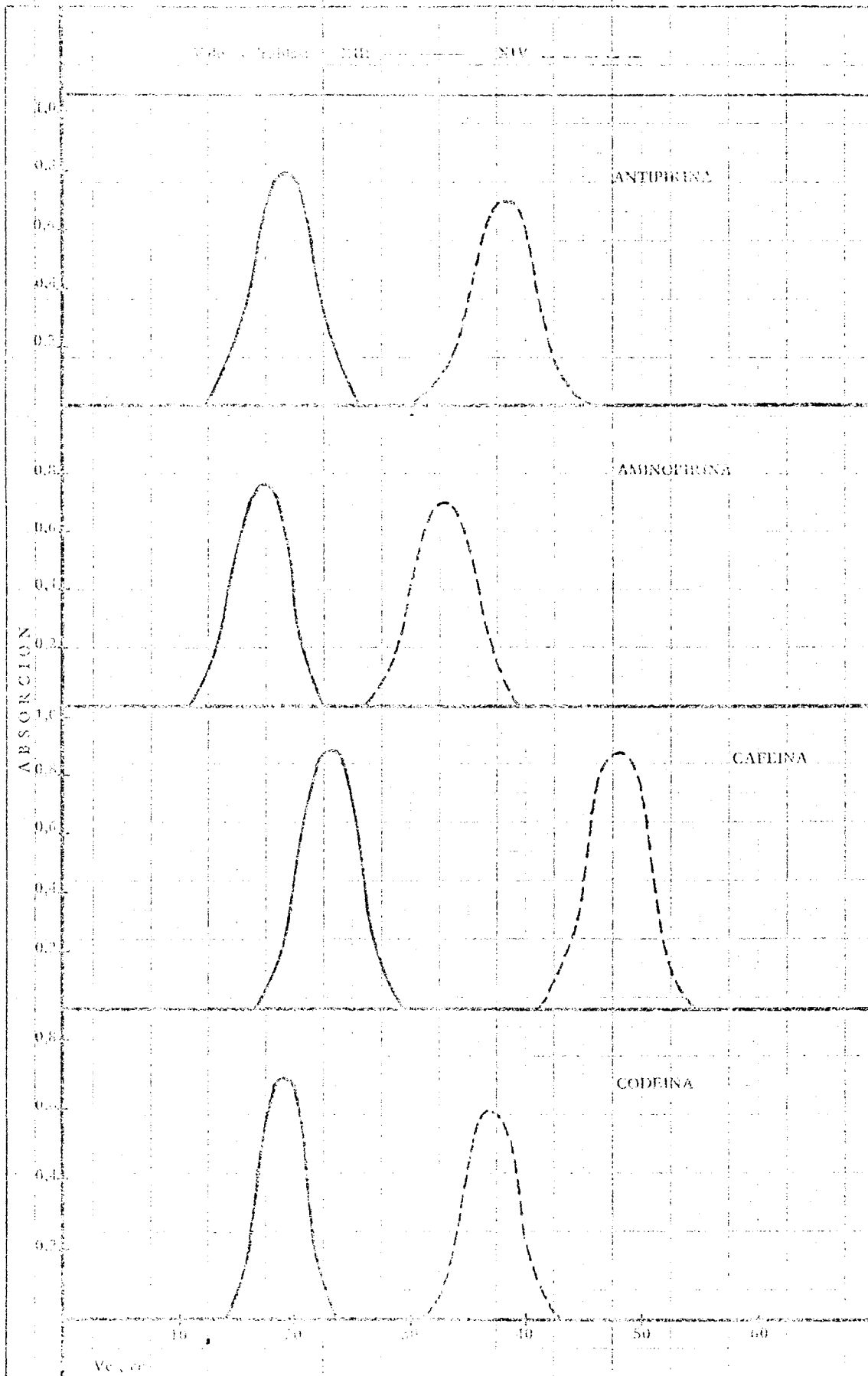


Fig. 39

TABLA XIII

ELUCION CON TRIS 0,05 M, EN ETANOL

Columna: K 15/30

Relleno: 6 g. de Sephadex LH-20

 $V_0 = 8 \text{ c.c.}$   $V_T = 24 \text{ c.c.}$ 

Compuesto	$V_e \text{ c.c.}$	$T_v \text{ c.c.}$	Kd
Acido salicílico	24	14	1,29
Acido acetil salicílico	20	16	0,97
Salicilamida	27	13	1,53
Etoxibenzamida	20	12	0,97
Paracetamol	21	13	1,05
Fenacetina	20	12	0,97
Antipirina	19	14	0,89
Aminopirina	17	12	0,73
Cafeína	23	13	1,21
Codeína	19	10	0,89

TABLA XIV.

ELUCION CON TRIS 0,05 M EN ETANOL

Columna: K 15/30

Relleno: 12 g. de Sephadex LH-20

$V_0 = 15,5 \text{ c.c.}$   $V_t = 48 \text{ c.c.}$

Compuesto	$V_e$ c.c.	$T_V$ c.c.	Kd
Acido salicílico	40	18	0,97
Acido acetil salicílico	34	22	0,73
Salicilamida	52	13	1,44
Etoxibenzamida	40	12	0,97
Paracetamol	42	24	1,04
Fenacetina	38	16	0,89
Antipirina	37	17	0,84
Aminopirina	33	14	0,69
Cafeína	48	14	1,28
Codeína	37	13	0,84

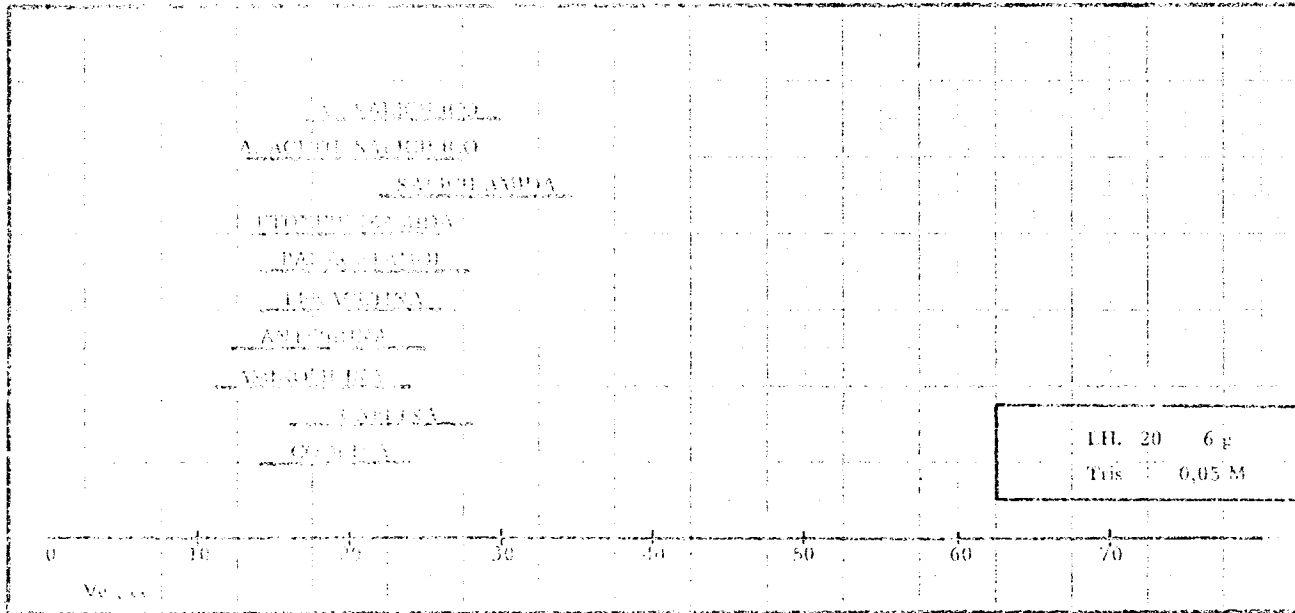


Fig. 41

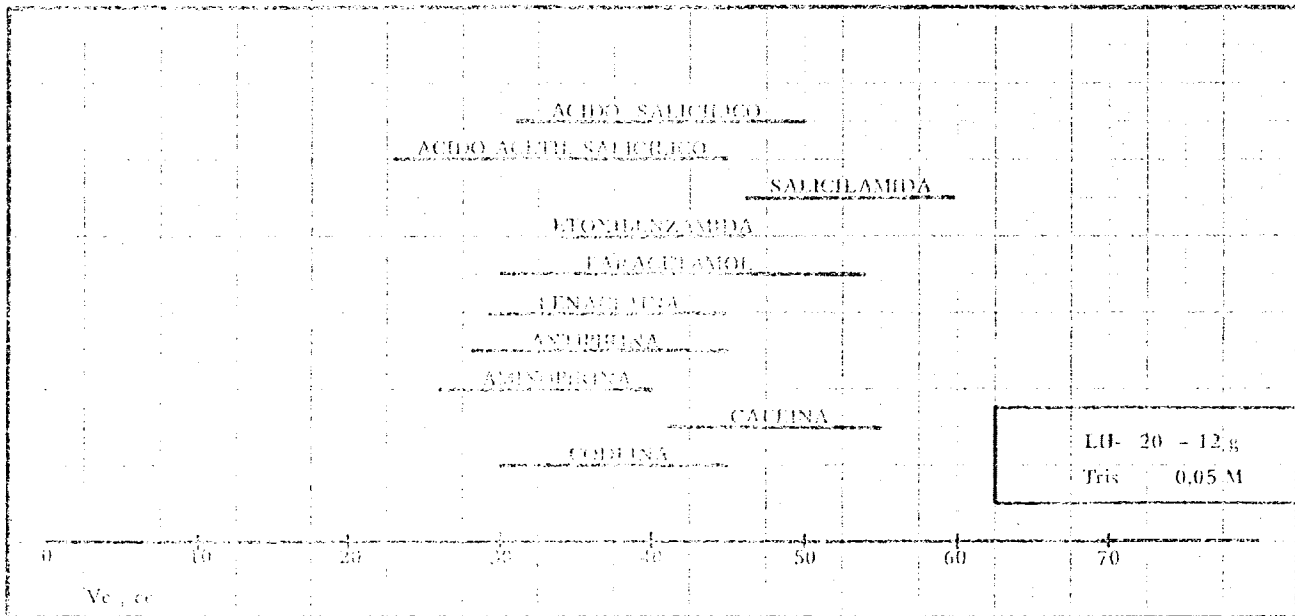


Fig. 42

Las variaciones de los  $V_e$  y de los  $T_V$ , con respecto a las obtenidas en etanol puro, son pocas acusadas, tanto en la serie realizada con 6 gramos como en la de 12 gramos de Sephadex, aunque las posibilidades separativas son mayores en la segunda. Los valores de  $K_d$  son también prácticamente análogos en las dos series, y, en general, comparativamente menores que los hallados con etanol sin adiciones. Esto explica, como puede deducirse de los gráficos de las figuras 41 y 42, que en la columna de 6 gramos de Sephadex los resultados de la separación sean totalmente negativos, incluso peor que con etanol puro, mientras que en la de 12 gramos se pueden separar los siguientes pares de compuestos:

Salicilamida - Acido acetil salicílico  
 Salicilamida - Codeína  
 Salicilamida - Aminopirina  
 Salicilamida - Antipirina  
 Salicilamida - Etoxibenzamida  
 Salicilamida - Fenacetina

Los pares de sustancias separados son prácticamente los mismos que cuando se utiliza ácido láctico como electrolito, con la desventaja de que en algunos disminuye la resolución.

#### IV.6. DETERMINACIONES CUANTITATIVAS

##### IV.6.1. Gráficas de calibrado

De la forma habitual, es decir, mediante la preparación de patrones, se han determinado las gráficas de calibrado de las diferentes sustancias que se separan en etanol o en etanol-láctico, que como se vió anteriormente, en grupos de dos, son todas las estudiadas. Las medidas espectrofotométricas se realizan con un aparato Beckman D-B - G-D . Todas las gráficas de calibrado son líneas rectas dentro de los intervalos de concentración que se indican en la Tabla XV, - por lo que en ésta se incluyen las ecuaciones de proporcionalidad entre la concentración y absorción a -- partir de las cuales se realizan posteriormente las - valoraciones cuantitativas. En la misma Tabla XV se - indica la desviación estandar para los límites máximo y mínimo del intervalo, calculada mediante diez determinaciones que comprenden el proceso completo de cromatografía y espectrofotometría.

Se ha prescindido del sistema etanol-Tris por no aportar ninguna mejora sobre el etanol puro o el - etanol-láctico.

TABLA XV

ECUACIONES DE CALIBRADO EN ETANOL Y EN ETANOL-LACTICO

Compuesto	Intervalo de validez comprobado, p.p.m.	Ecuación de calibrado y = Absorción x = Concentración, mg/g	Coeficiente de correlación	Desviación estándar para	
				Límite mínimo del intervalo	Límite máximo del intervalo
** Acido salicílico $\lambda=300$	10 - 30	$y = 0,019+25,14 x$	1,000	0,101	0,258
** Acido acetil salicílico $\lambda=278$	20 - 80	$y = 0,022+13,25 x$	1,000	0,229	0,439
** Salicilamida $\lambda=302$	10 - 40	$y = 0,072+31,50 x$	0,989	0,100	0,279
* Salicilamida $\lambda=302$	10 - 40	$y = 29 x$	1,000	0,091	0,244
** Etoxibenzamida $\lambda=292$	5 - 20	$y = 0,026+40,50 x$	1,000	0,053	0,187
** Paracetamol $\lambda=250$	5 - 20	$y = 0,215+103 x$	1,000	0,046	0,202
* Paracetamol $\lambda=250$	5 - 20	$y = 0,085+95 x$	1,000	0,052	0,211
** Fenacetina $\lambda=250$	5 - 20	$y = 0,040+92 x$	0,999	0,049	0,195
** Antipirina $\lambda=270$	5 - 20	$y = 0,004+49,50 x$	0,995	0,036	0,176
** Aminopirina $\lambda=269$	5 - 20	$y = 0,003+36,50 x$	1,000	0,044	0,189
** Cafeína $\lambda=273$	5 - 20	$y = 0,042+49 x$	1,000	0,049	0,193
** Codeína $\lambda=285$	20 - 80	$y = 0,010+10,50 x$	0,997	0,191	0,456

\* etano

IV.6.2. Análisis de mezclas sintéticas

En medio etanol se han preparado tres mezclas sintéticas de salicilamida y paracetamol, con cantidades variables de cada una de las sustancias. Seguidamente se indican los resultados obtenidos en la separación y determinación cuantitativa de los mismos, observando que el error relativo se encuentra dentro de la desviación del método determinada.

TABLA XVI

SALICILAMIDA				PARACETAMOL			
Cantidad puesta μg	Cantidad encontrada μg	Δ	Error Relativo %	Cantidad puesta μg	Cantidad encontrada μg	Δ	Error Relativo %
1000	994	-6	0,6	250	247	-3	1,2
1000	989	-11	1,1	1000	991	-9	0,9
250	252	+2	0,8	1000	1003	+3	0,3

De forma semejante se han preparado muestras sintéticas, en ácido láctico en etanol al 1 %, de Salicilamida - Codeina ; Salicilamida - Aminopirina ; Salicilamida -

- Antipirina ; Salicilamida - Etoxibenzamida ; Salicilamida - Fenacetina ; Salicilamida - Cafeina ; Salicilamida - Acido salicílico ; Acido acetil salicílico - Aminopirina y Acido acetil salicílico - Antipirina.

TABLA XVII

SALICILAMIDA				CODEINA			
Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %	Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %
1000	992	8	0,8	500	495	5	1,0
1000	997	3	0,3	2000	1985	15	0,75
250	247	3	1,2	2000	1981	19	0,95

TABLA XVIII

SALICILAMIDA				AMINOPIRINA			
Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %	Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %
1000	993	7	0,7	125	127	2	1,6
1000	997	3	0,3	500	497	3	0,6
250	248	2	0,8	500	499	1	0,2

TABLA XIX

SALICILAMIDA				ANTIPIRINA			
Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %	Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %
1000	994	6	0,6	125	123,5	1,5	1,2
1000	992	6	0,8	500	496	4	0,8
250	251	1	0,4	500	497	3	0,6

TABLA XX

SALICILAMIDA				ETOXIBENZAMIDA			
Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %	Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %
1000	994	6	0,6	125	123	2	1,6
1000	997	3	0,3	500	496	4	0,8
250	247	3	1,2	500	493	7	1,4

TABLA XXI

SALICILAMIDA				FENACETINA			
Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %	Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %
1000	992	6	0,8	125	124	1	0,8
1000	993	7	0,7	500	495	5	1
250	248	2	0,8	500	496	4	0,8

TABLA XXII

SALICILAMIDA				CAFEINA			
Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %	Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %
1000	998	2	0,2	125	124	1	0,8
1000	1001	1	0,1	500	497	3	0,6
250	247	3	1,2	500	494	6	1,2

TABLA XXIII

SALICILAMIDA				ACIDO SALICILICO			
Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %	Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %
1000	996	4	0,4	250	247	3	1,2
1000	989	11	1,1	750	748	2	0,3
250	249	1	0,4	750	744	6	0,9

TABLA XXIV

ACIDO ACETIL SALICILICO				AMINOPIRINA			
Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %	Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %
4000	3960	40	1	125	123	2	1,6
4000	3952	48	1,2	500	495	5	1
1000	986	14	1,4	500	497	3	0,8

TABLA XXV

ACIDO ACETIL SALICILICO				ANTIPIRINA			
Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %	Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %
4000	3962	38	0,95	125	124	1	0,8
4000	3964	36	0,90	500	495	5	1
1000	989	11	1,1	500	498	2	0,4

V. SEPARACIONES EN MEDIO ISOPROPANOL

### V.1. ELECCION DEL DISOLVENTE

En el capítulo anterior se ha comprobado que, en medio etanólico, el efecto aromático es muy poco acusado y, consecuentemente, las separaciones que se logran son muy reducidas. Por otra parte, se disponía de antecedentes bibliográficos sobre la existencia del citado efecto en el isopropanol (138), aun cuando en menor cuantía que en agua. Por ambas circunstancias se estimó procedente estudiar las posibilidades separativas en isopropanol, lo que a su vez permitiría poder comparar los resultados obtenidos en dos alcoholes cuyas constantes físicas son bastantes parecidas entre sí, y no demasiado diferentes a las del agua.

En las Tablas de constantes de manejo habitual no figura la solubilidad en isopropanol de las sustancias a separar; sin embargo, por vía experimental, se comprobó que todas eran suficientemente solubles para poder preparar disoluciones de concentración idéntica a las utilizadas en la experimentación con etanol.

## V.2. ESTABILIDAD DE LAS SUSTANCIAS EN ISOPROPANOL PURO Y CON ADITIVOS DE ACIDO LACTICO Y DE TRIS

Con la misma sistemática seguida en el caso del etanol se realizó el estudio de la estabilidad de las diferentes especies a separar disueltas en isopropanol, así como la de las disoluciones frente al soporte de separación LH-20.

Se realizaron tres series de ensayos: una con isopropanol puro, otra con isopropanol que contiene ácido láctico en concentración al 1% y otra tercera con isopropanol que contiene Tris en concentración 0,05 M.

