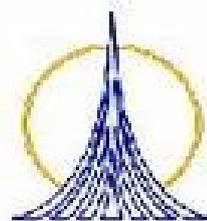




**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE UNA ELUCIÓN ISOCRÁTICA  
Y POR GRADIENTE PARA SEPARAR POR CLAR UN GRUPO  
DE FARMACOS ANALGÉSICOS.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUÍMICO  
FARMACÉUTICO BIÓLOGO PRESENTA:**

**ADRIANA ORTIZ TORRES**

**ASESOR: DR. JUAN CARLOS VÁZQUEZ LIRA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 esta 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 ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

ADRIANA ORTIZ TORRES

NUMERO DE CUENTA: 401013404

FECHA DE CULMINACIÓN DE LA CARRERA: 2006

SINODALES:

Dr. Juan Carlos Vázquez Lira  
Dr. Vicente Hernández Abad  
Q. María Teresa Mendoza Mata  
QFB. Felipe Alberto Pérez Vega  
Mtra. Leticia Huerta Flores

## INDICE

Introducción	1
Nomenclatura	2
I. Marco teórico	
1. Propiedades fisicoquímicas de los analitos de estudio	
1.1. Acetaminofeno	3
1.2. Ibuprofeno	3
1.3. Ketoprofeno	4
1.4. Naproxeno	4
2. Generalidades de la cromatografía	5
3. Aplicaciones de las técnicas cromatográficas	6
4. Análisis cuantitativo en CLAR	8
4.1. Análisis basados en la altura del pico	8
4.2. Análisis basados en el área del pico	8
4.3. Calibración y patrones	9
4.4. Patrón interno	9
4.5. Método de normalización de áreas	10
5. Análisis cualitativo en CLAR	10
5.1. Cromatogramas	10
6. Parámetros cromatográficos	12
6.1. Selectividad	12
6.2. Tiempo de retención	12
6.2.1. Tiempo de retención reducido	12
6.3. Tiempo muerto	13
6.4. Volumen de retención	13
6.5. Volumen muerto	13
6.6. Factor de capacidad	13
6.7. Resolución	14
6.8. Número de platos teóricos	14
6.9. Altura del plato	15
6.9.1. Altura del plato reducida	16
7. Variables que afectan la eficiencia de la columna	16
8. Variables del factor selectividad	17
9. Métodos para describir la eficacia de la columna	17
10. Optimización de la eficiencia de la columna	18
11. Factores que afectan las separaciones	18
11.1. Ensanchamiento de banda	18
11.2. Influencia de la fase móvil	18
11.3. Velocidad de flujo	19
11.4. Temperatura	19
11.5. Caída de presión	19
11.6. Diámetro de partícula de la fase estacionaria	20
11.7. Viscosidad	20
11.8. Forma de los picos cromatográficos	20
11.9. Factor de asimetría	21
11.10. Velocidad de migración de los solutos	21
12. Tipos de separaciones más utilizadas en CLAR	21

12.1. Cromatografía de adsorción	21
12.2. Cromatografía de exclusión	22
12.3. Cromatografía de intercambio iónico	23
12.4. Cromatografía de fase reversa	23
13. Características de la fase estacionaria	24
13.1. Composición química de la fase	24
13.2. Fuerzas de elusión fase móvil-soluto	24
13.3. Sustancias disociadas y no disociadas	26
13.4. Cargas	26
14. Fase móvil	28
14.1. Requerimientos de la fase móvil	28
14.2. Preparación de la fase móvil	29
14.3. Tratamiento de solventes	29
14.3.1. Filtración	30
14.3.2. Desgasificación	30
14.3.3. Vacío	31
14.3.4. Ultrasonido	31
14.3.5. Calentamiento	31
14.3.6. Saturación de la fase móvil con gases inertes	31
14.4. Instrumentación para CLAR	31
14.4.1. Recipientes para contener los disolventes de la f. móvil	31
14.4.2. Sistema de suministro de la fase móvil	32
15.1. Bombas	33
15.1.1. Bombas de flujo constante	33
15.1.2. Bombas de presión constante	34
15.2. Sistemas de inyección de muestra	34
15.3. Detectores	35
15.3.1. Detector fotométrico de longitud de onda fija	35
15.3.2. Detector de fluorescencia	37
15.3.3. Detector electroquímico	37
15.3.4. Detector de Índice de refracción	38
15.4. Columna	38
15.4.1. Tipos de rellenos de columna	39
16. Sistema de gradientes	39
Planteamiento del problema	42
Objetivos	43
Hipótesis	44
Método	45
Material y Equipo	46
Resultados y análisis	51
Conclusiones	64
Referencias Bibliográficas	65

## **INTRODUCCIÓN**

En este estudio se pretende, por medio de un análisis comparativo entre una elusión isocrática y una elución por gradiente, determinar cuál de estos métodos es más efectivo para separar una mezcla que contiene cuatro analgésicos: acetaminofeno, ibuprofeno, ketoprofeno y naproxeno.

Por medio de un análisis isocrático es posible lograr la separación de dicha mezcla, sin embargo, emplearía un mayor tiempo de análisis, en el caso del análisis por gradiente es posible modificar la fuerza de la fase en función del tiempo, por lo que se logra la separación en un menor tiempo, aunque es menos reproducible.

## PREFACIO

Esta obra pretende servir de guía en la elaboración de métodos analíticos para CLAR, pues ofrece un panorama general de los factores que hay que tomar en cuenta al desarrollar un método. En primer lugar se plantea un método para separar cuatro analgésicos por medio de una técnica isocrática, para la cual fue necesario seleccionar una longitud de onda óptima, en la cual pudieran ser cuantificados todos los analitos, además se considero el pH de la fase, mismo que influye en el comportamiento de los analitos, así como la fuerza de la fase, en el ensayo por gradiente de elución se considero además que, como algunos de los analitos son afines estructuralmente, se espera un tiempo de retención parecido para ambos analgésicos, lo que imposibilita tener una buena resolución, por lo tanto se modifica la fuerza de la fase para permitir que eluyan en diferentes tiempos, logrando además economizar el gasto de los disolventes.

## PROLOGO

En la actualidad, la técnica de CLAR, es ampliamente utilizada en la industria farmacéutica, ya que se utiliza para identificar y cuantificar los compuestos en una fase líquida y es de gran versatilidad, por lo tanto es necesario contar con las bases teóricas que permitan analizar o diseñar métodos analíticos. Aunque generalmente los métodos analíticos son farmacopeicos, no siempre está documentado la forma en que es posible analizar ciertas moléculas, por lo tanto se debe desarrollar un método confiable, reproducible y que pueda ser validado. El conocer los factores que afectan a una molécula en el sistema cromatográfico tales como el pH o la fuerza de la fase, son herramientas fundamentales en el desarrollo de métodos analíticos por CLAR.

## RESUMEN

Se pretendía determinar cual era la técnica más adecuada para separar un grupo de cuatro analgésicos, planteando un método de análisis por gradiente y un isocrático. Se realizaron algunas variables en ambos métodos con el fin de optimizarlos, tales como el pH y la fuerza de la fase. Se determino que el pH en el que se obtenían mejores resultados es a pH:4.

En el caso de la técnica isocrática no se obtuvieron parámetros cromatográficos adecuados, debido a su afinidad estructural no se logro una buena resolución.

La técnica por gradiente de elución ofrece mejores resultados, además de tener la ventaja de obtener tiempo de retención más cortos, logrando así economizar los disolventes.

## NOMENCLATURA

CLAR: Cromatografía de líquidos de alta resolución

CLAP: Cromatografía de líquidos de alta presión

$\alpha$ : Selectividad

$t_r$ : tiempo de retención

$t'_r$ : tiempo de retención reducido

$V_r$ : volumen de retención

$t_m$ : tiempo muerto

$k'$ : factor de capacidad

H: altura del plato

h: altura del plato reducida

f: factor de asimetría

N: número de platos teóricos

L: longitud de la columna

R: resolución

u: velocidad lineal

$\lambda$ : longitud de onda

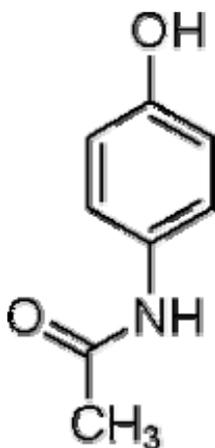
nm: nanometros

## I. MARCO TEÓRICO

### 1. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS ANALITOS DE ESTUDIO

#### 1.1. Acetaminofeno

Fórmula estructural:



Fórmula condensada:  $C_8 H_9 NO_2$

Peso molecular: 151.16 g/mol.

Punto de fusión: 168 -171 ° C

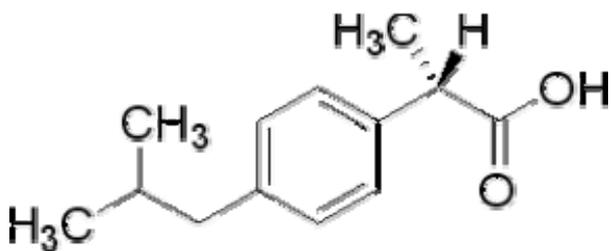
pka: 9.5

Descripción: es un polvo blanco, cristalino, inodoro, con sabor ligeramente amargo.

Solubilidad: fácilmente soluble en etanol, soluble en acetona, agua caliente e hidróxido de sodio 1N, poco soluble en cloroformo, insoluble en éter.<sup>1, 2,3</sup>

#### 1.2. Ibuprofeno

Fórmula estructural:



Formula condensada:  $(CH_3)_2CHCH_2C_6H_4CH(CH_3)CO_2H$

Peso molecular: 206.28

Punto de fusión: 75-77°C

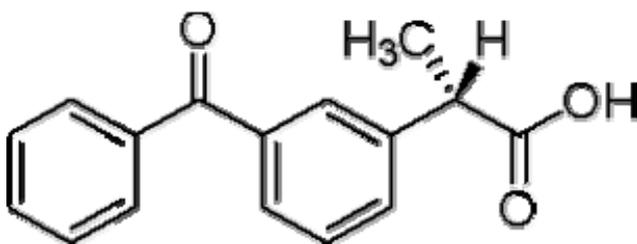
pKa: 4.4

Descripción: polvo o cristales blancos, incoloro con sabor y olor suaves característicos.

Solubilidad: insoluble en agua, soluble en etanol al 96%, cloroformo, acetona, éter y en soluciones acuosas de hidróxidos alcalinos y carbonatos.<sup>1, 2, 4</sup>

### 1.3. Ketoprofeno

Fórmula estructural:



Fórmula condensada: C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>COC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CO<sub>2</sub>H

Peso molecular: 254.28

Punto de fusión: 94°C

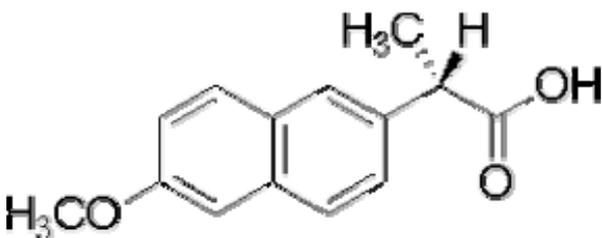
pKa: 5.02

Descripción: polvo o cristales blancos.

Solubilidad: Soluble en éter, alcohol, acetona, cloroformo, acetato de etilo, ligeramente soluble en agua.<sup>1, 2, 4</sup>

### 1.4. Naproxeno

Fórmula estructural:



Fórmula condensada: CH<sub>3</sub>OC<sub>10</sub>H<sub>6</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CO<sub>2</sub>H

Peso molecular: 230.26

Punto de fusión: 152-154°C

pka: 4.5

Descripción: es un polvo blanco, inodoro y cristalino

Solubilidad: es liposoluble, prácticamente insoluble en agua con un pH inferior a 4 y totalmente soluble en agua con un pH superior a 6.<sup>1, 2, 4</sup>

## **2. GENERALIDADES DE LA CROMATOGRAFÍA**

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) es una técnica analítica de separación que se utiliza para identificar y cuantificar los compuestos de una fase líquida. Se fundamenta en los equilibrios de concentración de los compuestos presentes entre dos fases no miscibles de la que una, llamada estacionaria, está inmovilizada en una columna o fijada sobre un soporte y la otra, llamada móvil, se desplaza al contacto de la primera, es decir, las fuerzas competitivas que establecen estas dos fases, por las moléculas del soluto. La muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico, esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible y que se fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria, aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil y los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez. La tendencia a solubilizar las moléculas de soluto por parte del disolvente, habrá de imperar sobre las fuerzas de retención del relleno de la columna, consiguiendo, arrastrar el soluto disuelto, hasta salir con él al exterior de la columna, proceso que se denomina elución, la elución a velocidades diferentes de los compuestos presentes por la fase móvil conduce a su separación.<sup>5, 6</sup>

La cromatografía en columna clásica no es tan eficiente para separar mezclas de sustancias estrechamente relacionadas químicamente. Con el objetivo de aumentar la resolución de la columna se han desarrollado otras técnicas, las cuales emplean fases estacionarias con partículas mucho más pequeñas que

las utilizadas en columnas clásicas, aumentando, en esta forma el factor de selectividad ( $\alpha$ ), pero debido a que con estos tamaños de partículas el flujo de la fase móvil sería demasiado lento, fue necesario aplicar presión para acelerar la elución, obteniendo así la técnica de CLAR.<sup>7</sup>

### **3. APLICACIONES DE LAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS**

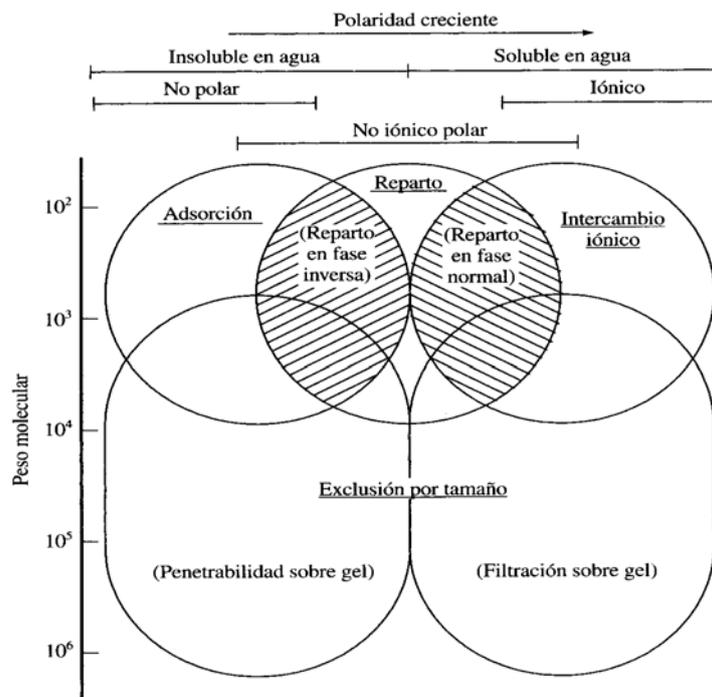
Entre las técnicas cromatográficas cuya fase móvil es un líquido, la CLAR es la más conocida. Su éxito se debe a la posibilidad de actuar de manera muy precisa sobre la selectividad entre los compuestos a través de la elección de la columna y de la composición del eluyente, es decir, al sacar partido de las interacciones disolución-fase móvil-fase estacionaria.<sup>8</sup>

La CLAR es ampliamente utilizada; las razones de la popularidad de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su aptitud para la separación de especies no volátiles o termolábiles, y sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ingeniería y para la sociedad en general, como por ejemplo proteínas, oligosacáridos, triglicéridos, vitaminas, fármacos, muestras provenientes del medio ambiente, entre otros.<sup>8</sup>

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de técnicas, que permite separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros medios.<sup>8</sup>

Para solutos con masas moleculares superiores a 10000, a menudo se utiliza la cromatografía de exclusión por tamaño, aunque ahora también es posible tratar estos compuestos por cromatografía de reparto en fase inversa, en el caso de especies iónicas de masa molecular más pequeña, se utiliza a menudo la cromatografía de intercambio iónico.

Los métodos de cromatografía de reparto se aplican a las especies poco polares pero no iónicas. Además este procedimiento se utiliza muchas veces para la separación de los integrantes de una serie homóloga. La cromatografía de adsorción se elige con frecuencia para separar especies no polares o isómeros estructurales. (Figura 1)<sup>8</sup>



**Figura 1.** Aplicaciones de la CLAR.

El éxito de la aplicación de la CLAR (o cromatografía de líquidos de alta presión, CLAP) para un compuesto dado, depende de la combinación correcta de las condiciones de operación, es decir, la preparación de la muestra, el tipo de columna, la fase móvil, la longitud, el diámetro de la columna, la velocidad de flujo de la fase móvil, el tipo de detección, etc.<sup>9</sup>

La migración diferencial en la CLAR es resultado del equilibrio de la distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la móvil. Dichos componentes se separan en la columna y al salir de ésta son conducidos por la fase móvil en el orden en que emergieron, hacia un detector, donde se registra una respuesta proporcional a su cantidad, sus concentraciones y sus tiempos de retención en la columna.<sup>9</sup>

La técnica se complementa con una serie de detectores cuya aplicabilidad se centra en distintas familias de compuestos (detector diferencial de índice de refracción y detector de fluorescencia), además se incorporan detectores de carácter universal, como son el ultravioleta – visible, de fila de fotodiodos y el de más reciente desarrollo detector de espectrometría de masas.<sup>9</sup>

#### **4. ANÁLISIS CUANTITATIVO EN CLAR**

La técnica de CLAR puede proporcionar información cuantitativa a cerca de las especies separadas. La cromatografía en columna, se basa en la comparación de la altura o del área del pico del analito con la de uno o más patrones.<sup>8</sup>

Para todos los detectores que se usan en cromatografía, al menos sobre un número razonable de los mismos, existe una relación lineal entre el área bajo el pico y la cantidad de sustancia que es responsable de causar ese pico. Por tanto, por inyección de cantidades apropiadas del analito puro, se puede trazar una recta de calibración para dicho analito. Esta recta se puede utilizar para buscar la concentración del analito en muestras de concentración desconocida, por medio de un análisis por regresión lineal.<sup>10</sup>

Los tiempos de retención de cada uno de los picos deben ser idénticos, pero el área bajo los picos deberá ser diferente. Si se calcula el área bajo los picos, se obtiene una recta de calibración.<sup>10</sup>

##### **4.1. Análisis basados en la altura del pico**

La altura de un pico cromatográfico se obtiene uniendo las líneas base a cada lado del pico por una línea recta, y midiendo la distancia vertical desde esta línea al pico. Esta medida normalmente se puede hacer con una precisión razonablemente buena. Es importante considerar, sin embargo, que las alturas del pico están inversamente relacionadas con las anchuras del pico. Por ello, con las alturas del pico se obtienen resultados exactos sólo si las variaciones en las condiciones de la columna durante el tiempo necesario para obtener los cromatogramas de la muestra y de los patrones no alteran la anchura del pico. Las variables que deben controlarse son la temperatura de la columna, la velocidad de flujo de la fase móvil y la velocidad de inyección de la muestra.<sup>8</sup>

##### **4.2. Análisis basados en las áreas de los picos**

El área del pico es independiente de los efectos del ensanchamiento, por lo tanto son un parámetro analítico más adecuado que la altura del pico. Por otra parte, las alturas del pico se miden más fácilmente y, para picos estrechos, se determinan con mayor exactitud.<sup>8</sup>

