

131A

233



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**"DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO  
ANALITICO PARA LA DETERMINACION  
CUANTITATIVA DEL PALMITATO DE VITAMINA "A"  
POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA  
RESOLUCION EN UN INYECTABLE".**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MARTHA ANGELINA TREJO LIZARDI



MEXICO, D. F., A 13 DE ENERO DE 1994

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

Jurado asignado

**PRESIDENTE : PROF. ETELVINA MEDRANO BARRA**  
**VOCAL : PROF. ALFREDO GARZON SERRA**  
**SECRETARIO : PROF. JOSE LUIS IBARMEA AVILA**  
**1er. SUPLENTE : PROF. CONSUELO ARELLANO BORJAS**  
**2do. SUPLENTE : PROF. NORMA TRINIDAD GONZALEZ MONZON**

Sitio donde se desarrollo el tema:

**Italmex, S.A.**

Asesor:

Prof. Alfredo Garzón Serra



Sustentante:

Martha Angelina Trejo Lizardi



**EXAMENES PROFESIONALES**  
**FAC. DE QUIMICA**

**A DIOS**

**A MI UNIVERSIDAD**

**AGRADEZCO TODAS LAS FACILIDADES Y APOYO BRINDADO PARA LA  
REALIZACION DE ESTE TRABAJO A:**

**LABORATORIOS ITALMEX S.A.**

**AL Q.F.B. ALFREDO GARZON SERRA  
POR SU APOYO, MOTIVACION Y DIRECCION**

**A MIS MAESTROS DE FACULTAD POR SU APOYO CONOCIMIENTOS Y  
SABIOS CONSEJOS.**

**EN ESPECIAL:**

**Q.F.B. ETELVINA MEDRANO BARRA**

**Q.F.B. JOSE LUIS IBARMEA AVILA**

**Q.F.B. ALFREDO GARZON SERRA**

**Q.F.B. HECTOR JARA FARJEAT**

**Q.F.B. MARIO MIRANDA CASTRO**

**AL Q.F.B. HECTOR GONZALEZ AGUILAR POR SU APOYO Y MOTIVACION**

**A MI MAMA : MARIA GUADALUPE LIZARDI SANCHEZ  
POR SU APOYO Y AMOR**

**PARA : SERGIO, SATURNINO Y CAROLINA  
POR SU AMOR Y CONFIANZA**

**PARA MIS TIOS: ANGELINA, CARLOS Y VENANCIO  
POR SU APOYO Y CARIÑO**

**AL SR. ANTONIO CURZIO GONZALEZ  
POR SU APOYO Y MOTIVACION**

**ESTE TRABAJO SE DESARROLLO EN EL DEPARTAMENTO DE CONTROL QUIMICO  
DE LOS LABORATORIOS ITALMEX, S.A. BAJO LA SUPERVISION Y  
ASESORAMIENTO DEL Q.F.B. ALFREDO GARZON SERRA**

## **I N D I C E**

<b>CAPITULO 1. INTRODUCCION.</b>	<b>6</b>
<b>CAPITULO 2. GENERALIDADES DE VITAMINAS.</b>	<b>7</b>
<b>CAPITULO 3. CROMATOGRAFIA.</b>	<b>18</b>
<b>CAPITULO 4. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.</b>	<b>51</b>
<b>CAPITULO 5. PARTE EXPERIMENTAL.</b>	<b>58</b>
<b>CAPITULO 6. DISCUSION DE RESULTADOS.</b>	<b>73</b>
<b>CAPITULO 7. CONCLUSIONES.</b>	<b>74</b>
<b>CAPITULO 8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.</b>	<b>75</b>

## **CAPITULO 1**

### **I N T R O D U C C I O N**

La cuantificación de vitaminas en preparados multivitamínicos ha sido un reto para el farmacéutico que trabaja en control de calidad en la Industria Farmacéutica.

Aún con la utilización de técnicas analíticas modernas como la cromatografía de líquidos de alta resolución, se tienen problemas para contar con métodos adecuados debido principalmente a lo complejo de las mezclas, al tipo de vehículo que se utiliza para la formulación y a las concentraciones vitamínicas que son permitidas actualmente.

El presente trabajo consiste en desarrollar y validar un método por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para el análisis de Palmitato de Vitamina A en un inyetable.

La validación incluye la determinación de la linealidad, exactitud, precisión, reproducibilidad y especificidad del método ya que se requiere utilizar tanto para control de calidad, como para seguir la estabilidad de la formulación.

El método de análisis desarrollado y validado es apropiado para la determinación de Palmitato de Vitamina A ya que es un método sencillo, rápido y de bajo costo.

## **CAPITULO 2**

### **GENERALIDADES DE VITAMINAS**

Las vitaminas son compuestos que se requieren en cantidades muy pequeñas para el crecimiento, conservación, reproducción y el mantenimiento de la vida en los animales, incluido el hombre.

Las vitaminas difieren de los demás nutrientes en que no forman parte de los tejidos corporales, sino que son componentes de ciertos sistemas hormonales y enzimáticos y por ello son esenciales en los procesos normales de la vida.

Los animales son incapaces de sintetizar estos compuestos mediante procesos anabólicos y por lo tanto deben ser suministrados por una fuente externa.

Estos compuestos o sus precursores se encuentran en los vegetales y por lo que se conoce, cumplen funciones metabólicas específicas en las células. Los tejidos de los vegetales son la fuente de estos factores nutricionales para el reino animal. Además de carbohidratos, grasas, proteínas, sales minerales y agua es necesario que el alimento del hombre y los animales contenga pequeñas cantidades de estas sustancias orgánicas denominadas vitaminas.

La carencia de las vitaminas en la dieta del hombre, al igual que en animales de experimentación, provoca reducción o detención total del crecimiento, estas anomalías son conocidas como enfermedades carenciales o por deficiencia.

Por ejemplo, se observó hace más de 3000 años que el escorbuto podía evitarse o curarse comiendo frutas o verduras frescas. También se sabía que el raquitismo se podía curar por ingestión oral de aceite de hígado de bacalao. En 1897, Eijkman demostró que una enfermedad, (beri-beri), resultante de ingerir prolongadamente arroz descascarillado, podía curarse incorporando a la dieta cascarillas de arroz. También se conocía el papel que desempeñaban los cereales o el hígado en la prevención de la ceguera nocturna.

Estas observaciones sugerían la presencia de sustancias orgánicas en los alimentos naturales que eran indispensables para la salud, pero no entraban en ninguna categoría de carbohidratos,

grasas o proteínas. Hopkins, en 1906 llamó a estas sustancias factores accesorios de los alimentos y en 1911 Funk, introdujo el término de vitamina que fue finalmente aceptado en 1913.

Las vitaminas se diferencian entre sí por su composición química y su función, pero comparten la característica de que ninguna de ellas puede ser sintetizada completamente o por lo menos con la velocidad adecuada, en los tejidos de los animales y el hombre.

Estas sustancias cumplen funciones de dos tipos: mantenimiento de las estructuras corporales y también de las funciones metabólicas normales por ejemplo, la Vitamina A es esencial para el mantenimiento del tejido epitelial y la Vitamina D tiene que ver con la absorción de las sales necesarias para la formación y crecimiento del tejido óseo.

Ciertas vitaminas del grupo hidrosoluble, entre ellas la tiamina, riboflavina, ácido pantoténico y niacina son constituyentes esenciales de las enzimas respiratorias, que son necesarias para la utilización de energía a partir del catabolismo oxidativo de azúcares y grasas.

Las vitaminas se dividen en dos grupos: factores liposolubles e hidrosolubles. Las vitaminas A, D, E, K, están incluidas dentro del grupo liposoluble, pueden ser extraídas con solventes orgánicos y se encuentran en las fracciones lipídicas de los tejidos animales. Las vitaminas hidrosolubles incluyen el ácido ascórbico y el complejo B. Se encuentran en el líquido extracelular y se excretan fácilmente por los riñones.

La actividad o potencia de una vitamina se mide mediante tres tipos principales de métodos.

1) Biológicos: En los cuales ratas, ratones, cobayos y pollos sirven como animales de prueba. El objetivo principal es medir la cantidad total de un nutriente presente en una muestra. A veces esto tiene poco significado práctico ya que el animal puede no aprovechar todo el factor debido a una digestibilidad deficiente, etc. Son métodos muy lentos y han sido empleados en forma exclusiva para alguna de las vitaminas.

2) Microbiológicos: Se emplean bacterias que necesitan ciertas vitaminas hidrosolubles para su desarrollo, estos métodos son rápidos, precisos y efectivos.

3) Químicos: Utilizan un color característico o una reacción específica sensible de estos compuestos; se dispone de ellos para la mayoría de las vitaminas presentes en mezclas no complicadas.

## **VITAMINA A**

El retinol, vitamina A o alcohol de la vitamina A se encuentra en forma natural únicamente en algunos alimentos de origen animal: leche, mantequilla, queso o hígado. Es una vitamina soluble en grasa, se encuentra como varios estereoisómeros y está presente en forma esterificada.

El retinol es uno de los carotenoides, muchos de los cuales tienen actividad de vitamina A, pero el retinol en sí y el 3-dihidroretinol son los más activos.

El aceite de hígado contiene aproximadamente 780 unidades de vitamina A y 2 microgramos de colecalfiferol (vitamina D) por ml. El 3-dihidroretinol, está presente en el pescado fresco, usualmente mezclado con retinol y tiene de 30 a 40% de actividad biológica.

El organismo no depende totalmente de una fuente dietética de retinol en sí, ya que puede formarlo a partir de precursores del caroteno, en especial, beta-caroteno.

Es la sustancia más activa y está presente en vegetales verdes y amarillos y es convertido a retinol en el humano. El beta-caroteno de la dieta se convierte en retinol en la pared del intestino delgado, no se conoce la proporción en que se transforma pero suele aceptarse que es alrededor de la tercera parte.

## **FARMACOLOGÍA**

En humanos se requiere una fuente de vitamina A exógena para el crecimiento y el desarrollo de huesos, visión, funciones de la reproducción y la integridad en la superficie de mucosa y epitelio.

En la retina, el retinol es convertido a aldehído, el cis retinal se combina con opsina para formar la rodopsina que es el pigmento visual. La vitamina A ha sido reportada que actúa como un cofactor en varias reacciones bioquímicas incluyendo síntesis de mucopolisacáridos, síntesis de colesterol y metabolismo de hidroxiesteroides.

## **ABSORCIÓN**

En dosis oral que no exceda el requerimiento fisiológico la vitamina A es fácil y completamente absorbida si la absorción de grasas es normal.

La absorción es incompleta, en dosis altas y en pacientes con mala absorción de grasas.

Las formulaciones de retinol o sus ésteres miscibles en agua son absorbidos más fácilmente en el tracto intestinal que las soluciones que están en aceite.

Los ésteres de retinol son hidrolizados en el lumen gastrointestinal por enzimas pancreáticas, el retinol es absorbido y entonces reesterificado, principalmente a retinil palmitato. Los ésteres de ácidos grasos de retinol entran a la circulación por el transporte de quilomicrones del sistema linfático.

Las concentraciones máximas que hay en plasma de ésteres de retinol se encuentran aproximadamente de 4 a 5 horas después de la administración oral de retinol en una solución en aceite, y de 3 a 4 horas después de la administración de una preparación miscible en agua. Las concentraciones normales del retinol en suero están en el intervalo de 300 - 700 mg/ml en adultos y de 200-500 mg/ml en infantes.

## **DISTRIBUCIÓN**

El retinil palmitato y cantidades pequeñas de retinol y retinal son almacenados en el hígado. Cantidades más pequeñas de retinil palmitato son almacenadas en riñón, pulmón, cápsulas adrenales, retina y grasa intraperitoneal. Normalmente el cuerpo almacena vitamina A suficiente para las necesidades de algunos meses. La vitamina A se distribuye en la leche.

La vitamina A no atraviesa fácilmente la placenta, el retinol es liberado desde el hígado unido a una alfa globulina específica, retinol unido a proteína (RBP). Esta liberación depende de varios factores incluyendo la concentración de proteína y de zinc.

El RBP circula como un complejo unido a una prealbumina. Las concentraciones de RBP pueden disminuir en personas con mala nutrición proteica.

Las concentraciones de retinol no son un buen indicador de la concentración de vitamina A en el estado nutricional, ya que las concentraciones en suero dependen de la concentración de RBP y no reflejan el almacenamiento en el hígado hasta que la cantidad almacenada es severamente disminuida. Después de la ingestión de una dieta deficiente en vitamina A las concentraciones normales en suero son mantenidas hasta que las almacenadas en el hígado son agotadas.

