



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

Propuesta de un método analítico por CLAR para  
la separación de acetaminofeno, naproxeno,  
ketoprofeno e ibuprofeno empleando fase reversa  
C<sub>18</sub> y detección a 220 nm

T E S I N A  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
P R E S E N T A  
ISRAEL HERNÁNDEZ RUZ

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE DE 2008

Asesor de Tesina  
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.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación Farmacéutica (LIF) de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza como parte de las actividades del diplomado en cromatografía de líquidos de alta resolución.

*Las Flores nacen, después se marchitan.*

*Las estrellas brillan y algún día se extinguirán.*

*Esta tierra, el sol, las galaxias y hasta el mismo gran  
universo algún día también se destruirán;*

*Comparado con eso la vida del hombre no es más que un  
parpadeo... Un escaso momento;*

*En ese escaso momento, las personas nacen, ríen, lloran,  
luchan, son heridas, sienten alegría, tristeza, odian a alguien,  
aman a alguien...*

*Todo en un solo momento;  
y después son abrazadas por ese sueño eterno llamado  
muerte....*

*Y sin embargo....*

*Vale la pena vivirla.*

*Siddhartha Jotama*

Dedico ese trabajo a mis padres José Luis Hernández Olguín y Josefina Ruz Cruz por el apoyo que me dieron para llegar hasta donde me encuentro.

A Ana Anaya Tapia por todo su amor, comprensión, complicidad, compañía, y apoyo que me ha dado.

Gracias aa

Y agradezco ante todo a Dios por la fuerza y entendimiento que me brinda ante cualquier obstáculo en el camino.

# ÍNDICE

## TABLA DE ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN.....	01
I. ANTECEDENTES TEÓRICOS.....	02
A. Antecedentes de la cromatografía.....	02
1. Separaciones cromatográficas.....	04
2. Clasificación de los métodos cromatográficos.....	04
3. Mecanismos de la separación.....	05
a. Cromatografía liquido-sólido o de adsorción.....	06
b. Cromatografía liquido-liquido o de reparto.....	07
1) Cromatografía de fase normal.....	08
2) Cromatografía de fase reversa.....	09
3) Cromatografía de pares iónicos.....	10
c) Cromatografía quiral.....	10
d) Cromatografía de formación micelar.....	11
e) Cromatografía de afinidad.....	11
f) Cromatografía de intercambio iónico.....	12
g) Cromatografía de exclusión molecular.....	13
4. Cromatografía de líquidos de alta resolución.....	14
5. Parámetros básicos de la CLAR.....	14
a. Factor de capacidad.....	15
b. Número de platos teóricos.....	16
c. Factor de selectividad.....	18
d. Resolución.....	19
6. Componentes de un sistema CLAR.....	20
a. Sistema de bombeo.....	20
b. Sistema de inyección.....	22
c. Columna.....	22
d. Detector.....	24
1) Detector ultravioleta.....	24
2) Detector de índice de refracción.....	25
3) Detector de conductividad.....	27

4) Detector de fluorescencia.....	28
5) Espectrómetro de masas.....	29
6) Detector de dispersión láser.....	30
e. Registrador de señales.....	31
f. Cromatograma.....	32
B. Propiedades de los analitos.....	33
1. Acetaminofeno.....	33
a. Nombres.....	33
1) Comercial.....	33
2) Químico.....	33
b. Apariencia.....	33
c. Solubilidad.....	34
2. Ketoprofeno.....	34
a. Nombres.....	34
1) Comercial.....	34
2) Químico.....	34
b. Apariencia.....	35
c. Solubilidad.....	35
3. Ibuprofeno.....	35
a. Nombres.....	35
1) Comercial.....	35
2) Químico.....	36
b. Apariencia.....	36
c. Solubilidad.....	36
4. Naproxeno.....	36
a. Nombres.....	37
1) Comercial.....	37
2) Químico.....	37
b. Apariencia.....	37
c. Solubilidad.....	37
II. OBJETIVOS.....	38
III. HIPÓTESIS.....	39
IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	40

A. Sustancias.....	40
B. Equipo.....	40
C. Método.....	41
V. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	42
VI. CONCLUSIÓN.....	54
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	56

## Tabla de abreviaturas

---

CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
FM	Fase móvil
FE	Fase estacionaria
ODS	Octadecil-silano
CCF	Cromatografía en capa fina
CG	Cromatografía de gases
CLS	Cromatografía líquido-sólido
Da	Daltons
CLL	Cromatografía líquido- líquido
CLFN	Cromatografía líquida de fase normal
CLFR	Cromatografía líquida de fase reversa
CLPI	Cromatografía líquida de pares iónicos
CLQ	Cromatografía líquida de quiralidad
CLFM	Cromatografía líquida de formación micelar
CLA	Cromatografía líquida de afinidad
CLII	Cromatografía líquida de intercambio iónico
CLEM	Cromatografía líquida de exclusión molecular
$k'$	Factor de capacidad
$t_r$	Tiempo de retención
$t_0$	Tiempo muerto
N	Número de platos teóricos
H	Altura equivalente del plato teórico
$w_h$	Ancho máximo de pico a la mitad de la altura
$w_b$	Ancho de pico en la base
$\alpha$	Selectividad
R	Resolución
As. USP	Factor de asimetría
MeOH	Metanol
ACN	Acetonitrilo
THF	Tetrahidrofurano

---

## INTRODUCCIÓN

Este proyecto tiene como objetivo desarrollar un método para la separación de los cuatro analgésicos (acetaminofeno, ibuprofeno, ketoprofeno y naproxeno) contenidos en una mezcla empleando una técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) de fase reversa C<sub>18</sub> acoplado a un detector ultravioleta, aprovechando la característica de estos compuestos para ionizarse o no ionizarse permanecer moleculares utilizando cromatografía de formación de pares iónicos; una de las finalidades que se tuvo fue la de conocer su comportamiento en distintos pHs manteniendo constantes la longitud de onda a 220 nm, velocidad de flujo de 1 mL/min, 10 µL de volumen de inyección de blanco así como de mezcla de los analitos y la inyección de cada uno por separado, observándose la separación y las características de los analitos. El experimento consistió en varias partes en las que se utilizó una fase móvil de MeOH: amortiguador de fosfatos 70:30 pH= 4 con una proporción, el segundo de fase móvil de MeOH: amortiguador de fosfatos 70:30 pH= 5 y el tercero de fase móvil de MeOH: amortiguador de fosfatos 70:30 pH= 6, dentro de este se realizó un experimento alterno con las mismas condiciones y con proporción de fase móvil 50:50; los analitos se inyectaron por separado con las mismas condiciones de los experimentos. La información obtenida de este experimento fue analizada, llegándose a proponer un método para optimizar su separación.

## I. ANTECEDENTES TEÓRICOS

### A. Antecedentes de la cromatografía

La cromatografía proporciona una nueva visión que permite obtener información importante de la composición química del mundo que nos rodea; fue desarrollada en el siglo veinte y llegó como una nueva y efectiva herramienta para la búsqueda científica, operación de procesos químicos en la industria y para el control de la salud humana.

A principios de 1900 el botánico ruso Mikhail Semenovich Tswett descubrió la cromatografía como un nuevo fenómeno y una nueva técnica para la investigación de mezclas complejas<sup>1</sup>. Estos experimentos consistieron en hacer pasar soluciones de pigmentos vegetales a través de tubos de vidrio rellenos de yeso pulverizado. Encontró que algunos de los pigmentos podían ser separados entre sí, de hecho, éstos aparecían como bandas coloreadas en los tubos. Debido a la aparición de estas bandas coloreadas llamó a esta separación "método cromatográfico" derivado del griego que significa escritura en color<sup>2</sup>; por esto es conocido como el padre de la cromatografía. En su trabajo publicado describió la separación de pigmentos de plantas por cromatografía líquida de columna; la técnica fue descrita y demostrada tan bien que fue usada sin cambios alrededor de cuarenta años<sup>3</sup> "ningún otro descubrimiento ha ejercido una gran influencia y ha ampliado el campo de la investigación de la química orgánica como el análisis cromatográfico de adsorción de Tswett. La búsqueda en el campo de las vitaminas, hormonas, carotenoides y otros numerosos componentes naturales nunca hubieran progresado sin este nuevo método, el cual también desglosó una enorme variedad de compuestos relacionados estrechamente en la naturaleza"<sup>1a</sup>.

En el período entre 1906 y 1952 fueron algunos de los descubrimientos de importancia. Por ejemplo, se desarrolló la técnica de cromatografía plana en la cual se usaba papel como soporte plano, pero cuando la capa delgada de gel de

silica fue introducida como una alternativa a finales de 1950 el campo de la cromatografía en capa fina (CCF) nació y llegó a ser tan popular que en gran parte reemplazó a la vieja técnica.

El desarrollo de las columnas cromatográficas se aceleró alrededor de los años cuarenta. Martin y Synge ganaron el premio Nobel por su escrito en el cual introducen la cromatografía líquido-líquido (o partición) y la teoría que lo acompañó se llegó a conocer como el plato teórico. El plato teórico fue nuevamente explorado por Craig quien publicó un artículo titulado "Cromatografía de partición y distribución a contracorriente" en 1950, su aparato de distribución a contracorriente ganó mucha popularidad, pero también fue reemplazada por la cromatografía de líquidos por tener mayores aplicaciones.

En 1955 Glueckauf publicó un artículo titulado "El Plato Concepto en Separación por Columna". Así como una de las publicaciones que tuvo un papel con gran impacto fue de Zuiderwer y Klinkenberg; quienes describieron el proceso cromatográfico en términos de cinética y examinaron el fenómeno de difusión y la transferencia de masa.

La nueva técnica, la cromatografía de gases (CG), se creó y se convirtió en una técnica simple y rápida capaz de producir separaciones de materiales volátiles que eran imposibles por destilación surgiendo nuevas teorías las cuales llevadas a la práctica maduraron rápidamente a la cromatografía de gases y por supuesto se intentó la aplicación de las técnicas exitosas de la cromatografía de gases a la vieja técnica de cromatografía de líquidos. Algunos de los créditos por la transferencia de tecnología pertenecen a Giddings quien en 1963, publicó un artículo titulado "Cromatografía de Líquidos con Condiciones Operacionales Análogas de Cromatografía de Gases". Esto tuvo una revolución en cromatografía de líquidos que brindó un nivel de eficiencia similar a lo conseguido en cromatografía de gases<sup>1</sup>.

## **1. Separaciones cromatográficas**

La cromatografía es un método muy utilizado y que permite la separación, identificación cualitativa y determinación cuantitativa de los componentes químicos en mezclas complejas. El término cromatografía se ha aplicado a varios sistemas y técnicas; sin embargo, todos estos métodos tienen en común el uso de una fase estacionaria y una fase móvil; en donde los componentes de una mezcla son transportados a través de la fase estacionaria por el flujo de una fase móvil, y las separaciones se basan en las diferencias de velocidad de migración entre los distintos componentes de la mezcla<sup>4</sup>.

## **2. Clasificación de los métodos cromatográficos**

Los métodos cromatográficos son de dos tipos. En la cromatografía en columna la fase estacionaria está contenida en un tubo estrecho y se fuerza el paso de la fase móvil a través de la fase estacionaria, ya sea a presión o por gravedad. En la cromatografía plana la fase estacionaria está sostenida sobre una placa plana o en los poros de un papel, la fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria por capilaridad o por efecto de la gravedad.

Los métodos cromatográficos se dividen en tres categorías, según la naturaleza de la fase móvil: líquido, gas y fluido supercrítico<sup>4</sup> (tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación de los métodos cromatográficos en columna

Clasificación	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
<b>General</b>			
Cromatografía de gases (CG)	Gas-líquido (GLC)	Líquido adsorbido o unido a una superficie sólida	Reparto entre gas y líquido
	Gas-sólido	Sólido	Adsorción
Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC)	(fase móvil: fluido supercrítico)	Especie orgánica unida a una superficie sólida	Reparto entre fluido supercrítico y superficie unida
Cromatografía líquida (CL)	Líquido-líquido o de reparto	Líquido adsorbido o unido a una superficie sólida	Reparto entre líquidos inmiscibles
	Líquido-sólido o de adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio iónico	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un sólido polímero	Reparto/tamizado
	Afinidad	Líquido con grupo específico unido a una superficie sólida	Reparto entre líquido superficial y líquido móvil
	Quiral		

### 3. Mecanismos de la separación

Los mecanismos o procesos de separación por los cuales funciona dan lugar a diferentes métodos de cromatografía de líquidos, estos comprenden la cromatografía de reparto o de líquido-líquido; cromatografía de adsorción o de líquido-sólido, cromatografía de intercambio iónico; cromatografía de exclusión molecular; cromatografía de afinidad y cromatografía quiral<sup>4</sup>.