### 4.3. Calibración y patrones

El método más sencillo para el análisis cromatográfico cuantitativo implica la preparación de una serie de disoluciones del patrón de composición parecida a la muestra. A continuación se obtienen los cromatogramas de los patrones y se representan las alturas o las áreas del pico en función de la concentración. La representación gráfica de los datos debería originar una línea recta que pasará por el origen de las coordenadas, los análisis se basan en esta gráfica.<sup>8</sup>

### 4.4. Patrón interno

En cromatografía cuantitativa, la mayor precisión se obtiene por el uso de patrones internos debido a que se evitan las incertidumbres asociadas a la inyección de la muestra, o a una gran manipulación de la misma durante su preparación. En este procedimiento se introduce en cada estándar y en la muestra una cantidad exactamente medida del patrón interno y la relación de las áreas (o alturas) del analito y del patrón interno que sirve como parámetro analítico.<sup>8</sup>

Frecuentemente, la cantidad del compuesto en una muestra se calcula sobre la base de la respuesta de un estándar. Esto puede realizarse una vez comprobado que existe linealidad, por el desarrollo de la siguiente ecuación:

$$C = \frac{\text{respuesta de la muestra} \times \text{concentración del estándar}}{\text{respuesta del estándar}}$$

También, se puede realizar la cuantificación del analito de interés por medio de la inclusión de un patrón interno. Los patrones internos son compuestos que son químicamente similares al analito pero no están presentes en la muestra hasta que son añadidos por el analista, éste añade una cantidad conocida del patrón interno y después realiza la cromatografía de la mezcla, la cantidad de compuesto B en la muestra puede ser calculado por la siguiente relación.<sup>10</sup>

$$\text{Cantidad del compuesto B} = \frac{\text{área bajo el pico B}}{\text{área bajo el pico patrón}} \times \text{cantidad del patrón interno añadido}$$

#### **4.5. Método de normalización de áreas**

En este método es necesario que se produzca la elución completa de todos los componentes de la muestra. En el método de la normalización, se determinan las áreas de todos los picos eluidos; tras corregir esas áreas debido a las diferencias en la respuesta del detector a los distintos tipos de compuestos, la concentración del analito se calcula por la relación de su área con el área total de los picos.<sup>8</sup>

### **5. ANÁLISIS CUALITATIVO EN CLAR**

El análisis cualitativo se hace frecuentemente por técnicas cromatográficas, el procedimiento puede ser deducido considerando el cromatograma de la muestra.<sup>10</sup>

Desde el punto de vista práctico el análisis cualitativo se hace para la determinación del tiempo de retención de los compuestos puros que se supone están presentes en la muestra, estos valores son comparados después con los tiempos de retención de los picos producidos por la muestra, esta aproximación es válida solo cuando todas las condiciones cromatográficas son idénticas, cuando se realizan todas las medidas, y si se usa la misma columna cromatográfica para hacer dichas mediciones.<sup>10</sup>

#### **5.1. Cromatogramas**

Si un detector que responde a la concentración del soluto, se coloca al final de la columna, y se registra su señal en función del tiempo (o del volumen de fase móvil añadido) se obtienen una serie de picos que reciben el nombre de cromatograma y que es muy útil para el análisis cualitativo y cuantitativo. La posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para identificar los componentes de la muestra: las áreas bajo los picos proporcionan una medida cuantitativa de la cantidad de cada componente.<sup>10</sup> (Figura 2)

El cromatograma es una imagen que traduce visualmente en una pantalla o en un papel la evolución, en función del tiempo, de un parámetro que depende de la concentración instantánea del soluto a la salida de la columna. El tiempo de elución se lleva al eje de abscisas, y la intensidad de la señal detectada, al eje de ordenadas. La línea base corresponde al trazado obtenido en ausencia del compuesto eluido. La separación se completa cuando el cromatograma

presenta tantos picos que vuelven a la línea base como compuestos hay en la mezcla de análisis. Un constituyente se caracteriza por su tiempo de retención  $t_r$  que representa el tiempo transcurrido entre el instante de inyección y el determinado cuando el pico correspondiente en el cromatograma alcanza su máximo. En el caso ideal  $t_r$  es independiente de la cantidad inyectada.<sup>6</sup>

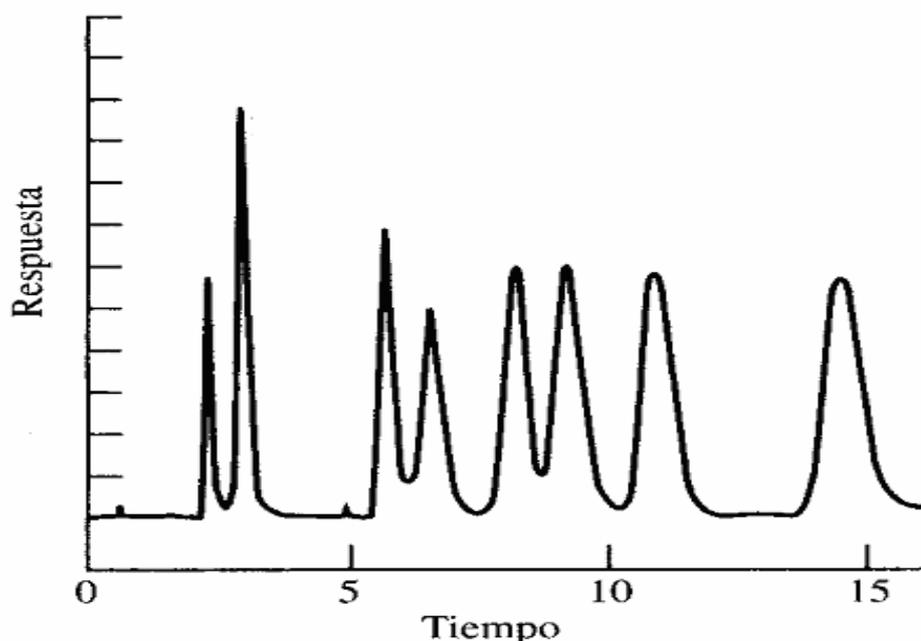


Figura 2. Representación gráfica de un cromatograma.<sup>8</sup>

Un cromatograma proporciona solo un elemento de información cualitativa acerca de cada una de las especies de la muestra, a saber, su tiempo de retención o su posición en la fase estacionaria tras un cierto periodo de elución. A partir de los cromatogramas obtenidos con diferentes fases móviles y estacionarias y a diversas temperaturas de elución, se pueden obtener datos adicionales.<sup>8</sup>

Es importante considerar que, aunque los cromatogramas no conducen a una identificación positiva de las especies presentes en la muestra, proporciona a menudo la evidencia segura de la ausencia de ciertos compuestos, así, si en la muestra no aparece un pico con el mismo tiempo de retención que el patrón en las mismas condiciones, se puede asumir que el compuesto en cuestión está ausente (o está presente a una concentración por debajo del límite de detección del procedimiento).<sup>8</sup>

Es prioritario garantizar que en la muestra no haya dos compuestos que tengan el mismo tiempo de retención, esto se puede hacer por separación de muestras

representativas sobre diversos tipos de columnas, si no se producen resultados ambiguos en todas las muestras cuando son analizadas sobre las diferentes columnas, se puede asegurar que no contienen compuestos con idénticos tiempos de retención, si se comprueba esto, entonces los tiempos de retención se pueden utilizar para el análisis cualitativo.<sup>10</sup>

## **6. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS**

La identificación de un compuesto por cromatografía corresponde a un método comparativo. Si se dispone de un compuesto del que no se sabe si se trata de A o B, su identificación por el método cromatográfico consistirá en comparar su tiempo de migración con el correspondiente a dos compuestos de referencia A y B, y todo esto sin cambiar de instrumentación y colocándolo en las mismas condiciones.<sup>5</sup>

### **6.1. Selectividad ( $\alpha$ )**

La selectividad es una función de la retención que la molécula tiene a lo largo del proceso de separación y esta reflejada por el factor de capacidad  $k'$ .

La selectividad de una columna, también referida como retención relativa o separación entre picos ( $\alpha$ ), es la relación entre los factores de capacidad ( $k'$ ) de los picos adyacentes.<sup>11</sup>

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$$

### **6.2. Tiempo de retención ( $t_r$ )**

El tiempo que transcurre después de una inyección de la muestra hasta que el pico de concentración del analito alcanza el detector se denomina tiempo de retención, el tiempo necesario para que la especie no retenida alcance el detector, se denomina tiempo muerto. La velocidad de migración de la especie no retenida coincide con la velocidad promedio del movimiento de las moléculas de la fase móvil.<sup>8</sup>

#### **6.2.1. Tiempo de retención reducido ( $t'_r$ )**

Es el tiempo de retención menos el tiempo muerto<sup>6</sup>

### 6.3. Tiempo muerto ( $t_m$ )

Es el tiempo de retención de una sustancia no retenida en la fase líquida.<sup>6</sup>

### 6.4. Volumen de retención ( $V_r$ )

Corresponde al volumen de la fase móvil que fluye entre el instante de inyección y el correspondiente a la aplicación del máximo del pico.<sup>6</sup>

$$V_r = t_r * F$$

Donde:

$t_r$ : Tiempo de retención

F: Flujo

### 6.5. Volumen muerto ( $V_m$ )

Es el volumen de la fase móvil en la columna, depende del volumen extracolumna hasta llegar al detector.<sup>4</sup>

$$V_m = t_m * F$$

Donde:

$t_m$ : Tiempo muerto

F: Flujo

### 6.6. Factor de capacidad ( $k'$ )

Este parámetro se utiliza para describir las velocidades de migración de los solutos en las columnas. Cuando el factor de capacidad (o de retención) es mucho menor que la unidad, la elución tiene lugar tan rápidamente que es difícil determinar con exactitud los tiempos de retención. Cuando el factor de capacidad es del orden de 20 a 30, los tiempos de elución son excesivamente largos. De forma ideal, las separaciones se realizan en unas condiciones en las que los factores de retención para las especies de una mezcla oscilen entre 2 y 10.<sup>10</sup>

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

## 6.7. Resolución (R)

La resolución se refiere al poder de separación de los solutos que se encuentran mezclados, y está afectada por tres factores independientes: selectividad, eficiencia y capacidad.<sup>7</sup>

La resolución R de una columna constituye una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos analitos. La resolución puede mejorarse alargando la columna, alargando así el número de platos teóricos, una consecuencia negativa de seto es que el tiempo que se requiere para la separación se incrementa mientras mayor sea la columna.

Si  $R < 1$  no hay separación

Si  $R = 1$  hay una separación aceptable

Si  $R > 2$  separación ideal.<sup>7</sup>

$$R = \frac{2 \left[ tr_B - tr_A \right]}{Wb_A + Wb_B}$$

Donde:

$t_r$ : Tiempo de retención del analito A y B

W: Anchura de los picos A y B

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left( \frac{1 + k'_B}{k'_B} \right)$$

Donde:

N: número de platos teóricos

$\alpha$ : Factor de selectividad

$k'_B$ : Factor de capacidad del analito B

## 6.8. Número de platos teóricos (N)

El término plato teórico es un concepto introducido por Martin y Synge para definir la separación cromatográfica y relacionarlo con los procesos de destilación. De esta manera un plato teórico puede considerarse como la región en la que la concentración del soluto en las dos fases es la misma que podría establecerse si el soluto estuviese en equilibrio con las dos fases en esa misma

región. La separación cromatográfica no se realiza de un modo continuo, sino en torno a zonas transversales paralelas imaginarias (platos); se puede decir que mientras más platos posea la columna, mayor capacidad separativa tendrá. La separación no se cuantifica en niveles, sino que se produce de modo continuo a lo largo de la columna, quedando definido por la sección teórica (transversal) de la columna en donde se establece un equilibrio de partición durante el flujo de la fase móvil.<sup>5</sup>

N está en función de la distribución estadística de las moléculas respecto al tiempo que tardan en salir de la columna, cuando mayor sea N, mayor será la agudeza del pico. Es decir, N quedará definido por cada tipo del cromatograma. Además, N tomará un valor distinto para cada soluto, aun en el mismo sistema cromatográfico, condiciones y fases.<sup>5</sup>

$$N = 16 \left( \frac{t_r}{w_b} \right)^2$$

### 6.9. Altura del plato (H)

El uso de H en vez de N posee dos ventajas fundamentales, ya que N queda definido por cada pico y cada columna, puesto que N aumenta con L. por el contrario, H solo depende de cada soluto y del tipo de relleno, manteniéndose constante con independencia de la longitud de la columna. Además si H define la distancia existente entre dos platos teóricos, sobre H van a actuar las condiciones iguales o diferentes. Si la mayoría de las moléculas están en idénticas condiciones, al tener poca influencia los procesos particulares, los niveles separativos se establecerán próximos, con lo que H tomara un valor pequeño y la eficiencia de la columna será grande. Por el contrario si los procesos columnares provocan que las moléculas se hallen muy dispersas, se obtendrá un valor alto de H y escasa eficiencia.<sup>5</sup>

$$H = \frac{L}{N}$$

Donde L es la longitud de la columna

N es el número de platos teóricos<sup>5</sup>

### 6.9.1. Altura del plato reducida

En la cromatografía donde la fase móvil es un líquido y para las columnas cuyo relleno esta formado por partículas esféricas, se aplica frecuentemente la altura del plato reducida ( $h$ ), en la que se considera el tamaño medio de las partículas ( $d_p$ ), lo cual permite comparar la eficiencia de las columnas rellenas de partículas de diferente tamaño, las columnas que tienen la misma relación presentan rendimiento similar.<sup>6</sup>

$$h = \frac{H}{d_p}$$

Donde:

$h$ : altura del plato reducida

$H$ : altura del plato

$d_p$ : diámetro de partícula

## 7. VARIABLES QUE AFECTAN LA EFICIENCIA DE UNA COLUMNA

Lo ideal para una separación cromatográfica es que se pueda lograr una buena separación en el menor tiempo posible.<sup>8</sup>

Al buscar las condiciones óptimas para conseguir una separación adecuada, debe tenerse en cuenta que los parámetros fundamentales  $\alpha$ ,  $k'$  y  $N$ , se pueden ajustar más o menos independientemente, de esta manera, la forma de modificar más fácilmente  $\alpha$ ,  $k'$  es variando la temperatura o la composición de la fase móvil. Aunque es menos conveniente, puede conseguirse también cambiando el relleno de la columna. Es posible cambiar  $N$  modificando la longitud de la columna y  $H$  por la alteración del caudal de la fase móvil, el tamaño de partícula del relleno, la viscosidad de la fase móvil, entre otras.<sup>8</sup>

Una forma fácil de mejorar la resolución es aumentar el número de platos teóricos de la columna, sin embargo este recurso puede resultar muy costoso, en términos de tiempo necesario para completar la separación, a no ser que el aumento de  $N$  se lleve a cabo mediante una reducción de  $H$  en vez de por alargamiento de la columna.<sup>8</sup>

## 8. VARIACIÓN DEL FACTOR DE SELECTIVIDAD

Cuando el factor de selectividad  $\alpha$  se aproxima a la unidad, optimizar  $k'$  y aumentar  $N$  no suele ser suficiente para conseguir una separación satisfactoria de dos solutos en un tiempo razonable. En estas circunstancias se debe buscar un procedimiento para aumentar  $\alpha$ , mientras  $k'$  se mantiene en el intervalo óptimo de 1 a 10, se dispone de las siguientes opciones:<sup>8</sup>

- Cambiar la composición de la fase móvil (incluyendo los cambios de pH)
- Cambiar la temperatura de la columna
- Cambiar la naturaleza de la fase estacionaria
- Utilizar efectos químicos especiales.

Para las separaciones que implican a ácidos o bases ionizables, muchas veces los cambios en el pH de la fase móvil permiten la manipulación de los valores de  $\alpha$ , si cambios importantes en  $k'$ , con lo que aumenta la eficiencia de la separación.<sup>8</sup>

Un método menos conveniente, pero con frecuencia más efectivo, de mejorar  $\alpha$  y mantener los valores de  $k'$  en su intervalo óptimo consiste en cambiar la composición química de la fase estacionaria.<sup>8</sup>

Los incrementos de temperatura, normalmente causan aumentos en  $k'$  pero tienen poca influencia sobre los valores de  $\alpha$  en cromatografía líquido-líquido y líquido-sólido. Por el contrario, en la cromatografía de intercambio iónico puede tener efectos lo suficientemente grandes como para explorar esa valiosa opción antes que recurrir al cambio de relleno de la columna.<sup>8</sup>

## 9. EFICIENCIA DE LA COLUMNA

Dos términos afines se utilizan como medidas cuantitativas de la eficiencia de la columna, la altura del plato y el número de platos teóricos, los dos están relacionados por la siguiente ecuación:<sup>8</sup>

$$N = L / H$$

Donde  $L$  es la longitud (normalmente en centímetros) del relleno de la columna. La eficiencia de la columna cromatográfica aumenta cuanto mayor es el número de platos teóricos, y cuanto menor es la altura del plato. Se han encontrado enormes diferencias en la eficiencia debido al tipo de columna y al tipo de fases, móvil y estacionaria utilizadas. La eficiencia en términos de

número de platos puede variar desde pocos cientos a varios cientos de miles; no son infrecuentes las alturas del plato que oscilan de unas pocas décimas hasta una milésima de centímetro o menos.<sup>8</sup>

Al reconsiderar  $N$  como parámetro que expresa la eficiencia de una columna, cuanto mayor sea ésta, mayor es la capacidad de separación de la columna, pero también por los procesos columnares que en ella se producen.<sup>5</sup>

## **10. OPTIMIZACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA COLUMNA**

Una separación cromatográfica se optimiza variando las condiciones experimentales hasta que los componentes de la mezcla se separan completamente en el menor tiempo posible, lo cual tiene como objetivo reducir el ensanchamiento de banda y modificar las velocidades relativas de migración de los componentes. Las variables cinéticas que incrementan  $H$ , producen ensanchamiento de banda. Por otra parte, las velocidades de migración son modificadas por aquellas variables que afectan a  $k'$  y  $\alpha$ .<sup>8</sup>

## **11. FACTORES QUE AFECTAN LAS SEPARACIONES**

El sistema de suministro de la fase móvil, la dirige hacia el sistema de introducción de la muestra y a través del resto del instrumento, la columna separa la muestra en sus componentes y el detector “detecta” la concentración instantánea de los diversos constituyentes de la muestra cuando se eluye en la columna.<sup>10</sup>

### **11.1. Ensanchamiento de banda.**

Se produce como consecuencia de la velocidad con la que ocurren los distintos procesos de transferencia de masa durante la migración de una especie a lo largo de la columna.<sup>10</sup>

### **11.2. Influencia de la fase móvil.**

La magnitud de los efectos cinéticos sobre la eficiencia de la columna depende claramente del tiempo de contacto entre la fase móvil y la fase estacionaria, el cual a su vez depende del caudal de la fase móvil.<sup>10</sup>

La adecuada elección de la composición de la fase móvil depende de diversos factores. Primero, la fase móvil debe tener una polaridad apropiada, además los componentes de la fase móvil generalmente deben tener baja viscosidad. Los componentes de alta viscosidad requieren operar con presiones más altas, lo que conlleva a una reducción en el tiempo de vida de la columna y a un incremento en la frecuencia de escapes de líquidos.<sup>10</sup>

