

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Diplomado de Cromatografía de líquidos de alta resolución

**EFFECTO DE LA VELOCIDAD DE FLUJO EN LA
SEPARACIÓN DE METIL, PROPIL Y BUTILPARABENO
POR CLAR EMPLEANDO FASE REVERSA Y
DETECCION UV.**

ALUMNA:

JUÁREZ MEJIA BEATRIZ

PROFESOR:

Dr. Juan Carlos Vázquez Lira



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.

INDICE

	Pag
2. Introducción	1
3. Marco teórico	2
3.1 Generalidades sobre la cromatografía	2
3.2 Objetivo de la cromatografía	3
3.3 Técnica de separación cromatográfica	4
3.4 Mecanismo de la separación	4
3.5 Selección del modo cromatográfico	6
3.6 Clasificación de la cromatografía	8
3.6.1 Cromatografía líquida	9
3.6.1.1 Cromatografía sólido- líquido o de adsorción	10
3.6.1.2 Cromatografía liquido-líquido o de Reparto	10
3.6.1.3 Cromatografía de Intercambio Iónico	11
3.6.1.4 Cromatografía de Exclusión	12
3.6.1.5 Cromatografía de Afinidad	13
3.6.1.6 Cromatografía de pares iónicos	13
3.6.1.7 Cromatografía micelar	14
3.6.2 Cromatografía de gases	14
3.6.2.1 Cromatografía gas-líquido	14
3.6.2.2 Cromatografía gas-sólido	14
3.6.3 Cromatografía de fluidos supercríticos	14
3.7 Cromatografía de líquidos de fase enlazada	15
3.7.1 Cromatografía de líquidos de fase normal	15
3.7.2 Cromatografía de líquidos en fase reversa	15
3.7.2.1 Aplicaciones de la cromatografía en fase reversa	16
3.8 Campo de aplicación de CLAR	17
3.9 Componentes de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución	19
3.9.1 Fase móvil	19
3.9.1.1 Características de los disolventes empleados en CLAR	20
3.9.1.2 Programación de la fase móvil	21
3.9.2 Sistema de bombeo	22
3.9.3 Sistema de inyección	23
3.9.4 Columna	24
3.9.4.1 Fuentes que dañan una columna de CLAR	25
3.9.4.2 Tipos de fase estacionaria	25
3.9.5 Detectores	26
3.10 Optimización de un análisis	28
3.11 Cromatograma	29
3.12 Parámetros cromatográficos	30
3.12.1 Tiempo de retención (t_R)	30
3.12.2 Tiempo muerto (t_M)	30
3.12.3 Tiempo de retención reducido (t'_R)	30
3.12.4 Volumen de retención (V_R)	30

3.12.5 Volumen muerto (V_M)	30
3.12.6 Resolución (R_s)	31
3.12.6.1 Factores que afectan la resolución	32
3.12.7 Plato teórico (N)	32
3.12.7.1 Variables que afectan la eficacia	33
3.12.8 Longitud de la columna (L)	34
3.12.9 Altura del plato teórico (H)	34
3.12.10 Altura de plato reducida (h)	35
3.12.11 Factor de selectividad (α)	35
3.12.12 Factor de capacidad	36
3.12.13 Velocidad lineal (u)	37
3.12.14 Coeficiente de reparto	37
3.12.15 Asimetría	37
3.13 Aplicaciones Cualitativas	38
3.14 Aplicaciones Cuantitativas	39
3.14.1 Adición estándar	39
3.14.2 Normalización interna	40
3.14.3 Patrón interno	40
3.15 Adecuabilidad del sistema	41
3.16 Parabenos	42
3.16.1 Metilparabeno	43
3.16.2 Propilparabeno.	43
3.16.3 Butilparabeno	44
4. Planteamiento del problema	45
5. Objetivo	46
6. Hipótesis	47
7. Parte experimental	48
7.1 Equipo	48
7.2 Material	48
7.3 Reactivos	48
7.4 Condiciones	48
7.5 Metodología	49
8. Resultados	50
9. Análisis de resultados	54
10. Conclusiones	58
11. Bibliografías	59

RESUMEN

En el presente trabajo se describe un método por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa para separar una mezcla de parabenos modificando las condiciones cromatográficas.