Efectuados los registros del espectro U.V. de las diferentes sustancias para tiempos diferentes dentro de un intervalo comprendido entre cero y 24 horas, contadas a partir del momento de la preparación de las disoluciones, se comprueba que todas son estables excepto el ácido acetil salicílico que se descompone en ácido salicílico. Con el fin de simplificar en las Tablas XXVI, XXVII y XXVIII figuran las medidas de la absorción efectuadas a los diferentes tiempos, a la longitud de onda más adecuada para cada una de las sustancias. Como

TABLA XXVI  
ESTABILIDAD EN ISOPROPANOL

Compuesto	Absorción después de un tiempo: (horas)					
	0	1	3	6	9	24
Acido salicílico	0,594	0,594	0,597	0,599	0,597	0,592
Acido acetil salicílico	0,652	0,652	0,659	0,659	0,657	0,650
Salicilamida	0,600	0,600	0,605	0,603	0,602	0,603
Etoxibenzamida	1,012	1,012	1,010	1,011	1,012	1,012
Paracetamol	0,875	0,875	0,880	0,879	0,878	0,879
Fenacetina	0,852	0,852	0,852	0,854	0,854	0,855
Antipirina	0,517	0,517	0,521	0,520	0,518	0,520
Aminopirina	0,420	0,420	0,422	0,424	0,422	0,420
Cafeína	0,460	0,460	0,463	0,462	0,463	0,462
Codeína	0,538	0,538	0,538	0,535	0,535	0,535

TABLA XXVII

ESTABILIDAD EN ACIDO LACTICO EN ISOPROPANOL 1 %

Compuesto	Absorción después de un tiempo: (horas)					
	0	1	3	6	9	24
Acido salicílico	0,589	0,589	0,589	0,592	0,592	0,590
Acido acetil salicílico	0,612	0,612	0,617	0,617	0,616	0,614
Salicilamida	0,605	0,603	0,603	0,605	0,605	0,605
Etoxibenzamida	0,500	0,502	0,502	0,504	0,504	0,500
Paracetamol	0,892	0,894	0,894	0,894	0,893	0,892
Fenacetina	0,870	0,870	0,872	0,874	0,874	0,871
Antipirina	0,502	0,503	0,503	0,503	0,502	0,502
Aminopirina	0,435	0,431	0,433	0,435	0,435	0,435
Cafeína	0,451	0,451	0,451	0,451	0,450	0,451
Codeína	0,531	0,531	0,533	0,533	0,532	0,532

TABLA XXVIII

ESTABILIDAD EN TRIS 0,05 M EN ISOPROPANOL

Compuesto	Absorción después de un tiempo: (horas)					
	0	1	3	6	9	24
Acido salicílico	0,598	0,598	0,598	0,598	0,560	0,598
Acido acetil salicílico	0,522	0,524	0,527	0,527	0,532	0,536
Salicilamida	0,605	0,605	0,605	0,605	0,605	0,605
Etoxibenzamida	0,510	0,511	0,511	0,513	0,512	0,509
Paracetamol	0,462	0,462	0,464	0,464	0,466	0,465
Fenacetina	0,451	0,450	0,451	0,452	0,452	0,450
Antipirina	0,520	0,521	0,521	0,520	0,521	0,520
Aminopirina	0,431	0,433	0,432	0,433	0,433	0,431
Cafeína	0,473	0,474	0,476	0,476	0,476	0,472
Codeína	0,544	0,544	0,544	0,546	0,548	0,545

ya se indicó en la serie del etanol esta medida, que en general es válida para un estudio de estabilidad, en el caso del acetyl salicílico no es suficiente ya que el salicílico presenta también absorción en la longitud de onda del máximo del acetyl salicílico -- por lo que este no disminuye a pesar de que se descomponga. Por lo tanto en el caso del ácido acetyl salicílico se incluyen los espectros totales del mismo, en isopropanol puro y en isopropanol tris, en los que se puede observar que la descomposición en isopropanol puro fig. 43 es muy pequeña, mientras que en isopropanol Tris fig. 44 es tan fuerte que a las veinticuatro horas prácticamente ha desaparecido la totalidad del ácido acetyl salicílico. No se han recogido los espectros U.V. de las disoluciones de ácido acetyl salicílico en isopropanol con ácido láctico porque todos ellos son idénticos, confirmándose así los resultados obtenidos en etanol acerca de la acción estabilizante del ácido láctico sobre el ácido acetyl salicílico.

Asimismo, y por análogo procedimiento, se comprueba que las disoluciones son estables al pasar a través del soporte LH-20 y que, incluso, el ácido acetyl salicílico no experimenta más transformaciones que las debidas al propio medio.

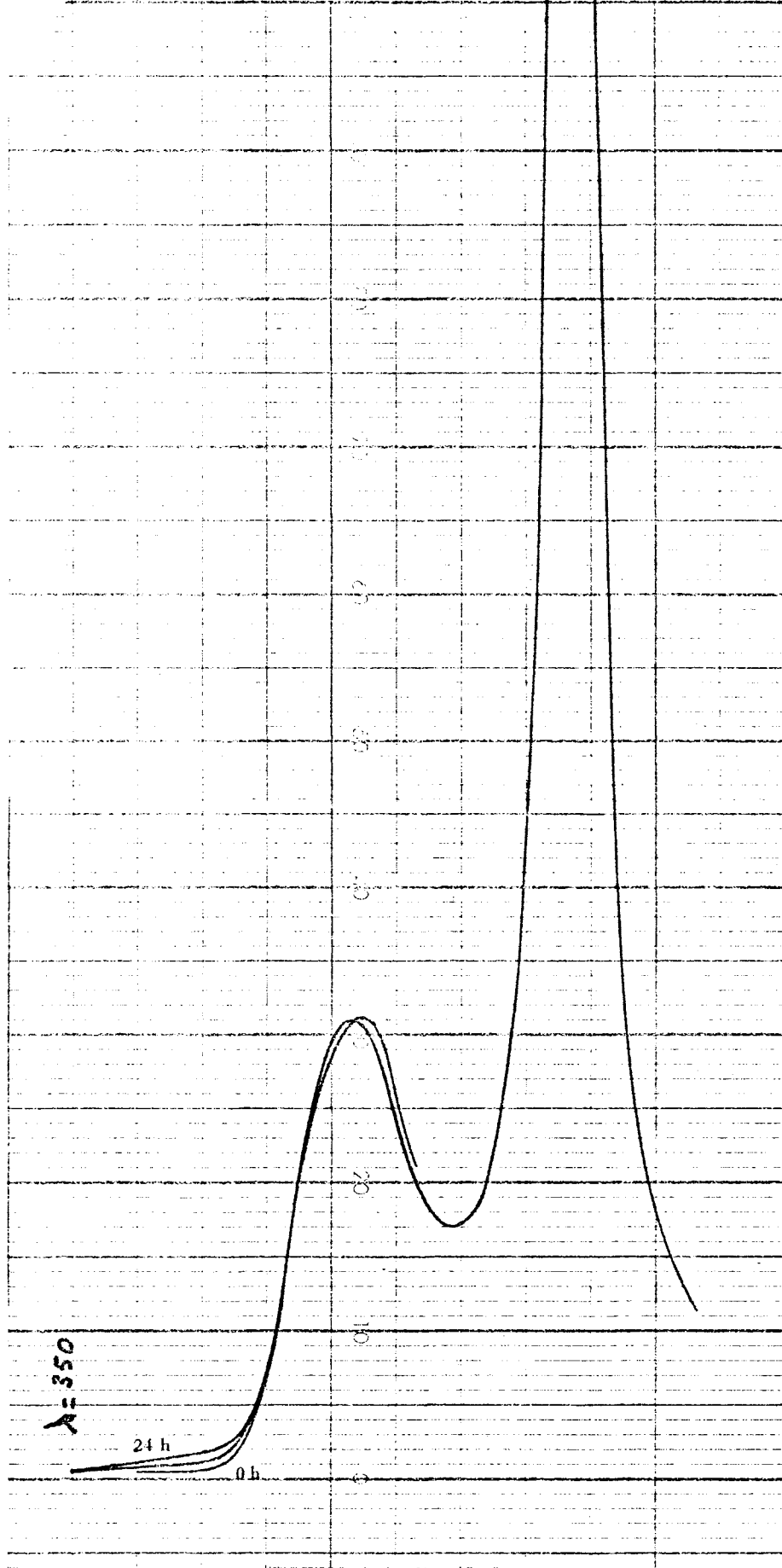


Fig. 43

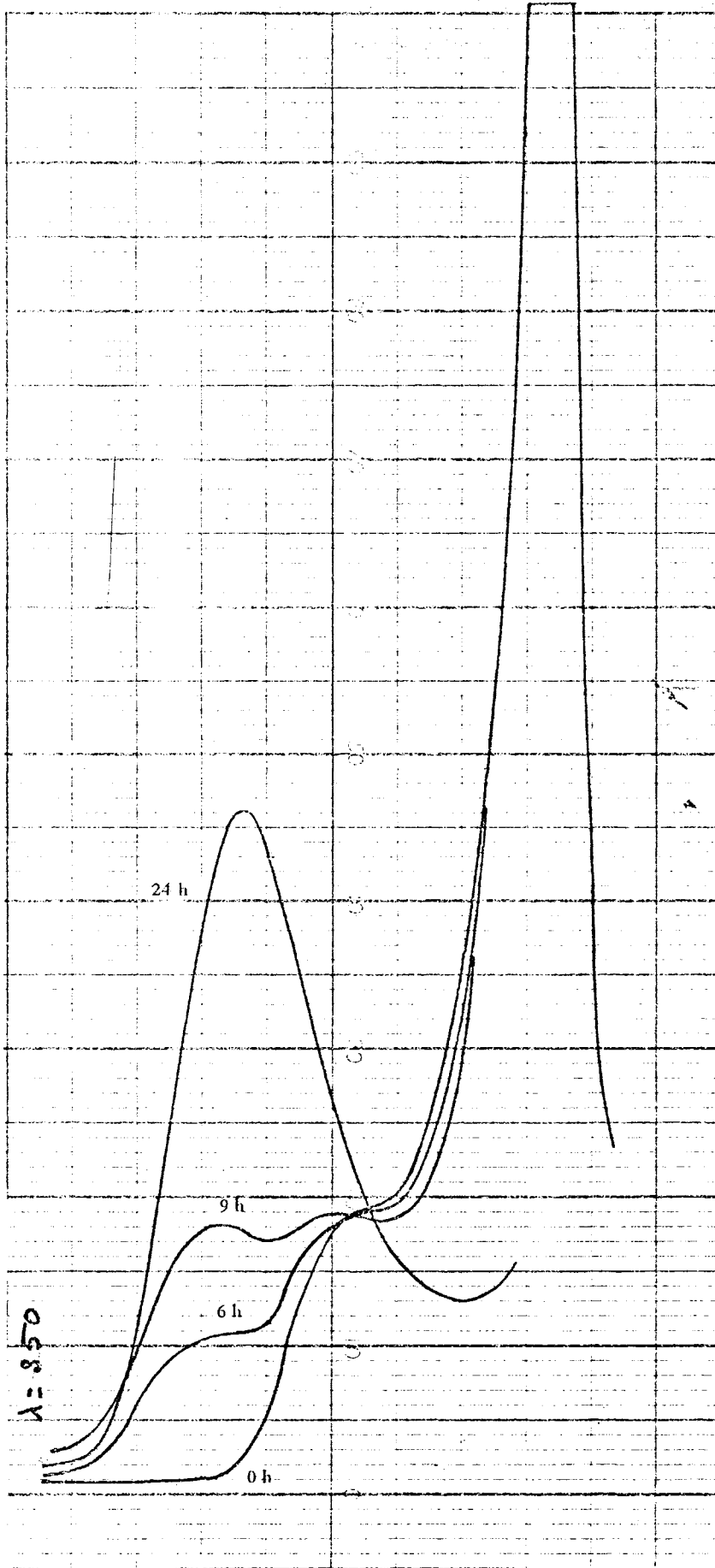


Fig. 44

### V.3. SEPARACIONES EN ISOPROPANOL PURO

Se prepararon disoluciones en isopropanol de las diferentes especies en estudio de concentración idéntica a las de etanol. Se utiliza una columna de 12 gramos de Sephadex LH-20, por ser el caso en el que mejores resultados se habían conseguido en etanol, a la que se incorporaron, asimismo, volúmenes de cada una de las disoluciones iguales a las utilizadas en la serie del etanol (véase Tabla IV).

En la Tabla XXIX se recogen los valores de  $V_e$ ,  $T_v$  y  $K_d$  obtenidos que, en principio, no son demasiado diferentes de los obtenidos en etanol. La analogía de los valores de  $K_d$  prueba que la retención es muy similar en los dos tipos de alcoholes. Sin embargo, en los  $V_e$  se observan diferencias, que, aunque no son acusadas, resultan significativas para los casos de etoxibenzamida, paracetamol, fenacetina, ácido salicílico y salicilamida. Para los tres primeros los  $V_e$  disminuyen un poco, mientras que aumentan, también de forma muy ligera, para los dos últimos. Bastan estas pequeñas modificaciones de los valores de  $V_e$  para que se aumenten, de forma sustancial, las posibili

TABLA XXIX

ELUCION CON ISOPROPANOL

Columna: K 15/30

Relleno: 12 g. de Sephadex LH-20

$V_t = 46,8 \text{ c.c.}$   $V_o = 15,5 \text{ c.c.}$

Compuesto	$V_e \text{ c.c.}$	$T_V \text{ c.c.}$	Kd
Acido salicílico	68	33	2,18
Acido acetil salicílico	43	15	1,14
Salicilamida	63	24	1,97
Etoxibenzamida	40	15	1,02
Paracetamol	38	19	0,93
Fenacetina	32	14	0,68
Antipirina	35	18	0,81
Aminopirina	37	14	0,89
Cafeína	53	15	1,55
Codeína	42	16	1,09

dades de separación. En efecto en la fig. 45 se puede observar que si bien sólo se logran separar pares de sustancias, el conjunto de posibilidades que se ofrece en medio isopropanol puro, es:

Acido salicílico - Acido acetil salicílico

Acido salicílico - Etoxibenzamida

Acido salicílico - Paracetamol

Acido salicílico - Fenacetina

Acido salicílico - Antipirina

Acido salicílico - Aminopirina

Acido salicílico - Codeína

Salicilamida - Acido acetil salicílico

Salicilamida - Etoxibenzamida

Salicilamida - Paracetamol

Salicilamida - Fenacetina

Salicilamida - Antipirina

Salicilamida - Aminopirina

Salicilamida - Codeína

Cafeína - Fenacetina

Cafeína - Antipirina

Cafeína - Aminopirina

Es decir, las modificaciones de  $V_e$ , aún siendo pequeñas, son suficientes para conseguir once separaciones más que en etanol.

#### V.4. SEPARACIONES CON ACIDO LACTICO 1% EN ISOPROPANOL

En la Tabla XXX se recogen los valores para  $V_e$ ,  $T_V$  y  $K_d$ , que son iguales o menores a los obtenidos con isopropanol puro. En la fig. 46 se observa que los pares de sustancias separables son:

Salicilamida - Etoxibenzamida

Salicilamida - Fenacetina

Salicilamida - Antipirina

Salicilamida - Aminopirina

Salicilamida - Codeína

Cafeína - Antipirina

Cafeína - Aminopirina

Cafeína - Fenacetina

Son, pues, notablemente inferiores en número a los conseguidos con isopropanol puro e incluso con -- etanol-ácido láctico. Comparativamente con este último, ahora es posible separar cafeína de antipirina, - aminopirina y fenacetina; pero estas tres posibilidades se ofrecen igualmente con isopropanol puro. En resumen, la incorporación de ácido láctico disminuye posibilidades, pues la ventaja de inhibir la descomposición del ácido acetyl salicílico pierde todo su sentido al ser inviable su separación.

TABLA XXX

ELUCION CON ACIDO LACTICO EN ISOPROPANOL AL 1%

Columna: K 15/30

Relleno: 12 g. de Sephadex LH-20

 $V_t = 46,8 \text{ c.c.}$   $V_o = 15,5 \text{ c.c.}$ 

Compuesto	$V_e$ c.c.	$T_v$ c.c.	Kd
Acido salicílico	48	16	1,34
Acido acetil salicílico	42	14	1,09
Salicilamida	55	18	1,63
Etoxibenzamida	39	14	0,97
Paracetamol	39	18	0,97
Fenacetina	32,5	15	0,70
Antipirina	34	17	0,76
Aminopirina	33	14	0,72
Cafeína	50	12	1,43
Codeína	41,5	13	1,07

#### V.5. SEPARACIONES CON TRIS 0,05 M EN ISOPROPANOL

Operando en idénticas condiciones que en todos los casos anteriores, se han obtenido los valores de  $V_e$ ,  $T_V$  y  $K_d$  que se recogen en la Tabla XXXI. Puede observarse que son muy parecidos a los de isopropanol láctico. En la fig. 47 se observa claramente que las separaciones posibles quedan reducidas a los siguientes pares de sustancias.

Salicilamida - Fenacetina  
Salicilamida - Antipirina  
Salicilamida - Aminopirina  
Salicilamida - Codeína  
Cafeína - Aminopirina

Son, pues, menores en número que en los casos del isopropanol - láctico o del etanol Tris y, consecuentemente, inferiores a los del isopropanol puro, sin que tampoco aparezcan pares de sustancias cuya separación no fuera posible en isopropanol sin aditivos.