### **11.3. Velocidad de flujo**

La velocidad de flujo tiene un efecto considerable sobre el tiempo de retención de los constituyentes de la muestra. A mayor velocidad de flujo menor tiempo de retención. La velocidad de flujo más rápida, pero la correlación velocidad de flujo-tiempo de retención es invariable.<sup>10</sup>

### **11.4. Temperatura**

En muchos análisis críticos por CLAR, variar la temperatura puede provocar cambios significativos en los tiempos de retención, dificultando el análisis cualitativo y afectando la precisión de las mediciones cuantitativas, las temperaturas elevadas son ventajosas porque la disminución en la viscosidad de la fase móvil, el aumento en la transferencia de masa y el aumento en la solubilidad de la muestra dan como resultado en una mejor resolución o un análisis más rápido. Conforme la temperatura se aumenta los valores de  $k'$  disminuyen y los picos se vuelven más agudos. Esta observación es bastante general para la mayoría de las formas de la CLAR. Una excepción es la cromatografía de intercambio iónico, en la que frecuentemente se observan cambios en la selectividad con los cambios de temperatura.<sup>12</sup>

Un incremento en la temperatura de la columna produce una reducción en el tiempo de retención para todos los componentes de la muestra, además se tiende a obtener mejores separaciones aumentando la temperatura de la columna.<sup>10</sup>

### **11.5. Caída de presión**

La caída de presión varía inversamente con el tiempo de retención. Aun cuando un aumento en la presión puede incrementar el número de platos máximo alcanzable, la generación de calor en el interior de la columna, como

resultado del trabajo hecho al forzar la fase móvil a través de ella a una presión muy alta, puede degradar seriamente el funcionamiento de la columna. Las presiones arriba de las 5000 psi (340atm) parecen no ser redituables para la mayoría de las separaciones de CLAR.<sup>12</sup>

#### **11.6. Diámetro de partícula de la fase estacionaria:**

Para cada tiempo de separación y presión de operación existe un diámetro de partícula óptima para el que la cuenta de platos es máxima. Los rendimientos analíticos mejoran notablemente cuando el diámetro de partícula se reduce, en especial cuando la columna se opera a la velocidad óptima. Cada vez que el diámetro de partícula se reduce a la mitad, la caída de presión necesaria crece en un factor de aproximadamente cuatro. A menudo, no obstante, la longitud de la columna puede reducirse significativamente. Desde el punto de vista de alcanzar con rapidez un número de platos alto, no hay condiciones prácticas de operación cuando son deseables partículas mayores de 5  $\mu\text{m}$ . N también es directamente proporcional a la longitud de la columna. Por supuesto, siempre se debe tener en mente que la resolución entre dos picos es proporcional sólo a la raíz cuadrada de N. El uso de partículas aún más finas o de columnas más largas con partículas del mismo tamaño requiere de presiones que excedan los 5000 psi, el límite práctico superior. Se encuentran disponibles columnas comerciales con materiales de empaque con diámetros de 3,5, y 10  $\mu\text{m}$ .<sup>12</sup>

#### **11.7. Viscosidad**

En CLAR siempre se prefiere un disolvente con viscosidad baja, mientras se mantenga constante la caída de presión a través de la columna, un aumento en la viscosidad del disolvente siempre disminuye el gasto de la fase móvil. Los coeficientes de difusión de los solutos también son afectados por la viscosidad de la fase móvil.<sup>12</sup>

#### **11.8. Forma de los picos cromatográficos**

La anchura de una banda aumenta a medida que se mueve a través de la columna, debido a que se dispone de más tiempo para que la dispersión tenga lugar. Por ello la anchura de la zona esta relacionada directamente con el

tiempo de permanencia en la columna, e inversamente con la velocidad a la que fluye la fase móvil.<sup>8</sup>

### **11.9. Factor de asimetría**

Algunos picos cromatográficos presentan cierta asimetría. Dicha asimetría se observa siempre en la parte descendente del pico, representando una distribución y liberación imperfecta del soluto por parte de la columna, así como otros efectos instrumentales en las partes insertas desde el inyector hasta el mismo detector.<sup>5</sup>

Para cuantificar la asimetría, se puede calcular el factor de asimetría  $f$ , definido por la relación entre las semianchuras del pico tomadas al 5 por ciento de la altura del pico, por encima de la línea de la base. En general los valores de  $f$  mayor o igual a 1,2 significan una apreciable asimetría, por lo tanto con menor eficiencia y resolución.<sup>5</sup>

### **11.10. Velocidad de migración de los solutos**

La eficiencia de una columna cromatográfica para separar dos solutos depende en parte, de las velocidades relativas con que eluyen las especies. Estas velocidades están determinadas por la magnitud de las constantes de los equilibrios en función de las cuales las especies se distribuyen entre las fases estacionaria y móvil.<sup>6</sup>

## **12. TIPOS DE SEPARACIONES CROMATOGRÁFICAS MÁS USADAS EN CLAR**

En cromatografía de líquidos existen múltiples tipos de separaciones que difieren por el mecanismo que rige la separación y por la naturaleza de la fase estacionaria y móvil de los cuales los más importantes son:<sup>13</sup>

### **12.1. Cromatografía de adsorción o fase normal**

La cromatografía de fase normal se utiliza típicamente utilizando dos adsorbentes, con o sin modificaciones químicas de su superficie. Las fases móviles utilizadas es fase normal con fases estacionarias no modificadas son disolventes orgánicos puros, prácticamente anhidros o con muy bajo contenido

de agua, de donde deriva la mayor dificultad práctica de esta técnica de separación. Para conseguir resultados reproducibles en fase normal, es necesario mantener constante el contenido de agua de la fase móvil.<sup>13</sup>

El adsorbente más ampliamente utilizado en este tipo de cromatografía es la silicagel. Esta consiste en polímeros no cristalinos de óxido de silicio hidratados ( $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ), siendo un sólido poroso y estable a valores de pH de 2 a 8. La superficie presenta grupos silanol y siloxano, de éstos los primeros son considerados los más importantes para la separación, estando ligeramente ácidos, aunque no uniformemente, ya que la fortaleza depende de su posición. La superficie puede ser tratada químicamente para recubrirla con otros grupos funcionales (fase ligada) que cambia sus propiedades, aunque no el tipo de separación. De esta forma se producen fases con base en sílice ligada con grupos amino, ciano, nitro o diol y que presentan ventajas indiscutibles con respecto a la sílice.<sup>8, 13</sup>

En cromatografía de adsorción, dos fuerzas intermoleculares juegan el papel fundamental en la separación de las moléculas: las fuerzas de Van der Waals, que existen entre la fase estacionaria y las moléculas adsorbidas, las cuales dependen de la masa relativa del soluto y del disolvente, las fuerzas electrostáticas asociadas a ambas fases juegan también un importante papel, estando relacionadas con la polaridad molecular.<sup>13</sup>

Este tipo de separación se utiliza generalmente para moléculas de elevada solubilidad en disolventes orgánicos y bajo peso molecular, aunque en la actualidad se utiliza más la cromatografía de fase reversa.<sup>13</sup>

## **12.2. Cromatografía de exclusión**

La cromatografía de exclusión por tamaño, es una técnica más valiosa que se aplica particularmente a especies de elevado peso molecular. Los rellenos para la cromatografía de exclusión por tamaño están constituidos por pequeñas partículas (aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ ) poliméricas o de sílice que contienen una red de poros uniforme en los que pueden difundir las moléculas del soluto y del disolvente. Las moléculas son atrapadas eficazmente en los poros y eliminadas del flujo de la fase móvil. El tiempo de residencia medio en los poros depende del tamaño efectivo de las moléculas de los analitos. Las moléculas que son

más grandes que el tamaño medio de los poros de relleno son excluidas y de esta forma, esencialmente no se retienen y por lo tanto, son las primeras que eluyen. Las moléculas que tienen diámetros que son significativamente menores, pueden penetrar a través del laberinto de poros y así resultan atrapadas durante más tiempo, éstas son las últimas en eluir.<sup>8, 13</sup>

### **12.3. Cromatografía de intercambio iónico**

Se utiliza para la separación y determinación de iones que se basa en el uso de las resinas de intercambio iónico. Es aplicable a la separación de casi cualquier tipo de molécula. La fuerza de atracción entre moléculas que llevan grupos cargados de signos opuestos se utilizan en CLAR de dos maneras diferentes: cromatografía de par iónico, la cual se destina principalmente a moléculas muy pequeñas e ionizables; y cromatografía de intercambio iónico que hace uso de la capacidad de las cargas ligadas a partículas para adsorber reversiblemente moléculas de gran peso molecular.<sup>8, 13</sup>

### **12.4. Cromatografía de fase reversa**

En la cromatografía de fase reversa, la fase estacionaria está representada por partículas de silicagel enlazadas covalentemente con cadenas de hidrocarburos, que representan la fase hidrófoba, mientras que una mezcla acuosa conteniendo cierta cantidad de disolvente orgánico polar como acetonitrilo o metanol, representa la fase hidrófila y constituye la fase móvil. La partición de los componentes de la muestra entre las dos fases dependerá de sus respectivas solubilidades. Los componentes más hidrófobos, terminarán en la fase hidrófoba.<sup>13</sup>

El comportamiento de separación cromatográfica en fase inversa es en hidrofobicidad creciente o polaridad decreciente.<sup>13</sup>

Existen varios tipos de separaciones cromatográficas usadas en cromatografía de fase reversa, dentro de las cuales, las más utilizadas son:

- De reparto simple
- De supresión iónica.
- De pares ionicos.<sup>13</sup>

## **13. CARACTERÍSTICAS E INTERACCIONES DE LA FASE ESTACIONARIA**

Independientemente del tipo de separación utilizada, las características fundamentales de las fases estacionarias utilizadas en CLAR, son las siguientes:<sup>7</sup>

### **13.1. Composición química de la fase**

La cromatografía en fase normal emplea fases estacionarias polares, tales como gel de sílice, óxido de aluminio, celulosa y disolventes relativamente no polares. En cambio, la cromatografía en fase reversa utiliza fase estacionaria hidrofóbica y disolventes de polaridad mediana o alta.<sup>7</sup>

En la cromatografía en fase normal los compuestos migran en orden de polaridad (el más polar cerca del origen) y de la cromatografía en fase reversa los compuestos migran en orden contrario: los menos polares cerca al origen y los más polares cerca al frente del eluyente.<sup>7</sup>

Para la cromatografía en fase reversa se emplea como fase estacionaria generalmente gel de sílice silanizada, en la cual, el gel de sílice se derivatiza con diclorometilsilano, diclorodioctilsilano o diclorododecilsilano para producir una fase enlazada no polar.<sup>7</sup>

### **13.2. Fuerzas de elución fase móvil- soluto**

La solubilidad es evidentemente un problema de polaridad. Por tanto, si el hecho de eluir va a ser función de la polaridad obedecerá a la dispersión de las moléculas del soluto entre las de la fase móvil, lo cual depende de la localización de las cargas de cada especie molecular. Se tienen en cuenta estas fuerzas electrostáticas.<sup>5</sup>

También, se deben tomar en cuenta las fuerzas dipolo-dipolo. Esto es usual para los disolventes polares como agua, metanol, acetonitrilo, etc. A causa de la diferencia de electronegatividad existente entre algunos agrupamientos, se produce una localización de la carga, formándose un dipolo de tipo permanente. Por ejemplo, en el caso del metanol si la molécula de soluto es

polar y no es preciso en realidad que lo sea mucho, se verá atraída por los dipolos de la fase móvil y se unirá electrostáticamente a ellos, siendo eluída. Al tratarse de fuerzas electrostáticas, serán relativamente intensas. Como los dipolos formados por la fase móvil, también pueden unirse entre sí cuanto mayor sea su polaridad, mayor unión dipolo-dipolo habrá mayor compactación, lo cual se puede medir mediante el índice de refracción de la disolución resultante.<sup>5</sup>

Si el dipolo permanente es inherente a la naturaleza de la fase móvil, fases móviles, en principio, no dipolares, pueden formar un dipolo temporal en estos casos. Cuando la fase móvil llega a las proximidades de la molécula de soluto, pueden existir interacciones de los electrones del soluto con los de la fase móvil, produciendo un dipolo. Los electrones de la molécula de soluto. Por regla general, están dispuestos de modo que no generan dipolo ninguno pero, al moverse, en un momento dado se sitúan de forma que la carga efectiva ya no es simétrica formando el dipolo permanente. Este en proximidad con las moléculas de la fase móvil inducirá en ellas una localización electrónica, y por tanto, un dipolo. Ambos se unen y así se puede sustraer de la fase estacionaria la molécula de soluto.<sup>5</sup>

Tanto en el caso de los dipolos permanentes como en el de los temporales, existe un caso particular y es el de las macromoléculas o moléculas relativamente grandes. El mecanismo será el mismo, tanto en un caso como en otro, pero estas grandes moléculas precisan rodearse de muchas de fase móvil de muchos dipolos con su correspondiente fuerza cada uno, para eluir. Así, si la polaridad de la fase móvil es de importancia capital para la separación cromatográfica se tendrá presente que esta polaridad es aportada por los distintos grupos polares o radicales sobre las moléculas base del disolvente.

Muchas veces, la sustitución de una fase móvil por otra idéntica salvo que en su molécula se ha reemplazado un radical por otro más o menos polar, resulta de particular interés.<sup>5</sup>

Otra causa de fijación de las moléculas de la fase móvil a los solutos y, por tanto, de elución, se refiere a las eventuales interacciones eléctricas entre las

moléculas ionizadas de soluto con las moléculas de los disolventes altamente polares, tales como agua, alcoholes de cadena corta, acetonitrilo, etc. El soluto ionizado es capaz de polarizar las moléculas circundantes de disolvente; la consecuencia es una atracción electrostática mutua, tanto más apreciable cuanto mayor sea la ionizabilidad del soluto y la polaridad de la fase móvil que se utiliza.<sup>5</sup>

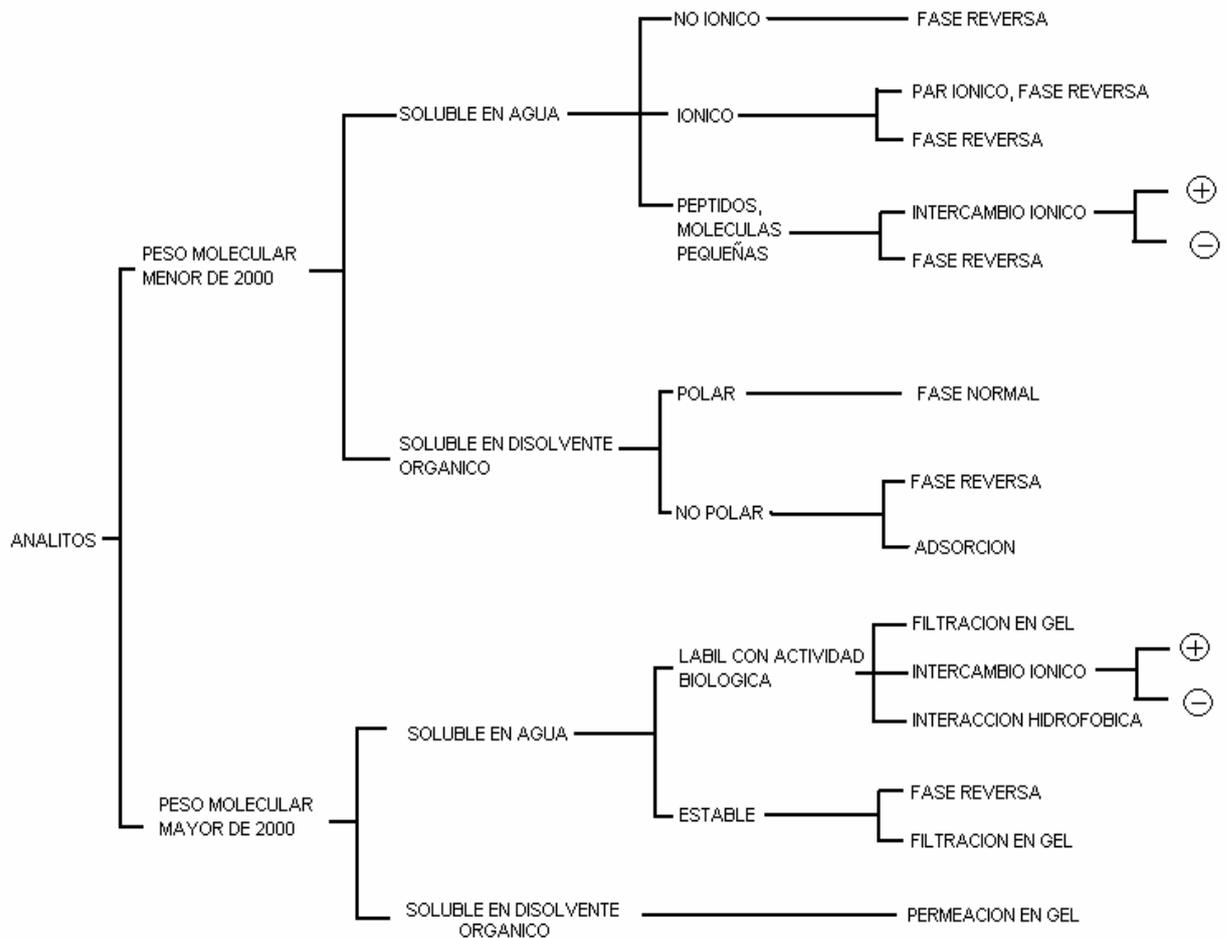
### **13.3. Sustancias disociadas y no disociadas**

En primer lugar, si la mezcla está formada por sustancias disociadas y no disociadas, se pueden separar los grupos porque las últimas no se retienen en los intercambiadores a menos que se presenten otros fenómenos, como la adsorción.<sup>6</sup>

### **13.4. Cargas**

Si la mezcla contiene compuestos con iones de carga opuesta, para separar los unos de los otros se debe emplear resinas catiónicas y aniónicas, si las sustancias tienen diferente carga se pueden separar por elución en la columna, teniendo en cuenta que los de carga mayor tienen mayor afinidad por el intercambiador.<sup>7</sup>

Suelen existir varias formas adecuadas de separar los componentes de una mezcla dada. Si el peso molecular del analito es menor de 2000 g/mol se utiliza una de las técnicas que se muestran en la parte superior de la figura 3, si es mayor, se emplea la parte inferior. En ambas partes, la primera pregunta es si los solutos se disuelven en agua o en disolventes orgánicos. Supóngase que se tiene una mezcla de moléculas pequeñas (peso molecular <2000) solubles en diclorometano. La fuerza elutrópica del diclorometano (0.42) es más cercana a la del cloroformo (0.40) que a la de alcoholes, acetonitrilo o acetato de etilo (> 0.58). Por tanto la Figura 3 sugiere intentar la cromatografía de adsorción para la cual la sílice microporosa es con mucho la fase estacionaria más común para CLAR.<sup>14</sup>



**Figura 3.** Elección del tipo de cromatografía según el analito de interés

Si los solutos sólo son solubles en hidrocarburos, el árbol de decisión sugiere que se intente la cromatografía de fase reversa. Ahora nuestras elecciones son muchas y se dispone de fases ligadas que contienen grupos octadecilo ( $n\text{-C}_{18}\text{H}_{37}$ ), octilo, butilo, etilo, metilo, fenilo, y ciano.<sup>14</sup>