El procedimiento consistió en inyectar una mezcla de metilparabeno, butilparabeno y propilparabeno, en un sistema de fase reversa, con detección ultravioleta (254nm), comparando una elución isométrica de flujo con un gradiente de esta propiedad. Con los resultados obtenidos, el gradiente de flujo es el más adecuado para separar la mezcla de parabenos, ya que cumple con la adecuabilidad del sistema establecido por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

2. Introducción

En la actualidad la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) ha llegado a ser una de las técnicas de laboratorio moderno más importante como herramienta para separar y detectar compuestos químicos. No está limitada por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra en comparación con otros métodos analíticos, y es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de fármacos y/o sus metabolitos. Es útil también para separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de otros grupos polifuncionales como los que presentan los fármacos y/o metabolitos a partir de materias primas, formas farmacéuticas o en fluidos biológicos.

La CLAR representa el mayor mercado en el mundo instrumental analítico. La popularidad de esta metodología se debe a su gran versatilidad, excelente capacidad para el análisis de trazas (en muchos casos ppb), rapidez y adaptabilidad al análisis cuantitativo. La CLAR se utiliza en casi todos los laboratorios industriales, organismos oficiales, universidades y en todos los laboratorios donde se realicen investigaciones químicas o bioquímicas. En los años venideros la CLAR continuará jugando un papel predominante en los laboratorios de investigaciones farmacéuticas.¹

3. Marco teórico

3.1 Generalidades sobre la cromatografía

La cromatografía es una técnica que se utiliza para separar mezcla de sustancias y se basa en la velocidad de desplazamiento diferencial de los mismos que se establece al ser arrastrados por una fase móvil (líquida o gaseosa) a través de un lecho cromatográfico que contiene la fase estacionaria, la cual puede ser líquida o sólida. Los componentes que se desean separar por cromatografía deberán ser solubles en la fase móvil y ser capaces de interaccionar con la fase estacionaria a través de diversos mecanismos tales como la adsorción, intercambio iónico, asociación, complejación o por simple tamiz molecular.

La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido. Si es un sólido, ha de estar finamente dividido (superficie específica elevada). Si es un líquido, para conseguir la inmovilidad del mismo, se utiliza un sólido poroso inerte finamente dividido, el cual se cubre con una película de líquido. La fase móvil puede ser gaseosa o líquida. Atendiendo a la naturaleza de la fase estacionaria y fase móvil.

La cromatografía es probablemente la más versátil de las técnicas de separación: es aplicable a cualquier mezcla soluble o volátil. ²

La cromatografía se convirtió en un método de análisis cuando se tuvo la idea de instalar a la salida de la columna un dispositivo para monitorizar, en función del tiempo, un parámetro que permitiera localizar los cambios de composición de la fase móvil: de este modo podemos conocer el tiempo de migración de los compuestos. Esta modificación a la cromatografía, cuyo objetivo no fue el de recuperar los compuestos, sino cuantificarlos apareció en los cuarenta.

La identificación de un compuesto por cromatografía corresponde a un método comparativo. Si se dispone de un compuesto del que no se sabe si se trata de

A o B, su identificación por el método cromatográfico consistirá en comparar su tiempo de migración con el correspondiente a dos compuestos de referencia A y B, esto, sin cambiar de instrumentación y colocándolos en las mismas condiciones.

Este procedimiento particular de fraccionamiento ha nacido bajo su forma moderna a principios de este siglo con los trabajos del botánico Mikhail Tswett, a quien se le atribuye la invención de los términos de cromatografía y cromatograma.

La técnica ha mejorado considerablemente desde sus principios. Actualmente se dispone de cromatógrafos que reúnen alrededor de una columna optimizada y miniaturizada, todo un conjunto de accesorios destinados a asegurar la repetibilidad de las experiencias sucesivas mediante un perfecto control de los diferentes parámetros de separación. Para análisis sucesivos de una misma muestra, realizados en condiciones idénticas a diferentes intervalos, los tiempos de retención son reproducibles con variaciones de pocos segundos.^{3,4}

3.2 Objetivo de la cromatografía

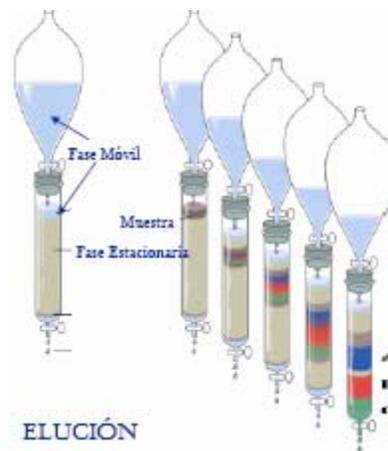
El principal objetivo de la cromatografía es separar los componentes de una muestra. Dicha separación depende de los anchos de los picos y de los espaciamientos de tiempo y volumen entre picos. Como resultado se puede obtener, una separación eficaz de pares de componentes con bandas angostas o anchas.

