



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE FLUJO CON RESPECTO A LA  
RESOLUCIÓN EN UNA MEZCLA DE METILPARABENO,  
ETILPARABENO, PROPILPARABENO Y BUTILPARABENO, POR CLAR  
EMPLEANDO FASE REVERSA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :**

**ELIZABETH AMELIA ROSAS AGUILAR**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. JUAN CARLOS VAZQUEZ LIRA**

México, D. F. 2007

---



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.



---

*Sabio no es aquel que sabe más,  
sino el que se percata de su ignorancia  
y lucha por salir de ella.*

---



---

*Enseñarás a volar,  
pero no volarán tu vuelo.*

*Enseñarás a soñar,  
pero no soñarán tu sueño.*

*Enseñarás a vivir,  
pero no vivirán tu vida.*

*Sin embargo...  
en cada vuelo,  
en cada vida,  
en cada sueño,  
perdurará siempre la huella  
del camino enseñado.*

*A mis padres y profesores*

***¡GRACIAS!***

---



## Índice

<b>I. Resumen</b> .....	1
<b>II. Introducción</b> .....	1
<b>III. Marco teórico</b> .....	2
1. Cromatografía de líquidos .....	2
2. Antecedentes de la cromatografía de líquidos .....	3
3. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) .....	5
4. Separación cromatográfica .....	6
5. Componentes básicos de un sistema de CLAR .....	6
5.1. Contenedor de disolvente .....	7
5.1.1 Elección del disolvente .....	7
5.1.2 Filtración y desgasificación de disolventes .....	7
5.1.3 Métodos de filtración de disolventes en CLAR .....	8
5.1.4 Métodos de desgasificación de disolventes en CLAR .....	8
5.1.5 Programación del disolvente en CLAR .....	9
5.1.5.1 Elución isocrática .....	9
5.1.5.2 Elución por gradiente .....	10
5.2. Bombas .....	12
5.2.1 Mecánicas .....	13
5.2.2 Neumáticas .....	14
5.3. Sistemas de inyección de muestra .....	16
5.4. Columnas y fases estacionarias .....	17
5.5. Detectores .....	18
5.5.1 Detector UV .....	18
5.5.2 Detector de índice de refracción .....	19
5.5.3 Detector de fluorescencia .....	20
5.5.4 Detector electroquímico .....	20
5.5.5 Detector de dispersión de luz .....	20
5.6. Sistema de registro de datos .....	21
6. Parámetros más importantes para una separación cromatográfica .....	21
6.1 Tiempo muerto .....	21
6.2 Tiempo retención .....	22
6.3 Factor de capacidad .....	22
6.4 Factor de selectividad .....	23
6.5 Adecuabilidad del sistema .....	23
6.6 Eficiencia de la columna .....	24
6.7 Resolución .....	25
6.7.1 Factores que afectan la resolución .....	25
6.7.2 Factor de coleo .....	27



---

---

7.	Propiedades fisicoquímicas de los analitos estudiados.....	29
7.1	Metilparabeno.....	29
7.2	Etilparabeno.....	29
7.3	Propilparabeno.....	30
7.4	Butilparabeno.....	30
IV.	<b>Planteamiento del problema.....</b>	<b>31</b>
V.	<b>Objetivos.....</b>	<b>32</b>
VI.	<b>Parte experimental.....</b>	<b>33</b>
1.	Sustancias.....	33
2.	Equipo.....	33
3.	Condiciones cromatográficas.....	34
4.	Metodología.....	34
4.1	Diagrama de flujo.....	34
VII.	<b>Resultados y análisis.....</b>	<b>36</b>
VIII.	<b>Conclusiones.....</b>	<b>46</b>
IX.	<b>Sugerencias.....</b>	<b>47</b>
X.	<b>Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>48</b>



### I. Resumen

El parámetro cromatográfico de resolución se ve afectado, por diferentes factores, entre los que se encuentra el factor de selectividad, eficiencia y la retención, los cuales se ven influidos por la velocidad de flujo. Por medio de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución se estudia una mezcla de los compuestos metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno y butilparabeno en una fase móvil de agua/metanol 38:62 (v:v) realizando una variación en la velocidad de flujo. Se encontró que la velocidad de flujo tiene un amplio efecto en la eficiencia de la separación ya que se relaciona con la velocidad lineal la cual a su vez, determina la altura del plato teórico (eficiencia) por lo que de acuerdo a los resultados obtenidos existe una velocidad de flujo óptima cercana a 1 mL/min.

### II. Introducción

En la industria farmacéutica es muy común el empleo de agentes conservadores en una gran variedad de formulaciones, entre los que se encuentran los parabenos. Tales sustancias comúnmente se analizan por cromatografía de líquidos. Sin embargo, en el desarrollo de métodos analíticos por esta metodología, uno de los puntos importantes a optimizar es la eficiencia y resolución en una mezcla determinada. Tal optimización incluye la separación por diversas alternativas tales como el gradiente de elución o el empleo de detectores más específicos.

Para el análisis de mezclas de parabenos los métodos establecidos incluyen elución isocrática o por gradiente. En el presente trabajo se desarrolló una optimización alternativa no reportada para el análisis de cuatro parabenos empleando un gradiente de flujo, por medio del cual se permitirá reducir el tiempo de análisis, aumentar la eficiencia y mejorar la asimetría del pico cromatográfico.



### **III. Marco Teórico**

#### **1. Cromatografía de líquidos**

La cromatografía de líquidos de alta resolución es una de las ramas más nuevas de la química analítica cuyo crecimiento ha sido muy rápido y su potencial es enorme. El papel del químico analista es el de identificar y cuantificar los componentes presentes en una muestra. Esto lo hace evaluando un producto, monitoreando la producción para el control de calidad, así como metabolitos de drogas en la sangre u orina de los pacientes.

La cromatografía es un método que sirve para separar mezclas químicas (principalmente orgánicas) en sus componentes individuales, sin embargo no es útil para identificar a los compuestos. En contraste, con la espectrofotometría, si se puede identificar la presencia de moléculas específicas en una mezcla, pero la información cuantitativa proporcionada por esta técnica es limitada, en especial cuando los compuestos de la mezcla son similares en estructura química, ya que éstos no se pueden separar. Por esta razón, la cromatografía de líquidos a menudo se acopla con la espectrofotometría. Por ejemplo, la cromatografía es el método más práctico de identificar y cuantificar a los diferentes componentes del complejo vitamínico B. Lo mismo sucede para el análisis de polímeros y muchos otros tipos de compuestos orgánicos.



## 2. Antecedentes de la cromatografía de líquidos

La cromatografía es una técnica que permite separar, cuantificar, aislar e identificar los componentes de una mezcla mediante un proceso de distribución entre dos fases, una fase móvil (gas o líquido) que es la que los transporta y una fase estacionaria (líquido o sólido) donde son retenidos selectivamente. El nombre cromatografía (*kromos*: color, *graphos*: descripción) se debe a que las primeras separaciones se llevaron a cabo con pigmentos de plantas, los cuales se observaban como bandas coloridas.

De acuerdo a la naturaleza de la fase móvil y teniendo en cuenta su polaridad en relación a la fase estacionaria se encuentran dos tipos de cromatografía en fase normal: la fase estacionaria es de naturaleza polar y la fase móvil es de naturaleza no polar y cromatografía en fase reversa: la fase estacionaria es de naturaleza no polar y la fase móvil es de naturaleza polar<sup>(1,2)</sup>.



En la tabla 1 se menciona cronológicamente algunos acontecimientos importantes en relación con el desarrollo de la cromatografía de líquidos.

**Tabla 1.** Acontecimientos importantes en el desarrollo de la cromatografía de líquidos

1903	Separación de pigmentos vegetales en columnas de vidrio por el botánico Tswett.
1930	Edgar Lederer retoma trabajos de Tswett. Obtiene el reconocimiento de la técnica.
1952	Premio Nobel de Química para Martín y Synge por el desarrollo de Cromatografía líquido-líquido o de partición.
1959	Primer trabajo por exclusión molecular aplicado a biopolímeros por Flodin y Porath.
1960's	Aplicación de IEC a separación de solutos iónicos, ionizables y neutros con capacidad de formar complejos iónicos.
1970's	La técnica de HPLC ha tenido una creciente difusión desde comienzos de esta década y la instrumentación ha ido mejorando.
1970-80's	Uso de modificadores de fase móvil para mejorar forma de picos.
1990's	Mejoramiento de la tecnología de partículas de fase reversa para disminuir interacciones indeseables con grupos silanol <sup>(3,4)</sup> .



### 3. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, High Pressure Liquid Chromatography), es una técnica de separación que emplea una fase estacionaria sólida o líquida y una fase móvil líquida. La separación de los componentes de una muestra se lleva a cabo en una columna, mediante fuerzas competitivas que se establecen entre las dos fases: la fase estacionaria, material con el que se empaca la columna, y la fase móvil, constituida por un disolvente o mezcla de disolventes o soluciones acuosas, la cual transporta los solutos de la muestra y fluye a través de la columna, mediante el empleo de un sistema de bombeo a una presión determinada. En estas condiciones se produce un proceso de migración de los componentes de la muestra, a diferentes velocidades de elución, por la fase móvil, lo cual facilita la separación, la identificación y la cuantificación de cada soluto de la muestra. Las separaciones se realizan por procesos de reparto, adsorción o intercambio iónico, dependiendo del tipo de fase estacionaria usada<sup>(5)</sup>.

Toda técnica analítica tiene algunas ventajas como son las siguientes:

- Velocidad de análisis
- Alta resolución
- Buena sensibilidad
- Automatización
- Amplio espectro de aplicación



#### 4. Separación cromatográfica

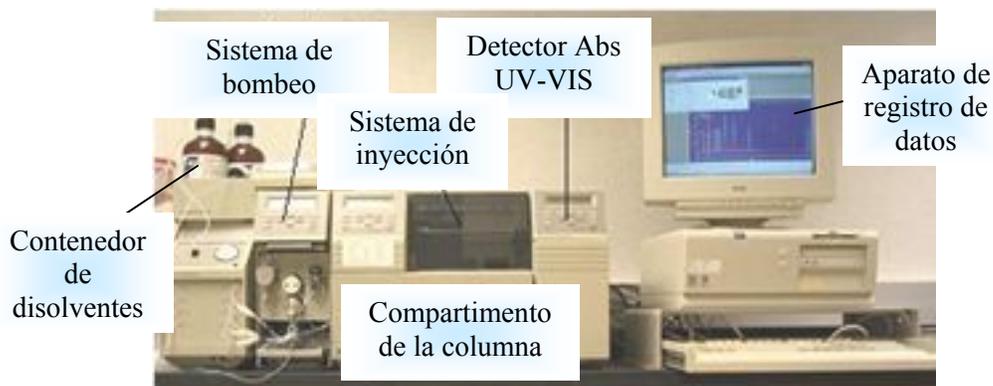
La separación cromatográfica es un sistema de distribución de los compuestos de una mezcla entre dos fases, una estacionaria con gran área superficial y otra líquida móvil que fluye a través de la primera.