En pacientes con deficiencia de vitamina A, la administración de esta vitamina da como resultado un aumento de las concentraciones en las retinas, seguida de la acumulación de la vitamina en el hígado; las concentraciones en suero permanecen normales hasta que el hígado se satura. Los pacientes con glomerulonefritis o nefrosis lipóide pueden tener altas concentraciones de Vitamina A en el suero debido a la RBP o almacenajes anormales. Si son administradas grandes dosis de Vitamina A después de la saturación de los sitios de almacenaje, la capacidad de unión del RBP puede excederse y desunir el retinol que es llevado por lipoproteínas, que pueden entrar a la circulación. Este desenlace del retinol puede ser responsable de algunos de los efectos tóxicos sobre las membranas celulares que resultan de la hipervitaminosis A.

## **ELIMINACIÓN**

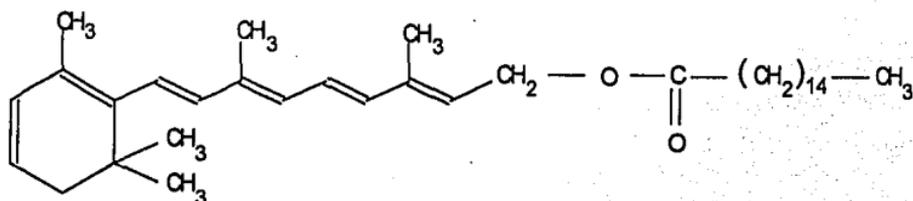
El retinol se conjuga con el ácido glucorónico, el beta-glucorónico sufre circulación enterohepática y a la vez oxidación hasta retinal y ácido retinóico. El ácido retinóico sufre descarboxilación y conjugación con el ácido glucorónico y es excretado en heces vía eliminación biliar. El retinal, el ácido retinóico y otros metabolitos solubles en agua, son excretados en orina y heces. Normalmente el retinol inalterado es excretado en orina.

## MONOGRAFÍA DE PALMITATO DE VITAMINA A

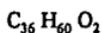
Nombre químico:

3,7-Dimetil-9-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-2,4,6,8- nonatetraen-1-ol, palmitato.

Fórmula desarrollada:



Fórmula condensada:



Peso molecular:

524.86

Origen:

Es un éster, mezcla de ésteres de retinol (usualmente acetato, propionato o palmitato) en un aceite vegetal adecuado.

Descripción:

Forma cristalina o amorfa, puede estar diluida en aceites.

La forma líquida es un aceite de color que varía del amarillo claro o rojizo y puede solidificarse bajo refrigeración, puede ser casi inodora o con ligero olor a pescado, pero no debe tener olor ni sabor a rancio. Es inestable cuando se expone al aire y a la luz.

**Solubilidad:**

Insoluble en agua o glicerol, soluble en alcohol absoluto, metanol, cloroformo, éter, éter de petróleo, grasas y aceites.

**Ensayos de identidad:**

A) Agregar a 1 ml de la muestra en cloroformo, que contenga aproximadamente, el equivalente a 6 microgramos de retinol, 10 ml de SR de tricloruro de antimonio; la solución toma rápidamente un color azul, que desaparece enseguida.

B) Cromatografía en capa delgada.

Soporte: Gel de sílice de 0.25 mm de espesor.

Fase móvil: mezcla de ciclohexano-éter (4:1). Forrar la cámara cromatográfica con papel filtro humedecido con la fase móvil.

Solución de referencia: Disolver con cloroformo en un matraz volumétrico de 25 ml de capacidad el contenido de una cápsula de estándar de referencia de vitamina A.

Solución de la muestra: Si es la forma líquida disolver un volumen representando aproximadamente a 15000 unidades, en cloroformo para obtener un volumen de 10 ml.

Si la muestra es sólida pesar la cantidad aproximada equivalente a 15000 unidades y depositarla en un embudo de separación, agregar 75 ml de agua destilada, agitar fuertemente 1 minuto, extraer con 10 ml de cloroformo, agitar 1 minuto fuertemente y centrifugar hasta clarificación del extracto clorofórmico.

Solución reveladora: SR de ácido fosfomolibdico.

Procedimiento: Aplicar por separado, en el punto de partida de la cromatoplaça, 15 microlitros de la solución de referencia y 10 microlitros de la solución de la muestra. Desarrollar el cromatograma en la fase móvil hasta una distancia de 10 cm del punto de aplicación, dejar secar al aire y rociar con la solución reveladora.

La mancha verde-azul que aparece es indicativa de la presencia de retinol. Los valores  $R_f$  aproximados a las manchas predominantes y correspondientes a las diferentes formas de retinol son: (forma alcohólica) 0.1; (acetato) 0.45 y (palmitato) 0.70.

C) El espectro de absorción en el rango de 300 a 400 nm exhibe inflexión cerca de 332 nm y máximos a 348, 367 y 389 nm.

La  $E(1\%, 1\text{ cm}) = 975$ .

Valor de acidez:

No más de 2.0

Valor de peróxido:

No se debe consumir más de 1.4 ml de solución 0.01 N de tiosulfato de sodio.

Relación de absorbancias:

La relación de la absorbancia corregida ( $A_{325}$ ) y de la observada  $A_{325}$ , determinada como se indica en la valoración de vitamina A, es de no menos de 0.85.

Rango de Fusión:

28°C - 29°C

Valoración:

Adicionar a la muestra 30 ml de alcohol, seguido de 3 ml de solución de hidróxido de potasio (9:10), reflujar durante 30 minutos, adicionar 30 ml de agua, transferir a un embudo de separación, adicionar 4 gramos de sulfato de sodio decahidratado, extraer con 150 ml de éter por 2 minutos, y si se forma una emulsión, continuar la extracción utilizando 3 porciones más de éter de 25 ml cada una, lavar los extractos reunidos con agua. Transferir el extracto a un matraz volumétrico de 250 ml, tomar una alícuota y hacer las diluciones necesarias hasta obtener una solución cuya concentración estimada sea de 3 a 5 microgramos de vitamina A por ml. Hacer la última dilución usando como disolvente alcohol isopropílico. Determinar la absorbancia de la solución a 310, 325 y 334 nm.

Porción hidrogenada:

Después de hidrogenar una alícuota de la solución obtenida para la valoración, no aparece un color azul al adicionar SR de tricloruro de antimonio. De la porción hidrogenada hacer una dilución en alcohol isopropílico cuya concentración estimada de vitamina A sea de 3 a 5 microgramos por ml. Determinar las absorbancias de la solución a 310, 325 y 334 nm.

Cálculos:

Calcular el contenido de vitamina A de la siguiente manera:

$$\text{mg vitamina A} = 0.549 \text{ A}_{325}/\text{LC}$$

Donde:

A<sub>325</sub> = Absorbancia obtenida a 325 nm.

L = Longitud de celda.

C = Cantidad de muestra en gramos en 100 ml de la solución de alcohol isopropílico.

Esta fórmula se utiliza si el valor de A<sub>325</sub> es no menor que (A<sub>325</sub>)/1.030 y no mayor que (A<sub>325</sub>)/0.970. Donde (A<sub>325</sub>) es la absorbancia corregida a 325 nm y esta dada por la siguiente expresión:

$$(A_{325}) = 6.815 A_{325} - 2.555 A_{310} - 4.260 A_{334}$$

En donde A es el valor de las absorbancias a las diferentes longitudes de onda dadas por los subíndices.

Si (A<sub>325</sub>) tiene un valor menor que A<sub>325</sub>/1.030 se deberá aplicar la siguiente fórmula para calcular contenido de vitamina A:

$$\text{mg vitamina A} = 0.549 (A_{325})/\text{LC}$$

### Empaque y Almacenamiento:

Conservar en contenedores herméticamente cerrados, de preferencia bajo atmósfera de nitrógeno y protegidos de la luz.

### Marbete:

Debe indicar la forma de la vitamina, conservador (si lo tiene), así como los dispersantes, antioxidantes o cualquier otra sustancia que haya sido agregada. Indicar la actividad de la vitamina A equivalente a la cantidad de retinol en mg por gramo y en unidad de vitamina A.

Una unidad internacional (U.I.) de vitamina A es la actividad biológica específica de 0.3 mcg de todos los isómeros trans de retinol.

### Toxicología:

El cuadro de intoxicación por vitamina A no es frecuente. La cantidad de vitamina A requerida para producir hipervitaminosis varía considerablemente. La administración crónica de vitamina A 4000 U/kg diariamente por 6-15 meses en adultos, o 18500 U/kg de vitamina A miscible en agua diariamente por 1-3 meses en infantes ha resultado en hipervitaminosis.

La toxicidad en grandes dosis de vitamina A es más común en niños que en adultos, en pocas horas después de la administración de una dosis de aproximadamente de 25000 U/kg se presenta irritabilidad, vértigo, delirio, coma, vómito y diarrea, aumento de presión intracraneana, dolor de cabeza, disturbios visuales, hepatomegalia y esplenomegalia, anorexia, pérdida del cabello, piel seca, evidencia roentgenográfica de elevación del periostio de los huesos largos, niveles altos de vitamina A en suero, aumento de los lípidos séricos, anemia hipoplásica, leucopenia, dedos en palillo de tambor y desarrollo esquelético prematuro.

### Categoría Terapéutica:

Vitamina Antixeroftálmica.

### Usos:

En deficiencias de vitamina A y como profiláctico durante los periodos de requerimientos mayores como durante la infancia, en el embarazo y la lactancia. También se puede requerir complementos en los pacientes con obstrucción de las vías biliares, cirrosis hepática, cuando existe xerofalmia, nictalopia, en ciertas hiperqueratosis de la piel y cuando se tiene poca resistencias a las infecciones.

### Contraindicaciones:

Hipervitaminosis A y en pacientes hipersensibles a la vitamina A.

### Dosis:

Por vía oral: adultos, deficiencia grave 100000 U.I. diarias por tres días, seguidas de 50000 unidades diarias por dos semanas. Mantenimiento 10000-20000 U.I. diarias por dos meses.

Intramuscular: 100000 U.I. diarias durante tres días, seguidas de 50000 U.I. diarias por dos semanas.

Niños (1 a 8 años): 5000-17500 unidades internacionales diarias por diez días.

Lactantes: 5000-10000 U.I. diarias por diez días.

## CAPITULO 3

### CROMATOGRAFIA

Las formulaciones farmacéuticas modernas son mezclas complejas que incluyen, además de uno o dos principios activos, materiales inertes tales como diluyentes, desintegrantes, colorantes y saborizantes. Con el fin de asegurar la calidad y la estabilidad del producto final, se debe buscar un método para separar el fármaco de estas sustancias.

Entre las técnicas más utilizadas para la resolución de estas mezclas existe un grupo de métodos altamente eficientes llamados colectivamente cromatografía.

La cromatografía comprende un grupo de métodos para separar mezclas moleculares que dependen de las afinidades diferenciales de los solutos entre dos fases: una estacionaria y una móvil.

Los métodos cromatográficos pueden ser clasificados de acuerdo con la naturaleza de las fases estacionaria y móvil, si la fase estacionaria es un sólido, se llama cromatografía de absorción, y si la fase estacionaria es un líquido se llama cromatografía de partición.

En la cromatografía de absorción, la fase móvil que contiene el soluto disuelto pasa sobre la superficie de la fase estacionaria. La retención de los componentes y su consecuente separación depende de la capacidad de los átomos que hay en la superficie de la fase estacionaria para extraer los solutos de la fase móvil y adsorberlos temporalmente por medio de fuerzas electrostáticas.

Si la fase móvil es un líquido, el proceso se llama cromatografía líquido-sólido (CLS) pero cuando la fase móvil es un gas se llama cromatografía gas-sólido (CGS).

En la cromatografía de partición, un material sólido inerte, tal como el gel de sílice o la tierra de diatomeas sirve para apoyar una capa delgada de líquido que es la fase estacionaria efectiva. A medida que la fase móvil que contiene el soluto pasa sobre esta fase líquida, hay retención y separación debido a la solubilidad relativa de los componentes en los dos líquidos según lo determinan sus coeficientes de partición. Si la fase móvil es un líquido este tipo de cromatografía se denomina líquido-líquido (CLL) y si la fase móvil es un gas el proceso se llama cromatografía gas-líquido (CGL).

La cromatografía líquido-líquido se puede llevar a cabo de dos maneras de acuerdo a las características de las fases.

A) Cromatografía en fase normal, donde la fase estacionaria es un líquido polar (agua); mientras que la fase móvil es relativamente no polar (hexano, benceno, cloroformo) este sistema es usado para separar compuestos polares que son distribuidos preferentemente en la fase estacionaria polar.

B) Cromatografía en fase inversa, la fase estacionaria es no polar (hidrocarburos) y la fase móvil es polar (agua, metanol, acetonitrilo).

Existen otras dos formas de cromatografía en las cuales la fase estacionaria es un sólido. Se clasifican independientemente de la CLS y la CGS debido a la exclusiva naturaleza de los procesos de separación. Son la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía por exclusión.

En la cromatografía de intercambio iónico, la fase estacionaria consta de una matriz polimérica sobre cuya superficie se han unido químicamente grupos funcionales de tipo iónico.