Esta preferencia hacia las bandas angostas se cuantifica mediante el parámetro de eficiencia cromatográfica.⁵

3.3 Técnica de separación cromatográfica

Por técnicas de separación cromatográficas se entienden las formas de poner en contacto las muestras problema con la fase móvil y estacionaria, la más habitual es la técnica de elución. La cromatografía de elución consiste en que una única porción de la muestra disuelta en la fase móvil se introduce en la parte superior de la columna (donde se encuentra la fase estacionaria), después de lo cual la mezcla se distribuye entre ambas fases.

Seguidamente, se agrega de forma continua fase móvil (eluyente), lo que hace avanzar la muestra dentro de la columna en una serie de transiciones entre la fase móvil y estacionaria. El movimiento de los solutos (componentes de la mezcla) tiene lugar sólo en la fase móvil y la velocidad media de avance depende del tiempo que el soluto permanece en esta fase.⁶



3.4 Mecanismo de la separación

El proceso de separación depende de diversos mecanismos que se relacionan directamente con la naturaleza química de la fase estacionaria, los solutos de interés y la fase móvil.

Por lo tanto la retención se debe a la competencia que se establece entre:

Fase móvil-Superficie adsorbente

Analito-Superficie Adsorbente

Si las fuerzas de interacción de la fase estacionaria con el analito son débiles, este será poco retenido y eluirá cerca de el tiempo muerto. En cambio, si la interacción es muy fuerte su elución se verá retardada e incluso puede quedar retenido en la fase estacionaria, sin eluir del sistema.

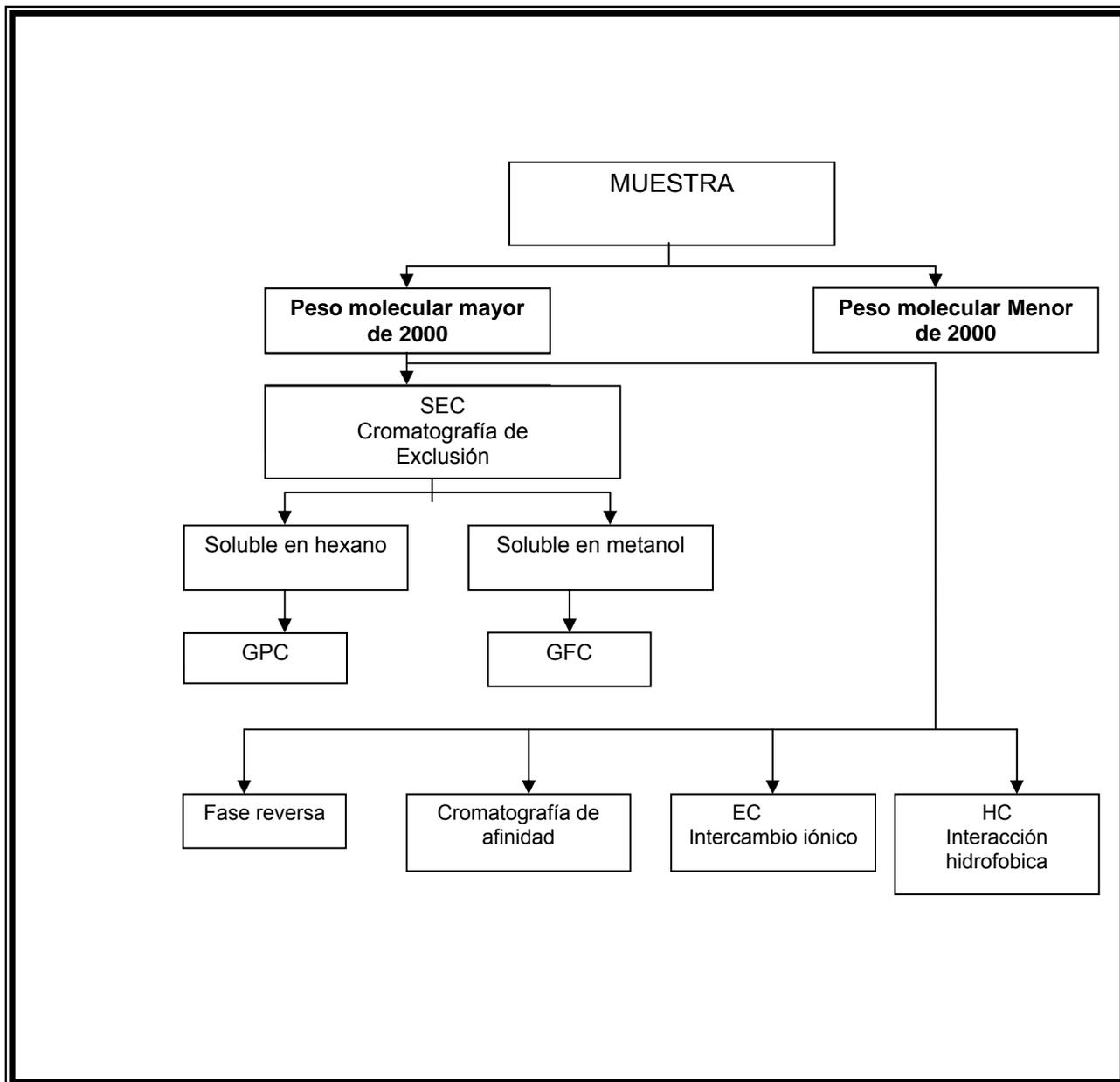
El proceso de adsorción de los analitos sobre una fase estacionaria polar como la sílice o la alúmina esta gobernado por interacciones específicas entre los grupos polares de la superficie adsorbente y los del analito. Las interacciones más representativas son: ^{1,7}