Si los solutos tienen peso molecular  $>2000$ , son solubles en disolventes orgánicos y su diámetro molecular es  $>30$  nm, la figura sugiere intentar la cromatografía de exclusión molecular. Si los solutos tienen peso molecular  $>2000$ , son solubles en agua pero no iónicos, y tienen diámetro  $<30$  nm., el árbol de decisión indica usar cromatografía de fase inversa ligada (como  $\text{C}_{18}$  – sílice) o cromatografía de interacción hidrófoba.<sup>14, 15</sup>

La cromatografía de interacción hidrofóbica se basa en la interacción de una fase hidrófoba estacionaria con un soluto hidrófobo. (Las sustancias hidrófobas son insolubles en agua y no atraen ésta hacia su superficie; las sustancias

hidrófilas son solubles en agua y la atraen hacia su superficie). La partícula masiva está hecha de polímero de estireno- divinilbenceno con poros que miden unos 100 nm. de diámetro, a través de los cuales pueden difundirse la mayoría de las moléculas. La superficie del polímero está recubierta de muchos grupos fenilo o de polietilenglicol, sustancias ambas que pueden interactuar con solutos hidrófobos y constituir de este modo medios para la separación cromatográfica.<sup>14, 15</sup>

## **14. FASE MÓVIL**

### **14.1. Requerimientos de la fase móvil**

Los disolventes que se utilizan como fase móvil en CLAR tienen que cumplir con elevados requisitos de calidad:<sup>13</sup>

Características:

- Disponible comercialmente.
- Costo.
- Miscible con otros disolventes.
- Pureza y Estabilidad.
- Debe poder solubilizar el analito
- Compatible con el detector<sup>13,16</sup>

Los disolventes utilizados en todas las aplicaciones de CLAR requieren elevada pureza (grado CLAR) que cumplen con estándares de calidad analítica corrientes. La calidad adicional esta relacionada con su pureza en primer lugar, que es similar a los disolventes de grado espectrofotométrico, pero adicionalmente son sometidos a filtración por membranas de 0,2 a 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.<sup>13</sup>

- No degradar o disolver la fase estacionaria (inerte). Las fases móviles no deben reaccionar ni someterse a polimerización con ninguna de las partes del sistema cromatográfico, incluyendo la muestra y la fase estacionaria.<sup>13,16</sup>
- Tener baja viscosidad para reducir las caídas de presión. La viscosidad es una de las propiedades más importantes en lo relativo a la caída de

presión en el sistema. Siempre que sea posible utilizar un disolvente menos viscoso, es lo ideal.<sup>13,16</sup>

- Ser compatible con el detector utilizado. Transparencia óptica (cuando se usan detectores UV). Las propiedades de los disolventes que se usan tienen una gran importancia en relación con el sistema de detección a utilizar. La detección más utilizada en CLAR es la espectrofotométrica en el rango ultravioleta, que requiere de la utilización de disolventes “transparentes” a la longitud de onda de medición. Cada disolvente posee una longitud de onda de corte en el rango ultravioleta, por lo cual no se recomienda o no es posible la medición.<sup>13, 17</sup>
- Temperatura de ebullición. Debe utilizarse, dentro de lo posible, disolventes de puntos de ebullición intermedios (50-80°C), los de muy bajo punto de ebullición tienden a evaporarse durante el proceso de separación y este cambio provoca fenómenos indeseables como cambios en la composición de la fase móvil, así como la aparición de burbujas en la celda del detector, por otro lado los disolventes que tienen temperaturas de ebullición elevadas, tienen también elevada viscosidad, lo que incrementa la caída de presión del sistema.<sup>13</sup>
- Elevado poder de disolución de las muestras. El disolvente que se utilice como fase móvil debe disolver completamente a la muestra, de lo contrario se podría dañar alguna de las partes del equipo.<sup>13</sup>
- Seguridad. Debe evitarse el uso de disolventes tóxicos, altamente inflamables o muy volátiles, como benceno, tetracloruro de carbono, piridina, etc.<sup>13</sup>

#### **14.2. Preparación de la fase móvil**

Se debe verificar rigurosamente que el pH de las soluciones amortiguadas ya que el rango de trabajo de las columnas cuya base es silica gel esta entre dos a ocho. En este paso debe tenerse en cuenta que en mezclas de fases acuosas con disolventes orgánicos, el pH medido es diferente al real, especialmente a elevadas concentraciones del disolvente.<sup>13</sup>

### **14.3. Tratamiento de disolventes**

En la actualidad CLAR ha llegado a ser una de las técnicas del laboratorio moderno más importantes como herramienta analítica para separar y detectar compuestos químicos. Como en todas las técnicas analíticas, los pequeños problemas a la larga pueden llegar a tener un mayor impacto en la exactitud y durabilidad del sistema.<sup>17, 18</sup>

Hasta los disolventes para CLAR, todos filtrados cuidadosamente en la fábrica, pueden acumular partículas en suspensión que pueden ser perjudiciales a los componentes del sistema CLAR. Estas partículas en suspensión pueden venir de varias fuentes, incluso de la exposición al polvo en el aire durante el trasegado de disolvente en su depósito, la exposición a partículas del aire durante el almacenamiento, la degradación lenta del disolvente, o de condensación y polimerización del mismo. Las partículas pueden ocasionar costosos daños a la bomba CLAR, y en general causar desgaste del sistema.<sup>16</sup>

El Nitrógeno disuelto es el otro componente de la atmósfera que puede producir burbujas en la columna de CLAR y cuando el disolvente entra al detector produce picos falsos y desviaciones de la línea base. El dióxido de carbono disuelto algunas veces puede ser la causa de los cambios de pH en el sistema de disolvente.<sup>17</sup>

#### **14.3.1. Filtración**

Como paso previo al análisis, la filtración de la fase móvil resulta un paso casi ineludible. La filtración de la fase móvil se realiza con el fin de eliminar de ésta las partículas suspendidas o crecimientos bacterianos que pudieran provocar obstrucciones en las partes del equipo más vulnerables (precolumna, columna, inyector y tuberías).<sup>13</sup>

El proceso de filtración se efectúa colocando una membrana de 0,5 µm de diámetro químicamente compatible con el disolvente en cuestión en un equipo similar. El equipo de filtración para CLAR está fabricado enteramente de vidrio para garantizar su compatibilidad con las fases móviles.<sup>13</sup>

#### **14.3.2. Desgasificación**

Tiene como objetivo eliminar de la fase los gases y el aire disuelto. La presencia de aire o gases en la fase móvil trae dificultades tales como:

- Aparición de burbujas en los cabezales de la bomba, interrumpiendo el flujo de la fase móvil.<sup>13</sup>
- Aparición de burbujas en la celda del detector, lo que hace inviable la detección.<sup>13</sup>
- Alteración de la señal de algunos detectores, como el UV en el rango lejano, fluorescente y electroquímico.<sup>13</sup>

Los métodos de desgasificación más usados en CLAR son los siguientes:

#### **14.3.3. Vacío**

Al aplicarse vacío a una solución, la presión parcial de los gases que se encuentran en equilibrio con ésta disminuirá, con lo que saldrán de la fase líquida los gases disueltos en ella.<sup>13</sup>

#### **14.3.4. Ultrasonido**

Se coloca el frasco de la fase móvil ya lista para usar un baño de ultrasonido, se aplica durante 5 a 15 minutos, en el cual la alta frecuencia evita que se formen las microburbujas, este método es el menos eficiente, pero el de más fácil aplicación.<sup>13</sup>

#### **14.3.5. Calentamiento**

El calentamiento de las soluciones de fase móvil, usualmente hasta condición de reflujo, hace menos viscosas las mismas, propiciando la salida de los gases.<sup>13</sup>

#### **14.3.6. Saturación de la fase móvil con gases inertes**

Es uno de los métodos de desgasificación más eficientes y tiene la ventaja de que se puede aplicar directamente en el reservorio de la fase móvil del equipo.<sup>13</sup>

### **14.4. Instrumentación para CLAR**

#### **14.4.1. Recipientes para contener los disolventes para la fase móvil**

La fase móvil debe suministrarse a la columna por medio de algún tipo de bomba. Para obtener separaciones basadas tanto en tiempo de análisis corto o

bajo presión óptima, es deseable un intervalo amplio de presiones y gastos. El sistema de bombeo debe estar libre de pulsos o tener un amortiguador de pulsos para evitar generar en el detector inestabilidad de la línea base.<sup>19, 20</sup>

Se utilizan válvulas o lazos (bucles de muestreo) para inyectar la muestra en el flujo de fase móvil justo en la cabeza de la columna de separación. Las muestras deben disolverse en una porción de la fase móvil (si es posible) para eliminar el innecesario pico del disolvente.<sup>19</sup>

Delante de la columna de separación puede haber un guardacolumna o un filtro en línea para impedir la contaminación de la columna principal por partículas pequeñas.<sup>19</sup>

La columna de separación contiene el empaque necesario para efectuar la separación de CLAR deseada. Estos pueden ser sílices para cromatografía de adsorción, fases enlazadas para cromatografía líquido-líquido, grupos funcionales de intercambio iónico enlazados al soporte estacionario para cromatografía de intercambio iónico, geles de porosidad específica para cromatografía líquido – líquido, grupos funcionales de intercambio iónico enlazados al soporte estacionario para cromatografía de exclusión o algún otro empaque exclusivo para un método de separación en particular.<sup>19</sup>

Un detector con algún tipo de dispositivo para el manejo de datos completa la instrumentación básica.<sup>19</sup>

#### **14.4.2. Sistema de suministro de la fase móvil.**

La fase móvil debe ser suministrada a la columna en un intervalo amplio de gastos (o flujos) y presiones. Para poder utilizar una variedad de disolventes orgánicos e inorgánicos, la bomba, sus sellos y todas las conexiones deben estar hechos de materiales químicamente resistentes a la fase móvil. Si el sistema no está libre de pulsos, se necesita alguna forma de amortiguación de pulsos. Se requiere de un desgasificador para remover el disolvente el aire y otros gases disueltos. Otra característica deseable en el sistema de suministro de disolvente es la capacidad de generar un gradiente de disolvente.<sup>12, 20</sup>

Una bomba debe ser capaz de operar por lo menos a 100 atm (1500psi), una presión adecuada para los cromatógrafos más económicos. De todas formas, 400 atm (6000 psi). Es un límite de presión más deseable. Para muchas de las

columnas analíticas sólo es necesario generar gastos moderados de 0.5-2 mL/min. Las columnas de microcalibre requieren de gastos tan bajos como unos cuantos microlitros por minuto.<sup>12, 21</sup>

## **15. COMPONENTES BÁSICOS DE UN SISTEMA CROMATOGRÁFICO**

### **15.1. Bombas**

El sistema de bombeo tiene como objetivo impulsar la fase móvil a través de la columna y debe cumplir ciertas especificaciones como reproducibilidad y precisión, manteniendo un flujo laminar y de velocidad constante.<sup>9</sup>

Requisitos o aspectos más importantes que debe reunir una bomba o sistema de bombeo:

- Debe producir presiones estables hasta 6000 psi.
- Mantener el flujo libre de pulsaciones.
- Generar intervalos de caudales de flujo (0,1 a 10 mL/min).
- Control y reproducibilidad del flujo de disolvente.
- Componentes de la bomba resistentes a la corrosión.

Existen básicamente dos tipos de bombeo, las bombas de flujo constante y las bombas de presión constante.

#### **15.1.1. Bombas de flujo constante.**

Mantienen una velocidad de flujo de la fase móvil constante. Entre éstas se encuentran las “bombas recíprocas”, que funcionan a base de pistones en número par, los cuales impulsan el disolvente que entra a las cámaras con una capacidad de volumen pequeña; estas bombas pueden generar pulsaciones de la fase móvil que producen perturbaciones en la línea base; las pulsaciones se corrigen mediante dispositivos especiales.<sup>9, 21</sup>

Otro tipo de bombas de flujo constante, son las bombas de desplazamiento positivo que pueden tener dos formas: como jeringa o como amplificador hidráulico. La primera es parecida a una jeringa cuyo émbolo actúa mediante

un espiral que empuja el disolvente y la segunda amplifica la presión del disolvente mediante su sistema hidráulico. Este tipo de bomba reduce las pulsaciones del disolvente.<sup>9, 21</sup>

### **15.1.2. Bombas de presión constante**

Las bombas de presión constante tienen la desventaja de que es necesario mantener la viscosidad del disolvente, la temperatura de la columna y la presión constantes, la ventaja es que si estos parámetros se mantienen, se controlan totalmente las pulsaciones. La forma más sencilla de estas bombas, emplea presión de un gas inerte para presurizar el disolvente. El problema es que parte del gas se disuelve en el disolvente y esto forma burbujas en el sistema. Otro sistema para estas bombas emplea un amplificador neumático que reduce el efecto del gas utilizando un pistón, reduciendo de esta manera el contacto del disolvente con el gas comprimido.<sup>9</sup>

Normalmente son sistemas isocráticos, es decir que mantienen constante la proporción de los disolventes en la fase móvil, sin embargo, los sistemas generalmente no son aplicables a separaciones en mezclas de solutos con valores muy variables de  $k'$ , en donde es necesario utilizar sistemas de elución con gradiente. Estos sistemas utilizan dos bombas que son programables para modificar, en forma lineal o exponencial (gradiente cóncavo o convexo), las proporciones iniciales de los disolventes que componen la fase móvil se encuentran separados y alimentando cada uno su respectiva bomba.<sup>9</sup>

Los disolventes se mezclan en la proporción deseada en una cámara que se encuentra antes de la columna. El inconveniente del gradiente es que su uso es muy difícil con ciertos detectores como los refractómetros.<sup>9</sup>

### **15.2. Sistemas de inyección de muestra**

Estos sistemas han variado durante la historia del sistema de CLAR, en un principio se utilizaba la inyección de la muestra con jeringas de alta presión las cuales ya están de desuso. Hoy se utiliza el sistema de válvulas inyectoras.

La elución implica el transporte de una especie a través de una columna por la adición de fase móvil, después de lo cual los componentes de la muestra se distribuyen entre las dos fases, las sucesivas adiciones de la fase móvil hacen

avanzar las moléculas de soluto por la columna en una serie de continuas transferencias entre las fases estacionaria y móvil.<sup>8</sup>

Las fuerzas de elución y de retención dependen de la estructura molecular, resaltando que adquieren magnitudes distintas según sus características fisicoquímicas.

### **15.3. Detectores**

En CLAR existen fundamentalmente tres tipos de detectores:

El primer tipo se basa en la detección de una diferencia entre una propiedad de la fase móvil y esta misma durante la elución del soluto, tal como el índice de refracción, la constante dieléctrica o la densidad, que se modifica por la presencia de los analitos. El detector más comúnmente usado en este tipo es el de índice de refracción. Generalmente se les conoce como detectores de masa. Se les considera poco sensibles y poco selectivos.<sup>11, 13</sup>

El segundo detector es conocido como detector de soluto: en este caso se utiliza la propiedad física del soluto que no es inherente a la fase móvil, para su detección. Esta misma propiedad, por supuesto, debe estar ausente o minimizada en la propia fase móvil. Los detectores de este tipo más ampliamente utilizados son: el detector de absorción UV, fluorescencia, radioquímico y electroquímico; su uso necesita de la elución en un sistema de disolventes que no interfiera con la detección del soluto.<sup>11, 13</sup>

El tercer tipo de detectores de CLAR son los de transformación de fase, aunque este tipo no es muy ampliamente usado, ya que generalmente operan mediante la eliminación de la fase móvil por evaporación antes de medir el soluto; de este tipo el más novedoso es el espectrómetro de masas acoplado a CLAR.<sup>13</sup>

Los detectores más comúnmente utilizados son:

#### **15.3.1. Detector fotométrico de longitud de onda fija**

El principio de la detección fotométrica, basado en la absorción de luz provocada por el soluto es el más utilizado en HPLC, gracias a que casi todas las sustancias presentan absorción de luz en este rango del espectro.

La concentración del soluto esta directamente relacionada a la fracción de la luz transmitida por la ley de Lambert- Beer: <sup>13</sup>

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \times l \times C$$

A: Absorbancia

$I_0$ : intensidad de la luz incidente

I: Intensidad de la luz transmitida

$\epsilon$ : coeficiente de extinción molecular del soluto

l: Longitud del camino óptico de la celda

C: concentración del soluto<sup>13</sup>

Se considera a la detección UV como selectiva ya que se elige la longitud de onda de mayor absorbancia de acuerdo con la sustancia que se desea conocer, pero debe tenerse en cuenta que en el rango del UV lejano (190-220nm) la mayoría de las sustancias presenta absorbancia. La sensibilidad de la mayor parte de los compuestos esta en el orden de los ng, lo que posibilita el análisis de cantidades trazas. Existen tres tipos de detectores fotométricos:<sup>13</sup>

- Fotómetros de filtro de longitud de onda fija.

Están diseñados para lecturas a una sola longitud de onda. Se utiliza una lámpara de deuterio o halógeno a diferentes longitudes, las más frecuentes son a 200, 220, 254 y 280nm.

Son más sensibles, económicos y robustos, pero su limitación consiste en que no es posible seleccionar aleatoriamente la longitud de onda de detección.<sup>13</sup>

- Detector UV- visible de longitud de onda variable.

Es el más utilizado ya que ofrece como ventaja la libre selección de la longitud de onda de trabajo sin necesidad de cambiar filtros o lámparas. Permite trabajar desde 190 hasta 700 u 800nm debido a que utiliza una red de difracción que consiste en un prisma que posibilita, mediante su rotación, seleccionar la longitud de onda de trabajo de forma continua y o discreta como los detectores fotométricos.<sup>13, 22</sup>

Estos detectores utilizan también como fuente de luz una lámpara de deuterio o halógeno, que en algunos modelos puede ser intercambiada por una de tungsteno para la detección en el rango visible.<sup>13</sup>

- Detector de arreglo de diodos.

En este tipo de detector, la lámpara de deuterio o tungsteno es dirigida a través de la celda del detector hacia un arreglo u ordenamiento de diodos que se encargan de su detección con elevada precisión. Permite la determinación espectral continua durante la elución, eliminando completamente los problemas relacionados con detener el flujo para realizar el barrido del espectro UV-visible. Permite detectar entre 190 y 1000nm asegurando la resolución de menos de un nanometro por diodo, por lo que no hay posibilidad de corrimientos de banda por desajustes en la parte óptica del detector.

### **15.3.2. Detector de fluorescencia.**

Este detector es uno de los más sensibles usados en HPLC. Su funcionamiento se basa en la capacidad de de ciertas moléculas de emitir un fotón en el rango del ultravioleta a una longitud de onda diferente a su rango de absorción.<sup>13</sup>

La fluorescencia se detecta por medio de un detector fotoeléctrico colocado perpendicularmente respecto al haz de excitación.<sup>11</sup>

Su selectividad es uno de sus mayores atributos, aunque se limita a sustancia como aquellas que poseen una estructura cíclica conjugada, como: aflatoxinas, bifenilos policlorados (PCB), aminoácidos aromáticos, vitaminas A1, B2, B6 y E, fenoles, etc.<sup>13</sup>

### **15.3.3. Detector electroquímico.**

El detector electroquímico es altamente sensible y específico. Su utilización esta destinada a la cuantificación de sustancias que poseen algún potencial de oxidación o reducción. Esta reacción ocurre de forma similar cuando un reactivo químico suministra un grupo funcional que participa en una reacción. El electrón requiere de cierta cantidad de energía para iniciar la reacción. Esta energía es suministrada por la diferencia de potenciales aplicada al electrodo por una fuente potenciométrica.<sup>13, 23</sup>

#### **15.3.4. Detector de índice de refracción.**

Este detector se considera universal, al detectar el paso de prácticamente cualquier sustancia en virtud de las diferencias de índice de refracción de éste con la fase móvil. Su aplicación está dada para sustancias que normalmente tienen muy poca o ninguna absorbancia en el rango UV.