El intercambio iónico consiste en el intercambio reversible del ión presente en la solución con un ión del polímero resinoso, celulosa modificada o soporte de gel de sílice. Este intercambio se aprecia en los siguientes ejemplos de una resina catiónica y una aniónica:



La separación por intercambio iónico se basa en la competencia entre la fase móvil y la muestra iónica por los sitios o grupos activos de una resina intercambiadora de iones.

Este tipo de separación se aplica a compuestos de un intervalo de pesos moleculares muy amplio, ejemplos característicos son los péptidos y aminoácidos.

En la cromatografía líquida por exclusión, o cromatografía de permeación o de filtración, la fase estacionaria es una sustancia polimérica que contiene numerosos poros de dimensiones moleculares bien definidas. Los solutos cuyo tamaño molecular es suficientemente pequeño dejan

la fase móvil para difundir dentro de los poros. Las moléculas más grandes que no penetran en estos poros quedan en la fase móvil y no son retenidas.

Este método es muy adecuado para separar mezclas en las cuales los solutos varían considerablemente de tamaño molecular. La fase móvil en la cromatografía de exclusión puede ser líquida o gaseosa.

El intervalo de pesos moleculares en que se puede trabajar por cromatografía de exclusión varía desde aproximadamente quinientos hasta varios millones.

## DESARROLLO HISTÓRICO

En 1905, Ramsey utilizó por primera vez técnicas cromatográficas para separar mezclas de gases y vapores. Al año siguiente el botánico ruso Tsweet empleó la cromatografía de elución en un experimento que tenía por objeto la separación de la clorofila de extractos vegetales.

En una columna de vidrio rellena de carbonato de calcio introdujó el extracto vegetal disuelto en éter de petróleo, a medida que el éter pasaba a través de la columna, se separaban bandas de diferentes colores que correspondían a los carotenos, las clorofilas y las xantofilas.

La cromatografía permaneció ignorada durante muchos años hasta que en 1941, Martin & Synge en busca de una solución introdujeron la cromatografía de reparto. Esta técnica evolucionó con rapidez, llegando a ser lo que ahora se conoce como cromatografía en papel y una versión limitada de cromatografía líquido-líquido en columna.

En 1952 Martin & James introdujeron la cromatografía de gases la cual se ha convertido en una de las técnicas más útiles para análisis de gases y compuestos orgánicos volátiles.

A pesar de que el primer experimento sobre cromatografía fue una forma de cromatografía líquida, no fue hasta 1968 cuando se presentó un avance importante y se debió a la introducción de altas presiones de operación y de sistemas de detección continua.

## **CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA**

La cromatografía en capa delgada (CCD) es un método de análisis en el cual la fase estacionaria es un sólido finamente dividido que se esparce en forma de capa delgada sobre una placa rígida o soporte y la fase móvil es un líquido que migra a través de la superficie plana, la fase móvil sube por la placa por efecto capilar.

La cromatografía en capa delgada se basa en el fenómeno de adsorción, aunque se sabe que no se pueden separar los fenómenos de adsorción y partición de una forma absoluta.

Existen una gran variedad de adsorbentes para usarse en CCD, sin embargo de una forma general se usan gel de sílice G y la alúmina neutra de tipo G. Estos adsorbentes no son la solución a todos los problemas, sin embargo proporcionan una buena base para la resolución.

Cada adsorbente tiene limitaciones, de acuerdo al compuesto por identificar por ejemplo, para compuestos muy polares existe el gel de sílice H (menor actividad que la G) o bien la H silanizada, las cuales son aplicables a casi todos los compuestos orgánicos.

Es conveniente usar un disolvente puro o bien mezcla de dos, tres, cuatro y quizás más para encontrar la mejor resolución posible y esto se puede hacer si se trabaja con la polaridad de los compuestos. En relación con los disolventes, se sabe que un compuesto no polar podrá ser transportado con un disolvente que tenga afinidad por él, es decir, que su polaridad sea semejante.

En el caso de que se tenga una mezcla, la polaridad no depende de un solo compuesto y se debe buscar un sistema de disolventes iniciando con los menos polares, para ir aumentando la polaridad lentamente. Siempre es más fácil trabajar con sistemas sencillos (dos disolventes), que con los más complejos.

Después de llegar a la adecuada resolución de una mezcla el siguiente paso es la identificación de los compuestos de una forma cualitativa, para la identificación de los compuestos no visibles es necesario, primero localizarlos en la placa y para esto se utiliza algunos de los siguientes métodos:

Irradiación con luz UV, vapores de yodo, en algunos casos se puede usar agua y también se puede usar reactivos como el ácido sulfúrico que se usa de una forma generalizada, (se llama reactivo universal), o una combinación de ácido sulfúrico con algún otro reactivo como puede ser

anisaldehído. En muchas ocasiones esto no es suficiente y en estos casos se debe buscar reactivos específicos según el tipo de compuesto o grupo funcional que contenga.

Una vez detectado el compuesto se puede conocer el valor de Rf para la identificación usando valores de la literatura o bien un estándar, lo cual es mucho mejor debido a que el valor de Rf varía por factores que influyen directamente como puede ser: temperatura, altitud, calidad del disolvente y saturación de la cámara.

El valor de Rf se determina de la siguiente manera:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por un compuesto desde el origen}}{\text{distancia recorrida por el frente de la fase móvil}}$$

La temperatura y la humedad son dos de los factores más importantes que pueden afectar las separaciones cromatográficas. Los valores del Rf siempre oscilan entre 0 y 1.

Disponiendo de un adsorbente de tamaño de partícula lo suficientemente fino, (25-40 micras), puro y homogéneo es posible elaborar capas de diferente espesor y se llama capa delgada cuando el espesor está entre 0.1 - 0.5 mm o capa preparativa cuando el espesor está entre 0.5 - 2.0 mm. Las placas para CCD poseen la ventaja de proporcionar separaciones más finas, nítidas y de requerir concentraciones más pequeñas de muestras (0.1-1.0 microgramos) que las placas de cromatografía preparativa.

Estas últimas poseen la ventaja de permitir separaciones de cantidades mayores de muestra, pero las separaciones no son tan nítidas. Estas placas se recomiendan cuando se desea efectuar separaciones previas para eliminar impurezas.

## **CROMATOGRAFIA LIQUIDA CLASICA Y CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION.**

Durante muchos años se practicó la cromatografía líquida en una forma que puede llamarse clásica y que consiste básicamente de lo siguiente: una columna de vidrio cuyo diámetro varía entre 2 y 10 cm, rellena de algún material como sílice, alúmina, azúcar, etc, cuyas partículas son por lo general de un tamaño cercano a las 200 micras o más. El disolvente o fase móvil fluye a

través de la columna por efectos de la gravedad produciéndose apenas una leve presión ejercida por el volumen de la fase móvil que se agrega a la columna y se recolecta en la base de la columna en fracciones de determinado volumen.

Uno de los inconvenientes de esta técnica es el largo tiempo de análisis requerido, que muchas veces puede ser de horas e incluso días; otra desventaja es el material de relleno el cual se utiliza por lo general una sola vez debido a que parte de la muestra se adsorbe en forma irreversible.

El problema principal de este tipo de cromatografía es la identificación y cuantificación de los componentes que eluyen de la columna disueltos en la fase móvil. En general se usa alguna técnica auxiliar, por ejemplo espectrofotometría, análisis químico, o simplemente un registro gravimétrico para determinar el contenido de cada uno de los componentes de la mezcla en las fracciones recolectadas.

La cromatografía líquida de alta resolución utiliza instrumental muy distinto con ventajas significativas. Se usan columnas de diámetro muy reducido, de 2 a 4.5 mm, rellenas de materiales especiales, cuyas partículas tienen un tamaño no mayor de 30 a 40 micras y con frecuencia hasta de 5 a 10 micras generalmente con una distribución de tamaños de no mayor de  $\pm 2$  micras. Este tipo de columna es muy eficaz pero ofrece una gran resistencia al flujo de la fase móvil, es decir, una gran caída de presión.

Por esta razón es necesario emplear sistemas de bombeo de alta presión, (hasta 400 atm), que hagan fluir la fase móvil a una velocidad razonable a través de la columna.

La cantidad de fase estacionaria dentro de la columna es pequeña por lo cual se requiere que la muestra también sea pequeña entre 1 y 10 mcg.

Si la presión de entrada a la columna no es muy elevada, (100 atm o menos), la muestra se introduce en la cámara de inyección mediante una jeringa de alta presión; a presiones más elevadas, se utilizan las valvulas de inyección.

## **VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LA CROMATOGRAFIA DE ALTA RESOLUCION.**

### **Ventajas:**

- \* Velocidad de análisis.
- \* Alta resolución.
- \* Resultados cuantitativos.
- \* Buena sensibilidad.
- \* Automatización.
- \* Amplio espectro de aplicaciones.

### **Limitaciones:**

- \* Instrumentación costosa.
- \* No existe detector universal y sensible.
- \* Elevado costo de operación.
- \* Experiencia indispensable.

Con esta técnica es usual obtener separaciones en el término de minutos. Para ello se requiere de columnas de alta eficiencia y sistemas de bombeo de alta presión, ya que separaciones rápidas requieren flujos elevados de fase móvil y esto a su vez requiere presiones elevadas.

Una de las ventajas principales es la alta resolución que es posible obtener y que permite separar mezclas muy complejas; tal es el caso de determinaciones en algunos fluidos biológicos como la orina, en la cual mediante la cromatografía líquida de alta resolución se han podido detectar hasta 200 compuestos diferentes. Las muestras naturales son difíciles de manejar, pero empleando cromatografía de intercambio iónico y programación de fase móvil la resolución es notable.

Los métodos de cromatografía líquida de alta resolución proporcionan también muy buena información de tipo cuantitativo, siendo posible efectuar con facilidad un análisis cuya precisión suele ser mejor del 1 %.

La cromatografía de alta resolución es aplicable a sustancias que por otra técnica resulta difícil o imposible, por ejemplo:

- A) Compuestos iónicos, como aminoácidos, sales inorgánicas, ácidos orgánicos, etc.

B) Compuestos de alto peso molecular, como polímeros, hidrocarburos polinucleares, productos naturales, etc.

C) Compuestos termolábiles y no volátiles, como vitaminas, pesticidas, plastificantes y muestras de peso molecular tan bajo como 18 o tan alto como varios millones.

## **INSTRUMENTAL**

En todo tipo de instrumental y no solamente en cromatógrafos de líquidos, hay ciertas características de índole general que deben evaluarse al considerar un aparato determinado ya sea con fines de adquisición o de formarse una idea sobre la utilidad que puede prestar. Dichas características son :

### **A) Versatilidad.**

El instrumento debe de ser adecuado para resolver y trabajar con muestras de diferente tipo y realizar el máximo de operaciones. El instrumento debe estar equipado con los siguientes aditamentos:

- \* Sistema de operación de alta presión.
- \* Diversos detectores.
- \* Sistema para recolectar fracciones a la salida de la columna.
- \* Programadores de fase móvil o disolvente (también llamados generadores de gradiente).
- \* Controles de temperatura para la columna y el detector.
- \* Controles de flujo.

### **B) Rapidez.**

Para obtener rapidez en el análisis es necesario contar con materiales de relleno de columnas de alta eficiencia y que el instrumento posea sistemas de bombeo de alta presión para la fase móvil.

### **C) Reproducibilidad y Estabilidad.**

Son características esenciales si se quiere obtener del instrumento un funcionamiento efectivo a largo plazo. El instrumento debe de proveer un control adecuado sobre los parámetros de operación tales como el flujo de la fase móvil.

Para ello debe estar provisto de controles de temperatura y flujo, sistemas de bombeo de alta presión, programadores de fase móvil, detectores, etc.

#### D) Sensibilidad.

Un buen instrumento, además de trabajar con pequeñas cantidades de muestra, debe generar señales de intensidad apreciables. La sensibilidad de todo cromatógrafo de líquidos depende sobre todo del sistema de detección que utiliza.

Aunque la fase móvil no es parte del instrumental propiamente dicho, el control de la presión, el flujo y la composición de la misma son muy importantes.

### **CARACTERISTICAS QUE DEBE PRESENTAR LA FASE MOVIL**

- \* Disolver la muestra .
- \* No degradar o disolver la fase estacionaria.
- \* Tener baja viscosidad.
- \* Ser compatible con el tipo de detector utilizado.
- \* Tener la polaridad adecuada para permitir una retención conveniente de la muestra en la columna.
- \* Un valor de  $K'$  entre 2 y 10.

Es esencial que la muestra sea soluble en la fase móvil para que pueda ser transportada a través de la columna. Cuando se introducen muestras en solución puede ocurrir precipitación dentro de la cámara de inyección o en la columna si el disolvente de la muestra y la fase móvil son muy diferentes en polaridad. Esto causaría pérdida de resolución en la separación, por lo tanto ambos se deben seleccionar con cuidado.