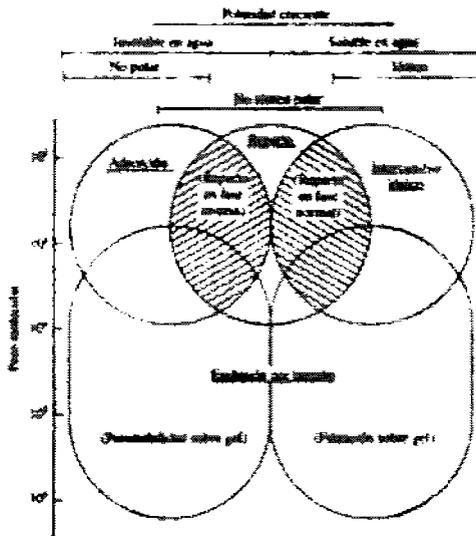


Figura 1. Elección del tipo de cromatografía.

### a) Cromatografía líquido-sólido o de adsorción

En esencia la técnica de cromatográfica original fue la cromatografía adsorción, esta es frecuentemente referida como cromatografía líquido-sólido (CLS). Los adsorbentes (fases estacionarias) usadas son la sílice, alúmina y carbón siendo más usadas las dos primeras<sup>5</sup> aunque más comúnmente la sílice por su mayor capacidad de muestra y su mayor variedad de formas útiles; con dicho empaquetamiento, el analito compite con la fase o fases móviles por los sitios sobre la superficie del sólido polar finamente dividido y la retención se debe a las fuerzas de adsorción<sup>4</sup>.

Las fases móviles son menos polares que las fases estacionarias y usualmente consisten de un sistema binario de disolventes pero la combinación ternaria y cuaternaria de disolventes pueden ser empleadas. La cromatografía líquido-sólido o de adsorción incluye partículas de gran área superficial donde las moléculas son atraídas, y por tanto son retenidas<sup>5, 6</sup>. En la actualidad la CLAR de

líquido-sólido se usa para separaciones de compuestos orgánicos relativamente no polares ni hidrosolubles cuya masa molecular es menor de unos 5000 Da.

Una ventaja especial de la cromatografía de adsorción que no comparten otros métodos, es su capacidad de resolución de mezclas de isómeros como las formas meta y para de derivados del benceno<sup>4</sup>.

### b) Cromatografía líquido-líquido o de reparto (partición)

El tipo de cromatografía más utilizado de CLAR es la cromatografía de reparto, la cromatografía líquido-líquido o de reparto (CLL) y de líquido-fase estacionaria enlazada. La diferencia entre estas dos radica en la forma de mantener la fase estacionaria sobre las partículas de soporte del empaquetamiento. En la cromatografía líquido-líquido, el líquido se mantiene por adsorción física, mientras que en la fase enlazada se une químicamente.

En sus inicios, la cromatografía de reparto solo era del tipo líquido-líquido, empleaba un sistema de disolventes de dos fases orgánica-acuosa inmiscibles entre sí en la cual las moléculas de la muestra se distribuyen entre ambas fases y un soporte de sílica y este un tipo de cromatografía que se empleaba para separar aminoácidos o para ciertas aplicaciones especiales<sup>5, 6</sup>. Ahora predomina la de fase enlazada dada su mayor estabilidad, y los empaquetamientos de fase enlazada se preparan por reacción de un órgano clorosilano con los grupos -OH formados en la superficie de partículas de sílice por hidrófisis en ácido clorhídrico diluido caliente. El producto es un organosiloxano<sup>4</sup>.

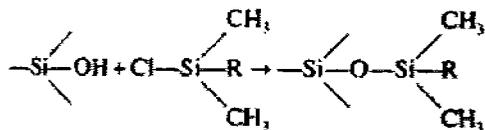


Figura 2. Formación de un organosiloxano

Donde R es frecuentemente un grupo octadecilo de cadena recta. Otros grupos funcionales orgánicos que se han enlazado en superficies de sílice son las aminas alifáticas, éteres y nitrilos, así como hidrocarburos aromáticos. Así pues están disponibles muchas polaridades distintas para la fase estacionaria enlazada.

Es posible distinguir dos tipos de cromatografía de reparto, según la polaridad relativa de la fase móvil (FM) y de la fase estacionaria (FE). Los primeros trabajos de cromatografía líquida se basaron en fases estacionarias muy polares con un disolvente relativamente no polar, como fase móvil. Por razones históricas, este tipo de cromatografía se llama ahora cromatografía de fase normal. En la cromatografía de fase normal, la fase sólida es más polar que la fase móvil; el componente menos polar eluye primero; al aumentar la polaridad de la fase móvil disminuye el tiempo de elución. Contrariamente en la cromatografía de fase reversa ocurre primero la elución del componente más polar y al incrementar la polaridad de la fase móvil aumenta el tiempo de elución<sup>4</sup>.

### 1) Cromatografía de fase normal (CLFN)

Las fases estacionarias en cromatografía de fase normal son generalmente polímeros inorgánicos que tienen un mayor número de poros de tamaño molecular (desde algunos nm a pm) de manera que sus áreas superficiales son grandes. Los dos materiales más comunes son el óxido de aluminio hidratado (sílice o sílica gel) o polímeros de óxido de aluminio hidratado (alúmina). Cuando los ligandos resultantes entre estos soportes y los componentes de la muestra son fuertes, el soporte se dice que es activo. Su actividad depende de la densidad de los grupos hidroxilo en la superficie así como de su forma química, si es que se encuentran protonados o desprotonados. Se esperaría que los enlaces Si-O se hidrolizaran en medio básico. Ya que la sílica se disuelve con lentitud en las fases móviles de pH alto. Pero en general, a cualquier pH conviene hacer más lenta la disolución de la columna analítica colocando una precolumna; su empaque se sacrifica; sus productos disueltos ayudan a preservar el empaque de la columna analítica.

En la cromatografía de fase normal el solvente polar es el factor primario que determina los volúmenes de elución, los solutos se mueven más rápidamente y eluyen con solventes más polares, la explicación es simple; los solventes más polares compiten mejor por los solutos que los solventes menos polares<sup>7</sup>.

## 2) Cromatografía de fase reversa (CLFR)

En la cromatografía de fase reversa es lo contrario; es decir, involucra una fase estacionaria la cual es menos polar que la fase móvil. Dos tipos de fases estacionarias usadas que son comunes contienen grupos no polares ligados sobre sílice los usados más a menudo son los grupos orgánicos  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{C}_8\text{H}_{17}$  y  $-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$  de estos los de cadena de 18 átomos de carbonos (grupo octadecil) son los más comunes. Las abreviaciones ODS y C18 son usadas para este tipo de fase estacionaria. Los grupos orgánicos ligados tienen un efecto similar al que se produciría por una capa sumamente delgada de disolvente orgánico en la superficie de las partículas de sílica. De este modo, los solutos se reparten entre el recubrimiento superficial y la fase móvil a semejanza con una extracción líquido-líquido. Además, a medida que la cadena de carbonos es más larga, estas capas se vuelven más orgánicas; como resultado, las cadenas más prolongadas interaccionan con más fuerza con los solutos que se disuelven preferencialmente en una fase orgánica.

El segundo tipo de fases estacionaria que se emplea en cromatografía de fase reversa está compuesta de perlas de polímeros orgánicos. Un polímero característico es una resina de poliestireno y divinilbenceno. El divinilbenceno forma enlaces cruzados entre las cadenas de polímero de poliestireno. Estos enlaces provocan una rigidez física en el polímero (la mayor densidad de enlaces cruzados se asocia con un material más rígido). La rigidez es necesaria para resistir la deformación a altas presiones.<sup>7</sup>

### 3) Cromatografía de pares iónicos (CLPI)

Este es un caso especial de la cromatografía líquido-líquido que es aplicable para solutos ionizables consistiendo de un catión  $C^+$  y un anión  $A^-$  que son individualmente solubles en agua, pero para el cual el par iónico  $C^+A^-$  es soluble en solvente no acuoso.<sup>8</sup> Es un subconjunto de la cromatografía en fase reversa en que se separan especies fácilmente ionizables en columnas de fase reversa. En esta variante, una sal orgánica que contiene un contra-ión orgánico, como el ión de amonio cuaternario o alquilo sulfonato, se adiciona a la fase móvil como un reactivo de emparejamiento iónico; se han propuesto dos mecanismos de separación. En el primer caso, el contra ión forma un par iónico sin carga con un ión de soluto de carga opuesta en la fase móvil, este par iónico se reparte en la fase estacionaria no polar, con la que se obtiene diferencias en las retenciones de solutos que se basan en la afinidad del par iónico por las dos fases; alternativamente, la fase estacionaria, normalmente neutra, retiene con fuerza el contra-ión que imparte una carga a esta fase. La separación de los iones de solutos orgánicos de carga opuesta ocurre después por formación de complejos de pares iónicos reversibles, de modo que los solutos retenidos con mayor fuerza forman los complejos más fuertes con la fase estacionaria. Mediante esta variante de cromatografía de reparto pueden lograrse algunas separaciones únicas de compuestos iónicos y no iónicos en una misma muestra.<sup>4</sup>

#### c) Cromatografía quiral (CLQ)

En este tipo de cromatografía se encuentra un gran número de materiales de fases estacionarias quirales disponibles para la resolución de mezclas de enantiómeros<sup>9</sup> en una columna cuya fase estacionaria es quiral, un compuesto con centro de asimetría y en el que dos enantiómeros R y S están presentes dará lugar a dos picos cuyas áreas serán proporcionales a la abundancia de cada una de las dos formas. La pureza óptica representa el exceso enantiomérico, éste se calcula a partir de la relación siguiente:

$$P.O = \left| \frac{A_R - A_S}{A_R + A_S} \right| \times 100$$

Donde AR y AS designan las áreas de los picos enantioméricos en los cromatogramas<sup>10</sup>.

#### **d) Cromatografía de formación micelar (CLFM)**

La cromatografía de formación de micelas es comúnmente usada para la separación de solutos no iónicos y los surfactantes están ligeramente arriba de la concentración micelar crítica, algunos de los surfactantes usados en la cromatografía micelar son el ión hexadeciltrimetilamonio, dodecilsulfato, la fase móvil puede o no contener modificadores y la temperatura tiene un efecto en la transferencia de masas entre las micelas y la fase estacionaria, esta puede ser usada para mejorar la eficiencia de la separación. La cromatografía micelar debe ser llevada a cabo alrededor de los 40 °C, con elevadas temperaturas los efectos de la velocidad de flujo y la concentración del surfactante pueden afectar la eficiencia de la separación. Para evitar esto y optimizar la eficiencia, la velocidad de flujo debe disminuirse al punto que se mantenga un tiempo de elución razonable. La mayor diferencia entre la cromatografía micelar y la de fase reversa es la selectividad en la separación ya que, la concentración micelar estaría en aumento, la retención del soluto disminuiría con las interacciones de las micelas con la fase móvil<sup>11</sup>.

#### **e) Cromatografía de afinidad (CLA)**

La cromatografía de afinidad consiste en enlazar de manera covalente un reactivo, llamado ligando de afinidad, a un soporte sólido. Entre los ligandos de afinidad usuales se encuentran anticuerpos, inhibidores enzimáticos u otras moléculas que se enlazan de manera reversible y selectiva a las moléculas del analito en la muestra. Cuando ésta pasa por la columna, se retienen solo las

moléculas que se enlazan de manera selectiva con el ligando de afinidad. Las moléculas no enlazadas pasan por la columna arrastradas por la fase móvil. Después de retirar las moléculas no deseadas, es posible la elución de los analitos retenidos, al cambiar las condiciones de la fase móvil.

La fase estacionaria de la cromatografía de afinidad es un sólido, como la agarosa, o un lecho de vidrio poroso, en el cual se inmoviliza el ligando de afinidad. La fase móvil de la cromatografía por afinidad tiene dos funciones distintas; en primer término, debe favorecer el enlace fuerte de las moléculas del analito con el ligando y en segundo lugar, una vez retiradas las especies no deseadas, la fase móvil debe debilitar o eliminar la interacción analito ligando, de modo que sea posible la elución del analito. Es frecuente que se usen cambios de pH o fuerza iónica para modificar las condiciones de elución en las dos etapas del proceso.

La cromatografía de afinidad tiene la ventaja principal de su extraordinaria especificidad. Su uso principal es el aislamiento rápido de biomoléculas en trabajos preparativos<sup>4</sup>.

#### **f) Cromatografía de intercambio iónico (CLII)**

La cromatografía de intercambio iónico está basada en la afinidad de iones en solución y los iones con carga opuesta en la fase estacionaria.

El material de empaque de la columna de intercambio iónico consiste en una fase sólida porosa, usualmente una resina en la cual los grupos iónicos como lo es el grupo sulfonato junto con iones de carga opuesta; propician que las moléculas de una muestra sean retenidas en la columna por el intercambio iónico, la fase móvil por lo general es un amortiguador que contiene iones opuestos a los que se encuentran en la fase estacionaria y que además tienen la misma carga que el o los analitos pero cuando el equilibrio de las cargas se alcanza se forman

pares iónicos; se da una competencia entre el soluto y las cargas del amortiguador por el sitio iónico dándose la separación.

