



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

"CUANTIFICACION DE ACIDO ASCORBICO, CAFEINA Y
BENZOATO DE SODIO EN PRODUCTOS COMERCIALES
UTILIZANDO DIFERENTES COLUMNAS POR HPLC
MEDIANTE CURVAS DE CALIBRACION"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

JUAN JESUS GOMEZ REYES

ASESOR: Q.F.B. ELIA GRANADOS ENRIQUEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.
 ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
 Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Cuantificación de ácido ascórbico, cafeína y benzoato de sodio
 en productos comerciales utilizando diferentes columnas por
 HPLC mediante Curvas de Calibración."

que presenta el pasante: Juan Jesús Gómez Reyes
 con número de cuenta: 9301733-4 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de Mayo de 2004.

PRESIDENTE	<u>QFB. Elia Granados Enríquez</u>	
VOCAL	<u>Q. Sonia Rincón Arce</u>	
SECRETARIO	<u>QFI. Guadalupe Koizumi Castro</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>DRA. Gabriela Vargas Martínez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>QFB. Gabriela Ponce Anguiano</u>	

AGRADECIMIENTOS

A Dios que me cuida mucho; por haberme dado todo lo que tengo y por permitirme vivir un día más dándome la fuerza para seguir adelante.

A mis papás: VICTOR y ARACELI por darme siempre su apoyo incondicional en todo momento. Me siento afortunado por tener a unos padres como Ustedes. Les dedico este logro (y los que faltan). Gracias por confiar en mí; los adoro, los quiero.....

A mis dos hermanitos del alma: LAURA y DAVID con los cuales he compartido muchos momentos; haré que se sientan orgullosos de tener a un hermanito como "Yo". Gracias por ser mis carnales; los amo.....

A mis dos abuelitas: CHATA y ANA, a las dos las quiero. Gracias por sus consejos y sabiduría que han compartido conmigo. A TODA MI RAZA: mis tías y tíos ÁNGELES, SANDRA, JAIME y GENARO; a mis sobrinitos: LALO e IVÁN; y a todos mis primos: PAUL, ABIGAIL, LEYSI, BRIAN, ALBERTO (El chino), ALE y ÁNGEL GABRIEL (Gaby); y a mi cuñado. JUAN FRANCISCO. Siempre me acuerdo de todos ustedes.

A la UNAM por permitir ser parte de ella. Siempre y orgullosamente diré ser "Universitario" (aunque no le vaya a los Pumas).

A todos los profesores que tuvieron que ver en mi desarrollo profesional por todas sus enseñanzas y consejos. Les agradezco en verdad.

Agradezco a la maestra ELIA GRANADOS por la confianza que depositó en mí, por los consejos y enseñanzas que me brindó; y lo más importante.....su amistad. Gracias maestra.

A la maestra SONIA RINCÓN y a toda la sección de Química Analítica (profesores y laboratoristas) por el apoyo brindado para la elaboración de esta Tesis.

A cada uno de los sinodales por las aportaciones brindadas para que este trabajo estuviera bien hecho.

Agradezco al Proyecto PAPIME con clave EN210403 y al responsable académico M en C JOSÉ DE JESÚS PÉREZ SAAVEDRA por el apoyo proporcionado en el uso del equipo de cómputo para la captura de información de esta tesis.

A mis compadres: VICTOR y FELIPE por la amistad que me han brindado, no crean que me olvidé de ustedes. Pronto se recuperarán.....

A mi buen amigo ARTURO (Gizmo); aunque seguimos diferentes caminos nuestra amistad ha perdurado. Sigamos así.....

A mis grandes amigos: ISAÍ y MARIO por su amistad y apoyo cuando más la necesitaba. Sé que también lo lograrán. ÉCHENLE GANAS.....

A mis amigos de la "OFICINA": SHAQ, MAGDA, MARTHA, BETO, LYS, SAÚL, PEDRO CARLOS, SILVIA (Chivis) y ERIKA, el ERAZ, GUILLERMO (Zorro), LUIS PARRA y ALEJANDRO (el Califas); a mis colegas DON JIMMY (Farma) y al buen DON MEMO (Biblioteca) por las atenciones prestadas; también al JORGITO, LUCHO, RICHARD, IVÁN, FER y KENA, MANGA, SILVERIO, COMPAGNI y MIRIAN, BETO, ARTURO (Fox) y a mi amigochá LAURA RODRÍGUEZ (aunque estés lejos me acuerdo de ti) y a todos los compañeros de la generación Q.F.B. 25 y a las demás generaciones que estuvieron conmigo. Gracias por compartir su amistad.....

Sin olvidarme también de mis amigas: TANIA, ZAIDA Y GUADALUPE (Q.F.B. 30) y de mi buen amigo ROBERTO (Q.F.B. 28) que aunque tuve poco tiempo de conocerlos me dio gusto compartir con ustedes los conocimientos que he adquirido. Van por buen camino, estoy seguro que también lo lograrán.....

A ti PRINCESITA por los momentos maravillosos que hemos pasado, por todo lo que venga y compartir conmigo esta etapa de mi vida. Te adoro.....

A todos los que creyeron y a los que no creyeron en mí..... Gracias.

"EL QUE PERSEVERA, ALCANZA", que sabias han sido para mí estas palabras. La gente que me conoce sabe a lo que me refiero. Recuérdalas siempre.....

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	Pág.
Índice General	1
Objetivos	3
Introducción	4
CAPÍTULO I. Generalidades	6
1.1 Definición de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución	7
1.2 Instrumental en HPLC	10
1.3 Parámetros relevantes en HPLC	13
1.4 Condiciones de análisis y elección de la muestra	14
1.5 Aplicaciones	16
1.5.1 Antioxidantes	16
1.5.2 Conservadores	16
1.6 Propiedades fisicoquímicas	18
CAPÍTULO II. Metodología experimental	20
2.1 Lista de material, equipo y reactivos	21
2.2 Desarrollo experimental	22
2.2.1 Selección, preparación y tratamiento de las muestras	23
2.2.2 Condiciones experimentales de trabajo	25
• Determinación de la longitud de onda	25
• pH de trabajo	26
• Temperatura	26
• Preparación de estándares (Curva de calibración)	27
2.2.3 Confiabilidad del Sistema	27
• Linealidad	27
• Reproducibilidad	29
• Sensibilidad	35
• Intervalos de confianza para la identificación de los analitos	36
CAPÍTULO III. Resultados	38
3.1 Resultados experimentales	39
3.2 Discusión de resultados	43
3.3 Comparación de Eficiencia	54

CAPÍTULO IV. Conclusiones	57
CAPÍTULO V. Anexos	59
• Anexo I Parámetros comúnmente utilizados en HPLC	60
• Anexo II Lista de disolventes utilizados en HPLC	61
• Anexo III Preparación de soluciones	63
• Anexo IV Valores de la t de Student	65
Índice de Tablas	66
Índice de figuras y gráficos	68
Abreviaturas	69
GLOSARIO	70
BIBLIOGRAFÍA	71

OBJETIVOS

Objetivo general

- Realizar la identificación, separación y cuantificación del Ácido ascórbico, Cafeína y Benzoato de sodio en productos comerciales por HPLC en fase reversa mediante la utilización Curvas de calibración con el fin de proponer una técnica de análisis químico que sirva de apoyo en las actividades que se realizan en las carreras de Química en el área instrumental con el fin de capacitar al estudiantado.

Objetivo académico

- Proporcionar una metodología mediante HPLC para la determinación de dichos compuestos contenidos en productos comerciales que sirva de apoyo en el área del control químico de éstos.

Objetivos específicos

- Determinar simultáneamente la cafeína, el ácido ascórbico (vit. C) y benzoato de sodio en productos comerciales mediante HPLC en fase reversa y cuantificar su contenido en los mismos.
- Establecer las condiciones experimentales de trabajo para llevar a cabo dichas determinaciones.
- Comparar y evaluar la eficiencia en la separación de los analitos usando dos tipos de columnas: CN y C₁₈ en fase reversa con el fin de verificar con cual de éstas la separación resulta ser más óptima.
- Elaborar un manual pequeño de prácticas por HPLC para utilizarlo en cursos de Análisis Instrumental y que sirva de apoyo en el área de Análisis Químicos.

INTRODUCCIÓN

La separación de compuestos con el propósito de identificar, cuantificar o purificar es uno de los aspectos desafiantes de la química analítica. Una gran variedad de métodos pueden ser usados para la identificación y la cuantificación de éstos, tales como la Espectroscopía, Fluorescencia, Espectrometría de masas, Cromatografía de gases, Infrarrojo, etc. De estos métodos, la Cromatografía de líquidos de Alta Resolución (CLAR) ha revolucionado el campo de la separación y cuantificación en cortos periodos de análisis ofreciendo eficiencia, confiabilidad, selectividad y sensibilidad en la separación de los componentes, la cual es considerada como una de las técnicas más poderosas de separación que existen en la actualidad.

Así, la cromatografía se puede definir como el método y la técnica usada para separar y analizar compuestos (analitos) contenidos en mezclas de sustancias químicas. La cromatografía líquida de alta eficacia ha adquirido en los últimos años un gran desarrollo como técnica de separación y análisis muy reproducible de aplicación prácticamente universal. Algunos ejemplos de éstos incluyen a los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, drogas, plaguicidas, antibióticos, fármacos, conservadores en alimentos y bebidas, etc.

En la literatura se reportan varios métodos oficiales para las determinaciones de los compuestos descritos anteriormente por CLAR. Sin embargo éstos métodos son complicados, ya que se requieren de varios pasos que consisten en ajuste de pH, extracciones, evaporación, disoluciones, condiciones de trabajo y lo costoso del material, equipo y reactivos para lograr exitosamente la cuantificación; los cuales resultan casi imposibles de realizar debido a las limitaciones con que cuenta la mayoría de los laboratorios de docencia en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FES-C1).

Por todo lo anterior se consideró importante proponer un método analítico que permita la cuantificación de compuestos (analitos) con rapidez y a bajo costo. Uno de éstos sería la determinación de conservadores y antioxidantes contenidos en alimentos y bebidas, tales como el ácido ascórbico, benzoato de sodio y cafeína. Hasta ahora no se había elaborado una metodología a nivel docencia en la Facultad de Estudios Superiores que impliquen la identificación y cuantificación de dichos compuestos por CLAR. De ahí el interés de desarrollar esta Tesis para su identificación y cuantificación. La elección de estos compuestos se debe a su uso común en la industria alimentaria, fácil manejo, estabilidad, no resultan ser tóxicos para el analista y lo económico de su obtención; además de encontrarse en una amplia gama de productos comerciales.

En el presente trabajo se realizará una cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con columnas C₁₈ y CN en fase reversa para determinar la concentración de cafeína, ácido ascórbico y benzoato de sodio en productos comerciales mediante "*Curvas de calibración*". El objetivo principal es proponer una técnica analítica que sea capaz de separar, identificar y cuantificar dichos productos por su uso común en la industria alimenticia, seleccionar cuál de las columnas resulta ser más eficiente para dicho fin, ó si las dos resultan ser igual de efectivas y verificar el contenido neto de tales compuestos en los productos seleccionados haciéndose uso del equipo, materiales, reactivos y tiempo horas/clase con los que cuenta los laboratorios de la sección de Química Analítica de la Facultad.

La primera parte de esta Tesis incluye conceptos generales para la comprensión del tema en estudio, la segunda parte comprende el desarrollo experimental, obtención de las condiciones de trabajo y confiabilidad del Sistema, y la tercera parte los resultados experimentales y su discusión, la eficiencia de las columnas y finalmente las conclusiones. Para esta Tesis no se consideran procedimientos de Validación, tratándose sólo de una metodología propuesta que muestra las condiciones experimentales para llevar a cabo la identificación y cuantificación de los compuestos mencionados, esto no excluye la necesidad propia de realizarla.

CAPÍTULO I

“GENERALIDADES”

1. 1 DEFINICIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

La cromatografía ⁽¹⁾ se puede definir simplemente como un método físico-químico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla (analito) entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria que se encuentra dentro de la columna y una fase móvil que es la que recorre toda la longitud de la columna. **En cromatografía líquida, tanto la fase móvil como el analito se encuentran en estado líquido;** de ahí el nombre de CLAR ó HPLC (las siglas HPLC se utilizarán de aquí en adelante); éstos fluyen a través de la columna que contiene en su interior a la fase fija o estacionaria, en la cual los componentes de la mezcla interactúan con la misma y posteriormente son retenidos selectivamente por la columna. Esta técnica es ideal para la separación de macromoléculas de interés biológico y de compuestos iónicos, la cual se puede utilizar para separar proteínas, aminoácidos, lípidos, ácidos nucleicos, etc. Otras aplicaciones en el ramo industrial son el análisis de pesticidas, aceites, polímeros, antioxidantes, análisis de agua, contaminantes, saborizantes, colorantes, etc. ⁽²⁾

La cromatografía líquida "clásica" se lleva a cabo en una columna generalmente de vidrio, la cual está rellena con la fase fija. Luego de sembrar la muestra en la parte superior, se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad. 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 los micrones, lo cual generó la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que fluya la fase móvil. Desde hace 80 años se conoce la cromatografía de líquidos, pero sólo a partir de 1967 los avances tecnológicos permitieron desarrollar un proceso cromatográfico para trabajar a altas presiones ⁽³⁾. De esta manera, nació la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que requiere de instrumental especial que permita trabajar a altas presiones para que se lleve a cabo la separación. Este proceso de ninguna manera sustituye a las demás cromatografías; especialmente la de gases por mencionar alguna, sólo es un complemento para el análisis de componentes que no toleran una fase móvil gaseosa ó temperaturas muy elevadas.

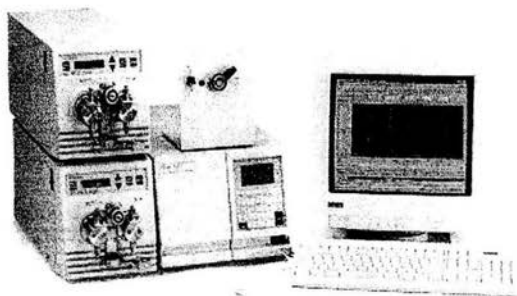


Fig. 1: Equipo de HPLC

La separación diferencial de CLAR ó HPLC es resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fase móvil y estacionaria. Dichos componentes se separan en la columna y al salir de ésta son conducidos por la fase móvil hasta un detector en el orden en que emergieron, registrándose los tiempos de retención característicos de cada compuesto así como sus respectivas concentraciones en cromatogramas, los cuales son representados por picos idealmente gaussianos ó simétricos en un tiempo de retención específico que se verán con más detalle más adelante.

Dependiendo del tipo de fase fija y del tipo de fenómeno físico que provoca la separación, la cromatografía líquida de alta resolución se puede dividir en varias clases:

1. **Cromatografía de adsorción:** se utiliza una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida o gaseosa, la cual hace referencia a la adhesión de moléculas de gases o líquidos a la superficie de sólidos porosos. El soluto puede adsorberse en la superficie de las partículas sólidas. El fenómeno de adsorción consiste en el que el soluto se pone en equilibrio entre la fase móvil y la superficie (sitios de adsorción) de la fase estacionaria debido a la unión de los átomos, iones o moléculas de un gas o de un líquido (adsorbato) a la superficie de un sólido o líquido (adsorbente).
La adsorción es un fenómeno de superficie; que a diferencia de la absorción ésta se da en una mezcla o interpenetración de dos sustancias. La cromatografía en columna utiliza una amplia gama de adsorbentes sólidos, incluidas la sílice, la alúmina y la sílice gelatinosa. También los líquidos pueden ser adsorbidos en estos sólidos y a su vez sirven como adsorbentes (un proceso denominado partición cromatográfica). El equilibrio entre el estado adsorbido y la solución es la causa de la separación de las moléculas de soluto.
2. **Cromatografía de reparto:** En casi todos los casos, como fase estacionaria se utilizan compuestos unidos químicamente a un soporte sólido de sílica. Se la subdivide en cromatografía en fase normal y fase reversa. En la cromatografía en fase normal, la fase fija es polar (como por ejemplo agua o trietilenglicol) y los compuestos menos polares eluyen primero. En la cromatografía en fase reversa, el compuesto unido químicamente es un hidrocarburo alifático y se emplean fases móviles polares. En este caso, las sustancias más polares eluyen primero.
3. **Cromatografía de intercambio iónico:** en este tipo de cromatografía aniones y cationes se unen covalentemente a la fase estacionaria sólida, comúnmente una *resina*. Los analitos son retenidos por atracciones electrostáticas por los grupos presentes en la resina (de carga opuesta). Se utilizan columnas rellenas con resinas de intercambio iónico para separar y determinar iones.

4. Cromatografía de exclusión molecular: La fase fija está formada por partículas poliméricas o de sílice que contienen una red uniforme de poros y llevan a cabo un fraccionamiento relacionado con el tamaño molecular. Las moléculas de tamaño mayor son excluidas y eluyen primero, mientras que las más pequeñas que penetran en los poros son retenidas más tiempo. Los poros son suficientemente pequeños para excluir las moléculas grandes de soluto, pero no las pequeñas.

5. Cromatografía por afinidad: el soluto en la fase móvil es atraído hacia grupos específicos (anticuerpos) unidos covalentemente e inmovilizados en la fase estacionaria.

En los últimos 15 años, el analista químico se ha visto apoyado por el gran desarrollo que han experimentado las llamadas Técnicas Instrumentales que han facilitado su trabajo y han aportado gran fiabilidad a los resultados. En la actualidad, los métodos de fase unida químicamente son los que predominan debido a las desventajas de los sistemas líquido-líquido, siendo la más importante la pérdida de fase estacionaria por disolución en la fase móvil, lo que hace necesario un recubrimiento periódico de las partículas del soporte. **En cromatografía de reparto** (que es la que se utilizará experimentalmente) los soportes para casi todos los rellenos de fases unidas químicamente se preparan con sílice rígida o composiciones constituidas básicamente por sílice. Estos sólidos están formados por partículas mecánicamente resistentes, porosas y uniformes. La superficie de la sílice, totalmente hidrolizada, está constituida por grupos silanol químicamente reactivos como se muestra en la siguiente figura:

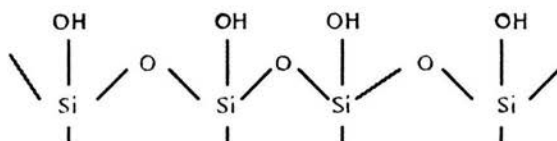
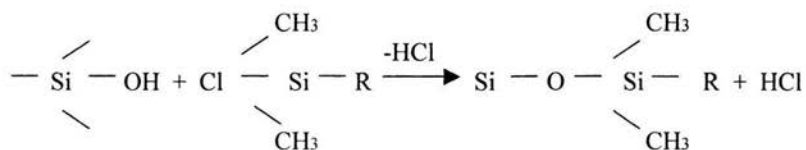


Fig. 2: Representación simplificada de los grupos silanol

Los recubrimientos de fase unida químicamente más utilizados son los *siloxanos*, que se forman por reacciones de la superficie hidrolizada (por calentamiento con HCl 0.1 M) con un *organoclorosilano*. Esto se ve representado en la siguiente figura:



donde R es un grupo alquilo o un grupo alquilo sustituido. Por lo general, el grupo R del siloxano en estos recubrimientos es una cadena C₈ (n-octilo) o una cadena C₁₈ (n-octadecilo).