Quando se lleva acabo una cromatografía líquido-líquido la fase móvil puede llegar a disolver la fase estacionaria. Para evitar esto se satura la fase móvil con la fase estacionaria, ya sea con anterioridad a su introducción o mediante el uso de una precolumna, que consiste en una sección corta de tubo, relleno de algún soporte sólido poroso, de los utilizados en cromatografía de gases,

que contiene un alto porcentaje de fase estacionaria. A través de esta precolumna se hace pasar la fase móvil antes de que entre a la columna y así se evita la pérdida de fase estacionaria.

La baja viscosidad de la fase móvil es muy importante en la eficiencia de la separación, ya que la viscosidad influye en el efecto de transferencia de masa entre la fase móvil y la fase estacionaria.

La fase móvil debe ser compatible con el detector empleado y de alta pureza. Usualmente grado espectroscópico o cromatográfico.

Esto es particularmente importante cuando se desean realizar análisis de alta sensibilidad con detectores como el de luz ultravioleta o el de fluorescencia.

Los disolventes más comúnmente empleados en cromatografía de alta resolución son :

- \* Hexano.
- \* Cloruro de metileno.
- \* Cloroformo
- \* Tetrahidrofurano.
- \* Acetonitrilo.
- \* Isopropanol.
- \* Metanol.
- \* Agua.

Recipientes de almacenamiento de la fase móvil.

Se pueden utilizar recipientes de vidrio, acero inoxidable o plásticos inertes, de una capacidad entre 1 y 3 litros.

Es también recomendable filtrar las fases móviles antes de emplearlas en el cromatógrafo, pasándolas a través de un filtro metálico o de cerámica de por lo menos 2 micras de porosidad.

Muchas veces, en especial cuando se trabaja con fases móviles polares, hay una marcada tendencia del oxígeno y otros gases a disolverse en el líquido. Si el líquido se gasifica dentro del instrumento y forma burbujas pueden afectar seriamente el funcionamiento del detector y la eficiencia de la columna por este motivo, es necesario remover de la fase móvil los gases disueltos.

## BOMBAS

La principal función del sistema de bombeo es proveer de fase móvil a la columna con un flujo constante y reproducible.

Las columnas utilizadas en CLAR están rellenas de partículas muy pequeñas que presentan cierta resistencia al flujo de la fase móvil por lo tanto se requiere de un sistema de bombeo que haga fluir la fase móvil a un flujo razonable.

Los requisitos más importantes de un sistema de bombeo son:

- A) El sistema debe ser hecho de materiales químicamente resistentes a la fase móvil.
- B) Alcanzar presiones de operación máximas (usualmente hasta 400 atm = 6000 psi).
- C) Un amplio intervalo en el volúmen de flujo (entre 0.5-10 ml).
- D) Reproducibilidad y constancia del flujo.
- E) Facilidad para el cambio de fases móviles.
- F) Características de flujo libre de pulsaciones o tener un regulador de pulsaciones.
- G) Facilidad de limpieza del sistema.

De acuerdo con las características de funcionamiento y diseño se puede considerar la siguiente clasificación :



## **BOMBAS MECANICAS**

**Bombas Recíprocas.-** Son bombas de un solo pistón que desplazan flujos de volúmen constante en forma no continua o pulsante. La máxima presión que se puede alcanzar varía según el diseño, pero en general es de aproximadamente 600 atm, (8000 psi).

Su operación es mediante el movimiento de un pistón o diafragma que llena y descarga una pequeña cámara a través de una válvula control que alternadamente se abre y se cierra. El volúmen

que envía la bomba en cada pulso se ajusta controlando la distancia del recorrido del pistón o diafragma. El flujo se ajusta variando el número de veces del desplazamiento por unidad de tiempo.

### **Ventajas.**

- \* Depósito de disolvente ilimitado.
- \* Rapidez del cambio de fase móvil.
- \* Volúmen de flujo constante.
- \* Facilidad de limpieza.

### **Desventajas.**

\* El flujo es en pulsaciones, por lo que hay pérdida en la eficacia de la columna e inestabilidad del detector.

Las alternativas que se utilizan para eliminar el exceso de las pulsaciones son :

A) Colocando un serpentín largo (15 metros) entre la bomba y la cámara de inyección, para absorber las pulsaciones producidas por la bomba.

B) El uso de un manómetro de presión con un gran tubo de Bourdon, (normalmente intercalado, para evitar retención del líquido), que también se flexiona con cada pulso.

C) La manera más eficaz es utilizando bombas de doble pistón donde existen dos pistones gobernados por un mismo motor a través de un eje excéntrico. Este mecanismo permite que un

pistón succione mientras que el otro expulsa el líquido fuera de la bomba. Por lo tanto los perfiles de flujo se superponen el uno al otro reduciéndose apreciablemente las pulsaciones.

**Bombas de Desplazamiento Continuo (jeringas).**- Son aquellas en las que un émbolo o pistón se desplaza en forma continua y uniforme por un motor de precisión, comprimiendo el líquido contenido en una cámara de cierto volumen, el líquido fluye luego a través de una abertura en la misma cámara y se obtiene así un flujo de volumen constante que puede variar según se desplace el émbolo a mayor o menor velocidad.

#### Ventajas.

- \* El flujo proporcionado es uniforme y continuo.
- \* Se alcanzan altas presiones de operación.
- \* Son de bajo mantenimiento.

#### Desventajas.

- \* Limitada capacidad del depósito (250-500 ml) y para llenar la cámara es necesario suspender su operación.
- \* A altas presiones hay ligeros cambios en el flujo al comprimirse el disolvente (4% a 408 atm = 6000 psi).
- \* Son de alto costo.

### **BOMBAS NEUMATICAS**

Este sistema emplea un cilindro de gas conectado directamente a través de un regulador, al depósito de la fase móvil. La presión del gas impulsa el líquido a través del aparato. La máxima presión de trabajo está limitada por la presión del gas y el material de fabricación del sistema.

#### Ventajas.

- \* Flujos de presión constantes y libre de pulsaciones.
- \* Son de bajo costo.
- \* Bajo mantenimiento (no hay juntas ni válvulas).

## **Desventajas.**

- \* Baja capacidad de volúmen del depósito.
- \* El cambio de un disolvente a otro es lento.
- \* La presión máxima de trabajo se limita por el depósito de gas (200 atm = 3000 psi).
- \* Difusión del gas en el líquido.

Esta última desventaja se puede resolver utilizando un serpentín largo que hace que la superficie de la interfase gas-líquido disminuya bastante y la mayor parte de la fase móvil se usa antes de que llegue al detector la porción que contiene al gas. También se logra desechando las últimas porciones del líquido que han sido saturadas por el gas.

Algunos diseños tienen sistemas amplificadores de presión que pueden producir 400 atm = 6000 psi, utilizando bajas presiones del gas. En estos sistemas se utiliza un pistón de gran diámetro para el gas que transmite su movimiento a otro de pequeño diámetro para el líquido. Así se obtiene que la presión en el líquido es proporcional al cociente del área de la sección de ambos pistones, proporcionando gran presión al líquido. Sin embargo el diseño es caro, complejo y de alto mantenimiento.

## **VALVULAS INYECTORAS.**

Esta parte del instrumento exige cuidadoso diseño puesto que debe resistir altas presiones, tener un volúmen pequeño y sus cavidades deben ser bien barridas por la fase móvil.

Hasta hace relativamente poco tiempo, la introducción de la muestra se efectuaba mediante una jeringa de pequeña capacidad con la cual se inyecta la muestra dentro de una cámara, que es posteriormente diluida y arrastrada por la fase móvil.

El instrumento moderno emplea en general válvulas inyectoras. La muestra se introduce en la válvula mediante una jeringa, que desplaza el líquido y llena el espacio interno de una pequeña porción del tubo capilar de acero, (usualmente el volúmen contenido en el tubo es de 10 a 50 mc). La muestra se inyecta en la columna accionando la válvula de forma tal que la disposición de entrada y salida se invierte.

De esta forma se logra inyectar a cualquier presión un intervalo muy amplio de tamaños de muestra, (no es necesario llenar todo el volumen del tubo con la muestra), con un alto grado de reproducibilidad.

Las válvulas inyectoras se fabrican solo de materiales inertes, como el teflón y el acero inoxidable y su diseño es tal que resisten presiones muy elevadas.

## **PROGRAMADORES DE FASE MOVIL.**

Por medio de este equipo es posible cambiar la composición de la fase móvil conforme transcurre el análisis. Por lo general, se utilizan dos disolventes de diferente polaridad y se varia el porcentaje del disolvente más polar en la mezcla binaria.

Las ventajas de trabajar con gradiente son : análisis más rápidos; mejores separaciones; mayor simetría en los picos y mejor estabilidad.

La elución isocrática, (composición constante de la fase móvil), toma mucho tiempo y la forma de las señales no es muy buena; en contraste la separación por gradientes es rápida y las señales son simétricas.

El programador de fase móvil es un dispositivo muy complejo que puede resultar tan costoso como el instrumento mismo. Básicamente hay programadores de dos clases:

1) Programadores que efectúan el mezclado en una cámara para que posteriormente el líquido pase a la bomba, la que envía la mezcla a la columna. Este tipo de programador es muy sencillo y barato y no requiere equipo especial alguno, si bien presenta ciertas limitaciones pues solo se pueden efectuar fácilmente programaciones exponenciales.

2) Programadores de mezclado en corriente. Requieren dos bombas que por lo común son del tipo de desplazamiento continuo y desplazan cantidades determinadas de cada líquido lo que permite generar cualquier forma de gradiente. Estos programadores son mucho más versátiles, pero más costosos.

## **REGISTRADORES.**

Su función es representar en un registro gráfico la señal originada por el detector. Generalmente se utiliza registradores potenciométricos de 1 ó 10 milivolts. Las características deseables de los registradores son : respuesta rápida de la pluma y velocidad variable del papel.

## **CONTROLES DE TEMPERATURA.**

En muchos casos el control de temperatura que requiere la columna no necesita ser superior  $\pm 2$  °C; sin embargo, para trabajos de más precisión o cuando se realiza cromatografía de intercambio iónico o de permeación es necesario un control más refinado. La mayoría de los análisis se llevan a cabo a temperatura ambiente, y es por esto que muchos instrumentos carecen de dispositivos de control de temperatura. Para trabajar a temperaturas superiores a la del medio ambiente, se utilizan baños de agua o de otro líquido con regulación de temperatura, o bien hornos de tipo eléctrico.

## **MEDICION DE FLUJOS.**

En cromatografía líquida existen diversas técnicas por medio de las cuales es posible medir el flujo a través de la columna.

1) Métodos gravimétrico o volumétrico. Consiste en pesar o medir el volúmen de la fase móvil recolectada durante un cierto lapso de tiempo. Estos métodos son sencillos y exactos pero no son muy rápidos y además no hay lectura continua.

2) Medidores de flujo. Consisten en un pequeño tubo de vidrio de sección cónica, en cuyo interior una esfera metálica flota dentro del líquido por efecto de la fricción que produce el paso de este dentro de dicho tubo. La altura a la que se mantiene la esfera da una indicación del flujo obtenido. Este dispositivo no es muy popular, pues no es muy exacto y además requiere calibración.

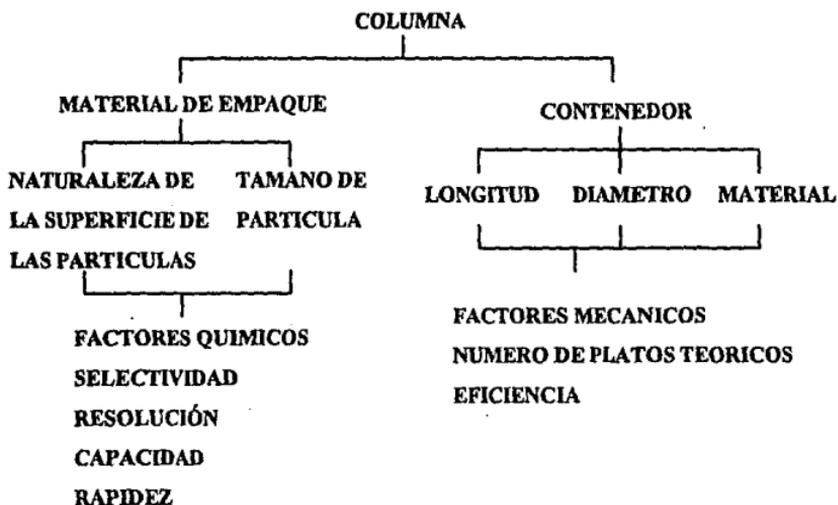
3) Medidor de burbuja. Que consta de un tubo de vidrio de volúmen conocido a través del cual fluye la fase móvil. La forma como se mide el flujo es introduciendo una burbuja y midiendo el tiempo de recorrido a través del tubo. Este método es muy rápido, exacto y preciso y no requiere calibración.

