

Cromatografía electrocinética micelar (MEKC): un modo de electroforesis capilar empleado para resolver una mezcla compleja de vitamina B6 (clorhidrato de piridoxina), vitamina B12 (hidroxocobalamina), dexametasona y piroxicam en formulaciones farmacéuticas

Vera Candiotti, L.^a; Williner, M. R.^a; Nepote, J. A.^a; Olivieri, A. C.^b

a- Cátedra de Química Analítica II, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria. Paraje "El Pozo". C.C.242. Santa Fe S3000ZAA, Argentina.

b- Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Suipacha 531, Rosario S2002LRK, Argentina.

RESUMEN: Este trabajo describe un método rápido, basado en la cromatografía electrocinética micelar (MEKC) y la detección directa de la absorción electrónica a 240 nm; el cual fue desarrollado para la separación de cuatro fármacos presentes en formulaciones farmacéuticas, que contienen como principios activos vitamina B6 (clorhidrato de piridoxina), vitamina B12 (hidroxocobalamina), dexametasona fosfato de sodio (DEX) y piroxicam (PIR). Esta asociación se usa como analgésico, antiinflamatorio, miorelajante y antineurítico. MEKC se desarrolló en un capilar desnudo de sílice fundido de 70 cm de longitud total y 75 μm de diámetro interno (42 cm al detector), a 18 kV, con buffer borato a $\text{pH}=7.5$, en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) 20 mmol L^{-1} y acetonitrilo (ACN) en una concentración de 50 mg L^{-1} . La separación de los 4 fármacos se logró en un tiempo cercano a los 10 minutos. Se obtuvieron resultados satisfactorios para las siguientes resoluciones de los pares de analitos que presentaron movilidades electroforéticas similares: $B12/B6 = 2.20$, $B6/PIR = 3.05$, $PIR/DEX = 6.08$. MEKC es apropiado para resolver y cuantificar estos analitos en mezclas complejas como medicamentos y fluidos biológicos.

Palabras claves: cromatografía electrocinética micelar, fármacos, modo.

SUMMARY: Micellar Electrokinetic Chromatography (MEKC): a mode of Capillary Electrophoresis used to resolve a complex mixture of vitamin B6 (pyridoxine hydrochloride), vitamin B12 (hydroxocobalamin), dexamethasone and piroxicam in pharmaceutical formulations. Vera Candiotti, L.; Williner, M. R.; Nepote, J. A.; Olivieri, A. C.

This report describes a rapid method, based on micellar electrokinetic chromatography (MEKC) and direct electronic absorption detection at 240 nm, which was developed to separate of four pharmaceuticals present in pharmaceutical formulations that contain vitamin B6 (pyridoxine hydrochloride), vitamin B12 (hydroxocobalamin), dexamethasone sodium phosphate (DEX) and piroxicam (PIR) as active principles. This association serves as analgesic, anti-inflammatory, myorelaxant and anti-neuritic. MEKC is developed on uncoated fused-silica capillary tubing 70 cm total length and 75 μm I.D. (42 cm to detector), at 18 kV in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS) 20 mmol L^{-1} and acetonitrile 50 mg L^{-1} . The four pharmaceuticals were resolved in nearly 10 minutes. Satisfactory results were obtained for the following resolutions of anilities pairs which presented similar electrophoretic mobility: $B12/B6 = 2.20$, $B6/PIR = 3.05$, $PIR/DEX = 6.08$. MEKC is suitable to resolve and quantify these pharmaceuticals in complex mixtures such as medicaments and biological fluids.

Key words: micellar electrokinetic chromatography, pharmaceuticals, mode.

*Correspondencia a:

Fax +54-342-4575221.

E-mail: janepote@fbc.unl.edu.ar

Recibido: 17-06-04

Aceptado: 02-09-04

Introducción

La electroforesis capilar (CE) es una microtécnica analítica separativa, en la cual los componentes de una solución se separan mediante la acción de un campo eléctrico aplicado en el interior de un tubo capilar de sílice fundida (generalmente de 50 cm de largo y 25-75 μm de diámetro interno), de acuerdo a sus movilidades. Esta técnica puede ser utilizada en varios modos diferentes. En el presente trabajo se realizó un estudio preliminar empleando uno de los modos más comúnmente utilizados como la electroforesis capilar de zona (CZE), mediante el cual se lograron detectar en una primera instancia dos, y luego tres picos correspondientes a la mezcla compleja de estos cuatro fármacos. Seguidamente se aplicó la MEKC para lograr la obtención de los cuatro picos esperados. En consecuencia, se seleccionó la cromatografía electrocinética micelar (MEKC), debido a que es una técnica muy apropiada para separar compuestos neutros. Además es muy conveniente para ser empleada en el monitoreo y en el control de calidad de medicamentos, debido a que es rápida, simple y directa.