TABLA XXXI

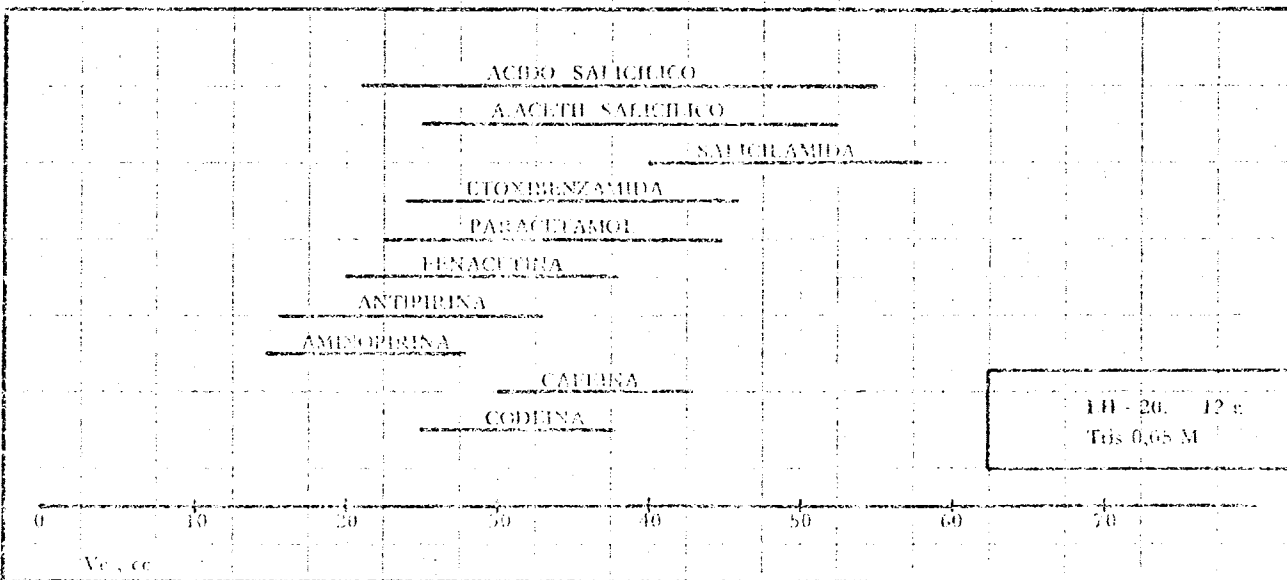
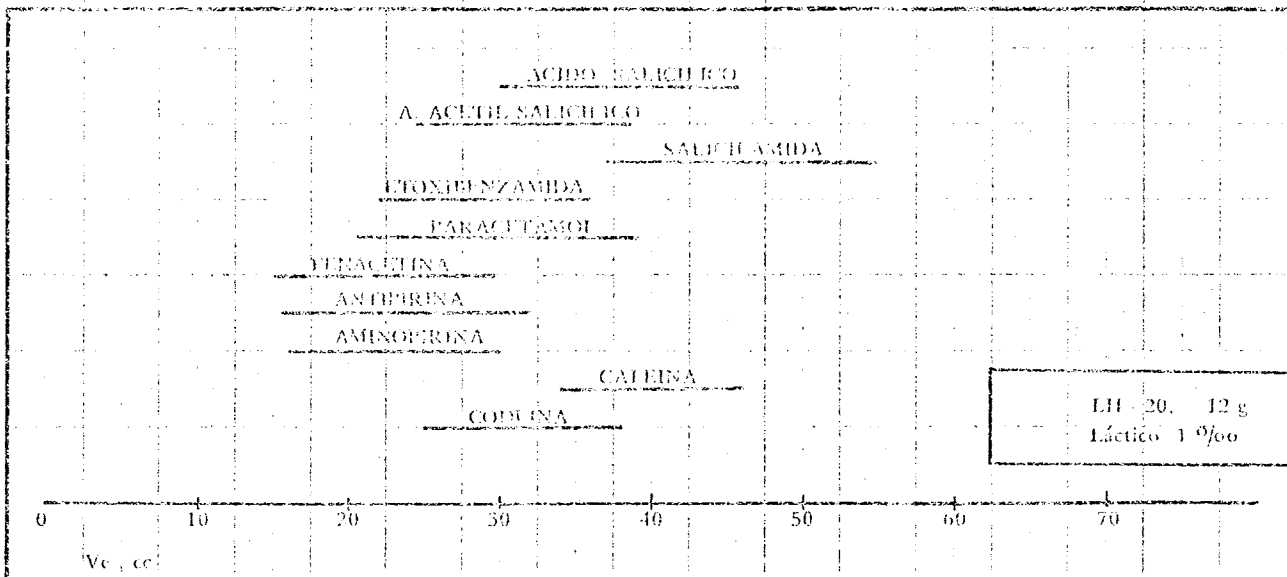
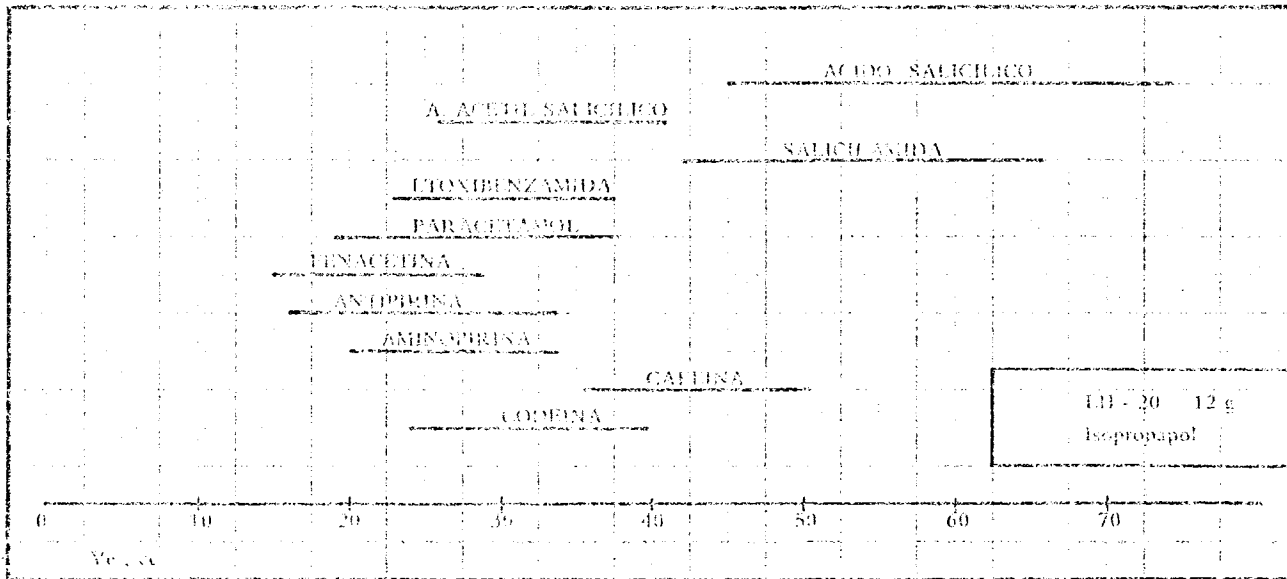
ELUCION CON TRIS 0,05 M EN ISOPROPANOL

Columna: K 15/30

Relleno: 12 g. de Sephadex LH-20

 $V_t = 46,8 \text{ c.c.}$   $V_o = 15,5 \text{ c.c.}$ 

Compuesto	$V_e$ c.c.	$T_v$ c.c.	Kd
Acido salicílico	49	34	1,39
Acido acetil salicílico	50	27,5	1,43
Salicilamida	59	20	1,80
Etoxibenzamida	42	18	1,09
Paracetamol	42	22	1,09
Fenacetina	37	15	0,89
Antipirina	33,5	15	0,74
Aminopirina	31	13	0,64
Cafeína	44	17	1,18
Codeína	41	23	1,05



## V.6. DETERMINACIONES CUANTITATIVAS

### V.6.1. Gráficas de calibrado

A la vista de los resultados obtenidos en la separación, las determinaciones cuantitativas se limitan a isopropanol sin adiciones. En la Tabla XXXII se recogen las ecuaciones de valoración en este medio de cada una de las sustancias en estudio.

Para el ácido acetil salicílico también es válida la ecuación de valoración propuesta, si bien el resultado está afectado de un error por defecto debido a la descomposición que tiene lugar durante el tiempo que se invierte en el proceso cromatográfico. Para subsanar ese error se utiliza un factor de corrección obtenido del estudio cinético de la descomposición. En la Fig. 48 se representa la descomposición del ácido acetil salicílico en función del tiempo durante las veinticuatro horas del estudio inicial de estabilidad y en la Fig. 49 la descomposición porcentual del ácido acetil salicílico durante las tres primeras horas. De esta última gráfica puede deducirse que el factor de corrección, en

TABLA XXXII  
 ECUACIONES DE CALIBRADO EN ISOPROPANOL

Compuesto	Intervalo de validez comprobado, p.p.m.	Ecuación de calibrado x = Concentración mg/c.c. y = Absorción	Coeficiente de correlación	Desviación estándar para	
				Límite mínimo del intervalo	Límite máximo del intervalo
Acido salicílico $\lambda=306$	10 - 30	$y = 0,072+25,286 x$	1,000	0,901	0,261
Acido acetil salicílico $\lambda=278$	20 - 30	$Y = -0,035+13,25 x$	0,999	0,197	0,415
Salicilamida $\lambda=305$	10 - 40	$y = -0,012+29,5 x$	1,000	0,083	0,265
Etoxibenzamida $\lambda=292$	5 - 20	$y = -0,034+41,5 x$	1,000	0,049	0,189
Paracetamol $\lambda=250$	5 - 20	$y = -0,098+97 x$	1,000	0,053	0,198
Fenacetina $\lambda=252$	5 - 20	$y = -0,040+92 x$	0,999	0,051	0,203
Antipirina $\lambda=274$	5 - 20	$y = -0,117+60 x$	0,995	0,047	0,192
Aminopirina $\lambda=272$	5 - 20	$y = -0,190+36,5 x$	1,000	0,039	0,178
Cafeína $\lambda=276$	5 - 20	$y = -0,007+46 x$	0,999	0,046	0,187
Codeína $\lambda=288$	20 - 80	$y = -0,04+10,125 x$	1,000	0,188	0,411

DESCOMPOSICION DEL ACIDO ACETIL SALICILICO EN ISOPROPANOL

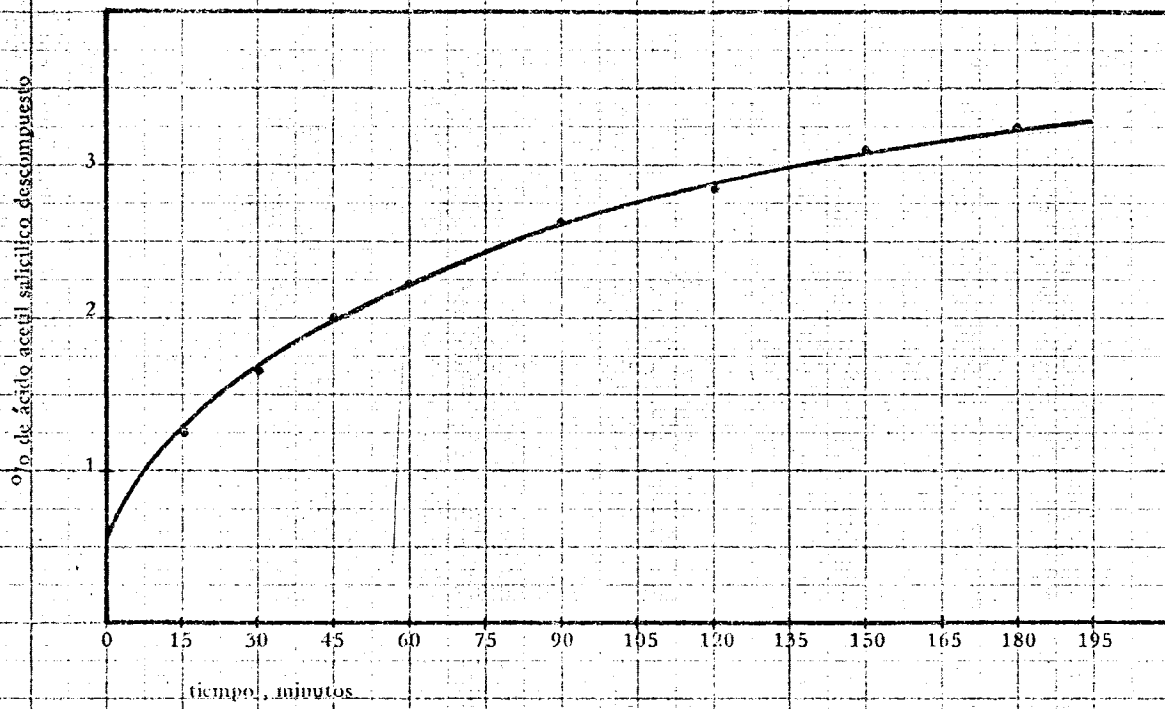


Fig. 49

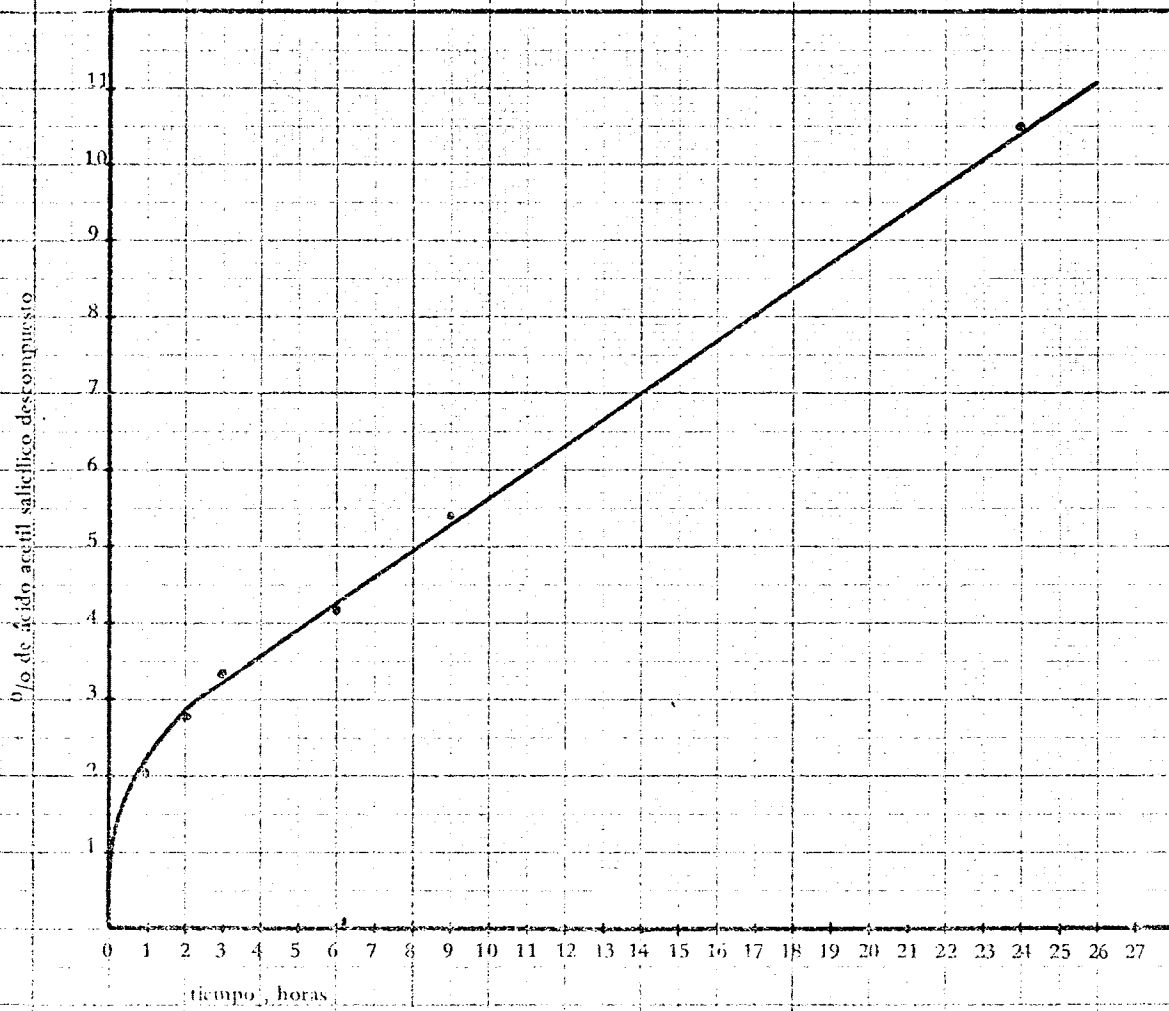


Fig. 48

nuestro caso, es de 1,023 ya que el tiempo empleado en el proceso es inferior a una hora.

#### V.6.2. Análisis de mezclas sintéticas

Dado el gran número de pares de sustancias que es posible separar en este medio, no se ha realizado el análisis de todos ellos, sino que se ha prescindido de las mezclas separables en etanol, ya que como, en general, las sustancias son más solubles en este disolvente, su empleo resultaría más adecuado. También se ha prescindido de aquellos pares en que interviene el ácido salicílico con otra sustancia, puesto que el salicílico, por sí mismo, no debe encontrarse en las mezclas analgésicas.

De los pares de sustancias restantes se han --  
preparado tres mezclas de cada uno y los resultados --  
obtenidos se recogen en las tablas XXXIII a XXXVII.

TABLA XXXIII

ANTIPIRINA				CAFEINA			
Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %	Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %
250	252	2	0,8	5000	1989	-11	0,55
1000	995	-5	0,5	2000	2000	0	0
1000	992	-8	0,8	500	502	2	0,4

TABLA XXXIV

AMINOPIRINA				CAFEINA			
Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %	Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %
250	248	-2	0,8	2000	1983	-17	0,85
1000	1007	7	0,7	2000	1996	-4	0,02
1000	998	2	0,02	500	494	-6	1,2

TABLA XXXV

FENACETINA				CAFEINA			
Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %	Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %
250	247	-3	1,2	2000	1983	-17	0,85
1000	996	-4	0,4	2000	1998	-2	0,01
1000	992	-8	0,8	500	496	4	0,8

TABLA XXXVI

ACIDO ACETIL SALICILICO				SALICILAMIDA			
Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %	Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %
4000	3882	-118	2,95	500	519	19	3,8
4000	3876	-124	3,1	2000	2058	58	2,9
1000	977	-23	2,3	2000	2034	34	1,7

TABLA XXXVII

ACIDO ACETIL SALICILICO				ACIDO SALICILICO			
Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %	Cantidad puesta Mg	Cantidad encontrada Mg		Error Relativo %
4000	3888	-112	2,8	1000	969	31	3,1
4000	3894	-106	2,65	3000	2925	75	2,5
1000	976	-24	2,4	3000	2934	66	2,2

VI. SEPARACIONES EN MEDIO AGUOSO

## VI.1. SOLUBILIZACION EN MEDIO ACUOSO

### VI.1.1. Solubilización en medio ácido

Tanto en etanol como en isopropanol los Kd obtenidos para parte de las sustancias son superiores a la unidad, debido, en unos casos, a su naturaleza aromática y, en otros, a la existencia de heterociclos. Era, pues, muy probable que la retención y las posibilidades separativas se favorecieran en medio acuoso; sin embargo, este medio se había soslayado inicialmente por la escasa solubilidad en el mismo de las sustancias objeto de este estudio. No obstante, es sabido que la disolución en agua de sustancias orgánicas, habitualmente insolubles en este medio, puede favorecerse por dos procedimientos:

- a) por la adición de otras sustancias orgánicas, solubles en agua
- b) por la previa disolución de las mismas en -- otros disolventes, que a su vez sean miscibles con el agua.

El ácido láctico reúne la doble condición de ser soluble en agua y ser disolvente de antipirina, aminopi

rina, cafeína y codeína. Por ello, para obtener disoluciones acuosas de estas sustancias se toman de 50 a 100 mg de las mismas, se disuelven en 1 c.c. de ácido láctico y se diluyen con agua hasta el volumen deseado. Por otra parte, etoxibenzamida, paracetamol, fenacetina, salicilamida, ácido acetyl salicílico y ácido salicílico se pueden disolver en etanol-ácido láctico, 1:1. A tal fin se toman, igualmente, de 50 a 100 mg de sustancia, se disuelven en 2 c.c. de la mezcla -- etanol-láctico y se diluyen con agua. Se ha comprobado que, después de diluir con agua, basta una concentración de láctico del 0,5 % para que las sustancias se mantengan en disolución.

De esta manera se ha conseguido poner en disolución, en un medio prácticamente acuoso, la totalidad de las sustancias objeto de estudio, con la ventaja de que, además, se encuentra en la disolución ácido láctico, compuesto que, en etanol, se ha comprobado que ejerce una acción favorable para los fines pretendidos, aun cuando en isopropanol no se mantiene.

#### VI.1.2. Solubilización en medio básico

El Tris hidroximetil amino metano, que por ser sólido no puede emplearse como disolvente, es soluble

en agua y permite, además, mantener las sustancias en solución. El procedimiento seguido para ello consiste en disolver de 50 a 100 mg de cada una de las sustancias en 2 c.c. de etanol, diluyendo posteriormente -- con una disolución de Tris hasta el volumen deseado. Se han utilizado disoluciones de Tris de concentración 0,01 M, 0,02 M, 0,1 M y 0,12 M. Las disoluciones se - tamponan con ácido clorhídrico, a pH = 7,5.