Los compuestos de la mezcla establecen equilibrios entre ambas fases reteniéndose selectivamente en la fase estacionaria, esto origina que el movimiento de compuestos por medio de la fase móvil permita su separación.

#### 5. Componentes básicos de un sistema de CLAR

Un sistema cromatográfico de líquidos, el cual se representa en la figura 1, se compone básicamente de las siguientes partes:

- Depósito que contiene la fase móvil (controlador de gradiente)
- Sistema de bombeo
- Sistema de inyección para introducir la muestra
- Columna cromatográfica
- Detector
- Aparato de registro de datos, tal como una computadora o integrador



**Figura 1.** Cromatógrafo de líquidos moderno



## 5.1 Contenedor de disolventes

La fase móvil se deposita en unos recipientes de vidrio o acero inoxidable de uno a dos litros de capacidad, los cuales suelen estar provistos de un sistema de desgasificación para evitar que gases disueltos en la fase móvil puedan formar burbujas en la columna o en el sistema de detección y un filtro para eliminar partículas en suspensión en el disolvente.

### 5.1.1 Elección del disolvente

Características:

- Disponible comercialmente
- Precio
- Pureza y estabilidad. En la actualidad contamos con productos de calidad de pureza cromatográfica. Bajo contenido de impurezas
- Disolver la muestra
- Miscible con otros disolventes para formar mezclas útiles
- No degradar o disolver la fase estacionaria
- Tener baja viscosidad para disminuir la presión dentro de la columna
- Ser compatible con el detector utilizado

### 5.1.2 Filtración y desgasificación de disolventes

En la actualidad la 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. Aun con la evolución de los cromatógrafos de líquidos en la era de la computadora, hay aun problemas que ésta no puede resolver.



Los disolventes para la CLAR, todos filtrados cuidadosamente en la fábrica, pueden acumular partículas en suspensión que pueden ser perjudicial a los componentes del sistema de 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 el depósito para disolvente, la degradación lenta del recipiente del disolvente, o de condensación y polimerización del disolvente. Las partículas pueden ocasionar costosos daños a la bomba, al guardar columnas, y en general causar desgaste del sistema de CLAR. Los fabricantes de los instrumentos tienen en cuenta este problema y recomiendan que se filtre y desgasifiquen los disolventes antes de usarlos.

En el instante que se abre un nuevo recipiente de disolvente para utilizarse en CLAR se expone el interior de éste a la atmósfera y empieza a acumular gases disueltos que se encuentran en ella. El oxígeno disuelto puede producir burbujas en la columna de CLAR y cuando el disolvente entra al detector produce picos falsos y desviaciones de la línea base.

### **5.1.3 Métodos de filtración de disolventes en CLAR**

Hay tres métodos comunes que se utilizan hoy para la filtración previa de los disolventes en CLAR:

- Filtro a la entrada del disolvente
- Filtración al Vacío
- Filtración en Línea

### **5.1.4 Métodos de desgasificación de disolventes en CLAR**

Existen tres métodos comunes empleados para desgasificar disolventes en CLAR previos a su uso:

- Sonicación
- Burbujear Helio
- Desgasificación al Vacío



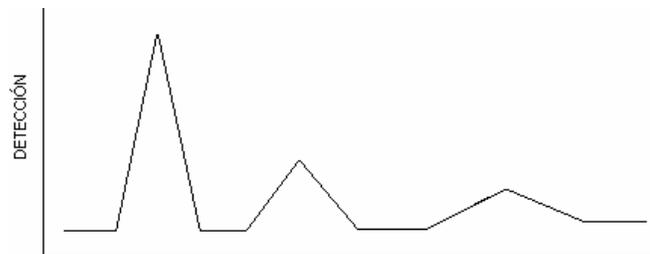
### 5.1.5 Programación del disolvente en CLAR

La elución de los componentes de una mezcla se puede llevar a cabo por programación del disolvente, mediante el cual existen dos métodos:

- Isocrático
- Gradiente

#### 5.1.5.1 Elución isocrática

La elución isocrática se realiza cuando la fase móvil se mantiene sin cambio hasta finalizar la elución de la muestra (figura 2). En muestras complejas este mecanismo no alcanza a resolver los componentes en un tiempo razonable.



**Figura 2** Representación gráfica para la elución isocrática en cromatógrafo de líquidos



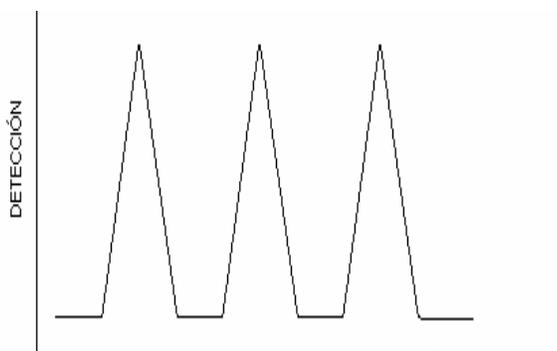
### 5.1.5.2 Elución por gradiente

La elución por gradiente representada en la figura 3, es un método por medio del cual la composición de la fase móvil cambia durante el tiempo <sup>(9)</sup>. Existen dos tipos de sistemas de gradientes: gradiente de flujo y gradiente de elución<sup>(10)</sup>.

La muestra es inyectada al sistema a una concentración de fase móvil fija, conforme transcurre el tiempo la concentración del disolvente orgánico se incrementa, para aumentar la velocidad de elución de los componentes<sup>(11)</sup>.

Para obtener buenos resultados con el método de gradiente se deben seguir cinco pasos fundamentales:

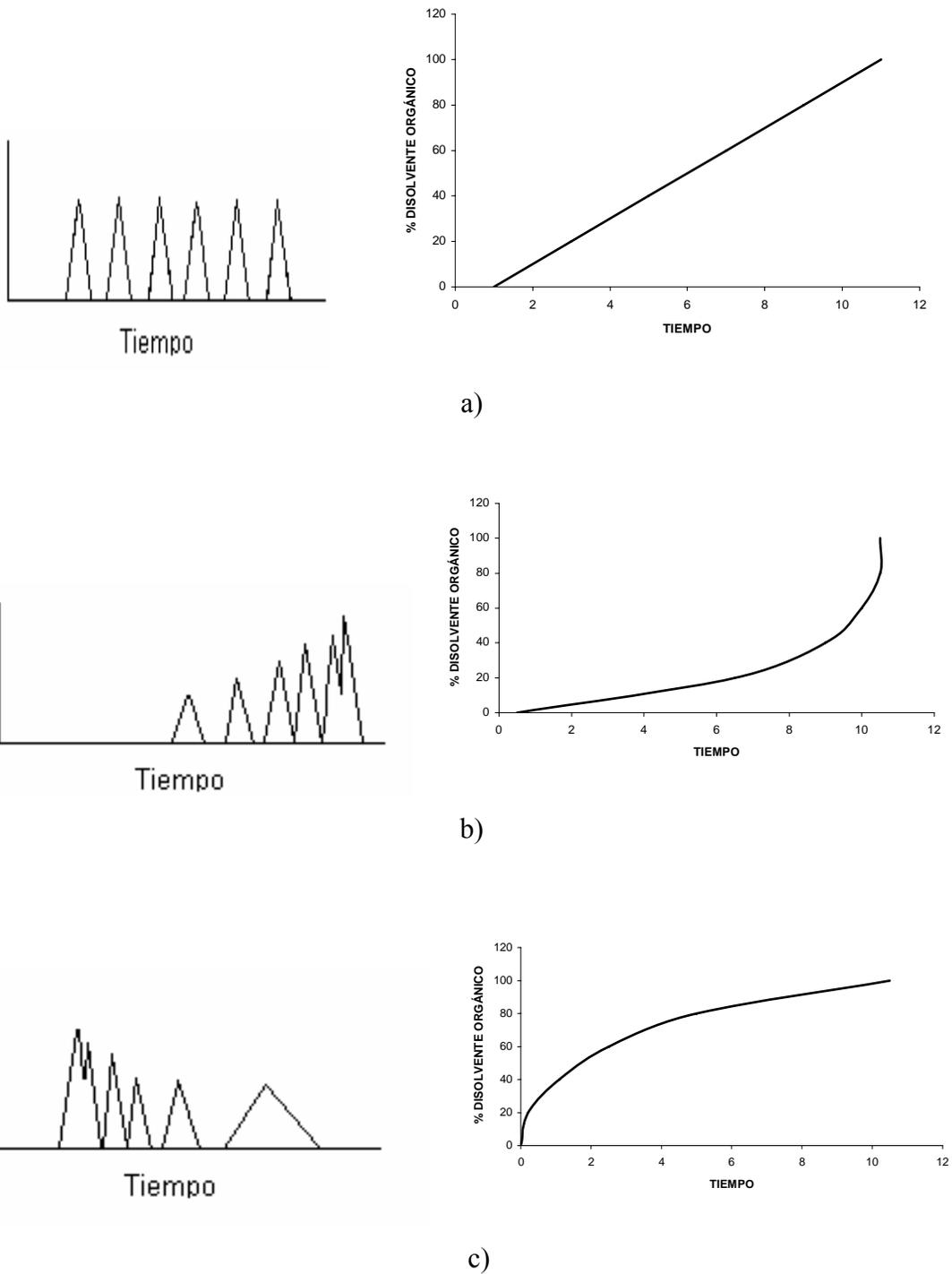
- Determinar la composición inicial y final del disolvente
- Ajustar el tiempo del gradiente
- Determinar la forma del gradiente (lineal, cóncava o convexa)
- Ajustar la velocidad del flujo para mejorar la resolución
- Regresar a las condiciones iniciales la columna



**Figura 3.** Representación gráfica para la elución por gradiente<sup>(11)</sup>



Estos gradientes pueden ser de 3 tipos, los cual se representan en la figura 4.



**Figura 4.** Tipos de gradiente más comunes a) lineal, b) cóncavo, c) convexo <sup>(8,9)</sup>



*Gradiente lineal.* Las condiciones iniciales comienzan con un 10 % de disolvente “a” o menos de fase orgánica, mientras que la fase móvil “b” contiene el 90 % o más de fase orgánica disolvente “b”, la corrida inicial de este gradiente de fase móvil “b” es del 0 % a 100 % de fase móvil “b”; con la finalidad de detectar disturbios en la línea base como resultado de las impurezas originadas en la columna por la fase móvil <sup>(9)</sup>.

*Gradiente cóncavo.* Este gradiente se presenta cuando se mantiene a un mínimo la proporción del disolvente “a” por lo tanto una polaridad y un flujo bajo y sólo en la última porción del gradiente éste se acelera, aumentando la proporción del disolvente “b” al igual que el flujo.

*Gradiente convexo.* En este gradiente al principio se incrementa la polaridad al aumentar la proporción del disolvente “a” y al final del gradiente se mantiene alta.