Varios medicamentos contienen como principios activos vitamina B6 (clorhidrato de piridoxina), B12 (hidroxocobalamina), dexametasona fosfato de sodio (DEX) y piroxicam (PIR). Esta asociación se usa como analgésico, antiinflamatorio, miorelajante y antineurítico. Su acción farmacológica produce una efectiva y rápida respuesta en el tratamiento de enfermedades tales como reumatismo articular, traumatismos del sistema locomotor, osteoartritis, lumbalgia, espondilitis anquilosante, trastornos músculoesqueléticos, dolor posparto y lesiones del deporte. Los efectos adversos más importantes que presentan son de origen gastrointestinal como por ejemplo úlcera, úlcera hemorrágica, insuficiencia hepática severa (1, 2), por lo tanto es muy importante disponer de métodos analíticos rápidos y directos para el monitoreo y control de calidad de estos medicamentos. El clorhidrato de piridoxina o vitamina B6 [clorhidrato de dimetanol (5-hidroxi-6-metilpiridina-3,4-dil)] es una vitamina soluble en agua y actúa principalmente en el metabolismo de los aminoácidos. La hidroxocobalamina o vitamina B12. Coa-[a-(5,6-dimetilbenzimidazol)]-Cob-hidroxocobamida es una vitamina hidrosoluble cuya

deficiencia afecta a los sistemas hematopoyéticos y nervioso. La dexametasona fosfato de sodio (DEX); [21-fosfato disódico (9-fluor-11 β , 17,21-trihidroxi-16 α -methylpregna-1,4-dieno-3,20-diona)] es un corticosteroide soluble en agua (10 mg/100 ml a 25 $^{\circ}\text{C}$), acetona, metanol y cloroformo; que posee una potente acción antiinflamatoria y prácticamente no tiene potencia para retener Na^+ . El piroxicam (1,2-benzotiazin-carboxamida) es un compuesto analgésico y antiinflamatorio no esteroide (3, 4).

Existen pocas técnicas para la determinación simultánea de estos compuestos. Solamente se han publicado trabajos para el análisis simultáneo de dos de ellos (5-7). Hay publicaciones científicas donde se determinan vitaminas del grupo B mediante CZE y MEKC en preparaciones farmacéuticas (8-11). En base a la combinación de espectrofotometría con calibración multivariada (PLS-1), nuestro grupo de trabajo desarrolló un método para determinar B6, B12 y DEX simultáneamente en inyectables (12) y otro para determinar estos cuatro fármacos presentes en comprimidos (13); consecuente hasta ese momento no se habían hallado publicaciones que desarrollen métodos para determinar simultáneamente B6, B12, DEX y PIR. Diferentes Farmacopeas proponen la determinación unitaria de estos compuestos mediante la aplicación de HPLC (3, 4, 14).

En este trabajo se desarrolló un modo directo, simple y rápido, de separar estos fármacos en matrices complejas, que permite una rápida separación de los mismos, aplicable al control de calidad farmacéutico: cromatografía electrocinética micelar (MEKC) (8, 10, 11). Este método se llevó a cabo sin necesidad de una etapa de separación previa, ni solventes contaminantes. Se estudiaron tabletas y comprimidos comerciales que contienen esta mezcla cuaternaria de B6, B12, DEX y PIR, con los componentes en una relación de masa igual a 60:1:0.4:4.

Materiales y métodos

Reactivos

Para la preparación de las soluciones patrones madres se emplearon las siguientes drogas de calidad grado analítico: Vitamina B6 (Parafarm-Saporiti Laboratorios, Buenos Aires, Argentina), Vitamina B12 (Saporiti Laboratorios, Buenos Aires, Argentina), DEX (Saporiti Laboratorios, Buenos Aires, Argentina) y PIR

(Sigma, WI, USA). Las soluciones patrones madres de vitamina B12, vitamina B6, piroxicam y dexametasona, se prepararon con agua Milli-Q (ultrapura) cada una de concentración igual 1.000 g L⁻¹. En el caso de PIR, se agregaron dos gotas de NaOH 0.1 N para lograr la completa disolución, diluyendo luego con agua Milli-Q para obtener la concentración deseada.

Las mezclas artificiales se prepararon a partir de las soluciones patrones de cada fármaco, de tal forma de obtener concentraciones finales de cada fármaco y la relación entre los mismos similares a la muestra comercial, como se indicó anteriormente.