- **Interacción dipolo-dipolo:** esto es usual para los solventes polares, como agua, metanol y acetonitrilo. A causa de la diferencia de electronegatividad existente entre algunos agrupamientos, se produce una localización de carga, formándose un dipolo de tipo permanente.
Si la molécula del soluto es polar, se vera atraída por los dipolos de la fase móvil y se unirá eletrostaticamente a ellos, siendo eluida.⁸

- **Interacción por puentes de hidrógeno:** El establecimiento de puentes de hidrógeno entre fase móvil y solutos adquiere más importancia si es mayor la capacidad donadora del dador de protones y, por otro lado la capacidad aceptora de las moléculas. La probabilidad de que surja enlaces por puentes de hidrógeno será mas considerable cuando las moléculas dadoras sean ácidos, y las aceptoras, de naturaleza mas bien básica.⁸

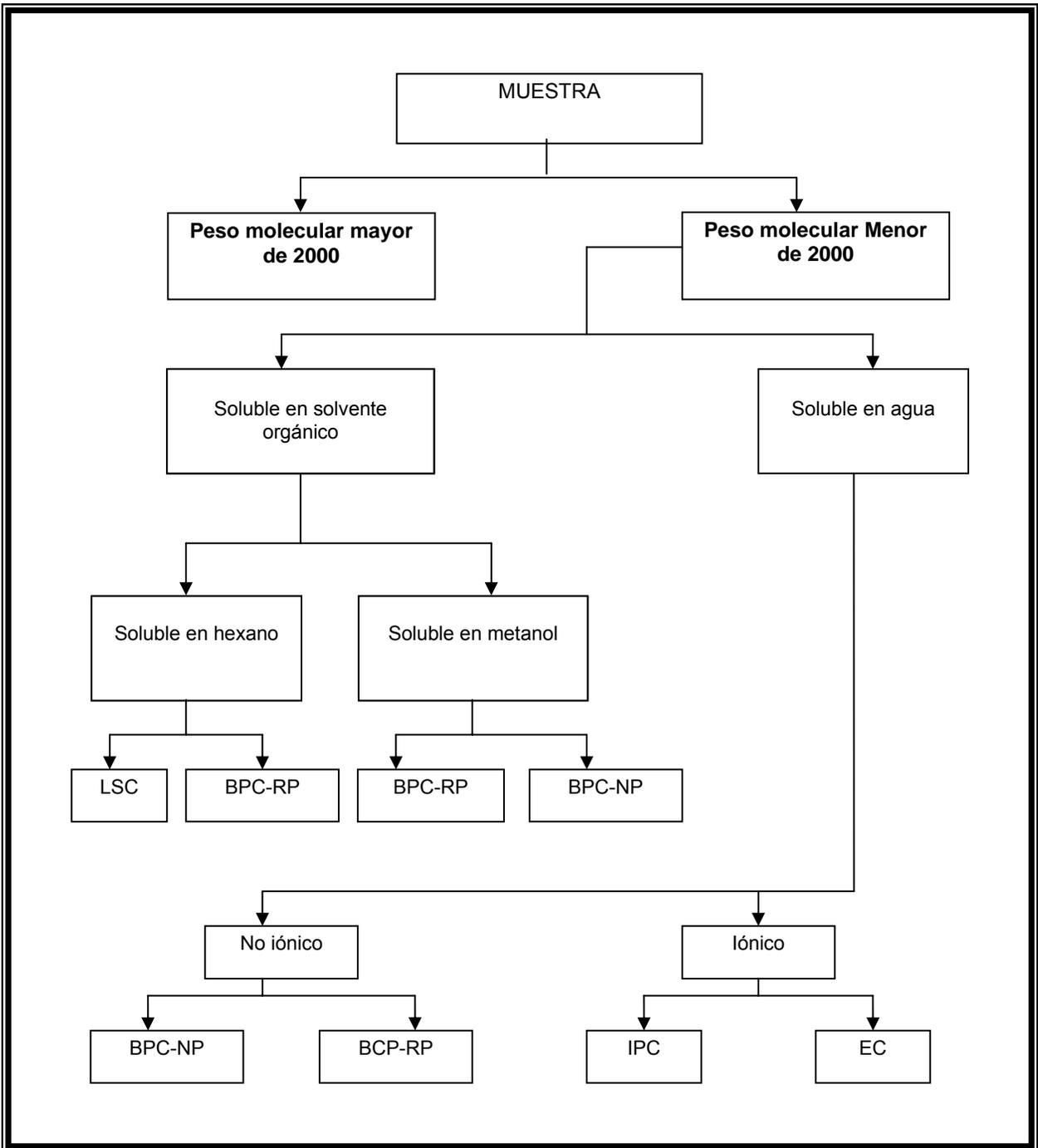
3.5 Selección del modo cromatográfico.⁹

En la figura 1A Y 1B, se representa esquemáticamente una metodología general para la selección de una modalidad de separación cromatográfica.



GPC= cromatografía de permeación de gel GFC= cromatografía de filtración de gel

Figura 1 A. Selección de modalidades cromatográficas.



LSC= cromatografía fase normal de absorción
BPC-RP= Cromatografía de fase reversa enlazada
BPC-NP= Cromatografía de fase normal enlazada
IPC= cromatografía de pares iónicos
IEC= cromatografía de intercambio iónico

Figura 1 B. Selección de modalidades cromatográficas.

3.6 Clasificación de la cromatografía

En la figura 2, se representa una clasificación de la cromatografía con base en el tipo de fase estacionaria y el tipo de equilibrio involucrado.

Clasificación general	Técnicas específicas	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Cromatografía de líquidos(LC) (fase móvil: líquida)	Líquido-líquido	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre líquidos inmiscibles
	Líquido-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
	Líquido-sólido o adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio iónico	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un sólido polímero	Distribución /exclusión