## VI.2. ESTABILIDAD DE LAS SUSTANCIAS EN DISOLUCION ACUOSA

### VI.2.1. Estabilidad en láctico al 0,5 %.

De forma similar a como se realizó con los otros medios disolventes, se ha estudiado la estabilidad de las sustancias tanto en el nuevo medio como durante su paso, en disolución, a través del soporte separativo. En todos los casos, excepto en el del acetyl salicílico, se ha comprobado que son estables. El ácido acetyl salicílico es también bastante estable, pues su hidrólisis comienza a apreciarse a las tres horas, lo que viene a confirmar la acción inhibidora del ácido láctico, tal como había sido observado en los dos medios alcohólicos (Tabla XXXVIII)

### VI.2.2. Hidrólisis del ácido acetyl salicílico en función del pH

Ante la fácil hidrólisis del ácido acetyl salicílico, en especial en medio básico, se realizó un estudio de la estabilidad a distintos pH con objeto de definir el intervalo en el que la hidrólisis sea menos

TABLA XXXVIII

ESTABILIDAD EN ACIDO LACTICO EN AGUA AL 0,5 ‰

Compuesto	Valores de la absorción después de un tiempo: (horas)					
	0	1	3	6	9	24
Acido salicílico	0,520	0,520	0,520	0,520	0,525	0,520
Acido acetil salicílico	0,530	0,530	0,530	0,535	0,535	0,530
Salicilamida	0,548	0,548	0,548	0,548	0,550	0,545
Etoxibenzamida	0,720	0,725	0,720	0,725	0,731	0,725
Paracetamol	0,690	0,695	0,700	0,700	0,700	0,690
Fenacetina	0,660	0,665	0,665	0,665	0,670	0,655
Antipirina	0,525	0,530	0,530	0,530	0,535	0,525
Aminopirina	0,420	0,425	0,430	0,430	0,430	0,425
Cafeína	0,540	0,540	0,545	0,548	0,545	0,540
Codeína	0,455	0,450	0,455	0,460	0,460	0,455

elevada, dentro del cual deberá operarse, posteriormente, en los ensayos de separación.

Para ello se prepararon disoluciones 0,05 M de Tris de pH 4 ; 5,5 ; 6,5 ; 7 ; 7,5 ; 8 y 9 con dos concentraciones de ácido acetil salicílico: 25 y 50 ppm. El pH se modificó mediante la adición de ácido clorhídrico, antes de llevar la disolución a volumen requerido en cada caso.

La descomposición se estudia espectrofotométricamente y los resultados obtenidos aparecen en las -- figs. 50 y 51 no existiendo diferencia entre las muestras de 25 y 50 p.p.m. Como puede observarse en -- todos los casos se produce una descomposición, creciente con el pH. Esta descomposición a partir de una hora es lineal en función del tiempo, mientras que en -- función del pH las curvas son de forma sigmoidea. Como después se verá, el tiempo que se tarda en realizar -- el proceso cromatográfico para el ácido acetilsalicílico es de una hora, lo cual quiere decir que la descomposición del ácido acetil salicílico no resulta de -- demasiado elevada. Ahora bien el estudio del comportamiento separativo de las sustancias en medio básico -- requiere efectuarse en el de menor basicidad posible, es decir a pH 7 - 7,5, a fin de que la fracción hidro-

DESCOMPOSICIÓN DEL ACIDO ACETIL SAICILICO EN TRIS-CHH

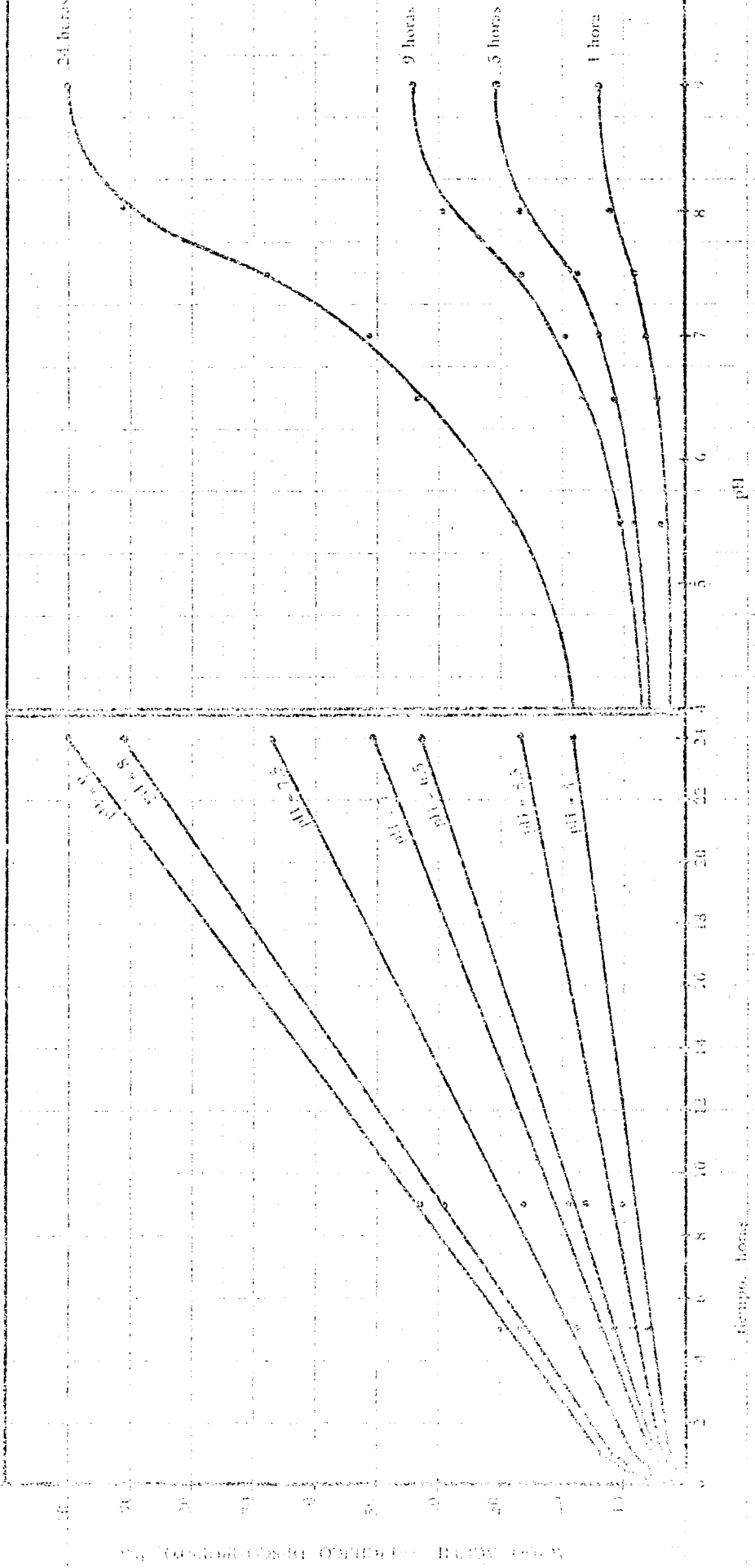


Fig. 51

Fig. 30

lizada sea la menor posible. En la figura 52 se recoge con mayor detalle la descomposición del ácido -- acetil salicílico a pH 7,5 con objeto de poder realizar la corrección que proceda, debida a la hidrólisis, según el tiempo invertido en la separación cromatográfica. Se observa que con una duración de hora a hora y media el factor de corrección oscila entre 1,074 y 1,101.

A pH 4 y pH 5,5 existe también hidrólisis, pero ahora cualitativamente más acusada que cuando se opera con ácido láctico a estos mismos valores de pH. Cabía pues pensar que el ácido láctico mantiene en medio acuoso una cierta acción estabilizante o, por el contrario, que el Tris favorece la hidrólisis. Para -- aclarar estos aspectos se realizó un nuevo estudio de estabilidad a pH 3 utilizando los tres medios siguientes: TRIS - Ac. clorhídrico, ácido clorhídrico y ácido láctico. Los resultados se recogen en la fig. 53 observando que en la hidrólisis es prácticamente idéntica con ácido clorhídrico y ácido láctico, y que por tanto, para un mismo pH, el TRIS favorece la descomposición.

HIDROLISIS DEL A. ACETIL SALICILICO CON TAMPON TRIS pH = 7,5

°% ACIDO ACETIL SALICILICO DESCOMPUESTO

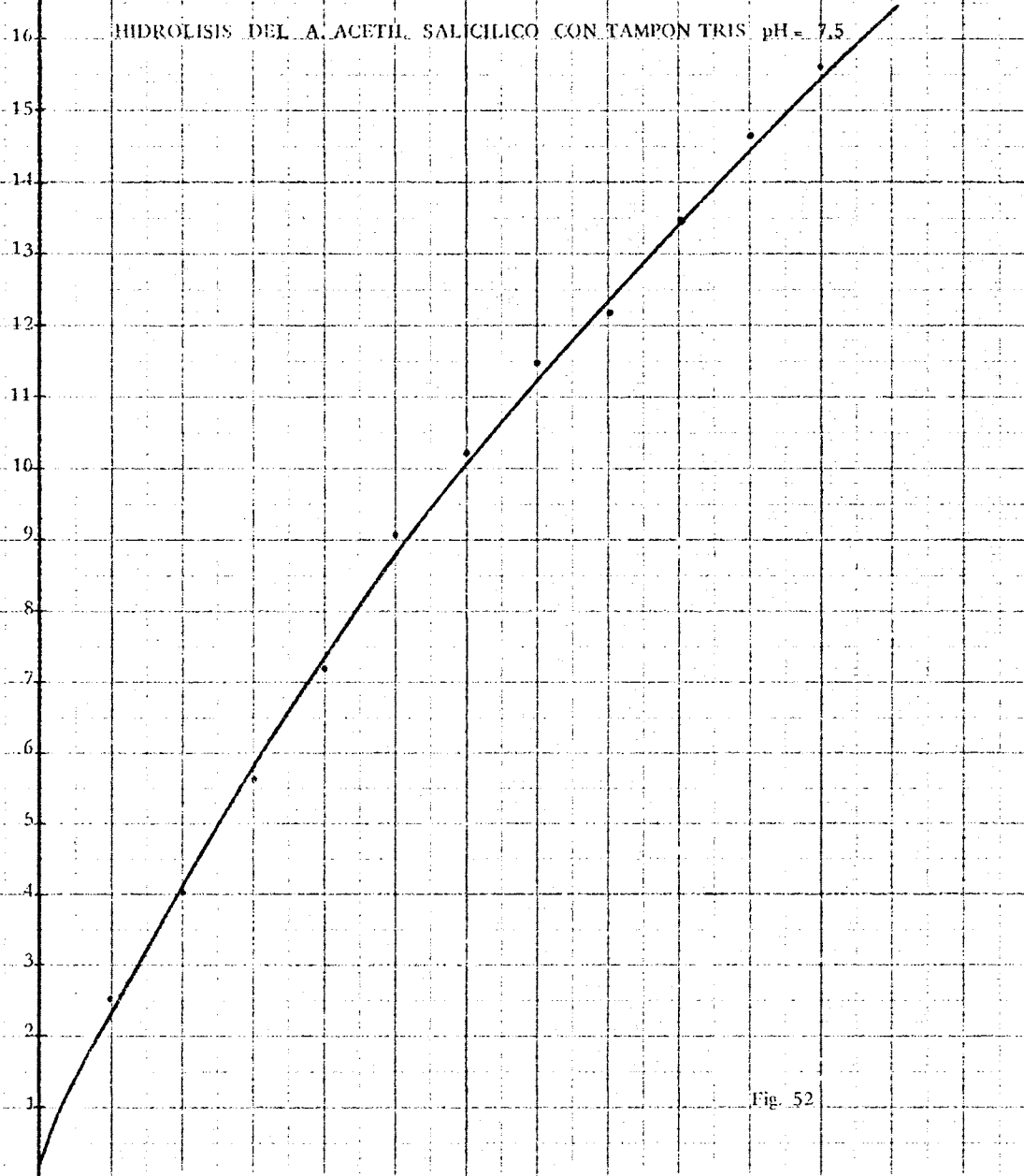


Fig. 52

HIDROLISIS DEL A. ACETIL SALICILICO A pH = 3

°% ACIDO ACETIL SALICILICO DESCOMPUESTO

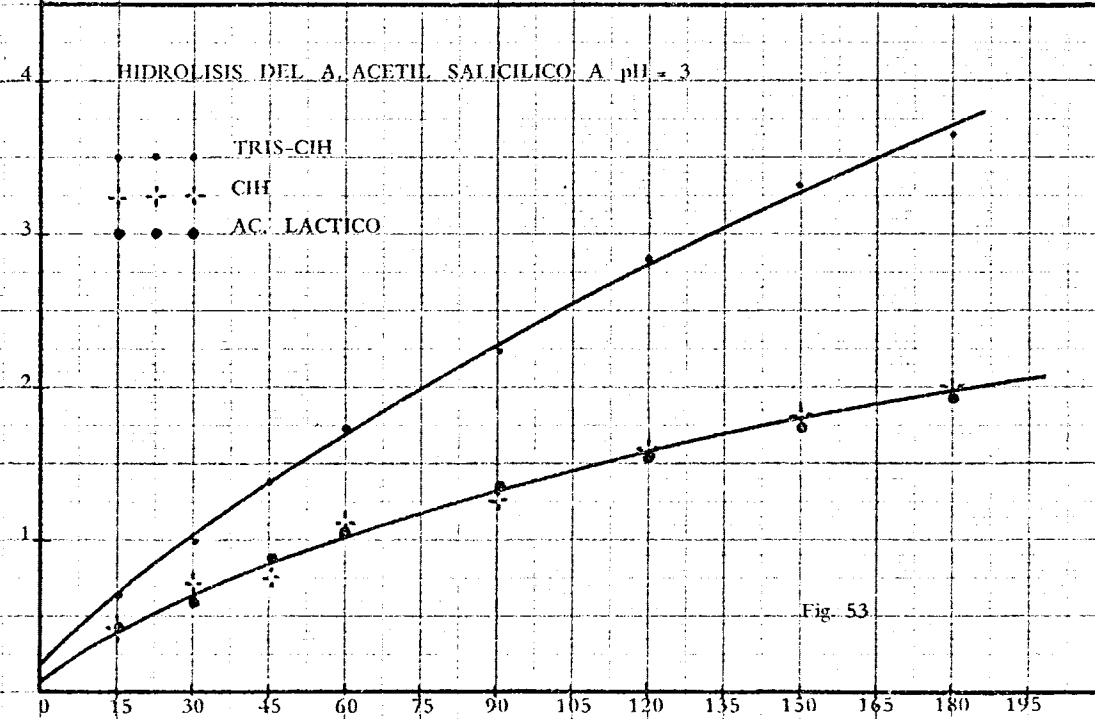


Fig. 53

tiempo, minutos

### VI.3. SEPARACIONES EN MEDIO ACUOSO CON LACTICO 0,5%

La concentración de las soluciones, así como las partes alicuotas empleadas de cada una para los ensayos cromatográficos, son las mismas que en los casos anteriores (Tabla IV) excepto para los ácidos salicílico y acetyl salicílico y la salicilamida, en los que, debido al incremento de  $T_V$ , se emplean soluciones de concentración triple a la indicada en la citada tabla. Asimismo, y a fin de que las condiciones operativas sean idénticas para poder comparar los resultados, se utiliza la columna K 15/30 que permite el uso de 12 g. de Sephadex LH-20. Conviene hacer notar que el  $W_r$  de este gel en agua es algo mayor que en alcohol, por lo que el volumen del gel no es exactamente igual, aunque sí la masa. Operando con el flujo de 1,0 c.c./min., el lecho de 12 g. de Sephadex no se compacta, y la cromatografía de la totalidad de los productos se realiza en 5,5 horas, tiempo que permite efectuar el análisis en una jornada. Como eluyente se utiliza una disolución acuosa de ácido láctico al 0,5 % ya que, como queda indicado, en este medio y a esa concentración las sustancias a separar se mantienen disueltas. Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla XXXIX. Las curvas de

TABLA XXXIX

ELUCION CON ACIDO LACTICO AL 0,5 %cEN AGUA

Columna: K 15/30

Relleno: 12 g. de Sephadex LH-20

$V_0 = 17$  c.c.  $V_T = 44,2$  c.c.

Compuesto	$V_e$ c.c.	$T_V$ c.c.	Kd
Acido salicílico	168	42	7,55
Acido acetil salicílico	195	60	8,90
Salicilamida	185	50	8,40
Etoxibenzamida	114	32	4,85
Paracetamol	106	32	4,45
Fenacetina	115	31	4,90
Antipirina	54	20	1,85
Aminopirina	35	18	0,90
Cafeína	54	20	1,85
Codeína	35	10	0,90

elución presentan una buena simetría, no habiéndose incluido por ser análogas a las obtenidas en etanol e isopropanol y no aportar ningún dato complementario de interés, excepto el citado. Los valores de  $V_e$  ofrecen una notable dispersión, sobre todo comparativamente con los obtenidos en los medios alcohólicos en presencia de ácido láctico, lo que ya es índice de una posible mayor eficacia en la separación. En cuanto a los valores de  $T_v$  algunos se mantienen muy análogos -cafeína, aminopirina, antipirina, paracetamol-, otros se modifican discretamente -codeína, fenacetina, etoxibenzamida-, existiendo un tercer grupo -ácido salicílico, acetyl salicílico y salicilamida- que se incrementan de manera muy considerable. Este mayor intervalo de elución presupone, pues, que se ponen de manifiesto fuerzas de retención que no se aprecian en los medios alcohólicos. Pero aún son más significativos los valores de  $K_d$ : En efecto, mientras en etanol-láctico oscilaban entre 0,67 -para codeína y aminopirina- y 1,46 para salicilamida, ahora están comprendidos entre 0,9 para codeína y aminopirina y 8,9 para el ácido acetyl salicílico, pudiéndose distinguir los cuatro grupos siguientes, en los que el efecto aromático se incrementa de forma sucesiva:

Primer grupo : aminopirina y codeina, en los que prácticamente no existe efecto aromático.

Segundo grupo: integrado por antipirina y cafeina, en los que el efecto aromático se aprecia muy discretamente, ya que el valor de  $K_d$ , en el caso de la antipirina pasa de 0,75 en etanol-láctico a 1,85 en agua-láctico. Para la cafeina el incremento es un poco menor puesto que pasa de 1,15 a 1,85 respectivamente.

Tercer grupo : formado por etoxibenzamida, paracetamol y fenacetina, cuyos  $K_d$  en etanol-láctico eran del orden de la unidad, o inferiores, y ahora adquieren valores comprendidos entre 4,45 y 4,9; y

Cuarto grupo : formado por ácido acetil salicílico, ácido salicílico y salicilamida, cuyos  $K_d$  en etanol-láctico eran respectivamente 1,22; 0,95 y 1,46, mientras que ahora son 8,9; 7,55 y 8,4.

En la fig. 54 se observan claramente los cuatro grupos, separables entre sí. Dentro de cada grupo las sustancias no son separables.

Las posibilidades separativas aumentan en agua-láctico de manera considerable, pues mientras en etanol e isopropanol sólo se conseguían separar pares de sustancias, ahora se logran separar cuatro series. De esta forma, y según se deduce del esquema de la figura 55 el método es válido para separar hasta treinta y seis grupos distintos de sustancias.

Este notable incremento de las posibilidades separativas pone de manifiesto el escaso significado del efecto aromático en los alcoholes frente al que se produce en agua, aún con baja concentración de electrolito.

A pesar de todo, hay que destacar que el tiempo invertido para la elución total del ácido acetil-salicílico es de 225 minutos (flujo de 1 cc/min), iniciándose la elución a los 165 minutos, tiempo durante el cual se hidroliza en una proporción de 2,2 % .

Aunque los resultados obtenidos son aceptables, se pensó en estudiar la influencia de una variable, todavía sin modificar a lo largo de todo el trabajo, como es el relleno de la columna.