Los rellenos de las columnas en la cromatografía de fase unida químicamente se clasifican en dos tipos: **en fase normal** se utiliza una fase estacionaria polar, por lo que la fase móvil debe ser no polar. Los empaques que se pueden utilizar en la fase normal son diol, sílica, amino entre otros. **En fase reversa** se necesita un empaque no polar y una fase móvil polar. Los empaques que comúnmente se utilizan para la fase reversa son ODS (C₁₈), octyl, dimetil, etc. Hoy en día la más usada es la fase reversa, debido a que anteriormente la fase estacionaria consistía en grupos polares donde se tenía que hacer uso de solventes orgánicos caros y tóxicos tales como hexano, cloroformo, etc., que además absorben en la región visible. Es por ello que se modificó la fase, invirtiéndose la propiedad de la molécula para hacerla menos polar. (4)

1. 2 INSTRUMENTAL EN HPLC

Un equipo para cromatografía líquida de alta resolución puede representarse por el siguiente esquema:

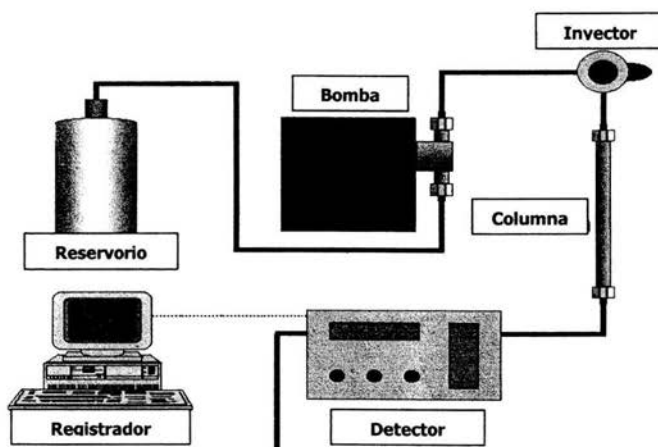


Fig. 3: Componentes principales en un equipo de HPLC



a) Fase móvil

La fase móvil es la fase que recorre toda la longitud de la columna disolviendo al analito para que pueda pasar por la fase fija o estacionaria. Debe ser un solvente o una mezcla de solventes con un grado alto de pureza, desionizado y filtrado previamente con poros de 0,22 – 0,45 μm para evitar que partículas e impurezas tapen y contaminen la columna. Cuando se trata de una mezcla, puede programarse la bomba (si es binaria) para que tome solventes de diferentes botellas en una proporción determinada y realice la mezcla en una cámara de mezclado.

Si durante toda la separación se utiliza siempre el mismo solvente sin cambiar su composición se denomina **isocrática**, sin embargo es normal realizar un **gradiente** ó cambio de composición el cual proporciona diferentes cantidades ó volúmenes del solvente a lo largo de la cromatografía para mejorar la eficiencia y acortar la duración del proceso. Estos gradientes de solvente también son realizados en forma automática por las bombas.

b) Bomba

Es el sistema que permite impulsar la fase móvil a través de la columna o fase estacionaria. Las bombas que se emplean en este tipo de aparatos pueden realizar dos tipos de elusión: **isocrática** en la cual el volumen de la fase móvil se mantiene constante, y en **gradiente** que proporciona diferentes cantidades o volúmenes de solvente. Estas bombas utilizan presiones muy altas que van de 0 a 6,000 psi con velocidades de flujo de 0.1 a 10 mL/min, la cual es regulada por un detector de presión colocada en la bomba.

c) Inyector

Este puede ser de tres tipos:

- Inyector de loop fijo, en el cual el volumen del flujo de la muestra se programa de forma constante.
- Inyector de loop variable, el cual puede inyectar diferentes cantidades de muestra.
- Inyector automatizado, en el que la muestra se coloca dentro de un vial y el aparato toma automáticamente lo que se requiere.

La muestra es inyectada por una microjeringa y el volumen inyectado va de 10-20 μL para que la resolución de los picos sea buena y la separación sea más rápida.

d) Columna

Es la parte más importante del sistema, la columna es la fase fija o estacionaria donde se va a llevar a cabo la separación de los analitos. Estas pueden tener en su interior sílica, alúmina o C_{18} . Las columnas son tubos largos de acero inoxidable las cuales tienen un tamaño variable que va de 2 a 30 cm con diámetros de 2 a 9 mm. En la columna se realiza la interacción soluto-disolvente lo cual permite la separación de los componentes de la muestra.

e) Detector

Los tipos detectores más empleados en HPLC son:

- de Fluorescencia
- Espectrofotométricos (Ultravioleta, visible e infrarrojo)
- de Índice de refracción (también conocido como detector universal)
- Electroquímicos

El detector está compuesto por una microcelda de cuarzo en forma de "Z" la cual se considera la pieza más importante y cara de todo el equipo. El tipo UV-visible es el detector más utilizado en HPLC debido a que la mayoría de los compuestos tienen cuando menos una absorbancia en las regiones del UV ó visible. Su fundamento se basa en la ley de Lambert y Beer, la cual relaciona la absorbancia del soluto con su concentración mediante la siguiente fórmula: (5)

$$A = \xi bc \quad \text{donde:}$$

A = absorbancia
 ξ = absorptividad molar
c = concentración
b = la trayectoria recorrida

f) Integrador - Registrador

Es la parte del equipo que permite interpretar la señal mostrando no sólo el cromatograma obtenido, sino los tiempos de retención, las áreas y porcentajes de los componentes contenidos en el analito. Idealmente, se trata de picos gaussianos y cada pico corresponde a un componente de la muestra original. El tiempo de retención se mide desde el momento de la inyección de la muestra hasta que aparece el pico máximo en el cromatograma tal y como se muestra en la siguiente figura:

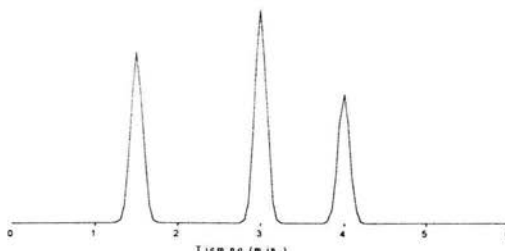


Fig. 4: Cromatograma

El integrador calcula además el área correspondiente a cada pico, la cual es proporcional a la cantidad de sustancia. Dado que los detectores de HPLC son no destructivos, ya que es posible recuperar los productos que salen de él. De esta manera, dependiendo del tamaño del *loop* de inyección, de la columna y del tipo de bomba es posible realizar separaciones analíticas obteniendo cromatogramas. (6)

1. 3 PARÁMETROS RELEVANTES EN HPLC

Los parámetros teóricos que caracterizan las separaciones cromatográficas por HPLC son parecidos con la cromatografía de gases. El éxito de la separación depende de las condiciones de separación, tales como: tipo y longitud de columna, proporción y tipo de fase móvil, velocidad de flujo de la fase móvil, etc. Además hay parámetros que hay que considerar para que se lleve a cabo una buena separación como son los números de platos teóricos (**N**) que varían con los cambios de longitud de columna y por la velocidad de flujo de la fase móvil; el factor de capacidad (**k'**) que se modifica por los cambios en la fuerza de elusión de la fase móvil, proporción de compuesto orgánico y agua; grado de separación (α) que depende de la afinidad del soluto respecto a la fase móvil y estacionaria, se varía modificando la composición de la fase móvil y orgánica; y la **Rs** (resolución) que nos dice si hubo separación de los compuestos. (7)

Los parámetros comúnmente utilizados en HPLC son:

- **Rs**= Resolución; indica cuán separados están los componentes contenidos en una mezcla.
- **N**= Determinación del número de platos teóricos, los cuales indican la capacidad (eficiencia) de una columna para separar.
- **k'** = Factor de capacidad, el cual indica cuánto interactúa la muestra con ambas fases, móvil y estacionaria. A valores altos de **k'** hay una mejor separación.
- **t**= Factor de coe, indica la simetría del pico en el cromatograma.
- **t_R**= El tiempo de Retención permite identificar el compuesto (analito), ya que cada compuesto tiene un **t_R** característico. Este parámetro se mide en minutos y depende del flujo con que se trabaja. La velocidad de flujo que más se utiliza es de 0.5 a 2.0 mL/min a una presión de 4 000 psi; no deben emplearse presiones mayores a 6 000 psi con el fin de evitar que se dañe el equipo. También depende de la fase móvil que se utilice. Para facilitar que el tiempo de Retención sea menor se puede modificar el diámetro ó longitud de la columna.

En general, cuando alguno de estos parámetros no se cumple, el sistema no está optimizado. (8)

En HPLC, en lugar de variar la temperatura de la columna para mejorar la resolución del cromatograma, se cambia la composición de la fase móvil a lo largo de la separación utilizando mezclas de entre dos y cuatro solventes. De hecho, presenta las siguientes ventajas frente a la cromatografía de gases:

- Tiene una difusión mínima en la fase móvil, debido a la rapidez del análisis.
- No tiene efectos negativos por calor, ya que no depende de la volatilidad ó estabilidad térmica de los componentes.
- La muestra no se destruye, por lo que se puede recuperar para su uso posterior.
- Permite cambiar la fase móvil desde la composición del líquido.

1. 4 CONDICIONES DE ANÁLISIS Y ELECCIÓN DE LA MUESTRA

En lo que respecta a la optimización de las condiciones experimentales es posible realizar ensayos preliminares utilizando cromatografía en capa delgada con la misma fase fija que contiene la columna. Por otra parte es necesario tener en cuenta que dado que se utilizan altas presiones, es imprescindible evitar la presencia de partículas que puedan obstruir los caños y la formación de burbujas que puedan deteriorar el relleno de las columnas y que produzcan inestabilidad en la señal del detector.

Para evitar las obstrucciones, los solventes y las muestras a inyectar se filtran con membranas de 0,45 a 0,22 μm . Para evitar la formación de burbujas, los equipos de HPLC cuentan con desgasadores de solvente por vacío o por burbujeo con He y, en el caso de no contar con los mismos, se deben desgasificar los solventes por medio de ultrasonido o agitación bajo vacío antes de utilizarlos como fase móvil. La muestra se debe someter a diferentes pruebas de estabilidad como son la degradación, pH alto o bajo, altas temperaturas, etc. Si el producto está degradado o caduco no puede detectarse por este método. (9)

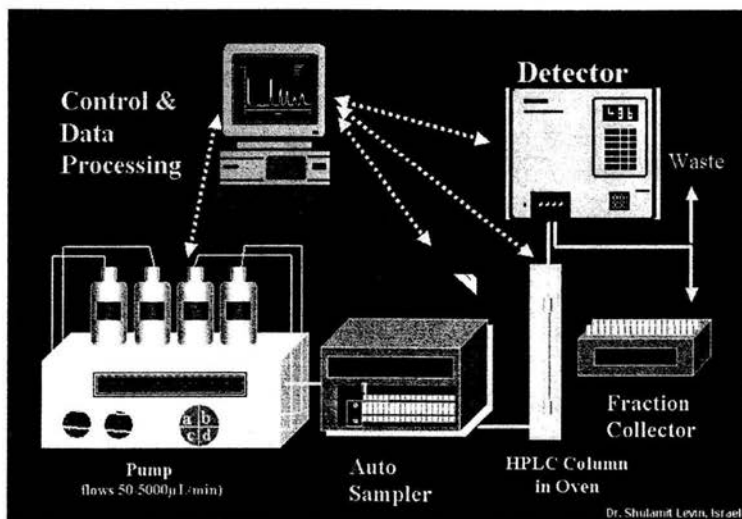


Fig. 5: Pasos a seguir en un análisis por HPLC

Para la cuantificación de sustancias se puede hacer uso de varios métodos analíticos. Uno de estos métodos utilizados en química analítica especialmente en HPLC es la **Curva de calibración**, que es una gráfica que representa el valor de alguna propiedad en función de la concentración ó volumen del analito. La cual implica el uso de instrumentos ópticos y/o electrónicos para las mediciones, no del constituyente como tal; sino de alguna propiedad (absorbancia, fluorescencia, área de pico, etc.) dada por un stock de la misma naturaleza del analito (estándar) para determinar en un intervalo de concentración en el que se supone se halla la concentración del analito en la muestra que es lineal y proporcional para cada disolución del estándar y la muestra. Aunque no se hará uso de las demás Curvas, no está de más mencionarlas:



Tabla 1.1: Comparación de las tres principales Curvas para la cuantificación de analitos utilizadas en Química Instrumental

Curva de calibración	Curva de adiciones patrón	Curva de valoración
Se tiene sólo una solución problema (analito) y no está mezclado con los estándares. El STD es de la misma naturaleza al analito	El problema está en cada uno de los sistemas (mezcla de STD + analito). También el STD es de la misma naturaleza al analito	Se va agregando cierto volumen de STD que es de diferente naturaleza (composición) al analito. Ej. STD MnO ₄ ⁻ + Glucosa
La gráfica es P vs [STD]	La gráfica es P vs [STD]	La gráfica es P vs mL valorante
La gráfica parte de b=0 (siempre y cuando sea directa)	La gráfica no parte de 0 (b≠0); ya hay una respuesta al inicio.	La curva (a diferencia de las demás) no sigue un comportamiento lineal ya que sufre cambios de pendiente en el Vpeq.
La concentración del analito se determina "interpolando" en la gráfica	La concentración del analito se determina "extrapolando" en la gráfica	La concentración del analito se determina por cálculos y relaciones estequiométricas entre STD y analito
Se utiliza cuando la matriz de analito es sencilla (no está mezclado con demasiadas sustancias que interfieran en su cuantificación)	La matriz de analito es compleja (muestras biológicas, suelo, aguas residuales, sangre, etc.)	Generalmente se cuantifica metales que formen complejos coloridos con el titulante que se use. Ej: EDTA + Cu ²⁺

Una aplicación característica de HPLC es la determinación de aditivos en bebidas refrescantes, usando una columna rellena con fase unida químicamente polar (ciano). Se obtiene la identificación de cuatro picos correspondientes a: vitamina C, sacarina, cafeína y benzoato de sodio.

Identificación de picos
 1. Vitamina C
 2. Sacarina
 3. Cafeína
 4. Benzoato sódico

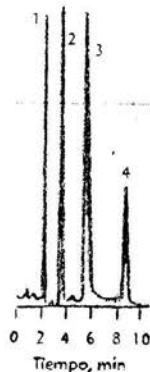


Fig. 6: Aplicaciones típicas de cromatografía de fase enlazada. Aditivos de refresco - Columna empaquetada con una fase enlazada polar (ciano). Elución isocrática: 6% HOAc / 94% H₂O. Caudal: 1.0 mL/min. Fuente SKOOG, HOLLER. *Principios de Análisis Instrumental*. 2001, pp. 717. (5)

La AOAC (Association of Official Analytical Chemistry) propone un método de HPLC en fase reversa con una columna Lichrosorb RP 18 de 10 micras, utilizando como fase móvil un gradiente que comienza con agua: ácido Acético 95:5 y termina al cabo de los 10 minutos con acetonitrilo / ácido acético 95:5, con detector de UV-Vis a 270 nm. (8,13). El ácido acético se añade con el fin de evitar las colas en los antioxidantes más polares.

1.5 APLICACIONES

1.5.1 ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son sustancias que se emplean fundamentalmente para reducir o prevenir la oxidación de los lípidos que forman parte del contenido de los alimentos (9), pueden ser de origen natural ó sintético, los cuales pueden añadirse combinados o individualmente, como es el caso de los tocoferoles y el ácido ascórbico, siendo este último el más utilizado en la industria alimenticia. El uso frecuente de los antioxidantes está regulado como consecuencia de su posible toxicidad (Ver Tabla 1.2) siendo necesaria su cuantificación en los alimentos en los que se haya establecido un límite para prevenir lo anterior.

Todos los antioxidantes son compuestos que reaccionan fácilmente con el oxígeno, por lo que actúan como "neutralizadores" del mismo. El ácido ascórbico se emplea para proteger a los compuestos sensibles a la oxidación, siendo los compuestos aromáticos de tipo lipídico los más vulnerables. Un claro ejemplo sería el refresco y los preparados en polvos para elaborar bebidas de sabor. La oxidación puede iniciarse como consecuencia de la incorporación del aire durante la formación, elaboración y envasado del producto. La protección del producto se logra mediante el uso del antioxidante que se añade antes de elaborar el producto.

1.5.2 CONSERVADORES

Los conservadores, como su nombre lo dice, son sustancias que se agregan a los alimentos encargadas de conservar, mantener y prolongar el tiempo de consumo del producto de agentes (polvo, luz, mohos y bacterias) que pudieran alterar el contenido original del mismo. Hoy en día es muy común la utilización de los conservadores de la industria alimentaria. Los conservadores que se emplean comúnmente son los sulfitos, el ácido acético y benzoico, benzoato de sodio y los parabenos; así como sus respectivos derivados. (9)

El agua es el componente que se encuentra en mayor proporción en los alimentos que se elaboran (60-90%). El agua que se emplea en su elaboración tiene una repercusión directa sobre la calidad de los mismos, permitiendo el crecimiento de un limitado número de microorganismos. Es por ello que se requiere el uso de un conservador para prevenir la aparición de éstos que pudieran alterar la integridad

física del producto (olor, color, sabor y apariencia) en periodos prolongados de almacenamiento. El benzoato de sodio, a diferencia de los demás conservadores tiene una actividad máxima a pH inferiores a 3, es eficaz frente a un gran número de MO (*Saccharomyces*, *Bacillus*, etc.), no forma precipitados ni sedimentos, además de que casi no altera el sabor del producto. (9)

Otro compuesto que se consume comúnmente es la cafeína, que es un estimulante del SNC. Se ha demostrado que la cafeína posee una actividad bactericida frente a diversos MO (*Staphylococcus aureus*). Se encuentra en las plantas de distintas familias, principalmente en las hojas de té negro, del mate y de la planta *Coffea ssp*. Las personas que ingieren cafeína ya sea en café, té o bebidas comerciales (refrescos) experimentan menos somnolencia, menos fatiga, retrasa la aparición del sueño y piensan con mayor rapidez y claridad. La cafeína se absorbe bien por vía oral, se distribuye en todos los compartimentos corporales (Líquido cefalorraquídeo), se liga fácilmente a las proteínas plasmáticas por ser liposoluble, la cual posteriormente es eliminada en la orina. (10)

En cuanto al análisis cuantitativo de estos compuestos, su principal problema se suele plantear en la etapa de extracción, ya que generalmente se encuentran a bajas concentraciones, además de las sucesivas etapas de limpieza y tratamiento que se realizan antes de ser determinados por una u otra técnica. Sin embargo, una técnica ya clásica para la determinación de éstos es la Cromatografía de Líquido de Alta Resolución (HPLC), resultando más eficaz que la Espectrofotometría, ésta no sólo permite establecer el contenido total de los mismos, sino de resolver y cuantificar en un solo cromatograma la mayor parte de los compuestos sintéticos contenidos en el producto, mezcla, sustancia o analito en cuestión mediante la utilización de un gradiente de elusión. La fase más utilizada es la Fase Reversa (ya explicada con anterioridad) con columnas del tipo C₈ y C₁₈.

Tabla 1.2: Propiedades de ácido ascórbico, benzoato de sodio y cafeína utilizados en la industria alimenticia.

Conservador	Propiedades y limitaciones
Acido benzoico/ benzoato de sodio	Normalmente se emplea la sal sódica debido a que resulta ser más soluble en agua. Máxima actividad a pH inferiores a 3. Eficaz frente a un amplio rango de MO. Sinérgico con el SO ₂ .
Cafeína	Limitaciones: el ácido libre puede precipitar si no se mezcla bien. Todos los conservantes pueden producir alergias y malestares estomacales. Puede tener propiedades como conservador (bactericidas). Es un relajante muscular, estimula el SNC avivando la actividad mental y el rendimiento físico, retrasando el sueño y la fatiga. (2) Limitaciones: su solubilidad disminuye al bajar la temperatura. Se asocia con la hiperactividad de los niños por el consumo de refrescos que la contienen. En altas concentraciones se puede presentar taquicardia.
Antioxidante	Propiedades y limitaciones
Acido ascórbico	Posee un importante poder antioxidante, ayuda a evitar la oxidación de compuestos lipídicos ya que frena la capacidad catalítica del hierro y del cobre en las oxidaciones. Conserva el aroma de zumos de frutas. También puede utilizarse como conservador en algunos productos (refrescos). Limitaciones: puede desestabilizar algunos colorantes. Se descompone fácilmente si se somete a un tratamiento térmico. (12.)