Cromatografía de gases(GC) (fase móvil: gas)	Gas-líquido	Líquido absorbido entre un sólido	Distribución entre un gas y un líquido
	Gas-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
	Gas-sólido	Sólido	Adsorción
Cromatografía de fluidos supercríticos(SFC) (fase móvil: fluido supercrítico)		Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el fluido supercrítico y la superficie enlazada

Figura 2. Clasificación de técnicas cromatográficas.

3.6.1 Cromatografía líquida

Como su nombre lo indica, la cromatografía de líquidos, emplea una fase móvil líquida. La gran ventaja de la cromatografía de líquidos reside en la comparación de diversas propiedades de las fases móviles con distintas fases estacionarias y diversos detectores.¹⁰ La cromatografía de líquidos abarca diversas técnicas y muchas de ellas se clasifican con más de un nombre. El proceso de separación cromatográfica puede definirse como la transferencia de masas entre una fase estacionaria y una móvil. La mezcla que contiene los compuestos a separar es disuelta e inyectada en una columna rellena de fase estacionaria a través de la cual es forzada a pasar por una fase móvil impulsada por una bomba de alta presión. Dentro de la columna la mezcla se separa en sus componentes en función de su interacción entre las dos fases. Esta separación puede ser modificada eligiendo adecuadamente tanto la fase móvil como la estacionaria, el flujo de la fase móvil o la temperatura de la separación. De esta forma la técnica de HPLC adquiere un alto grado de versatilidad difícil de encontrar en otras técnicas, siendo capaz de separar los componentes de una gran variedad de mezclas.²

La cromatografía de líquidos de alta resolución no está limitada por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra en comparación con la cromatografía de gases (CG) y es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de otros grupos polifuncionales como los que presentan los fármacos y/o metabolitos.