En las series del etanol e isopropanol el empleo del LH-20, como único soporte, estaba plenamente

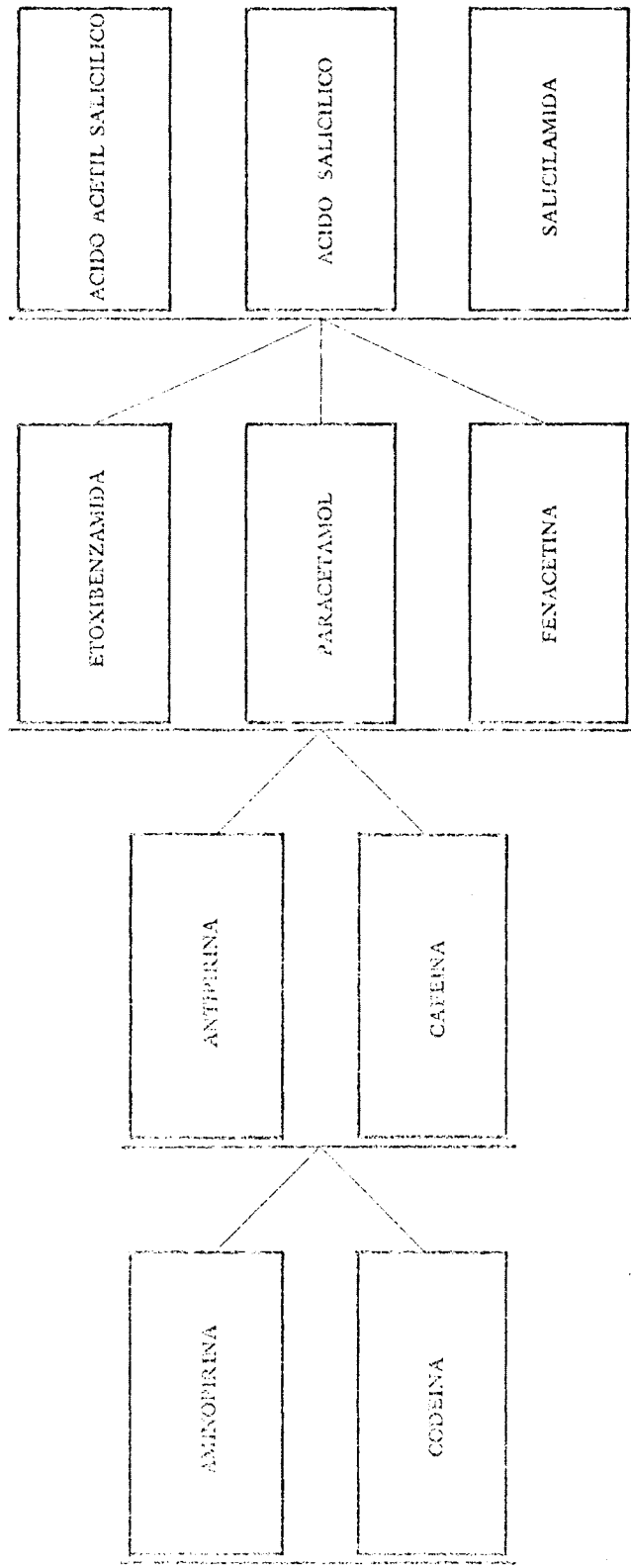


Fig. 55

justificado por su especificidad para medios orgánicos. También estaba justificado el empleo de este mismo soporte en medio acuoso, supuesto que tiene un doble carácter lipo e hidrófilico. Ahora bien en medio acuoso también era posible, e incluso recomendable, utilizar como soporte geles del tipo G que son típicamente hidrofílicos.

Inicialmente se eligió el tipo G-15 porque su  $W_r$  es el más próximo al  $W_r$  del LH-20 en etanol. Se pretendía con ello adquirir un mayor conocimiento sobre las sustancias cuyo mecanismo separativo se deba preferentemente a filtración molecular, que serán aquellas cuyo  $V_e$  se mantenga constante a pesar de haber modificado el tipo de eluyente y de soporte.

Por otra parte se puede hacer un examen comparativo de la influencia en la separación derivada del distinto tipo de estructura de ambos geles LH-20 y G-15 cuando se opera en las mismas condiciones. Se realizó, pues, un ensayo utilizando como relleno 14 g de Sephadex G-15, cuyo volumen es análogo al de 12 g de LH-20, y se eluyó con ácido láctico al 0,5 % en agua, como en el caso anterior. Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla XL y en la fig. 56.

TABLA XL

ELUCION CON ACIDO LACTICO AL 0,5 % EN AGUA

Columna: K 15/30

Relleno: 14 g. de Sephadex G-15

 $V_0 = 17$  c.c.  $V_t = 49,3$  c.c.

Compuesto	$V_e$ c.c.	$T_v$ c.c.	Kd
Acido salicílico	136	40	4,98
Acido acetil salicílico	71	22	2,26
Salicilamida	153	34	5,66
Etoxibenzamida	89	42	2,99
Paracetamol	88	40	2,95
Fenacetina	84	31	2,79
Antipirina	42	16	1,04
Aminopirina	27	9	0,41
Cafeína	44	20	1,12
Codeína	34	11	0,70

Como característica general, se observa que los valores  $V_e$  y  $T_V$  disminuyen y, consiguientemente, también disminuye  $K_d$ , cuyos valores oscilan ahora entre 0,41 para la aminopirina y 5,66 para la salicilamida.

De los cuatro grupos de sustancias que se separan al emplear el LH-20 (Fig. 54), con el G-15 se agrupan los dos primeros manteniéndose de forma sensible en una posición intermedia, aunque similar al caso anterior. No obstante, la aminopirina tiene un  $T_V$  suficientemente pequeño para que siga siendo posible su separación de antipirina y cafeína. El tercer grupo, integrado en el caso del LH-20 por etoxibenzamida, paracetamol y fenacetina, se ve ahora incrementado por el ácido acetil salicílico, reduciéndose, en consecuencia, el último al ácido salicílico y la salicilamida. Las posibilidades separativas varían, pues, con el nuevo tipo de Sephadex, y aunque disminuyen ligeramente, como puede observarse en el esquema de la fig. 57, resulta especialmente destacable, que se consiga separar el ácido acetil salicílico del ácido salicílico, dentro de unos tiempos de elución para el primero, muy inferiores a los que se obtenían en el caso del LH-20, hasta el punto de que aquí el porcen-

taje hidrolizado es sólo del 1,3 % . Este valor permite realizar la determinación con un margen de error - aceptable. Tal separación y determinación, como ya se ha indicado es del mayor interés, pues la presencia - del ácido salicílico puede proceder de una descomposición no deseada del acetyl salicílico.

Ante los anteriores resultados, era obligado - ensayar también el comportamiento del Sephadex G-10, ya que por ser el de mayor grado de entrecruzamiento tiene mayor número de grupos activos, aptos para la - adsorción, por unidad de volumen de lecho.

Se realizó, por ello, un nuevo ensayo con 20 g. de Sephadex G-10, con la misma columna cromatográfica que en los casos anteriores y con el mismo eluyente. Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla -- XLI y Fig. 58 en donde se puede observar que hay un grupo de sustancias constituido por aminopirina, - antipirina, cafeína y codeína cuyos  $V_e$  y  $T_V$  no varían apreciablemente con respecto al Sephadex G-15, siendo sólo posible separar aminopirina y cafeína. En el resto de las sustancias,  $V_e$  y  $T_V$  experimentan un considerable aumento, especialmente acusado en los casos de la salicilamida y del ácido salicílico. No obstante, esto no supone ninguna mejora en cuanto a las posibi-

TABLA XLI

ELUCION CON ACIDO LACTICO AL 0,5 % EN AGUA

Columna: K 15/30

Relleno: 20 g. de Sephadex G-10

$V_0 = 18$  c.c.  $V_t = 48,5$  c.c.

Compuesto	$V_e$ c.c.	$T_V$ c.c.	Kd
Acido salicílico	312	50	15,89
Acido acetil salicílico	132	74	6,16
Salicilamida	312	66	15,89
Etoxibenzamida	132	48	6,16
Paracetamol	112	50	5,08
Fenacetina	122	30	5,60
Antipirina	47	34	1,56
Aminopirina	27	10	0,46
Cafeína	46	22	1,54
Codeína	30	11	0,62

lidades separativas, como puede observarse en la Fig. 59 , y sin embargo lleva implícito el que la duración del proceso cromatográfico es casi el doble que con el Sephadex G-15.

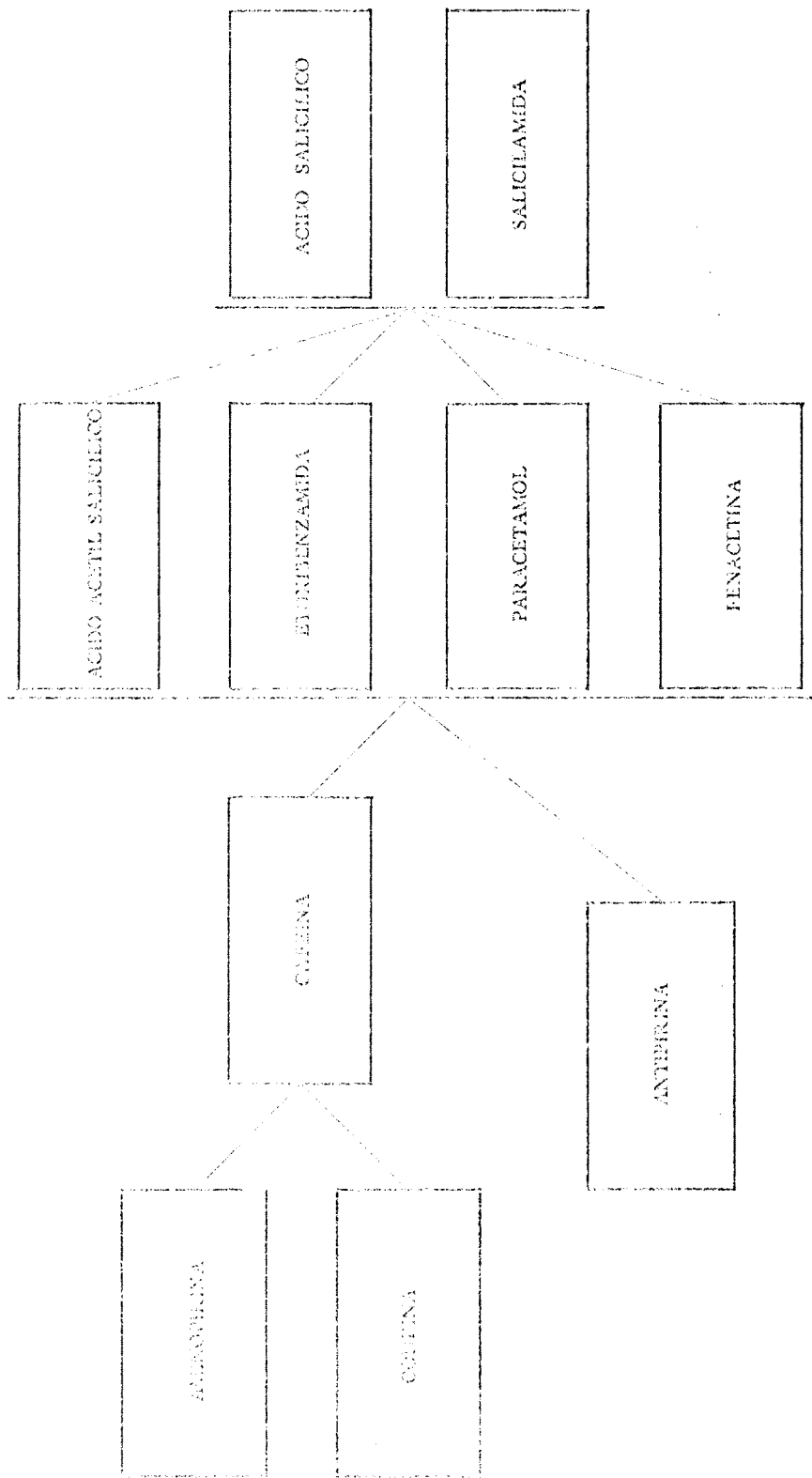


Fig. 59

INTERVALOS DE ELUCION CON AGUA-LACTICO

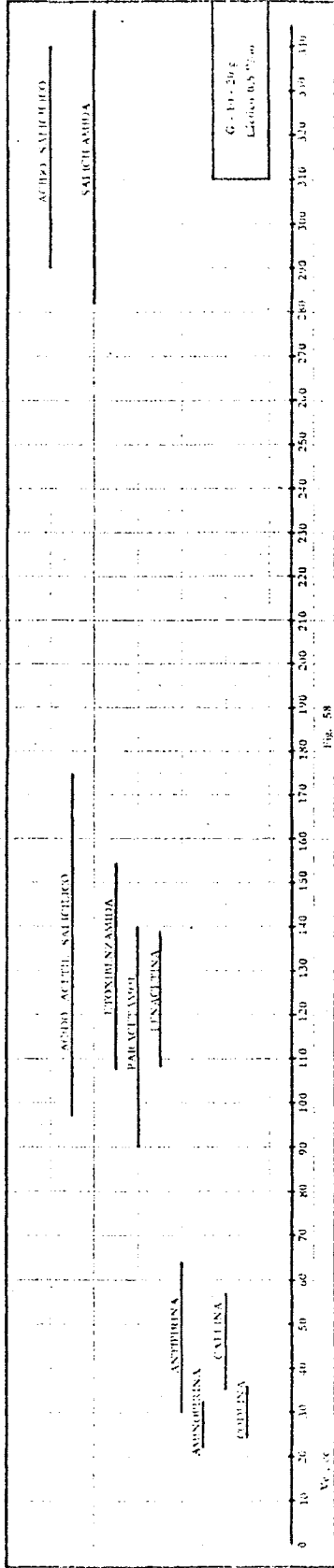


Fig. 53

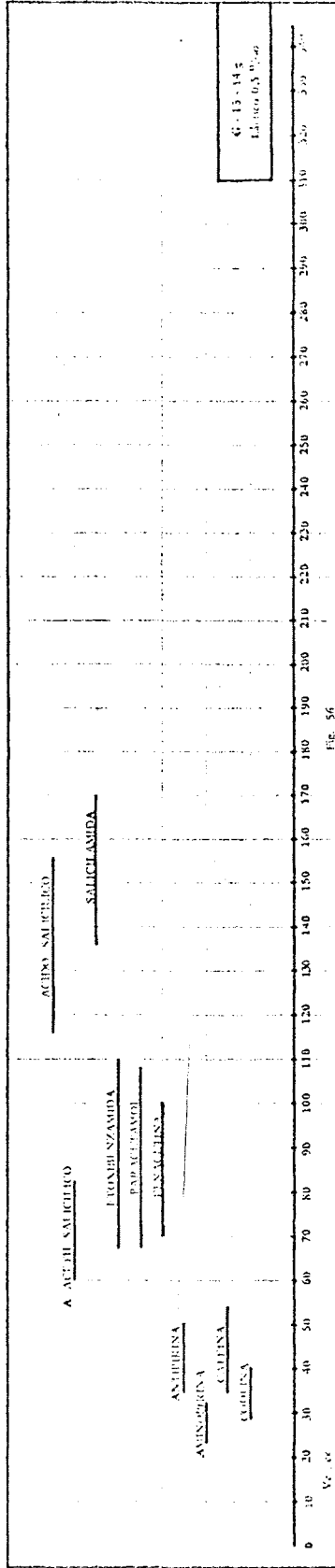


Fig. 54

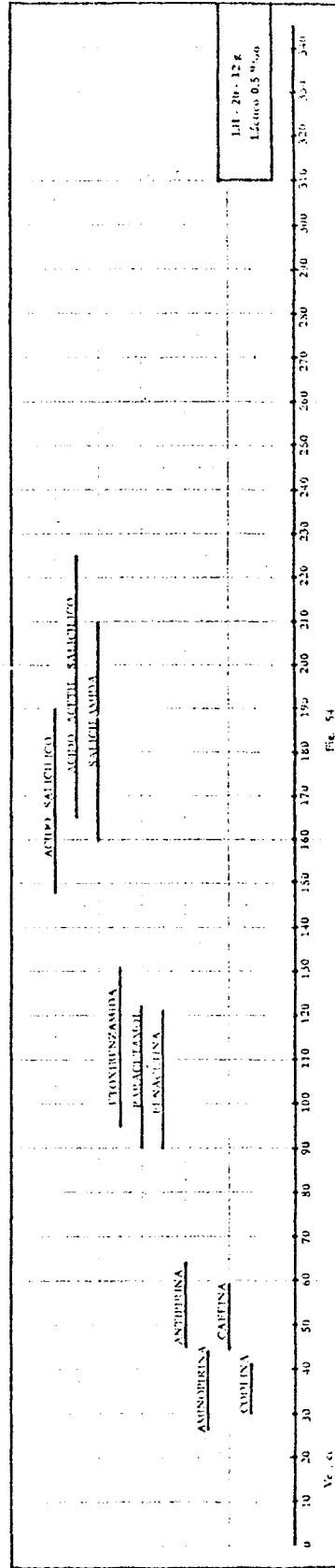


Fig. 55

#### VI.4. SEPARACION CON DISOLUCIONES ACUOSAS DE TRIS

Para completar el estudio separativo se realizaron ensayos en medio básico, utilizando el tampon Tris y  $\text{pH} = 7,5$ , por las razones indicadas en VI.2.2, aun, cuando eran previsibles limitaciones para el ácido acetil salicílico. Para las demás sustancias se comprobó la estabilidad de forma análoga a como se realiza en todos los casos. Tabla XLII.

En medios alcohólicos se observó que la concentración 0,05 M de Tris no aumentaba el fenómeno de retención, y lo mismo ocurría con concentraciones de láctico al 0,5 %. Sin embargo, en medios acuosos, se ha comprobado que, con esta concentración de ácido láctico se producen retenciones muy elevadas. Por otra parte, el Tris es muy soluble en agua, lo que permite utilizarle en un intervalo más amplio de concentraciones.

Por todo ello se hicieron dos ensayos, con disoluciones acuosas de Tris de concentración superior e inferior, respectivamente, a la utilizada con etanol e isopropanol.

Se eligieron así concentraciones de Tris 0,1 M

TABLA XLII  
ESTABILIDAD EN TRIS 0,05 M EN AGUA

Compuesto	Absorción después de un tiempo: (horas)					
	0	1	3	6	9	24
Acido salicílico	0,140	0,145	0,145	0,150	0,150	0,145
Acido acetil salicílico	0,270	0,275	0,280	0,270	0,270	0,270
Salicilamida	0,480	0,480	0,490	0,485	0,490	0,485
Etoxibenzamida	0,710	0,715	0,715	0,720	0,720	0,715
Paracetamol	0,685	0,690	0,700	0,690	0,695	0,690
Fenacetina	0,680	0,690	0,685	0,685	0,690	0,680
Antipirina	0,530	0,535	0,535	0,540	0,540	0,535
Aminopirina	0,380	0,380	0,390	0,400	0,390	0,390
Cafeína	0,520	0,520	0,525	0,530	0,530	0,525
Codeína	0,450	0,450	0,460	0,455	0,460	0,455

y 0,02 M. La concentración de las diferentes sustancias en estas disoluciones y las cantidades utilizadas de las mismas, son iguales a las de la Tabla IV, excepto para el ácido salicílico cuya concentración se duplica y la salicilamida en que se multiplica por cinco, por las razones indicadas en VI.3.

Los resultados obtenidos se recogen en las Tablas XLIII y XLIV y en las figs. 60 y 61. Los  $T_V$ , prácticamente, no varían con la concentración de Tris, e igual sucede con los  $V_e$  del ácido acetyl salicílico, antipirina, aminopirina, cafeína, etoxibenzamida, paracetamol y fenacetina.