Para realizar los diferentes ensayos se utilizaron las siguientes soluciones buffer: fosfato monoácido de sodio dihidratado (Na₂HPO₄ · 2 H₂O) 20 mol L⁻¹, de pH = 9.0; Fosfato 10 mol L⁻¹/Borato 10 mol L⁻¹, de pH = 9.0 y un buffer de borato (Na₂B₄O₇ · 10 H₂O) de concentración igual a 2 × 10⁻² mol L⁻¹, pH = 7.5, con agregado dodecilsulfato de sodio (SDS) en una concentración de 2 × 10⁻² mol L⁻¹ y acetonitrilo 50 mg L⁻¹. Esta última solución buffer de pH = 7.5 fue preparada en el día, filtrada y desgasificada antes de su uso.

Muestras analizadas

Las muestras comerciales (comprimidos) fueron obtenidas de los siguientes laboratorios: Flexicamin B12, SIDUS SA (Buenos Aires, Argentina), Flogiatrin, SANOFI (Buenos Aires, Argentina), y Solocalm Plus, MICROSULES BERNABO (Buenos Aires, Argentina). Para su preparación, se pesaron 20 comprimidos de cada medicamento, para obtener el peso promedio de los mismos, se molieron finamente con mortero, se mezclaron y se pesó la cantidad correspondiente a un comprimido. Esta masa se transfirió cuantitativamente a un vaso de precipitado de 50 ml, al que se le agregaron 30 ml de agua Milli-Q y gotas de NaOH 0.1 mol L⁻¹. Luego se sonicó durante 5 minutos y el contenido fue transferido cuantitativamente, previo filtrado (para eliminar excipientes no solubles en dicho solvente), a un matraz de 50 ml. Finalmente se completó hasta enrase con agua ultrapura, para luego ser inyectada en el instrumento.

Antes de su uso en la experimentación por electroforesis, las soluciones de electrolito, las soluciones patrón y las muestras artificiales y comer-

ciales, fueron filtradas a través de filtros de acetato de celulosa de 0.20 µm (Sartorius) y desgasificadas en un baño ultrasónico durante 10 minutos.

Instrumentos

Los electroferogramas se obtuvieron con un instrumento SpectraPHORESIS 100. Thermo Separation Products, San José, California, dotado de un detector UV-visible. Los capilares que se emplearon, poseían las siguientes características: capilar desnudo de sílice fundido de 75 µm de diámetro interno, 70 cm longitud total y 42 cm de longitud de detección, provistos por la misma empresa. Además, para que las paredes del capilar estén siempre en las mismas condiciones, se realizaron entre análisis, lavados sucesivos con H₂O ultrapura, NaOH 0.1 N y buffer de trabajo. La detección se efectuó mediante la medida de absorbancia a una longitud de onda de 240 nm. Con el propósito de determinar la longitud de onda de detección de los fármacos en estudio, se realizaron los espectros de absorción electrónica de cada uno en soluciones patrones en un espectrofotómetro Beckman DU 640, usando cubetas de cuarzo de 1.00 cm.

Consideraciones teóricas sobre MEKC

Este es un modo de separación de la electroforesis capilar basada en interacciones de tipo hidrofóbicas y/o iónicas, entre los diferentes analitos y micelas cargadas positivamente o negativamente, según su naturaleza. El comportamiento de este sistema es bastante similar al que existe en una columna cromatográfica de reparto líquido-líquido, con la particularidad que en la MEKC la fase estacionaria se mueve a lo largo del capilar con una velocidad mucho menor que la fase móvil. Además, en ambos casos el mecanismo de separación es idéntico, debido a que depende de las diferencias entre las constantes de distribución de los distintos analitos presentes en la fase acuosa y la fase pseudoestacionaria constituida por las cadenas de hidrocarburo. Generalmente se suelen agregar surfactantes neutro, aniónico, catiónico o zwitteriónico para cambiar los coeficientes de partición de los analitos, y solventes tales como acetonitrilo con el propósito de incrementar la solubilidad de analitos orgánicos. La ventaja fundamental de la MEKC frente a la CZE es que permite separar compuestos neutros, que de lo con-

trario migrarían al mismo tiempo (arrastrados por el flujo electroosmótico, EOF) (15-18).

El proceso es realmente cromatográfico, de aquí que se le denomine cromatografía electrocinética micelar capilar. MEKC presenta algunas ventajas sobre la técnicas de cromatografía líquida empleada comunmente: (a) eficacias de columna (100 000 platos o más), (b) facilidad con la que se puede modificar la fase pseudoestacionaria en comparación con el cambio de fase estacionaria en HPLC (cambio de columna con otro tipo de relleno), (c) no son necesarios dispositivos para alta presión y (d) el consumo de solventes de alta pureza es menor que en HPLC. Además, es la única técnica de electroforesis que puede ser usada para la separación tanto de solutos neutros como de los cargados, tales como principios activos de medicamentos. La formación de la fase pseudoestacionaria se logra mediante el uso de tensoactivos en el buffer de corrida. A concentraciones mayores que la "micelar crítica" (de 8 a 9 mol L⁻¹ para dodecil sulfato de sodio SDS) se forman micelas, que son agregados de moléculas individuales de tensoactivo. Las micelas son esencialmente esféricas con los extremos hidrofóbicos orientados hacia el centro para evitar la interacción con el buffer hidrofílico y los extremos cargados hacia el buffer. A pesar que la MECK es una técnica muy apropiada para compuestos neutros y muy conveniente para su empleo en el monitoreo y el control de calidad de medicamentos, presenta algunas limitaciones como ser una estrecha ventana de separación y una limitada estabilidad de las micelas de la fase pseudoestacionaria (19, 20).