La cromatografía de intercambio iónico se utiliza mayormente en la química inorgánica para la separación de iones metálicos así como en sistemas biológicos para separar iones solubles en agua como proteínas, nucleótidos y aminoácidos<sup>12</sup>.

### **g) Cromatografía de exclusión molecular (CLEM)**

La cromatografía de exclusión o permeación en gel es usada para separar componentes como lo son polímeros o proteínas con pesos moleculares mayores a los 1000 Da; es un método que discrimina de acuerdo al tamaño de las moléculas del analito<sup>13</sup>. Las partículas de la fase estacionaria tienen una red de poros uniformes en los cuales algunas partículas de solutos pueden ser retenidas. Las moléculas que son más grandes que el tamaño de poro son excluidas y no retenidas; mientras tanto, las moléculas que son más pequeñas que el poro son retenidas dentro. El tiempo de residencia dentro del poro depende del tamaño del soluto; de la forma que encajen las moléculas dentro del poro; las más pequeñas serán las más retenidas porque la retención esta basada enteramente en impedimentos físicos, sin interacción química; la fase móvil no juega un papel crítico en la separación.

Los geles orgánicos y las partículas con base de sílica son usados en las fases estacionarias para cromatografías de exclusión molecular. Los geles que se usan más a menudo se encuentran hechos de polímeros entrecruzados de estireno polivinilbenceno o poliacrilamidas. El grado de entrecruzamiento es definido como el tamaño de poro, las partículas de sílica tienen tamaños de poro en el intervalo de 40 a 2500 Å, una gran variedad en cuanto a intervalos de tamaño de poro por cada tipo de fase estacionaria para lograr la separación de diferentes pesos moleculares. Una recta de calibración es incluida con cada

columna y define el intervalo de peso molecular de cómo es usada cada columna<sup>14</sup>.

#### **4. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)**

Con el objeto de aumentar la eficiencia en las separaciones, el tamaño de las partículas de fase fija se fue disminuyendo hasta el tamaño de las micras, lo cual generó la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que fluya la fase móvil.

De esta manera, nació la técnica de cromatografía líquida de alta resolución, que requiere de instrumental especial que permita trabajar con las altas presiones requeridas; la cromatografía líquida de alta resolución es el tipo de cromatografía de elución más versátil y ampliamente utilizado, tiene aplicaciones en la bioquímica, ciencias ambientales, ciencias de la alimentación, medicina forense, química farmacéutica y toxicología. Es empleada para separar y determinar especies en diversos materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos.

En la cromatografía líquida, la fase móvil es un disolvente líquido que contiene la muestra como mezcla de solutos. Los tipos de cromatografía líquida de alta resolución suelen clasificarse según el mecanismo de separación o el tipo de fase estacionaria<sup>4</sup>.

#### **5. Parámetros básicos de la CLAR**

Dos de las preguntas básicas en la cromatografía de líquidos de alta resolución son:

1. ¿Cómo los componentes en particular pueden ser separados?
2. ¿Porqué los compuestos fueron separados por la cromatografía de líquidos utilizado?

La respuesta puede ser obtenida en los cromatogramas obtenidos por la separación de compuestos bien conocidos y la separación puede ser fácilmente entendida de acuerdo a principios comunes de física y química<sup>15</sup>.

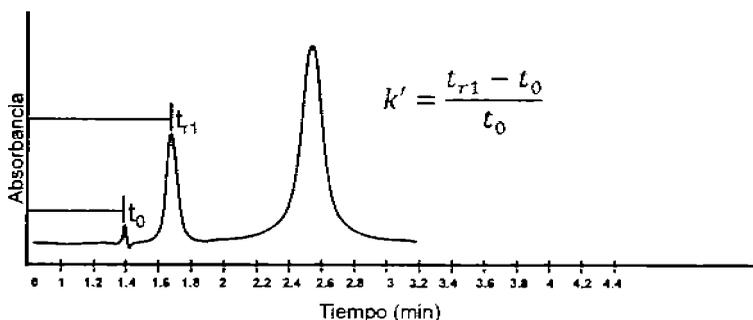
La CLAR se describe en cuatro parámetros básicos: eficiencia, factor de capacidad, factor de selectividad y resolución. La capacidad y la selectividad de la columna son variables que están relacionadas estrechamente con el proceso de manufactura de la columna, la eficiencia y la resolución pueden ser controladas.

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

El factor de capacidad muestra la medida tomada del cromatograma para cuantificar los resultados. Para una separación efectiva en cromatografía de líquidos, la columna debe tener la capacidad de retener la muestra y la habilidad para separar componentes de la muestra eficientemente. El factor de capacidad de la columna es una medida directa de la intensidad de la interacción de la muestra con la fase estacionaria, es definido por la fórmula siguiente:

$$k' = \frac{t_{r1} - t_0}{t_0}$$

Donde  $t_{r1}$  es el tiempo que tarda un soluto específico para llegar al detector (tiempo de retención) y  $t_0$  es el tiempo que tardan las especies no retenidas para llegar al detector. Algunos valores de  $k'$  son obtenidos si se usa el volumen en lugar del tiempo,  $v_{r1}$  que es el volumen de solución que pasa al detector, antes de que se observe un pico específico de elución y  $v_0$  es el volumen del solvente bombeado al detector entre el tiempo de inyección y el de aparición de especies no retenidas (volumen muerto). El volumen muerto es igual al volumen de la columna no ocupado por el material de empaque más el volumen de tubería que llega al detector<sup>16</sup>.



**Figura 3.** Interpretación del factor de capacidad en el cromatograma

El factor de capacidad de una columna en su mayor parte está en función del material de empaque pero puede ser manipulado para disminuirse por una variación en la fuerza de la fase móvil. Usar una columna con un elevado factor de capacidad puede resultar en tiempos de análisis largos, comprometiendo la relación entre resolución y tiempo de análisis que debe ser alcanzado. Típicamente un valor de  $k'$  entre 2 y 5 representa un buen balance entre el tiempo de análisis y resolución.

### **b) Número de platos teóricos (N)**

Un plato teórico, es un corte imaginario dentro de la columna, mismo donde se alcanza un equilibrio temporal de distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria. La separación ocurre a lo largo de la columna y explica el comportamiento del proceso de separación en la columna; es una expresión que es generalmente aplicable para todos los tipos de columnas cromatográficas, en la que se describe al número de platos teóricos, primero como una medida de resolución y eficiencia de la columna, expresada en término de número de platos teóricos (N) y la altura equivalente del plato teórico denotado por H, y secundariamente para medir la resolución alcanzada en un cromatograma.

Un estimado del número de platos teóricos requerido para una separación puede ser calculada con las siguientes ecuaciones que definen al número de

platos teóricos en términos de tiempo de retención y el ancho de la base del pico<sup>17</sup>.

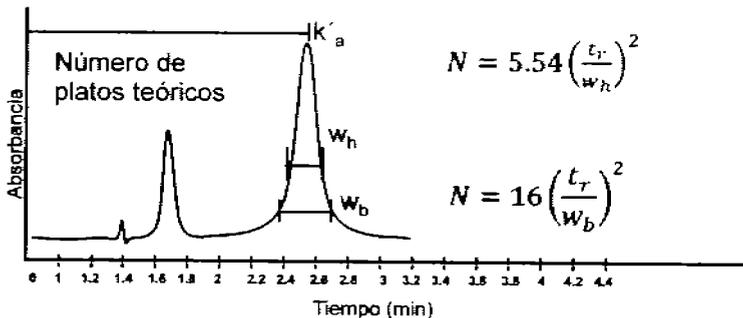
$$N = 5.54 \left( \frac{t_r}{w_h} \right)^2 \qquad N = 16 \left( \frac{t_r}{w_b} \right)^2$$

N = Número de platos teóricos

$t_r$  = Tiempo de retención de la primera sustancia (primer pico)

$w_h$  = Ancho máximo de pico a la mitad de la altura

$w_b$  = Ancho de pico en la base



**Figura 4.** Parámetros utilizados del cromatograma para el cálculo de los platos teóricos

La expresión anterior describe la eficiencia de la columna, es decir, la capacidad para proporcionar picos estrechos y bien separados. A mayor valor de N mayor será la eficiencia de la columna.

La eficiencia de la separación también se puede medir en términos de altura equivalente del plato teórico con la siguiente expresión:

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

Donde L es la longitud de la columna, H es la altura equivalente del plato teórico y N el número de platos teóricos o eficiencia de la columna. La eficiencia

se varía con cambios de la longitud de la columna o en la velocidad de flujo de la fase móvil.

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

La selectividad de un sistema cromatográfico es una medida de la diferencia de los tiempos de retención (o volúmenes) entre dos picos, lo que describe la efectividad con la que son separados dos compuestos en un sistema cromatográfico la selectividad ( $\alpha$ ) de la separación de dos solutos se encuentra definida como el cociente entre sus respectivos valores de factor de capacidad<sup>18</sup>

$$\alpha = \frac{k'_b}{k'_a}$$

Donde:

$k'_b$  = factor de capacidad del soluto más retenido

$k'_a$  = factor de capacidad del primer pico

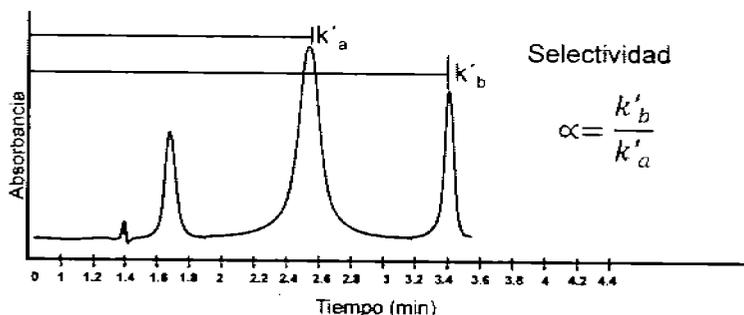


Figura 5. Efectividad de la separación de dos picos en una columna

La selectividad de una columna es función primaria del material de empaque, no obstante el cromatograma puede ser controlado con la fase móvil o con temperatura. Para manipular el valor de  $\alpha$  la opción es cambiar la composición de la fase móvil o cambiar el tipo de disolvente.

#### d) Resolución (R)

La resolución es un término usado para describir la disminución en la separación de bandas de picos de solutos vecinos. La resolución puede ser mejorada por el incremento del número de platos teóricos de la columna (N) y el factor de selectividad ( $\alpha$ ); separación dada en razón a la retención de los componentes. El número de platos teóricos es el parámetro físico y el factor de selectividad el parámetro químico para la separación<sup>15</sup>. En la siguiente ecuación de la resolución describe la relación entre los factores antes mencionados, dichos factores pueden ser manipulados para proporcionar una adecuada resolución entre los picos:

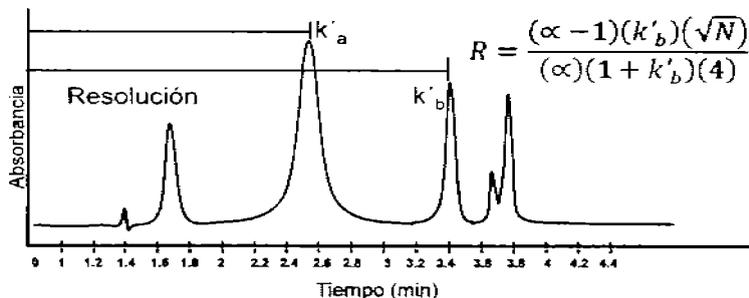
$$R = \frac{(\alpha - 1)(k'_b)(\sqrt{N})}{(\alpha)(1 + k'_b)(4)}$$

Donde:

$\alpha$  = Selectividad

$k'_b$  = Factor de capacidad del soluto más retenido

N = Número de platos teóricos (eficiencia)



**Figura 6.** La resolución de dos sustancias es la separación entre picos y anchos de banda.

Un valor de R de 1.2 unidades hasta 1.5, se requiere para la separación entre dos picos. El mejor camino para cambiar en valor de R es el cambio de selectividad o el factor de capacidad de la columna. El efecto en la disminución del

largo de la columna o el descenso de la velocidad de flujo es poco significativo, ya que la resolución incrementa proporcionalmente a la raíz cuadrada del número de platos teóricos, es entonces que a mayor resolución mejor será la separación lograda.

## 6. Componentes de un sistema CLAR

Las partes esenciales que conforman un equipo de CLAR son la bomba, el inyector, la columna, el detector y el registrador de señales.