1.6 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

Cafeína

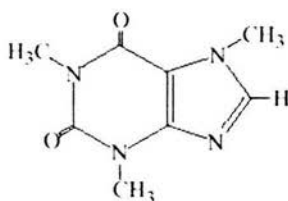


Fig. 7: Estructura química - $C_8H_{10}N_4O_2 \cdot H_2O$

Propiedades: pKa: 9.64 - Alcaloide cristalino blanco en forma de masas algodonosas o hebras largas sedosas y flexibles; pierde agua a 80 °C; efloresce al aire; p.f. 236.8 °C. Es soluble en cloroformo y ligeramente soluble en agua y alcohol, muy poco soluble en éter. Inodora y de sabor amargo.

Obtención: por extracción del café, té, guaraná o la nuez de cola; también se obtiene sintéticamente. La mayoría de la cafeína del comercio es un subproducto de la fabricación del café descafeinado.

Método de purificación: recristalización.

Calidades: técnica; USP; FCC.

Peligros: un gramo o más es tóxico, se ha encontrado que 200 µg/mL inhiben la actividad de la DNA polimerasa. Al usarse en bebidas no debe superar el 0.02% de contenido total.

Usos: bebidas, medicina.

Ácido ascórbico

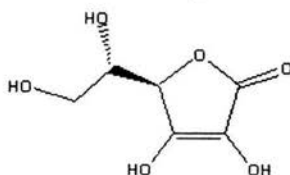


Fig. 8: Estructura química – $C_6H_8O_6$

Propiedades: pKa's = 4.1; 11.79 - Cristales blancos en forma de placas de agujas; p.f. 192 °C, soluble en agua y ligeramente soluble en alcohol, insoluble en éter, cloroformo, benceno, aceites y grasas. Estable al aire cuando está seco.

Fuentes: se le encuentra en frutos agrios, tomates, papas y verduras de hojas verdes. Fuente comercial: producto sintético elaborado mediante fermentación del sorbitol.

Equivalencia: una unidad internacional equivale a 0.05 mg de ácido L-ascórbico.

Calidades: USP; FCC.

Usos: nutrición, fijación del color, aromatizante y preservativo para carnes y otros alimentos, oxidante para la pasta del pan, agente reductor en química analítica. Debe estar presente en la dieta para evitar el escorbuto.

Ácido benzoico/Benzoato de sodio

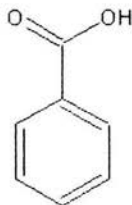


Fig. 9: Estructura química— C₆H₅COOH

Propiedades: pKa = 4.2 - Escamas blancas o agujas de cristal con olor a benzoína; δ 1.2659 g/mL; p.f. 121.25 °C; p.e. 249.2 °C; sublima parcialmente a 100 °C; ligeramente volátil; soluble en alcohol, éter, cloroformo, benceno, tetracloruro de carbono; ligeramente soluble en agua.

Obtención: a) descarboxilación del ácido ftálico mediante vapor en presencia de catalizador; b) cloración del tolueno e hidrolizado a ácido benzoico; c) oxidación del tolueno.

Método de purificación: sublimación.

Calidades: técnica: QP, USP, FCC.

Peligros: moderadamente tóxico por ingestión. Su uso es restringido a 0.1% en alimentos.

Usos: benzoatos de sodio como conservador de alimentos; plastificante, resinas alquídicas, sazón del tabaco, aromas, perfumes, STD en química analítica y como agente antifúngico.

CAPÍTULO II

*“METODOLOGÍA
EXPERIMENTAL”*

2.1 LISTA DE MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS

- Equipo HPLC marca PERKIN-ELMER modelo 250 compuesto por una bomba binaria modelo Spectra System P2000, una válvula inyectora Rhydne provista de un *loop* de inyección de 20 μL , un detector de absorción UV-visible de longitud de onda variable modelo LC 290 de la misma marca y un integrador registrador modelo 3396 HEWLETT PACKARD.
- Balanza analítica Mettler H72.
- Sistema purificador de agua Millipore. (10 M Ω Cm)
- Ultrasonido Branson Mod. 2210.
- Jeringa Halminton con capacidad de 20 μL .
- pH metro Mettler Mod. MP 230
- Columna analítica marca Nucleosil C18 de 5 μm (fase reversa unida químicamente formada por cadenas de hidrocarburo lineal de 18 átomos de carbono) de 250 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno.
- Columna analítica marca Hibar CN RT 250-4 de 5 μm de 250 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno.
- Filtro poro 0.44 μm . Sartorius
- 1 parrilla con agitador. Corning Mod. PC-353
- 3 vasos de precipitados de 200 mL. Kimax
- 1 probeta de 100 mL. P.K. México
- 1 embudo de vidrio. Kimax
- 1 matraz aforado de 100 mL. Pyrex
- 5 matraces aforados de 50 mL. Pyrex
- Pipetas volumétricas de 1,2,3,4,5 y 10 mL. Pyrex
- 1 mortero con pistilo

REACTIVOS

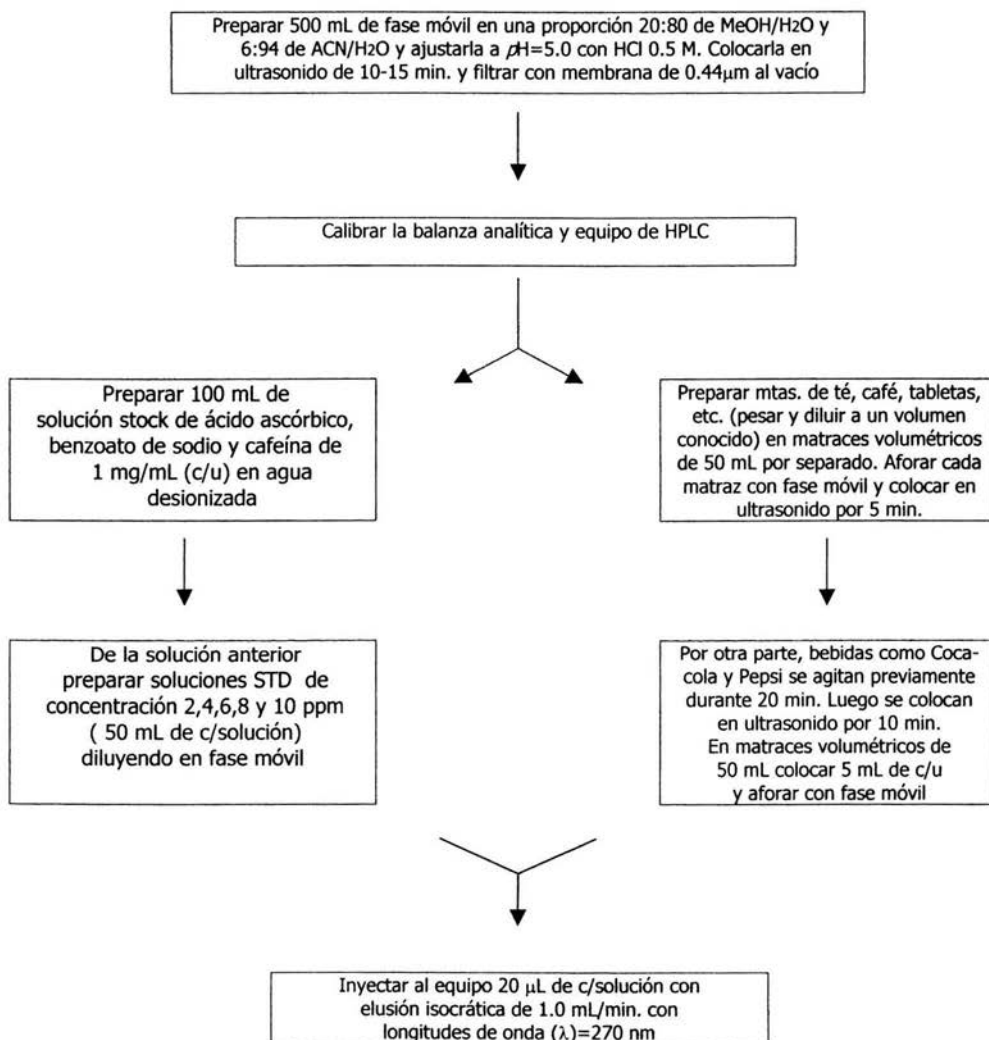
- L (+) ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) al 99.7 %. Merck - Lote 25001798
- Cafeína ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$) al 99.0 %. Aldrich Chemical - Lote 11020 KX
- Benzoato de sodio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{COONa}$) al 99.2 %. Nutrer – Lote 0106896
- Alcohol metílico (CH_3OH) 99.98 % de ensayo. Mallinckrodt ChroARHPLC
- Acetonitrilo (CH_3CN) 99.97 % de ensayo. Mallinckrodt ChroARHPLC
- Ácido clorhídrico (HCl) concentrado, 37.7% de ensayo. Reac. y Productos finos, S.A. de C.V.
- Agua desionizada con calidad 10 M Ω Cm. Millipore
- Solución buffer de fosfatos de pH 4.0 y 7.0 para ajustar el pH metro
- Muestras comerciales que contengan uno o varios de los analitos mencionados. Ej.: gaseosas de cola (Coca-cola; Pepsi; KAS; Power Punch), Cafiaspirina, Nescafé, Decaf, Jumex, Fresquibón, Té Lagg's, aceitunas Lol-Tun y Vitamina C en tabletas. Las gaseosas y aceitunas tienen benzoato de sodio como conservador.

2. 2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

Cuando se desarrolla una técnica analítica por HPLC normalmente se elige en primer lugar una fase fija (estacionaria) adecuada y una fase móvil con una composición tal que sea compatible con la fase fija, que disuelva los componentes a analizar y que permita una buena separación (*Ver Tabla 5.1*). Luego se optimizan las condiciones de flujo de solvente, cantidad de muestra a inyectar y, en el caso de un detector de absorción como el que se empleará en este caso (*UV-visible*), se determinará la/s longitud/es de onda de detección, de las cuales se habla más adelante.

Para el análisis de las muestras y estándares de ácido ascórbico, cafeína y benzoato de sodio se utilizará para su detección una columna de fase reversa C₁₈ y otra de CN, tal y como se describe en el siguiente diagrama:

DIAGRAMA DE FLUJO



2.2.1 SELECCIÓN, PREPARACIÓN Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras que a continuación se describen se eligen por su uso común, estabilidad y lo económico que resulta obtenerlas, las cuales contienen a los compuestos (analitos) en cantidad suficiente que son del interés para la investigación.

- **Acido ascórbico (Vit. C):**

- 1) Té de limón: marca Té Lagg´ s; caja de 25 sobres. - Lote #889754
- 2) Gaseosas
 - Pepsi: botella de 600 mL. - Lote # 755023-4
 - Coca-cola: botella de 600 mL. - Lote # 8896521
- 3) Tabletas: frasco de 30 tabletas de Vit. C con Rose Hips del Dr Simi.
Vitamina C 100 mg
Rose Hips 50 mg
Excipiente cbp 1 tableta - Lote # MA03055.
- 4) Fresquibón: sobre de 5 g sabor fresa. (30 mg de Vit. C) - Lote # L-12256
- 5) Jumex: envase Tetrapack de 200 mL sabor manzana. (55% de Vit. C) - Lote # 7501/ 0928

- **Benzoato de sodio:**

- 1) Gaseosas
 - Pepsi: botella de 600 mL
 - Coca-cola: botella de 600 mL
- 2) Aceitunas en salmuera: marca Lol-Tun; frasco de 250 mL.
Benzoato de sodio 0.1 %
Masa drenada 150 g – Lote # C-7 50 3001

- **Cafeína:**

- 1) Gaseosas
 - Pepsi: botella de 600 mL
 - Coca-cola: botella de 600 mL
- 2) Café: Nescafé Decaf; frasco de 200 g. - Lote # L-8200 / 36
- 3) Café Legal: sobre de 30 g. - Lote # 45 - 879
- 4) Té de limón: marca Té Lagg´ s; caja de 25 sobres. – Lote # 889754
- 5) Cafiaspirina: de BAYER, caja con 40 tabletas.
Acido acetilsalicílico 500 mg
Cafeína 30 mg
Excipiente cbp 1 tableta – Lote # 3FO9C2 / 09JN05

PREPARACIÓN Y TRATAMIENTO

Aquí se describe los pesos y el tratamiento que se le da a las muestras en la fase experimental para llevar a cabo la cuantificación e identificación.

- **Té Lagg's:** se tomaron de 1 a 2 sobres de té de limón con un peso aprox. de 1.320 g c/u y se colocaron en 50 mL de agua desionizada en un vaso de precipitados y se lleva a infusión a 80 °C en una parrilla durante 15 min. Posteriormente se deja enfriar y se lleva a un aforo de 100 mL con agua desionizada. Se filtró y se tomó de esta solución una alícuota de 10 mL y luego se lleva a un aforo de 50 mL con fase móvil. Posteriormente se colocó en ultrasonido por 5 min.

- **Gaseosas:** (Pepsi y Coca-cola): estas bebidas deben ser descarbonatadas previamente. Para ello se agitaron fuertemente durante 15-20 min y fueron colocadas en ultrasonido por 10 min. Posteriormente se filtró aprox. 50 mL del producto y se colocó en un vaso de precipitados, luego se tomó una alícuota de 5 mL y se llevó a un aforo con 50 mL de fase móvil.

- **Fresquibón:** se pesaron 100 mg del polvo el cual fue disuelto con H₂O desionizada y posteriormente fue llevado a un aforo de 100 mL. Se filtró dicha solución y se tomó de ésta una alícuota de 5 mL y se aforó con 50 mL de fase móvil.

- **Jumex:** del envase de Jumex se vació aprox. 50 mL y se filtró el producto. Luego se tomó una alícuota de 5 mL llevándose a un aforo con 50 mL de fase móvil.

- **Aceitunas:** del frasco que contiene el producto se vació aprox. 50 mL del producto. Se filtra la solución y se tomó una alícuota de 2 mL y posteriormente se aforo con 100 mL de fase móvil.

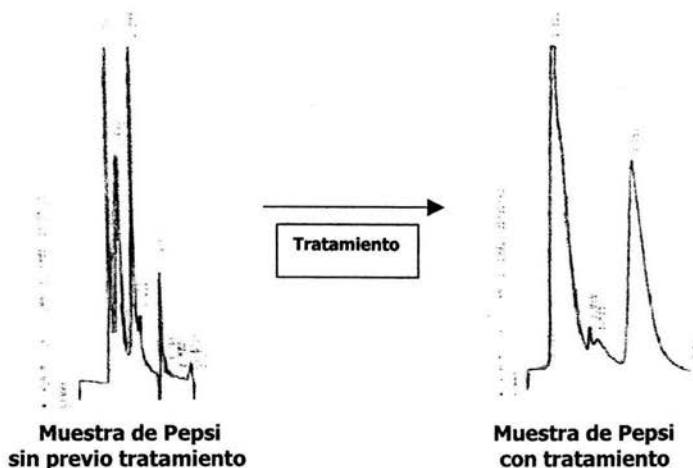
- **Tabletas (Vit. C):** se pesaron 5 tabletas y se obtuvo su peso promedio, luego en un mortero se molieron hasta obtener un polvo fino y se pesaron 100 mg del mismo en un vaso de precipitados. Se disolvió con agua desionizada y se aforó a 100 mL. Se filtró la solución y se tomó una alícuota de 5 mL la cual se afora con 50 mL de fase móvil.

- **Nescafé Decaf y Café Legal:** se pesaron 200 mg de c/café los cuales se disolvieron en 50 mL de H₂O desionizada y se calentó en una parrilla por 10 min. Esta solución se deja reposar hasta enfriarse para luego llevarse a un aforo de 100 mL. Se filtra la solución y se tomó una alícuota de 5 mL y ésta misma se aforó en un matraz de 50 mL con la fase móvil. Posteriormente se coloca en ultrasonido por 5 min.

- **Cafiaspirina:** se pesaron 5 tabletas y se obtuvo su peso promedio, luego en un mortero se molieron hasta obtener un polvo fino y se pesaron 100 mg del mismo en un vaso de precipitados. Se disolvió con agua desionizada y se aforó a 100 mL. Se filtró la solución y se tomó una alícuota de 5 mL la cual se afora con 50 mL de fase móvil.

2.2.2 CONDICIONES EXPERIMENTALES DE TRABAJO

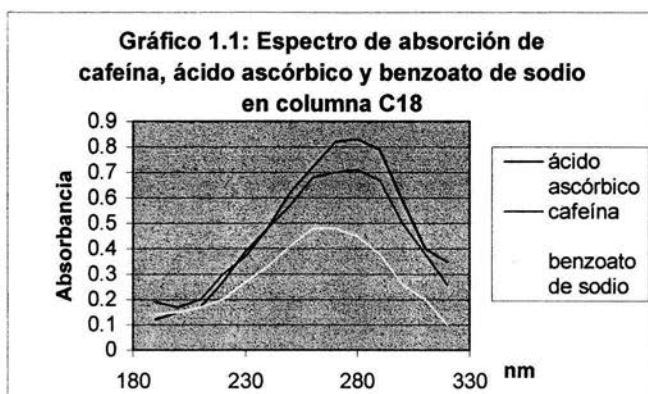
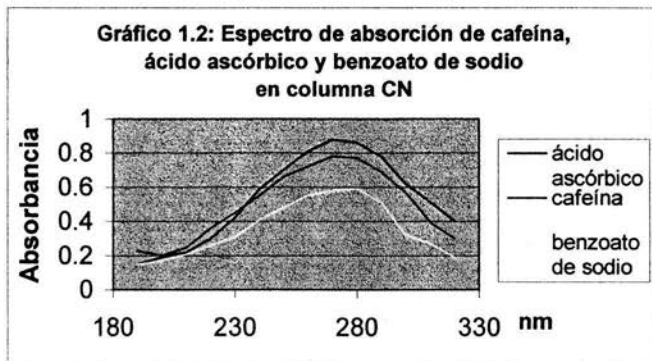
En primer lugar es primordial elegir la longitud de onda (λ) para desarrollar una técnica analítica espectrofotométrica en la cual se va a realizar las mediciones de las concentraciones tanto de los estándares como de las muestras comerciales (analitos), y tener bien establecidas las condiciones para llevar a cabo la experimentación como son: las concentraciones del STD y analito a utilizar, pH de trabajo, temperatura de experimentación, proporción de fase móvil, velocidad de flujo, etc. (7,21) Para de esta manera poder separar, identificar y cuantificar eficazmente los compuestos contenidos dentro de los productos obteniendo cromatogramas (picos) lo más gaussianos y simétricos posibles. En los siguientes cromatogramas damos un ejemplo a lo que se quiere llegar:



A continuación se presenta una breve explicación de las condiciones generales a las cuales fueron sometidos tanto los estándares como el de las muestras (analitos) que permitieron su lectura en el equipo.