El índice de refracción varía considerablemente con la temperatura, por lo que generalmente se trabaja conectado a un termostato para lograr la estabilidad necesaria.<sup>13, 23</sup>

#### **15.4. Columna**

Muchas separaciones de CLAR se realizan en columnas con diámetro interior de 4 a 5 mm, tales columnas proporcionan un buen compromiso entre eficiencia, capacidad de muestra, cantidad de empaque y disolvente necesarios. Los empaques de la columna utilizan partículas de tamaño uniforme y mecánicamente estables. Los diámetros de partícula caen en el intervalo 3-5  $\mu\text{m}$ . ocasionalmente hasta 10  $\mu\text{m}$  o más para cromatografía preparativa.<sup>12, 24</sup>

Con las columnas de calibre estrecho, el analista puede optar por fases móviles que contengan disolventes no convencionales o de alta pureza, que normalmente no se considerarían debido a su costo. En las columnas de calibre estrecho hay una mayor homogeneidad en la densidad del empaque sobre el área de sección cruzada del lecho y gradientes de temperatura menores a través de la columna, ya que el calor por fricción se disipa mejor. Cuando se requiere que  $N$  sea superior a 30,000, son necesarias las columnas largas, se pueden unir varias columnas cortas para construir una columna larga, sin pérdida en la cuenta de platos. Esto no puede realizarse con las columnas de 4.6 mm de diámetro.<sup>12, 24</sup>

Si una columna de diámetro de 2 mm da buena respuesta, una de 1 mm la dará aún mejor si no es necesario modificar el sistema. Las columnas empacadas con diámetros interiores de un milímetro o menos imponen limitaciones rígidas para los efectos extracolumna. El volumen del detector e inyector debe ser extremadamente bajo para que el ensanchamiento de la banda no se vuelva un problema. No se puede utilizar una válvula de inyección

estándar ni ninguna longitud de tubo conector entre la columna y el detector. El volumen del detector debe reducirse enormemente (1  $\mu$ l.), con el resultado de que aumenta el nivel de ruido del detector y la sensibilidad a la concentración es afectada.<sup>12, 23</sup>

#### **15.4.1. Tipos de rellenos de la columna**

En cromatografía de líquidos se han utilizado dos tipos básicos de rellenos, pelicular y de partícula porosa. El primero consiste en bolas de vidrio o de polímero, no porosas y esféricas con unos diámetros característicos de 30 a 40 $\mu$ m. en la superficie de estas bolas se deposita una capa delgada y porosa de sílice, alúmina, de una resina sintética de poliestireno-divinilbenceno o de una resina de intercambio iónico. Para algunas aplicaciones se aplica un recubrimiento adicional, constituido por una fase estacionaria líquida que se mantiene fija por adsorción. Las partículas también se pueden tratar químicamente para obtener una capa superficial orgánica. Por lo general, los rellenos peliculares se utilizan ampliamente en las precolumnas y no en las columnas analíticas.<sup>8, 23</sup>

Los típicos rellenos de partículas porosas para cromatografía de líquidos están formados por micropartículas porosas con diámetros entre 3 y 10  $\mu$ m y con la menor dispersión posible con respecto aun tamaño determinado. Las partículas pueden ser de sílice, alúmina, de una resina sintética de poliestireno-divinilbenceno o resinas de intercambio iónico, aunque la sílice es el material de relleno más común en cromatografía de líquidos. Las partículas de sílice se preparan aglomerando partículas de sílice de tamaños inferiores al micrómetro en unas condiciones tales que se forman partículas mayores con diámetros muy uniformes.<sup>8, 23</sup>

### **16. SISTEMA DE GRADIENTES**

Existen dos tipos de sistemas de gradientes en CLAR: gradientes de flujo y gradientes de elución. El gradiente de flujo se utiliza para controlar en cierta forma, los tiempos de elución, sin embargo si no se vigila adecuadamente la velocidad de flujo óptima, puede ocurrir que se pierda resolución por esta

causa, además el utilizar velocidades de flujo muy bajas, alargaría el tiempo de análisis.<sup>5</sup>

Al cambiar la composición de la fase móvil y por lo tanto, su isotonicidad, se estará afectando la capacidad de retención de la fase estacionaria. Así, de modo general, puede aplicarse en cualquier tipo de cromatografía: adsorción, partición, de intercambio iónico, principalmente. Pero se debe evaluar si este modo operativo afecta a la presión y a la reproductibilidad del sistema cromatográfico.<sup>5</sup>

En el sistema de dos bombas, se opera por medio de la presión de un gas comprimido que actúa directamente sobre el líquido o sobre un pistón. En el sistema de una bomba, los disolventes se mezclan previamente, a baja presión mediante una cámara de baja presión con su válvula proporcional.<sup>5</sup>

Estos sistemas se controlan generalmente con su correspondiente microprocesador, así se obtiene una gran flexibilidad en el sistema cromatográfico: se pueden hacer gradientes simples o más complejos, con tramos lineales, exponenciales, o mesetas isocráticas.<sup>5</sup>

Al intentar una separación dada de una mezcla más o menos compleja, es deseable intentar que los cambios en los gradientes sean alcanzados lo más rápidamente posible. En los sistemas de dos bombas, los disolventes se mezclan a alta presión y el volumen mezclado, por lo general es mayor que en los sistemas de una bomba, la constancia de la composición depende de la precisión de la parte electrónica que libera el flujo. Este efecto es sensiblemente menor operando con sistema de dos bombas. Respecto a la reproductibilidad, los sistemas de dos bombas, son mejores ya que logran resultados mucho más reproducibles.<sup>5</sup>

Existen dos métodos de programación de disolvente en CLAR:<sup>13</sup>

- Isocrático. Se inyecta la muestra y la columna y la fase móvil permanecen invariables a lo largo del tiempo requerido para que eluya la muestra.<sup>16</sup>
- Gradiente de Elución. Es un término que se utiliza para describir el proceso mediante el cual se cambia la composición de la fase móvil. Pueden efectuarse de dos maneras:
  - A baja presión.
  - A alta presión.

En la mayoría de los casos, la separación isocrática se adapta bien a los análisis, sin embargo se encuentran muestras de mezclas complejas que tienen una amplia gama de tiempos de retención, en los que la mejor opción es aplicar un gradiente. <sup>16</sup>

Cuando se desarrolla un análisis usando el método de gradiente se debe tener presente dos objetivos: <sup>13</sup>

- Obtener la mejor Resolución de los componentes de la muestra en el menor tiempo posible.
- Asegurar alta precisión y exactitud.

Para obtener buenos resultados con el método de gradiente debemos seguir cinco pasos fundamentales: <sup>13</sup>

- Determinar la composición inicial y final del disolvente.
- Ajustar el tiempo del gradiente.
- Determinar la forma del gradiente (lineal, cóncava o convexa).
- Ajustar la velocidad del flujo para mejorar la resolución.
- Regresar a las condiciones iniciales la columna. <sup>13</sup>

En la elución isocrática la selección correcta de la fuerza del solvente es un paso muy importante y las separaciones son aceptables una vez que los valores de  $k'$  son correctos. <sup>16</sup>

El gradiente de elución se utiliza en el caso de que las muestras no puedan ser analizadas por medio de un método isocrático, así como para el estudio de mezclas desconocidas. <sup>16</sup>

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Existen algunos inconvenientes en el uso de un gradiente de elución en comparación con un análisis isocrático, siendo los más importantes la dificultad para la transferencia de métodos de un equipo a otro y en ocasiones el gran tiempo para equilibrar al sistema cromatográfico debido a la inestabilidad de la línea base, por lo que generalmente se plantean métodos de análisis mediante un modelo isocrático que pudiera proporcionar resultados más reproducibles.

Sin embargo, las ventajas del gradiente sobre el análisis isocrático logran equilibrar a sus desventajas, como en el caso de separaciones en las cuales la poca selectividad de los analitos no permite un análisis adecuado.

En este caso, debido que se pretende generar un método para un grupo de analitos que son afines estructuralmente, el realizar un método isocrático implicaría que no se obtuviera una buena selectividad además de requerir mayor tiempo de análisis, por lo cual se propone diseñar un método de elución por gradiente con el fin de obtener buena resolución y selectividad de los analitos.

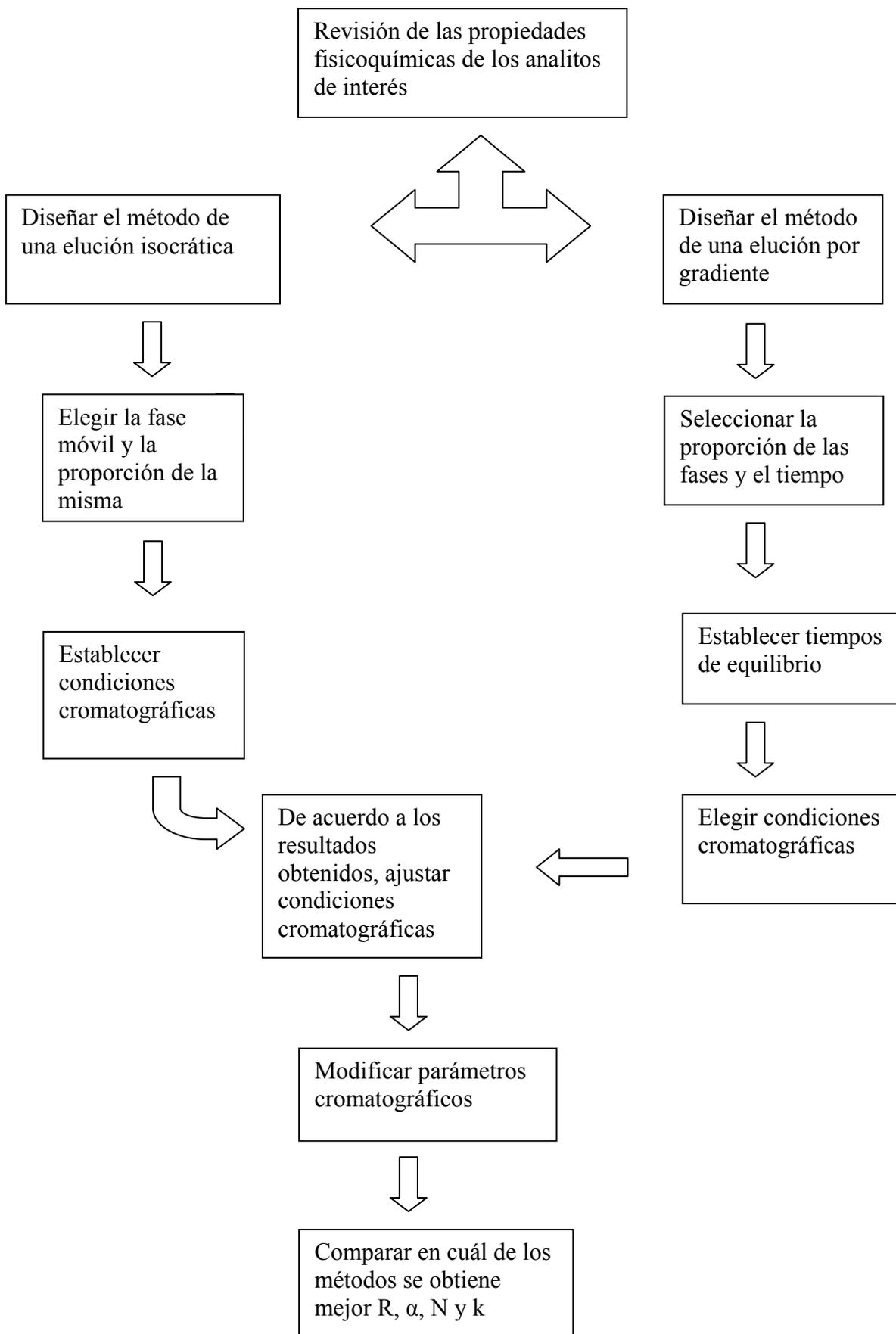
## **OBJETIVOS**

- Desarrollar un método por CLAR a través de elución isocrática, empleando una columna C-18 y detección UV para separar y cuantificar cuatro analgésicos.
- Desarrollar un método por CLAR empleando un gradiente de flujo en una columna C-18 adaptada con un detector UV para separar y cuantificar cuatro analgésicos.
- Comparar las ventajas y desventajas del análisis isocrático vs gradiente de elución.

## **HIPÓTESIS**

La elución de un analito dentro de la columna cromatográfica se ve afectada por distintos factores, tales como las características fisicoquímicas del soluto y de la fase móvil, al tratarse de un análisis en el que están involucrados varios analitos, el análisis isocrático resultará ser menos eficiente en comparación de un gradiente, ya que al modificar la proporción de la fase móvil durante la elución, se obtendrá una mejoría en la resolución, simetría del pico y reducción del tiempo de análisis.

## METODOLOGÍA



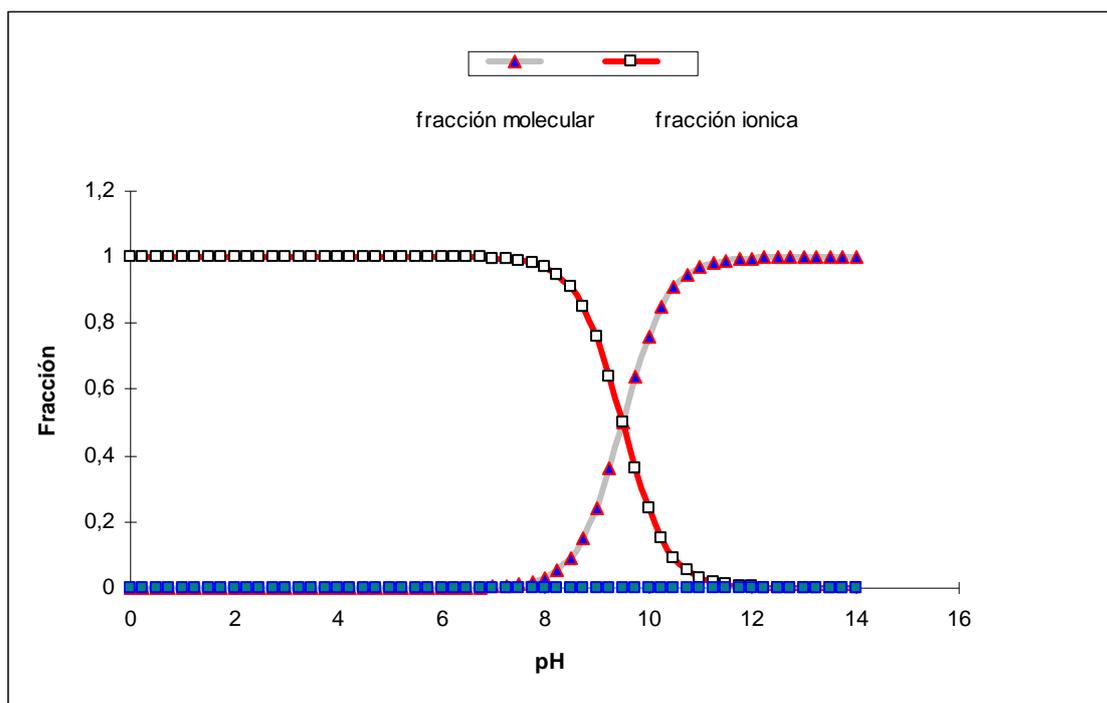
## METODOLOGÍA.

Se filtraron y sonicaron los medios, (buffer pH=4, pH=5 y pH=6) y se prepararon las muestras de naproxeno, paracetamol, ketoprofeno e ibuprofeno a una concentración de 200µg/mL, así como la mezcla, con la misma concentración para todos los analitos, posteriormente, se acondiciono el equipo, se purgó la bomba y se monitoreo la linea base. Se establecieron las condiciones en el método generado, en primer lugar a pH=4, después a pH=5 y finalmente a pH=6, en todos los casos con una velocidad de flujo de 1mL/min, a 220nm y volumen de inyección de 25µL.

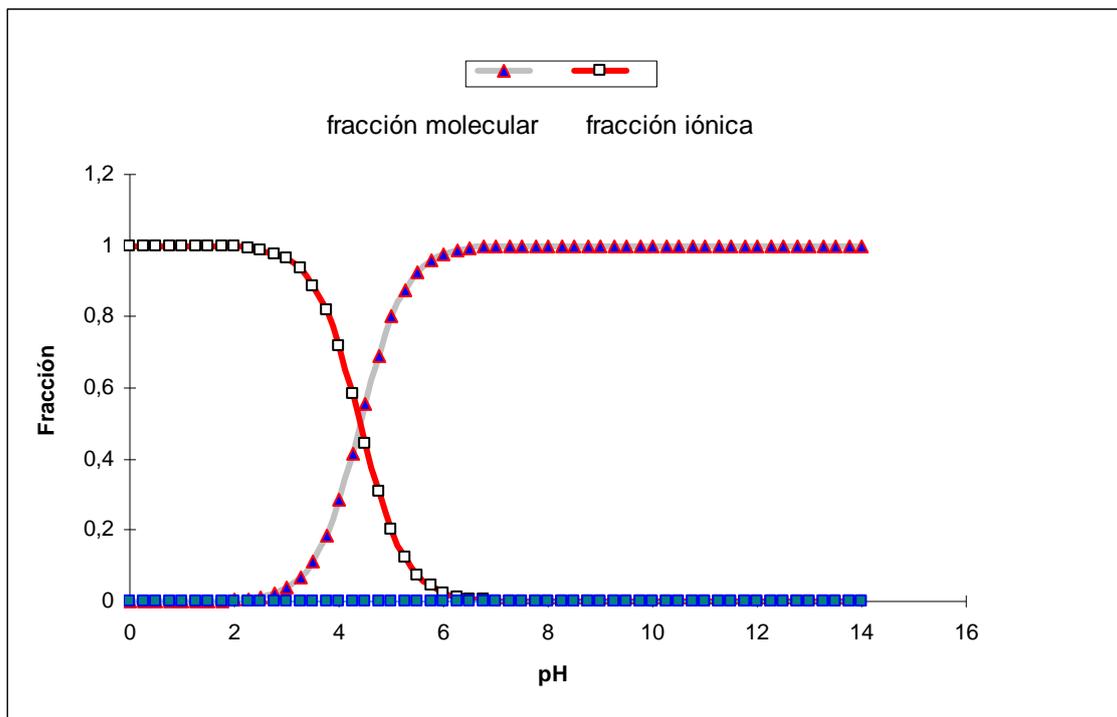
Se realizó la metodología por medio de un modelo isocrático a los tres diferentes pH, y el método por gradiente únicamente a pH: 4. Se compararon los resultados de la elución isocrática contra la elución por gradiente para definir cual proporciona mejores resultados.