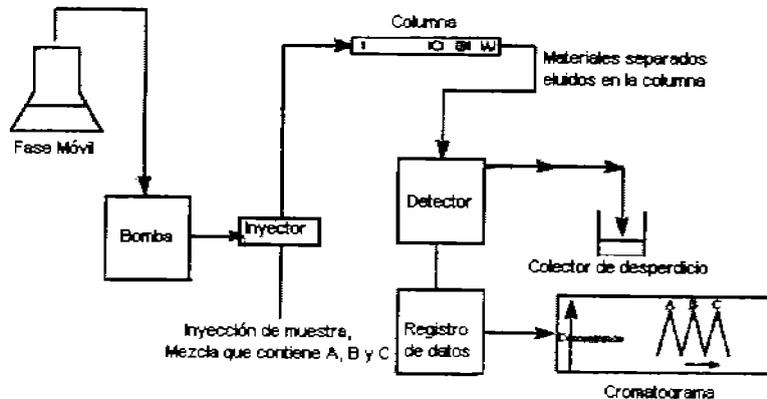


Figura 7. Representación de un equipo básico de CLAR

### a) Sistema de bombeo

El sistema tiene por objeto impulsar la fase móvil a través de la columna y debe cumplir ciertas especificaciones como lo son la reproducibilidad y precisión, manteniendo un flujo constante.

Las bombas empleadas en CLAR son de tres tipos:

I. Bombas recíprocas o de vaivén, son las más utilizadas, están formadas por una pequeña cámara cilíndrica que se llena y luego se vacía por oscilación de un pistón de zafiro. El bombeo produce un flujo pulsado que después debe amortiguarse. Sus principales ventajas son que se consiguen presiones elevadas y se suministra un caudal constante, pudiéndose adaptar a la técnica de elución con gradiente, debido a su pequeño volumen interno<sup>4</sup>.

II. Bombas de flujo constante que mantienen una velocidad de flujo a través de la fase móvil. Entre estas bombas recíprocas que funcionan a base de pistones que impulsan el disolvente que entra a cámaras con una capacidad de volumen pequeña. Otro tipo de bombas de flujo constante son las bombas de desplazamiento positivo que pueden tener dos formas: como jeringa o amplificador hidráulico. La primera es parecida a una jeringa consisten en una cámara equipada con un mecanismo de tornillo cuyo embolo actúa mediante un espiral que empuja el disolvente y la segunda amplifica la presión del disolvente mediante un sistema hidráulico; Suministran un flujo libre de pulsaciones pero con una capacidad limitada a unos 250 mL<sup>4,19</sup>.

III. Bombas neumáticas o de presión constante. La forma más sencilla de estas bombas hacen uso de la presión de un gas inerte para presurizar a la fase móvil el disolvente conteniendo en el recipiente o en lugar del gas puede usar un amplificador neumático que utiliza un pistón. Son sencillas, no provocan pulsaciones pero están limitadas a presiones relativamente bajas. Se debe mantener la viscosidad del disolvente así como la temperatura de la columna. emplea una presión de un gas<sup>4, 20</sup>.

Estas bombas son normalmente usadas para sistemas isocráticos, donde la proporción de la fase móvil se mantiene constante, cuando los solutos a separar poseen un valor muy variable de  $k'$  se debe utilizar un sistema de gradiente, en el que se varía la composición de la fase móvil a través del tiempo de elución; estos sistemas utilizan dos bombas que son programables para modificar lineal o

exponencialmente las proporciones iniciales del disolvente, mismos que se encuentran separados en su respectiva bomba. Los disolventes se mezclan en la proporción deseada en una cámara que se encuentra antes de la columna<sup>4,6</sup>.

### **b) Sistema de inyección**

Mediante este sistema se introducen las muestras al sistema cromatográfico, y se hace mediante varios mecanismos de inyección que se utilizan según sea el caso. El sistema de inyección de muestras más usado en la cromatografía de líquidos se basa en un bucle de muestras. Frecuentemente se encuentran disponibles bucles intercambiables de una amplia gama de tamaños que varían de 5 a 500  $\mu\text{L}$  y su reproducibilidad típica de las inyecciones con bucle de muestras es del orden de décimas de punto porcentual relativa. Muchos aparatos de CLAR incluyen un muestreador automatizado con la que se mantiene la reproducibilidad entre inyecciones y se disminuye el error debido a la medición del volumen a inyectar<sup>4,6</sup>.

### **c) Columna**

Este es el corazón del proceso cromatográfico donde se realiza la separación de las muestras; y el material de empaque utilizado estará en virtud de la separación que se desee hacer<sup>6</sup>.

Las dimensiones de la columna están en función del fin que se desee llegar en la separación; existen las columnas de grandes dimensiones para la cromatografía preparativa, y las de menor tamaño en cuanto a longitud y a diámetro utilizadas para fines analíticos.

Las más comunes son de acero inoxidable, aunque también las hay de polímero llamado PEEK, su longitud puede ir de 10 cm o menos hasta 30 cm.

Sobre la fase estacionaria de la columna es diverso<sup>6</sup>. Las más usadas con este propósito contienen sílice mezclada con otros compuestos y se encuentran en una gran variedad de tamaño de poro, tamaño de partícula y pueden ser modificadas para tener distintas selectividades<sup>21</sup>. A continuación se enumeran los usados en CLAR:

- I. Octadecil-silano (ODS) enlazado químicamente a sílica porosa o a micropartículas de cerámica de 3  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- II. ODS enlazado químicamente a gel de sílice con una superficie de porosidad controlada y que a su vez ha sido unida a un núcleo sólido esférico de 30  $\mu\text{m}$  a 50  $\mu\text{m}$ .
- III. Partículas de sílica porosa de 5  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- IV. Gel de sílice con una superficie de porosidad definida<sup>6</sup>.

La columna  $C_{18}$  es la más usada en fase reversa ya que separa casi todas las mezclas que pasan a través de ella, otro tipo de columna la  $C_8$  de sílice modificada es usada para la separación intermedia de compuestos no polares y la columna  $C_4$  es comúnmente usada para la separación de proteínas. La limitación de uso de este tipo de columnas se encuentra en la región de pH de trabajo en que se pueden usar este intervalo va desde un pH de 2 hasta un pH igual a 8 además presenta adsorción de especies básicas de forma irreversible como consecuencia de la unión de hidrógenos del soluto y la superficie de los grupos silanol, por ello se han modificado estas fases estacionarias con la finalidad de proteger al soluto de los grupos hidroxilo a través de un proceso llamado end capping.

Otro tipo de fases estacionarias se incluye a un grupo de óxidos mezclados recientemente estudiados en la cromatografía líquida, en estos se encuentran

incluidas las combinaciones alúmina-sílice, magnesia-sílice, zirconia-sílice y titania-sílice<sup>21</sup>. La alúmina es una alternativa de uso no tan frecuente en la cromatografía de líquidos de alta resolución ya que esta es inerte y el intervalo de pH en el que puede ser usado varía de 1 a 14. El zirconio es un óxido metálico; tiene las mismas propiedades físicas y mecánicas de la sílice y su estabilidad química es alta, pueden ser recubiertas con butadieno o reaccionar con silanos para producir fases ligadas alquílicas<sup>22</sup>.

#### **d) Detector**

Un buen detector para cromatografía de líquidos debe tener sensibilidad, estabilidad y un bajo volumen de pico, en el cromatograma debe mostrar una línea base estable desde una concentración máxima eluída en la columna cromatográfica hasta la más baja. La sensibilidad de detección debe ser de 10 µg/µL o mucho mejor para trabajos analíticos. Con el uso de un diámetro pequeño de columna como en el caso de la CLAR el detector debe ser capaz de medir con precisión pequeños volúmenes de picos y resolverlos de otros picos; el volumen de pico de detección debiera ser menor a 100 µL. a continuación se describen las características de detectores usados en CLAR<sup>23</sup>:

##### **1) Detector ultravioleta**

Los detectores ultravioleta funcionan monitoreando la luz absorbida por las moléculas del soluto de un rayo incidente; los detectores UV son los más comúnmente utilizados en sistemas de cromatografía de líquidos, en estos detectores no se aprecia el flujo o la sensibilidad a la temperatura, tienen una buena dinámica en cuanto a intervalo lineal se refiere. La absorbancia es proporcional a la concentración y obedece a la ley de Lambert-Beer dada por la siguiente ecuación:

$$\text{absorbancia} = \log I_o / I_t = \epsilon c l$$

Donde:

$\epsilon$  = es el coeficiente de absortividad,  $l$  = la dimensión de celda

$c$  = es la concentración del soluto y

Una de las modificaciones que se le han realizado a este tipo de detectores es el llamado espectrofotómetro UV con arreglo de fotodiodos<sup>9</sup>, que en contraste con el detector UV típico, el detector de arreglo de diodos puede ser usado para hacer mediciones recurrentes a diferentes longitudes de onda. Por este medio se obtiene un espectro completo en cada tiempo de un cromatograma y con un sistema de evaluación computacional generar cromatogramas en 3D<sup>24</sup>.

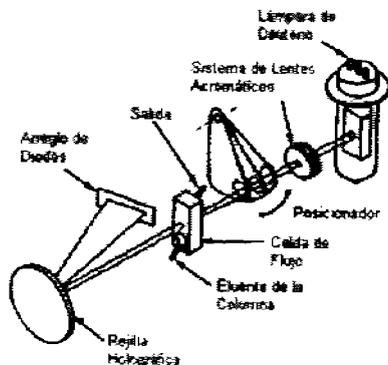


Figura 8. Esquema de un detector UV con arreglo de diodos

## 2) Detector de índice de refracción

Este tipo de detectores miden la diferencia entre los índices de refracción del disolvente puro y de la solución de la muestra que sale de la columna; de esta manera se detecta cualquier cambio en la composición de la fase móvil. La respuesta de este detector es universal y su sensibilidad es moderada, por lo general del orden de los microgramos.

Desafortunadamente, debido a la respuesta universal, es difícil efectuar programaciones de fase móvil con este detector, además es sensible a las

variaciones de flujo y de temperatura. Para poder observar diferencias en el índice de refracción del orden de  $1 \times 10^{-7}$  unidades se requiere un control de temperatura de  $\pm 0.0001$  °C.

Hay dos modelos distintos de este tipo de detector, uno de ellos, llamado refractómetro de desviación, se basa en el desplazamiento óptico de un rayo de luz y es colimado por el lente, atraviesa luego las celdas que contienen respectivamente el disolvente puro y la solución que sale de la columna, es reflejado por un espejo y enfocado a través de un mecanismo de ajuste óptico, incidiendo más tarde sobre la superficie de una fotocelda. El ángulo de incidencia del rayo de luz sobre la fotocelda está determinado por el ángulo de desviación que resulta de la diferencia entre los índices de refracción de los líquidos en ambas celdas. Conforme el rayo cambia su ángulo de incidencia sobre la fotocelda, se genera una señal, que es amplificada y representada por el registrador de señales.

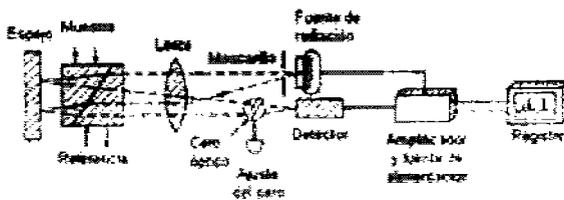


Figura 9. Esquema de un detector de índice de refracción

El esquema óptico de un refractómetro de tipo Fresnel consta de dos rayos de luz colimados y de igual intensidad, que pasan a través de un prisma e inciden sobre la interface vidrio-líquido de las celdas de referencia y muestra respectivamente. Dichas celdas, de aproximadamente 3  $\mu$ L cada una, consisten en cavidades ovaladas en una pequeña pieza de teflón, ubicada entre el prisma y una placa de sostén. El ajuste grueso del ángulo de incidencia de la luz se realiza rotando el cuerpo del proyector. La diferencia de la intensidad de la luz transmitida a través de las celdas está en función de los índices de refracción de ambos líquidos y se mide por medio de una fotocelda doble, la cual genera una señal que

es registrada. El detector de índice de refracción no destruye la muestra, su estabilidad es buena, es sensible a cambios de temperatura y de flujo, la señal que genera puede ser positiva o negativa según el índice de refracción de la solución que contiene la muestra sea mayor o menor que el índice de refracción del disolvente<sup>25</sup>.

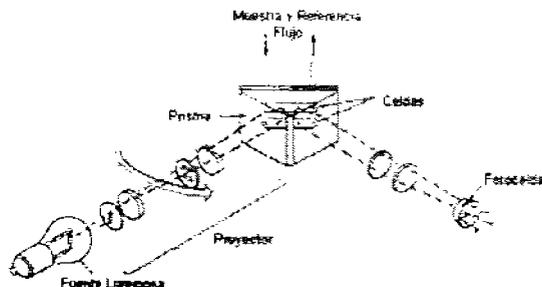


Figura 10. Esquema de un detector de índice de refracción de tipo Fresnel

### 3) Detector de conductividad

Algunos solutos iónicos pueden ser detectados en fases móviles acuosas usando un detector de conductividad y los dispositivos con celdas de bajo volumen se pueden usar para CLAR ya que las columnas se encuentran disponibles comercialmente; en un principio este dispositivo debía ser aplicado en sistemas no acuosos; por tanto, la aplicación de la conductividad con columnas para CLAR y medios no acuosos no había sido estudiado adecuadamente. La respuesta de los detectores de conductividad depende de la temperatura, como consecuencia la temperatura debe ser controlada cuidadosamente.