- **Determinación de la longitud de onda de trabajo (λ)**

Para obtenerla primero se corrió la fase móvil para cerciorarse que no diera lectura y se calibra con ésta el detector; luego se inyectaron al equipo los estándares de los compuestos a analizar (ácido ascórbico, benzoato y cafeína) en una concentración de 20 ppm c/u. Se tomaron lecturas en cada columna a diferentes longitudes de onda comprendidas dentro del rango del *UV-visible* con un intervalo de 190 a 320 nm utilizando fase móvil de MeOH/H₂O para la columna C18; y una mezcla de ACN/H₂O en la columna CN ambas a pH= 5.0, las cuales se ven visualizadas en los siguientes gráficos:



Por los resultados obtenidos los tres compuestos presentan mayor absorbancia (sensibilidad) a longitudes de 260-280 nm en ambas columnas (*C18* y *CN*), por lo que la longitud de onda de trabajo óptima para realizar dicha experimentación es $\lambda = 270 \text{ nm}$.

- ***pH de trabajo***

Se sabe de antemano que las columnas cromatográficas no deben de trabajar a pH alcalinos ($\text{pH} > 7.0$) debido a que éstas se degradan en su interior (empaquete) y ya no separaría eficazmente a los analitos. Es por eso que se hace uso de agua desionizada ($\text{pH} \approx 5.5 - 5.8$) en la preparación de la fase móvil. El pH que se elige para la experimentación es de **$\text{pH} = 5.0$** , ya que los compuestos que se van a analizar no se ven alterados en su estructura química a dicho pH (en base a su pKa); además que no se altera, modifica o degrada su contenido en las muestras comerciales (alimentos, bebidas, etc.) (12)

- ***Temperatura***

Según la bibliografía, dichos compuestos no se ven alterados a temperatura ambiente (**25°C**) por lo que resultan ser muy estables y no necesitan de condiciones especiales de trabajo. (de 2 a 3 horas aprox.) Sólo el ácido ascórbico resulta ser inestable a la luz por la oxidación que sufre dicho compuesto, por lo que debe protegerse de ella y guardarse en recipientes bien cerrados. La velocidad de flujo y proporción de la fase móvil para ambas columnas se resumen en la siguiente Tabla:

Tabla 2.1: Condiciones experimentales de trabajo

Condiciones	Valor
pH	5.0
λ	270 nm
Velocidad de flujo	1.0 mL/min
Fase móvil	20:80 MeOH/H ₂ O – C ₁₈ 6:94 ACN/H ₂ O – CN
Temperatura	Ambiente (25 °C)
Datos del integrador	ZERO: 0.5 ATT: 4-6 CHTSP: 0.6-1.0 AR REJ: 10 000 PKWD: 0.2 THRS: 2.0

- **Preparación de los estándares (Curva de calibración)**

Una vez establecidas las condiciones óptimas de trabajo se procedió a elaborar las curvas de calibración por triplicado para cada columna.

Se prepararon soluciones stock's de ácido ascórbico, benzoato de sodio y cafeína en una proporción de 2,4,6,8 y 10 ppm las cuales se prepararon de la siguiente manera: Una vez calibrada la balanza analítica se pesaron aprox. 100 mg considerando la pureza de c/u de los respectivos estándares y se disolvieron con H₂O desionizada para posteriormente aforarlos en un matraz de 100 mL. De ésta solución se tomó una alícuota de 10 mL y se aforó con 100 mL de agua desionizada. Con pipetas volumétricas de 1,2,3,4 y 5 mL se tomaron los respectivos volúmenes para obtener las concentraciones deseadas (2,4,6,8 y 10 ppm) las cuales fueron llevadas a un aforo de 50 mL con fase móvil. Se vaciaron en recipientes y se rotulan para su uso inmediato.

2.2.3 CONFIABILIDAD DEL SISTEMA

- **Linealidad**

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta medida (*Propiedad*). (13,21) Este parámetro es necesario para la correcta determinación del analito para lo cual se prepara una serie de al menos cinco soluciones de un estándar, estas soluciones se inyectan al equipo al menos por duplicado con un coeficiente de determinación ≥ 0.98 , el cual se determina mediante una curva de calibración (concentración vs respuesta medida) de estas 5 disoluciones preparadas a partir de una misma solución estándar y haciendo la medición cuando menos por duplicado para cada solución. La regresión lineal se determina $Y = mX + b$ donde:

r= coeficiente de correlación: indica la relación entre las dos variables (X,Y) donde $r \geq 0.99$. La no correspondencia de la recta indica problemas por efectos de la matriz y está relacionada como la exactitud del método en cuestión.

r²= coeficiente de determinación: se determina para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto, donde $r^2 \geq 0.98$ para que éste sea confiable. Esto nos indica que los resultados son directamente proporcionales a la concentración en un intervalo determinado.

m= La pendiente: se determina como parámetro indicativo de la sensibilidad del método o para evaluar la correlación de los diferentes métodos.

b= la ordenada al origen: se determina para evaluar la proporcionalidad de la función analítica, es decir, que la recta pase por el origen y que cualquier desviación pueda adjudicarse únicamente a un error aleatorio, donde $b \approx 0$.

A continuación damos un ejemplo de una Curva de calibración basándose en lo explicado anteriormente para el STD de cafeína en ambas columnas la cual se obtuvo con inyecciones repetidas por triplicado:

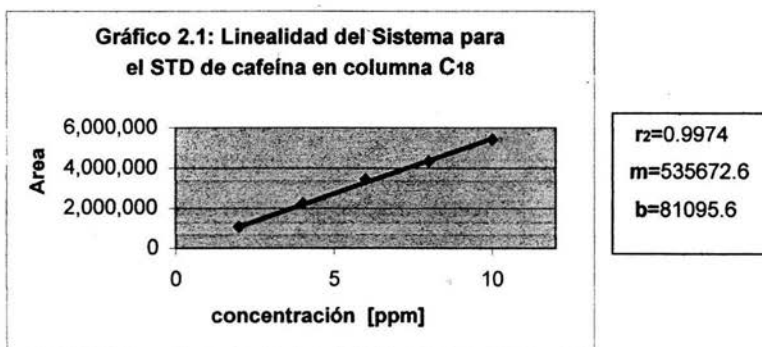


Tabla 2.2: Linealidad del Sistema para el STD de cafeína en columna C18

Sistemas	Concentración teórica	Concentración real *	Área promedio experimental
	ppm ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
1	2	2.084	1,075,142
2	4	4.168	2,252,276
3	6	6.252	3,433,474
4	8	8.336	4,313,519
5	10	10.42	5,401,246

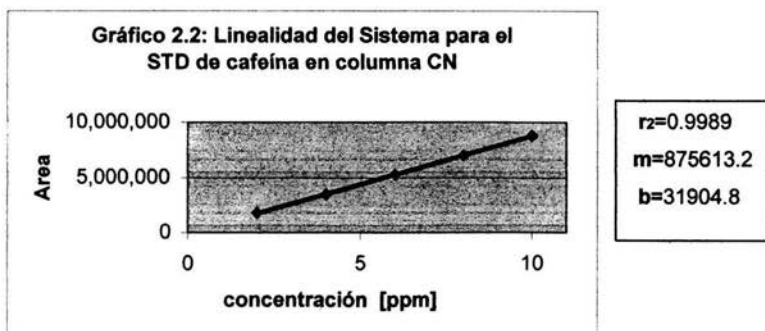


Tabla 2.3: Linealidad del Sistema para el STD de cafeína en columna CN

Sistemas	Concentración teórica	Concentración real *	Área promedio experimental
	ppm ($\mu\text{g/mL}$)		
1	2	2.032	1,807,413
2	4	4.064	3,498,312
3	6	6.096	5,298,987
4	8	8.128	7,021,014
5	10	10.16	8,802,194

* De acuerdo a lo pesado de los estándares

Al evaluar la linealidad ($r_2 > 0.99$) se demuestra la capacidad del sistema para asegurarse que la respuesta analítica es proporcional a la concentración del analito en estudio en un intervalo de concentración dado por los estándares. En el Análisis y discusión de resultados se menciona la linealidad de las demás Curvas.

- **Reproducibilidad**

La reproducibilidad es el grado de concordancia de datos obtenidos (tanto de muestras como estándares) en determinaciones repetidas cuando se han introducido variaciones en las condiciones de trabajo. (13,21) De esta manera se puede evaluar la reproducibilidad entre analistas, equipo, laboratorio, días, etc. Para evaluar la reproducibilidad de las columnas se procedió primeramente a realizar las Curvas de calibración con los estándares preparados. Dicho parámetro se obtuvo realizando las Curvas de calibración por triplicado con diferente material, fase móvil; a diferentes días y horas en las que duró la experimentación *con las condiciones experimentales ya establecidas* en el cual se pretende comparar las áreas registradas entre las columnas *C18* y *CN* en las cuales se inyecta el mismo contenido de estándares y muestras (analito). Al verificar que las Áreas obtenidas concuerdan una respecto a la otra a diferentes concentraciones de los estándares que contienen al ácido ascórbico, benzoato y cafeína, de igual manera se inyecta y se verifica el Área de las muestras para cerciorarse que también obtuvieran Áreas parecidas entre cada inyección. Dando un ejemplo de lo descrito anteriormente se muestra a continuación la reproducibilidad obtenida del estándar de cafeína en columna *C18* y *CN*:

Tabla 2.4: Áreas obtenidas del STD de cafeína a la 1ª semana de la experimentación en columna C18

Sistemas	Concentración teórica [ppm]	Concentración real [ppm] *	Área	C.V. %
1	2	2.032	1,175,142	1.91
			1,159,593	
			1,131,458	
2	4	4.064	2,276,317	1.08
			2,252,275	
			2,301,487	
3	6	6.096	3,362,048	1.25
			3,298,457	
			3,283,424	
4	8	8.128	4,313,519	1.42
			4,212,226	
			4,206,123	
5	10	10.16	5,401,246	1.78
			5,287,888	
			5,213,029	

Tabla 2.5: Áreas obtenidas del STD de cafeína a la 2ª semana de la experimentación en columna C18

Sistemas	Concentración teórica [ppm]	Concentración real [ppm] *	Área	C.V. %
1	2	2.041	1,225,512	1.60
			1,237,741	
			1,199,358	
2	4	4.082	2,556,357	2.07
			2,479,501	
			2,457,448	
3	6	6.123	3,340,789	1.60
			3,444,896	
			3,366,122	
4	8	8.164	4,145,672	1.051
			4,201,248	
			4,115,121	
5	10	10.205	5,444,028	1.36
			5,298,446	
			5,388,842	

Tabla 2.6: Áreas obtenidas del STD de cafeína a la 3ª semana de la experimentación en columna C18

Sistemas	Concentración teórica [ppm]	Concentración real [ppm] *	Área	C.V. %
1	2	2.027	1,102,419	1.70
			1,065,651	
			1,088,387	
2	4	4.054	2,388,755	1.77
			2,409,513	
			2,328,447	
3	6	6.081	3,248,226	1.48
			3,286,882	
			3,345,681	
4	8	8.108	4,188,604	1.27
			4,091,277	
			4,175,921	
5	10	10.135	5,299,478	1.05
			5,347,779	
			5,241,843	

* De acuerdo con lo pesado en los estándares

Tabla 2.7: Áreas obtenidas de muestras comerciales que contienen cafeína a la 1ª semana de la experimentación en columna C1s

Muestra	Area	C.V. %
Pepsi	4,527,120	1.44
	4,658,554	
	4,578,124	
Coca-cola	4,295,987	1.54
	4,401,258	
	4,422,156	
Cafiaspirina	2,443,312	1.605
	2,366,446	
	2,399,014	
Café Legal	3,887,850	1.96
	3,773,040	
	3,747,442	
Nescafé Decaf	384,209	2.62
	397,875	
	378,011	
Té de limón	208,960	2.52
	199,447	
	200,886	

Tabla 2.8: Áreas obtenidas de muestras comerciales que contienen cafeína a la 2ª semana de la experimentación en columna C1s

Muestra	Area	C.V. %
Pepsi	4,449,523	1.60
	4,538,855	
	4,398,322	
Coca-cola	4,485,974	1.27
	4,396,254	
	4,502,159	
Cafiaspirina	2,343,718	1.55
	2,416,444	
	2,369,788	
Café Legal	3,896,857	1.71
	3,766,036	
	3,824,504	
Nescafé Decaf	403,118	2.25
	391,190	
	384,554	
Té de limón	200,165	2.14
	194,456	
	202,825	

Tabla 2.9: Áreas obtenidas de muestras comerciales que contienen cafeína a la 3ª semana de la experimentación en columna C1s

Muestra	Area	C.V. %
Pepsi	4,348,232	1.41
	4,419,755	
	4,296,988	
Coca-cola	4,353,786	1.07
	4,274,452	
	4,289,953	
Cafiaspirina	2,441,814	1.62
	2,387,645	
	2,464,533	
Café Legal	3,709,558	1.72
	3,838,630	
	3,787,995	
Nescafé Decaf	412,811	1.70
	399,126	
	404,458	
Té de limón	199,143	1.39
	193,654	
	196,722	

Tabla 2.10: Áreas obtenidas del STD de cafeína a la 1ª semana de la experimentación en columna CN

Sistemas	Concentración teórica [ppm]	Concentración real [ppm] *	Area	C.V. %
1	2	2.032	1,847,413	1.54
			1,872,323	
			1,815,492	
2	4	4.064	3,498,312	1.18
			3,434,598	
			3,422,190	
3	6	6.096	5,298,987	0.81
			5,213,431	
			5,265,490	
4	8	8.128	7,021,014	0.61
			7,082,516	
			6,998,932	
5	10	10.16	8,802,194	0.11
			8,789,985	
			8,810,595	

Tabla 2.11: Áreas obtenidas del STD de cafeína a la 2ª semana de la experimentación en columna CN

Sistemas	Concentración teórica [ppm]	Concentración real [ppm] *	Area	C.V. %
1	2	2.041	1,846,516	1.45
			1,801,396	
			1,799,887	
2	4	4.082	3,517,390	0.45
			3,486,786	
			3,509,678	
3	6	6.123	5,177,986	0.76
			5,233,587	
			5,255,702	
4	8	8.164	7,000,884	0.60
			6,923,956	
			6,993,413	
5	10	10.205	8,894,554	0.63
			8,813,022	
			8,786,977	

Tabla 2.12: Áreas obtenidas del STD de cafeína a la 3ª semana de la experimentación en columna CN

Sistemas	Concentración teórica [ppm]	Concentración real [ppm] *	Area	C.V. %
1	2	2.027	1,804,456	1.32
			1,823,098	
			1,852,514	
2	4	4.054	3,513,412	0.90
			3,457,987	
			3,461,628	
3	6	6.081	5,119,314	0.80
			5,165,823	
			5,202,008	
4	8	8.108	6,956,788	0.41
			6,989,334	
			7,014,151	
5	10	10.135	8,815,626	0.20
			8,779,877	
			8,801,552	

* De acuerdo a lo pesado en los estándares

Tabla 2.13: Áreas obtenidas de muestras comerciales que contienen cafeína a la 1ª semana de la experimentación en columna CN

Muestra	Area	C.V. %
Pepsi	8,755,452	0.97
	8,837,814	
	8,697,132	
Coca-cola	8,347,930	0.99
	8,289,676	
	8,404,006	
Cafiaspirina	4,171,746	0.98
	4,130,204	
	4,089,835	
Café Legal	6,516,324	0.96
	6,393,846	
	6,446,501	
Nescafé Decaf	543,590	2.04
	566,171	
	552,966	
Té de limón	384,633	2.06
	378,586	
	369,257	

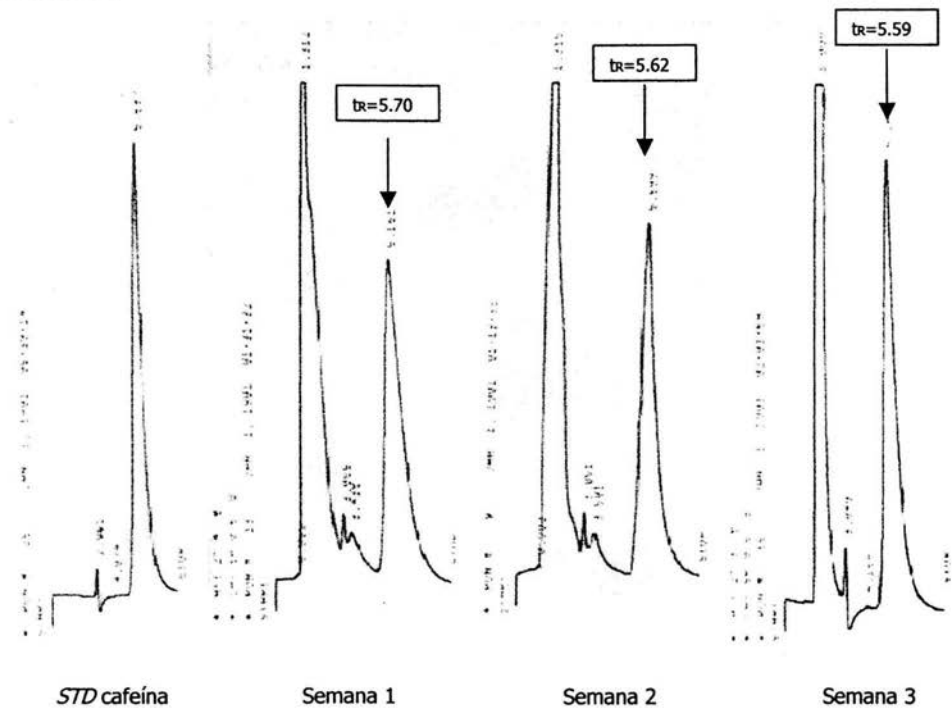
Tabla 2.14: Áreas obtenidas de muestras comerciales que contienen cafeína a la 2ª semana de la experimentación en columna CN

Muestra	Area	C.V. %
Pepsi	8,863,636	1.01
	8,685,993	
	8,794,017	
Coca-cola	8,246,852	1.05
	8,341,910	
	8,422,024	
Cafiaspirina	4,139,564	1.09
	4,185,646	
	4,095,336	
Café Legal	6,388,231	0.97
	6,467,417	
	6,345,874	
Nescafé Decaf	501,922	1.29
	492,233	
	489,787	
Té de limón	311,097	1.88
	303,258	
	299,876	

Tabla 2.15: Áreas obtenidas de muestras comerciales que contienen cafeína a la 3ª semana de la experimentación en columna CN

Muestra	Area	C.V. %
Pepsi	8,803,174	0.76
	8,702,695	
	8,676,393	
Coca-cola	8,414,081	0.78
	8,283,453	
	8,346,704	
Cafiaspirina	4,206,713	0.77
	4,142,566	
	4,180,417	
Café Legal	6,383,721	0.99
	6,506,564	
	6,477,844	
Nescafé Decaf	477,522	2.09
	463,136	
	482,243	
Té de limón	344,748	2.12
	330,795	
	335,016	

Como se puede apreciar en **las Tablas 2.4 a la 2.16** hay una concordancia (Reproducibilidad) entre las áreas obtenidas tanto del STD como en las muestras que contienen cafeína en ambas columnas (*C18* y *CN*) el cual se puede corroborar con el Coeficiente de variación (**C.V. < 2.0%**) parámetro establecido para Análisis Instrumentales. Sin embargo los resultados obtenidos en la columna *C18* reportan % C.V. mayores a los reportados en la columna *CN*. Lo anterior tiene mucho que ver con la eficiencia de las columnas (**N y A.E.P.T.**), de la cual se hablará con mayor detalle más adelante. Visualmente se puede ver su separación con Áreas y *t_R* semejantes entre sí en los siguientes cromatogramas:

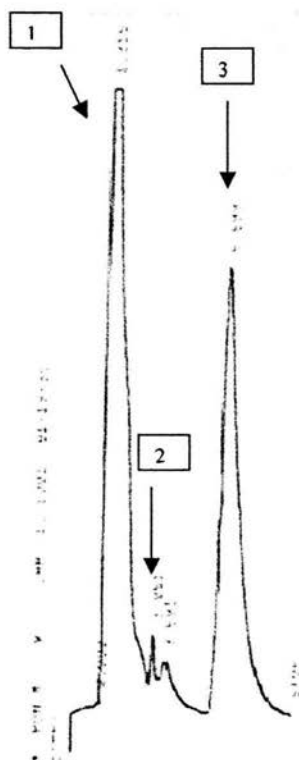


Muestra: Coca-cola	Área promedio	<i>t_R</i> min. promedio
Semana 1	4,373,134	5.637
Semana 2	4,461,462	
Semana 3	4,376,063	

De manera similar se verificó también la reproducibilidad en las demás Curvas de calibración y las muestras que contienen al benzoato y ácido ascórbico inyectadas por triplicado en ambas columnas con su respectiva fase móvil.