## 5.2 Bombas

La elección de bombas en CLAR no es menos importante que los demás componentes. Los parámetros de capacidad, necesidad, versatilidad, precisión, exactitud, robustez, tamaño y costo, deben considerarse. Los criterios de selección que debe reunir una bomba son los siguientes:

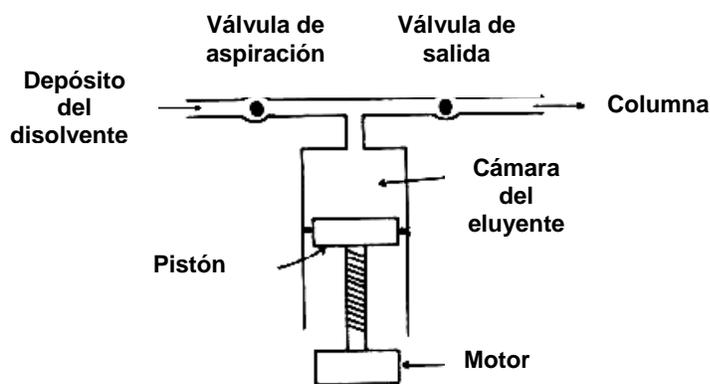
1. Reproducibilidad de la velocidad de flujo de la fase móvil
2. Capacidad para operar a velocidades de flujo bajas (0.5-2 mL/min) pero con la capacidad de 0-10 mL/min para separaciones analíticas de pequeña escala
3. Resistencia química
4. Seguridad en el límite de presión
5. Facilidad de medir flujo y/o reducción de velocidad de flujo
6. Capacidad para usar volúmenes pequeños de fase móvil
7. Manipulación de la presión por medio de un interruptor
8. Sistema de bombeo con bajo volumen muerto (reciclable puede ser conveniente)
9. Bajo mantenimiento
10. Reservorio con alta capacidad <sup>(7)</sup>



Las bombas que se usan en CLAR se pueden clasificar según su funcionamiento y diseño en mecánicas y neumáticas.

### 5.2.1 Mecánicas

Son bombas de volumen constante, éstas se pueden subdividir en dos tipos: de cámara reducida (tipo jeringa) y con cámara de volumen infinito (tipo recíproco). Las **bombas de cámara reducida** tienen un sistema de funcionamiento similar al de una jeringa, con un flujo uniforme, no pulsante; en ella, un émbolo desplaza un determinado volumen de líquido hasta el agotamiento. Son bombas de baja capacidad (250 mL) e incómodas para cambios de disolventes, figura 5.



**Figura 5.** Bomba de cámara reducida

La forma más simple de una bomba de flujo constante, consiste en un pistón accionado por un tornillo, si el tornillo se mueve a una velocidad constante el desplazamiento del pistón será constante y una vez que el sistema ha alcanzado la presión de operación, la velocidad del flujo será también constante. Todos estos tipos de bombas dan flujos libres de pulsaciones debido a su acción de tipo jeringa.



Las bombas con cámara de volumen infinito o recíproco están diseñados para trabajar con uno o varios pistones, la cual se ejemplifica en la figura 6.

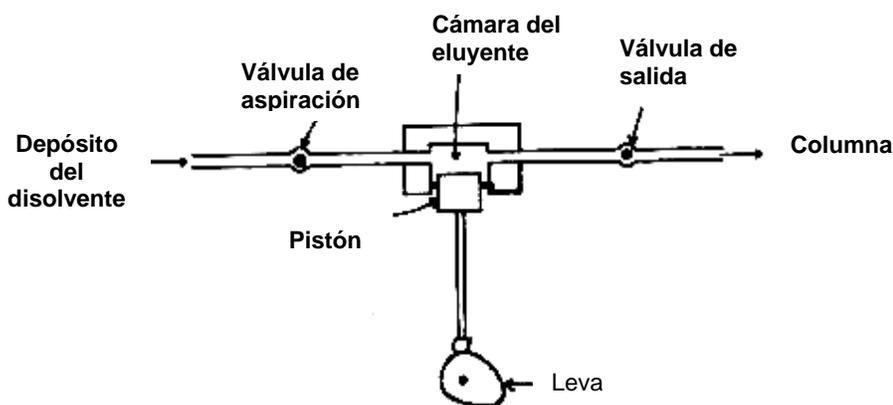


Figura 6. Bomba recíproca

### 5.2.2 Neumáticas

Son bombas de presión constante las cuales consisten en un tubo de acero inoxidable en forma de espiral con fase móvil en su interior, al cual en un extremo se le coloca una columna y en el otro extremo se conecta a una fuente de gas. Cuando el suministro de gas se acciona, el gas desplaza a la fase móvil, forzándola por el sistema.



Existen otras bombas de presión constante en donde el pistón se encuentra entre el gas y la fase móvil (figura 7). En general las bombas de presión constante tienen las siguientes características:

- a) Cámara de fase móvil de volumen limitado
- b) Para una presión constante de la bomba, la velocidad de flujo del sistema varía con cambio en la composición de la fase móvil, en la temperatura, viscosidad, resistencia generada por la columna (filtros obstruidos), entre otros factores
- c) Generalmente son más sencillas en su construcción por lo tanto son menos caras y es más fácil de darles servicio<sup>(7,8)</sup>

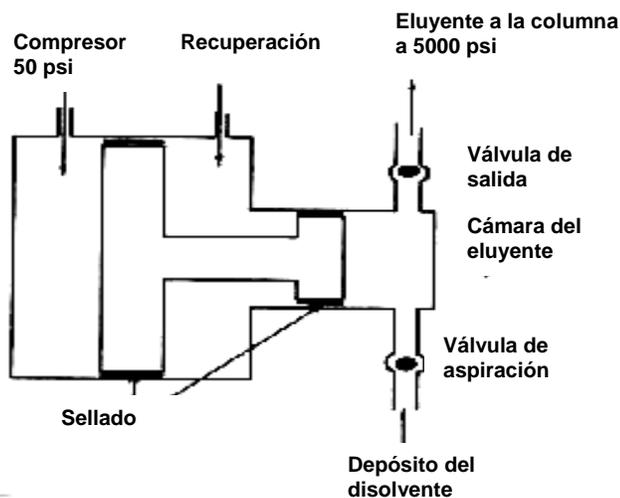


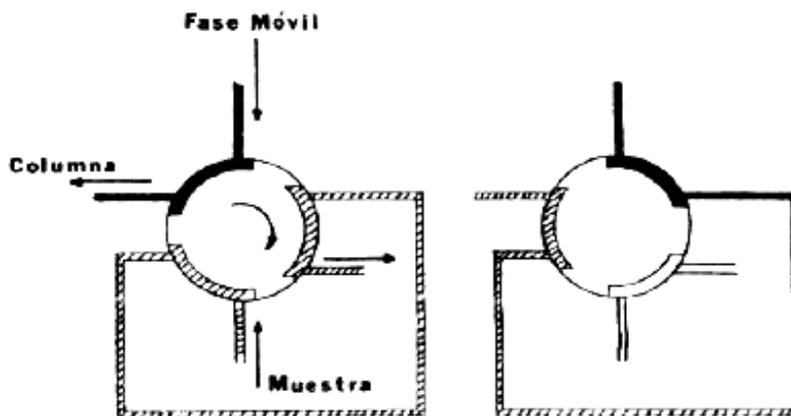
Figura 7. Bomba neumática



### 5.3 Sistemas de inyección de muestra

Después de su disolución en la fase móvil u otra solución adecuada, los compuestos que serán sometidos a la separación cromatográfica, se inyectan hacia la fase móvil, ya sea manualmente con jeringa o con inyectoros automáticos. Estos últimos consisten en un carrusel o soporte para mantener los viales de muestras, que tienen en la parte superior un séptum o tapón penetrable, y un dispositivo de inyección para transferir la muestra desde los viales a un loop de volumen fijo calibrado, desde el cual la muestra se introduce al interior del cromatógrafo. Algunos automuestreadores pueden programarse para controlar el volumen de muestra, el número de inyecciones y los ciclos de lavado del loop, el intervalo entre inyecciones y otras variables de operación.

Puede usarse una jeringa para inyección manual de muestras a través de un séptum, cuando la presión de entrada a la columna es menor que 70 atmósferas (aproximadamente 1000 psi), a presiones mayores es esencial una válvula de inyección. Algunos sistemas de válvulas incorporan un loop calibrado que se llena con la solución de prueba por transferir a la columna en la fase móvil. En otros sistemas, la solución de prueba se transfiere por medio de una jeringa y posteriormente se pasa hacia la fase móvil, figura 8.



**Figura 8.** Sistemas de inyección con válvula de conmutación.



#### 5.4 Columnas y fases estacionarias

Las columnas cortas con un diámetro interno pequeño, densamente empacadas con partículas de fase estacionaria permiten una distribución adecuada entre la fase móvil y la fase estacionaria.

Los sistemas que consisten en fases estacionarias polares y fases móviles no polares, se denominan de fase normal, mientras que el arreglo opuesto, fases móviles polares y fases estacionarias no polares se conocen como cromatografía de fase reversa. La cromatografía de reparto casi siempre se usa para compuestos de peso molecular menor de 2000 g/mol, solubles en hidrocarburos. La afinidad de un compuesto por la fase estacionaria y por lo tanto su tiempo de retención en la columna, se controla haciendo la fase móvil más o menos polar. La polaridad de la fase móvil puede variarse por la adición de un segundo y algunas veces un tercero o un cuarto disolvente.

Las fases estacionarias para una cromatografía de líquidos de fase reversa, consiste generalmente en una fase orgánica químicamente unida a la sílice u otros materiales. Usualmente las partículas son de 3 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, pero los tamaños pueden fluctuar hasta 50  $\mu\text{m}$  o más para columnas preparativas. Las partículas pequeñas cubiertas con una capa delgada de fase orgánica proporcionan una baja resistencia a la transferencia de masas y por tanto, una transferencia rápida de compuestos entre la fase estacionaria y móvil. La polaridad de la columna depende de la polaridad de los grupos funcionales enlazados, los cuales varían clásicamente desde octadecilsilano relativamente no polar a los grupos nitrilo e hidroxilo sumamente polares, las fases estacionarias no enlazadas líquidas deben ser extremadamente inmiscibles con la fase móvil. Aún así, usualmente es necesario presaturar la fase móvil con fase estacionaria a fin de prevenir la remoción de la fase estacionaria de la columna. Las fases estacionarias poliméricas recubiertas sobre el soporte son más durables.



En general las columnas convencionales empleadas para separaciones analíticas, tiene diámetro interno de 2 a 5 mm; las columnas con diámetros mayores se usan para cromatografía preparativa. Las columnas pueden termostatzarse para obtener separaciones más eficientes, pero rara vez se usan a temperaturas mayores que 60° C debido a la degradación potencial de la fase estacionaria o la volatilidad de la fase móvil. A menos que se establezca otra cosa en la norma específica del producto, las columnas se usan a temperatura ambiente.

## 5.5 Detectores

Una buena parte de los métodos por cromatografía de líquidos emplean detectores espectrofotométricos. Este tipo de detector consiste de una celda de flujo continuo montada al final de la columna. Un haz de radiación en un intervalo variado, pasa a través de la celda de flujo y entra al detector. A medida que los compuestos eluyen de la columna, estos pasan a través de la celda y absorben la radiación lo que produce cambios medibles en el nivel de energía.