Ciertos diseños de detectores de conductividad son también susceptibles a cambios en la velocidad de flujo y su respuesta es predecible en cuanto a datos de conductividad y estos dispositivos exhiben una respuesta lineal en cuanto a la concentración del soluto cuando estén diseñados apropiadamente, aunque los detectores de conductividad no son aplicables en la totalidad de sistemas

orgánicos pero estos dispositivos son una parte integral de la cromatografía de iones y ha probado ser extremadamente valioso para analizar sustancias inorgánicas y orgánicas en fases móviles acuosas<sup>26</sup>.

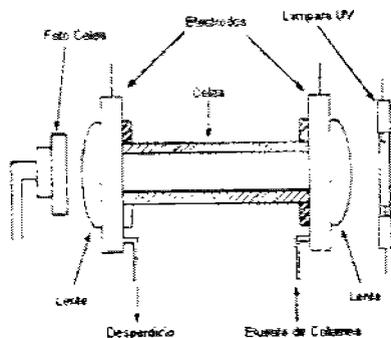


Figura 11. Esquema de un detector de conductividad

#### 4) Detector de fluorescencia

Estos dispositivos activan compuestos fluorescentes presentes en la fase móvil para ser detectados, cuando pasa el efluente con la mezcla la celda es irradiada con luz ultravioleta y cualquier medición resultante es por la radiación fluorescente. Aunque solo una pequeña porción de compuestos orgánicos e inorgánicos son fluorescentes y muchos compuestos activos biológicamente así como contaminantes ambientales y compuestos con anillos aromáticos son fluorescentes.

Entre las generalidades de su uso se relaciona su alta sensibilidad de estos detectores ya que la longitud de onda de excitación y la longitud de onda de detección puede ser variado, por tanto, el detector puede ser selectivo. La aplicación de los detectores de fluorescencia se ha llegado a utilizar para derivatizar compuestos no fluorescentes o débilmente fluorescentes en la precolumna o en la post columna para su detección<sup>27</sup>.

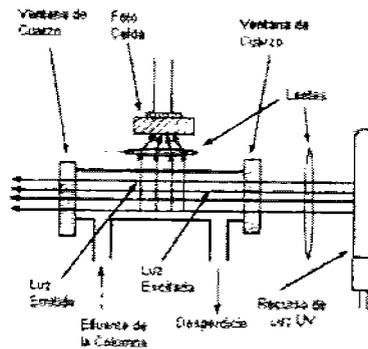


Figura 12. Esquema de un detector de fluorescencia

### 5) Espectrómetro de masas

El espectrómetro de masas es un importante detector en CLAR porque este tiene la habilidad para generar información de estructuras y dar el peso molecular de los solutos eluidos.

La combinación de la CLAR y un espectrómetro de masas sirve para la separación e identificación de muestras en el mismo paso, una ventaja que ningún otro de los detectores provee.

Una de las dificultades en el uso de un espectrómetro de masas es el tiempo de flujo de un CLAR que está en el orden de 1 mL/min, y el cual es una magnitud mayor a la que puede ser tomado por el sistema de vacío del espectrómetro de masas convencional así como, la dificultad que se presenta en el espectrómetro de masas de vaporizar compuestos no volátiles y moléculas termolábiles sin que haya degradación<sup>14</sup>.

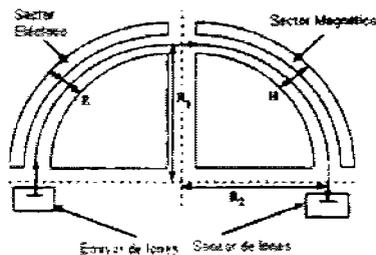


Figura 13. Espectrómetro de masas

### 6) Detector de dispersión láser

Es un detector de vaporización con detector de dispersión; responde a cualquier analito que es mucho menos volátil que la fase móvil. La mezcla entra al detector por la parte de arriba, en el nebulizador el eluyente es mezclado con nitrógeno gaseoso y forzado a pasar por una aguja formando una fina dispersión. La fase móvil se evapora al pasar por el tubo calentado dejando partículas finas sólidas del o de los solutos para finalmente entrar a la zona de detección en el fondo. Las partículas que provienen del dispersor son detectadas por la luz de un diodo láser hacia un fotodiodo. El detector de dispersión láser tiene una respuesta no lineal por tanto se emplean una serie de polinomios para construir la curva de calibración.

El detector de dispersión láser es un detector compatible con los gradientes de elución y no hay picos asociados con el frente del disolvente y por tanto no hay interferencia de este con los picos eluidos como de presentarían en un detector ultravioleta<sup>28</sup>.

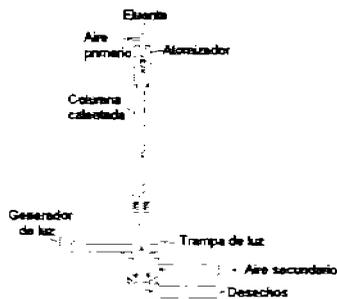


Figura 14. Detector de dispersión láser

#### e) Registrador de señales

Los compuestos separados en la columna, deberán ser registradas por un graficador o registrador; en el caso del graficador es necesario calcular manualmente el área obtenida para cada pico<sup>6</sup>.

El método más sencillo de medición es mediante la altura de los picos desde la línea base al máximo del pico aunque se debe contar con una línea base estable para obtener una buena precisión. Esta área se puede medir de varias maneras, si el pico es simétrico se hace mediante una triangulación prolongando los lados del pico hasta la línea base midiendo el ancho y la altura del pico. Hay otras formas como son utilizando un planímetro o recortando y plegando el área obtenida. Aunque una manera muy frecuente es medir la altura de los picos y multiplicarla por el ancho del pico medido en la altura media<sup>6</sup>.

En la actualidad los instrumentos de cromatografía líquida como la mayoría de los instrumentos analíticos, incorporan una computadora para el control, para la adquisición de datos así como el manejo de datos.

Los softwares aprovechan para evaluar en los cromatogramas las integraciones de los picos, así como, evalúan los datos para la repetibilidad, precisión y robustez incluso en algunos casos se han diseñado softwares con la

finalidad de simular una corrida de CLAR que ayudan a resolver problemas del sistema cromatográfico<sup>29</sup>.

### f) Cromatograma

Si un detector que responde a la concentración de soluto se coloca el extremo final de la columna durante la elución y se representa gráficamente su señal en función del tiempo, se obtiene una serie de picos conocido como cromatograma.

La posición de los picos sobre el eje de tiempo puede usarse para identificar los componentes de la muestra; las áreas bajo los picos proporcionan una medida cuantitativa de la cantidad de cada especie<sup>4</sup>.

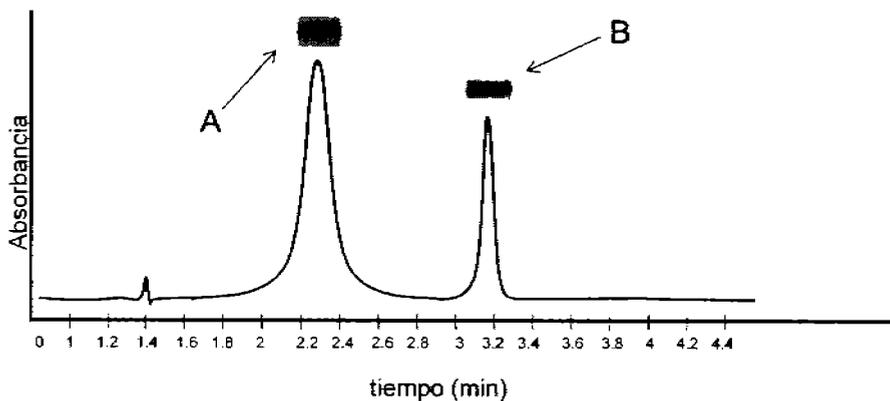


Figura 15. Representación gráfica de un cromatograma típico

## B. Propiedades de los analitos

### 1. Acetaminofeno

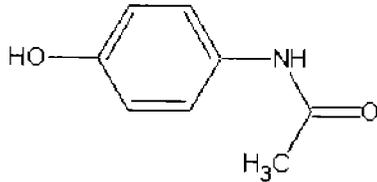


Figura 16. Estructura química del acetaminofeno

#### a. Nombres

##### 1) Comercial

Tylenol, Tylenol, Temperal, Magnidol-plus.<sup>30</sup>

##### 2) Químico

N- (4-Hidroxifenil) acetamida; 4'-hidroxiacetanilida; p-hidroxiacetanilida; p-acetaminofenol; paracetamol; N-acetil-p-aminofenol.

Tabla 2. Propiedades químicas del acetaminofeno

Formula molecular	Peso molecular	pKa
$C_8H_9NO_2$	151.16 g/mol	9.5

#### b. Apariencia

El acetaminofeno se encuentra generalmente como un polvo blanco cristalino con un ligero sabor amargo.

### c. Solubilidad

Muy soluble en agua fría, mucho más soluble en agua caliente, soluble en metanol, etanol, dimetilformamida, acetona, acetato de etilo, ligeramente soluble en éter. Prácticamente insoluble en éter de petróleo, pentano, benceno<sup>31, 32</sup>.

Se emplea como analgésico, antipirético en el tratamiento sintomático de padecimientos que cursen con fiebre y dolor como: bronquitis, amigdalitis, faringitis, otitis, sinusitis.

Además es útil en el tratamiento de cefálea, neuralgias, amigdalectomía, otalgias y odontalgias. Antipirético en casos de gripe y reacciones posvacunales<sup>30</sup>.

## 2. Ketoprofeno

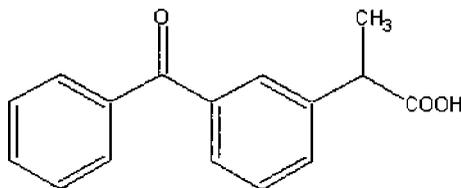


Figura 17. Estructura química del ketoprofeno

### a. Nombres

#### 1) Comercial

Orudis, Profenid, Keduril, k-profen.<sup>30</sup>

#### 2) Químico

ácido (RS)-2-(3-Benzoilfenil) propiónico; ácido m-Benzoilhidratropico

**Tabla 3.** Propiedades químicas del ketoprofeno

Formula molecular	Peso molecular	pKa
$C_{16}H_{16}O_3$	254.29 g/mol	4.8

### b. Apariencia

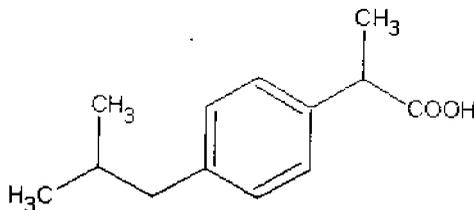
Polvo cristalino blanco o casi blanco

### c. Solubilidad

Soluble en éter, alcoholes, acetona, cloroformo, dimetilformamida, acetato de etilo, ligeramente soluble en agua<sup>31, 32</sup>.

Se usa como analgésico, antiinflamatorio; está indicado para el tratamiento de la artritis reumatoide aguda y crónica, en la osteoartritis, para aliviar dolores medios a moderados, y por su efecto antipirético, para reducir la fiebre<sup>30</sup>.

## 3. Ibuprofeno



**Figura 18.** Estructura química del ibuprofeno

### a. Nombres

#### 1) Comercial

Advil, Citalgan, Diprodol, Dolvan, Ibuffam.<sup>30</sup>

## 2) Químico

ácido  $\alpha$ -Metil-4-(2-metilpropil) bencenacético; ácido p-isobutilhidratrópico

**Tabla 4.** Propiedades químicas del ibuprofeno

Formula molecular	Peso molecular	pKa
$C_{13}H_{18}O_2$	207.27 g/mol	5.2

### b. Apariencia

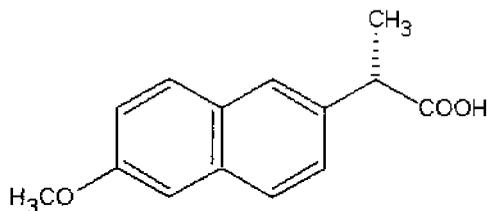
El ibuprofeno es un polvo cristalino blanco o colorido.

### c. Solubilidad

Prácticamente insoluble en agua pero es muy soluble en la mayoría de los solventes orgánicos<sup>31, 32</sup>.

Se utiliza como antiinflamatorio, para el alivio temporal de molestias y dolores asociados con el resfriado común, cefalea, otalgias y odontalgias, dismenorrea primaria, lumbalgia, torceduras y contusiones<sup>30</sup>.

## 4. Naproxeno



**Figura 19.** Estructura química del naproxeno

## a. Nombres

### 1) Comercial

Fuxen, Naprodil, Naxen, Novaxen, Proxalin.<sup>30</sup>

### 2) Químico

ácido (S)-6-Metoxi-.alfa.-metil-2-naftaleneacético; ácido d-2-(6-metoxi-2-naftil) propiónico

Tabla 5. Propiedades químicas del naproxeno

Formula molecular	Peso molecular	pKa
C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	230.26 g/mol	4.5

## b. Apariencia

Polvo blanco cristalino o ligeramente amarillo

## c. Solubilidad

Soluble en 25 partes de etanol (96%), 20 partes de metanol, 15 partes de cloroformo, 40 partes de éter, prácticamente insoluble en agua<sup>32</sup>.