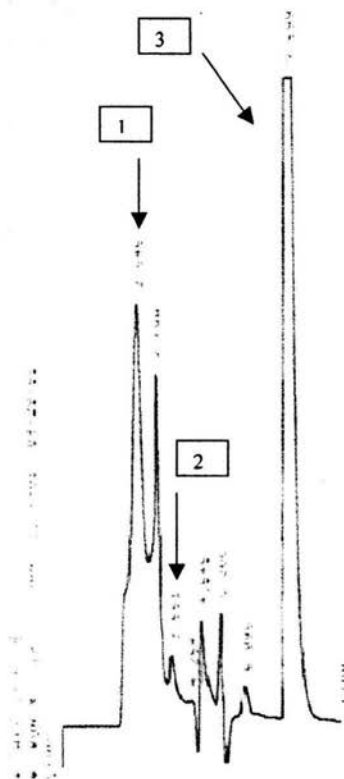
- **Sensibilidad**

Este parámetro se refiere a la cualidad que tiene el método para dar un cambio en la respuesta analítica al cambiar la concentración de analito bajo las condiciones de análisis establecidas (13,18). Para lograr esto se hicieron las pruebas necesarias a fin de establecer las condiciones químicas e instrumentales para llevar a cabo las determinaciones y obtener las condiciones de trabajo. Dicho lo anterior se puede apreciar que las concentraciones en las que fueron preparados los estándares para realizar las Curvas de calibración (2 a 10 ppm), el tratamiento que se le da a los analitos propuesto en la experimentación, y la longitud de onda que se estableció anteriormente ($\lambda=270\text{ nm}$) podemos decir que a estas condiciones son fácilmente detectables y medibles (sensible) por el equipo usado para llevarse a cabo su separación, identificación y cuantificación eficazmente. Esto visualmente se puede apreciar en los siguientes cromatogramas:



Mezcla de cafeína, ácido ascórbico y benzoato de sodio contenidos en mta. de Coca-cola en columna C18

1. ác. ascórbico - tr: 1.61 min
2. benzoato - tr: 3.32 min
3. cafeína - tr: 5.62 min



Mezcla de cafeína, ácido ascórbico y benzoato de sodio contenidos en mta. de Coca-cola en columna CN

1. ác. ascórbico - tr: 2.54 min
2. benzoato - tr: 3.65 min
3. cafeína - tr: 6.55 min

- **Intervalos de confianza para la identificación de los analitos**

Debido a que la cromatografía es principalmente un método de separación, no puede usarse para identificar compuestos sin compararse con una sustancia de referencia (*Ej. un STD*). Para un análisis cualitativo debe determinarse el tiempo de Retención (t_R) que se obtiene del pico de una sustancia conocida. Cuando un pico aparece al mismo tiempo comparándose con la sustancia de referencia bajo las mismas condiciones experimentales, la probabilidad de una identificación correcta es muy alta (21).

Existen varios métodos estadísticos para estar seguros de que un resultado obtenido experimentalmente sea confiable. **La t de Student** es un valioso auxiliar estadístico que se utiliza para medir probabilidad. Se usa principalmente para expresar intervalos de confianza para comparar los resultados de diferentes experimentos (14). Al inyectar tanto el STD y los analitos y obtener su respectivos tiempos de Retención, por lo regular el t_R del analito (mta.) debe ser cercano al t_R del STD de acuerdo al párrafo anterior. Como se obtuvieron diferentes t_R en las muestras se procede a realizar una t de Student y verificar si los t_R que se reportan de c/u de las muestras cae dentro de este intervalo y poder afirmar que se logra identificar los compuestos ácido ascórbico, cafeína y benzoato de sodio contenidos en las muestras.

El intervalo de confianza se realiza con un 95% de confianza el cual se determina con la siguiente fórmula:

$$\mu = \bar{x} \pm t_s \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \text{donde}$$

μ = intervalo de confianza
 \bar{x} = media medida
 t = es un número obtenido de la t Student
 s = desviación estándar
 n = número de observaciones

A continuación se muestra un resumen de los t_R de la cafeína obtenidos por triplicado del Sistema de estándares en columna C18.

Curva de Calibración para el STD de cafeína en columna C18

Sistemas	Conc. teórica	Conc. real	Area	t_R (min.)
	ppm ($\mu\text{g/mL}$)			
1	2	2.084	1,075,142	5.578
2	4	4.168	2,252,275	5.528
3	6	6.252	3,433,474	5.495
4	8	8.336	4,313,519	5.575
5	10	10.42	5,401,246	5.637
			$\bar{X} =$	5.5622
			$S =$	0.0533

Con los datos de la \bar{x} , s y la t obtenida en la Tabla de la t de Student (Ver anexo – Tabla 6.1) se procede a sustituir éstos valores en la fórmula:

$$\mu = 5.5622 \pm \frac{(4.303)(0.0533)}{\sqrt{3}} = 5.5622 \pm \mathbf{0.1324}$$

por lo que el intervalo de confianza para el t_x de la cafeína al 95% en columna C18 es de (**5.429 ≤ x ≤ 5.694**). Ahora se compara dicho intervalo con el t_x de las muestras que contienen cafeína en columna C18:

Muestra	t_x (min.)
Pepsi	5.511
Coca-cola	5.691
Cafiaspirina	5.225
Café Legal	5.736
Nescafé Decaf	5.774
Té de limón	5.648

dichos cálculos indican que hay un 95% de probabilidad de una identificación correcta de la cafeína contenida en las muestras utilizando la C18. Para los t_x que no están dentro del intervalo lo explicaremos con detalle más adelante. De la misma manera se obtuvieron los intervalos de confianza de los demás compuestos ácido ascórbico y benzoato de sodio en ambas columnas, los cuales se resumen en las siguientes Tablas:

Tabla 3.1: Intervalos de confianza al 95% para la identificación de cafeína, ácido ascórbico y benzoato de sodio en columna C18

Compuesto	Intervalo
Cafeína	(5.429 ≤ x ≤ 5.694)
Ácido ascórbico	(1.5848 ≤ x ≤ 1.6468)
Benzoato de sodio	(3.1392 ≤ x ≤ 3.2392)

Tabla 3.2: Intervalos de confianza al 95% para la identificación de cafeína, ácido ascórbico y benzoato de sodio en columna CN

Compuesto	Intervalo
Cafeína	(6.4112 ≤ x ≤ 6.6092)
Ácido ascórbico	(2.356 ≤ x ≤ 3.650)
Benzoato de sodio	(3.002 ≤ x ≤ 3.920)

Nota: Cabe señalar que todos los datos que a continuación se hacen mención se obtuvieron con inyecciones repetidas por triplicado tanto de la solución analítica (mta. problema) como de c/u de las soluciones estándar de referencia. Esto se hace con el fin de verificar la reproducibilidad y sensibilidad del método.

CAPÍTULO III

“RESULTADOS”

4.1 RESULTADOS EXPERIMENTALES

A continuación se muestran las siguientes Tablas y Gráficas con los datos experimentales promedio obtenidos en la columna C18 tanto de los estándares y de las muestras comerciales que se utilizaron, utilizando fase móvil MeOH/H₂O a pH= 5.0

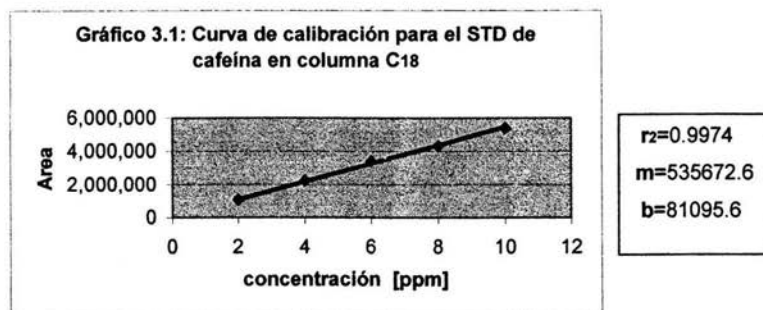


Tabla 3.3: Curva de Calibración para el STD de cafeína en columna C18

Sistemas	Conc. teórica	Conc. real	Area	t _R (min.)	w	N	AETP (cm)
	ppm (µg/mL)						
1	2	2.084	1,075,142	5.578	0.819	742.17	0.0404
2	4	4.168	2,252,276	5.528	0.798	767.80	0.0390
3	6	6.252	3,433,474	5.495	0.784	786.01	0.0381
4	8	8.336	4,313,519	5.575	0.813	752.36	0.0398
5	10	10.42	5,401,246	5.637	0.783	829.26	0.0361
	X =		5.5622		0.7994	722.08	0.0418

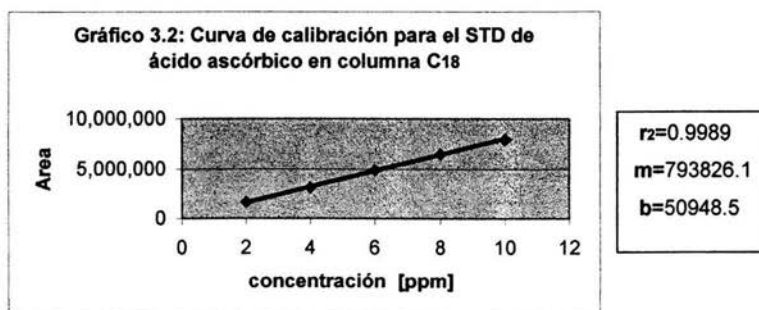


Tabla 3.4: Curva de Calibración para el STD de ácido ascórbico en columna C18

Sistemas	Conc. teórica	Conc. real	Area	t _R (min.)	w	N	AETP (cm)
	ppm (µg/mL)						
1	2	2.051	1,665,620	1.605	0.337	362.91	0.0826
2	4	4.102	3,124,384	1.601	0.351	332.46	0.0902
3	6	6.153	4,871,875	1.619	0.347	348.30	0.0861
4	8	8.204	6,483,149	1.625	0.361	324.19	0.0925
5	10	10.255	7,924,499	1.630	0.373	305.54	0.0981
	X =		1.6158		0.3538	334.68	0.0899

t_R= tiempo de retención; w= ancho de pico a la base; N= número de platos teóricos (o eficiencia); AETP= altura equivalente del plato teórico.

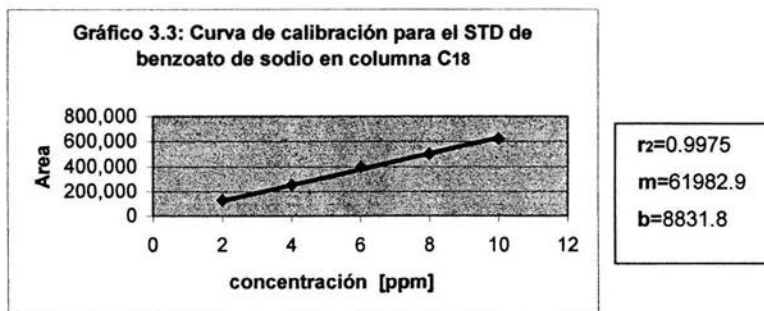


Tabla 3.5: Curva de Calibración para el STD de benzoato de sodio en columna C18

Sistemas	Conc. teórica	Conc. real	Area	t_R (min.)	w	N	AETP (cm)
	ppm ($\mu\text{g/mL}$)						
1	2	2.062	126,431	3.156	0.608	431.10	0.0695
2	4	4.124	254,513	3.189	0.612	434.43	0.0690
3	6	6.186	398,021	3.191	0.584	477.69	0.0628
4	8	8.248	502,329	3.20	0.560	522.44	0.0574
5	10	10.31	622,352	3.21	0.553	539.11	0.0556
	$\bar{X} =$			3.1892	0.6082	480.95	0.0628

Tabla 3.6: Cuantificación de cafeína contenida en las muestras problema

Muestra	Area	t_R (min.)	w	N	AETP (cm)	Concentración ppm ($\mu\text{g/mL}$)
Pepsi	4,527,120	5.511	0.710	963.97	0.0311	82.998
Coca-cola	4,295,987	5.690	0.780	851.74	0.0352	78.684
Cafiaspirina	2,543,312	5.435	0.750	840.22	0.0357	45.964
Café Legal	3,887,850	5.736	0.892	661.62	0.0453	71.064
Nescafé Decaf	334,209	5.774	0.834	766.90	0.0391	4.725
Té de limón	208,960	5.648	0.705	1026.90	0.0292	1.198

Tabla 3.7: Cuantificación de ácido ascórbico contenido en las muestras problema

Muestra	Area	t_R (min.)	w	N	AETP (cm)	Concentración ppm ($\mu\text{g/mL}$)
Pepsi	6,785,328	1.587	0.619	105.17	0.2852	84.834
Coca-cola	6,271,264	1.615	0.683	89.45	0.3353	78.358
Té de limón	12,329,504	1.647	0.774	72.44	0.4141	77.337
Tabletas	2,012,698	1.614	0.385	281.19	0.1066	24.712
Fresquibón	1,251,058	1.766	0.676	109.19	0.2747	15.118
Jumex	3,408,274	1.807	0.764	89.50	0.3351	42.292

Tabla 3.8: Cuantificación de benzoato de sodio contenido en las muestras problema

Muestra	Area	t_R (min.)	w	N	AETP (cm)	Concentración ppm ($\mu\text{g/mL}$)
Aceitunas	3,066,896	3.228	0.561	529.73	0.0566	2466.86
Pepsi	434,119	3.329	0.589	511.12	0.0586	68.613
Coca-cola	455,626	3.301	0.655	406.37	0.0738	72.083

A continuación se muestran las siguientes Tablas y Gráficas con los datos experimentales promedio obtenidos en la columna **CN** tanto de los estándares y de las muestras comerciales que se utilizaron, utilizando fase móvil ACN/H₂O a pH= 5.0

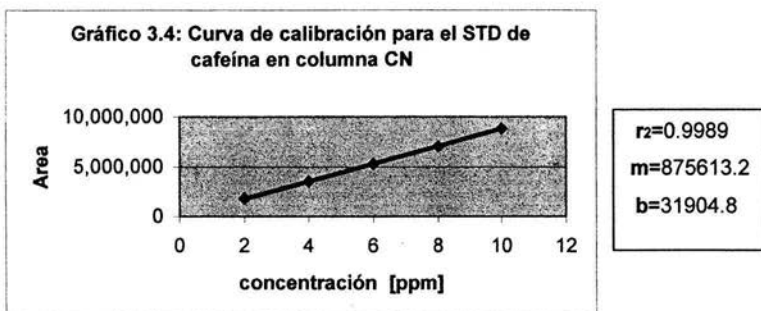


Tabla 3.9: Curva de calibración para el STD de cafeína en columna CN

Sistemas	Conc. teórica	Conc. Real	Area	t_R (min.)	w	N	AETP (cm)
	ppm ($\mu\text{g/mL}$)						
1	2	2.032	1,807,413	6.516	0.265	9673.65	0.00258
2	4	4.064	3,498,312	6.443	0.263	9602.50	0.00260
3	6	6.096	5,298,987	6.550	0.253	10724.11	0.00233
4	8	8.128	7,021,014	6.519	0.268	9466.99	0.00264
5	10	10.16	8,802,194	6.523	0.267	9549.75	0.00261
	$\bar{X} =$			6.5102	0.2632	9803.4	0.00255

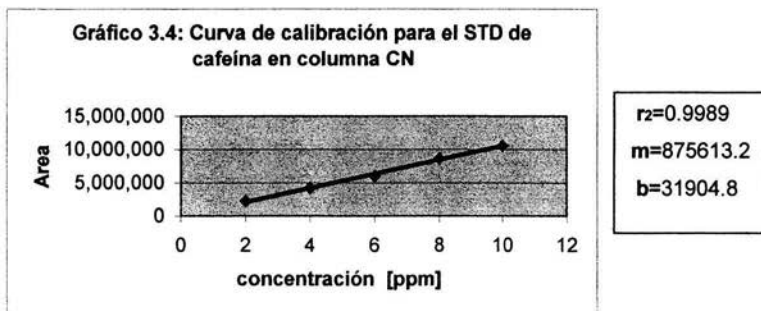


Tabla 3.10: Curva de Calibración para el STD de ácido ascórbico en columna CN

Sistemas	Conc. teórica	Conc. real	Area	t_R (min.)	w	N	AETP (cm)
	ppm ($\mu\text{g/mL}$)						
1	2	2.019	2,231,767	2.559	0.179	3270.05	0.00764
2	4	4.038	4,234,446	2.547	0.165	3812.50	0.00655
3	6	6.057	5,978,704	2.415	0.154	3934.71	0.00635
4	8	8.076	8,608,974	2.473	0.158	3919.71	0.00637
5	10	10.095	10,580,232	2.521	0.167	3646.13	0.00685
	$\bar{X} =$			2.503	0.1646	3716.62	0.00675

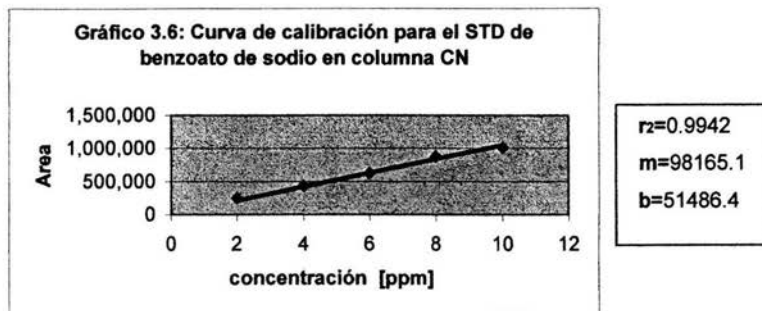


Tabla 3.11: Curva de Calibración para el STD de benzoato de sodio en columna CN

Sistemas	Conc. teórica	Conc. real	Area	t_R (min.)	w	N	AETP (cm)
	ppm ($\mu\text{g/mL}$)						
1	2	2.041	250,617	3.485	0.291	2294.77	0.0108
2	4	4.082	438,412	3.510	0.322	1901.17	0.0131
3	6	6.123	623,954	3.586	0.376	1455.34	0.0171
4	8	8.164	875,852	3.524	0.325	1881.15	0.0132
5	10	10.205	1,013,547	3.555	0.346	1684.31	0.0148
	\bar{X}			3.461	0.332	1755.79	0.0143

Tabla 3.12: Cuantificación de cafeína contenida en las muestras problema

Muestra	Area	t_R (min.)	w	N	AETP (cm)	Concentración ppm ($\mu\text{g/mL}$)
Pepsi	8,755,452	6.590	0.284	8614.97	0.00290	99.624
Coca-cola	8,347,930	6.578	0.281	8773.22	0.00284	94.973
Cafiaspirina	4,171,746	6.438	0.248	10782.47	0.00231	47.279
Café Legal	6,536,634	6.465	0.239	11707.42	0.00213	74.282
Nescafé Decaf	543,590	6.706	0.473	3216.06	0.00777	5.843
Té de limón	384,633	6.577	0.627	1760.51	0.01420	2.014

Tabla 3.13: Cuantificación de ácido ascórbico contenido en las muestras problema

Muestra	Area	t_R (min.)	w	N	AETP (cm)	Concentración ppm ($\mu\text{g/mL}$)
Pepsi	7,479,117	2.645	0.538	386.72	0.0646	70.936
Coca-cola	7,393,343	2.544	0.524	377.13	0.0662	70.122
Té de limón	13,293,616	2.647	0.315	1129.81	0.0221	63.062
Tabletas	2,497,284	2.606	0.124	7066.84	0.0035	23.651
Fresquibón	1,267,011	2.615	0.137	5829.37	0.0042	11.974
Jumex	3,537,248	2.787	0.407	750.24	0.0334	33.522

Tabla 3.14: Cuantificación de benzoato de sodio contenido en las muestras problema

Muestra	Area	t_R (min.)	w	N	AETP (cm)	Concentración ppm ($\mu\text{g/mL}$)
Aceitunas	5,729,840	3.552	0.175	6591.58	0.0037	2882.51
Pepsi	822,457	3.461	0.419	1091.67	0.0229	78.54
Coca-cola	906,831	3.506	0.420	1114.92	0.0224	87.13

t_R = tiempo de retención; w = ancho de pico a la base; N = número de platos teóricos (o eficiencia); AETP = altura equivalente del plato teórico.