La separación por cromatografía de líquidos es el resultado de la interacción de las moléculas de la muestra entre la fase móvil y la estacionaria. La recuperación de la muestra es fácil si así lo requiere el análisis.

3.6.1.1 Cromatografía sólido- líquido o de adsorción

Usa una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida o gaseosa. El soluto se adsorbe en la superficie de las partículas sólidas. La separación de los diferentes solutos se explica por equilibrio entre las fases estacionaria y móvil.⁴

Si la muestra es soluble en disolventes no polares o moderadamente polares tales como: hexano, diclorometano, cloroformo o éter etílico, entonces la cromatografía de adsorción es una buena opción. El mecanismo de la cromatografía de adsorción involucra la interacción entre la molécula de la muestra y la fase estacionaria. Tal interacción es un caso de competencia en el que las moléculas de la fase móvil y las del soluto compiten por los sitios de adsorción discretos sobre la superficie del empaque de la columna. La interacción entre las moléculas del soluto y el adsorbente es óptima cuando los grupos funcionales del soluto se superponen exactamente a estos sitios de adsorción. (Figura 3)¹¹

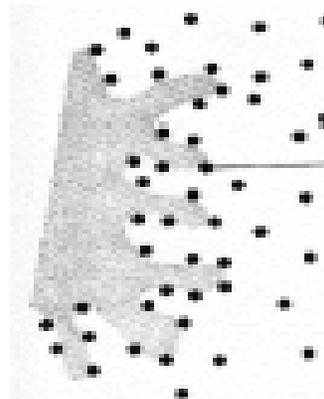


Figura 3. Equilibrio de adsorción

3.6.1.2 Cromatografía líquido-líquido o de reparto

Utiliza una fase estacionaria líquida que forma una fina película sobre la superficie de un material inerte y poroso que solo desempeña un papel de apoyo.⁴

Las moléculas de soluto se distribuyen entre los dos líquidos: uno es la fase móvil y el otro es la fase estacionaria, que se encuentran homogéneamente dispersas en un soporte sólido, finamente dividido. (Figura 4) ¹

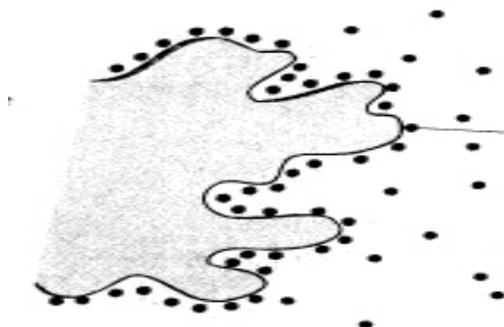


Figura 4. Equilibrio de reparto

3.6.1.3 Cromatografía de Intercambio Iónico

La fase estacionaria ha de ser un sólido y la fase móvil un líquido (CSL). El intercambio iónico es un proceso mediante el cual ocurre un intercambio de iones de grupos semejantes entre una solución y un sólido esencialmente insoluble en contacto con la solución.

Los intercambiadores iónicos son sólidos insolubles en agua y disolventes orgánicos, que puestos en contacto con una disolución salina, reemplazan algunos de sus iones con los de la disolución. Muchas sustancias, tanto naturales como sintéticas, actúan como intercambiadores iónicos. (Figura 5)

Entre las primeras están las arcillas y las zeolitas. Las resinas sintéticas de intercambio iónico son polímeros de elevado peso molecular .¹¹

Se emplean rellenos en los cuales la partícula está constituida por un polímero o por silicagel, en cada caso unida a un grupo funcional aniónico o catiónico

(típicamente sulfónico para el intercambio de cationes, amonio cuaternario para intercambio de aniones).