El uso que tiene es de antiinflamatorio, analgésico, antipirético en enfermedades reumáticas, osteoartritis, gota, afecciones musculoesqueléticas y periarticulares<sup>30</sup>.

## II. OBJETIVOS

### Objetivo general

- ↓ Proponer un método analítico para la separación de acetaminofeno, naproxeno, ketoprofeno e ibuprofeno que cumpla los requerimientos de la FEUM 8ª

### Objetivos particulares

- Obtener y adecuar la eficiencia de cada soluto.
- Obtener y adecuar la eficiencia y resolución de la mezcla de antiinflamatorios.
- Proponer un diseño experimental basado en un cuadro de optimización por efecto del pH.

### III. HIPÓTESIS

En el análisis de compuestos con propiedades ácido-base en medio acuoso; si se modifica la proporción de fase móvil y pH; se logrará una separación eficiente y selectiva de los analitos, empleando un sistema cromatográfico hidrofóbico y detección por absorción a 220 nm.

## IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL

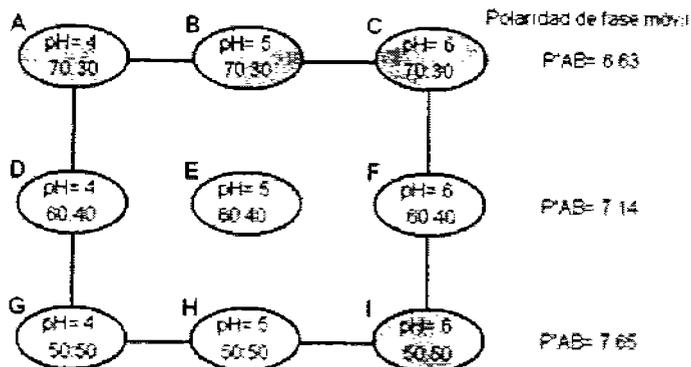
### A. Sustancias

- Acetaminofeno STD concentración 1000 µg/mL (marca Merck México S.A)
- Naproxeno STD concentración 1000 µg/mL (marca Merck México S.A)
- Ketoprofeno STD concentración 1000 µg/mL (marca Merck México S.A)
- Ibuprofeno STD concentración 1000 µg/mL (marca Merck México S.A)
- Agua destilada grado CLAR
- Metanol grado HPLC marca (Merck México S.A)
- Amortiguador de fosfatos pH 4 concentración 0.01M
- Amortiguador de fosfatos pH 5 concentración 0.01M
- Amortiguador de fosfatos pH 6 concentración 0.01M

### B. Equipo

- Cromatografo Varian Prostar con automuestreador Modelo 410
- Programa Galaxie Workstation
- Detector UV Varian Modelo Cary 50Bio
- Bomba Varian Modelo Cary
- Desionizador Milli-Q Millipore Syntesis
- Columna Microsorb MV C18  
Empaque Microsorb-MV 100 C18  
Tamaño de Partícula: 5 µm  
Longitud: 150 mm  
Diámetro Interno: 4.6 mm  
Material: acero inoxidable

### C. Método



**Figura 20.** Cuadro de condiciones de experimento

Se utilizaron las condiciones A, B, C, I; y las muestras para la evaluación del efecto del pH fueron hechas de la siguiente manera: se hicieron las diluciones correspondientes de los analitos para obtener una concentración final de 200 µg/mL de cada uno de los analitos individualmente; 10 mg de cada uno de los cuatro estándares fueron disueltos individualmente en un volumen de 10 mL de metanol; se tomaron 0.2 mL de cada uno de los estándares y colocados en un vial, se llevó a un volumen final de 1 mL, se preparó una mezcla de analitos 0.25 mL de cada uno de ellos para obtener un volumen final de 1 mL; se programó el método empleando longitud de onda  $\lambda = 220$  nm, velocidad de flujo de 1 mL/min, y acondicionó el equipo CLAR, se inyectó 10 µL de fase móvil compuesta con metanol y amortiguador de fosfatos pH= 4 en una proporción de 70:30 v/v, la elución se programó para un tiempo de 10 minutos, posteriormente se inyectó el mismo volumen de cada uno de los analitos por separado, y después la mezcla correspondiente bajo las mismas condiciones.

De igual manera, se realizaron los otros experimentos con las condiciones y metodología modificando la fase móvil de metanol: amortiguador de fosfatos 70:30 v/v con un pH= 5, otro con una fase móvil de metanol: amortiguador de fosfatos 70:30 v/v y pH= 6; el último que se realizó se llevó a cabo con proporción 50:50 metanol: amortiguador de fosfatos pH= 6.

## V. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

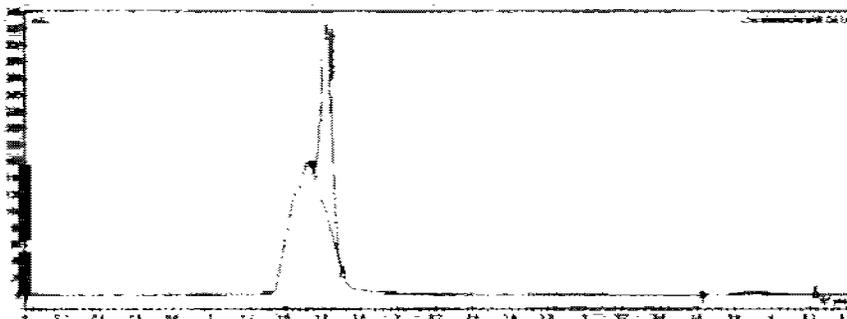


Figura 21. Cromatograma obtenido al analizar acetaminofeno con las condiciones A de la figura 20

Tabla 7. Datos experimentales de la figura 21

Analito	$t_r$ min	Área mUA*min	$k'$	NTP	$\alpha$	R	As. USP
Acetaminofeno	1.62	14.352325	0.16	3880.74	0.0	0.0	0.81

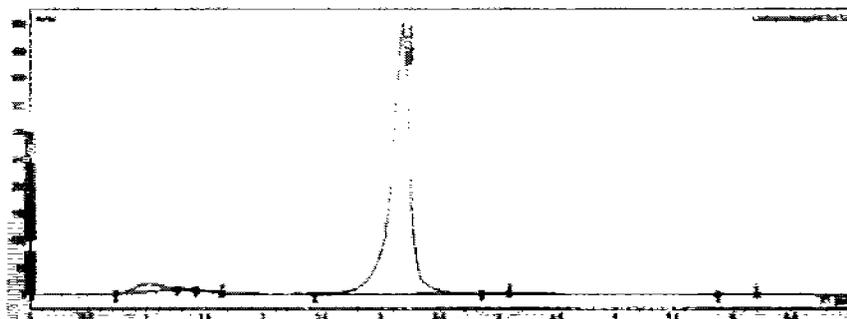


Figura 22. Cromatograma que se obtiene al analizar ketoprofeno con las condiciones A de la figura 20

Tabla 8. Datos experimentales de la figura 22

Analito	$t_r$ min	Área mUA*min	$k'$	NTP	$\alpha$	R	As. USP
Ketoprofeno	3.19	90.845905	1.28	2391.13	16.75	7.37	0.76

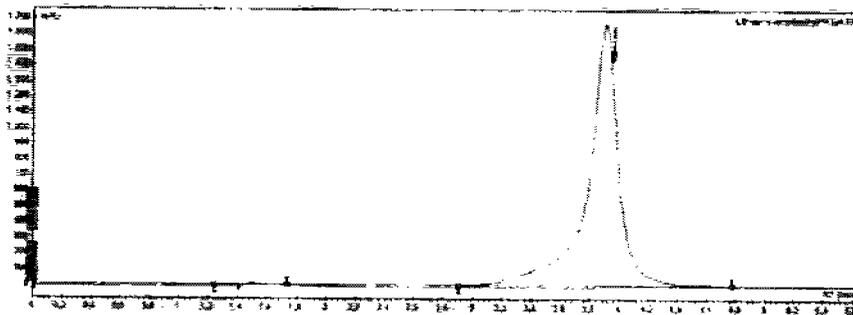


Figura 23. Cromatograma que se obtiene al analizar naproxeno con las condiciones A de la figura 20

Tabla 9. Datos experimentales de la figura 23

Analito	$t_r$ min	Área mUA*min	$k'$	NTP	$\alpha$	R	As. USP
Naproxeno	3.90	414.560096	1.79	2147.68	23.44	8.35	0.76

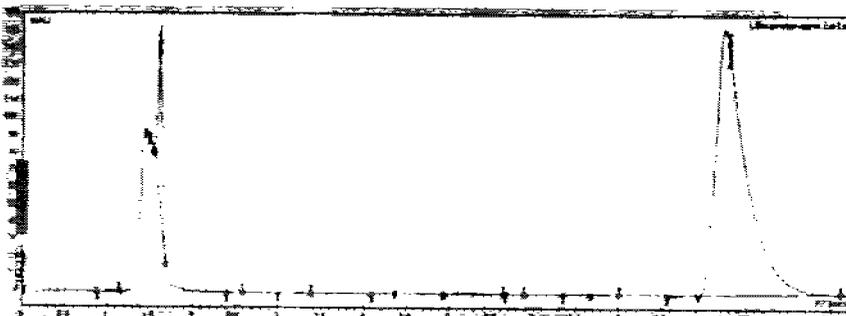


Figura 24. Cromatograma que se obtiene al analizar ibuprofeno con las condiciones A de la figura 20

Tabla 10. Datos experimentales de la figura 24

Analito	$t_r$ min	Área mUA*min	$k'$	NTP	$\alpha$	R	As. USP
Ibuprofeno	8.24	63,123131	4.89	3074.26	1.07	1.04	2.10

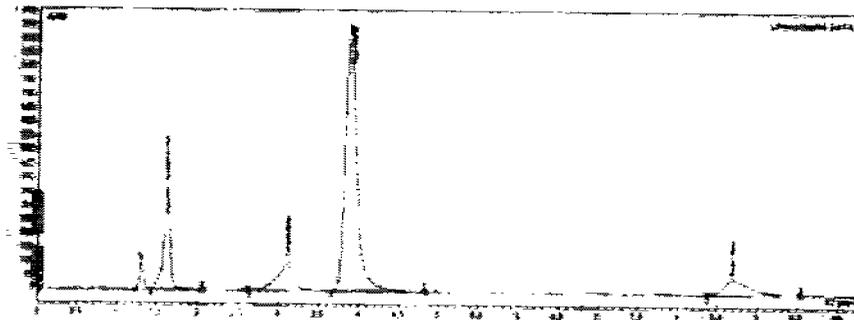


Figura 25. Cromatograma que se obtiene al analizar la mezcla con las condiciones A de la figura 20

Tabla 6. Datos experimentales de la figura 25

Analito	$t_r$ min	Área mUA*min	$k'$	NTP	$\alpha$	R	As. USP
Blanco	—	—	—	—	—	—	—
Acetaminofeno	1.63	33.889334	0.16	2537.24	-2.27	2.97	0.77
Ketoprofeno	3.12	24.546217	1.23	1350.78	7.59	6.37	0.81
Naproxeno	3.87	157.994065	1.77	4042.66	1.44	2.58	1.44
Ibuprofeno	8.69	19.640163	5.20	3857.54	2.95	11.99	1.96

En los experimentos realizados de forma individual, el número de platos teóricos (N) supera a los 2000, siendo los mínimos requeridos para que se considere que existe una buena eficiencia, la mezcla por otra parte, presenta un número de platos teóricos superior al requerido exceptuando al ketoprofeno; su eficiencia es baja ya que sus valores son inferiores al mínimo necesario. El factor de asimetría (As. USP) de los picos individuales indican un ligero cabeceo para el acetaminofeno, ketoprofeno, simetría para el naproxeno; y coleo para el ibuprofeno según valores límite indicados por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). La retención mínima del sistema cromatográfico determinada por la FEUM es de 2 aproximadamente a un tiempo de retención entre 4 a 5 minutos, en la mezcla de este experimento no se cumple este parámetro ya que los analitos empiezan a eluir cercanos al tiempo muerto.

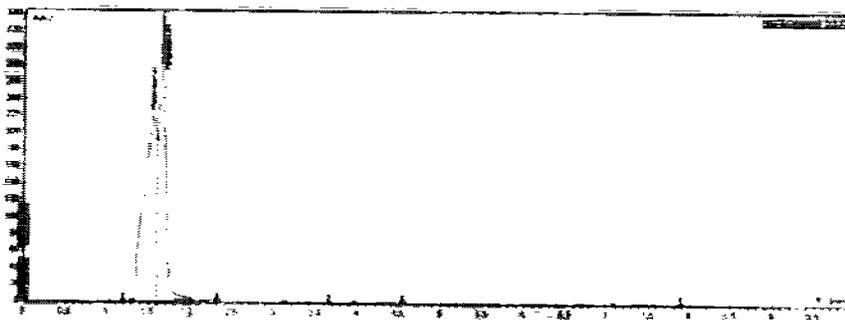


Figura 26. Cromatograma que se obtiene al analizar acetaminofeno con las condiciones B de la figura 20.