Resultados y discusión

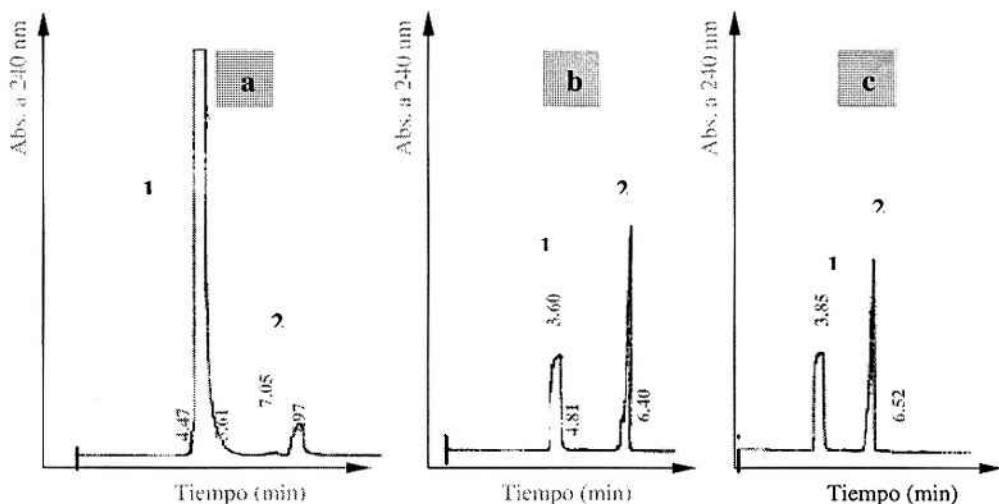
Análisis de los espectros de absorción

A partir de analizar el comportamiento de los espectros de absorción electrónica UV-vis de B6, B12, DEX y PIR en soluciones acuosas, se pudo determinar la longitud de onda de trabajo para la detección de estos. Para ello se realizaron los espectros individuales de los compuestos puros a tres pH diferentes (pH = 2.0, pH = 6.0 y pH = 12.0). Teniendo en cuenta que en los cuatro casos analizados existe un fuerte solapamiento de las señales espectrales de los fármacos en estudio, comportamiento favorable para la determinación simultánea por EC, se optó por la longitud de onda de 240 nm, en donde todos los compuestos presentan buena absorptividad, principalmente la dexametasona que es el que se encuentra en menor concentración en las muestras reales (13).

Separación mediante CZE

En una primera etapa se estudió la aplicación de CZE como microtécnica separativa simple; para lo cual se consideraron las propiedades de las moléculas de los fármacos analizados (3, 4, 14) y distintos tipos de soluciones buffer citadas en reportes científicos (5). Consecuentemente se comenzó trabajando a pH alcalino, donde el flujo electroosmótico es de mayor importancia, para ello se preparó una mezcla artificial con los 4 compuestos siendo la concentración final de cada uno de 0.200 g L⁻¹. Se procedió luego a evaluar la naturaleza del buffer apropiado para el análisis. Se realizaron corridas electroforéticas siempre al mismo voltaje (18 kV), con buffer fosfato 20 mmol L⁻¹ (figura 1. a), con buffer borato 20 mmol L⁻¹ (figura 1. b) y con buffer fosfato 10 mmol L⁻¹ / borato 10 mmol L⁻¹ (figura 1. c), en todos los casos a pH = 9.0.

Figura 1: Electroferogramas de la mezcla artificial por CZE: con buffer fosfato 20 mmol L⁻¹ (a), con buffer borato 20 mmol L⁻¹ (b) y con buffer fosfato 10mM / borato 10 mmol L⁻¹ (c). En todos los casos se trabajó a 18 kV y a pH 9.