Se observa, sin embargo, un fenómeno especialmente significativo: el ácido acetyl salicílico es la sustancia que se eluye en primer lugar con  $V_e$  y  $T_V$  -- muy bajos, lo cual quiere decir que, a pesar de que a este pH la hidrólisis es muy elevada, al ser el tiempo de elución muy bajo resulta, no obstante, pequeña. De este modo en los gráficos de las figs. 62 y 63 se indican las posibles separaciones en grupos de tres y cuatro sustancias, para Tris 0,1 M, que permite establecer hasta diez y seis combinaciones. Con Tris 0,02 M se consiguen separar tres grupos de cinco y además seis grupos de cuatro y tres de tres con lo que el nú

TABLA XLIII  
ELUCION CON TRIS 0,1 M EN AGUA

Columna: K 15/30

Relleno: 20 g. de Sephadex G-10

$V_0 = 18 \text{ c.c.}$   $V_t = 48,5 \text{ c.c.}$

Compuesto	$V_e$ c.c.	$T_V$ c.c.	Kd
Acido salicílico	107	44	4,81
Acido acetil salicílico	30	11	0,65
Salicilamida	241	72	12,05
Etoxibenzamida	128	45	5,94
Paracetamol	131	37	3,85
Fenacetina	132	53	6,11
Antipirina	41	20	1,24
Aminopirina	38	28	1,08
Cafeína	46	20	1,51
Codeína	53	30	1,89

TABLA XLIV  
ELUCION CON TRIS 0,0 2 M EN AGUA

Columna: K 15/30

Relleno: 20 g. de Sephadex G-10

$V_0 = 18$  c.c.  $V_T = 48,5$  c.c.

Compuesto	$V_e$ c.c.	$T_V$ c.c.	Kd
Acido salicílico	90	33	3,89
Acido acetil salicílico	28	9	0,54
Salicilamida	279	77	14,11
Etoxibenzamida	130	40	6,05
Paracetamol	127	53	5,89
Fenacetina	129	52	6,00
Antipirina	38	18	1,08
Aminopirina	34	25	0,86
Cafeína	43,5	16	1,38
Codeína	72	30	2,32

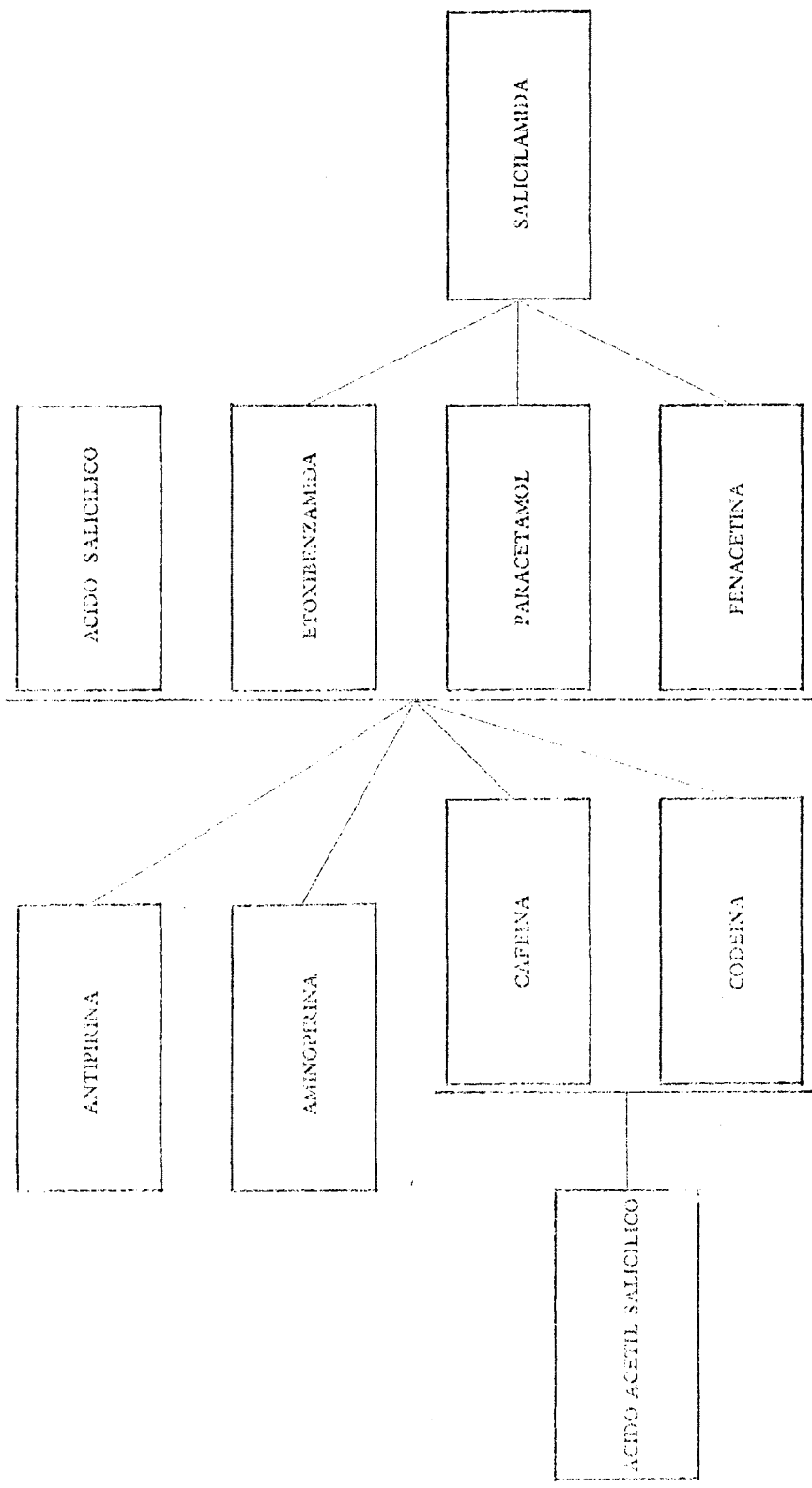


Fig. 62

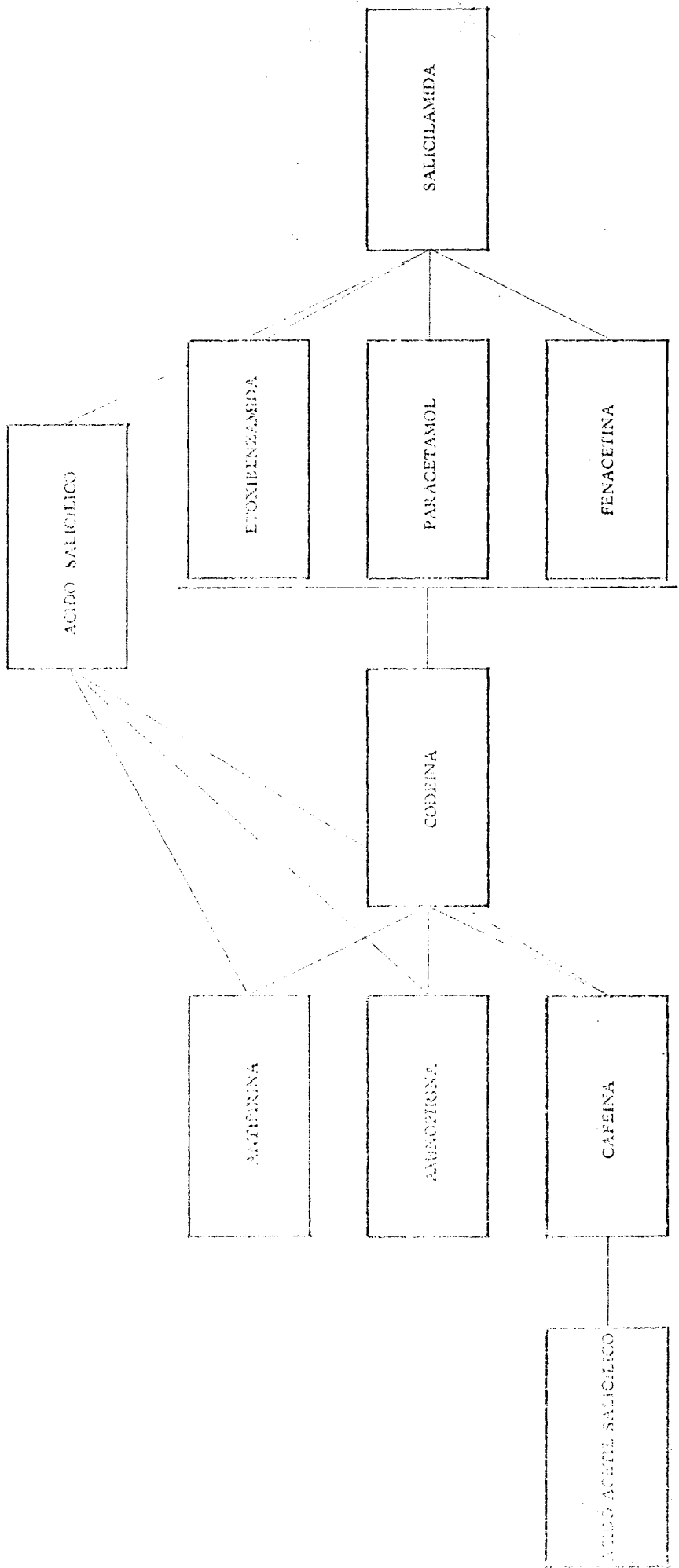


Fig. 63

mero de combinaciones disminuye pero se aumenta el número de sustancias determinables simultáneamente. Por otra parte, se observa también que para la codeína y la salicilamida los  $V_e$  disminuyen para la concentración de Tris más elevada, sucediendo al contrario con el ácido salicílico.

A la vista de estas variaciones convenía comprobar si se puede establecer alguna relación entre los valores de  $V_e$  y la concentración de Tris en el eluyente. Para ello se realizaron otros dos ensayos con disoluciones de Tris de concentración 0,01 M y 0,12 M, es decir un poco más alta y más baja, respectivamente, que las empleadas en los ensayos anteriores.

Los resultados, recopilados en la Fig. 69 permiten comprobar que, al menos en el intervalo de concentraciones experimentado, existe una relación lineal entre  $V_e$  y la concentración de Tris, con coeficiente angular positivo en el caso del ácido salicílico y negativo para las otras dos sustancias, codeína y salicilamida.

El hecho de que sea el ácido salicílico la única de las tres sustancias cuyo  $V_e$  crece con la concentración de Tris, puede estar vinculado con la mayor -

VARIACION DE  $V_e$  CON LA CONCENTRACION DE TRIS

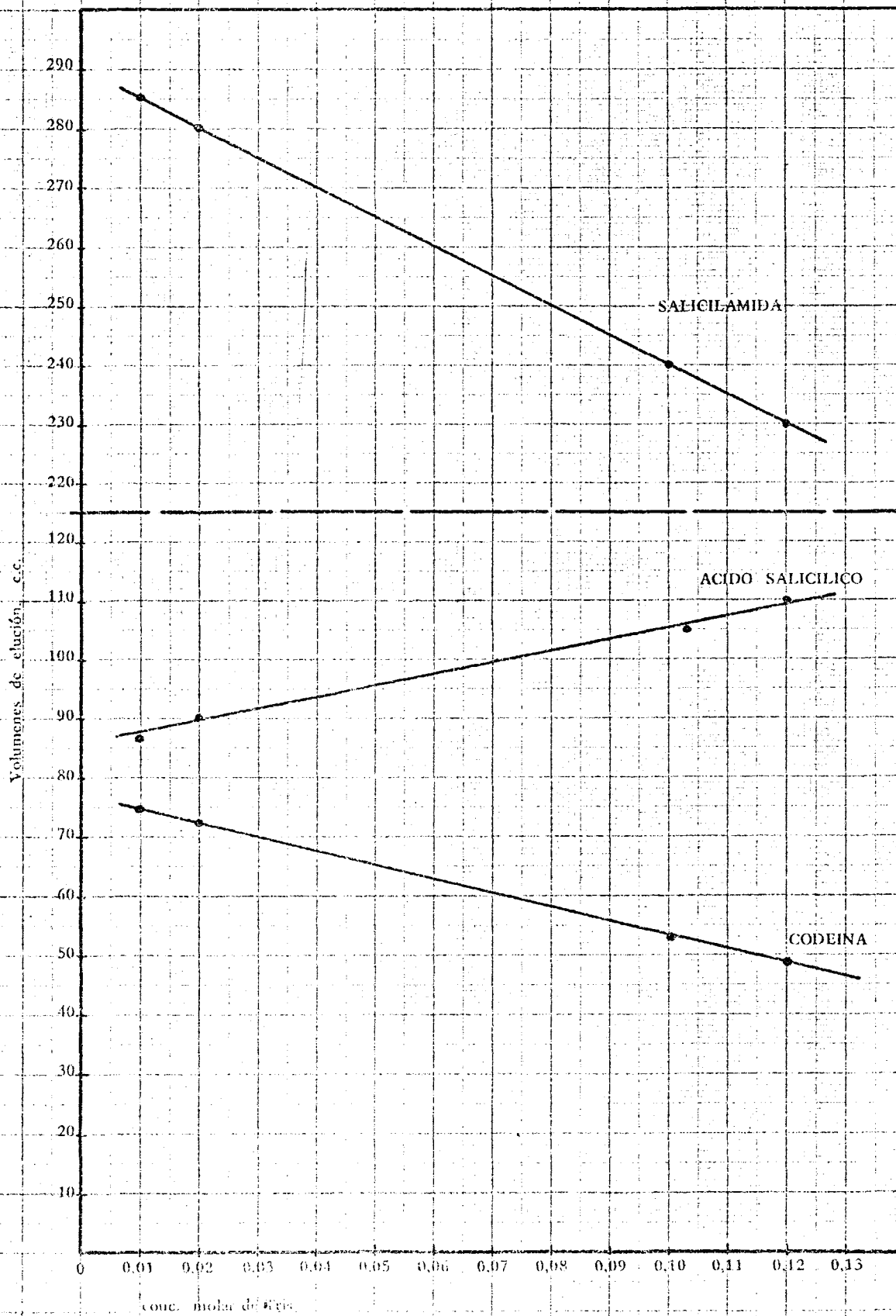


Fig. 6-f

disociación del mismo, como consecuencia del aumento de la reserva básica. El fenómeno está en concordancia con la hipótesis de Janson (117), que estima que los ácidos se eluyen antes de la columna como consecuencia de las repulsiones provocadas por los grupos carboxilos del soporte. Es evidente que en el ácido acetil salicílico esto no ocurre, pero puede ser debido a razones de tipo estérico. En todo caso, y aunque la hipótesis anterior esté lejos de poder considerarse como absolutamente válida, se estima que merece la pena señalar la existencia del fenómeno, por cuanto puede contribuir a la interpretación del mecanismo de retención, hoy todavía tan difuso. El comportamiento de salicilamida y codeína está de acuerdo con lo que, en general, ocurre al aumentar la concentración de electrolitos en el caso de especies con efecto aromático (128).

En las Tablas XLV y XLVI y Figs. 65 y 66 se recogen los resultados obtenidos para la totalidad de las sustancias, observándose que, exceptuados ácido salicílico, codeína y salicilamida, el resto de las sustancias mantienen prácticamente inalterados los parámetros de elución que se vienen utilizando. En el esquema de la Fig. 67 se observa que el número de po

150.

TABLA XLV

ELUCION CON TRIS 0,12 M EN AGUA

Columna: K 15/30

Relleño: 20 g. de Sephadex G-10

$V_0 = 18 \text{ c.c.}$   $V_t = 48,5 \text{ c.c.}$

Compuesto	$V_e \text{ c.c.}$	$T_V \text{ c.c.}$	Kd
Acido salicílico	111	40	5,03
Acido acetil salicílico	29	10	0,59
Salicilamida	231	69	11,51
Etoxibenzamida	128	43	5,94
Paracetamol	134	46	6,27
Fenacetina	129	52	6,00
Antipirina	44	18	1,40
Aminopirina	36	21	0,97
Cafeína	44,5	17	1,43
Codeína	48	17	1,62

TABLA XLVI

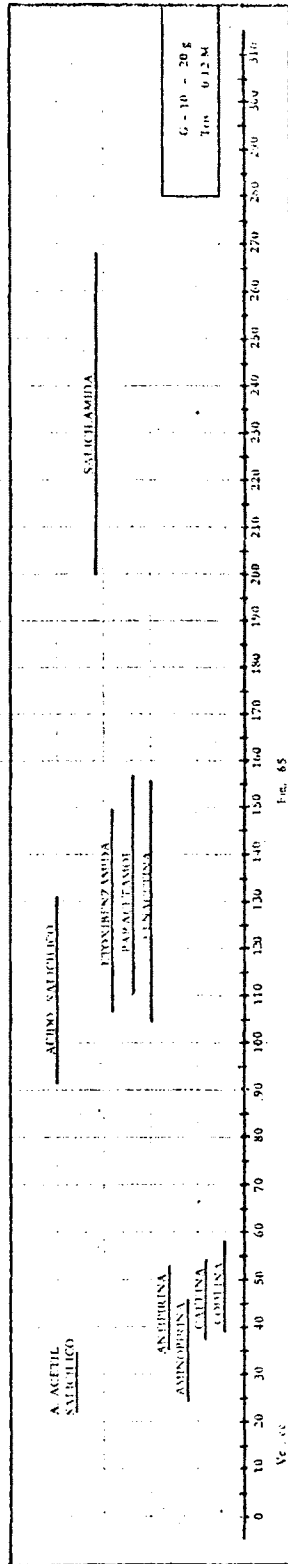
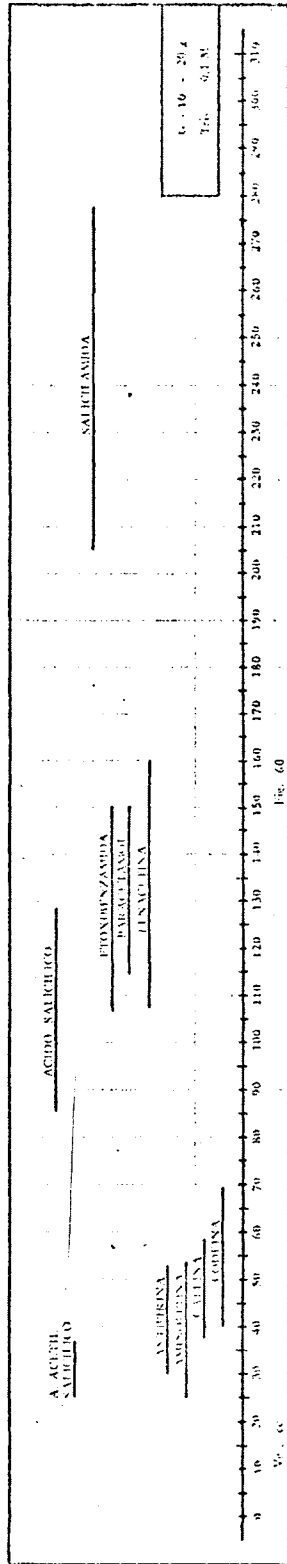
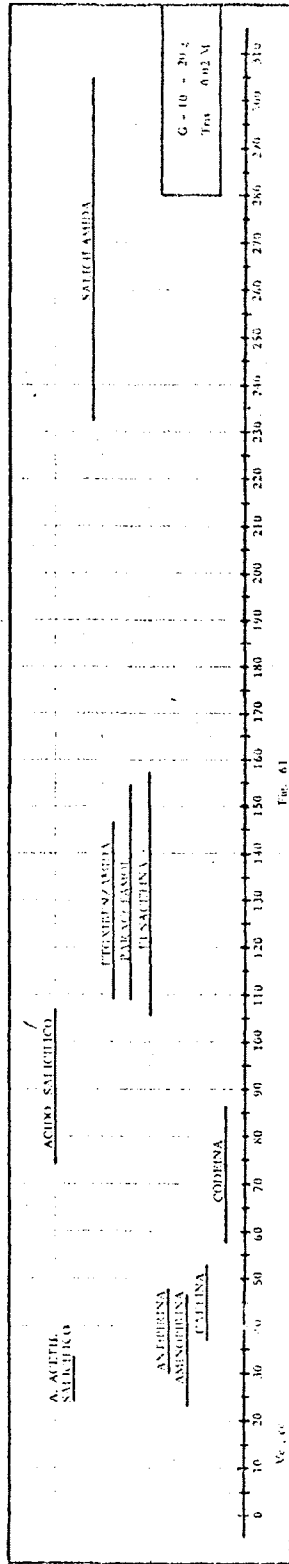
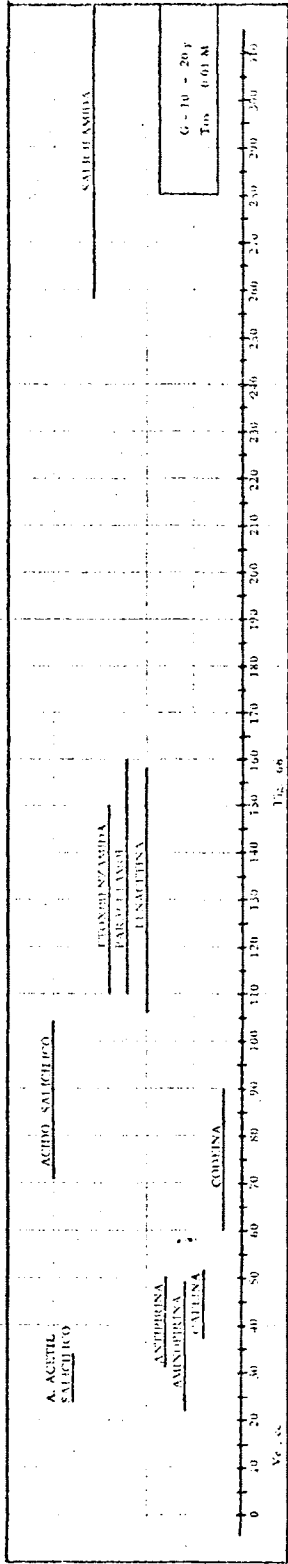
ELUCION CON TRIS 0,01 M EN AGUA