Tabla 12. Datos experimentales de la figura 26

Analito	$t_r$ min	Área mUA*min	$k'$	NTP	$\alpha$	R	As. USP
Acetaminofeno	1.65	31.670822	0.18	2795.37	1.65	1.60	1.39

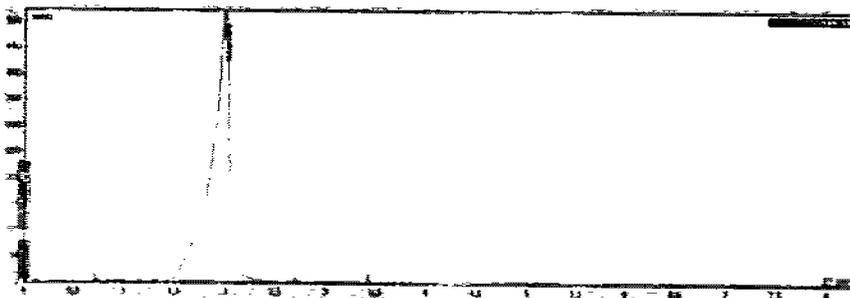
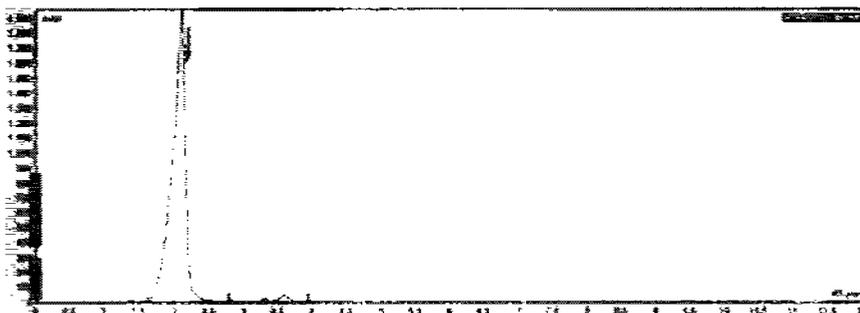


Figura 27. Cromatograma que se obtiene al analizar ketoprofeno con las condiciones B de la figura 20

Tabla 13. Datos experimentales de la figura 27

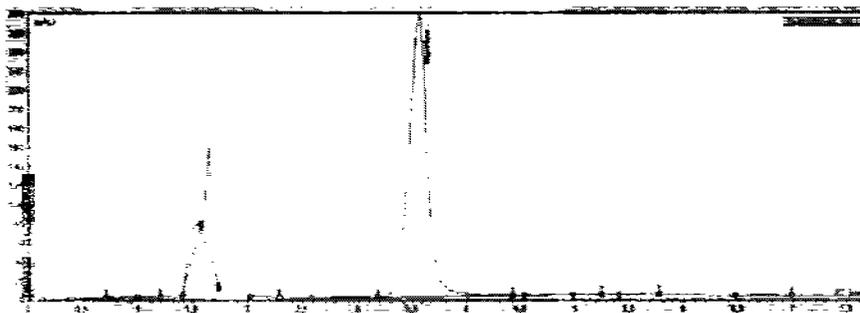
Analito	$t_r$ min	Área mUA*min	$k'$	NTP	$\alpha$	R	As. USP
Ketoprofeno	1.97	109.562360	0.41	806.04	-1.23	7.48	0.66



**Figura 28.** Cromatograma que se obtiene al analizar naproxeno con las condiciones B de la figura 20

**Tabla 14.** Datos experimentales de la figura 28

Analito	$t_r$ min	Área mUA*min	$k'$	NTP	$\alpha$	R	As. USP
Naproxeno	2.11	429.602945	0.50	745.59	8.83	2.39	0.68



**Figura 29.** Cromatograma que se obtiene al analizar ibuprofeno con las condiciones B de la figura 20

**Tabla 15.** Datos experimentales de la figura 29

Analito	$t_r$ min	Área mUA*min	$k'$	NTP	$\alpha$	R	As. USP
Ibuprofeno	3.56	58.632524	1.54	2219.04	1.48	1.72	0.99

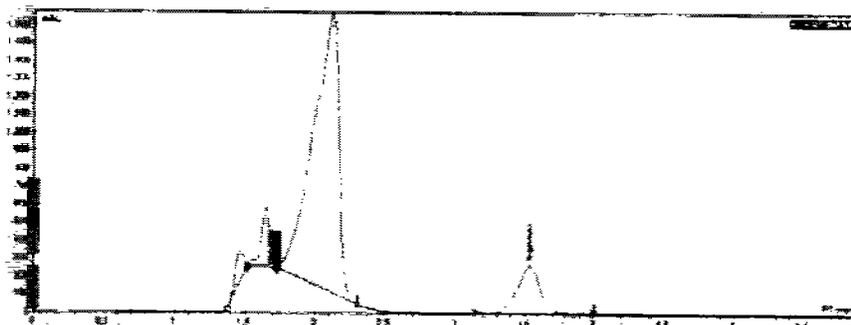


Figura 30. Cromatograma que se obtiene al analizar la mezcla de analitos con las condiciones B de la figura 20

Tabla 11. Datos experimentales de la figura 30

Analito	$t_r$ min	Área mUA*min	$k'$	NTP	$\alpha$	R	As. USP
Blanco	—	—	—	—	—	—	—
Acetaminofeno	1.65	38.563693	0.18	2924.16	3.80	1.52	0.75
Ketoprofeno	2.12	328.545124	0.51	640.61	2.84	2.04	0.63
Naproxeno	2.12	328.545124	0.51	640.61	2.84	2.04	0.63
Ibuprofeno	3.54	49.424570	1.53	2394.83	2.97	4.55	0.95

En el caso del acetaminofeno e ibuprofeno, el número de platos teóricos supera los 2000, teniendo buena eficiencia; el ketoprofeno y el naproxeno muestran baja eficiencia al estar por debajo de lo mínimo requerido; la mezcla al igual que los análisis individuales muestran una disminución de los tiempos de retención para todos los analitos traslapándose acetaminofeno, ketoprofeno y naproxeno. En cuanto al factor de asimetría (As. USP) de los picos individuales muestran que el acetaminofeno, el ketoprofeno y naproxeno presentan cabeceo, en tanto el ibuprofeno presenta más simetría y se encuentra cercano a la idealidad de un valor de 1 el valor debido a la disminución del tiempo de retención, se produce una disminución del factor de capacidad indicada en la FEUM 8ª.

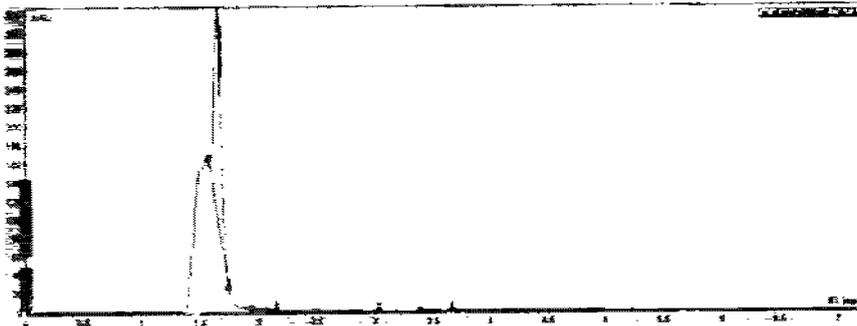


Figura 31. Cromatograma que se obtiene al analizar acetaminofeno con las condiciones C de la figura 20

Tabla 17. Datos experimentales de la figura 31

Analito	$t_r$ min	Área mUA*min	$k'$	NTP	$\alpha$	R	As. USP
Acetaminofeno	1.65	14.471714	0.18	3877.89	0.0	0.0	0.81

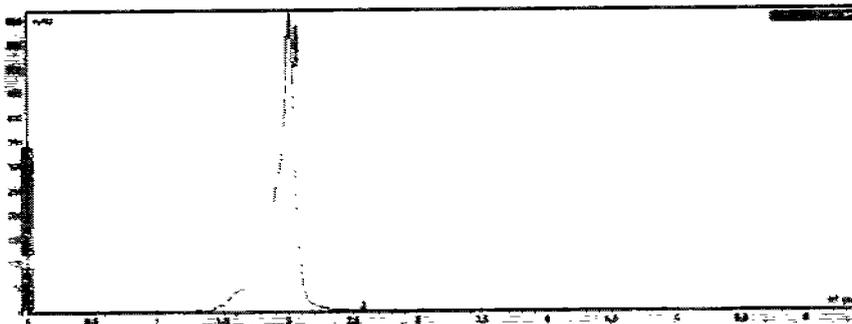
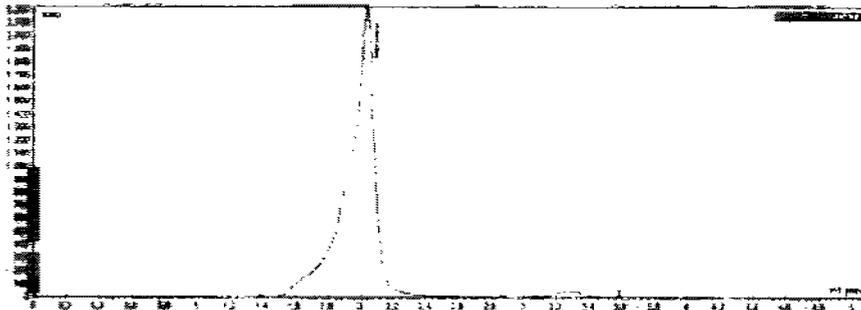


Figura 32. Cromatograma que se obtiene al analizar ketopropeno con las condiciones C de la figura 20

Tabla 18. Datos experimentales de la figura 32

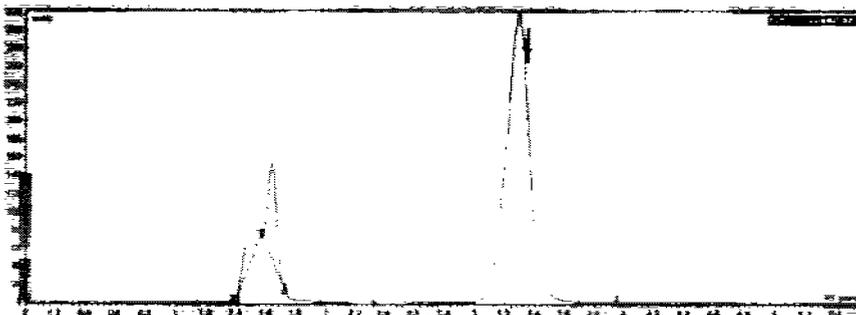
Analito	$t_r$ min	Área mUA*min	$k'$	NTP	$\alpha$	R	As. USP
Ketopropeno	2.01	111.55502004	0.44	1089.53	0.0	0.0	0.64



**Figura 33.** Cromatograma que se obtiene al analizar naproxeno con las condiciones C de la figura 20

**Tabla 19.** Datos experimentales de la figura 33

Analito	$t_r$ min	Área mUA*min	$k'$	NTP	$\alpha$	R	As. USP
Naproxeno	2.03	423.793353	0.45	974.16	0.0	0.0	0.66



**Figura 34.** Cromatograma que se obtiene al analizar ibuprofeno con las condiciones C de la figura 20

**Tabla 20.** Datos experimentales de la figura 34

Analito	$t_r$ min	Área mUA*min	$k'$	NTP	$\alpha$	R	As. USP
Ibuprofeno	3.29	59.273160	1.35	1938.42	7.89	8.20	0.94

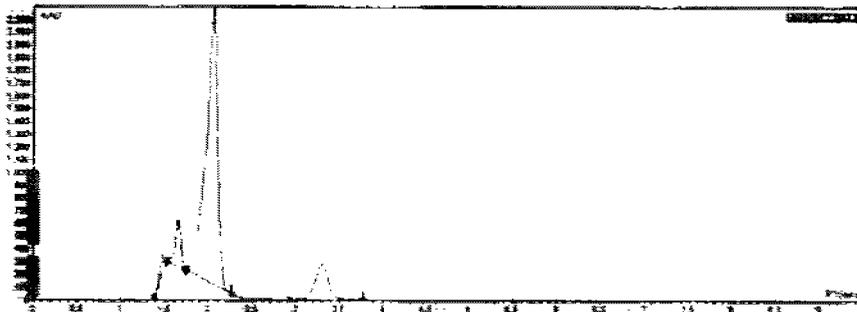


Figura 35. Cromatograma que se obtiene al analizar la mezcla con las condiciones C de la figura 20

Tabla 16. Datos experimentales de la figura 35

Analito	$t_r$ min	Área mUA*min	$k'$	NTP	$\alpha$	R	As. USP
Blanco	---	---	---	---	---	---	---
Acetaminofeno	1.65	25.531396	0.18	3593.91	3.45	1.60	0.72
Ketoprofeno	2.05	330.563887	0.47	1519.48	2.58	2.49	0.66
Naproxeno	2.05	330.563887	0.47	1519.48	2.58	2.49	0.66
Ibuprofeno	3.31	51.378438	1.36	2223.53	2.92	5.10	0.95

El acetaminofeno e ibuprofeno, tienen buena eficiencia; el ketoprofeno y el naproxeno tienen baja eficiencia al estar por debajo de los 2000 N. La mezcla, al igual que los analitos individuales muestra disminución de los tiempos de retención traslapándose los tres primeros picos; se presenta un cabeceo de los mismos de manera individual y en mezcla una elución simultánea de los mismos, el ibuprofeno es el único que se muestra simétrico su valor esta cercano a la idealidad. Debido a la disminución del tiempo de retención, el factor de capacidad es inferior al indicado en la FEUM 8<sup>a</sup> tanto en los analitos individuales como en mezcla.