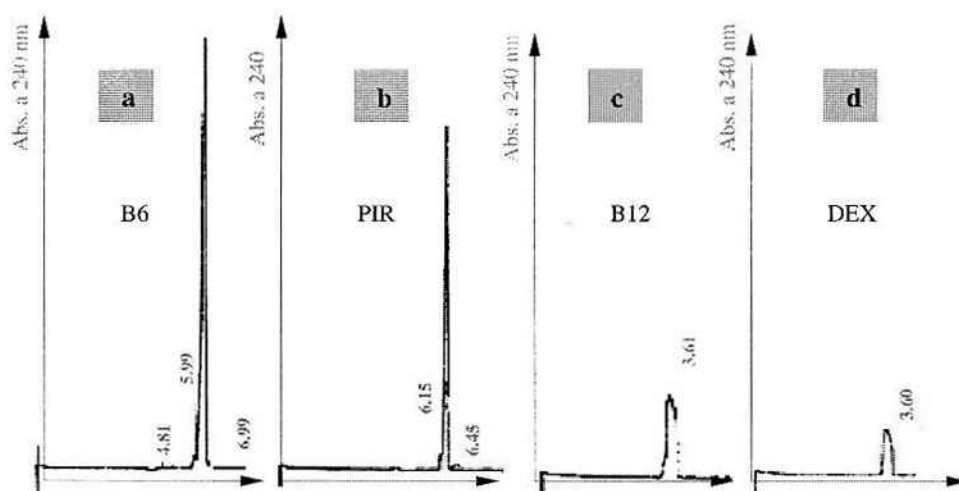


Como se puede observar en los electroferogramas de la Fig.1, en los 3 casos solamente aparecen dos picos en lugar de los cuatro esperados. Luego de analizar cada caso, se decidió continuar trabajando con buffer borato, debido a que con buffer fosfato (Fig.1.a) el tiempo de migración fue el mayor de los tres. Además en los casos de trabajar con buffer borato (Fig.1.b) y borato/fosfato (Fig. 1.c) los tiempos de migración fueron similares, (menores al anterior) pero en el caso de la Fig.1.b, al tiempo de migración (t_m) de 6.40 min se observan dos picos no resueltos. Por otro lado el buffer borato 20 mmol L⁻¹ (pH = 9.0) es más simple de preparar que el buffer fosfato 10 mmol L⁻¹ / borato 10 mol L⁻¹. Esto es coincidente con lo publicado por Su y col. (2001), en su reporte sobre determinación de vitaminas

hidrosolubles en tabletas y cápsulas comerciales (5).

Para la identificación de cada uno de los picos que se habían obtenido en la Fig.1.b, se realizaron corridas individuales de cada compuesto con buffer borato 20 mol L⁻¹ (pH = 9.0). Según sus tiempos de migración se pudo establecer que cuando se corre la mezcla, el primer pico del electroferograma (t_m =3.60min) de la Fig.1. correspondía a B12 y DEX, cuyo tiempo de migración es igual al de cada uno de estos analitos cuando se los corre individualmente, como se puede ver en las Figs. 2.c y 2.d. El segundo pico (t_m =6.40min) correspondía a B6 y PIR, debido a que muestra un tiempo de migración similar a los presentados por cada uno de ellos cuando se los analiza individualmente, de acuerdo a lo se puede observar en las Figs. 2.a y 2.b.

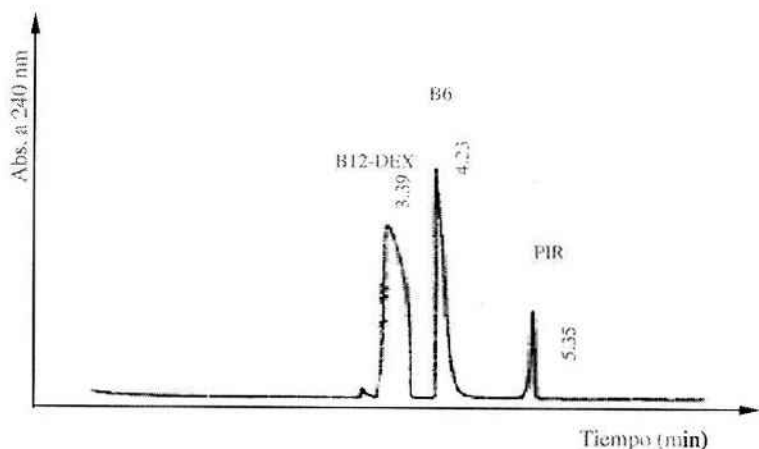
Figura 2: Electroferogramas de los cuatro compuestos puros. Buffer: borato 20 mmol⁻¹, pH=9.0 a 18 kV, Vitamina B6 (a); PIR (b); Vitamina B12 (c) y DEX (d).