4.2 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A continuación se muestran los datos obtenidos de cada columna (C_{18} y CN) ambas en fase reversa. Cabe señalar que todos los datos mostrados a continuación se obtuvieron con inyecciones repetidas por triplicado los cuales permanecieron constantes (*reproducibles*). La estabilidad que tuvieron las muestras a temperatura ambiente (periodo de 3 horas) resulta ser favorable para su identificación, separación y cuantificación.

De acuerdo a los resultados obtenidos de la columna C_{18} se determinó que el tiempo de retención (t_R) para el STD de cafeína es de $\bar{X} = 5.5622$ min. (Tabla 3.3), el cual nos ayuda a identificar cualitativamente la presencia de la misma en las muestras problema:

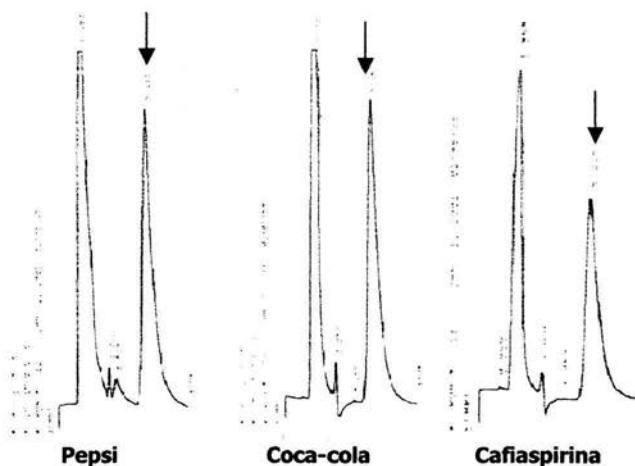


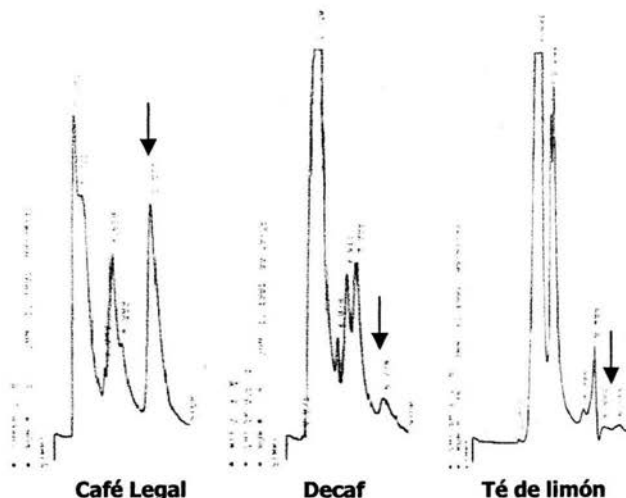
STD cafeína

En los cromatogramas obtenidos experimentalmente para cada muestra analizada se registraron los siguientes tiempos de retención en columna C_{18} :

Muestra	t_R (min.)
Pepsi	5.511
Coca-cola	5.690
Cafiaspirina	5.435
Café Legal	5.736 *
Nescafé Decaf	5.774 *
Té de limón	5.648

* Muestras que se encuentran fuera del intervalo de confianza





De acuerdo al intervalo de confianza determinado para la Cafeína siendo éste de ($5.429 \leq x \leq 5.694$ min.) para lograr su identificación contenida en los productos, observamos que en las muestras comerciales de Nescafé Decaf y el Café Legal sus t_R están fuera del este intervalo; **5.774 y 5.736 min.** respectivamente. Lo anterior puede deberse a efectos de la matriz tales como la composición de la muestra, que se encuentre ésta en menor proporción en el producto o de alguna interferencia que pudiesen ocasionar los demás compuestos contenidos en el mismo. Pero dichos tiempos no están tan alejados del t_R del STD (**5.622 min.**). Cabe recordar que en HPLC el t_R que registra del analito (cafeína) contenido de la muestra comercial es semejante o aproximado al t_R de la sustancia de referencia (STD de cafeína) (17,19). En los cromatogramas se logra visualizar y separar con claridad el pico cromatográfico de los demás compuestos logrando la identificación. En las demás muestras sus t_R caen dentro de este intervalo, lo que significa que hay un 95% de probabilidad de una identificación correcta de la cafeína contenida en los productos comerciales utilizando la **C18**.

Como ya se había mencionado, se realizó una Curva de calibración utilizando la propiedad (Área) la cual fue medida de una serie de soluciones estándar de concentraciones conocidas (**2,4,6,8 y 10 ppm**). El objetivo que se persigue en dicha experimentación es también lograr la cuantificación de la cafeína y de los otros compuestos (ác. ascórbico y benzoato). Al obtener la curva linealizada ($r_2 = 0.9974$) se procede a interpolar las muestras problema basándose en el área obtenida para conocer las concentraciones al inicio de éstas respectivamente. En base a la dilución que tuvieron *c/u* (Ver Preparación de *mtas.*) se obtuvo lo siguiente:

Muestra	Concentración mg /100 mL	Muestra	Concentración mg/100 g
Pepsi	8.299	Café Legal	3483.33
Coca-cola	7.868	Nescafé Decaf	305.88 **
Té de limón	0.1198 **		
Cafiaspirina	4.596		

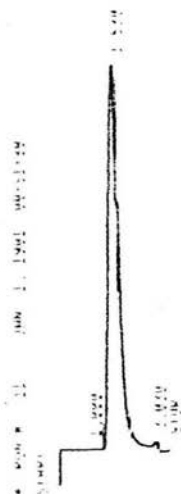
Los productos que están marcados con doble asterisco (**) la cuantificación se hizo por extrapolación con el fin de darnos una idea de la cantidad de cafeína contenida en éstos. Sin embargo esta no es del todo confiable ya que las Áreas que reportan están fuera de la Curva de calibración, además que la forma de los cromatogramas (picos) son poco selectivos en comparación de las demás muestras, por lo que se debió cuantificarlos mejor por alturas desde la base del pico y concentrar más la muestra que es lo recomendable cuando se presentan este tipo de casos. En lo que respecta a las demás muestras sus Áreas están dentro de la Curva de calibración.

Ahora se procede a obtener la pureza de la cafeína contenida en el medicamento (Cafiaspirina):

$$\begin{array}{r}
 0.0459 \text{ mg (100 mL)} = 4.596 \text{ mg} \dots\dots\dots 102.5 \text{ mg polvo} \\
 \text{---} \\
 \text{mL} \qquad \qquad \qquad X = 29.553 \text{ mg} \dots\dots\dots 659.1 \text{ mg tabletas} \\
 \\
 \text{marbete - Cafeína} \dots\dots\dots 30 \text{ mg} \text{ ----- } 100 \% \\
 \\
 29.553 \text{ mg} \text{ ----- } X = 98.51 \%
 \end{array}$$

tal como se esperaba la cantidad de cafeína en el Café Legal es mayor a la contenida en el Nescafé Decaf; ya que éste último está descafeinado. Con respecto al medicamento obtuvo una pureza aceptable de 98.51% dado que la Farmacopea (USP) da un intervalo del 95 -105% en el contenido.

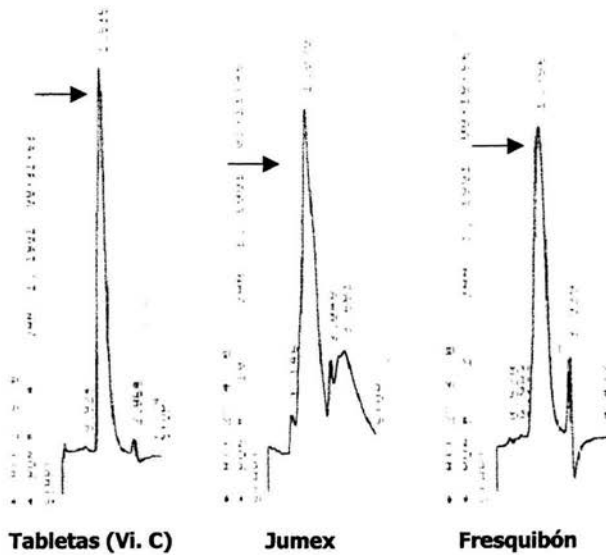
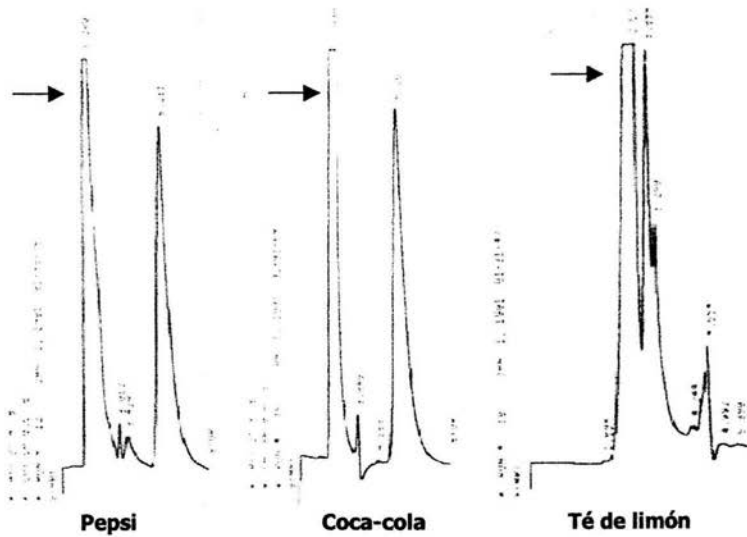
Para el STD de ácido ascórbico el t_R obtenido es de $\bar{X} = 1.6158 \text{ min.}$ (Tabla 3.4); el intervalo de confianza al 95% es de ($1.5848 \leq x \leq 1.6468 \text{ min.}$) Las muestras comerciales de Jumex y Fresquibón registran t_R de **1.807 y 1.766 min.** respectivamente, los cuales no se encuentran dentro del intervalo. La explicación por la cual no caen dentro del intervalo es la misma que en el caso anterior. En los demás productos el t_R obtenido es semejante al de la sustancia de referencia lográndose así su identificación en columna **C1s**:



STD ácido ascórbico

Muestra	t_R (min.)
Pepsi	1.587
Coca-cola	1.615
Té de limón	1.647
Tabletas (Vit.C)	1.614
Fresquibón	1.766 *
Jumex	1.807 *

* Muestras que se encuentran fuera del intervalo de confianza



De igual manera se realizó una Curva de calibración ($r_2= 0.9989$) en la cual se interpola el área obtenida por las muestras comerciales con la del STD:

Muestra	Concentración mg/100 mL
Pepsi	8.483
Coca-cola	7.835
Té de limón	7.733
Fresquibón	1.511
Jumex	4.229
Tablet (Vit.C)	2.471

La pureza de las Tabletas de Vit. C (Rose Hips del Dr Simi) se calcula de la siguiente manera

$$\frac{0.0247 \text{ mg (100 mL)}}{\text{---}} = 2.471 \text{ mg} \dots\dots\dots 101.7 \text{ mg polvo}$$

$$\text{mL} \quad \quad \quad X = 102.90 \text{ mg} \dots\dots\dots 4235.4 \text{ mg tabletas}$$

marbete – Vit. C 100 mg ----- 100 %

$$102.90 \text{ mg} \text{ ----- } X = 102.9 \%$$

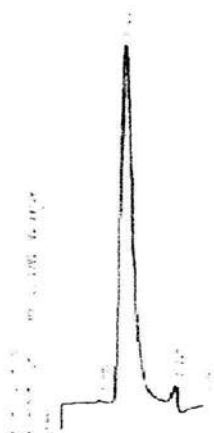
el medicamento obtuvo una pureza aceptable (95 -105%) en el contenido. De igual manera se procede a conocer la cantidad de Vit. C contenida en el sobre de Fresquibón:

$$\frac{0.0151 \text{ mg (100 mL)}}{\text{---}} = 1.511 \text{ mg} \dots\dots\dots 0.102 \text{ g mta.}$$

$$\text{mL} \quad \quad \quad X = 74.06 \text{ mg} \dots\dots\dots 5.0 \text{ g sobre}$$

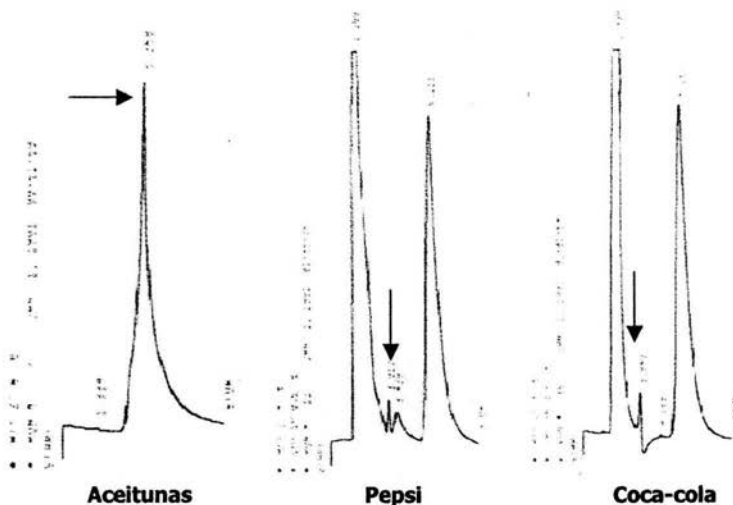
por lo que hay 74.06 mg de Vit. C totales contenidos en el sobre de Fresquibón (1.48 %)

El t_r para el STD de benzoato de sodio es de $\bar{X} = 3.1892 \text{ min.}$ (Tabla 3.5); el intervalo de confianza al 95% es de ($3.1392 \leq x \leq 3.2392 \text{ min.}$) Las muestras comerciales de Pepsi y Coca-cola registran t_r de **3.329 y 3.301 min.** respectivamente, los cuales no se encuentran dentro del mismo; pero tampoco están tan alejados de la sustancia de referencia, además de que se aprecia el pico cromatográfico indicando la presencia del conservador. Las aceitunas registraron un t_r de **3.228 min.** el cual es semejante al obtenido por el STD:



STD benzoato de sodio

Muestra	t_r (min.)
Aceitunas	3.228
Pepsi	3.329
Coca-cola	3.301



La Curva de calibración obtuvo una $r_2= 0.9974$, por lo que se procedió a interpolar las Áreas de las muestras comerciales:

Muestra	Concentración mg/100 mL	% p/v (g/100 mL)
Aceitunas	246.68	0.246
Pepsi	6.861	0.0068
Coca-cola	7.208	0.0072

Según las normas establecidas para la industria alimenticia, el benzoato de sodio que es un conservador no debe estar en cantidades mayores de **0.1 % (p/v)**, (12) por lo que el contenido de éste en las bebidas está dentro de lo establecido, solo en el caso de las aceitunas sobrepasa dicho valor según lo indicado en el marbete del producto.

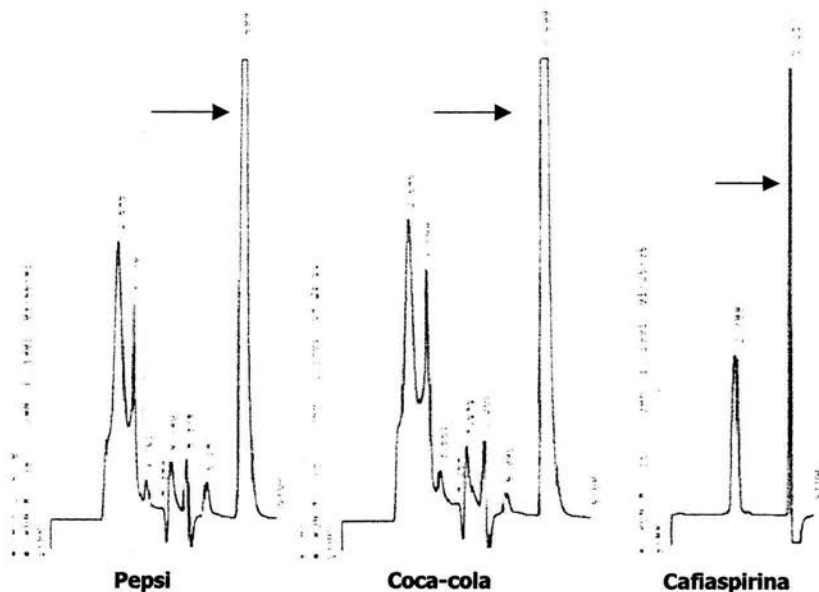
A continuación se reportan los valores obtenidos utilizando la columna CN.

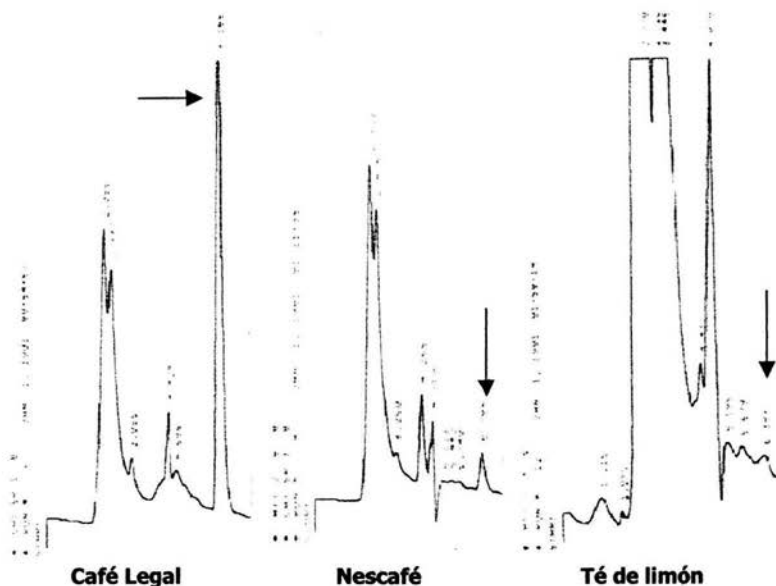
Para el STD de cafeína el t_R obtenido para dicha columna es de $\bar{X} = 6.5102 \text{ min.}$ (Tabla 3.9); y el intervalo de confianza al 95% es de $(6.4112 \leq x \leq 6.6092 \text{ min.})$. Solamente la muestra de Nescafé Decaf registró un t_R de 6.706 min. , el cual no está contemplado en el intervalo. En los demás productos los t_R obtenidos son semejantes al de la sustancia de referencia; por lo que en esta columna también se logra identificar la cafeína.