## METODO ISOCRÁTICO.

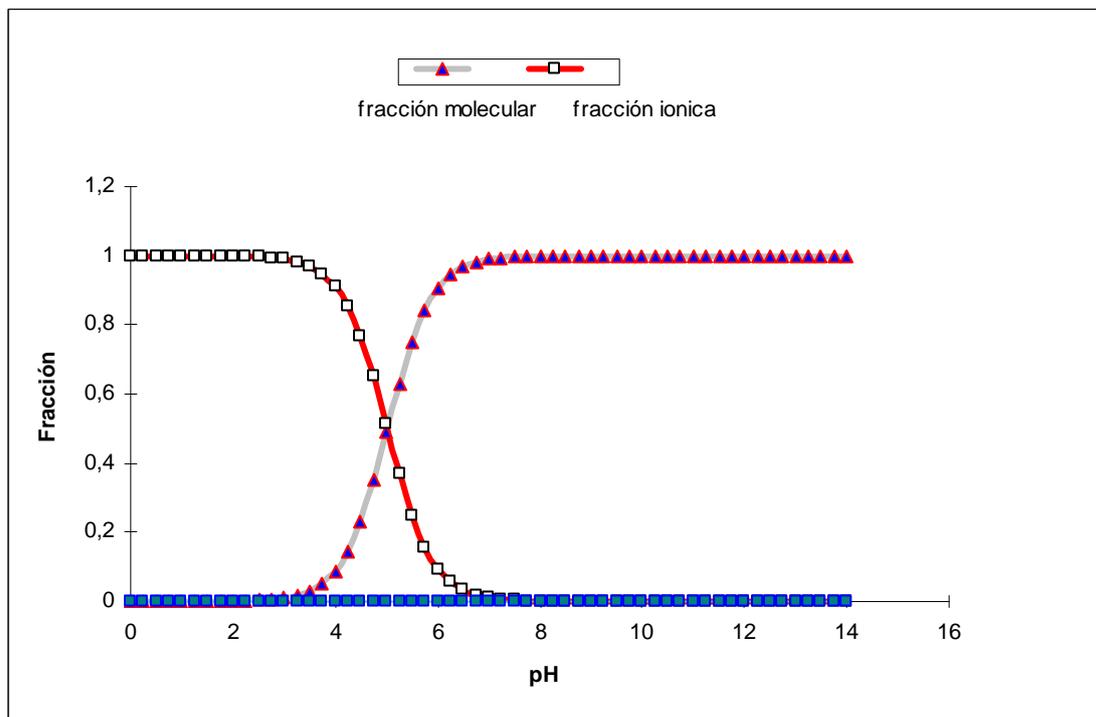
Para el diseño del método experimental empleando un análisis isocrático, se procedió a realizar una hoja de cálculo en Excel, de esta forma se representa el comportamiento de los analitos en función del pH, en las figuras 4, 5, 6 y 7.



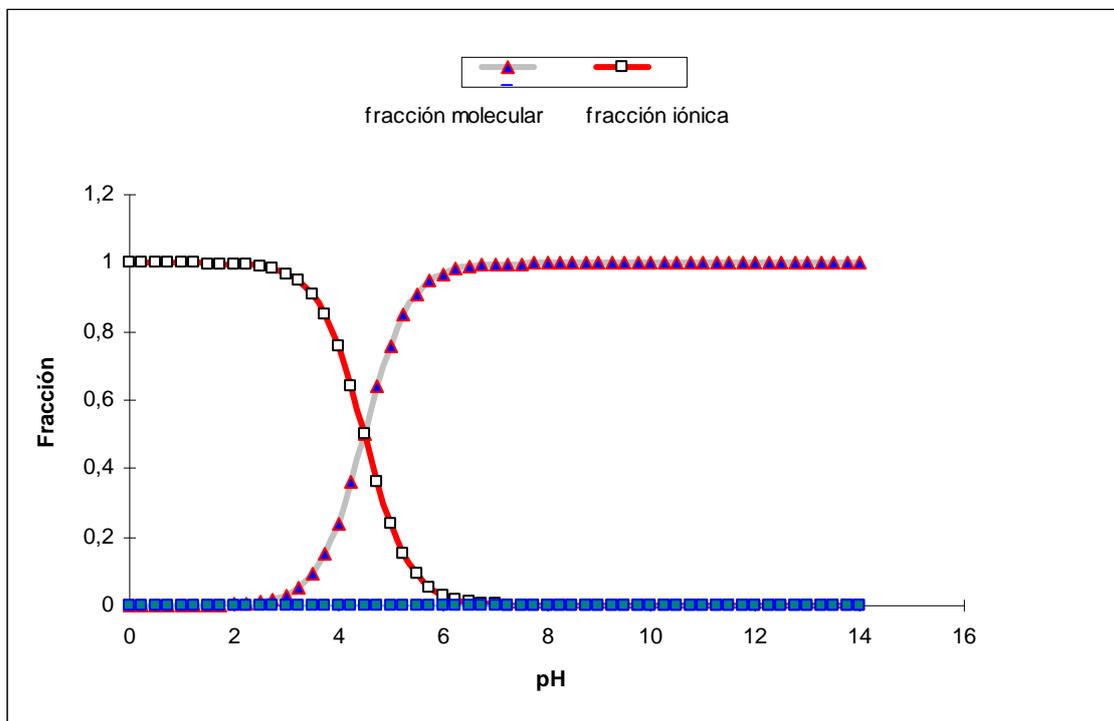
**Figura 4.** Diagrama de distribución de especies de Acetaminofeno



**Figura 5.** Diagrama de distribución de especies de Ibuprofeno



**Figura 6.** Diagrama de distribución de especies de Ketoprofeno



**Figura 7.** Diagrama de distribución de especies de Naproxeno

En la tabla 1 se presentan los resultados de distribución de especies por efecto del pH. De esta forma se logra predecir el orden de elución por efecto de la hidrofobicidad, para la planeación de los experimentos basados en la Tabla 2.

**Tabla 1.** Comportamiento de los analitos en función del pH.

ANALITO	pH: 4		pH: 5		pH: 6	
	% iónico	% molecular	% iónico	% molecular	% iónico	% molecular
Acetaminofeno	100%	0%	100%	0%	100%	0%
Ibuprofeno	28%	72%	80%	20%	97%	3%
Ketoprofeno	9%	91%	51%	49%	90%	10%
Naproxeno	24%	76%	76%	24%	97%	3%

**CONDICIONES:**

Longitud de onda: 220nm

Volumen de inyección: 25µL

Velocidad de flujo: 1 mL/min

**Tabla 2.** Diseño del método experimental para el análisis isocrático.

COMPOSICIÓN DE LA FASE: METANOL, BUFFER	pH		
	4	5	6
50:50	*		*
70:30		*	*

De acuerdo a la hidrofobicidad de los analitos podemos predecir que el orden de elución será el siguiente:

- 1) Acetaminofeno
- 2) Ketoprofeno
- 3) Naproxeno
- 4) Ibuprofeno

Se utilizan los cromatogramas individuales para confirmar el orden de elución.

**DISEÑO POR GRADIENTE DE ELUCIÓN**

Con base en los resultados de los análisis isocráticos, se diseñaron las condiciones para los experimentos por gradiente de elución que se presentan en las tablas 3, 4 y 5.

Condiciones:

Longitud de onda: 220nm

Volumen de inyección: 25µL

**Tabla 3. Gradiente 1**

t	% A (buffer pH:4)	% B (metanol)
prerun	70	30
15	70	30
17	70	30
20	50	50

**Tabla 4. Gradiente 2**

t	% A (buffer pH:4)	% B (metanol)
prerun	70	30
4	20	80
15	20	80
18	70	30
23	70	30

**Tabla 5. Gradiente 3**

t	% A(buffer pH:4)	% B (metanol)
prerun	30	70
3.5	30	70
4	10	90
10	10	90
11	70	30
12	70	30

## MATERIAL Y EQUIPO

### Equipo

- Cromatógrafo Varian Prostar con automuestreador Modelo 410.
- Software Galaxy Workstation.
- Detector UV-Visible, marca Varian.
- Columna microsorb MV C<sub>18</sub>.

### Material

- Vasos de precipitado de 10 mL.
- Micropipetas.
- Viales para automuestreador Varian modelo 410.
- Recipientes de vidrio para fase móvil.
- Matraces volumétricos de 10 mL.

### Reactivos

- Agua destilada Milli-Q Millipore.
- Metanol (grado HPLC). Marca J.T. Baker

### Analitos

- Acetaminofeno estándar.
- Ketoprofeno estándar.
- Ibuprofeno estándar.
- Naproxeno estándar.

Preparación de soluciones amortiguadoras.

Buffer pH: 4.

En un matraz volumétrico de 1000mL se disolvieron 5,04g de fosfato dibásico de sodio y 3,01g de fosfato monobásico de potasio en 800mL de agua. Se ajustó el pH con ácido acético glacial.

## RESULTADOS

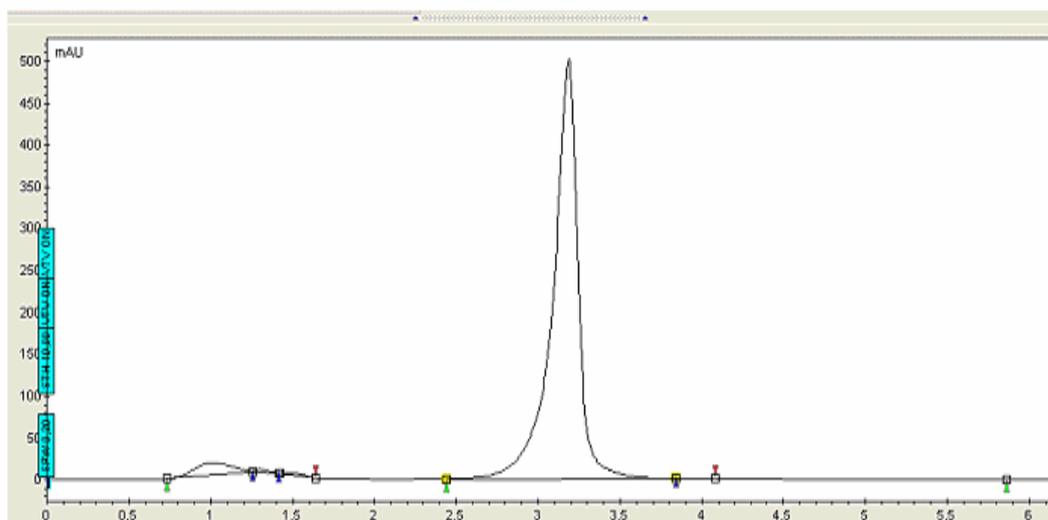


Figura 8. Ketoprofeno, pH: 4. Metanol, Buffer: 50:50

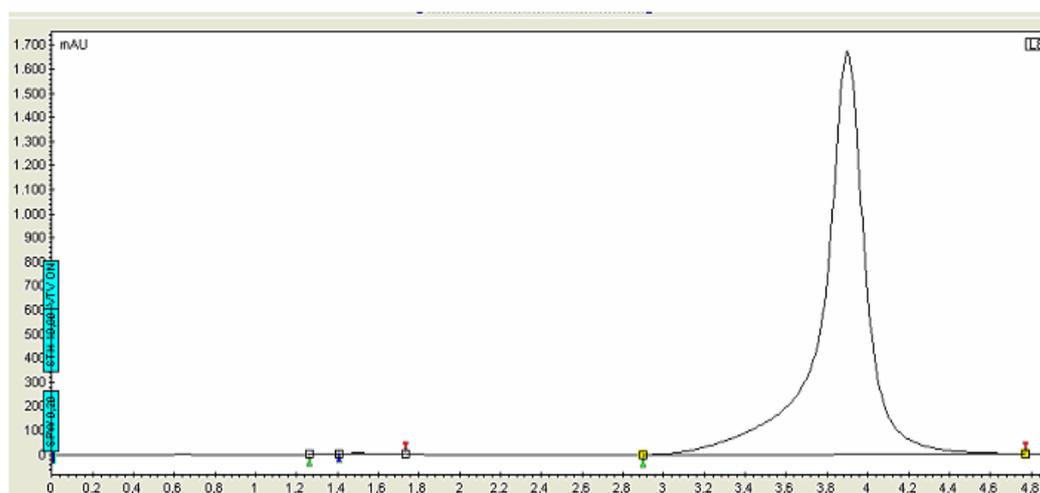


Figura 9. Naproxeno, pH: 4. Metanol, Buffer: 50:50

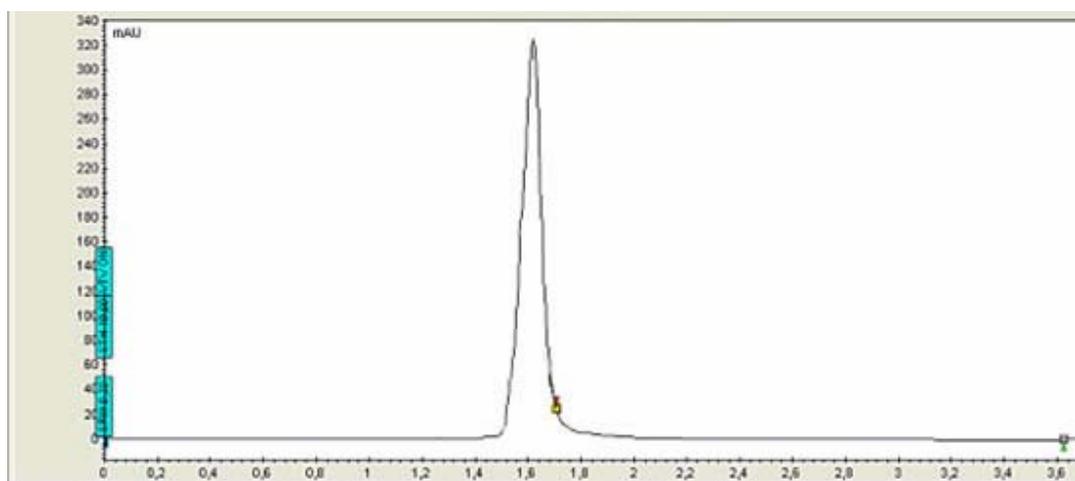
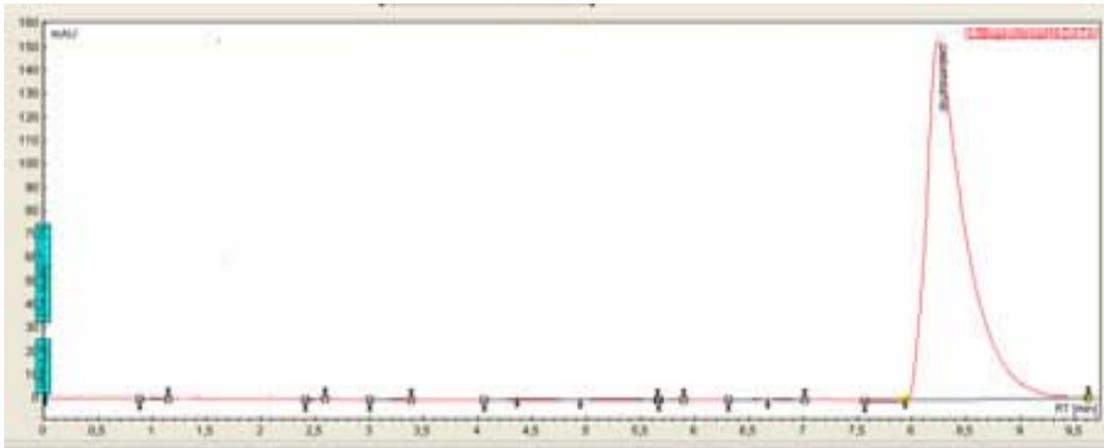
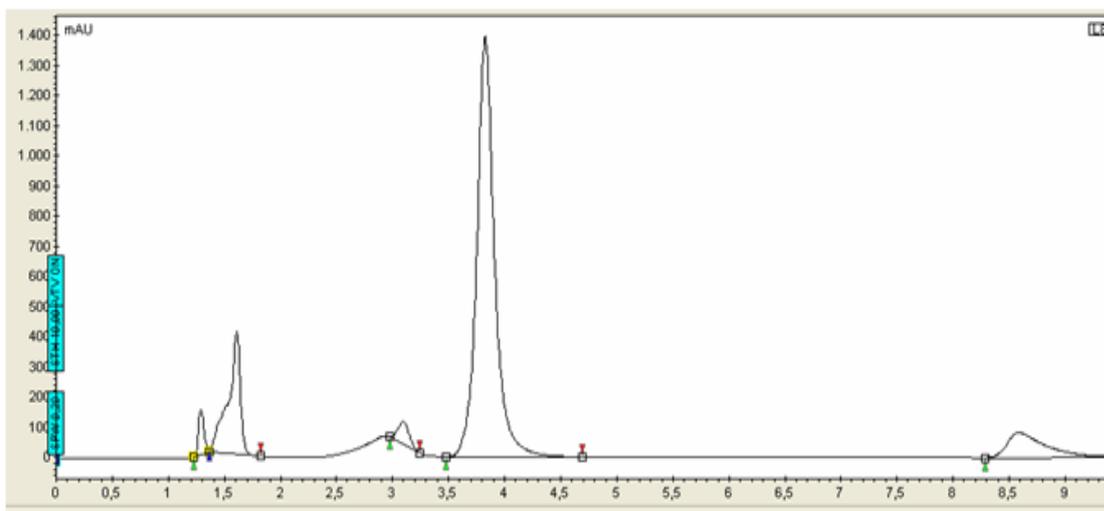


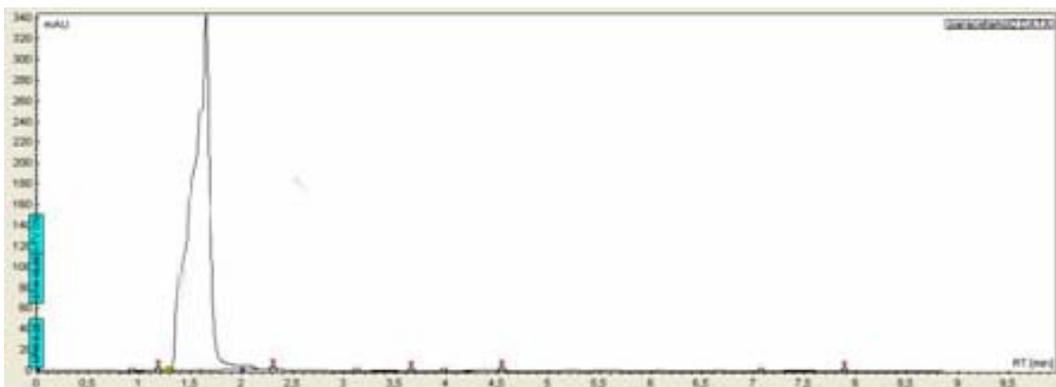
Figura 10. Acetaminofeno, pH: 4. Metanol, Buffer: 50:50