Con el objetivo de resolver apropiadamente el problema analítico planteado, se disminuyó la intensidad del flujo electrosmótico mediante la modificación del pH del buffer, en consecuencia se realizaron corridas con borato 20 mmol L⁻¹ a pH = 7.5 y 18 kV. Con esas condiciones experimentales se obtuvieron 3 picos que de acuerdo a los tiempos de migración (t_m) de cada uno, corresponden: el primero a la mezcla B12 y DEX ($t_m = 3.39$ min.), el segundo a

B6 ($t_m = 4.23$ min.) y el tercero a PIR ($t_m = 5.35$ min.); tal como se puede observar en la Figura 3. De esta forma la disminución del pH posibilitó la separación de B6 y PIR (componentes del segundo pico del electroferograma que se muestra en la figura 1.b). En consecuencia, se llegó a la conclusión que mediante la aplicación de CZE con las condiciones experimentales indicadas anteriormente no se lograba la separación de los cuatro fármacos en estudio.

Figura 3: Electroferograma de la muestra artificial realizada con ZCE: Buffer borato 20 mmol L⁻¹ pH = 7.5 a 18 kV.

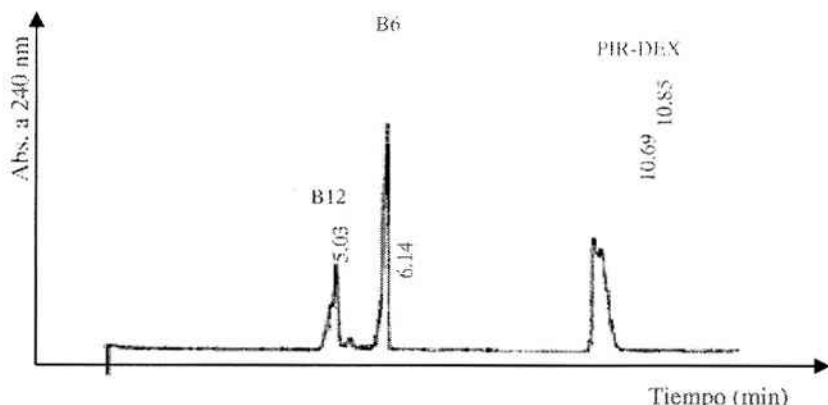


Desarrollo de MEKC

Luego de estudiar algunos de los efectos de los efectos de los buffer, se planteó una nueva alternativa, que fue la de agregar al buffer borato (20 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 9.0$) un surfactante aniónico como el dodecil sulfato de sodio (SDS), en una concentración superior a la micelar crítica ($8\text{-}9 \text{ mmol L}^{-1}$). En este caso se adicionó al buffer borato una concentración de SDS igual a 20 mmol L^{-1} . En consecuencia, el desarrollo experimental bajo estas condiciones, generó la posibilidad de comenzar a trabajar con cromatografía micelar electrocinética capilar (MEKC). De este modo los electroferogramas obtenidos presentaban 3 picos, que de acuerdo a los tiempos de migración se identificaban de la siguiente manera: el primero con B12 ($t_m = 5.03 \text{ min}$), el segundo con B6 ($t_m = 6.14 \text{ min}$) y

el tercero con dos picos no resueltos correspondientes a PIR-DEX (Fig. 4). Como se puede apreciar, el agregado del surfactante aniónico influye en la separación de los componentes del primer pico del electroferograma que se muestra en la figura 3, vitamina B12 y dexametasona. Pero con estas condiciones, se observó una modificación importante en el t_m de DEX, de tal forma que dicho t_m resultó ser similar al de PIR. Como se observa en la Fig. 4 hay un tercer pico no resuelto para PIR-DEX, y además el electroferograma muestra una modificación en el orden de migración de los analitos en estudio. Tal orden de migración se puede observar en la Tabla 1 de acuerdo a los t_m de cada analito, y es el siguiente: vitamina B12, vitamina B6, piroxicam y dexametasona.

Figura 4: Electroferograma de la muestra artificial. Buffer borato 20 mmol L^{-1} $\text{pH}=9.0$ con el agregado de 20 mmol L^{-1} de SDS a 18 kV .



A continuación se trabajó con buffer borato 20 mmol L^{-1} , pero ahora a $\text{pH}=7.5$, al que se le adicionó SDS en una concentración igual a 20 mmol L^{-1} . Con este nuevo modo de separación, se observaron 4 picos en los electroferogramas obtenidos, con las siguientes características: los dos primeros picos presentaban una resolución muy pobre tal como se puede ver en la Tabla 1.

Finalmente, esta separación se optimizó mediante el agregado al buffer borato de acetonitrilo

(ACN) en una proporción de 50 mg L^{-1} , tal como se puede observar en la Fig. 5 y apreciar en los valores presentados en la Tabla 1. En consecuencia con el modo MEKC, realizado con buffer borato a $\text{pH}=7.5$, 18 kV en presencia de SDS 20 mmol L^{-1} y ACN, permite separar adecuadamente la mezcla compleja motivo del presente trabajo. Es decir se obtuvieron electroferograma con los 4 picos buscados, correspondiente a cada uno de los fármacos en cuestión.