STD cafeína

Muestra	t_R (min.)
Pepsi	6.59
Coca-cola	6.58
Cafiaspirina	6.438
Café Legal	6.465
Nescafé Decaf	6.706 *
Té de limón	6.577





La Curva de calibración tiene un comportamiento lineal ($r_2= 0.9987$), por lo que se puede utilizar para cuantificar la cantidad de cafeína contenida en las muestras:

Muestra	Concentración mg /100 mL	Muestra	Concentración mg/100 g
Pepsi	9.962	Café Legal	3695.52
Coca-cola	9.497	Nescafé Decaf	290.54 **
Té de limón	0.201 **		
Cafiaspirina	4.727		

Los productos que están marcados con doble asterisco (**) la cuantificación también se hizo por extrapolación. Se presenta el mismo caso ocurrido con la C_{18} ; las Áreas reportadas están fuera de la Curva de calibración, por lo que se debió haber concentrado más la muestra. En lo que respecta a las demás muestras sus Áreas están dentro de la Curva de calibración.

La pureza del medicamento (Cafiaspirina) se obtuvo de la siguiente manera:

$$\begin{array}{r}
 0.04727 \text{ mg (100 mL)} = 4.727 \text{ mg} \dots\dots\dots 104.3 \text{ mg polvo} \\
 \text{---} \\
 \text{mL} \qquad \qquad \qquad X= 29.853 \text{ mg} \dots\dots\dots 658.7 \text{ mg tabletas} \\
 \\
 \text{marbete - Cafeína} \dots\dots\dots 30 \text{ mg} \text{ ----- } 100 \% \\
 \\
 29.853 \text{ mg} \text{ ----- } X= 99.51 \%
 \end{array}$$

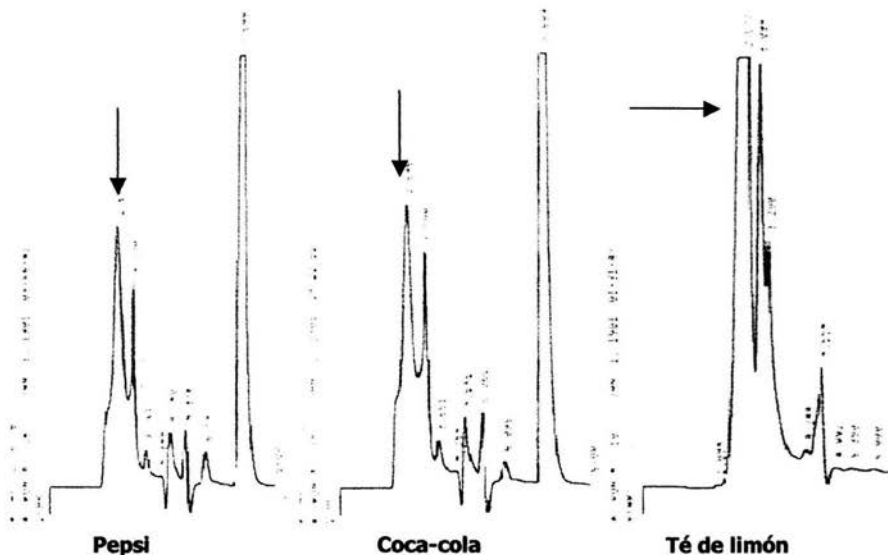
Comparando estos datos con los de la columna anterior (C_{18}) resultan ser muy parecidos; el Nescafé Decaf tiene menor cantidad de cafeína comparándolo con la obtenida por café Legal, y el medicamento también contiene una pureza aceptable.

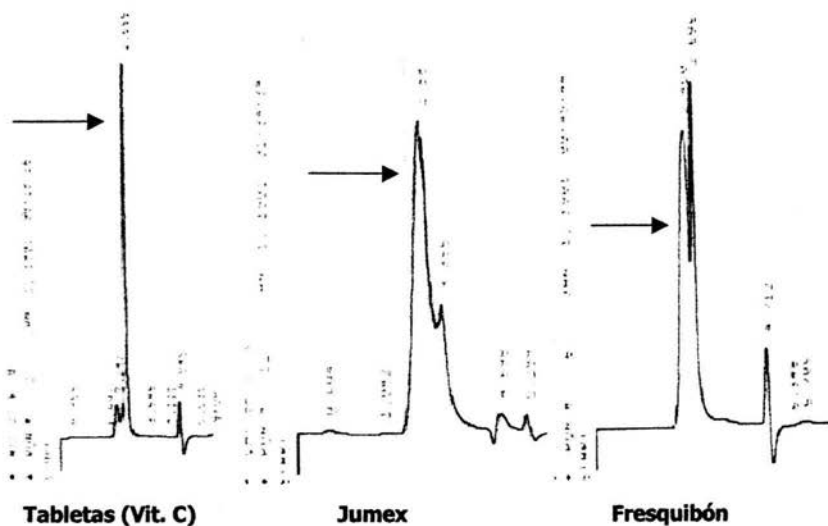
El STD de ácido ascórbico el t_R fue de $\bar{X} = 2.503 \text{ min.}$ (Tabla 3.10); el intervalo de confianza al 95% es de $(2.356 \leq x \leq 2.650 \text{ min.})$ Solamente la muestra de Jumex registró un t_R de **2.787 min.**, el cual no está contemplado en el intervalo. En los demás productos los t_R obtenidos son semejantes al de la sustancia de referencia; por lo que en esta columna también se logra la identificación de dicho compuesto.



STD ácido ascórbico

Muestra	t_R (min.)
Pepsi	2.645
Coca-cola	2.544
Té de limón	2.647
Tabletas (Vit.C)	2.606
Fresquibón	2.615
Jumex	2.787 *





La Curva de calibración también presenta un comportamiento lineal ($r_2= 0.9923$) por lo que se interpola obteniéndose las siguientes concentraciones:

Muestra	Concentración mg/100 mL
Pepsi	7.093
Coca-cola	7.012
Té de limón	6.306
Fresquibón	1.197
Jumex	3.352
Tabletas (Vit.C)	2.279

Vemos que en los cromatogramas de las muestras de Pepsi, Coca-cola y Té de limón el pico que identifica al ácido ascórbico no está tan separado del otro; hay poca Resolución, por lo que de alguna manera es poco selectivo, por lo que hubiera sido conveniente cuantificarlos por alturas para tener una mayor credibilidad del contenido de éste en los productos.

La pureza de las Tabletas de Vit. C (Dr. Simi) se calcula de la siguiente manera:

$$\begin{array}{l}
 0.02365 \text{ mg (100 mL)} = 2.365 \text{ mg} \dots\dots\dots 102.24 \text{ mg polvo} \\
 \text{---} \\
 \text{mL} \quad \quad \quad X = 97.602 \text{ mg} \dots\dots\dots 4219.4 \text{ mg tabletas} \\
 \\
 \text{marbete - Vit. C} \dots\dots\dots 100 \text{ mg} \text{ ----- } 100 \% \\
 \quad \quad \quad \quad \quad 97.602 \text{ mg} \text{ ----- } X = 97.6 \%
 \end{array}$$

teniendo una pureza aceptable del principio activo en el medicamento. La cantidad de Vit. C contenida en el sobre de Fresquibón se calcula de manera siguiente:

$$\begin{array}{l}
 0.0119 \text{ mg (100 mL)} = 1.197 \text{ mg} \dots\dots\dots 0.1035 \text{ g mta.} \\
 \text{---} \\
 \text{mL} \quad \quad \quad X = 57.82 \text{ mg} \dots\dots\dots 5.0 \text{ g sobre}
 \end{array}$$

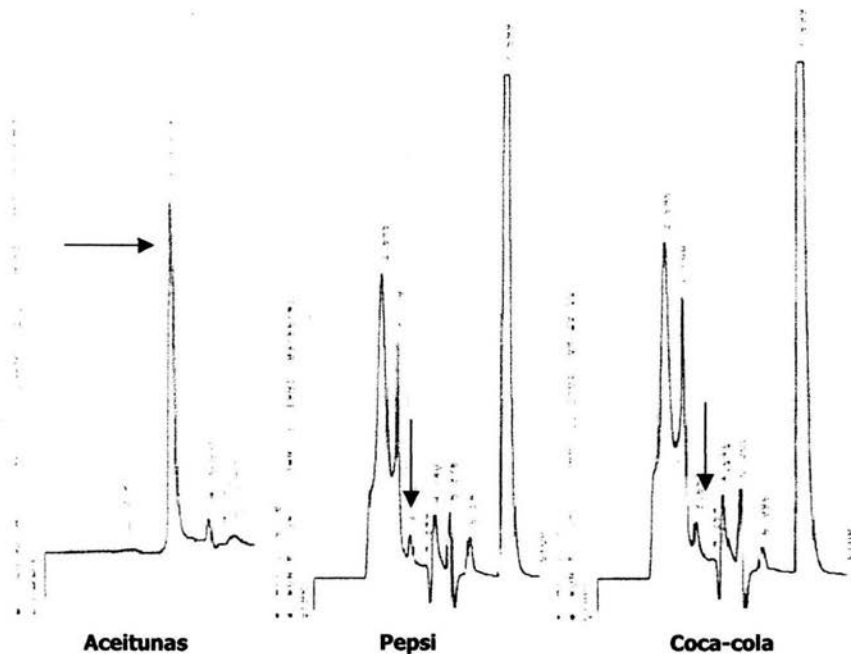
por lo que hay 57.82 mg de Vit. C totales contenidos en el sobre de Fresquibón (1.15 %)

Respecto al STD de benzoato de sodio dio un t_R promedio de **3.461 min.** (Tabla 3.11); el intervalo de confianza al 95% es de (**3.3632 ≤ x ≤ 3.5588 min.**) En este caso todos los productos sus t_R obtenidos son semejantes al de la sustancia de referencia; confirmando así su presencia.



STD benzoato de sodio

Muestra	t_R (min.)
Aceitunas	3.552
Pepsi	3.461
Coca-cola	3.506



Relacionando las áreas de las muestras comerciales con la Curva de calibración ($r_2 = 0.9942$) se cuantifica su contenido:

Muestra	concentración mg/100 mL	% p/v (g/100 mL)
Aceitunas	288.2	0.288
Pepsi	7.854	0.0078
Coca-cola	8.713	0.0087

En base a las normas alimenticias las bebidas tienen una cantidad aceptable de benzoato ($< 0.1\% \text{ p/v}$). Sin embargo la cantidad de éste en las aceitunas sobrepasa dicho margen.

Como se pudo apreciar con anterioridad el contenido de los compuestos: cafeína, benzoato de sodio y ácido ascórbico en los productos comerciales resulta ser muy parecido entre una columna y otra (CN y C18); por lo que la identificación y cuantificación de dichos analitos se puede realizar utilizando cualquier columna de las que se hace mención.

4.3 Comparación de eficiencia

Ahora se procede a verificar la eficiencia de cada columna (N* y AETP*).

Tabla 4.1: Comparación de eficiencia de las columnas C18 y CN

Compuesto	Muestras	Columna: C18		Columna: CN	
		N	AETP (cm)	N	AETP (cm)
Cafeína	STD	722.08	0.0418	9803.4	0.00255
	Pepsi	861.87	0.0348	8614.97	0.00290
	Coca-cola	851.44	0.0352	8773.22	0.00284
	Cafiaspirina	776.55	0.0386	10122.95	0.00246
	Café Legal	684.89	0.0438	10994.26	0.00227
	Nescafé Decaf	766.90	0.0391	3216.06	0.00778
	Té de limón	1063.59	0.0282	1760.51	0.01420

Compuesto	Muestras	Columna: C18		Columna: CN	
		N	AETP (cm)	N	AETP (cm)
Ácido ascórbico	STD	334.68	0.0899	3716.62	0.00675
	Pepsi	68.41	0.4385	386.72	0.0646
	Coca-cola	59.31	0.5058	377.42	0.0662
	Té de limón	72.44	0.4141	1155.56	0.0216
	Tabletas	281.19	0.1066	7066.84	0.0035
	Fresquibón	109.19	0.2747	6196.10	0.0040
	Jumex	95.85	0.3129	805.05	0.0310

Compuesto	Muestras	Columna: C18		Columna: CN	
		N	AETP (cm)	N	AETP (cm)
Benzoato de sodio	STD	480.95	0.0628	1755.79	0.0143
	Aceitunas	542.94	0.0552	6621.30	0.0037
	Pepsi	542.28	0.0553	1289.13	0.0193
	Coca-cola	431.37	0.0695	1209.05	0.0206

* La fórmula para el cálculo de N y AETP puede consultarse en el Anexo incluido

Comparando los parámetros **N** y **AETP** obtenidos de cada columna se puede apreciar que la columna **CN** es la que tiene una mejor simetría y comportamiento gaussiano en comparación de la **C18** que en algunos cromatogramas presenta picos asimétricos. La columna **CN** es la que cuenta con un valor más alto de platos teóricos y un valor de **AETP** mucho menor en comparación con la columna **C18**; por lo que se puede afirmar que **la columna CN resulta ser más eficiente que la columna C18 para el presente experimento**, ya que a mayor número de platos teóricos (**N**) y un menor valor de altura equivalente al plato teórico (**AETP**) resulta ser más eficiente la separación. (18,14,21)

Viendo con detalle los picos cromatográficos obtenidos en la mayoría de las muestras que identifican a la cafeína en la columna **C18** son algo asimétricos. Esto se puede deber a que la cafeína se encuentra en un estado protonado dado por el pH de trabajo ($H_{caf} \oplus$ $pK_a=10.6$); dicha especie de cafeína puede reaccionar con los silanoles residuales contenidos en la superficie de la columna. Cabe recordar que la silanización es un proceso que se lleva a cabo por reacción de los grupos silanoles con un agente silantinante (clorosilano) en presencia de una amina para eliminar el HCl liberado y catalizar la reacción (Ver Fig.2). Sin embargo dicha reacción no es del todo perfecta ya que por lo regular quedan grupos silanoles sin reaccionar (silanoles residuales) interactuando con el analito en cuestión generando la asimetría de los picos. En cromatografía de fase reversa las formas más disociadas se retienen menos que las no disociadas, por lo que es conveniente desplazar el equilibrio hacia la forma no iónica. Para lograr esto se necesitaría ajustar pH mayores a 7.0, valor incompatible con el material de la columna.

Por último se pudo apreciar que en los productos comerciales **el componente menor retenido es el ácido ascórbico, siguiéndole el benzoato de sodio y por último la cafeína, la cual resulta ser el compuesto más retenido**. Los únicos productos que poseían los 3 componentes en su composición química son las bebidas comerciales Pepsi y Coca-cola; por lo que se procede a calcular la resolución (**Rs**) de éstos haciendo uso de la siguiente fórmula: (21)

$$R_s = \frac{2 (tr B - tr A)}{w A + w B} \quad \text{donde} \quad \begin{array}{l} A = \text{ácido ascórbico} \\ B = \text{benzoato de sodio} \\ C = \text{cafeína} \end{array}$$

Tabla 4.2: Resolución de los componentes (analitos) en gaseosas utilizando columna C18

Muestra	Componente	tr	w	Rs
Pepsi	A	1.280	0.619	A – B 3.557
	B	3.429	0.589	
	C	5.211	0.710	B – C 2.743
Coca-cola	A	1.315	0.683	A – B 3.118
	B	3.401	0.655	
	C	5.69	0.780	B – C 3.190

Tabla 4.3: Resolución de los componentes (analitos) en gaseosas utilizando columna CN

Muestra	Componente	tr	w	Rs
Pepsi	A	2.645	0.538	A – B 2.332
	B	3.761	0.419	B – C 8.048
	C	6.59	0.284	
Coca-cola	A	2.545	0.524	A – B 2.343
	B	3.651	0.420	B – C 8.356
	C	6.58	0.281	

La resolución en ambas columnas es > de 1.5; por lo que existe una buena separación y los componentes están separados con una pureza del 99.65 %. (13,20)

Por lo mostrado anteriormente se pudo separar e identificar con éxito los componentes analizados; sin embargo solo queda mencionar si la cantidad que se cuantificó en c/u es la real. Cabe mencionar que la mayoría de los productos comerciales no tiene indicado un marbete donde nos indique cuanto hay de cada compuesto analizado, solo en el caso de las aceitunas marca Lol-Tun indicaba un contenido neto del 0.1% (p/v) de benzoato de sodio como conservador, obteniéndose un contenido de 0.246% en la columna C18, y 0.288 % (p/v) en la columna CN.

Se procuró incluir en las muestras seleccionadas medicamentos en los que si vienen indicados marbetes con la cantidad de principio activo (analito) y poder calcular la pureza de los mismos. Para la Cafiaspirina se obtiene una pureza del 98.51 %, y de las Tabletas de Vit. C del Dr. Simi nos indica una pureza del 102.9% que son datos obtenidos de la columna C18; para la columna CN los mismos medicamentos obtuvieron un 99.51% para la Cafiaspirina, y un 97.6 % en las Tabletas de Vit. C.

Todo lo anterior se obtuvo por triplicado lo que implica cierto grado de confiabilidad de la metodología propuesta; además que se demuestra la reproducibilidad por ser datos obtenidos de diferentes columnas con diferentes fases móviles. Cabe recordar que todo lo anterior se hizo con el fin de que se logren identificar, separar y cuantificar los analitos en cuestión de manera fácil por así decirlo; tomando en cuenta las condiciones en las que se encuentran los laboratorios para docencia (equipo, material, reactivos, analistas, etc.) que fue uno de los objetivos planteados; para incluirse posteriormente en manuales de prácticas en cursos de Química Instrumental el cual debe considerarse para su posterior validación por docentes y estudiantado.

En resumen, si se quieren obtener buenas separaciones con cromatografía de reparto (HPLC) en un tiempo razonable, las polaridades del soluto, de la fase móvil y de la fase estacionaria se han de armonizar cuidadosamente. Por desgracia la mayoría de estas interacciones son imperfectas, y en el mejor de los casos el analista sólo puede elegir la fase estacionaria de manera general. Una vez hecha la elección, el analista debe realizar una serie de ensayos obteniendo los cromatogramas con varias fases móviles hasta que se llegue a una separación satisfactoria. Si la resolución de los componentes contenidos en la muestra resulta deficiente, se ha de elegir otro tipo de columna.

CAPÍTULO IV

“CONCLUSIONES”

CONCLUSIONES

- Se logró la identificación, separación y cuantificación del ácido ascórbico, benzoato de sodio y cafeína contenidos en los productos comerciales por HPLC mediante Curvas de calibración.
- Se propuso una técnica sensible para la determinación de dichos compuestos por HPLC en fase reversa.
- La separación de los compuestos ácido ascórbico, benzoato de sodio y cafeína resulta ser más eficiente utilizando la columna CN.
- El método por Curva de calibración en donde el área de pico tiene comportamiento lineal está directamente relacionada a la concentración del analito.
- Este método cumple con los requerimientos de Reproducibilidad, Sensibilidad, linealidad que son los puntos mínimos de una metodología, por lo que debe considerarse para su posterior validación y documentación.
- Con esto se da pie a la elaboración de un manual de prácticas por HPLC el cual se utilizará en prácticas a nivel docencia.

CAPÍTULO V

“ANEXOS”

ANEXO I: PARÁMETROS COMÚNMENTE UTILIZADOS EN HPLC

Debido a que la cromatografía es principalmente un método de separación, no puede usarse para identificar compuestos sin compararse con una sustancia de referencia (**Ej. un estándar**). Para un análisis cualitativo debe determinarse el **tr** que se obtiene del pico de una sustancia conocida. Cuando el pico de una muestra (**analito**) aparece al mismo tiempo comparándose con la sustancia de referencia (**STD**) bajo las mismas condiciones experimentales, la probabilidad de una identificación correcta es muy alta (21).