### 5.5.1 Detector UV

El detector UV puede clasificarse en tres tipos:

1. Onda fija
2. Onda variable
3. Arreglo de diodos



Estos detectores se utilizan ampliamente. Los detectores de *longitud de onda fija* operan a una longitud de onda única, comúnmente a 254 nm, emitida por una lámpara de mercurio de baja presión o por filtros intercambiables. Los detectores de longitud de onda variable contienen una fuente continua, tal como una lámpara de deuterio o de xenón de alta presión y un monocromador o un filtro de interferencia para generar la radiación monocromática a la longitud de onda seleccionada por el operador. Los detectores de longitud de onda variables pueden programarse para cambiar la longitud de onda mientras el análisis se está efectuando. Los detectores de longitud de onda múltiple miden simultáneamente la absorbancia a dos o más longitudes de onda. En los detectores de longitud de onda múltiple de arreglo de diodos, la radiación pasa a través de la celda con la muestra y luego se resuelve en las longitudes de onda que la componen, las que se detectan individualmente por el arreglo de fotodiodos. Estos detectores obtienen datos de absorbancia en el intervalo completo UV-Visible lo que proporciona al analista cromatogramas a múltiples longitudes de onda seleccionadas y espectros de los picos eluidos. Usualmente los detectores de arreglo de diodos tienen menor señal a ruido que los detectores de longitud de onda fija o variable y por lo tanto son menos adecuados para el análisis de compuestos presente a concentraciones bajas.

### **5.5.2 Detector de índice de refracción**

Los detectores de índice de refracción se usan para detectar compuestos que no absorben en ultravioleta, pero son menos sensibles que los detectores ultravioleta. Los detectores de índice de refracción son sensibles a cambios pequeños en la composición del disolvente, en la velocidad de flujo y en la temperatura de tal manera que puede requerirse una columna de referencia para obtener una línea base satisfactoria.



### 5.5.3 Detector de fluorescencia

Son sensibles a compuestos que son fluorescentes por naturaleza o que pueden convertirse en derivados fluorescentes por transformación química o por copulación de grupos funcionales específicos con reactivos fluorescentes. Si se requiere la derivación, esta puede hacerse previo a la separación cromatográfica, o alternativamente, el reactivo puede adicionarse a la fase móvil antes de su entrada al detector.

### 5.5.4 Detectores electroquímicos

Los detectores potenciométricos, voltimétricos o electroquímicos polarográficos se usan para la cuantificación de compuestos que pueden oxidarse o reducirse con un electrodo de trabajo. Estos detectores son selectivos, sensibles y confiables pero requieren fases móviles conductoras libre de oxígeno disuelto y de iones metálicos reducibles. Debe usarse una bomba sin pulso y debe tenerse cuidado de asegurar que el pH, la fuerza iónica y la temperatura de la fase móvil permanezcan constantes. Los electrodos de trabajo son propensos a la contaminación con productos de reacción con las consecuentes respuestas variables.

### 5.5.5 Detector de dispersión de luz

Su fundamento está basado en la dispersión de la radiación por un aerosol seco formado por el eluato de la columna. En este caso la respuesta depende de la masa de analito y no de la estructura del mismo. Cuenta con las siguientes ventajas: es universal y compatible con elución en gradiente aunque es un detector no selectivo. Su mecanismo consta de tres pasos primordiales: nebulización, evaporación de la fase móvil y detección.



## 5.6 Sistema de registro de datos

Las estaciones de datos reciben y almacenan las señales del detector e imprimen los cromatogramas completos con la altura de los picos, las áreas de los picos, la identificación de la muestra y las variables del método. También se usan para programar el cromatógrafo de líquidos, para controlar la mayoría de las variables y para proporcionar períodos de operación automática prolongados.

Los datos pueden registrarse en un graficador en integradores de diferente complejidad, en los que puede imprimirse desde el área del pico hasta cromatogramas con área y altura del pico y cuentan con base de datos para probables reprocesamientos.

Hoy día el empleo de software especializado proporciona un mejor manejo y obtención de los parámetros cromatográficos más importantes.

## 6. Parámetros más importantes para una separación cromatográfica

### 6.1 Tiempo muerto ( $t_0$ )

Corresponde al tiempo de retención para una sustancia que no es retenida por la columna, esto es el tiempo en que la fase móvil recorre de un lado a otro la columna (figura 9).



## 6.2 Tiempo de retención ( $t_R$ )

Se mide desde el momento de la inyección de la muestra hasta el momento en que aparece el máximo del pico en el cromatograma <sup>(2)</sup>, figura 9.

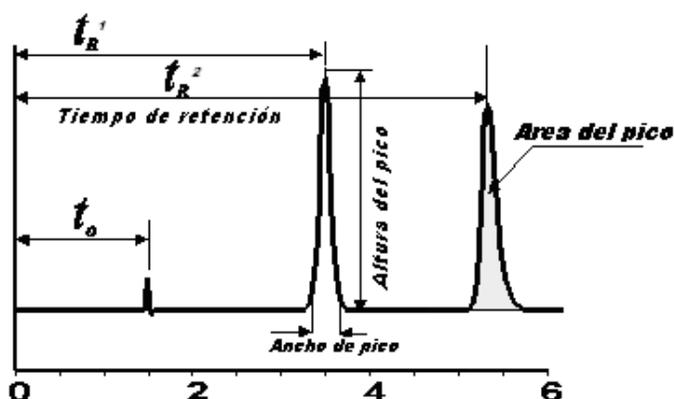


Figura 9. Representación de  $t_0$ ,  $t_R$ , área, altura y ancho de pico.

## 6.3 Factor de capacidad ( $k'$ )

Es la función de la retención del pico de la muestra en el cromatograma. Es específico para cada sustancia.  $k'$  depende de la fase estacionaria, la fase móvil, la temperatura, calidad del empaque, etc.

$$k' = (t_R - t_0) / t_0$$

Como ejemplo, una columna  $C_{18}$  tiene una  $k'$  mayor que una  $C_8$  y está que una  $C_3$ . Entre columnas  $C_{18}$ , la  $k'$  disminuye al disminuir la carga de carbono (% de carbono) <sup>(11)</sup>.



#### 6.4 Factor de selectividad ( $\alpha$ )

Los tiempos de retención cromatográficos son característicos y representativos de los compuestos, pero no son únicos la coincidencia de tiempos de retención de una muestra y una sustancia de referencia pueden usarse como una característica en la construcción de un perfil de identidad, pero por si mismo es insuficiente para establecer su identidad. Los tiempos de retención absolutos de un compuesto dado varían de un cromatograma a otro, normalmente las comparaciones se hacen en términos de retención relativa ( $\alpha$ ) la cual se calcula por medio de la siguiente relación:

$$\alpha = (t_2 - t_0) / (t_1 - t_0)$$

En donde

$t_2$  y  $t_1$  = tiempos de retención, medidos desde el punto de inyección de la muestra y del patrón de referencia, respectivamente, determinados bajo condiciones experimentales idénticas en la misma columna.

$t_0$  = tiempo de retención de una sustancia no retenida<sup>(13)</sup>.

#### 6.5 Adecuabilidad del sistema

La adecuabilidad del sistema son las condiciones óptimas de operación tanto del sistema como del método analítico, los parámetros dependerán de los obtenidos en el desarrollo del método analítico aunque en otras ocasiones se encuentra establecidas en las normas oficiales (FEUM, USP, BP). Los parámetros requeridos son:

Factor de capacidad ( $K'$ ) > 2

Resolución (R) > 2

Asimetría < 2

Platos teóricos (N) > 2000



## 6.6 Eficiencia de la columna

Este parámetro es de gran importancia porque indica el buen funcionamiento de la columna, los valores para este parámetro se obtendrán a partir del desarrollo o estará indicado en la información oficial.

La eficiencia de la columna también puede especificarse como un requisito de adecuación del sistema, especialmente cuando sólo uno de los picos del cromatograma es el que interesa, sin embargo para asegurar la resolución este medio es menos confiable que una medición directa. La eficiencia de la columna es una medida de la definición del pico, lo cual es importante para la detección de trazas de componentes.

El número de platos teóricos  $N$ , es una medida de la eficiencia de la columna y puede calcularse de la siguiente manera:

$$N = a (t_R / w)^2$$

$N$  = Número de platos teóricos,

$a$  = Es una constante dependiendo del método usado (tabla 2)

$t_R$  = tiempo de retención del pico

$W$  = ancho del pico

**Tabla 2.** Valores de  $a$  en los diferentes métodos utilizados <sup>(15)</sup>

Método	$a$
Ancho del pico a la $\frac{1}{2}$ de su altura	5.54
Ancho del pico al 4.4 % de la altura del pico ( método $5\sigma$ )	25
Tangente	16

El valor de  $N$  es la medida de la capacidad que tienen una columna cromatográfica para separar dos picos y esta definida como la distancia que hay entre el centro de los picos dividida entre el promedio de los ancho de los picos <sup>(14)</sup>.



## 6.7 Resolución (R)

La resolución es una función de la eficiencia de la columna y se especifica para asegurar que los compuestos eluyen en tiempo muy cercanos se separen adecuadamente uno del otro para establecer la resolución general del sistema y para garantizar que los estándares internos y el principio activo estén separados satisfactoriamente.

En la separación de dos componentes en una mezcla la resolución R, se determina por medio de la siguiente fórmula:

$$R = 2 (t_2 - t_1) / (w_2 + w_1)$$

En donde

$t_2$  y  $t_1$  = tiempo de retención de los dos componentes

$w_2$  y  $w_1$  = a los anchos correspondientes a las bases de los picos obtenidos por extrapolación de los lados relativamente rectos de los picos a la línea base.