Columna: K 15/30

Relleno: 20 g. de Sephadex G-10

 $V_0 = 18 \text{ c.c.}$   $V_t = 48,5 \text{ c.c.}$ 

Compuesto	$V_e$ c.c.	$T_v$ c.c.	Kd
Acido salicílico	86	33	3,67
Acido acetil salicílico	29	10	0,59
Salicilamida	285	74	14,40
Etoxibenzamida	129	40	6,00
Paracetamol	134	50	6,30
Fenacetina	130	52	6,10
Antipirina	39	20	1,13
Aminopirina	35	27	0,91
Cafeína	44	15	1,40
Codeína	74	29	3,02



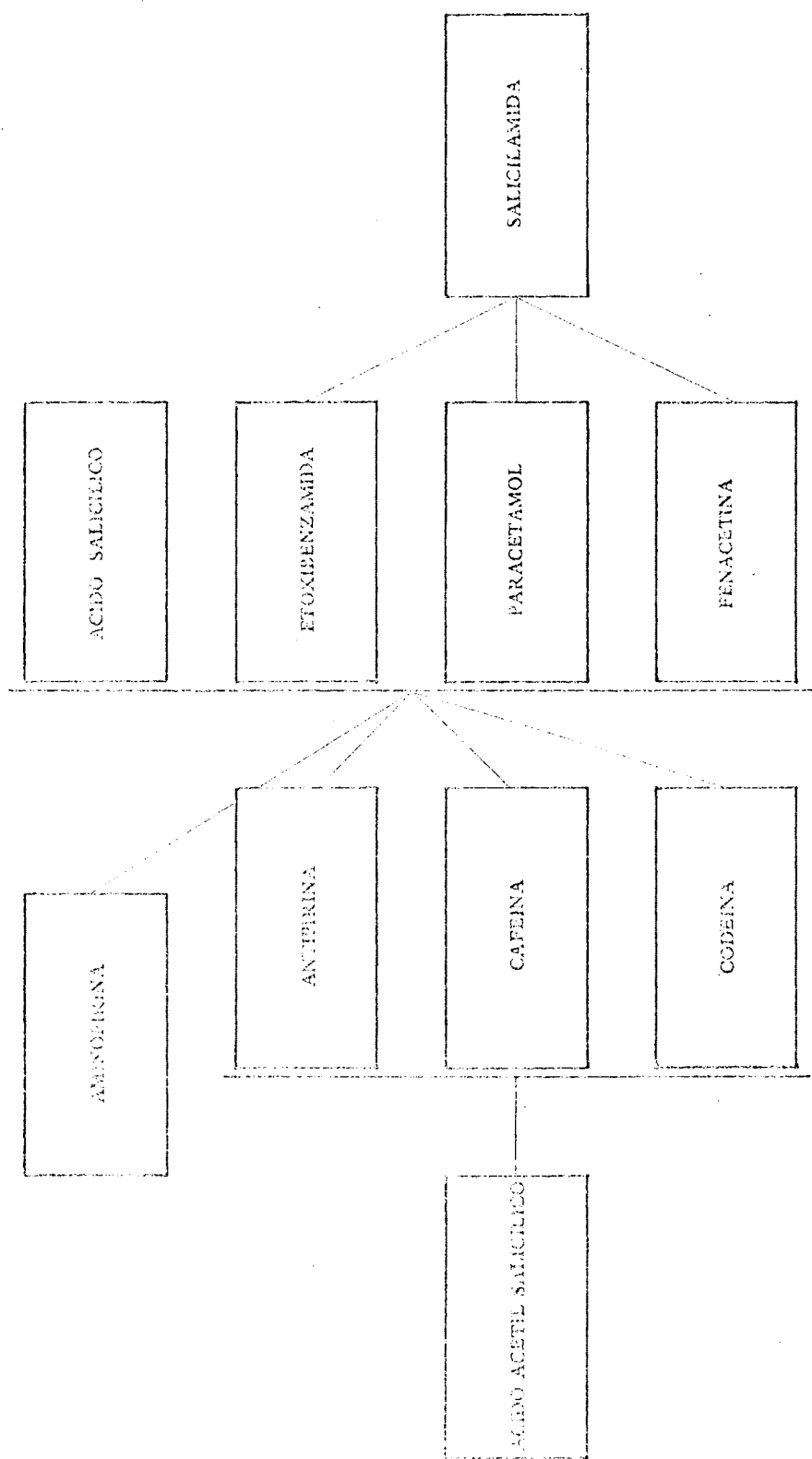


Fig. 67

sibilidades es igual al de la Fig. 66 pero aumenta el número de grupos de cuatro sustancias separables. Al disminuir la concentración de Tris a 0,01 M, se hace posible la separación de grupos de cinco sustancias como ocurría con el 0,02 M, siendo seis el número de combinaciones posibles con ese número además - de otras doce con grupos de cuatro como se deduce -- del esquema de la figura 68.

Puede observarse, pues, que modificar la concentración de Tris proporciona mayor flexibilidad a las posibles separaciones. En efecto, para una concentración de Tris 0,1 M son separables la codeína y el ácido salicílico, no siendolo este último de etoxibenzamida, paracetamol y fenacetina. Sin embargo, la separación de estos del ácido salicílico podría - conseguirse con sólo disminuir la concentración de - Tris a 0,01 M.

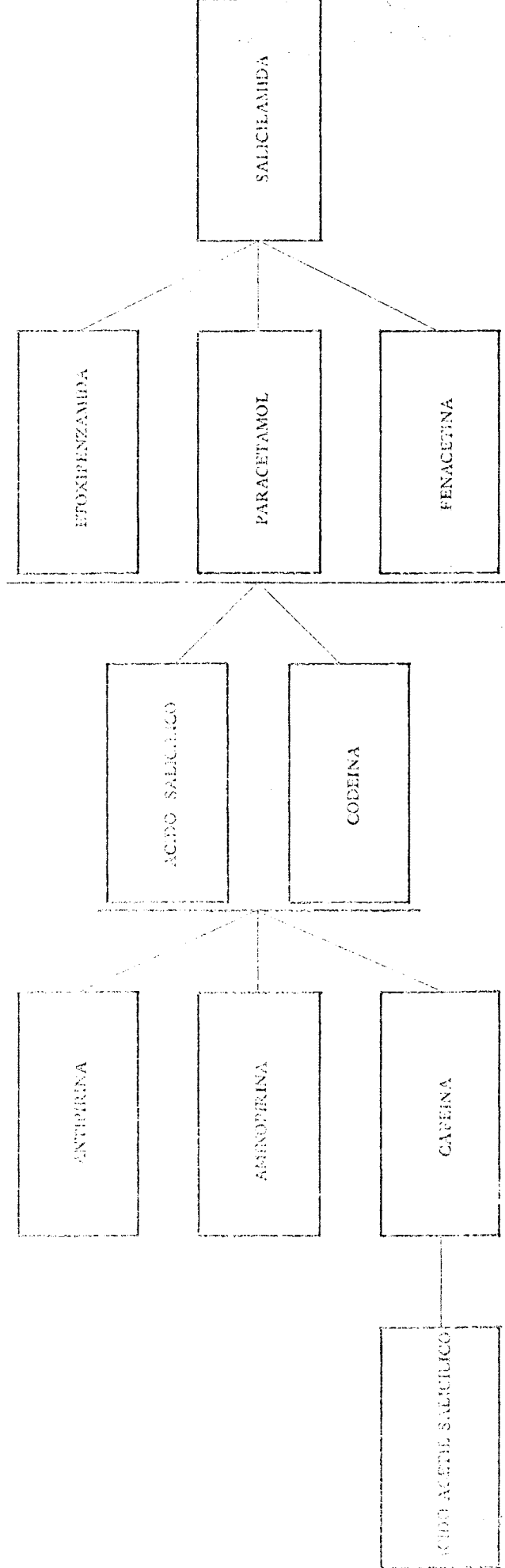


Fig. 68

## VI.5. DETERMINACIONES CUANTITATIVAS

### VI.5.1. Gráficas de calibrado

Al igual que en los casos anteriores se han obtenido las gráficas de calibrado de cada una de las sustancias en las dos variantes de medios acuosos empleados. En la Tabla XLVII se indican los resultados obtenidos en disolución acuosa de ácido láctico al 0,5 % y en la Tabla XLVIII los correspondientes a las disoluciones de Tris 0,01 M. La desviación estandar se ha calculado siempre mediante diez determinaciones realizadas en los límites mínimo y máximo del intervalo válido de concentraciones.

### VI.5.2. Análisis de mezclas sintéticas en agua-ácido láctico

Ante el elevado número de grupos diferentes de sustancias que pueden separarse, se ha limitado la preparación y análisis de mezclas sintéticas a aquellos casos más significativos, tanto por su viabilidad de separación como por su interés práctico. En este sentido, y utilizando como soporte LH-20 se hizo -

TABLA XLVII

ECUACIONES DE CALIBRADO EN AGUA - LACTICO

Compuesto	Intervalo de validez comprobado, p.p.m.	Ecuación de calibrado x = Concentración mg/c.c. y = Absorción	Coeficiente de correlación	Desviación estándar para	
				Límite inferior	Límite superior
Acido salicílico $\lambda=299$	10 - 30	$y = 0,001+25,38 x$	1,000	0,089	0,255
Acido acetil salicílico $\lambda=275$	20 - 80	$y = 0,16+24,63 x$	1,000	0,198	0,402
Salicilamida $\lambda=299$	10 - 40	$y = 0,005+25,83 x$	1,000	0,093	0,257
Etoxibenzamida $\lambda=292$	5 - 20	$y = 0,02+38,20 x$	1,000	0,063	0,219
Paracetamol $\lambda=242$	5 - 20	$y = 0,11+63,14 x$	1,000	0,049	0,208
Fenacetina $\lambda=244$	5 - 20	$y = 0,079+52,26 x$	0,999	0,051	0,199
Antipirina $\lambda=241$	5 - 20	$y = 0,012+48,40 x$	1,000	0,044	0,187
Aminopirina $\lambda=259$	5 - 20	$y = 0,008+39,90 x$	1,000	0,038	0,189
Cafeína $\lambda=273$	5 - 20	$y = 0,001+51,36 x$	1,000	0,046	0,186
Codeína $\lambda=284$	20 - 80	$y = 0,004+20,415 x$	1,000	0,197	0,433

TABLA XLVIII

ECUACIONES DE CALIBRADO EN AGUA - TRIS

Compuesto	Intervalo de validez comprobado, p.p.m.	Ecuación de calibrado y = Absorción x = Concentración, mg/c,c	Coeficiente de correlación	Desviación estandar para	
				Limite mínimo del intervalo	Limite máximo del intervalo
Acido salicílico $\lambda=296$	10 - 30	$y = -0,022+6,71 x$	1,000	0,997	0,247
Acido acetil salicílico $\lambda=268$	20 - 80	$y = -0,01+6,425 x$	1,000	0,236	0,465
Salicilamida $\lambda=299$	10 - 40	$y = 0,003+23,34 x$	1,000	0,099	0,285
Etoxibenzamida $\lambda=292$	5 - 20	$y = 0,02+37,5 x$	0,999	0,049	0,196
Paracetamol $\lambda=244$	5 - 20	$y = 0,037+62,3 x$	1,000	0,051	0,226
Fenacetina $\lambda=245$	5 - 20	$y = -0,01+66 x$	1,000	0,039	0,187
Antipirina $\lambda=242$	5 - 20	$y = 0,022+48,2 x$	1,000	0,047	0,199
Aminopirina $\lambda=264$	5 - 20	$y = 0,105+28,4 x$	0,991	0,051	0,210
Cafeína $\lambda=273$	5 - 20	$y = 0,01+52,60 x$	0,999	0,042	0,198
Codeína $\lambda=284$	20 - 80	$y = 0,015+20,925 x$	1,000	0,203	0,398

TABLA XLIX

MEZCLA 1				
Compuesto	Cantidad puesta $M_p$	Cantidad encontrada $M_e$		Error relativo %
Acido acetil salicilico	1000	1007	7	0,7
Fenacetina	250	248	-2	0,8
Aminopirina	125	125	0	0
Codeina	500	497	3	0,6
MEZCLA 2				
Compuesto	Cantidad puesta $M_p$	Cantidad encontrada $M_e$		Error relativo %
Acido acetil salicilico	1000	1009	9	0,9
Fenacetina	1000	989	-11	1,1
Aminopirina	1000	997	3	0,3
Codeina	1000	991	9	0,9

TABLA L

MEZCLA 1				
Compuesto	Cantidad puesta /mg	Cantidad encontrada /mg		Error relativo %
Salicilamida	500	476	-3	0,6
Etoxibenzamida	250	251	1	0,4
Aminopirina	125	126	1	0,8
Antipirina	125	124	-1	0,8
MEZCLA 2				
Compuesto	Cantidad puesta /mg	Cantidad encontrada /mg		Error relativo %
Salicilamida	1000	992	-8	0,8
Etoxibenzamida	1000	993	-7	0,7
Aminopirina	1000	1003	3	0,3
Antipirina	1000	996	-4	0,4

el análisis de dos mezclas sintéticas de ácido acetil salicílico, fenacetina, aminopirina y codeína, de concentraciones diferentes. Los resultados se recogen en la Tabla XLIX . Observese que los valores obtenidos - para el ácido acetil salicílico son, incluso, superiores a los teóricos, como consecuencia de que el ácido salicílico que se forma en su hidrólisis presenta una cierta absorción a la longitud de onda a que se mide el acetil salicílico. Es evidente, pues, que para evitar este error siempre que haya acetil salicílico con vendrá operar en condiciones tales que sea posible la separación de ambos.

Con el soporte Sephadex G-15 se han separado y analizado dos mezclas sintéticas de salicilamida, etoxibenzamida, antipirina y aminopirina de diferentes - concentraciones. Los resultados obtenidos se indican en la Tabla L.

Los errores relativos están comprendidos dentro de la desviación del método.

### VI.5.3. Análisis de mezclas sintéticas en Tris 0,01 M en agua

También en este caso el número de grupos distin

tos de especies a separar es muy elevado, siendo cinco las sustancias separables en un sólo proceso cromatográfico. Por ello se ha tomado un solo grupo separable, entre los más representativos, preparándose dos mezclas sintéticas del mismo, sobre las que se ha realizado la separación y determinación, como en los casos anteriores. Los resultados obtenidos para las mezclas de ácido acetil salicílico, cafeína, ácido salicílico, paracetamol y salicilamida se expresan en la Tabla LI, en la que se puede observar que los errores están comprendidos dentro de la desviación determinada.

148.

TABLA LI

MEZCLA 1				
Compuesto	Cantidad puesta <i>Mg</i>	Cantidad encontrada <i>Mg</i>		Error relativo %
Acido acetil salicílico	250	246	-4	1,6
Acido salicílico	1000	1005	5	0,5
Cafeina	125	126	1	0,8
Paracetamol	500	499	-1	0,2
Salicilamida	1000	988	12	1,2
MEZCLA 2				
Compuesto	Cantidad puesta <i>Mg</i>	Cantidad encontrada <i>Mg</i>		Error relativo %
Acido acetil salicílico	1000	985	-15	1,5
Acido salicílico	1000	1009	9	0,9
Cafeina	1000	1005	5	0,5
Paracetamol	1000	996	4	0,4
Salicilamida	1000	991	9	0,9

VII. CONCLUSIONES

## VII. CONCLUSIONES

- 1ª) Mediante el estudio del comportamiento en cromatografía de gel de las sustancias ácido salicílico, ácido acetil salicílico, salicilamida, etoxibenzamida, paracetamol, fenacetina, antipirina, aminopirina, cafeína y codeína, todas ellas utilizadas en la preparación de analgésicos, se propone un método analítico sencillo, de fácil generalización y múltiples posibilidades, para separar unitariamente o por grupos- las sustancias citadas, determinándose posteriormente por espectrofotometría U.V. De las diez especies estudiadas se logran separar y valorar unitariamente distintas combinaciones de cinco, así como grupos de dos, tres y cuatro sustancias.
- 2ª) Las separaciones se basan en combinar el comportamiento de filtro molecular del soporte con la existencia de ciertas fuerzas de retención, denominadas en la bibliografía "efecto aromático", que en general se ponen de manifiesto en sustancias de tipo aromático y heterocíclico. Para enjuiciar la existencia del "efecto aromático" se utiliza el va

lor del coeficiente de reparto  $K_d$ .

- 3ª) En medio etanol el "efecto aromático" prácticamente no se manifiesta. Sólo aparece de forma discreta para la salicilamida y, en menor cuantía aún, para el ácido salicílico. Las posibilidades de separación en este medio se reducen a la salicilamida de otras seis sustancias, y a la aminopirina de la cafeína.
- 4ª) Al incorporar al etanol un electrolito ácido, como es el ácido láctico, el "efecto aromático" crece notablemente, aumentando a medida que lo hace la concentración de láctico. De este modo el número de posibilidades se incrementa de forma considerable, aún cuando se mantienen reducidas a la separación de dos sustancias.
- 5ª) Al incorporar al etanol un electrolito de tipo básico, como es el Tris, los valores de  $K_d$ , en relación con los obtenidos en etanol, prácticamente no se alteran. Esto indica que tal electrolito, en este medio, no ejerce ninguna influencia sobre el "efecto aromático".
- 6ª) En isopropanol el "efecto aromático" se exalta, -

en relación con el etanol puro, poniéndose de manifiesto en mayor número de sustancias, en especial para el ácido salicílico, salicilamida y cafeína. Esto lleva implícito que se aumente el número de separaciones posibles, aún cuando estas siguen concretadas a dos sustancias.