## COLUMNAS.

En todo sistema cromatográfico, ya sea en fase líquida o gaseosa, la columna es el corazón del sistema puesto que en ella se lleva efecto la separación de los componentes de la mezcla en estudio.

Elección de una columna para cromatografía de líquidos.

Una columna está compuesta de dos partes: el material de empaque y el contenedor que generalmente es de acero inoxidable pero también puede ser de plástico. Como se muestra en la siguiente figura, ambos contribuyen al buen funcionamiento y separación de la muestra.



Características Generales.

Básicamente la columna consiste en un segmento de tubo de algún material inerte de diámetro uniforme y capaz de resistir altas presiones. En algunos casos se ha empleado vidrio de pared

grosa, pero tiene el inconveniente de no permitir conexiones metal-vidrio herméticas que resistan altas presiones.

La longitud de la columna es por lo general entre 10 y 50 cm aunque en ocasiones puede ser bastante más larga, en especial en el caso de la cromatografía de permeación donde es práctica usual el empleo de varias columnas conectadas una detrás de otra. El diámetro interno en la mayoría es alrededor de 3 - 4 mm pero en las columnas de tipo preparativo puede ser de más de 1 cm.

La capacidad de la columna depende de su longitud, diámetro y material de relleno. En general las columnas muy eficaces son de diámetro pequeño (3 mm) efectúan análisis muy rápidos; su capacidad en cambio es muy limitada y la muestra debe ser de tamaño muy reducido, lo que exige un detector muy sensible.

Respecto a la forma o geometría de la columna, se prefieren las rectas sobre todo porque hay cierta pérdida de eficiencia cuando se doblan las columnas.

Cuando sea necesario usar columnas muy largas, se pueden utilizar columnas rectas conectadas entre sí o bien columnas enrolladas o de forma en U, L, S, u 8, estas últimas configuraciones facilitan el control de temperatura.

Los avances en la tecnología de columnas pueden resumirse como siguen:

- \* Elaboración de partículas del material de empaque de tamaño muy reducido (5 micras).
- \* Uniformidad de tamaños de las partículas.
- \* Refinamiento en el proceso de relleno de la columna.
- \* Procesos químicos muy eficientes en la preparación de materiales de fase estacionaria químicamente unida.

Aunque no forman parte de la columna como tal, las conexiones entre columna así como entre columna, detector o el inyector deben ser herméticas y de tamaño pequeño.

En los extremos de la columna se coloca un disco de metal o teflón poroso para evitar que el relleno de la columna se afloje o se pierda y se produzcan caídas de presión muy grandes.

Actualmente las columnas de CLAR se han desarrollado en un alto grado de eficiencia (10000 platos teóricos por metro de columna).

## DEFINICIONES.

El lenguaje comunmente empleado en CLAR utiliza términos y símbolos característicos de esta técnica instrumental.

### 1) Tiempo de retención ( $T_r$ ).

Es el tiempo que la muestra permanece dentro de la columna y se mide desde el momento en que la muestra se introduce en el sistema hasta el momento en que se obtiene el punto máximo del pico. Por lo general se emplea como medida de tipo cualitativo y se expresa en minutos.

### 2) Tiempo muerto ( $T_o$ ).

Es el tiempo requerido para eluir una muestra no retenida en la columna y se determina midiendo el tiempo de retención de la fase móvil.

### 3) Tiempo de retención corregido ( $T_r'$ ).

Es el tiempo que la muestra permanece retenida en la fase estacionaria, se obtiene de la diferencia del tiempo de retención y el tiempo muerto:  $T_r' = T_r - T_o$ .

### 4) Ancho de la base del pico ( $W$ ).

Es la porción de la línea base interceptada por las tangentes trazadas en los puntos de inflexión a ambos lados de la señal cromatográfica.

### 5) Número de platos teóricos ( $N$ ).

Un plato teórico es el equilibrio de distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria y se mide de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$N = 16 (T_r/W_b)^2 \quad \text{o} \quad N = 5.45 (T_r/W_h)^2$$

Donde:

$N$  = Número de platos teóricos.

Tr= Tiempo de retención del pico.

Wb= Ancho del pico (se obtiene por extrapolación de tangentes del punto de inflexión a la línea base).

Wh= Ancho del pico tomado a la mitad de la altura.

El número de platos teóricos es una medida de la eficiencia de la columna cuanto mayor sea el valor de N, más eficiente es la columna.

6) Altura equivalente a un plato teórico (AEPT).

Este valor indica la longitud de columna requerida para obtener un equilibrio de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria.

$$H = L / N$$

Donde:

L = Longitud de la columna.

N = Número de platos teóricos.

7) Coeficiente de distribución o reparto (K).

Se representa por :

$$K = \frac{\text{cantidad de muestra} / \text{ml de fase estacionaria}}{\text{cantidad de muestra} / \text{ml de fase móvil}}$$

Es una propiedad física característica de cada muestra y del sistema cromatográfico.

8) Relación de fases ( $\theta$ ).

Indica la relación del volumen del espacio ocupado por la fase estacionaria dentro de la columna.

$$0 = \frac{\text{mililitros de fase móvil}}{\text{mililitros de fase estacionaria}}$$

### 9) Factor de capacidad (K').

Es una medida de la afinidad de un soluto por cualquiera de las fases, e indica el tiempo de retención de un soluto en la columna.

$$K' = \frac{T_r'}{T_o} = \frac{T_r - T_o}{T_o} = \frac{\text{Tiempo de la fase estacionaria}}{\text{Tiempo de la fase móvil}}$$

### 10) Resolución (R).

Es una forma de ver el grado de separación obtenida entre dos compuestos. Se obtiene de la siguiente manera:

$$R = \frac{t}{(0.5) \times (W_a + W_b)} = \frac{2 At}{W_{b_1} + W_{b_2}}$$

Donde:

At = Diferencia de los tiempos de retención.

W<sub>b1</sub>+W<sub>b2</sub> = Ancho de los picos respectivamente.

Un valor de R mayor o igual de 1.5 significa separación completa. Mientras que R = 1 significa que la resolución es aproximadamente del 90%.

### 11) Factor de Selectividad (α).

Este factor describe la posición relativa de dos picos adyacentes. La separación de los picos depende de la interacción selectiva con la fase estacionaria. Calculándose para dos picos A y B del siguiente modo:

$$\alpha = \frac{T_r(B)}{T_r(A)} = \frac{K_B}{K_A}$$

Si α = 1 los dos picos tienen tiempos de retención idénticos, o sea no existe separación.

## **FASE ESTACIONARIA.**

La fase estacionaria puede ser un sólido poroso del tipo de los usados en cromatografía de adsorción, intercambio iónico y exclusión. Las diferentes fases difieren en su composición química, estructura y tamaño de partícula. Una posibilidad es usar una fase estacionaria líquida e impregnar con ella la superficie de las partículas de un sólido que actúa únicamente como soporte. Sin embargo, hoy en día estas columnas son muy poco frecuentes, ya que resulta difícil evitar que la fase estacionaria sea arrastrada por la fase móvil.

Los rellenos más ampliamente utilizados actualmente en cromatografía líquida de partición tienen la fase estacionaria químicamente enlazada a las partículas soporte. Son las denominadas fases enlazadas que poseen alta duración y no requieren acondicionamiento. Las fases enlazadas se preparan por reacción química entre los grupos hidroxilo de la superficie de las partículas de sílice y una molécula orgánica lineal o un organosilano.

Básicamente las fases químicamente enlazadas consisten en una unión covalente de especies orgánicas a una partícula de sílica colocada sobre una superficie cualquiera o una superficie de porosidad controlada. La partícula generalmente consiste ya sea en un lecho de vidrio, (diámetro de partícula 25 a 30 micras), unida a una capa de sílica o a micropartículas porosas de sílica, (diámetro de partícula de 5 a 10 micras).

Las partículas porosas pueden ser de forma esférica o irregular. La fase químicamente enlazada puede consistir en una capa de un polímero o de una sustancia monomolecular.

Las fases enlazadas se pueden dividir en los siguientes grupos:

a) Silano derivados (fases no polares).

Es la fase más comúnmente usada y se prepara al hacer reaccionar el octadecil o fenil silano con las partículas de sílica. Este tipo de fases son las utilizadas en la CLAR de fase reversa.

b) Fases polares.

En este tipo, grupos polares como el éter o nitrilo son unidos a la sílica por medio de una unión -Si-C .

### c) Esteres de la sílica.

En donde cualquier producto con un hidrógeno activo, por ejemplo, alcoholes, nitrilos o polioles se esterifican con la sílica activada. La desventaja de estos es que son fácilmente hidrolizados por el agua o sufren transesterificación con alcoholes.

### DETECTORES.

Un detector ideal sería aquél que satisficiera los siguientes requisitos:

- \* Altamente sensible.
- \* Estable.
- \* Lectura continua.
- \* Respuesta universal.

Sin embargo, en la actualidad no se cuenta con este tipo de detector y los que existen sólo son adecuados para ciertas aplicaciones.

#### Detector de Índice de Refracción.

La detección se basa en equilibrar el sistema con la fase móvil pura y medir el cambio de índice de refracción cuando aparece la muestra eluida junto con la fase móvil, es lógico que cuanto mayor sea la diferencia entre los índices de refracción de la muestra y la fase móvil, mayor será el desequilibrio; la máxima sensibilidad es cuando se alcanzan a detectar diferencias muy pequeñas entre ambos.

#### Desventajas.

En mezclas complejas los índices de refracción de los componentes pueden cubrir un amplio intervalo de valores y algunos de ellos pueden ser tan cercanos a los de la fase móvil que no pueden ser detectados. Existe la necesidad de equilibrar el detector cada vez que se produce un pequeño cambio en la composición de la fase móvil. No se puede trabajar en gradiente.

Existen dos tipos de detectores de índice de refracción ambos requieren del uso de una celda de doble paso, en la cual, el lado que contiene a la muestra se compara con la referencia que no contiene muestra.

### Detectores de Desviación.

Este tipo de detector se basa en la medida del desplazamiento óptico de un rayo de luz, al variar la composición de lado de la muestra en relación con la de referencia. Conforme se eluye la muestra varía el ángulo de refracción, moviéndose el rayo de luz. Esto se traduce como un cambio de la señal que va al detector y lo desequilibra. Esta señal se relaciona con la concentración de la muestra.

#### Ventajas:

- \* Baja sensibilidad frente a partículas sólidas y burbujas de aire.
- \* Intervalos de índice de refracción 1.000 - 1.750

#### Desventajas:

- \* Costoso.
- \* Difícil manejo (no se puede limpiar con facilidad).

### Detectores de Reflexión (Fresnel).

Se fundamenta en el principio de Fresnel según el cual en la interface entre un prisma de vidrio y algún líquido, la cantidad de luz transmitida y reflejada es proporcional al ángulo de incidencia de la luz y al índice de refracción del líquido.

Al entrar la muestra en una celda de luz se refracta con un ángulo diferente, con lo cual a la salida hacia la fotocelda habrá variado su intensidad. El desequilibrio que se genera en el detector provoca un cambio en la energía eléctrica de su señal de salida, dicha señal se relaciona con la concentración de la muestra.

#### Ventajas:

- \* Alta sensibilidad, opera a flujos muy bajos con celdas de poco volumen.
- \* Fácil acceso a la celda.
- \* Bajo costo.

#### Desventajas:

- \* Necesidad de cambiar prismas para adaptarse al índice de refracción de los disolventes.
- \* Ajuste óptico cuando se cambia el disolvente.

#### Detectores Ultravioleta.

Cuando algunos grupos funcionales se exponen a la radiación, experimentan excitación electrónica a causa de la absorción de energía a la longitud específica del grupo funcional. Esta energía provoca el paso de un electrón provocando la desviación de la luz.

Espectro del visible 380-800 nm.

Espectro Ultravioleta 210-380 nm.

La fuente luminosa más usada en los detectores UV posee la mayor parte de su energía en una longitud de onda fija de 254 nm.

#### Ventajas:

- \* Estables.
- \* Sensibles (menor de 1 ng).
- \* Económicos.
- \* Sencillos.

#### Detectores de Fluorescencia.

Utilizados para compuestos que presentan fluorescencia natural, así como para los que pueden convertirse en fluorescentes por derivación. Los detectores difieren en el modo de control a través de monocromador de una longitud de onda, generalmente la de excitación y los más completos ofrecen control por monocromador de ambas longitudes de onda tanto de excitación como de emisión.

#### Detector Electroquímico.

Representa para algunos compuestos mayor selectividad y sensibilidad. Se basa en la oxidación o reducción del compuesto en un electrodo adecuado midiéndose la corriente resultante.

La fase móvil debe ser conductora de la corriente eléctrica estabilizándose con una sal adecuada esto impide trabajar en fase normal. Se trabaja mejor en fase inversa e intercambio iónico. A la fase móvil se le debe eliminar oxígeno, contaminantes metálicos y haluros para reducir la corriente de fondo y por lo tanto el ruido que se deriva de la línea base.