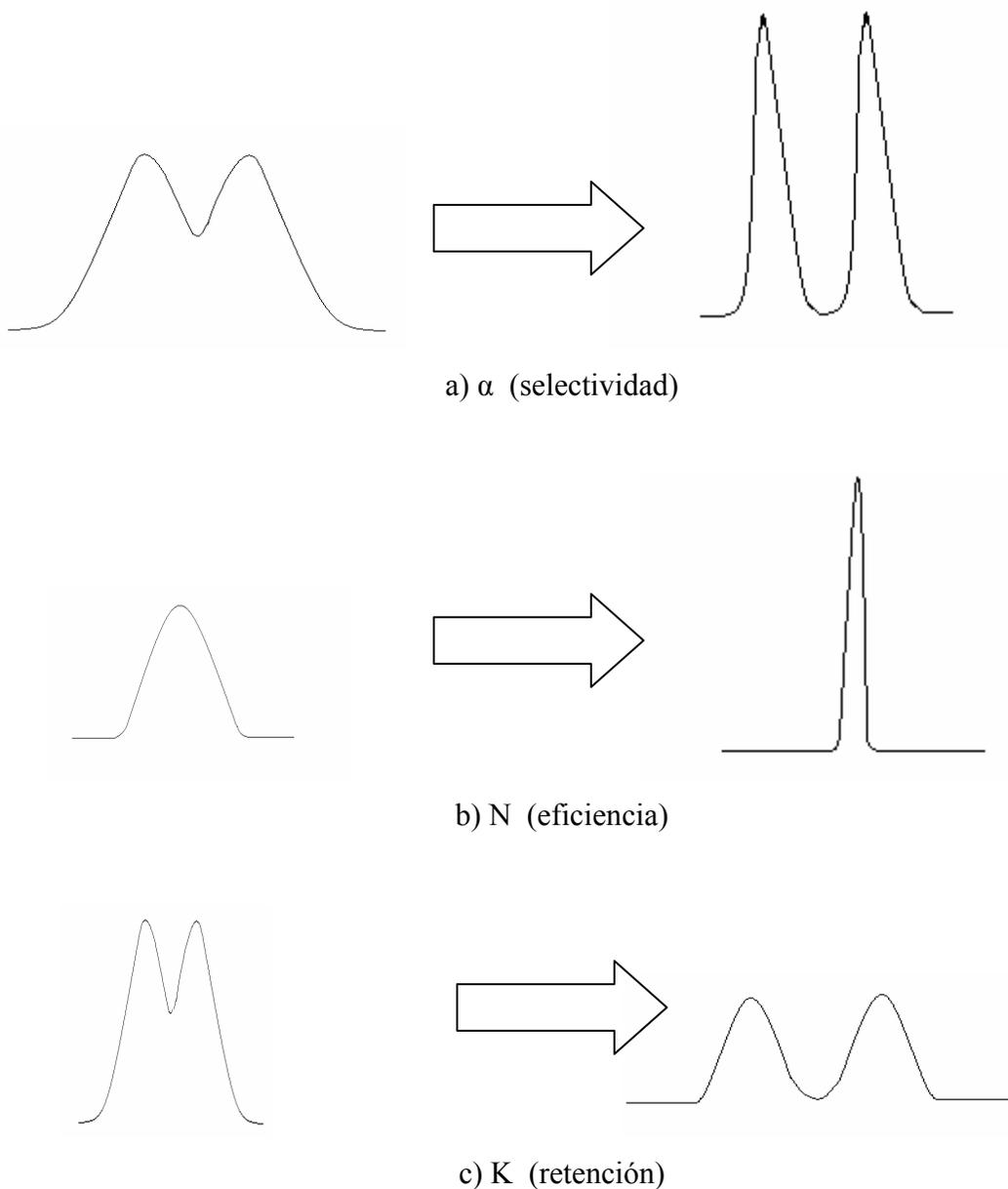
### 6.7.1 Factores que afectan la resolución

La ecuación que se muestra a continuación, representa como la resolución es afectada por los siguientes factores: selectividad, eficiencia y retención:

$$R = \frac{(1/4) (\alpha - 1)}{\alpha} \sqrt{N} \frac{[k / (1 + k)]}{k}$$



En la figura 10 se representan los tres principales efectos en la resolución de una separación cromatográfica.



**Figura 10.** Principales efectos que determinan la resolución en un análisis cromatográfico a) selectividad b) eficiencia c) retención <sup>(15)</sup>



Una relación importante que existe entre la eficiencia y la resolución se puede describir con base a la siguiente relación:

$$\frac{N_1}{N_2} = \left[ \frac{R_1}{R_2} \right]^2$$

En donde se puede obtener la siguiente relación:

$$\text{Eficiencia} \times 4 = \text{Resolución} \times 2^{(16)}$$

Una resolución igual a uno se considera como una separación casi completa aunque en realidad presenta aproximadamente un 3 % de traslape de picos adyacentes, cuando  $R = 1.5$  la resolución tiene una sobreposición de 0.3 %.

### 6.7.2 Factor de coleo

Es una medida de la simetría del pico, tiene valor de uno para picos perfectamente simétricos y su valor se incrementa conforme el coleo se hace más pronunciado, (figura 11). En algunos casos se pueden presentar valores menores de uno. A medida que aumenta la asimetría del pico la integración y por lo tanto la precisión son menos confiables<sup>(11)</sup>.

En general los picos de concentración son asimétricos y esta asimetría (t) se puede evaluar de acuerdo a la ecuación:

$$t = \left( \frac{B}{A} \right)$$

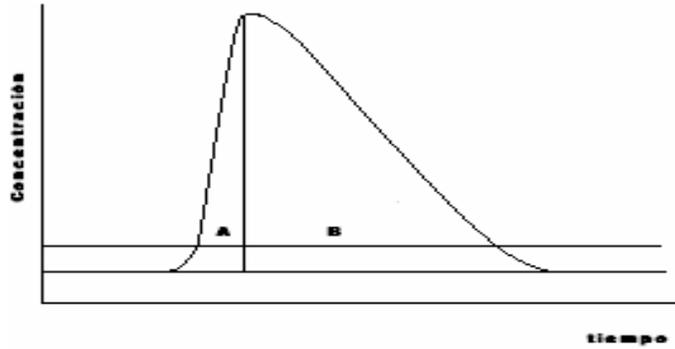
En donde:

B = Distancia después del centro del pico

A = Distancia antes del centro del pico

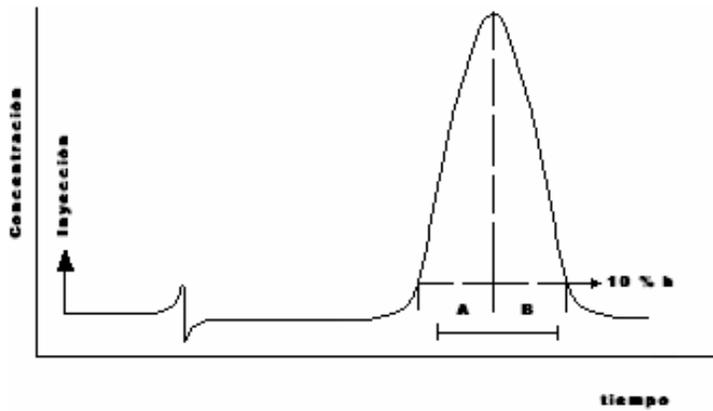


Estas distancias se toman a un 10 % de la altura del pico.



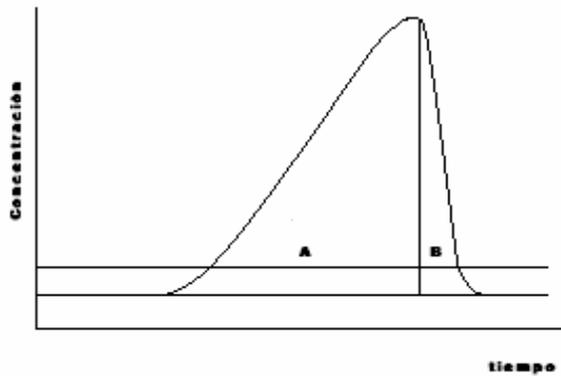
$$t = \left( \frac{B}{A} \right) > 1$$

a) Pico coleado



$$t = \left( \frac{B}{A} \right) \approx 1$$

b) Pico simétrico



$$t = \left( \frac{B}{A} \right) < 1$$

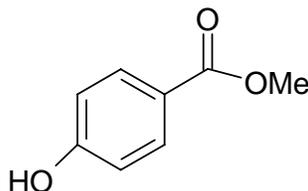
d) Pico cabecado

Figura 11. Criterios empleados para el factor de coleo <sup>(11,15)</sup>



## 7. Propiedades fisicoquímicas de los analitos estudiados

### 7.1 Metilparabeno



$C_8H_8O_3$

PM 152.15 g/mol

Ácido Benzoico

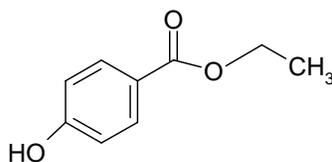
4-hidroximetil ester

Metil *p*-hidroxibenzoato

Solubilidad: Casi insoluble en agua; soluble en metanol, éter y propilenglicol.

Aplicación: Es utilizado como conservador en cosméticos, preparaciones farmacéuticas y en alimentos.

### 7.2 Etilparabeno



$C_9H_{10}O_3$

PM 166.18 g/mol

Ácido Benzoico

4-hidroxietil ester

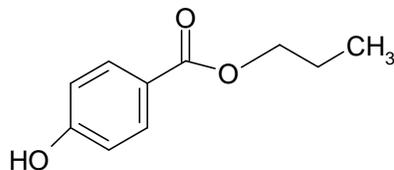
Etil *p*-hidroxibenzoato

Solubilidad: Casi insoluble en agua fría; soluble en etanol, acetona o propilenglicol.

Aplicación: Es utilizado como conservador en cosméticos y preparaciones farmacéuticas.



### 7.3 Propilparabeno



$C_{10}H_{12}O_3$

PM 180.20 g/mol

Ácido Benzoico

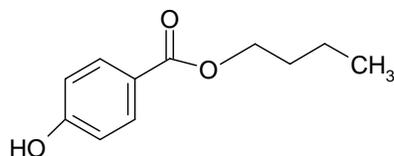
4-hidroxi-propil ester

propil *p*-hidroxibenzoato

Solubilidad: Casi insoluble en agua fría; soluble en etanol, acetona, propilenglicol o dietil éter; moderadamente soluble en benceno.

Aplicación: Es utilizado como conservador en preparaciones farmacéuticas.

### 7.4 Butilparabeno



$C_{11}H_{14}O_3$

PM 194.23 g/mol

Ácido Benzoico

4-hidroxi- butil ester

butil *p*-hidroxibenzoato

Solubilidad: Casi insoluble en agua fría; soluble en etanol, acetona o propilenglicol.

Aplicación: Es utilizado como conservador en cosméticos preparaciones farmacéuticas y en alimento.



#### **IV. Planteamiento del problema**

En una mezcla de los compuestos metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno y butilparabeno analizados por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en fase reversa con una fase móvil de MeOH/ Agua, la resolución de los picos no cumple con lo establecido en FEUM y el tiempo de análisis es muy largo; por lo que se propone variar la velocidad de flujo con el objeto de reducir el tiempo de análisis.



## V. Objetivos

Evaluar el efecto del aumento de la velocidad de flujo en un sistema isocrático y determinar cómo el parámetro de resolución cambia.

Proponer un gradiente de flujo para el análisis de los compuestos en la mezcla que cumpla con los requerimientos establecidos en FEUM.