Resultados de las resoluciones obtenidas con MEKC

Las resoluciones de los picos del electroferograma de las muestras artificiales y comerciales para los pares de analitos que presentaron picos cercanos, fue calculada como:

$$R = 2 (t_2 - t_1) (w_1 + w_2)^{-1}$$

donde t_2 y t_1 representan los tiempos de migración de los analitos próximos, y w_1 y w_2 son los anchos de zona de los respectivos picos medidos sobre la línea de base. (15, 16). Se considera que las dos especies en cuestión están resueltas cuando R es mayor de 1.5.

Tabla 1: Tiempos de migración y resoluciones para los cuatro compuestos separados mediante la aplicación de MEKC

Buffer borato 20 mmol L ⁻¹ (pH = 7.5 a 18 kV)	Tiempos de migración (min) ^a				Resolución ^a		
	B12	B6	PIR	DEX	B12/B6	B6/PIR	PIR/DEX
Con 20 mmol L ⁻¹ de SDS	4.12 (0.34) ^b	4.51 (0.45)	5.91 (0.19)	11.02 (0.58)	0.87 (1.28)	4.40 (2.40)	5.03 (2.00)
con 20 mmol L ⁻¹ de SDS y 50 mg L ⁻¹ de ACN	4.85 (0.43) ^b	6.06 (0.77)	7.28 (0.80)	10.25 (0.78)	2.20 (1.18)	3.05 (1.50)	6.08 (1.32)

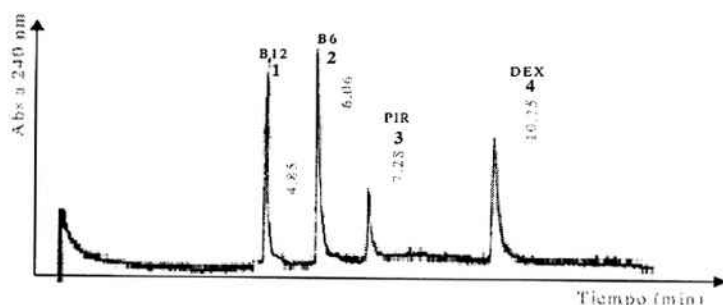
a- Todos los valores se obtuvieron como el promedio de corridas electroforéticas realizadas por triplicado a muestras artificiales y comerciales.

b- Los valores entre paréntesis corresponden a los coeficientes de variación (CV, %).

En la tabla 1, se presentan los resultados de los tiempos de migración de cada analito ensayado en muestras artificiales y muestras comerciales, en corridas electroforéticas realizadas en presencia de SDS solamente y SDS con ACN. En la primera situación se puede observar en los resultados de la tabla 1, que no se resuelven los picos correspondientes a

B12 y B6, debido a que presentan un valor de menor de 1.5, en cambio cuando se efectúa la corrida en presencia de ACN, este valor de resolución es marcadamente mayor de 1.5, lo que concuerda con el electroferograma de la Fig. 5, donde se puede observar una muy buena resolución de todos los fármacos en cuestión.

Figura 5: Electroferograma de la muestra comercial: Buffer borato 20 mmol L⁻¹ pH = 7.5 con 20 mmol L⁻¹ de SDS y 50 mg L⁻¹ de ACN a 18 kV. Identificación de los picos: 1, B12; 2, B6; 3, PIR; 4, DEX.



Se evaluó también el efecto del voltaje aplicado para acelerar los tiempos de migración, para esta experiencia se realizaron corridas de muestras artificiales por triplicado trabajando para todos los casos con buffer borato 20 mM, pH = 7.5 con 20 mM de SDS y 50 mg L⁻¹ de ACN, trabajando a los voltajes siguientes: 15 kV, 18 kV y 20 kV. Cuando se aplicaron 15 kV, se observó que el tiempo total de la corrida era de 16 minutos, y cuando se aplicaron 20 kV, se pudo observar que la intensidad de corriente era elevada y provocaba el calentamiento del capilar. Finalmente se seleccionó el voltaje igual a 18 kV, debido a que como se observó el tiempo total de la corrida es próximo a los 10 minutos y el calentamiento por efecto Joule no afecta significativamente el perfil de absorbancia en función del tiempo.

Conclusiones

Luego de aplicar la CZE no se logró separar los analitos con las condiciones experimentales ensayadas. En consecuencia, se usó el modo MECK, con el cual se obtuvo una muy buena separación de los cuatro fármacos presentes en las distintas formulaciones farmacéuticas analizadas, en un tiempo cercano a los 10 minutos. Las condiciones de trabajo en las que se logró muy buena resolución de vitamina B12, vitamina B6, piroxicam y dexametasona finalmente fueron las siguientes: buffer borato 20 mM, SDS 20 mM, acetonitrilo 50 mg L⁻¹, pH = 7.5, el voltaje 18 kV y la detección a la longitud de onda de 240 nm. Este método analítico es apropiado resolver y cuantificar la mezcla de estos analitos en medicamentos y fluidos biológicos.