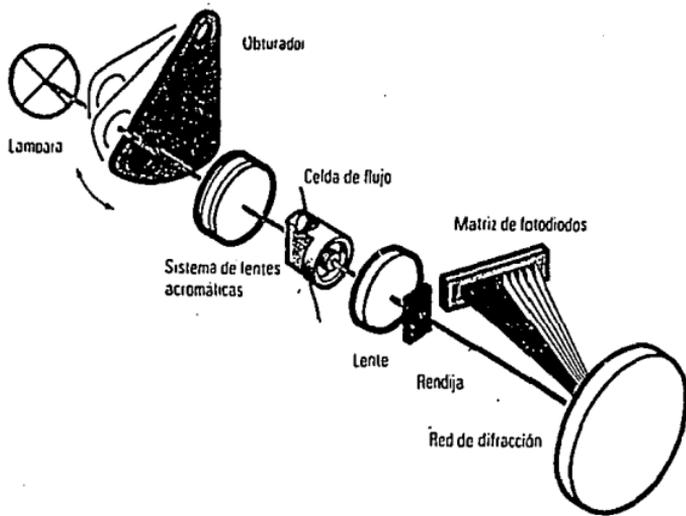
En cuanto a las muestras, deben ser oxidables o reducibles a un potencial que no provoque electrólisis de la fase móvil o los restantes compuestos de la muestra.

#### Detector de Arreglo de Diodos.

Este detector consta de: una lente, una red de difracción fija y una parte móvil, el obturador (que se utiliza para la calibración de las longitudes de onda). Con una celda estándar de alta presión puede utilizar otros detectores en serie. El sistema óptico inverso del detector es muy sencillo.

#### Ventajas:

- \* Alto rendimiento de la luz.
- \* Baja dispersión.
- \* Selección y cambio de longitud de onda precisos.
- \* Medidas rápidas, exactas y precisas.
- \* Influencia despreciable de los cambios de índice de refracción.
- \* Detección múltiple.
- \* Adaptación de otro detector en serie.
- \* Cambio de longitud de onda para aumentar la sensibilidad.
- \* Alta selectividad para suprimir los picos interferentes.
- \* Corrige la derivada de la longitud de onda de referencia.
- \* Doble señal para controlar la pureza en el control de calidad.



ESQUEMA DEL DETECTOR DE ARREGLO DE FOTODIODOS

## **ANÁLISIS CUANTITATIVO.**

El análisis cuantitativo de mezclas de sustancias siempre ha sido relativamente fácil de efectuar mediante cualquier técnica cromatográfica con resultados válidos. En la actualidad el análisis cuantitativo por medio de la CLAR es tan confiable como el realizado por la cromatografía de gases.

En general todo análisis cuantitativo puede dividirse en varias etapas:

- \* Muestreo.
- \* Separación y detección.
- \* Integración de las señales.
- \* Cálculo de la composición.

Muestreo.

Si la muestra requiere de alguna preparación o tratamiento previo, este debe realizarse con todo cuidado.

Separación y detección.

Puede ser la fuente de muchos errores debidos a múltiples factores por ejemplo, puede haber descomposición o absorción irreversible de los componentes de la muestra en la columna, ya sea por efecto de la fase móvil o del material de relleno de la columna.

La sensibilidad, linealidad y especificidad del detector son también muy importantes. El tamaño de la muestra debe estar dentro del intervalo lineal del detector; los cambios de flujo, de temperatura y las fallas electrónicas pueden afectar las características de la respuesta del detector.

Integración de las señales.

El propósito de esta etapa es transformar de alguna forma la intensidad de las señales emitidas por el detector en medidas que puedan relacionarse con la concentración de la muestra. Las señales obtenidas en la mayoría de los detectores aparecen en el registrador de forma más o menos Gaussiana cuya altura o área se utiliza como una medida cuantitativa.

Técnicas manuales e instrumentales que se conocen para integrar las áreas de los picos.

a) Altura del pico.

Aunque el área es una medida precisa, la altura se emplea mucho porque es muy simple de obtener, aunque es más sensible a variaciones instrumentales.

Si los picos están completamente distorsionados o asimétricos o si la columna está sobrecargada de muestra o la cantidad de la muestra está fuera del intervalo lineal del detector, no debe utilizarse esta técnica. Si hay desviación de la línea base, la altura del pico se obtiene interpolando la línea base entre el principio y el fin de cada uno.

b) Altura del pico por el ancho a la mitad de la altura.

Cuando los picos son simétricos tienen aproximadamente la forma de un triángulo y es por esto que el área se mide multiplicando la altura del pico por el ancho medido a la mitad de la altura.

La precisión de esta técnica depende de la simetría del pico y de la relación entre su altura y su ancho.

c) Triangulación.

Este método consiste en trazar tangentes a ambos lados del pico hasta formar un triángulo con la línea base y luego aplicar la fórmula de la base multiplicada por la mitad de la altura. Este método es menos preciso que el anterior y está sujeto a errores al trazar las tangentes.

d) Cortar y pesar.

Básicamente lo que se hace es determinar el peso por unidad de área utilizado en el registrador, recortando los picos trazados en el papel del registrador y pesándolos y de esta forma se determina su área. La precisión en general es buena, pero depende de muchos factores como son el cuidado al recortar los picos, la homogeneidad del papel, etc.

e) Planímetro.

Se utilizan planímetros para medir las áreas, no ofrece ventaja alguna apreciable sobre los métodos anteriores. El proceso es lento, depende mucho de la habilidad personal y su precisión es mejor que la del método de la triangulación.

f) Integradores de disco.

Este es quizás el método más conveniente de medir áreas, el integrador transforma la señal que recibe el registrador en una serie de trazos en el papel que se pueden relacionar con las áreas de los picos.

g) Integradores electrónicos.

Los métodos de integración electrónica proporcionan datos de una precisión en muchas ocasiones superior a la del mismo cromatógrafo. La señal que recibe el registrador es transformada directamente en unidades relacionadas con el área y la concentración.

La cuarta etapa en el análisis cuantitativo es el cálculo de la composición de la muestra que se lleva a cabo por los siguientes métodos:

- a) Normalización de las áreas.
- b) Calibración externa.
- c) Uso de un patrón interno.

a) Normalización de las áreas.

Este método puede aplicarse con o sin factores de corrección, dependiendo de la precisión requerida y de la muestra. En esencia, relaciona las áreas obtenidas con el porcentaje de composición de la mezcla.

$$\% A1 = \frac{A1}{\text{Area total}} \times 100$$

Esta técnica requiere que todos los componentes de la mezcla sean eluidos y que la respuesta del detector sea igual para todos ellos, condición que por lo general no se cumple y que da lugar a que la normalización de áreas lleve el uso de factores de corrección o de respuesta. La respuesta de diversos compuestos puede variar de acuerdo con el detector empleado; para lograr mejores

resultados, es necesario obtener los factores de respuesta de los diversos compuestos que constituyen la mezcla.

Los factores de respuesta, relativos a un cierto compuesto de referencia, se calculan por medio de la fórmula:

$$f_x = \frac{A_r}{A_x} \times \frac{C_x}{C_r} \times f_r$$

Donde:

$A_r$  y  $A_x$  : son las áreas obtenidas para el compuesto de referencia y el compuesto problema.

$C_r$  y  $C_x$  : son las concentraciones de la referencia y del problema.

$f_r$  : es el factor de respuesta asignado al compuesto de referencia. De aquí resulta la siguiente fórmula:

$$\% X = \frac{A_x f_x}{A_r f_r} \times 100$$

#### b) Calibración externa.

Consiste en comparar el área correspondiente a cantidades conocidas de la sustancia problema con el área obtenida para la misma sustancia en la mezcla y cuya concentración se desea determinar. Se procede inyectando en el cromatógrafo cantidades exactas ( $C_1$  y  $C_2$ ) del compuesto problema y se obtienen las áreas de los picos ( $P_1$  y  $P_2$ ) correspondientes a cada una de las cantidades inyectadas.

A partir de estos datos se hace un gráfico de calibración, en que se representa la concentración en función del área del pico.

Se inyecta un cierto volumen de la muestra de composición desconocida, relacionando el área ( $x$ ) obtenida para el compuesto objeto de análisis con el gráfico de calibración.

Este método es muy sensible a errores en la inyección de los patrones y de la muestra problema.

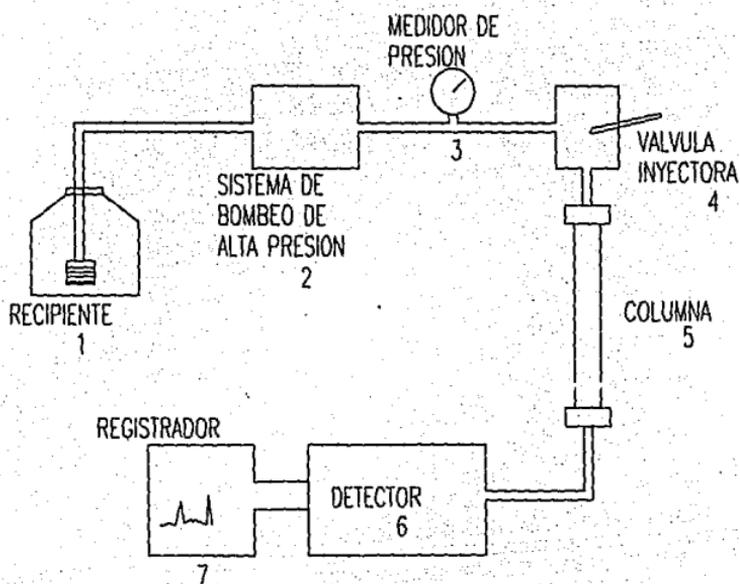
### c) Patrón Interno.

Este método es menos susceptible a errores técnicos y compensa, en algunos casos, errores producidos durante la preparación de la muestra. Consiste en comparar la relación entre áreas obtenidas del compuesto problema y del patrón interno con diversas concentraciones del compuesto problema.

A la muestra por analizar se le agrega una cantidad conocida de una sustancia que sirve de patrón interno y se determina la relación de las áreas (muestra/patrón) se efectúa así la lectura de la composición de la muestra en el gráfico de calibración, puesto que se conoce la cantidad de muestra patrón.

La sustancia utilizada como patrón interno debe ser de preferencia de estructura química similar al compuesto analizado, estar presente en concentraciones parecidas, tener un tiempo de retención cercano al del compuesto problema pero sin interferir con él, ser inerte y no formar parte de la muestra. Se puede llevar a efecto un análisis estadístico de los datos obtenidos para determinar el límite de su confiabilidad.

Los aspectos cuantitativos de la CLAR han mejorado notablemente con la introducción de los inyectores automáticos y los integradores electrónicos, esto unido a los avances en la calidad de las columnas y la estabilidad de los detectores han permitido obtener en forma rutinaria resultados cuantitativos de una gran precisión, cuya coeficiente de variación es menor del 1%.



ESQUEMA DE UN CROMATOGRFO DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION

## **CAPITULO 4**

### **VALIDACION DE METODOS ANALITICOS**

La industria farmacéutica está especialmente interesada en la validación de métodos analíticos debido al gran incremento de nuevos productos que tienen que ver con la salud y que requieren de métodos analíticos adecuados.

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir el método debe probarse para determinar su especificidad. La validación general incluye una evaluación de la linealidad y exactitud y proporciona una medida del comportamiento del método.

La validación del método puede definirse como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

La capacidad se expresa en este caso en términos de parámetros analíticos.

El proceso de validación de un método en particular está basado en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos prácticos de medición.

#### **DEFINICIONES**

##### **Linealidad:**

La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

#### **Intervalo:**

El intervalo de un método analítico está definido por las concentraciones entre los niveles superior e inferior de la sustancia (incluyendo estos niveles), en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

#### **Exactitud:**

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia, se expresa como el % de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se le ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

#### **Precisión:**

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de Desviación Estándar o del Coeficiente de Variación. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

##### **a) Repetibilidad.**

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizada por un sólo analista, usando los mismos aparatos y técnica.

##### **b) Reproducibilidad.**

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios utilizando el mismo y/o diferentes equipos.

#### **Límite de Detección:**

Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

### **Límite de Cuantificación:**

Es la menor concentración de la sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo condiciones de operación establecidas.

### **Especificidad:**

Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

### **Tolerancia:**

Es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo pequeñas modificaciones de las condiciones normales de operación.

### **Estabilidad de la Muestra:**

Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación de mantener su integridad bajo determinadas condiciones específicas.

Las etapas importantes que se deben considerar para la validación de métodos analíticos son las siguientes:

- 1.- Diseño.
- 2.- Desarrollo.
- 3.- Validación.