## VI. Parte experimental

### 1. Sustancias

<i>Reactivo</i>
Metanol HPLC
Agua HPLC
Metilparabeno
Etilparabeno
Propilparabeno
Butilparabeno

### 2. Equipo

<i>Equipo</i>	<i>Proveedor</i>	<i>Fecha de calibración</i>	<i>Modelo</i>
Cromatógrafo de Líquidos	Varian	-	410
<i>Accesorios</i>	<i>Proveedor</i>	<i>No. de serie</i>	<i>Características</i>
Columna	Varian	-	Microsorb-MV 100 4.6 x 150 mm, 5 $\mu$ m, empacada C <sub>18</sub> .
Sonicador	VWR	-	75D
<i>Instrumento</i>	<i>Proveedor</i>	<i>Fecha de calibración</i>	<i>Modelo</i>
Balanza analítica	OHAUS	08-08-2005	Explorer Pro 214C



### 3. Condiciones cromatográficas

Fase móvil MeOH/ H<sub>2</sub>O (62:38)

t<sub>0</sub> 1.6 min

t<sub>equilibrio</sub> 2 min

Tiempo de análisis entre 10 - 20 min

Longitud de onda ( $\lambda$ ) 254 nm

Vol. de inyección 5  $\mu$ L

Temperatura de la columna: Ambiente

### 4. Metodología

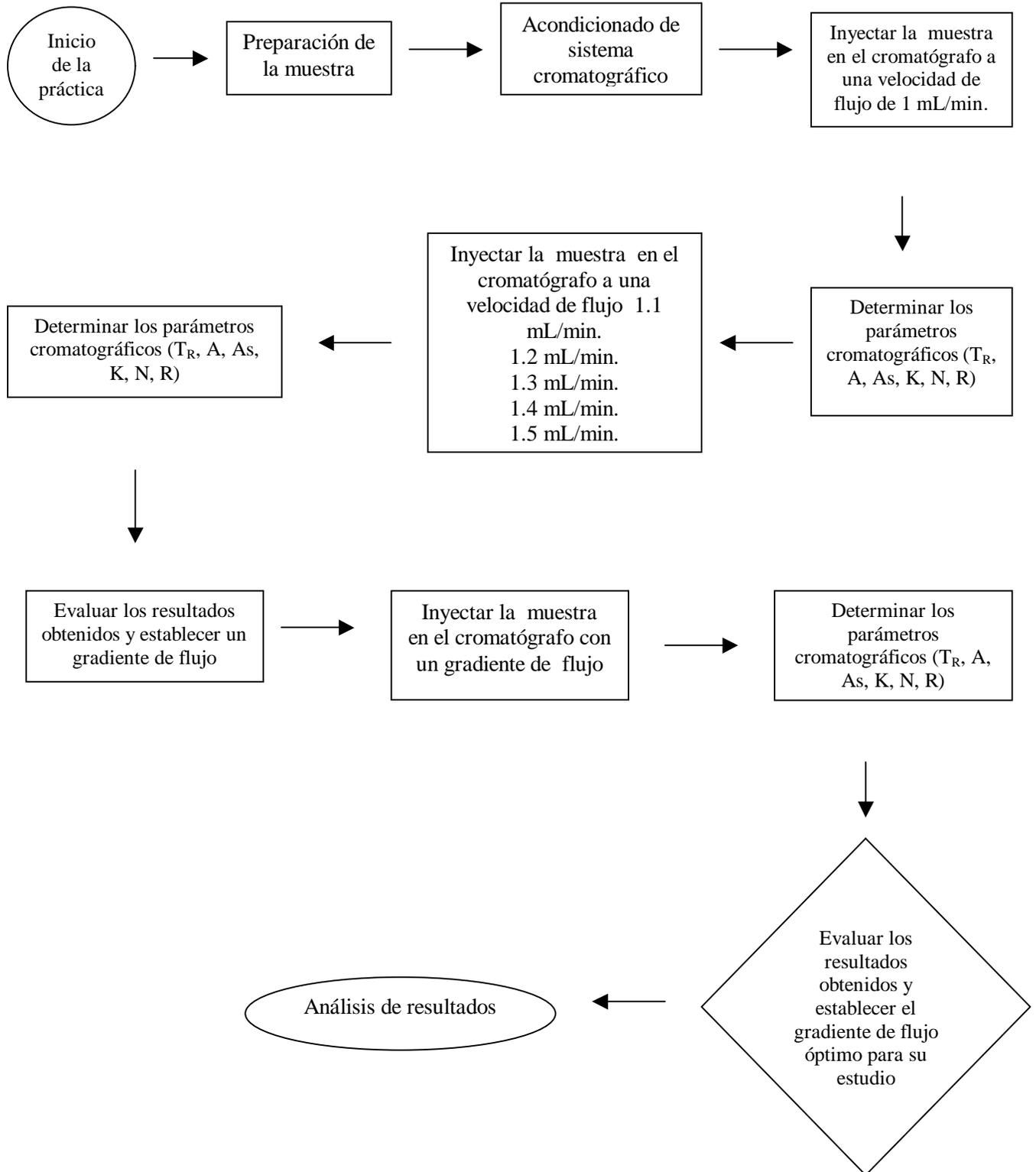
Preparación de las muestras

Se pesaron aproximadamente 10 mg de metilparabeno, 14 mg de etilparabeno, 15 mg de propilparabeno y 25 mg de butilparabeno, se colocaron en un vial, se adiciono un mL de metanol y se mezcló.

Se inyectaron al cromatógrafo 5  $\mu$ L de la preparación de la muestra a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min hasta 1.5 mL/min (isométrico), con una fase móvil de MeOH/H<sub>2</sub>O (62:38). Se obtuvieron los cromatogramas por separado y se calcularon los siguientes parámetros: tiempo de retención, área, asimetría, factor de capacidad, número de platos teóricos así como la resolución.



### 4.1. Diagrama de Flujo

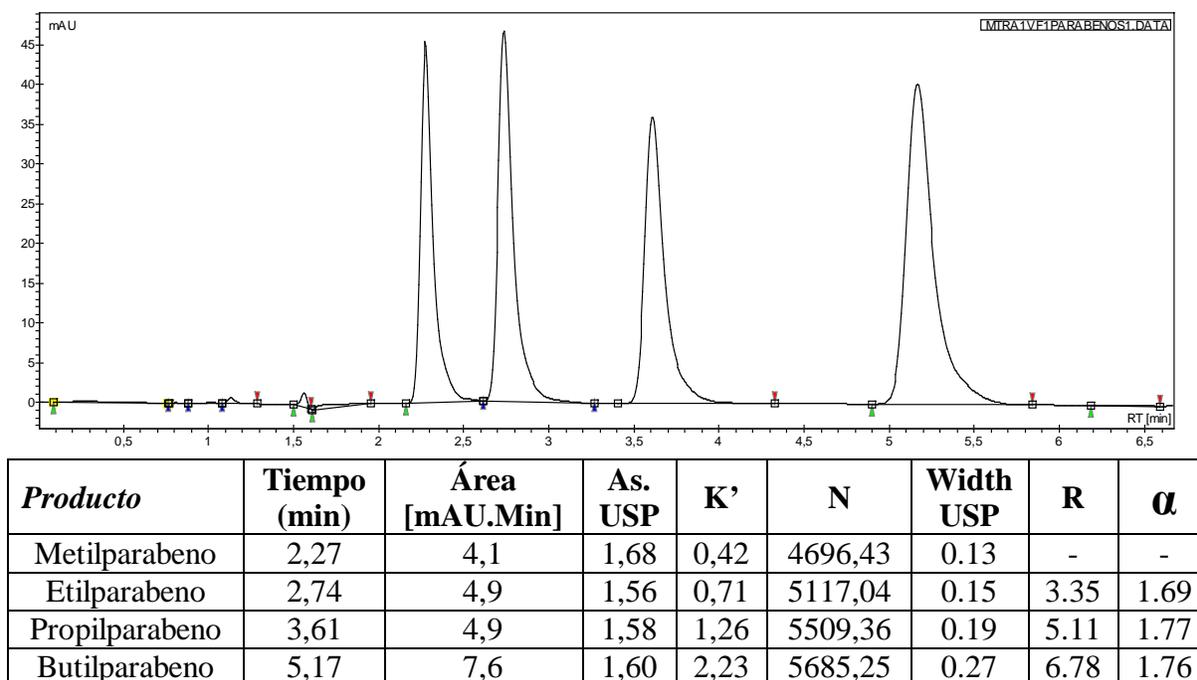




## VII. Resultados y análisis

El orden de elución de estos compuestos es el siguiente: metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno y butilparabeno, esto es debido a que entre más larga sea la cadena de hidrocarburos ( $p\text{-CH}_3$ ,  $p\text{-CH}_2\text{CH}_3$ ,  $p\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $p\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ) ésta presentara una menor polaridad y será retenida por un mayor tiempo en la fase estacionaria.

En la figura 12, se obtiene una buena resolución de los picos de los compuestos lo cual nos permite identificarlos, sin embargo el tiempo de análisis es muy largo por lo que se modificara la velocidad de flujo.

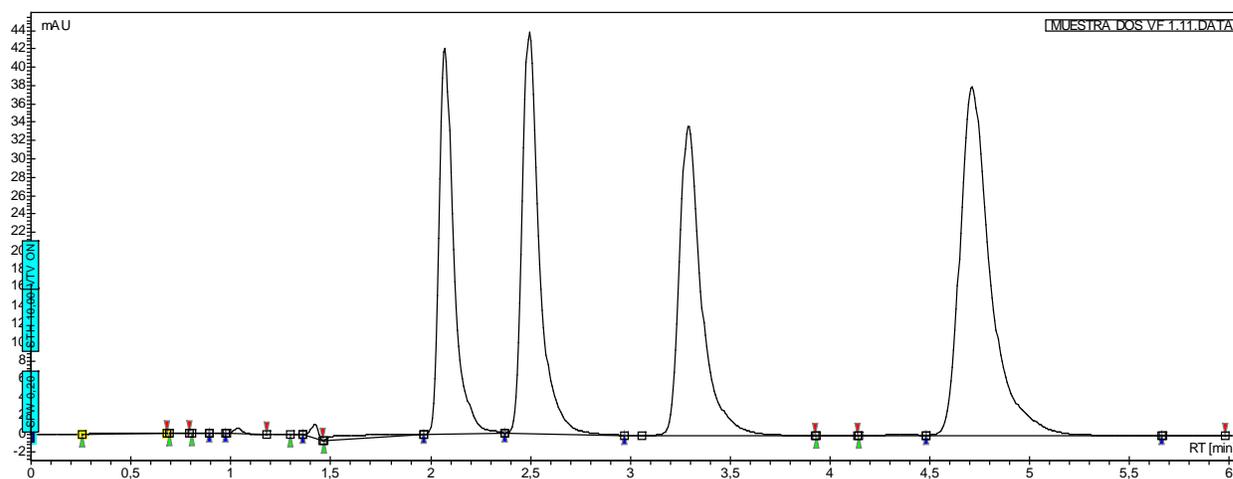


**Figura 12.** Cromatograma obtenido a una velocidad inicial de 1 mL/min.

Los resultados nos permiten tener un panorama general donde se determinan los parámetros cromatográficos de cada uno de estos compuestos. Estos se tomarán en cuenta como valores iniciales.



De acuerdo a los resultados representados en la figura 13, obtenidos a una velocidad de flujo de 1.1 mL/min no existe una variación significativa en el parámetro de resolución obtenida en el análisis inicial, persiste un tiempo largo de análisis y además no se modifica el orden de elución de los compuestos.