Una medida de la eficiencia de una columna en particular es conocer se puede estimar calculando el número de platos teóricos (**N**) utilizando la siguiente ecuación:

$$N = \frac{16 (t_R)^2}{w}$$

donde **tr** es el tiempo de retención de la sustancia y **w** es el ancho de pico obtenido medido desde los lados del pico hasta la línea base. El valor de **N** es dependiente de la sustancia a analizar y de las condiciones de operación tales como la velocidad de flujo, la temperatura, la cantidad del empaque de la columna y la uniformidad de ésta.

Como una medida de la eficiencia de la separación de dos componentes en una mezcla, la resolución (**Rs**) se determina por la siguiente ecuación:

$$R_s = \frac{2 (t_R B - t_R A)}{w A + w B}$$

donde **trB** y **trA** son los tiempos de retención para los componentes y **wA** y **wB** son los anchos correspondientes de los picos. Este factor es importante para asegurar la separación de dos componentes que eluyen muy cercano uno de otro y se establece la eficiencia del sistema. Si el valor de éste es > 1.5 se dice que hay una buena separación entre los componentes.

El factor de capacidad (**K'**) nos indica cuánto interactúa la muestra con ambas fases (estacionaria y móvil). A valores altos de **K'** hay una mejor separación. Su cálculo se realiza con la siguiente fórmula:

$$K' = \frac{(t_R - t_0)}{t_0}$$

tr es el tiempo de retención de la sustancia analizada, y **to** es el tiempo muerto debido a una señal o ruido del equipo.

Con respecto al cálculo de la altura equivalente a un plato teórico (**AETP**) está dada por:

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

donde **L** es la longitud de la columna (tamaño), y **N** es el número de platos teóricos. Los valores obtenidos de **AETP** y **N** se utilizan para evaluar la eficiencia de una columna. Si **N** es mayor y **AETP** es menor se dice que es más eficiente la separación. (6,7)

ANEXO II

Tabla 5.1: Lista de disolventes utilizados en HPLC

Disolvente	Índice de polaridad	Longitud de onda de corte	Solubilidad en agua % p/p
Ácido acético	0.62	230	100
Acetona	5.10	330	100
Acetonitrilo	5.80	190	100
Benceno	2.70	280	0.18
CCl ₄	1.60	263	0.08
Cloroformo	4.10	245	0.815
Etanol	6.20	210	100
Metanol	5.10	205	100
Tolueno	2.40	285	0.051
Agua	9.00	200	100
Xileno	2.50	290	0.018
Acetato de etilo	4.40	260	8.7
Heptano	0.00	200	0.0003
Hexano	0.00	200	0.001

Tabla 5.2: Absorbancias obtenidas de estándares de ácido ascórbico, benzoato de sodio y cafeína en fase móvil MeOH/H₂O a pH=5.0 en Columna C18

λ nm	Absorbancias		
	Ácido ascórbico	Cafeína	Benzoato de sodio
190	0.12	0.19	0.14
200	0.15	0.17	0.15
210	0.17	0.20	0.17
220	0.27	0.30	0.20
230	0.39	0.37	0.27
240	0.48	0.48	0.33
250	0.62	0.57	0.41
260	0.72	0.68	0.48
270	0.82	0.70	0.48
280	0.83	0.71	0.45
290	0.79	0.67	0.38
300	0.59	0.50	0.26
310	0.40	0.38	0.20
320	0.35	0.26	0.10

Tabla 5.3: Absorbancias obtenidas de estándares de ácido ascórbico, benzoato de sodio y cafeína en fase móvil ACN/H₂O a pH=5.0 en Columna CN

λ nm	Absorbancias		
	Ácido ascórbico	Cafeína	Benzoato de sodio
190	0.15	0.23	0.15
200	0.19	0.20	0.17
210	0.22	0.25	0.21
220	0.30	0.36	0.26
230	0.42	0.45	0.31
240	0.59	0.55	0.41
250	0.70	0.66	0.48
260	0.81	0.72	0.55
270	0.88	0.78	0.58
280	0.86	0.77	0.59
290	0.78	0.69	0.51
300	0.62	0.57	0.32
310	0.51	0.39	0.27
320	0.40	0.30	0.19

ANEXO III

Preparación de soluciones

*** Soluciones estándar de ácido ascórbico, benzoato de sodio y cafeína:**

Se prepararon stock's de ácido ascórbico, benzoato de sodio y cafeína en una proporción de 2,4,6,8 y 10 ppm.

Calibrada la balanza analítica se pesaron aprox. 100 mg (*considerando la pureza*) de los respectivos estándares y se disolvieron con H₂O desionizada para posteriormente aforarlos en un matraz de 100 mL.

$$100 \text{ mg} / 100 \text{ mL} = 1 \text{ mg/mL} = 1,000 \text{ ppm} *$$

De la solución anterior se tomó una alícuota de 10 mL y se aforó con 100 mL de agua desionizada

$$1,000 \text{ ppm} \frac{10 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} = 100 \text{ ppm}$$

Con pipetas volumétricas de 1,2,3,4 y 5 mL se tomaron las respectivas alícuotas y fueron llevadas a un aforo de 50 mL con fase móvil para posteriormente vaciarlas en recipientes y rotularlas con su respectiva concentración.

$$100 \text{ ppm} \frac{1 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} = 2 \text{ ppm}$$

$$100 \text{ ppm} \frac{2 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} = 4 \text{ ppm}$$

$$100 \text{ ppm} \frac{3 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} = 6 \text{ ppm}$$

$$100 \text{ ppm} \frac{4 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} = 8 \text{ ppm}$$

$$100 \text{ ppm} \frac{5 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} = 10 \text{ ppm}$$

* ppm = $\mu\text{g/mL}$ ó mg/L

Preparación de soluciones

*** Fase móvil – MeOH/Agua**

Se preparó un total de 500 mL de fase móvil en una proporción 20:80 de metanol/agua para la cual se utilizó 400 mL de agua desionizada y se le agrega 100 mL de metanol grado HPLC y se ajusta el pH a 5.0 (a 25 °C) con HCl 0.5 M. Se filtra por una membrana de 0.44 μm al vacío para posteriormente colocarse en ultrasonido de 10 a 15 min. Se guarda la disolución en un recipiente cerrado y protegido de la luz.

*** Fase móvil CH₃CN/Agua**

Se preparó un total de 500 mL de fase móvil en una proporción 6:94 de acetonitrilo/agua para la cual se utilizó 470 mL de agua desionizada y se le agrega 30 mL de acetonitrilo grado HPLC y se ajusta el pH a 5.0 (a 25 °C) con HCl 0.5 M. Se filtra por una membrana de 0.44 μm al vacío para posteriormente colocarse en ultrasonido de 10 a 15 min. Se guarda la disolución en un recipiente cerrado y protegido de la luz.

*** Disolución de HCl 0.5 M**

Se toman con una pipeta volumétrica 4.0 mL de HCl concentrado ($\delta = 1.19 \text{ g/mL}$; 37.7% de pureza) y se aforan en un matraz de 100 mL. Posteriormente se vacía la solución y se guarda en un recipiente cerrado y protegido de la luz.

Anexo IV

Tabla 6.1: Valores de la t de Student

Grados de libertad	% Nivel de confianza		
	90	95	99
1	6.314	12.706	63.657
2	2.920	4.303	9.925
3	2.353	3.182	5.841
4	2.132	2.776	4.604
5	2.015	2.571	4.032
6	1.943	2.447	3.707

Fuente: Harris, Daniel. *Análisis Químico Cuantitativo*
Ed. Iberoamericana.1999, pp.53

ÍNDICE DE TABLAS

CONTENIDO	Pág.
Tabla 1.1. Comparaciones de las tres principales Curvas para la cuantificación de analitos utilizadas en Química Analítica	15
Tabla 1.2. Propiedades del ácido ascórbico, benzoato de sodio y cafeína utilizados en la industria alimenticia	17
Tabla 2.1. Condiciones experimentales de trabajo	27
Tabla 2.2. Linealidad del Sistema para el STD de cafeína en columna C ₁₈	28
Tabla 2.3. Linealidad del Sistema para el STD de cafeína en columna CN	29
Tabla 2.4. Áreas obtenidas del STD de cafeína a la 1ª semana de la experimentación en columna C ₁₈	30
Tabla 2.5. Áreas obtenidas del STD de cafeína a la 2ª semana de la experimentación en columna C ₁₈	30
Tabla 2.6. Áreas obtenidas del STD de cafeína a la 3ª semana de la experimentación en columna C ₁₈	30
Tabla 2.7. Áreas obtenidas de mts. comerciales que contienen cafeína a la 1ª semana de la experimentación en columna C ₁₈	31
Tabla 2.8. Áreas obtenidas de mts. comerciales que contienen cafeína a la 2ª semana de la experimentación en columna C ₁₈	31
Tabla 2.9. Áreas obtenidas de mts. comerciales que contienen cafeína a la 3ª semana de la experimentación en columna C ₁₈	31
Tabla 2.10. Áreas obtenidas del STD de cafeína a la 1ª semana de la experimentación en columna CN	32
Tabla 2.11. Áreas obtenidas del STD de cafeína a la 2ª semana de la experimentación en columna CN	32
Tabla 2.12. Áreas obtenidas del STD de cafeína a la 3ª semana de la experimentación en columna CN	32
Tabla 2.13. Áreas obtenidas de mts. comerciales que contienen cafeína a la 1ª semana de la experimentación en columna CN	33
Tabla 2.14. Áreas obtenidas de mts. comerciales que contienen cafeína a la 2ª semana de la experimentación en columna CN	33
Tabla 2.15. Áreas obtenidas de mts. comerciales que contienen cafeína a la 3ª semana de la experimentación en columna CN	33

Tabla 3.1 Intervalos de confianza al 95% para la identificación de cafeína, ácido ascórbico y benzoato de sodio en columna C ₁₈	37
Tabla 3.2 Intervalos de confianza al 95% para la identificación de cafeína, ácido ascórbico y benzoato de sodio en columna CN	37
Tabla 3.3. Curva de Calibración para el STD de cafeína en columna C ₁₈	39
Tabla 3.4. Curva de Calibración para el STD de ácido ascórbico en columna C ₁₈	39
Tabla 3.5. Curva de Calibración para el STD de benzoato de sodio en columna C ₁₈	40
Tabla 3.6. Cuantificación de cafeína contenida en las muestras problema en columna C ₁₈	40
Tabla 3.7. Cuantificación de ácido ascórbico contenido en las muestras problema en columna C ₁₈	40
Tabla 3.8. Cuantificación de benzoato de sodio contenido en las muestras problema en columna C ₁₈	40
Tabla 3.9. Curva de Calibración para el STD de cafeína en columna CN	41
Tabla 3.10. Curva de Calibración para el STD de ácido ascórbico en columna CN	41
Tabla 3.11. Curva de Calibración para el STD de benzoato de sodio en columna CN	42
Tabla 3.12. Cuantificación de cafeína contenida en las muestras problema en columna CN	42
Tabla 3.13. Cuantificación de ácido ascórbico contenido en las muestras problema en columna CN	42
Tabla 3.14. Cuantificación de benzoato de sodio contenido en las muestras problema en columna CN	42
Tabla 4.1. Comparación de eficiencia de las columnas C ₁₈ y CN	54
Tabla 4.2. Resolución de los componentes (analitos) en gaseosas utilizando columna C ₁₈	55
Tabla 4.3. Resolución de los componentes (analitos) en gaseosas utilizando columna CN	56
Tabla 5.1. Lista de disolventes utilizada en HPLC	61
Tabla 5.2. Absorbancias obtenidas de estándares de ácido ascórbico, benzoato de sodio y cafeína en fase móvil MeOH/H ₂ O a μ H=5.0 en Columna C ₁₈	61
Tabla 5.3. Absorbancias obtenidas de estándares de ácido ascórbico, benzoato de sodio y cafeína en fase móvil ACN/H ₂ O a μ H=5.0 en Columna CN	62
Tabla 6.1. Valores de la t de Student	65

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS

CONTENIDO	Pág.
Figura 1: Equipo de HPLC	7
Figura 2: Representación simplificada de los grupos silanol	9
Figura 3: Componentes principales en un equipo de HPLC	10
Figura 4: Cromatograma	12
Figura 5: Pasos a seguir en un análisis por HPLC	14
Figura 6: Aplicaciones típicas de Cromatografía de fase enlazada	15
Figura 7: Estructura química de la cafeína	18
Figura 8: Estructura química del ácido ascórbico (Vit. C)	18
Figura 9: Estructura química del ácido benzoico/benzoato de sodio	19
Gráfico 1.1: Espectro de absorción de cafeína, ácido ascórbico y benzoato de sodio en columna C ₁₈	26
Gráfico 1.2: Espectro de absorción de cafeína, ácido ascórbico y benzoato de sodio en columna CN	26
Gráfico 2.1: Linealidad del Sistema para el STD de cafeína en columna C ₁₈	28
Gráfico 2.2: Linealidad del Sistema para el STD de cafeína en columna CN	28
Gráfico 3.1: Curva de calibración para el STD de cafeína en columna C ₁₈	39
Gráfico 3.2: Curva de calibración para el STD del ácido ascórbico en columna C ₁₈	39
Gráfico 3.3: Curva de calibración para el STD de benzoato de sodio en columna C ₁₈	40
Gráfico 3.4: Curva de calibración para el STD de cafeína en columna CN	41
Gráfico 3.5: Curva de calibración para el STD del ácido ascórbico en columna CN	41
Gráfico 3.6: Curva de calibración para el STD de benzoato de sodio en columna CN	42

ABREVIATURAS

CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HPLC	Acrónimo del idioma inglés (High Performance Liquid Chromatographic) para cromatografía de líquidos de alta resolución
UV	Espectrometría de absorción en el ultravioleta
AEPT	Altura equivalente de platos teóricos
N	Número de platos teóricos
ACN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
G.R.	Grado reactivo
STD	Estándar
mta.	Muestra
C.V.	Coefficiente de variación
V _{peq.}	Volumen en el punto de equivalencia
λ	Longitud de onda
AOAC	Association of Official Analytical Chemistry
CDTDA	Centro de Difusión Tecnológica de la Alimentación
pp.	Páginas
ppm	Partes por millón
$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Microgramos/ microlitros
pH	Potencial hidrógeno
USP	Siglas en inglés de la farmacopea de los Estados Unidos (United States Pharmacopea)
Fig.	Figura
MO	Microorganismo
Ej.	Ejemplo
t _R	tiempo de Retención
min.	minutos
ODS	Octadecilsilano

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

GLOSARIO

- **Absorción:** Proceso que ocurre cuando una sustancia penetra en otra. La *adsorción* es un fenómeno de superficie; la *absorción* es una mezcla o interpenetración de dos sustancias.
- **Adsorción:** proceso que ocurre cuando una sustancia queda retenida en la superficie de otra. Este fenómeno es común en la cromatografía.
- **Cromatografía:** técnica en la cual las moléculas del soluto de una fase móvil se separan debido a la diferencia de afinidad que presenta por la fase estacionaria. Cuando mayor sea la afinidad por la fase estacionaria, mayor será el tiempo de retención durante el cual la molécula es retenida.
- **Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución:** técnica cromatográfica en la que se utilizan partículas muy finas en la fase estacionaria y un dispositivo de alta presión (bomba) para forzar al solvente a circular en la columna.
- **Curva de calibración:** gráfica que muestra el valor de alguna propiedad en función de la concentración del analito. Cuando se determina la propiedad correspondiente de una sustancia problema, su concentración puede obtenerse de la gráfica.
- **Detector de ultravioleta:** detector para cromatografía de líquidos que mide la absorbancia en el UV de los solutos que emergen de la columna.
- **Elusión:** proceso que consiste en hacer pasar un líquido o un gas por una columna cromatográfica.
- **Elusión isocrática:** es una separación donde se utiliza un sólo disolvente como fase móvil.
- **Elusión por gradiente:** la composición de la fase móvil varía progresivamente para incrementar la fuerza eluotrópica del solvente; o sea para hacer una elusión suficientemente rápida de todos los componentes y la eficacia en la separación aumenta notablemente.
- **Fase Normal:** es una separación cromatográfica en la que se utiliza una fase estacionaria polar u una fase móvil de polaridad menor.
- **Fase reversa:** técnica en la cual la fase estacionaria es menor polar que la fase móvil. El 75% de todas las cromatografía líquidas son separaciones de fase inversa, debido a que éstas hacen excelentes separaciones, eliminan la formación de colas en los picos y es menos sensible a las impurezas polares (agua) en el eluyente.
- **Fuerza eluotrópica:** medida de la energía de adsorción de un solvente sobre la fase estacionaria en la cromatografía. A mayor fuerza eluotrópica con mayor rapidez eluye el solvente y los solutos de la columna.
- **Interpolación:** (dentro) estimación del valor de una cantidad que se sitúa entre dos valores conocidos
- **Ley de Beer:** es una ley que relaciona la absorbancia (A) de una mta. con su concentración (c), la trayectoria recorrida (b) y la absortividad molar (E). Dando esto que $A = Ebc$. La ley de Beer se aplica a soluciones diluidas en las cuales la especie absorbente no participa en un equilibrio dependiente de la concentración. El color de una solución es el complemento del color de la luz que absorbe.

BIBLIOGRAFÍA

1. Skoog, Holler. Fundamentos de Química Analítica. 4ª edición. Editorial Reverte, S.A. 2001. pp. 664-710.
2. Bejan, John. *Fundamentos de Farmacología*. 2ª. Edición. Harla S.A. de C.V.1992. pp. 338-339
3. Tesis - Flores, Alejandra. Obtención de Diclofenaco Metílico y su Determinación por Cromatografía de Gases. FESC-UNAM., México 2001.
4. Skoog, Holler. Principios de Análisis Instrumental. 5ª edición. España, 2001. pp. 800-802.
5. Harris, Daniel. Análisis Químico Cuantitativo. Ed. Iberoamericana, S.A. de C.V. México, D.F. 1999. pp. 619-621, 624-631.
6. John, Adamovics. Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals. Vol. 49. Difusión científica. México, D.F. 1997. pp. 50-53
7. H. M. McNair y B. Esquivel. Cromatografía líquida de alta presión. Monografía científica de la OEA.
8. K. Helrich (Editor). Official Methods of the Association of Official Analytical Chemistry (AOAC Official Methods of Analysis), 15 th. Ed., Vol. 2. 1990. pp. 752.
9. M. F. Delaney, K. M. Pasko, D. M. Mauro, D. S. Gsell, P. C. Korologos, J. Morawski, L. J. Krolkowski, F. V. Warren Jr. *J. Chem Ed.*, 1985. pp. 62, 618.
10. J. E. DiNunzio. *J. Chem Ed.*, 1986. pp. 62, 446.
11. V. L. McDevitt, A. Rodríguez, K. R. Williams. *J. Chem Ed.*, pp. 75, 625. 1998.
12. Alan H. Varnam. Bebidas, Tecnología, Química y Microbiología. Serie 2 Ed. Acribia, S.A. España. 1994. pp. 80-82, 92-96, 241-244.
13. Métodos Instrumentales de Análisis". Willard, Merritt. 1996
14. Manual de Prácticas de Química Analítica. UAM. 2000
15. Jonh A. Adamovics. Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals. Vol. 49 Difusión científica. México, D.F. 1990
16. Manual de Prácticas de Análisis de Medicamentos. UAM. 2000.
17. García E. P. Curso Básico de Cromatografía. FESC/UNAM, 1989.
18. Varcarcel, M. Técnicas Analíticas de Separación. Reverté,, México. 1988.
19. Willard T. H. Métodos de Separación para el Análisis. Gpo. Iberoamericana, México. 1990.
20. Quattrochi A. introducción al HPLC, Artes Gráficas S.A. California.1992
21. USP 26. United Stated Pharmacopeial. Ed. United States Pharmacopeial Convention, Inc. 2002.