### **1.- Diseño.**

#### **Revisión Bibliográfica.**

La etapa de diseño comprende una revisión bibliográfica exhaustiva, con la finalidad de conocer las propiedades físicas, químicas, estabilidad e interacciones del principio activo, así como referencias para la cuantificación del mismo.

### **Adaptación Parcial.**

Esta etapa como su nombre lo dice comprende una adaptación parcial de las condiciones de preparación de las muestras, así como de las condiciones cromatográficas reportadas en la literatura para el diseño del método analítico objeto del estudio.

### **Adaptación Total.**

Es la reproducibilidad fiel de un método analítico reportado en la literatura, en otras palabras es la adaptación y seguimiento de las condiciones de operación que especifica un método analítico que se toma como referencia.

## **2.- Desarrollo.**

Tomando como antecedente que se va a realizar una adaptación parcial del método analítico, en primera instancia, en la etapa de desarrollo se tienen que tomar en cuenta los siguientes puntos:

- a) Formulacion
- b) Condiciones cromatográficas preliminares
- c) Optimización
- d) Fase móvil
- e) pH
- f) Fuerza iónica
- g) Flujo
- h) Columna analítica
- i) Tipo de detección
- j) Eficiencia de extracción
- k) Selección
- l) Solvente de elección
- m) Agitación
- n) Tipo de evaporación
- o) Tiempo de agitación
- p) Tiempo de sonicación

### Selección del Estándar Interno.

El estándar interno es a menudo utilizado en un método analítico para la cuantificación de un principio activo determinado. Su uso presenta las ventajas de lograr mayor precisión y minimizar al máximo los errores de manipulación que pudieran cometerse durante el análisis.

### 3.- Validación.

Uno de los principales objetivos de la industria farmacéutica es asegurar un adecuado control de calidad de los medicamentos, es por esto que la validación retrospectiva y prospectiva hoy en día ha tenido una gran importancia.

La validación de los métodos analíticos permite evaluar parámetros estadísticos como son precisión, exactitud, linealidad y reproducibilidad entre otros. De aquí se obtiene información sobre la confiabilidad del método que se emplea en el análisis del principio activo de una forma farmacéutica.

Por otra parte, los criterios que deben cumplir los parámetros estadísticos son establecidos ya sea por las autoridades o por el propio laboratorio o casa matriz, las cuales dan una serie de normas o especificaciones que deben respaldar al método analítico. Se deben validar los métodos analíticos tanto para materias primas como para principios activos contenidos en el producto en proceso o en la forma farmacéutica, y estos métodos pueden ser para control de calidad únicamente o indicadores de estabilidad.

Al término de la validación se debe reunir la documentación siguiente: los procedimientos de la validación, criterios de aceptabilidad y el reporte de la validación.

### **ESPECIFICIDAD.**

La prueba de especificidad del método se lleva a cabo de diferentes maneras dependiendo de su aplicación; en el caso de un método de control para el producto terminado solamente es necesario hacerlo específico de las probables interferencias debidas al placebo. En cambio si el método va a ser empleado para estudios de estabilidad se deberá cumplir con todo un protocolo de investigación, para poder desarrollar un método en el que la respuesta no este influenciada por

los demás componentes de la formulación y/o sus productos de degradación incluyendo los del principio activo en estudio.

1.- La capacidad del método para cuantificar el principio activo en presencia del sistema de liberación se determina adicionando una cantidad apropiada de sustancia de referencia al placebo o sistema de liberación, en cantidad equivalente al producto terminado.

2.- Para determinar si el método es aplicable a estudios de estabilidad, una solución de referencia o un producto terminado serán degradados, empleando diferentes condiciones como por ejemplo, calor, ácido y calor, base y calor, condiciones de oxidación, luz, humedad, etc.

3.- La probabilidad de que interfieran los productos de degradación provenientes del sistema de liberación es alta por lo que es necesario analizar y cuantificar una solución de referencia de reciente preparación en presencia de placebo normal y placebo degradado. El placebo puede ser degradado empleando ácido, base, peróxido de hidrógeno y calor, o alguna combinación de ellos.

Se sugieren los siguientes métodos para degradar la sustancia; se deberá escoger aquel que de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas del compuesto sea el más adecuado.

A) Colocar la sustancia de interés, el placebo y muestras del lote del producto en un horno entre 70°C y 120°C ó a 20°C menos que el punto de fusión de la sustancia de interés durante un apropiado número de días (2 a 4 semanas).

B) Exponer la sustancia de interés, el placebo y muestras del lote del producto a la luz ultravioleta o fluorescente y/o humedad.

C) Si es necesario hacer soluciones de la sustancia de interés ajustando el pH a 1-2 y/o 10-12 y colocarlas a 60°C - 80°C durante dos a cuatro semanas.

D) Se pueden degradar por oxidación (con peróxido de hidrógeno) y permanecer dos a cuatro semanas a temperatura ambiente.

E) Checar la aparición de sustancias relacionadas (productos de degradación). Utilizando por lo menos cualquiera de las técnicas cromatográficas siguientes CLAR, CG, y/o CCD.

Cuando el pH de la muestra se cambia este debe ser ajustado al pH normal antes del análisis, al menos que se demuestre que el análisis no es dependiente del pH.

Las muestras deben presentar un cambio en la concentración del analito para al menos una de las condiciones empleadas para la solución de referencia y formulación o producto y respuesta mínima para los excipientes en todos los casos.

## **CAPITULO 5**

### **PARTE EXPERIMENTAL**

#### **DETERMINACION CUANTITATIVA DEL PALMITATO DE VITAMINA A POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION EN UN INYECTABLE.**

##### **Objetivo.-**

Contar con un método analítico rutinario para la determinación cuantitativa del Palmitato de Vitamina A en un inyectable (800 U.I./ml).

##### **Fundamento.-**

El método se basa en la separación y cuantificación del Palmitato de Vitamina A por medio de una cromatografía de fase inversa, a una longitud de onda de 325 nm.

##### **Reactivos.-**

- \* Estándar Secundario de Palmitato de Vitamina A.
- \* Metanol grado HPLC.
- \* Cloroformo grado reactivo analítico.
- \* Agua bidestilada o grado HPLC.
- \* Nitrógeno.

##### **Equipo.-**

- \* Detector Waters modelo 484.
- \* Bomba Waters modelo 6000.
- \* Data Module Waters modelo 745.
- \* Frascos viales de vidrio color ambar de 4 ml de capacidad.
- \* Filtros millex (FHLP) de 0.5 micras.
- \* Jeringa de vidrio de 5 ml.
- \* Baño ultrasónico.

- \* Baño María.
- \* Refrigerador.
- \* Matraces volumétricos de vidrio no actínico de 50 y 100 ml.
- \* Pipetas volumétricas de 1, 2, 3 y 5 ml.
- \* Vasos de precipitados de vidrio de 100 ml.

#### Preparación de la Solución del Estándar de Referencia.-

Pesar alrededor de 17 mg de estándar secundario de palmitato de vitamina A (aproximadamente 28900 U.I.) dentro de un matraz volumétrico no actínico de 100 ml de capacidad. Llevar a volumen con metanol y agitar durante 45 minutos con ayuda de un agitador magnético.

Transferir cuantitativamente 3 ml de la solución anterior a un matraz volumétrico no actínico de 50 ml de capacidad. Llevar a volumen con metanol:cloroformo (1:1) y agitar la solución durante 3 minutos.

#### Preparación de la Solución de la Muestra.-

Transferir cuantitativamente 1 ml de la solución inyectable a un matraz volumétrico no actínico de 50 ml de capacidad, dejar drenar perfectamente la pipeta. Lavar la pipeta con 5 ml de metanol:cloroformo (1:1) y llevar a volumen con metanol:cloroformo (1:1). Agitar la solución durante 3 minutos.

#### Procedimiento.-

Filtrar las soluciones del estándar de referencia y de la muestra a través de filtros miller de 0.5 micras y recibir el filtrado correspondiente a cada una de las soluciones en frascos viales de color ámbar de 4 ml de capacidad. Realizar esta operación lo más rápido posible y proteger las soluciones de la luz.

Empezar el análisis inyectando por cuadruplicado la solución del estándar de referencia hasta que no exista una variación mayor del 2%.

Nota: Hasta que la variación del estándar de referencia se encuentre dentro de límites, preparar la solución de la muestra lo más rápido posible e inyectarla inmediatamente.

Continuar inyectando la solución de la muestra por duplicado.

Condiciones sugeridas para el cromatógrafo de líquidos.-

Detector:	UV - 325 nm
Sensibilidad:	0.14 AUFS
Columna:	Econosphere C18 de 150 mm de largo por 4.6 mm de diámetro interno Alltech.
Fase móvil:	Metanol (HPLC). Filtrar a través de filtros FHLF de 0.5 micras y degasificar.
Velocidad de flujo:	3.0 ml/min.
Presión:	2000 psi.
Volúmen de inyección:	40 mcl.

Tiempo de Retención Aproximado:

Palmitato de Vitamina A : 2.7 min.

Cálculos.-

Calcular las unidades internacionales (U.I.) de palmitato de vitamina A por cada ml de la muestra utilizando la siguiente formula:

$$U.I./ml = \frac{A_{mta}}{A_{std}} \times \frac{U.I. \text{ std} \times \text{Potencia Std} \times F. \text{ Dilución}}{\text{Volúmen de la muestra (ml)}}$$

Donde:

A mta = Area del palmitato de vitamina A en la solución de la muestra.

A std = Area del palmitato de vitamina A en la solución del estándar de referencia.

U.I. std = Unidades internacionales según el peso del estándar de referencia.

Potencia Std = Pureza del estándar de referencia.

F. Dilución = Factor de dilución, en este caso tiene un valor de 0.03

Volúmen de la muestra (ml) = Volúmen utilizado de la muestra en mililitros.

**VALIDACION DEL METODO ANALITICO PARA LA DETERMINACION DE PALMITATO DE VITAMINA A POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.**

La Validación del Método se realizó de acuerdo a la Guía de Requisitos Mínimos para la Validación de Métodos Analíticos emitida por la Secretaría de Salud y el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México, A.C.

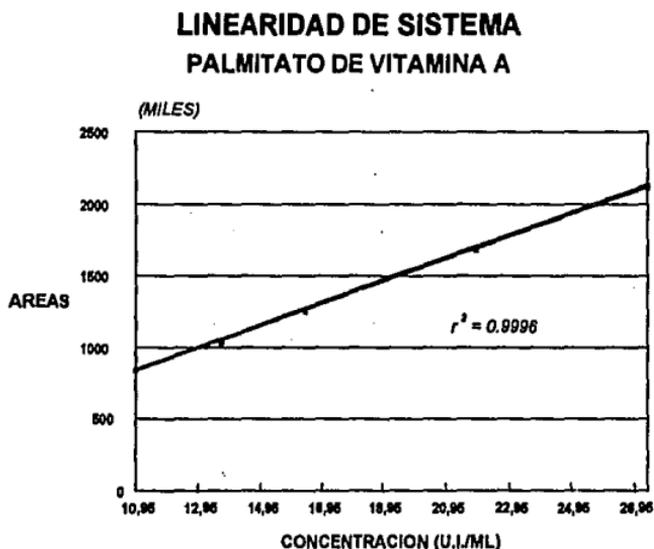
Linearidad del Sistema.-

Criterio de Aceptación:  $r \geq 0.99$  ;  $r^2 \geq 0.98$

Se determinó construyendo una curva de calibración de una misma solución patrón de palmitato de vitamina A, utilizando diluciones al 68.43%, 85.54%, 102.65%, 136.87% y 171.09%, realizando análisis por duplicado para cada dilución.

%	Concentración de palmitato de vitamina A (U.I./ml).	Areas
68.43	10.95	844075 841727
85.54	13.68	1031483 1031094
102.65	16.425	1250154 1261361
136.87	21.90	1683730 1681171
171.09	27.37	2124844 2114924
$r = 0.9998$ $r^2 = 0.9996$		
Cumple con los criterios de aceptación establecidos.		

La recta obtenida para la linealidad del sistema se presenta en la siguiente figura.



**Resultados:**

**Precisión del Sistema.-**

**Criterio de Aceptación:** C.V.  $\leq$  1.5%

Se determinó por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar de Palmitato de Vitamina A correspondiente al 100% establecido en la Linealidad del Sistema.

## Resultados:

%	Relación de áreas
100	1333433
	1328986
	1329610
	1339129
	1330817
C.V. = 0.3441	
Cumple con el criterio de aceptación establecido	

## Linearidad del Método.-

### Criterio de Aceptación:

Cantidad Adicionada VS Cantidad Recuperada:

$$m \approx 1 ; b \approx 0 ; r^2 \geq 0.98$$

% Recuperado:

En el Intervalo de Confianza debe localizarse el 100%.