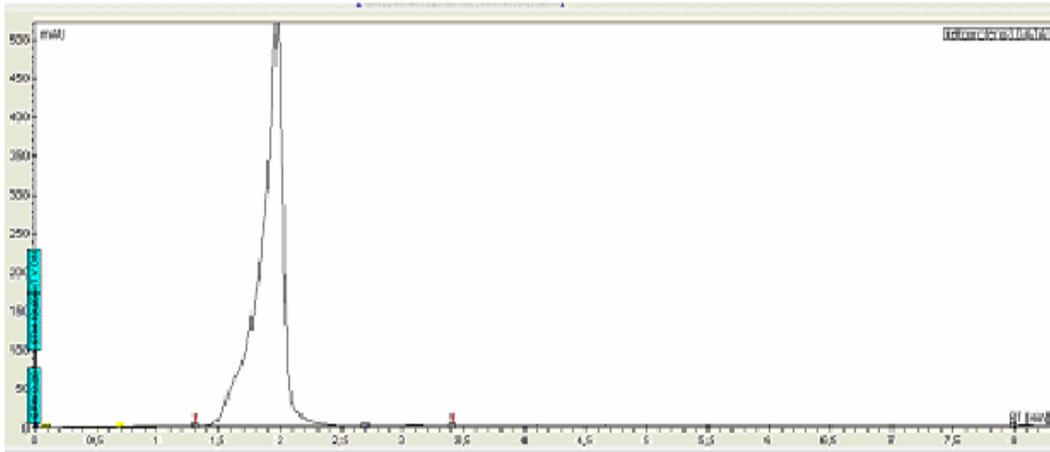
**Figura 11.** Ibuprofeno, pH: 4. Metanol, Buffer: 50:50



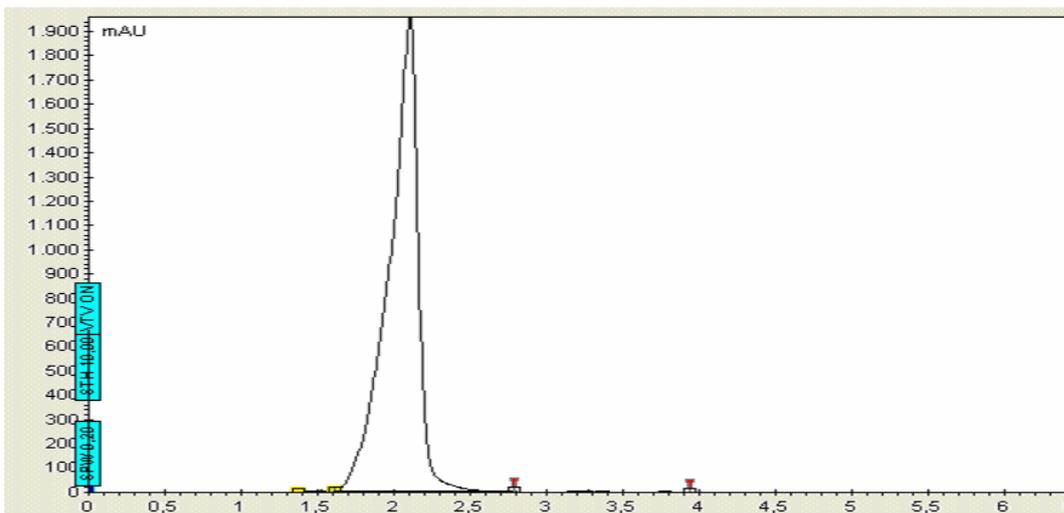
**Figura 12.** Mezcla. pH: 4. Metanol, Buffer: 50:50



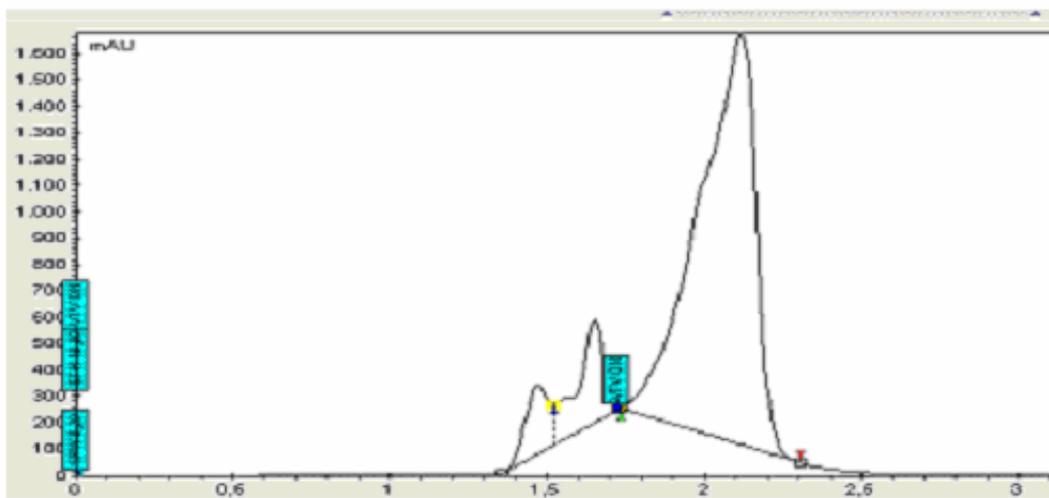
**Figura 13.** Acetaminofeno. pH: 5. Metanol, Buffer: 70:30



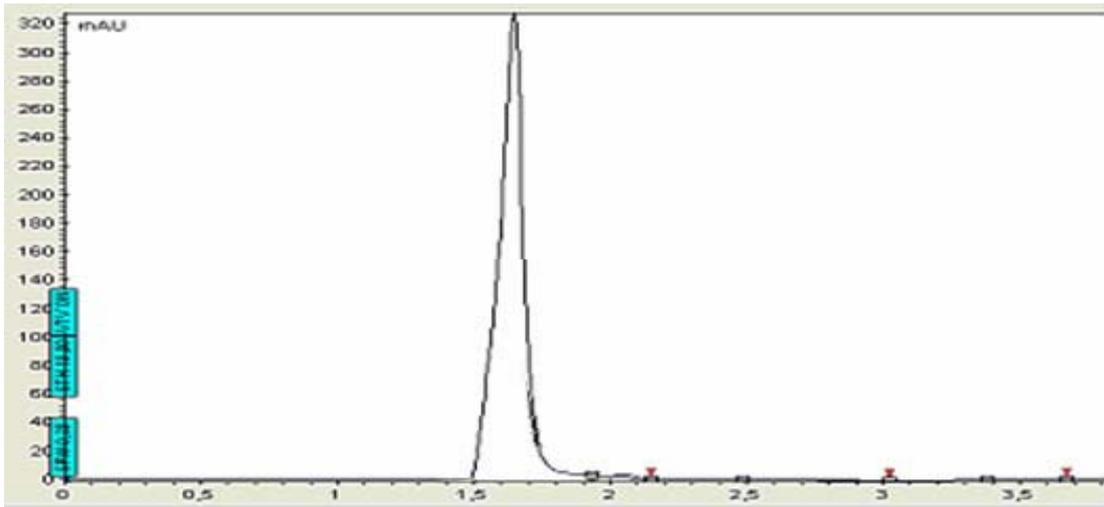
**Figura 14.** Ketoprofeno. pH: 5. Metanol, Buffer: 70:30



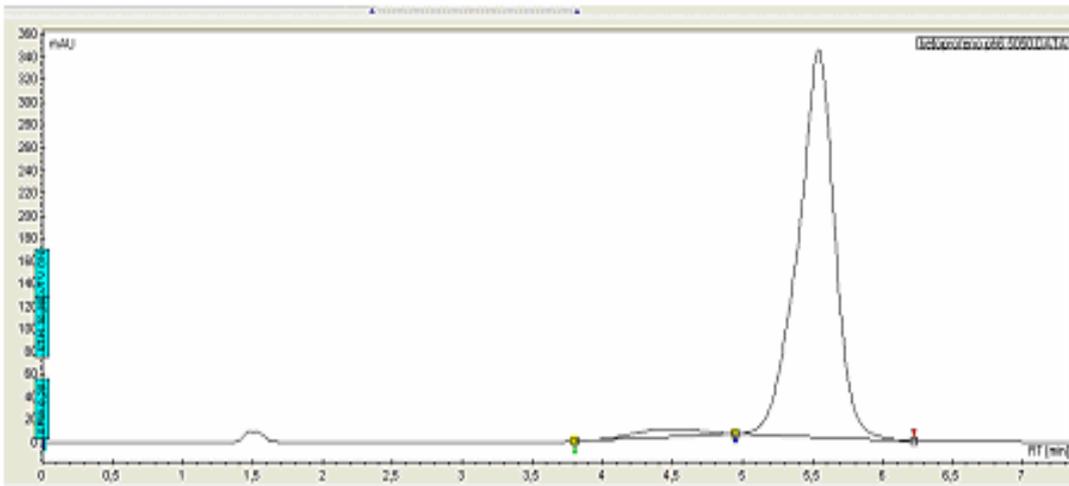
**Figura 15.** Naproxeno. pH: 5. Metanol, Buffer: 70:30



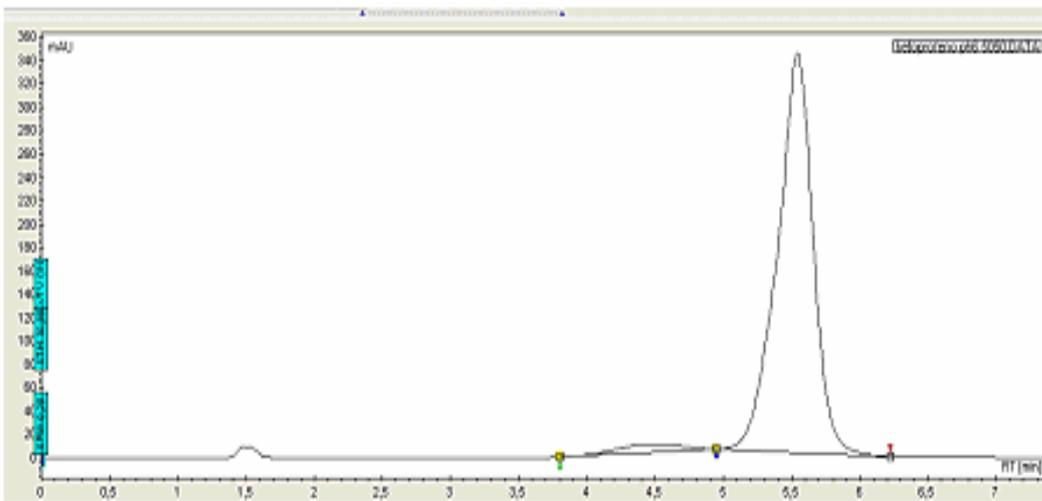
**Figura 16.** Mezcla. pH: 5. Metanol, Buffer: 70:30



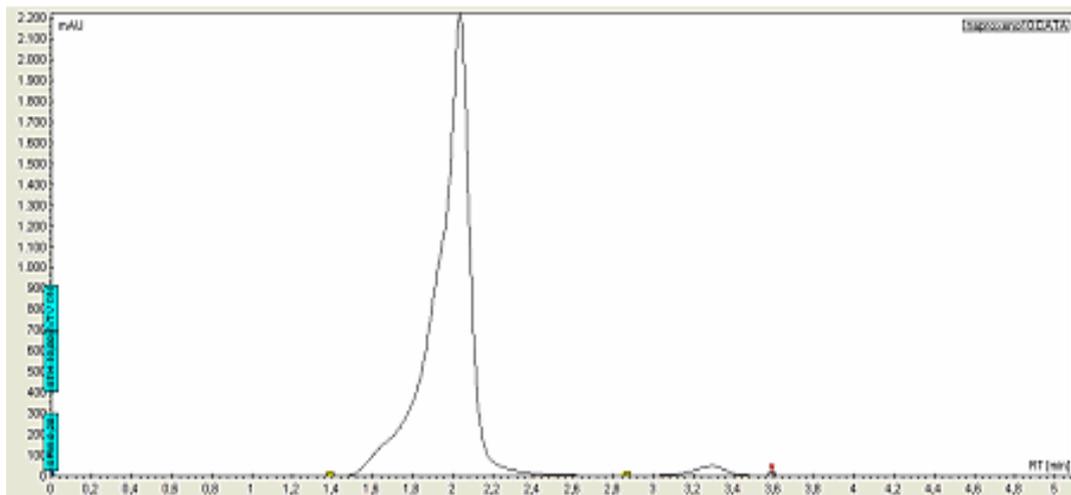
**Figura 17.** Acetaminofeno. pH: 6. Metanol, Buffer: 70:30



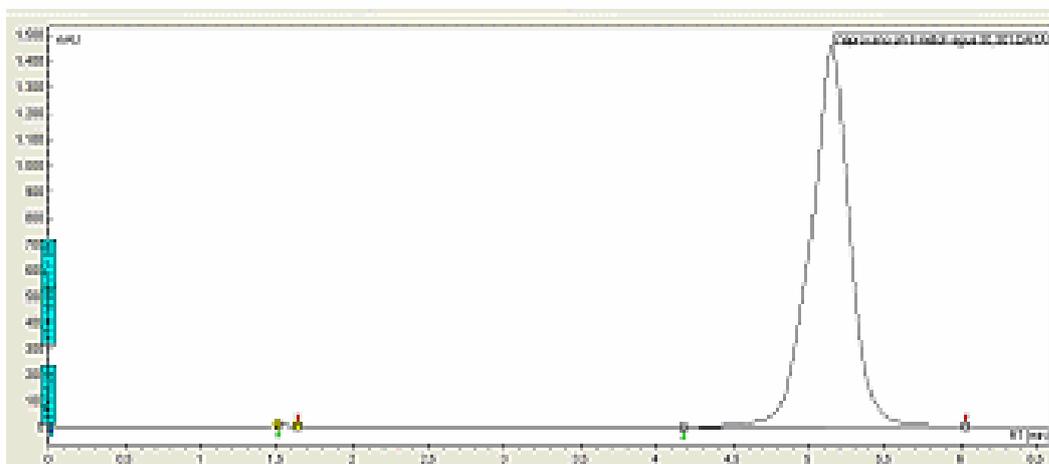
**Figura 18.** Ketoprofeno. pH: 6. Metanol, Buffer: 70:30



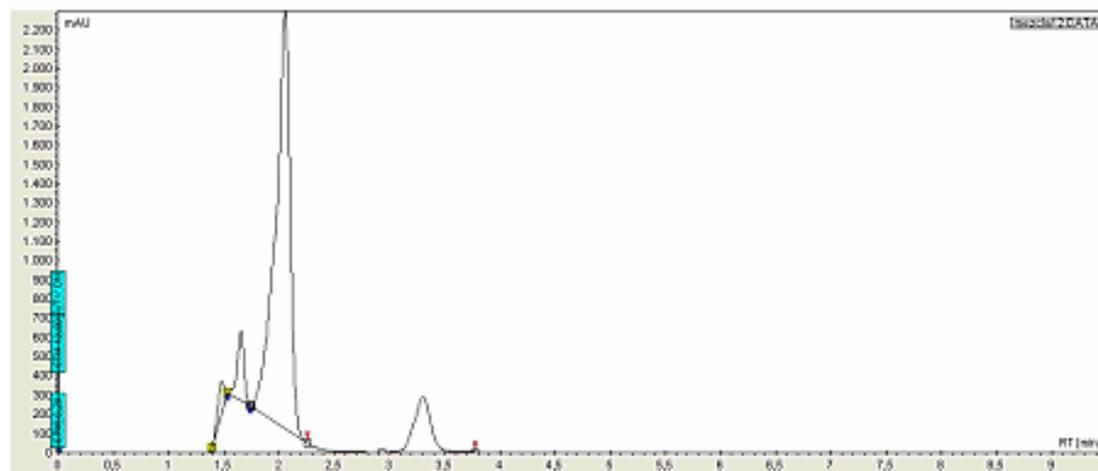
**Figura 19.** Ketoprofeno. pH: 6. Metanol, Buffer: 50:50



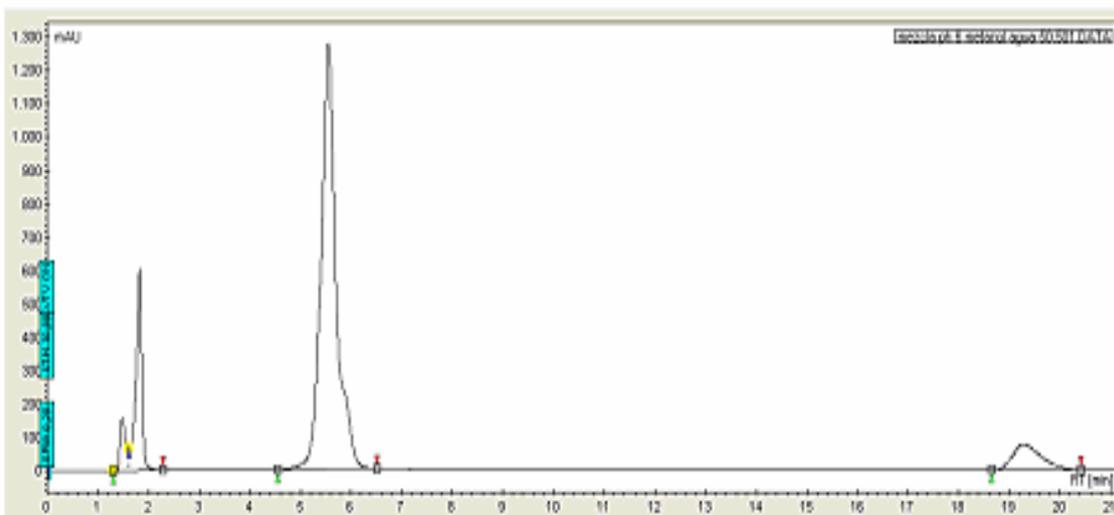
**Figura 20.** Naproxeno. pH: 6. Metanol, Buffer: 70:30



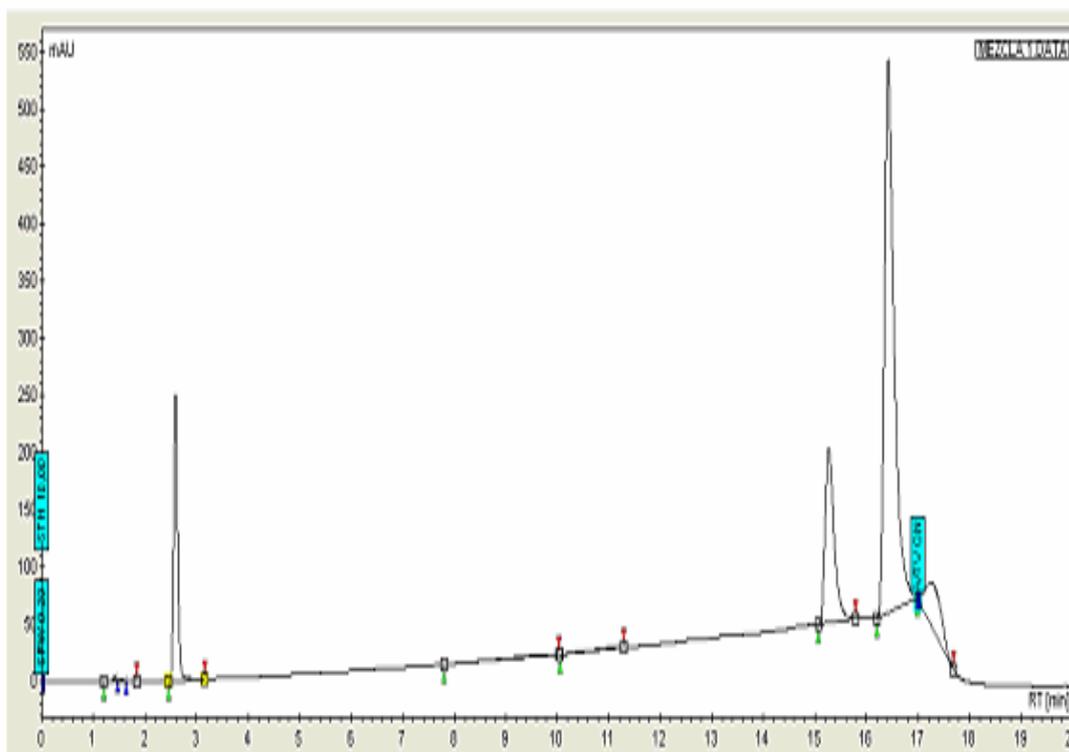
**Figura 21.** Naproxeno. pH: 6. Metanol, Buffer: 50:50