- 7<sup>a</sup>) En general, los valores de  $K_d$  no se alteran por la adición de electrolitos al isopropanol, tanto de ácido láctico como de Tris, si bien en algunos casos experimentan una ligera disminución, lo que, implica que el número de separaciones disminuya.
- 8<sup>a</sup>) En medio acuoso, con ácido láctico al 0,5 %, se exalta de forma considerable el "efecto aromático" de todas las sustancias estudiadas, excepto para la aminopirina y la codeína, obteniéndose valores de  $K_d$  dentro de un amplio intervalo lo que hace posible separar cuatro grupos de sustancias. La salicilamida y el ácido acetil salicílico son las especies donde el "efecto aromático" queda más exaltado.
- 9<sup>a</sup>) Como consecuencia de la distinta estructura de los geles, se modifican las posibilidades de separación en agua-láctico. Así, y a diferencia de lo

que ocurre con el Sephadex LH-20, con los tipos - G-10 y G-15 se puede separar el ácido acetil salicílico de la salicilamida y del ácido salicílico. Resulta destacable que, aunque en Sephadex G-10 - el efecto aromático se exalta respecto al G-15, - no por ello se incrementan las posibilidades separativas, ya que la relación entre los valores de  $K_d$  es análoga en ambos.

- 10<sup>a</sup>) Con disoluciones acuosas de Tris se disminuye notablemente el "efecto aromático" del ácido salicílico y del ácido acetil salicílico, manteniéndose prácticamente constante para el resto de las sustancias. Tal disminución permite separar cinco -- grupos de sustancias, tres de ellos integrados -- por una única especie.
- 11<sup>a</sup>) Los volúmenes de elución de la salicilamida, ácido salicílico y codeína tienen una dependencia lineal con la concentración de Tris en el medio -- acuoso. Esta dependencia es creciente para el ácido salicílico y decreciente para la codeína y salicilamida. La dependencia creciente es probable que sea debida a repulsiones con los grupos carboxilos del gel, al encontrarse el ácido salicílico

más disociado a medida que aumenta la concentración de base en el medio.

- 12ª) Antipirina, aminopirina y cafeína tienen siempre un comportamiento similar. En el proceso cromatográfico el mecanismo dominante para estas sustancias parece ser el de filtración molecular. La analogía de comportamiento de las dos primeras era previsible dada su analogía estructural.
  
- 13ª) Igualmente se comportan siempre de forma análoga etoxibenzamida, paracetamol y fenacetina, lo que también es lógico, ya que no existen entre ellas grandes diferencias estructurales.
  
- 14ª) El ácido láctico inhibe la descomposición del -- ácido acetil salicílico en disoluciones de etanol e isopropanol, mientras que el Tris, en medio -- acuoso la exalta, incluso sin modificar el pH.

*María Isabel Pico*

VIII. BIBLIOGRAFIA

- (1) LEVINE J., J. Pharm Sci 52 (11), 1015-31 (1963)
- (2) AROND L.H. y FRANK H.P., J. Phys. Chem 58, 953 (1954).
- (3) FLODIN P. e INGELMAN B. U.S. patent 3,042, 667 (1959).
- (4) KENTZKAMP N., HOELSCHER P., KRENEK D. y MUELLER D., Deut Apotheker. Ztg 99, 1273-5 (1959).
- (5) ADAMOVA E. y ZYKA J. Ceskoslov Farm. 4, 9-10 (1955).
- (6) KRANJELVIC M. y KAJGANOVIC V., Croat. Chem. Acta 30, 47-52 (1958).
- (7) BOZSAI I., DUPEZA K., KELEMEN-KUETTEL I. y MOZSON YISATA L., Gyogyszereszet 3, 139-43 (1959).
- (8) BUDESINSKY B. y KORBL J., Collection Czech. Chem. Consmuns 25, 76-84 (1960).
- (9) LASZLO V., Pharm Hung. 37 (3), 122-7 (1967).
- (10) DICK J. y RISTIC J., Sec. Stiinte Chim 6, 3-4 (1959).
- (11) KRENTZKAMP N., EBEL S. y KINDLING H., Deut. Apotheker Ztg. 99, 433-6 (1959).
- (12) MANZONI C., Boll. Soc. Ital Farm Osp., 18 (2) 83-8 (1972).

- (13) VASILICO R., SCINTEE V., CHIALDA I. SISMAN E., FRUCHTER J. y JECU H., Rev. Chim. 13, 759-60 (1962).
- (14) GHIEMMETTI G. y MELA C., Boll Chim. Farm. 99, 452-6 (1960).
- (15) KEMY P. BILLON J.P. y BIGEARD F., Ann. Pharm. Franc 17, 284-94 (1959).
- (16) BUSHKOVA M.N., BRAGINSKAYA P.B., YAMPOL'SKAYA M. M., Farmatsiya 20, (1) 84-5 (1971).
- (17) MARTIN C. y WIRTH P., Pharm. Acta Helv. 35, 575-7 (1960).
- (18) MOUTON M. y MASSON M., Ann. Pharm. Franc 18, 759-762 (1960).
- (19) MOHORIC J., Farm. Vestnik 13, (1-2) 1-5 (1963).
- (20) GEORGIEVSKII V.P., DZYUBA N.P. y LITVINENKO A.L. Farmatsiya 20, (14) 45-7 (1971).
- (21) GUREVICH Ya. y PEREL'MAN M., Apteknoe Delo 9, (2) 14-19 (1960).
- (22) GONCHAROVA N.A., EVSTRATOVA K.I., Khim-Farm Zh 5, (7) 48-52 (1971).
- (23) DZYUBA N.P. y GEORGIEVSKII, Med. Prom. SSSR 16 (11) 31-3 (1962).
- (24) IZMAILOV M.A., DZYUBA N.P. y GEORGIEVSKII, Med. Prom SSSR 17 (1) 28-31 (1963).

- (25) SONGLING L. y BLAKE M.I., Anal Chem. 38 (4), 549-52 (1966).
- (26) DAUKSAS K. y FINKELSTEINAITE M., V.U. Mokslo Darbai Chem 28, (1) 23-8 (1959).
- (27) NYREDY S., Gogyszereszet 6, 459-64 (1962).
- (28) BOUCHERLE A. SERNSCLAT F., Bull. Trav. Soc. Pharm Lyon 4, 41-9 (1960).
- (29) WEBER D.J. y LEVINE J., J. Pharm Sci. 55 (1), (1966).
- (30) WACHSMUTH H. y KOECKHOVEN L., J. Pharm Belg. 14, 215-20 (1959).
- (31) PAULOV V.L. y BARABASH T.I., Aptehnoe 7 (5), 43-8 (1958).
- (32) KOS J., Acta Pharm Jugoslav. 15 (3), 111-14 (1965).
- (33) MELO G., Il Farmaco E. Pratica 23 (8), 418 (1968).
- (34) CHODAKOWSKI M.A. y JESKE S., Acta Polon Pharm 23 (1) 47-9 (1966).
- (35) AZZAMASTSEV A.P., Aptehnoe Delo 7 (5), 72-8 (1958).
- (36) MARTIN C. y WIRTH P., Pharm Acta Helv. 34, 283-95 (1959).
- (37) KUM-TATT L. y CHIAN-SENG CHAN, J. Pharm y Pharmacol 12, 624-30 (1960).

- (38) DEDICOAT H. y SYMONDS D.C., J. Ass. Pub. Anal 10 (1) 14-17 (1972).
- (39) MURFIN J.W. y DEDICOAT H., J. Ass. Pub. Anal 11, 108-11 (1973).
- (40) HOWORKE K. y BECKERT S., Pharm Zentralhalle 102 (11), 715-18 (1963).
- (41) ULUBELEN A., Rev. Fac. Sci. Univ. Ist. 24, 145-61 (1959).
- (42) CELECHOVSKY J. y SVODOVA D., Ceskoslov Farm 8, 380-4 (1959).
- (43) ELLERT H., JASINSKI T. y MARCINKOWSKA K., Acta Polon. Pharm. 17, 29-39 (1960).
- (44) NAZARETH M.R. y HUYCK L., J. Pharm Sci. 50, 620-3 (1961).
- (45) SUFFIS R., LEVY A. y DEAN D.E., Anal Chem 36 (3), 636-7 (1964).
- (46) TETUO I., TATSUZAWA M. y MASAMI H., Yakuzaigaku 31 (4), 257-65 (1971).
- (47) J. Ass. Publ Analysts 1 (3), 64-67 (1963).
- (48) PELLERIN F. y CHASSET R., Ann. Pharm 26 (6), 421-8 (1968).
- (49) SATTLER H., Pharm Ztg. 111 (39), 1395-1405 (1966)
- (50) SHANE N.A. y RUTH J., Anal Chem. 39 (3), 414 (1967).

- (51) LADOMERY L.G., Australasian J. Pharm S. 44, 10-11 (1963).
- (52) CELECHOVSKY J., Acta Fac Rerum Natur. U. Comeniana Chim 12, 375-82 (1968).
- (53) MACHEK. G. y LORENZ F., Sci Pharm. 34 (3), 213-31 (1966).
- (54) FABRIZIO F., J. Pharm Sci. 57 (4), 643-45 (1968)
- (55) MACHEK G., Sci Pharm 29, 73-80 (1961).
- (56) WLODZIMIERZ ZYZYSKI, Acta Polon. Pharm 17, 277-86 (1960).
- (57) SHANE N. y KOWBLANSKY M., J. Pharm Sci. 57 (7), 1218-23 (1968).
- (58) CLAYTON A.W. y THIERS R.E., J. Pharm Sci. 55 (4), 404-7 (1966).
- (59) SHANE N. y ROTERT S., J. Pharm Sci. 60 (1), 114-16 (1971).
- (60) KANTER S.L. y HORBALY R.W., J. Pharm Sci. 60, 1898 (1971).
- (61) LANGE E.W. y BELL A.S., J. Pharm Sci. 55 (4), 386-9 (1966).
- (62) LANGE E.W., J. Pharm Sci. 60, 1898 (1971).
- (63) THERON J., J. Pharm Sci. 62 (9), 1500-2 (1973).

- (64) NAOBUMI O., Yakugaku Zasshi 85 (11), 1004-6 (1965).
- (65) Yakugaku Zasshi 87 (6) 743-5 (1967).
- (66) RUELL T. y GAGNAIRE D., Bull. Soc. Chim France 10, 2189-92 (1963).
- (67) HOLLIS P.D., Anal Chem 35 (11), 1682-4 (1963).
- (68) NIKOLIES K., Acta Pharm Hung. 31, 197-204 (1961).
- (69) RUBINSKOYA V.G. y FIGUORSKII N.A., Apteknoe Delo 11 (6), 37-42 (1962).
- (70) STOICHEVA L., Nauch. Trudove Visshiya Med. Inst. Sofiya 5 (2), 141-51 (1958).
- (71) BOUNICHSEN R., MACHLY A.G. y NORDLANDER S., J. Chromatography 3, 190 (1960).
- (72) Mc COUNELL DAVIS T.W., GENEST K., LANE R. y FANNI LO C.G., Proc. Can. Soc. Forensic Sci. 1, 29 (1962).
- (73) ZARNACK J. y PFEIFER S., Pharmazie 18, 288-94 (1963).
- (74) VECERKOVA J., KOHLICEK J. y KAEL K., Pharmazie 17, 394-9 (1962).
- (75) SEIDLEIN H.J. y POGGENDORF A., Pharm. Praxis Bei-lage Pharmazie 9, 192-7 (1963).
- (76) VIETTI-MICHELINA M., Pharm. Acta Helv. 31, 347-9 (1956).

- (77) GANSHIRT H. y MALZACHER A., Arch. Pharm. 293, 925-32 (1960).
- (78) GANSHIRT H., Arch. Pharm. 296 (2), 129-34 (1963)
- (79) SOETERBOCK A.M. y VAN THIEL M., Pharm. Weekbl 109 (40), 962-5 (1974).
- (80) DUSANKA R., ZORKA, B. STAKIC T.D., Acta Pharm. Jugosl 4 (3), 173-6 (1974).
- (81) LIEU VAN T., J. Chem Educ. 48 (7), 478-9 (1971).
- (82) PELLERIN F. y MANCHERON D., Inst. Symp. Chromatogr. Electrophor., Lect Pap. 6, 501-14 (1970).
- (83) SYMONDS D.C. y DEDICOAT H., J. Ass. Pub. Anal 10 (2), 54-5 (1972).
- (84) VUKKEEVIE-KOVOCEVIC V. y ARAM KASI K., Acad. Sei. 13 (3-4), 77-8 (1968).
- (85) BICAN FISTER T., Acta Pharm. Jugoslav. 12, 73-8 (1962).
- (86) SZASZ G., KHIN L. y BUDVAI R., Acta Pharm Hung. 33 (6), 245-51 (1963).
- (87) HOFFMAN J.A. y MITCHELL H.I., J. Pharm Sci. 52, 305-6 (1963).
- (88) CRIPPEN R. y C. FREIMUTH H., Anal Chem 36 (2), 273-5 (1964).
- (89) WATSON J.R., MATSUI FUMI y Mc COUNELL P.M., J. Pharm Sci. 61 (6), 929-33 (1972).

- (90) LAIK S., Chromatographia 6 (11), 478-80 (1973)
- (91) STEVENSON R. y BURTIS L., J. Chromatg. 61 (2), 253-61 (1971).
- (92) MOYELL J.S., HISKEY C.F. y LOGHMAN L., Anal Chem 46 (3), 449-52 (1974).
- (93) BRENDL WOLFGANG D., Pharm Ztg. 118 (40), 1583-5 (1973).
- (94) KAMP W., Pharm Weekblad 95, 481-6 (1960).
- (95) DIBBENS H.W. y SCHOLZ G., Arch. Pharm. 298 (3), 175-84 (1965).
- (96) SMITH DONALD J., J. Ass of Anal Chem 55 (3) 596-609 (1972)
- (97) YOSHINO T. SFENO A. y SUGIHARA M., Kayaku To Kogyo 36, 404-9 (1962).
- (98) HABERLI E. y BEGUIN E., Pharm Acta Helv. 35, 13-21 (1960).
- (99) REISCH J., BORNFLETH H. y RBEINBOY J., Pharm Ztg Nachr. 108 (36), 1182-3 (1963).
- (100) LEVINE J., J. Am. Pharm Assoc. 46, 687-9 (1957)
- (101) LEVINE J. y WETER D.J., J. Pharm Sci. 57 (4), 631-3 (1968).
- (102) LEVINE J., J. Pharm Sci. 50, 506-9 (1961).

- (103) INDEMANS A.W.M. y MULDER G., J. Pharm Weekblad 96, 465-77 (1961).
- (104) CHMIL U.D. Ya SHOSTENKO U., Zh. Analit Khim. 20 (10), 1122-4 (1965).
- (105) THOMAS KOSHY K., J. Pharm Sci. 53 (20), 1280-2 (1964).
- (106) HAMILTON J.L., J. Ass Offic. Anal Chim 54 (4), 895-9 (1971).
- (107) POLLINO G. Boll Chim Farm. 111 (1), 57-63 (1972)
- (108) SARSUNOVA M. y SCHWARZ V., Pharmazie 18, 34-7 (1963).
- (109) ANDREVA L.G., Apteknoe Delo 9 (1), 51-5 (1960)
- (110) OLADYSHEV P.D., GARYAEV M.I. y SADCHIKOV I. Ya Izu Akad Nauk Kaz SSR Ser Khim 18 (6), 69-70 (1968).
- (111) GELOTTE B., J. Chromatog. 3, 330-342 (1960)
- (112) STREULI C.A. y ORLOFF M., J. Chromatog. 62, 73-77 (1971).
- (113) Handbook of Chemistry and Physics. 43 rd. Ed  
Chemical Rubber Publishing Co. 1962.
- (114) Index Merk (8<sup>a</sup> Ed) (1968).
- (114 bis) U.S.P. XVIII, Sep. (1970).

- (115) PORAT J. y FLODIN P., Nature 183, 1657 (1959).
- (116) JOUSTRA M. SODUQUIST B. y FISCHER L., J. Chromatog. 28, 21-25 (1967).
- (117) JANSON J.C., J. Chromatog. 28, 12-20 (1967).
- (118) FLODIN P., Dextran gels and their applications in gel filtration, Uppsala (1962).
- (119) MOTOYUKI S., J. Chem Ing Jpn 7 (4) 262-6 (1974).
- (120) ALVAREZ A. y TORRE V. J. Pharm Sci. 58 (6)(1969)
- (121) KLEIN A., CHUDZIK J. y SARNECKA - KELLER M., J. Chromatog. 53, 329-336 (1970).
- (122) FISCHER L., An introduction to gel chromatography, North Holland, Amsterdam (1969).
- (123) HUEGLUND A., Inform Quim. Anal 19 (4) 131-2, 119 (1965).
- (124) KUNDUN. y MAENZAF., Naturwissenschaften 57 (11) 544-5 (1970).
- (125) PORAT J., Biochim Biophys Acta 39 193-207 (1960).
- (126) MARSDEN N.V.B., Ann. N.Y. Acad. Sci 125, 428 (1965).
- (127) GLAZER A.N. y WELLNER D. Nature 194, 862 (1962).
- (128) WIELAND y DETERMAN., J. Chromatog. 28, 2 (1967).

- (129) DETERMAN H. y WALTER I., Nature 219, 604-5 (1968).
- (130) ALUMAA A. y PALM U., Uch. Zap. Tartu Univ. 302 21-7 (1972).
- (131) SOPORER A.H. y TRUEBLOOD K.N., J. Chromatog. 2 499-512 (1959).
- (132) DETERMAN H., Gel Chromatography Springer-Verlag Berlin (1967).
- (133) GILES C.H., EASTON I.A., Mc KAY R.B., PATEL C.C, SHAH N.B. y SMITH D., Trans Faraday Soc 62 (7) 1963-75 (1966).
- (134) BROOK A.J.W. y HOUSLEY S., J. Chromatog. 41 200-4 (1969).
- (135) BROOK A.J.W. y MUNDAY K.C., J. Chromatog. 47 1-8 (1970).
- (136) SYNGE Q.L.M. y YOUNGSON, Biochem J. 78 31P
- (137) STREULI. C.A., J. Chromatog. 56, 219-23 (1971).
- (138) STREULI. C.A., J. Chromatog. 56, 225-29 (1971).
- (139) WILK M. ROCHLITZ J. y BENDE H., J. Chromatog. 24, 414 (1966).
- (140) OELERT H.H., Fresenius' Z. Anal Chem. 244 (2) 91 (1969).
- (141) KEIICHI. W., Yakugaku Zasshi 90 (12) 1570-3 (1970).

- (142) KEIICHI. W., Yakugaku Zasshi 93 (11) 1427-32 (1973).
- (143) DANILOVIC M. y MIRKOVIC S., Arhv Farm (Belg.) 11, 117-22 (1961).
- (144) JUE J. y HUYCK C.L., J. Am. Pharm. Assoc 3 (9) 470-1 (1963).
- (145) WHITWORTH C.W., JUN H.W. y LUZZI L.A., J. Pharm Sci 62 (10), 1721-2 (1973).
- (146) JUN H.W., WHITWORTH C.W. y LUZZI L.A., J. Pharm Sci 63 (1), 133-5 (1974).
- (147) HOCMAN G., J. Chromatog 21 (3), 413-10 (1966).
- (148) MARSALL J.J., J. Chromatog 53 (2), 379-80 (1970).
- (149) ORTIZ J.M., Ann. Real Acad. Farm 41, 53 (1975).