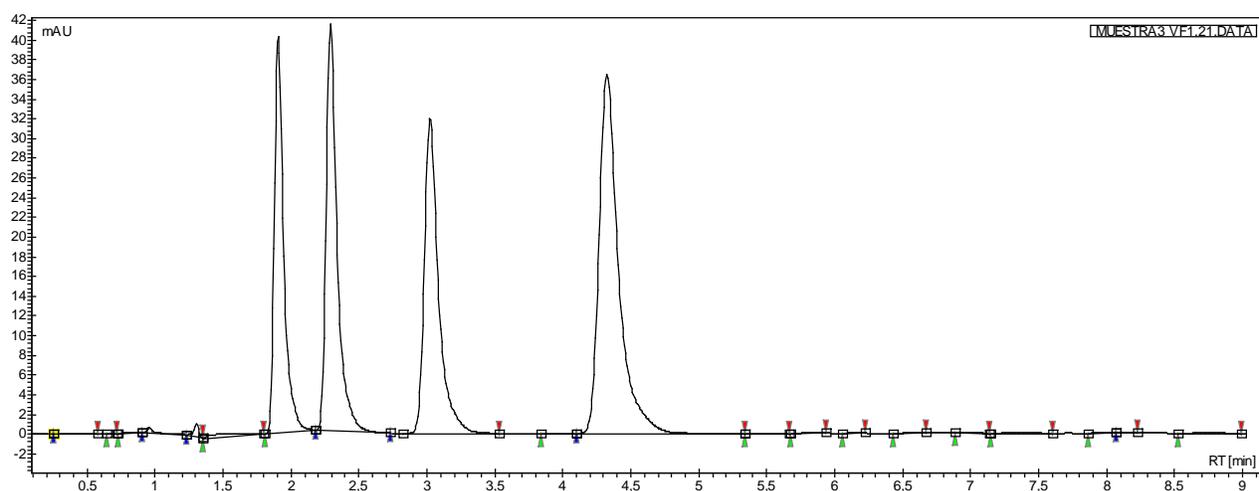


Producto	Tiempo (min)	Área [mAU.Min]	As. USP	K'	N	Width USP	R	$\alpha$
Metilparabeno	2.07	3.6	1.57	0.30	4305.50	0.13	-	-
Etilparabeno	2.49	4.3	1.59	0.56	4696.61	0.15	3.00	1.86
Propilparabeno	3.29	4.3	1.67	1.05	5005.67	0.19	4.70	1.87
Butilparabeno	4.71	6.7	1.59	1.95	5422.27	0.26	6.31	1.85

Figura 13. Cromatograma obtenido a una velocidad de 1.1 mL/min.



Los resultados obtenidos a una velocidad de 1.2 mL/min se representan en la figura 14. Aunque los tiempos de retención de los picos disminuyeron a esta velocidad de flujo aún no existe una variación significativa en el parámetro de resolución.

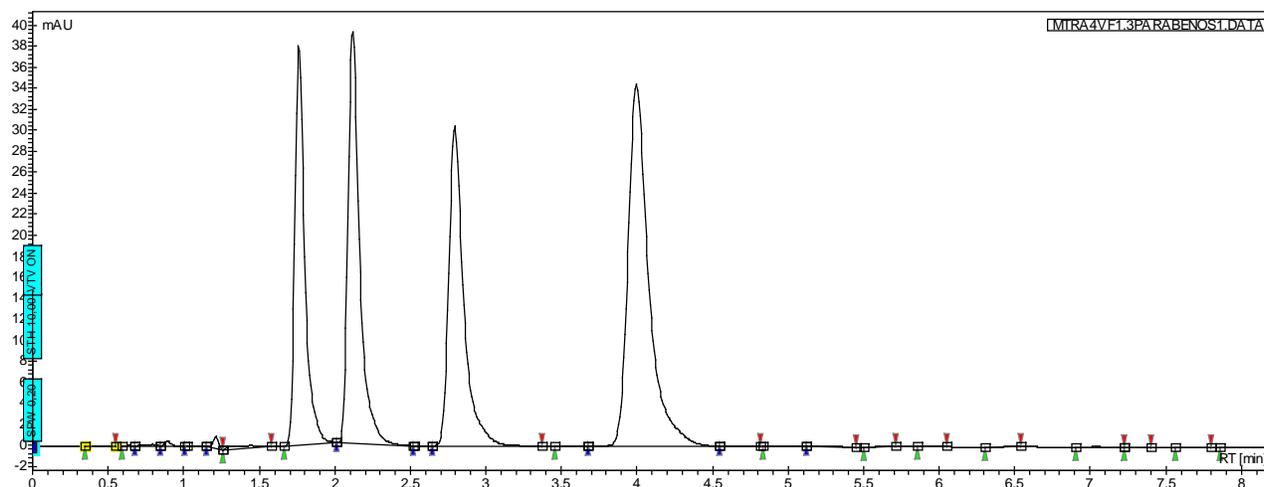


Producto	Tiempo (min)	Área [mAU.Min]	As. USP	K'	N	Width USP	R	$\alpha$
Metilparabeno	1.91	3.2	1.58	0.19	4007.59	0.12	-	-
Etilparabeno	2.29	3.9	1.53	0.43	4347.88	0.14	2.92	2.26
Propilparabeno	3.02	3.9	1.65	0.89	4695.54	0.18	4.56	2.06
Butilparabeno	4.33	6.1	1.60	1.70	5130.90	0.24	6.24	1.91

Figura 14. Cromatograma obtenido a una velocidad de 1.2 mL/min.



A una velocidad de flujo de 1.3 mL/min representada en la figura 15, se observa que para el propilparabeno la resolución es menor con respecto a la inicial, los tiempos de retención de los compuestos presentan una disminución importante en el análisis, por lo que el tiempo de corrida total es de 4.5 minutos.



Producto	Tiempo (min)	Área [mAU.Min]	As. USP	K'	N	Width USP	R	$\alpha$
Metilparabeno	1.76	2.9	1.67	0.10	3791.58	0.11	-	-
Etilparabeno	2.12	3.5	1.55	0.33	4130.90	0.13	3.00	3.3
Propilparabeno	2.79	3.5	1.64	0.75	4434.52	0.17	4.46	2.27
Butilparabeno	3.99	5.4	1.65	1.50	4723.70	0.23	6.00	2.00

Figura 15. Cromatograma obtenido a una velocidad de 1.3 mL/min.



En los resultados de  $t_R$  de los compuestos estudiados disminuyeron en cuanto se realizó un aumento en la velocidad de flujo, esto es debido a que al aumentar la velocidad de flujo aumenta la velocidad de elución, aumenta la velocidad lineal y la eficiencia del sistema cambia.

El parámetro de resolución se ve afectado de menor a mayor medida en el siguiente orden: etilparabeno, propilparabeno y butilparabeno aunque si existe una buena separación entre los picos lo cual permitió la identificación clara de cada uno de ellos.

En el valor del factor de asimetría los valores en los diferentes flujos se mantienen constantes aproximadamente de 1.5 a 1.7 por lo que cumple con el requisito indicado en la farmacopea (FEUM) que debe ser menor a 2.

Se obtiene la siguiente resolución relacionando todos los resultados obtenidos a diferentes velocidades de flujo (tabla 3).

	<b>V<sub>F</sub> 1.0</b> (mL/min)	<b>V<sub>F</sub> 1.1</b> (mL/min)	<b>V<sub>F</sub> 1.2</b> (mL/min)	<b>V<sub>F</sub> 1.3</b> (mL/min)	<b>V<sub>F</sub> 1.4</b> (mL/min)	<b>V<sub>F</sub> 1.5</b> (mL/min)
Metilparabeno Etilparabeno	3.35	3.00	2.92	3.00	2.75	2.82
Etilparabeno Propilparabeno	5.11	4.70	4.56	4.46	4.34	4.37
Propilparabeno Butilparabeno	6.78	6.31	6.24	6.00	5.89	5.72

**Tabla 3.** Comparación de resolución a diferentes velocidades de flujo



El tiempo total para el análisis de estos compuestos es de 4 min aproximadamente.

Se puede observar que la resolución disminuye a medida que se va aumentando la velocidad de flujo.

Un punto a considerarse para el metilparabeno es que al aumentar la velocidad de flujo el tiempo de retención de este compuesto se acerca considerablemente al tiempo muerto por lo que resulta inadecuado un método con estas características.

Además otro parámetro que es afectado por el aumento de la velocidad de flujo es la eficiencia, es decir, el número de platos teóricos (N) disminuye con respecto a los valores iniciales; debido a que la velocidad lineal aumenta y por lo tanto la altura del plato teórico (H) aumenta resultando por consiguiente pérdida de eficiencia.

Debido a los anteriores resultados los análisis resultaron inadecuados por no cumplir con Farmacopea, debido a esto el método tuvo que ser modificado para que la adecuabilidad del sistema pudiera cumplirse.



Una alternativa de solución fue el realizar un análisis por gradiente de flujo. De esta manera los gradientes propuestos fueron:

### Gradiente 1

Condiciones de análisis

Fase móvil MeOH/ H<sub>2</sub>O (62:38)

Tiempo de corridas 5.7 min.

Velocidad de flujo: 0.6 a 1.7 mL/min

$\lambda$  254 nm

Vol. de inyección 5  $\mu$ L

Temperatura de la columna: Ambiente

**Tabla 4.** Gradiente de flujo 1

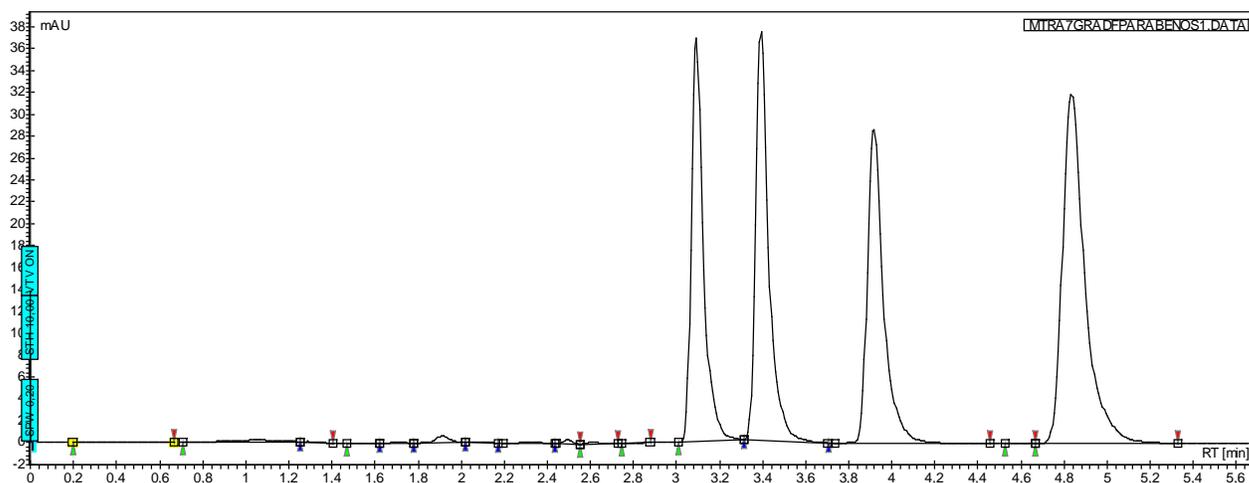
<i>T</i> (min)	<i>Vel. F.</i> (mL/min)	% <i>H2O</i>	% <i>MeOH</i>
0,0	0,6	32	68
2,0	0,6	32	68
2,6	0,8	32	68
2,4	1,0	32	68
2,6	1,3	32	68
2,8	1,5	32	68
3,0	1,6	32	68
3,5	1,7	32	68

**Tabla 5.** Resultados del gradiente de flujo 1

Producto	Tiempo (min)	As.	N	R
Metilparabeno	3.09	1.53	15961.05	-
Etilparabeno	3.39	1.53	16185.76	2.85
Propilparabeno	3.92	1.51	14970.14	4.41
Butilparabeno	4.83	1.61	11822.43	5.87



En este análisis de gradiente se modificó también la proporción de fase móvil quedando 32:68 agua:metanol. El orden de elución de nuestros componentes no se modificó, los cuales se representan en la figura 16



**Figura 16.** Cromatograma obtenido por un gradiente de flujo (tabla 4)

La resolución entre estos picos cumple con los requerimientos marcados en farmacopea ( $R \geq 2$ ) pero los picos presentan un coleo considerable y con respecto a sus platos teóricos presentan una buena eficiencia.