**Figura 22.** Mezcla. pH: 6. Metanol, Buffer: 70:30



**Figura 23.** Mezcla. pH: 6. Metanol, Buffer: 40:60

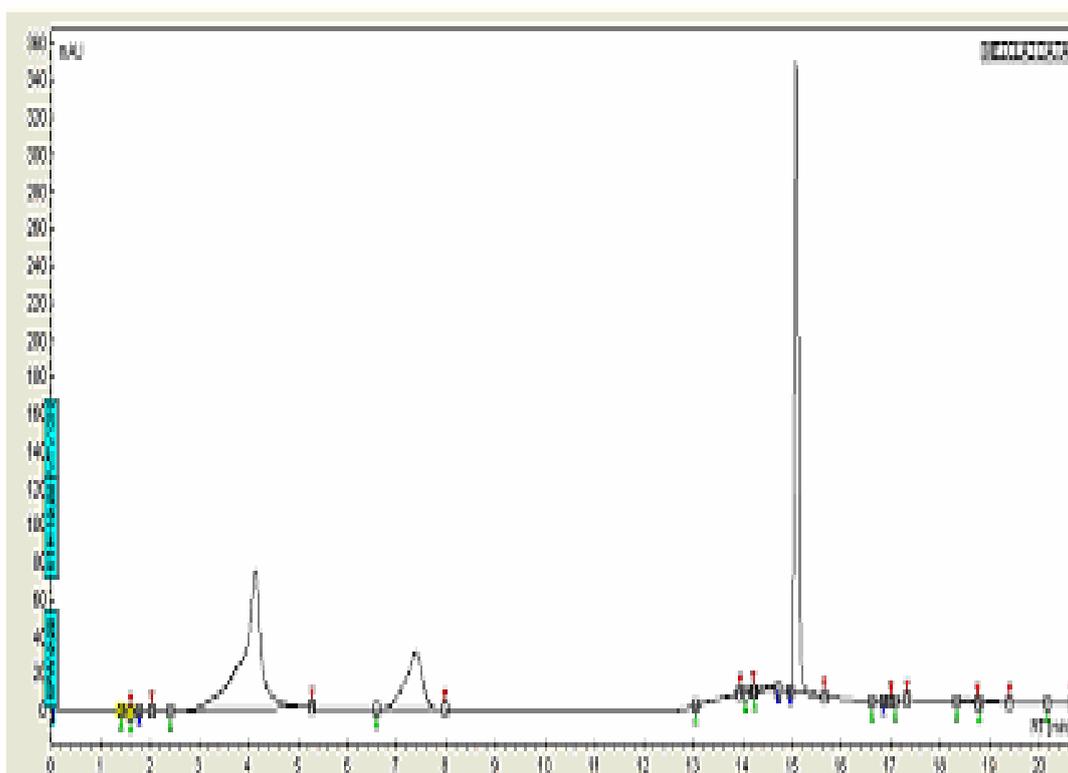


**Tabla 6.** Parámetros cromatográficos Gradiente 1.

ANALITO	$t_r$	N	$k'$
Acetaminofeno	2,59	592	0.5792
Ketoprofeno	15,27	1576.25	8.3109
Naproxeno	16,42	1592.24	9.0121

**Tabla 7.** Resolución y selectividad. Gradiente 1

ANALITO	R	$\alpha$
Acetaminofeno-ketoprofeno	56,3555	14.3473
Ketoprofeno-Naproxeno	3,59375	1.08437



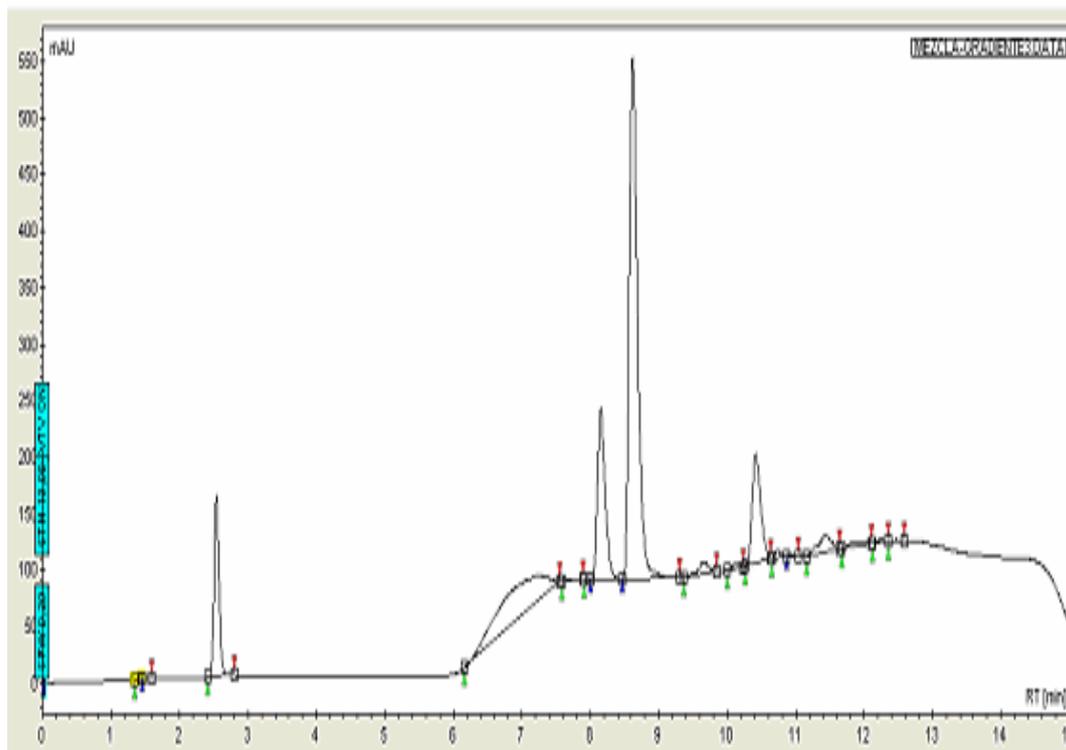
**Figura. 25.** Gradiente 2

**Tabla 8.** Parámetros cromatográficos Gradiente 2.

ANALITO	$t_r$	N	$k'$
Acetaminofeno	4,13	249,3584	1,51829
Ketoprofeno	7,37	393,0666	3,493902
Naproxeno	15,08	3217,0666	8,195121

**Tabla 9.** Resolución y selectividad. Gradiente 2

ANALITO	R	$\alpha$
Acetaminofeno-ketoprofeno	5,7345	2,3012
Ketoprofeno-Naproxeno	20.56	2,3455



**Figura. 26.** Gradiente 3

**Tabla 10.** Parámetros cromatográficos Gradiente 3.

ANALITO	$t_r$	N	$k'$
Acetaminofeno	2,54	580,5714	0,5487
Ketoprofeno	8,15	1241,9047	3,9695
Naproxeno	8,62	1253,8181	4,2560
Ibuprofeno	10,42	1449,7391	5,3536

**Tabla 11.** Resolución y selectividad. Gradiente 3

<b>ANALITO</b>	<b>R</b>	<b><math>\alpha</math></b>
Acetaminofeno-ketoprofeno	32,057	7,2333
Ketoprofeno-Naproxeno	2,1860	1,07219
Naproxeno-Ibuprofeno	8,0019	1,25787

Para establecer las condiciones durante el análisis por gradiente de eluci

## ANALISIS DE RESULTADOS

La hidrofobicidad del compuesto está directamente relacionada con los tiempos de retención, en una fase reversa, entre más hidrofóbica sea la molécula, mayor será su tiempo de retención.

El porcentaje de disolvente orgánico también se relaciona con los tiempos de retención obtenidos, mientras más porcentaje se utilice de disolvente orgánico, menores serán los tr, aunque si se utiliza una fase demasiado fuerte, los analitos podrían salir con el tiempo muerto.

El pH del medio es uno de los factores más importantes al desarrollar un método por CLAR, ya que de ello depende el comportamiento de los analitos que tienen comportamiento ácido-base, que puede determinar si el analito sale más rápido o se retiene en la columna. Además el pH puede cambiar la hidrofobicidad del compuesto y por lo tanto influir en su tr. Al variar las condiciones de pH, se obtiene una variación considerable en los parámetros cromatográficos, ya que de acuerdo al estado molecular o ionizado en la que se encuentren los analitos, cambia su tr.

De acuerdo a los diagramas de distribución de especies, se observa que todos los analitos se encuentran ionizados en mayor porcentaje a pH: 6, por lo cual se esperaba que tuvieran un tr menor. Sin embargo cuando se pretende separar un grupo de compuestos cuya afinidad estructural es evidente, tal como el naproxeno y el ketoprofeno, los picos tendrán un comportamiento cromatográfico muy similar, por lo tanto se obtendrá una baja selectividad. A pH: 6 con una proporción de fase 50:50, metanol: buffer, se obtuvieron los picos de naproxeno y ketoprofeno a 5,15 y a 5,55 min. respectivamente, se pueden observar en los cromatogramas individuales, (figuras 19 y 21), pero en la mezcla de analgésicos se aprecia un solo pico, por lo que los valores de selectividad no son lo óptimos.

A pH: 5 con una proporción de fase 70:30, metanol: buffer, da como resultado un cromatograma en donde la mezcla de analgésicos tiene muy pobre selectividad, resolución y simetría.

En el análisis realizado a pH: 4, el tiempo de análisis fue de aproximadamente 9,5 min., pero la selectividad es muy baja; el acetaminofeno eluye en el tiempo muerto, el ketoprofeno y el naproxeno tienen un tr de 3,19 y 3,90 min.

respectivamente, y del Ibuprofeno se obtiene un pico asimétrico. Se observa que a pH: 4 se obtuvieron adecuados valores de selectividad aunque una baja eficiencia y la asimetría de 3,5 en el caso del Ibuprofeno.

Las desventajas de la elución isocrática para separar la mezcla de analgésicos, son:

1. Los tiempos de retención de los analitos son más largos, por lo tanto se amplía el tiempo de corrida, aumentando el gasto de los disolventes.
2. Se pierde resolución y eficiencia
3. No se obtiene buena selectividad, en algunos casos, se obtuvieron picos encimados.

Para establecer las condiciones durante el análisis por gradiente de elución, se consideraron varios factores, en primer lugar las propiedades fisicoquímicas de los analitos de interés, tales como su pka, su solubilidad, así como su absorción en la región UV, tomando en cuenta para hacer el análisis, la longitud de onda más adecuada para los cuatro analgésicos con el fin de obtener una respuesta significativa, en este caso es  $\lambda=220\text{nm}$ , al igual que en la elución isocrática.

Con base en los resultados de la elución isocrática se optó por utilizar una mezcla de metanol y buffer pH: 4. Se planteó en primer lugar, un análisis en el que se propuso una proporción 70:30 buffer pH=4 y metanol, se obtuvo el pico de acetaminofeno a los 2,59 min, y al permanecer en esa proporción, los picos de ketoprofeno y naproxeno se obtuvieron a los 15,27 y 16,42 min, respectivamente y no se logro separar el ibuprofeno, pues se encuentra en estado molecular en un 72% de acuerdo al diagrama de distribución de especies.

Debido a que en este análisis no se logró separar satisfactoriamente los cuatro analgésicos, se propuso para el siguiente análisis, empezar con una proporción 30:70 de buffer pH: 4, metanol durante los cuatro primeros minutos y posteriormente, aumentar la proporción de buffer pH=4 (20:80) para aumentar la polaridad y permitir que se obtuvieran los picos de ketoprofeno y naproxeno, con un buena resolución, ya que como son estructuralmente parecidos se esperaba que los tiempos de retención de ambos fueran similares, con esta fase el pico correspondiente al ketoprofeno se obtuvo a los 7,37 min. y el

naproxeno se extendió a los 15,08 min. En tal caso se debió reducir la polaridad para no alargar tanto el tiempo de análisis, y permitir que eluyera el ibuprofeno.

Ya que en los dos primeros ensayos no se logró obtener el pico del ibuprofeno, porque se había manejado, en general, una alta polaridad o al menos no se mantuvo en un rango suficiente o en un lapso de tiempo ideal para que el ibuprofeno pudiera salir, se planteo en el tercer análisis comenzar con una proporción de 30:70, buffer pH=4, metanol, hasta los 4 min, permitiendo así eluir el acetaminofeno, a los 2,54 min, después se modificó la proporción de la fase 10:90, buffer pH=4, metanol, con lo que se logro acortar el tiempo de elusión del ketoprofeno, a los 8,15 min y en seguida, el naproxeno, a los 8,62 min, posteriormente se disminuyo la fuerza de la fase a una proporción de 70% de metanol, con lo que se obtuvo el pico del ibuprofeno a los 10,42 min.

En el primer análisis se obtuvieron mejores condiciones de selectividad, aunque el tiempo de corrida fue muy largo, en el segundo análisis, además de que el tiempo de análisis fue largo, los picos se obtuvieron con una resolución muy pobre, pero con buena selectividad. En el tercer ensayo se logro obtener mejor selectividad y resolución en un menor tiempo de análisis, los resultados serían mejores si el cambio de fase se hubiera cambiado a los seis minutos, evitando así que transcurrieran varios minutos antes de obtener los picos correspondientes al naproxeno e ibuprofeno.

La ventaja de utilizar un método por gradiente es que se pueden modificar las condiciones según convenga para favorecer la rápida elución de los analitos, logrando así acortar el tiempo de análisis y el consumo de los disolventes, además de que se pueden obtener mejores parámetros cromatográficos.

## CONCLUSIONES

Se debe seleccionar una longitud de onda en la que sea posible cuantificar a los cuatro analitos, el pH seleccionado debe ser en el que tengan mayor afinidad a la fase estacionaria reversa, además se debe considerar la proporción de la fase. Adecuando los factores que pueden afectar el comportamiento de los analitos y optimizándolos se podrán obtener mejores resultados.

Cuando un análisis isocrático no logra separar analitos de gran diferencia en hidrofobicidad, la mejor opción es plantear un análisis por gradiente.

Por medio de un gradiente se pueden optimizar los métodos por CLAR, para lograr acortar los tiempos de análisis y de esta manera economizar el uso de los disolventes, además de que se logra obtener una mejoría en los parámetros cromatográficos, tales como  $\alpha$ ,  $k'$  y R.

El mejor gradiente es el numero 3 (tabla 8), en el que se observan los más adecuados parámetros cromatográficos, se podría mejorar si la proporción de fase se modificara a los 6 minutos ya que al hacer la modificación hasta los diez minutos, se deja transcurrir algún tiempo antes de obtener el segundo pico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. The Merck Index. 16aed .Ed Merck USA, 2001
2. [http://www.sigmaaldrich.com/Area\\_of\\_Interest/The\\_Americas/Mexico.html](http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/The_Americas/Mexico.html)
3. Florey K. Copilador Analytical Profiles of Drug Substances. 5ta. Edition. U.S.A. Academia Press, 1985: vol. 14: 552-578.
4. Clarke. Isolation and identification of drugs. 2A ed. Editorial Pharmaceutical Press. London. 1986
5. Scott, Liquid Chromatography for the analyst. New York. Usa, 1994
6. García Adrián, Del Castillo Benito. Cromatografía de líquidos de alta resolución. Editorial Noriega. México 1990
7. Remington. Farmacia. Editorial Medica Panamericana, 28ªed. Tomo 2
8. Rouseac F., Rouseac A, Métodos y técnicas Instrumentales Modernas. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana 2003.
9. Luun, G. HPLC. Methods of Pharmaceutical of Análisis Vol 8, 2ªed. John Willey sons, New Cork, 2002
10. Torres de Young Stella. Introducción a la Cromatografía. Ed. Universidad Nacional, colección universitaria, 1994
11. Skoog D., Leary J. Análisis Instrumental. 4ªed. Mc Graw-Hill. Madrid, 1994
12. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 8aed. Secretaria de salud
13. Noa P. Cromatografía de Gases y Líquidos de Alta Resolución, Aplicación en el análisis de alimentos. UAM, México 2003
14. Bender G. Métodos instrumentales de análisis en química clínica. Ed Acribia, España, 1997
15. Day R A.L Underwood. Química Analítica Cuantitativa. Prentice Hall, Interamericana. México 1990
16. Snyder, Kirkland. Introduction to Modern Liquid Chromatography. Ed. John Wiley & sons. Nueva York, 1979.
17. Vascarsel, Casas. Técnicas Analíticas de Separación. Ed Reverté. México 2003
18. Beesley. Quantitative chromatographic Análisis. Ed Marcel, New York 2001
19. Hernández. Introducción al análisis instrumental. Ed. Arrel, España, 2002.
20. Harris. Análisis Químico Cuantitativo. Grupo editorial Iberoamérica, México 1992.
21. Matissek & Wittkowski. High Performance Liquid Chromatography in food control & research. Technomic. EUA, 1993
22. Lough & Warner. High Performance Liquid Chromatography, fundamental principles and practice. Blackie academic Professional. Londres 1998
23. Willard. Métodos Instrumentales de Análisis. Grupo Editorial Iberoamérica, México 1991

24. Meyer. Practical High Performance Liquid Chromatography. John Wiley Sons. New York 1998
25. Farrar H., Letzig L., Gill M. Validation of a liquid chromatographic method for the determination of ibuprofen in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 780 (2002) 341-348
26. Matysová L., Nováková L., Koupparis M. Seus HPLC determination of ketoprofen and its degradation products in the presence of preservatives in pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 36 (2004) 625-629
27. Pistos C., Stewart J. Assay for the simultaneous determination of acetaminophen-caffeine-butalbital in human serum using a monolithic column. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 36 (2004) 737-741
28. García A., Rupérez F., Marín A., Polyethylenglicol column for the determination of acetaminophen, phenylephrine and chlorpheniramine in pharmaceutical formulations. *Journal of chromatography B*, 785 (2003), 237-243
29. Rojas J., Becerra C., Parra J., Validación de las metodologías analíticas por HPLC para la certificación de patrones secundarios de Ibuprofeno, Naproxeno y Ketoprofeno. *Revista colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*. No. 30 (2001) 87-92.
30. Wang P., Leng Y., Gu J. Simple HPLC method for simultaneous determination of acetaminophen, caffeine and chlorpheniramine maleate in tablet formulations. *Chromatographia* 56 (2002) 295-298.