Agradecimientos

Se agradece al Laboratorio Modelo de la FBCB-UNL (Proyecto FOMEC de Química N° 329), al CONICET y a la ANPCyT (Proyecto No. 06-06078).

Bibliografía

1- J. E. F. Reynolds (Ed.), 1993. "Martindale, The Extra Pharmacopoeia", The Pharmaceutical Press (London), p. 1056.
2- A. Goodman Gilman, J. G. Harman, L. E. Limbird, P. B. Molinif, R. W. Ruddon, 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica, 9ª ed., Ed. McGraw-Hill Interamericana, México,

pp. 1567, 1570, 1574 y 1663-1664.
3- USP, 1995. Water-soluble vitamins tablets. In: United States Pharmacopeia XXIII, United States Pharmacopeia Convention, Rockville, Maryland, pp. 2172-2173.
4- USP, 2000. United States Pharmacopeia XXIV, United States Pharmacopeia Convention, Rockville, Maryland, pp. 839, 1315, 1342, 1447.
5- S. C. Su, S. S. Chou, D. F. Hwang, P. C. Chang, C. H. Liu, 2001. Capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic capillary chromatography for determination water-soluble vitamins in commercial capsules and tablets. *J Food Sc* **66**(1):10-14.
6- M. Amin y J. Reusch, 1987. High performance liquid chromatography of water soluble vitamins. III Simultaneous determination of vitamins B₁, B₂, B₆, B₁₂ and C, nicotinamide and folic acid in capsule preparation by ion pair reversed phase high performance liquid chromatography. *Analyst* **112** (7): 989-991.
7- P. C. Damiani, M. Bearzotti, M. Cabezón, A. C. Olivieri, 1998. Spectrofluorometric determination of piroxicam. *J Pharm Biomed Anal* **17**(2):233-236.
8- J. Boonkerd, M. R. Detaevernier, Y. Michotte, 1994. Use of capillary electrophoresis for the determination of the B group in pharmaceutical preparation. *J Chromatogr A* **670**:209-214.
9- U. Jegle, 1993. Separation of water-soluble vitamins via high-performance capillary electrophoresis. *J. Chromatogr A* **652**:495-501.
10- C. P. Ong, C. L. Ng, H. K. Lee, S. F. Y. Li, 1991. Separation of water and fat-soluble vitamins by micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr* **547**:419-428.
11- R. L. Boso, M. S. Bellini, I. Miksik, Z. Deyl, 1995. Microemulsion electrokinetic chromatography with different organic modifiers: Separation water- and lipid-soluble vitamins. *J Chromatogr A* **709**:11-19.
12- J. A. Nepote, P. C. Damiani, A. C. Olivieri, 2002. Chemometric assisted spectroscopic determination of vitamin B6, vitamin B12 and dexamethasone in injectables. *J Pharm Biomed Anal* **31**:621-627.
13- J. A. Nepote, L. Vera-Candiotti, M. R. Williner, P. C. Damiani, A. C. Olivieri, 2003. Development and validation of chemometrics-assisted spectrophotometry and micellar electrokinetic chromatography for the determination of four-component pharmaceuticals. *Anal Chim Acta* **489**: 77-84.
14- BP, 1998. British Pharmacopeia 1998. CD version 2.0. The Stationary Office Ltd. Norwich pp 918, 960, 982, 1055.
15- D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, 2001. Química Analítica, 7ª ed (Editores, S.A. de C.V.) Ed. McGraw-Hill Interamericana, México, pp. 725-737.

- 16- P. D. Grossman y J. C. Colbum, 1992. Capillary electrophoresis. Theory and Practice. Academic Press, Inc., San Diego, pp. 269-398.
- 17- Guzmán, N. (1993). Capillary Electrophoresis Technology. Marcel Decker Inc. New York, 857.
- 18- R. S. Khun y S. Hoffstetter Khun, 1993. Capillary Electrophoresis Principles and Practice. Springer Laboratory, Berlin, pp. 97-223.
- 19- A. Zemann, D. Volgger, 1997. Separation of priority pollutant phenols with coelectroosmotic capillary electrophoresis. Anal Chem 69: 3243.
- 20- R. M. Seifar, J. C. Kraak, W. T. Kok. Mechanism of electrokinetic separation of hydrofobic compounds with sodium dodecil sulfate in acetonitrile-water mixtures. Anal Chem 69:2772