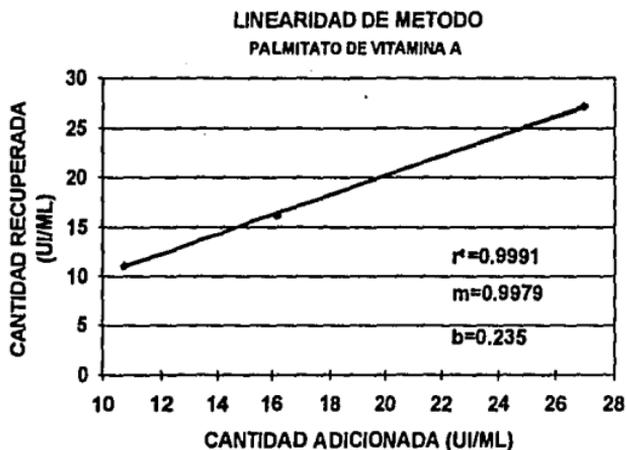
$$C.V. \leq 2\%$$

Se determinó con placebos adicionados del principio activo. Cada uno de manera independiente, a tres diferentes concentraciones 67.38%, 101.06% y 168.39%, realizando los análisis por triplicado para cada concentración.

Resultados:

%	Cantidad adicionada	Cantidad recuperada	% Recuperado
	U.I./ml	U.I./ml	
67.38	10.74	10.96	101.67
	10.74	11.10	102.97
	10.74	11.22	104.08
101.6	16.17	16.28	100.68
	16.17	15.98	98.82
	16.17	16.22	100.31
168.39	26.94	27.00	100.22
	26.94	27.17	100.85
	26.94	27.40	101.69
$m = 0.9979$ $b = 0.2350$ $r^2 = 0.9991$ I.C. = 101.21 % + 1.21 %   I.C. = 100.00 % a 102.42 % C.V. = 1.55 % Cumple con los criterios de aceptación establecidos.			

La recta obtenida de la linealidad del método se presenta en la siguiente figura.



Exactitud del Método al 100 % .-

Criterio de Aceptación: En el Intervalo de Confianza para la media debe localizarse el 100%.

C.V.  $\geq$  2%

Se determinó con seis placebos adicionados de Palmitato de Vitamina A al 100% de manera independiente.

Resultados:

%	Cantidad adicionada U.I.	Cantidad recuperada U.I.	% Recuperado
100	816.00	810.06	99.27
	816.00	816.55	100.07
	816.00	819.40	100.42
	816.00	824.28	101.01
	816.00	823.28	100.89
	816.00	819.78	100.46
I.C. = 100.35 % + 0.66 %    I.C. = 99.69 a 101.01 % C.V. = 0.63 % Cumple con los criterios de aceptación establecidos.			

Precisión ( Reproducibilidad ) del Método.-

Criterio de Aceptación: C.V. Total  $\leq$  2%

Se determinó de una muestra homogénea con dos analistas en dos días diferentes y por triplicado. Las muestras se trabajaron de manera independiente.

**Resultados:**

	Analista	
	1	2
Dia 1	111.93%	109.22%
	111.36%	108.76%
	112.15%	112.09%
Dia 2	109.61%	109.03%
	109.83%	109.12%
	110.10%	109.42%
C.V. total = 1.17 % Repetibilidad + 1.84 Reproducibilidad Intermedia/Analista +1.80 Reproducibilidad Interanalista + 0.83 Cumple con el criterio de aceptación establecido.		

Analista 1 : M.A.T.L.

Analista 2 : H.M.G.A.

**Tolerancia.-**

Para evaluar la Tolerancia del método analítico se realizaron las modificaciones que se mencionan a continuación:

Parámetros	Condiciones Normales	Condiciones Modificadas
Sensibilidad	0.14 AUFS	0.13 AUFS
Velocidad de flujo	3.0 ml/min	2.9 ml/min
Columna	Econosphere C18	Microbondapak C18
Resultados de tres muestras de un lote piloto.	109.03%	110.15%
	109.12%	109.85%
	109.42%	110.03%

### Estabilidad de la Muestra.-

Tres muestras diferentes de un lote de producción de producto terminado (lote 308584), se analizaron y se guardaron en una mezcla de metanol y cloroformo (50:50), en frascos ambar tipo III con tapa de rosca con empaque de Poxlan a temperatura ambiente ( $\pm 24\text{ }^\circ\text{C}$ ) y en refrigeración ( $\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ ) durante 4 y 24 hrs.

Los resultados de los análisis se presentan en la siguiente tabla. A las 24 horas los resultados ya son bajos aunque no aparecen picos de degradación en los cromatogramas como puede apreciarse en la siguiente figura.

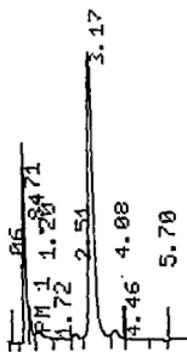
Estabilidad de la muestra.					
	Análisis inicial	4 hr 5 °C	24 hr T-A	24 hr 5 °C	4 hr T-A
Muestra 1	99.6	101.5	95.9	92.8	100.4
Muestra 2	100.3	98.7	90.9	93.3	102.6
Muestra 3	101.9	100.3	89.3	92.7	100.3



A) Análisis Inicial



B) Análisis 24 hr T.A.



C) Análisis 24 hr 5 °C

Especificidad.-

Con el fin de verificar la especificidad del método para obtener una respuesta debida únicamente al palmitato de vitamina A y no a otros componentes de la muestra y/o productos de degradación, se colocaron muestras de principio activo, placebo y producto terminado bajo diferentes condiciones, de luz, temperatura, oxidación, medio ácido y medio alcalino.

Las condiciones y los principales picos obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Condición	Tiempos de Retención		
	Principio Activo	Placebo	Producto Terminado
Temperatura ambiente	0.45	0.42	0.41
	0.75		0.80
	2.70		2.68
	3.41		3.37
Luz solar (2 hr)	0.47	0.33	0.49
	0.75		0.74
	2.63		2.66
	3.30		3.31
Temperatura 58 °C (2hr)	0.43	0.43	0.44
	2.49		0.73
	3.08		2.42
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30 % (2hr)	0.06	0.06	0.07
	0.40		0.47
	1.23		0.46
	2.40		2.43
Solución 0.1 N de HCl (2 hr)	0.32	0.66	0.75
	0.77		0.94
	1.58		1.58
	2.66		2.65
	3.33		3.30
Solución 0.1 N de NaOH (2hr)	0.62	0.06	0.06
	2.36	0.53	0.53

Los cromatogramas mas representativos se presentan en las siguientes figuras.



**Donde:**

- 1.- Materia prima análisis inicial (TA).**
- 2.- Placebo análisis inicial (TA).**
- 3.- Producto terminado análisis inicial (TA).**
- 4.- Producto terminado expuesto a luz solar.**
- 5.- Materia prima con  $H_2O_2$ .**
- 6.- Materia prima con solución 0.1 N de HCl.**
- 7.- Producto terminado con solución 0.1 N de HCl.**
- 8.- Materia prima con solución 0.1 N de NaOH.**

Fórmulas utilizadas para la Validación del Método.-

Pendiente ( m )

$$m = \frac{NT(\Sigma XY) - (\Sigma X)(\Sigma Y)}{NT(\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2}$$

Ordenada al origen ( b )

$$b = \frac{Y - m(\Sigma X)}{NT}$$

Coefficiente de correlación ( r )

$$r = \left[ \frac{(NT(\Sigma XY) - (\Sigma X)(\Sigma Y))^2}{(NT(\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2)(NT(\Sigma Y^2) - (\Sigma Y)^2)} \right]^{1/2}$$

Coefficiente de variación (CV).

$$DE = \frac{N(\Sigma Y^2) - (\Sigma Y)^2}{N(N-1)}$$

$$CV = \frac{DE}{\bar{Y}} \times 100$$

## **DISCUSION DE RESULTADOS.**

De acuerdo a la evaluación estadística del método analítico desarrollado para la determinación de palmitato de vitamina A por cromatografía de líquidos de alta resolución, este demostró ser exacto preciso reproducible y lineal en el intervalo de concentraciones ensayadas.

La técnica logra separar y cuantificar al palmitato de vitamina A de los demás ingredientes de la formulación por lo que es adecuada para el control de calidad del producto a granel y terminado.

Las muestras listas para el análisis son estables cuando menos por un periodo de 4 horas a temperatura ambiente y en el refrigerador por lo tanto, el análisis no necesariamente debe hacerse inmediatamente después de preparar las muestras. Sin embargo tratándose de un fármaco que tiene problemas de estabilidad, siempre será recomendable llevar a cabo la cuantificación lo más pronto posible.

La técnica separa los productos de degradación, sin embargo hay uno que aparece muy cercano al pico de la vitamina y que en ocasiones es difícil separarlo por lo que hay que tener mucho cuidado con la columna cromatográfica para que tenga una buena resolución y poder separarlo, de lo contrario se tomará como área del pico principal y los resultados serán más altos.

El sistema de solventes utilizado es una mezcla 50:50 de metanol:cloroformo por lo que hay que tener precauciones para que no se evapore antes de hacer la cuantificación para no tener resultados más altos que los reales.

Con agua oxigenada disminuye la concentración de la materia prima y desaparece en el producto terminado apareciendo un pico grande de producto de degradación a tiempo de retención muy corto.

En condiciones ácidas y básicas también disminuye mucho la concentración del principio activo.

El placebo no interfiere en la cuantificación del fármaco.

## **CONCLUSIONES.**

El método desarrollado es práctico y rápido, requiere poco manejo de la muestra y utiliza poca cantidad de disolventes orgánicos por lo que no resulta cara.

El método es adecuado para el control de calidad de palmitato de vitamina A en solución oleosa y puede también utilizarse para seguir la estabilidad de la formulación.

Por lo tanto se cumplió el objetivo principal planteado al desarrollar esta tesis que era el de tener un método de cuantificación confiable para el palmitato de vitamina A en una solución inyectable.

## BIBLIOGRAFIA.

- 1).- Ma. Soledad G. Chamorro. Métodos de Análisis de Vitaminas 3a ed. Editorial Academia Argentina, 1969.
- 2).- Suzanne Loebel, George Spratto. Manual de Farmacología. Editorial Limusa, 1986.
- 3).- Genaro A.R. Remington's Pharmaceutical Sciences 17<sup>th</sup> ed. Mack publishing company USA 1985.
- 4).- Glenn L. Jenkins. The Chemistry of Organic Medicinal Products 4<sup>th</sup> ed. New York. John Willey, 1957.
- 5).- AHFS. Drug Information 90. Editorial Staff, USA.
- 6).- Bowman Rand. Bases Bioquímicas y Patológicas. Aplicaciones Clínicas 2a ed. Editorial Interamericana, 1984.
- 7).- Alfred Goodman Gilman, Louis S. Goodman. Las Bases Farmacológicas de la Terapeutica, 6a Ed. Editorial Panamericana S.A. 1982.
- 8).- AMA, Drug Evaluations 4<sup>th</sup> ed. 1980.
- 9).- Validación de Métodos Analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmaceuticos Biologos y Secretaria de Salud.
- 10).- José Juárez Ayala. Diseño, Desarrollo y Validación de Métodos Analíticos. Beckman Instruments.
- 11).- Susan M. Ficarro and Kirit A. Shah. Validation of High Performance Liquid Chromatography and Gas Chromatography Assay. Pharmaceutical Manufacturing., Sep. 1984.
- 12).- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 5a ed., 1988.
- 13).- United States Pharmacopeia XXII and National Formulary XVII. USA, 1990.
- 14).- Andre P. de Leenher. Modern Chromatography, Marcel Dekker, 1985.
- 15).- Kenneth A. Conors. Chemical Stability of Pharmaceuticals, a Handbook for Pharmacists. John Willey, 1972.
- 16).- D. Matias Guzman Chozas. Curso de Análisis Farmacéutico. Editorial Reverte S.A., 1980.
- 17).- Harold M. Mc Nair y Benjamin Esquivel H. Cromatografía Líquida de Alta Presión, 2a ed., Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, 1980.
- 18).- The Merk Index, an Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. Merk Co. USA, 1989.
- 19).- Curso Sobre Métodos Cromatográficos de Mayor Aplicación en la Industria Químico Farmacéutica. ENCB, IPN, 1984.
- 20).- Catalogo Merk.
- 21).- Validación de Métodos Analíticos. CAFET, S.A.
- 22).- Kiyoshi Tsuji. Determination of Therapeutic Agents. Vol 9, parte 3, 1979.

- 23).- R. Strohecker and H.M. Hennig Wein. Vitamin Assay, Tested Methods, 2a ed.,. 1966.
- 24).- Martindale The Extrapharmacopoeia. The Pharmaceutical Press,. London, 1982.
- 25).- British Pharmaceutical Codex, 1973.
- 26).- Touchstone Dobbins. Practice of Thin Layer Chromatography, 2<sup>nd</sup> edition. Willey Interscience, 1983.
- 27).- Basic Liquid Chromatography. Varian Associates inc. USA. 1978.