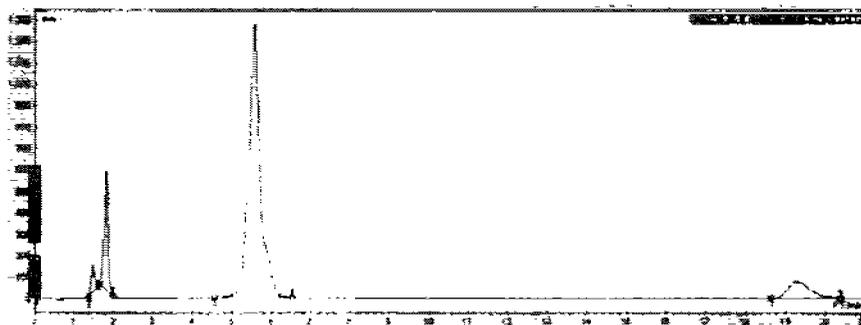


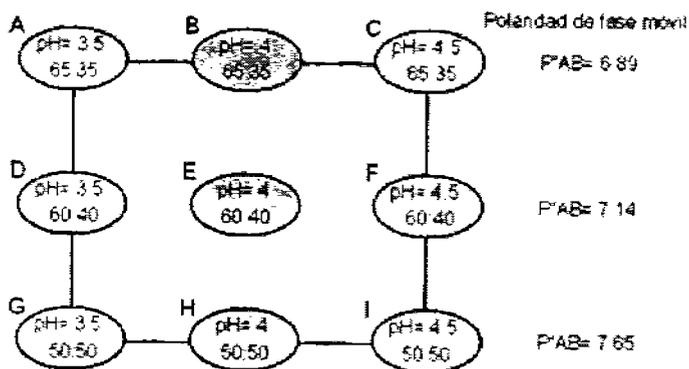
Figura 36. Cromatograma que se obtiene al analizar la mezcla con las condiciones I de la figura 20.

Tabla 21. Datos Experimentales de la Figura 36

Analito	$t_r$ min	Área mUA*min	$k'$	NTP	$\alpha$	R	As. USP
Blanco	—	—	—	—	—	—	—
Acetaminofeno	1.83	80.417259	0.30	1595.94	5.33	1.78	0.72
Ketoprofeno	5.55	439.308772	2.97	2029.78	9.73	11.03	1.19
Naproxeno	5.55	439.308772	2.97	2029.78	9.73	11.03	1.19
Ibuprofeno	19.27	49.961478	12.77	5580.23	4.30	17.99	1.45

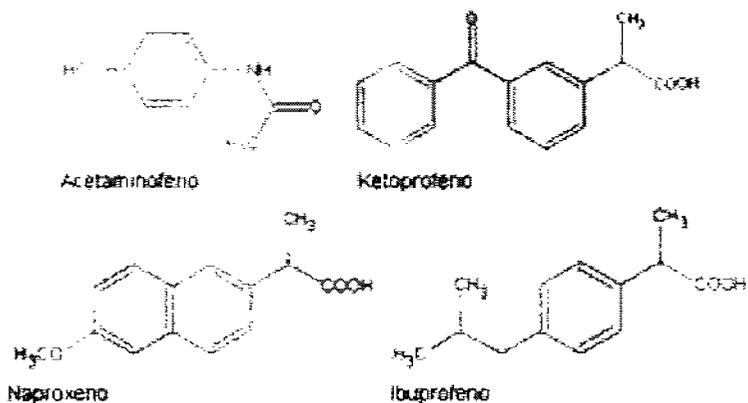
Finalmente con estas condiciones, la eficiencia se mejora para el ketoprofeno, naproxeno e ibuprofeno y disminuyendo la eficiencia para el acetaminofeno; los picos del ketoprofeno, naproxeno se encuentran traslapados, el ibuprofeno es simétrico según los valores establecidos en la FEUM 8ª; los analitos son retenidos con estas condiciones incrementando el tiempo de retención y por tanto el factor de capacidad muestra aumento en su valor pero no muy significativo para cumplir requerimientos.

Con los resultados de los cromatogramas obtenidos se propone una optimización del experimento para la separación de los analitos de interés empleando un pH= 4 bajo las condiciones B. E, H.



**Figura 37.** Cuadro propuesto de condiciones de experimento

El experimento realizado con fase móvil compuesta de metanol: amortiguador de fosfatos 70:30 pH= 4 muestra definidos (Figuras 21 a 25), eluyendo el acetaminofeno muy cercano al tiempo muerto, el ketoprofeno, naproxeno y finalmente el ibuprofeno; esta orden de elución se debe a las características de las moléculas, así como de su facilidad con que estas son ionizadas dependido del pH de trabajo que se esté utilizando; el acetaminofeno al ser una base, se encuentra de manera protonada en pH ácido, el ketoprofeno, naproxeno e ibuprofeno son ácidos débiles y por tanto, se encuentran en de forma molecular en mayor proporción (aproximadamente 90%), el orden de elución se justifica por sus propiedades de polaridad de las moléculas; por esta razón, el ketoprofeno es más polar que el naproxeno y el ibuprofeno más hidrofóbico (menos polar) que los otros ácidos débiles.



En el experimento con pH= 5, metanol: amortiguador de fosfatos 70:30 muestra al acetaminofeno, ketoprofeno y naproxeno con picos traslapados, debido a que a este pH de trabajo las moléculas se encuentran parcialmente ionizadas casi el 60 % y por lo tanto, hay una disminución en sus tiempos de retención al igual que para el ibuprofeno (figuras 26 a 30).

El experimento llevado a cabo con pH= 6, metanol: amortiguador de fosfatos 70:30 el acetaminofeno no se ve afectado por el pH, este sigue ionizado, y su tiempo de retención no varía, y se nota una ligera disminución en los tiempos de retención de los otros analitos ya que el grado de ionización es mayor al 90% (figuras 31 a 35); el ensayo a pH= 6 metanol: amortiguador de fosfatos 50:50, hay un retraso en el tiempo de retención del ketoprofeno, naproxeno que siguen eluyendo de manera simultánea; es decir, existe un problema de selectividad, el ibuprofeno es más retenido en la fase estacionaria ya por ser más hidrofóbico y esta proporción de fase móvil no favorece su elución en un buen tiempo de análisis (figura 36).

## VII. CONCLUSIÓN

Conocer las propiedades fisicoquímicas de uno o varios compuestos en una mezcla es una ventaja, esto ayuda a tener un mejor panorama de cómo lograr la separación proponiendo las condiciones de experimento lo cual asegura la disminución de tiempo de análisis, y disminución en el número de ensayos así como proponer nuevos caminos como el modificar la proporción de fase móvil para mejorar y cumplir con la adecuabilidad; mejorando la selectividad, resolución así como el factor de capacidad para que este método cumpla con lo establecido en la FEUM 8ª edición.

La optimización del método que se propone a pH 4 es la siguiente:

Proporción de FM MeOH:amortiguador de fosfatos	Fuerza de FM
65:35	6.89
70:30	7.14
50:50	7.65

Esta propuesta se encuentra basada en la resolución de los analitos; tomando en cuenta los pares críticos que son el ketoprofeno y naproxeno ya que estos analitos presentan traslape en pHs menores; por ello el mantener el pH= 4 y modificando la fase móvil es probable que se logre mejorar y optimizar las condiciones de experimento; otra alternativa que se sugiere es utilizar un gradiente de elución el cual puede ensayarse de manera inicial bajo las siguientes condiciones:

Tiempo (min)	Proporción de FM MeOH:amortiguador de fosfatos	Fuerza de FM
0-4	50:50	7.65
4-5	65:35	6.89
5-10	75:25	6.38

Sin embargo, en caso de no obtener una adecuada selectividad, se propone sustituir el metanol por acetonitrilo o THF en la fase móvil y adecuar la fuerza de elución con los nuevos disolventes.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Haleem I. (2002). A century of separation science. Marcel Dekker. USA; 19
2. Bender, G. (1987) Métodos instrumentales de análisis en química clínica. Acribia, S.A. España:187
3. Miller J. (1976). Chromatography concepts and contrasts. John Wiley & sons. New Jersey. USA; 1-3
4. Skoog. D. (2005) Principios de análisis instrumental. 8ª edición McGraw Hill.USA:630-633, 931,989, 993-995, 998, 1003
5. Cazes. J. (2004). Encyclopedia of cromatography. Marcel Dekker. USA:17, 888
6. Secretaria de Salud (2000). Farmacopea de Los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 8ª Ed. editorial talleres gráficos de publicaciones e impresiones de calidad. México. Tomo I pp 378-383
7. Rubinson. K. (2000). Contemporary instrumental analysis. Prentice Hall, Inc. New Jersey. USA:630-633
8. Ewing. G. (1985). Instrumental methods of chemical analysis. 5<sup>th</sup> edition. Mc Graw Hill. USA: 377-378
9. Braithwaite, A. (1999) Cromatographic methods. 5ª edition Marcel Dekker. USA,pp 290-294, 362-368
10. Rouessac. F, Análisis químico, métodos y técnicas instrumentales modernas. McGraw Hill. España:67-68
11. Phyllis. R. (1999) HPLC and CE principles and practice. Academic Press. USA: 36
12. Christian.G. (1986). Instrumental analysis.2nd edition. Allyn & Sons, Inc. USA:663
13. Settle.F. (1997) Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. Prentice Hall. Inc. New Yersey USA: 153,157-158
14. Katz. E. Chromatography handbook of HPLC. Wiley & Sons. USA: 36
15. Hanai.T. (1999) HPLC a practical guide. RSC Chromatography Monographs. Japan:1

16. Lindsay, S. (1992) High performance liquid chromatography. 2nd edition. John Wiley & Sons. England: 17-18
17. Tsuji, K. (1978) GLC and HPLC determination of therapeutic agents. Marcel Dekker, Inc. USA: 5
18. García de Marina, A. (1998). Cromatografía líquida de alta resolución. Editorial Limusa. México D.F.: 53
19. Loro, J. (2001) Manual de cromatografía. colección textos universitarios. México:
20. Hernández, I. (2002) Introducción al análisis instrumental\*. ed. Ariel Ciencia. México:
21. Cazes, J. (2001). Encyclopedía of chromatography, vol II. Publisher by Taylor & Francis Group. USA: 1793
22. Nollet, L. (2000). Food analysis for HPLC. Marcel Dekker, Inc. New York USA: 16
23. Zweig, G. (1973). Analytical methods for pesticides and plant growth regulators. Vol VII Thin-layer and liquid chromatography. Academic Press, Inc. USA: 93-94
24. Schwedt, G. (1997). The essential guide to analytical chemistry. John Wiley & sons. New York. USA: 158
25. McNair, H. (1978) Cromatografía líquida de alta presión. SSO EUA. Washington. USA: 32-34
26. Snyder, L. (1979). Introduction to modern liquid chromatography 2<sup>nd</sup> edition John Wiley & Sons, INC USA. Pp 161
27. Jeffery, B. (1991) Vogel's textbook of quantitative chemical analysis. 5th edition. Longman scientific & technical. New York. Pp 227
28. Harris, D. (2003) Quantitative chemical analysis. 6<sup>th</sup> edition. W.H Freeman & company. New York pp 625-626
29. Adamovics, J. Chromatographic analysis of pharmaceutical. Marcel Dekker. Inc. New York, USA: 183-185
30. Rosenstein, E. (2000). Diccionario de especialidades farmacéuticas. 46<sup>a</sup> edición. Ediciones PLM, S.A de C.V. México: 33, 397, 509, 598, 636, 871, 1040, 1067, 1190, 1328, 1400, 1449, 1596, 1627

31. Quanyun, X. Stability indicating HPLC methods for drugs analysis. 2<sup>nd</sup> edition. Pharmaceutical Press. London UK: 1-4, 339-341, 359-360
32. Merck and Company. (1996). The merck index. 12<sup>a</sup> Edition. Merck and Co. Inc. USA: 8, 776,836