**Gradiente 2**

Condiciones de análisis

Fase móvil MeOH/ H<sub>2</sub>O (62:38)

Corridas de 20 min

 $\lambda$  254 nmVol. de inyección 5  $\mu$ L

Temperatura de la columna: Ambiente

**Tabla 6.** Gradiente de flujo 2

<i>T</i> (min)	<i>Vel. F.</i> (mL/min)	% <i>H2O</i>	% <i>MeOH</i>
0,0	0,6	38	62
2,0	0,6	38	62
2,4	0,6	38	62
2,6	0,6	38	62
2,8	0,6	38	62
3,0	0,6	38	62
3,5	0,8	38	62
3,6	1,0	38	62
3,7	1,4	38	62
3,8	1,5	38	62
3,9	1,7	38	62

**Tabla 7.** Resultados del gradiente de flujo 2

<b>Producto</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>As.</b>	<b>N</b>	<b>R</b>
Metilparabeno	3.65	1.58	10249.83	-
Etilparabeno	4.05	1.57	22004.70	3.20
Propilparabeno	4.59	1.58	22552.54	4.69
Butilparabeno	5.49	1.67	17023.35	6.20



El tiempo de retención de los picos de estos compuestos aumenta bajo estas condiciones, debido a que el agua aumenta la polaridad en la fase móvil, se observa (figura 17) que la resolución y eficiencia de los picos aumenta.

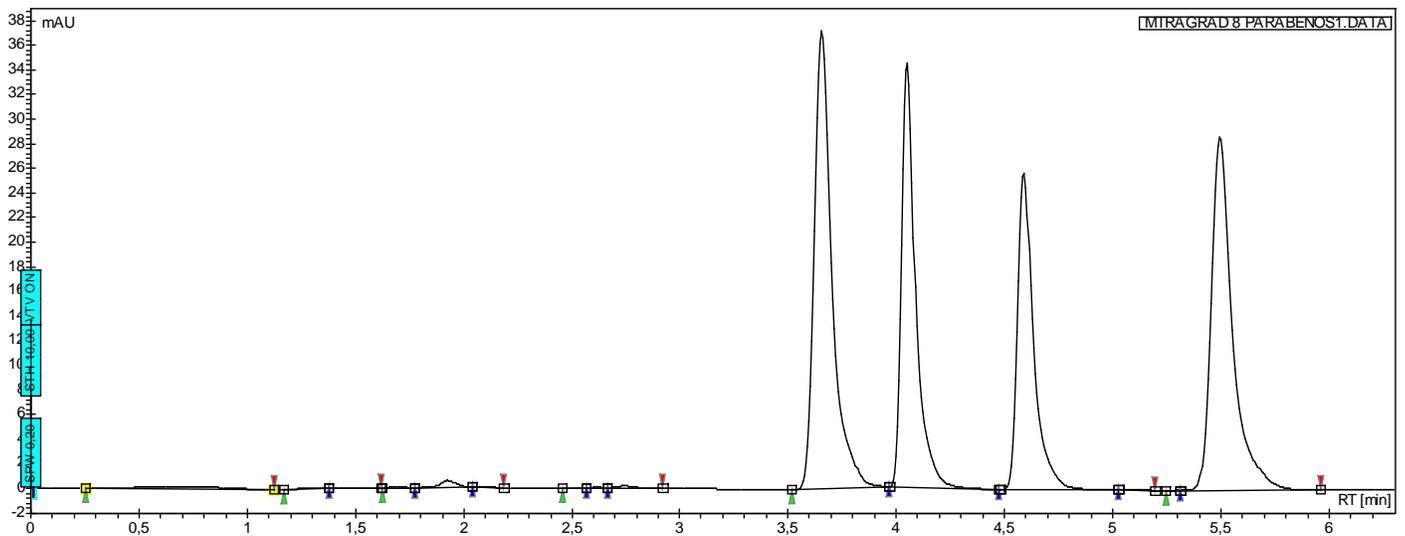


Figura 17. Cromatograma obtenido por un gradiente de flujo (tabla 6)



## VIII. Conclusiones

En este estudio de tipo experimental se establece que al aumentar la velocidad de flujo en un sistema isocrático el parámetro de resolución disminuye hasta valores no aceptados por farmacopea (FEUM).

La velocidad de flujo cambia la resolución porque la eficiencia del sistema varía; es decir, la velocidad lineal cambia y la altura del plato teórico se ve afectada.

En el análisis isométrico de flujo, la velocidad más adecuada es de 1 mL/min la cual de acuerdo con Van Deemter es cercana a la óptima para una columna de 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula.

Al aumentar la velocidad de flujo también se observa una disminución en la eficiencia de la columna y por consiguiente una disminución en la cantidad de platos teóricos.

Utilizando un flujo de 1.5 mL/min existe una disminución en los tiempos de retención sin que éste afecte a la identificación de cada uno de los picos de los compuestos presentes, el valor de la resolución cumple con lo establecido por FEUM.



### IX. Sugerencia

El análisis isométrico de flujo no representó una buena separación, por lo cual se propone el siguiente gradiente de flujo en función de los resultados obtenidos.

#### Condiciones de análisis

Fase móvil MeOH/ H<sub>2</sub>O (62:38)

Corridas de 20 min

$\lambda$  254 nm

Vol. de inyección 5  $\mu$ L

Temperatura de la columna: Ambiente

#### Gradiente propuesto

<i>t</i> (min)	<i>Vel. F.</i> (mL/min)	% <i>H2O</i>	% <i>MeOH</i>
0,0	0,6	38	62
5.8	0.6	38	62
6.0	1.0	38	62
7.0	1.4	38	62
7.3	1.7	38	62

Con la finalidad de que el pico de butilparabeno eluya más rápido y el tiempo de análisis sea más corto sin afectar la eficiencia de la separación.



## X. Referencias Bibliográficas

1. Lought, W (1995). HPLC. Fundamental Principles and practice. London, Blackie academic & Professional.
2. S.S.A. (2004). Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 8ª ed. Vol. I
3. Waters (2003). Seminario de Actualización en HPLC. Q. Ramiro Martínez Cortes.
4. Abott, D (1963). Chromatography. New York, Reinhold Publishing Corporation.
5. IMSS. Norma de métodos generales de análisis. Cromatografía de líquidos.
6. Beckman. Manual de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Latinoamericana.
7. Runser Dennis (1981). Maintaining and troubleshooting HPLC Systems. New York, John Wiley & Sons.
8. Snyder, L. R., Kirkland (1979). Introduction to modern liquid chromatography. 2ª New York, John Wiley and Sons.
9. Cazes, J. (2005). Encyclopedia of chromatography. 2ª ed. Taylor & Francis. Vol. I y II.
10. García de Marina, A, Del Castillo, B (1988). Cromatografía Líquida de Alta Resolución., México, D. F., Limusa.
11. Canitec (1999). Curso básico de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución HPLC.
12. Meyer, V. (1988). Practical High Performance Liquid Chromatography. New York, John Wiley & Sons.
13. Catalogo 2002. Macherey-Nagel. Chromatography. Vol. 2
14. Canitec. Curso desarrollo de métodos para cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Q.F.B. Manzano Hernández Raúl.
15. Catalogo 05/06. Phenomenex...breaking with tradition. Chromatography Columns and Supplies.
16. Agilent Technologies (2004) Seminario
17. Handbook of Pharmaceutical Excipients. London, Published by The Pharmaceutical Society of Great Britain. Tomo I y II.
18. Borch, T. and R. Gerlach (2004). "Use of Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography-diode Array Detection for Complete Separation of 2,4,6-trinitrotoluene Metabolites and EPA Method 8330 Explosives: Influence of Temperature and an ion-pair Reagent," J. Chromatography A.
19. Brown P, DeAntonois K. (1997). Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry Frank Settle, Editor: "High Performance Liquid Chromatography", Prentice Hall.



20. Skoog (1998). Principles of Instrumental Analysis, 5a ed. Saunders College Publishing
21. LC-GC Magazine. Advanstar Communications. (Disponible en: <http://www.chromatographyonline.com>. Consultado el día 4 de noviembre de 2006 a las 7:00 p.m.)
22. Dable, B., Marquardt J. Booksh S (2005). Rapid multivariate curve resolution applied to near real-time process monitoring with HPLC/Raman data. Journal of Chromatography A. Volume 1123, Issue 2.
23. Zhang, Q. L. (2005). High-performance liquid chromatographic assay of parabens in wash-off cosmetic products and foods using chemiluminescence detection. Analytica Chimica ACTA 537 (1-2): 31-39
24. A general treatment of chromatography including an overview of plate and rate theory.(Disponible en: <http://ull.chemistry.uakron.edu/analytical/Chromatography>. Consultado el día 11 de noviembre de 2006 a las 5:30 p.m.)
25. Tutorials on molecular spectroscopy and chromatography.(Disponible en: <http://www.shu.ac.uk/schools/sci/chem/tutorials>. Consultado el día 11 de noviembre de 2006 a las 6:45 p.m.)
26. Haky, J. E. Resolution in HPLC:Selectivity, Efficiency and Capacity. Encyclopedia of Chromatography.
27. Martín-Villacorta J., Méndez R.; N Montes.; García-Glez J. C. (2005). Effect of Temperature and Mobile Phase Composition on Reversed Phase HPLC Separation. Encyclopedic of Chromatography.
28. Braithwaite A, Smith F. J. (1996). Chromatographic Methods, 5a ed. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
29. Sadek, P (2004). Illustrated Pocket Dictionary of Chromatography. U.S.A., Wiley-Interscience.
30. Quattrocchi, O. (1992). Introducción a la HPLC. Buenos Aires, Artes Gráficas Farro.
31. Harvey D. (2000). Modern Analytical Chemistry. U. S. A., Mc Graw-Hill Higher Education.
32. Scott, R. P. (1991). Liquid Chromatography Column Theory. U.S.A., John Wiley & Sons,