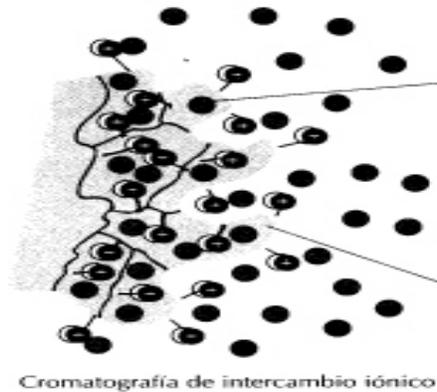


Figura 5. Equilibrio de intercambio iónico

3.6.1.4 Cromatografía de Exclusión

Esta técnica, también llamada cromatografía de filtración por gel o de permeación por gel, separa moléculas por su tamaño molecular. La fase estacionaria es un material que contiene poros cuyas dimensiones se eligen en relación del tamaño de las especies que hay que separar. De este modo se realiza un tipo de tamiz a escala molecular, de permeabilidad selectiva. Los poros son bastante pequeños para excluir a los solutos grandes pero no a los pequeños. Las moléculas grandes pasan de largo sin entrar en los poros. Las moléculas pequeñas tardan más tiempo en pasar a través de la columna porque penetran dentro del gel. ⁶

Las moléculas grandes no caben en ellos y siguen su recorrido. Las moléculas pequeñas quedan retenidas en los intersticios del gel. (Figura 6)

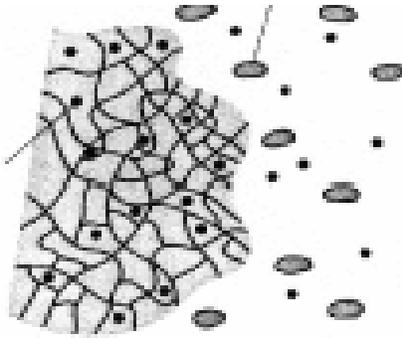


Figura 6. Equilibrio de exclusión molecular.

3.6.1.5 Cromatografía de Afinidad

La Cromatografía de Afinidad permite la separación de mezclas protéicas por su afinidad o capacidad de unión a un determinado ligando. En este caso, las proteínas que se retienen en la columna son aquellas que se unen específicamente a un ligando que previamente se ha unido a la matriz de la columna.¹¹

Por ejemplo un inhibidor enzimático o un anticuerpo, se utiliza especialmente en separaciones bioquímicas.²

3.6.1.6 Cromatografía de pares iónicos

La cromatografía de pares iónicos es un tipo de cromatografía de reparto en fase reversa que se utiliza para la separación y determinación de especies iónicas. En la cromatografía de pares iónicos la fase móvil está constituida por una disolución tampón acuosa que contiene un disolvente orgánico como metanol o acetonitrilo, y un compuesto iónico que aporta un contraion de carga opuesta a la del analito. Un contraion es un ión que se combina con el ión del analito para formar una pareja de iones, que es una especie neutra que es retenida por el relleno de fase reversa.¹²

3.6.1.7 Cromatografía micelar

La cromatografía micelar, permite separar tanto analitos neutros como cargados. La separación de compuestos neutros, se basa en la adición de un tensoactivo cargado a una concentración suficiente para formar micelas. Estos analitos neutros se distribuyen entre la fase micelar y la fase acuosa en diferente extensión dando lugar a su separación. Las moléculas neutras interaccionan con la micela en diferente grado en función de su hidrofobicidad y adquieren de esta manera movilidad.

3.6.2 Cromatografía de gases

3.6.2.1 Cromatografía gas-líquido

La fase móvil es un gas y la fase estacionaria es un líquido inmovilizado por impregnación o por enlaces sobre un soporte inerte que puede ser simplemente la pared de la columna.⁴

3.6.2.2 Cromatografía gas-sólido

La fase estacionaria es un sólido poroso (grafito o gel de sílice o aluminio) y la fase móvil es un gas. Este tipo de cromatografía de gases es muy efectivo para análisis de mezclas de gases o de compuestos con bajo punto de ebullición.⁴

3.6.3 Cromatografía de fluidos supercríticos

La fase móvil es un fluido en estado supercrítico, como el dióxido de carbono a uso 50 °C y 150 bares. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido.⁴

En este tipo de cromatografía un fluido supercrítico es utilizado como fase móvil, la fase estacionaria es un tipo de fase enlazada como en la cromatografía de fase reversa o normal, incluso puede utilizar columnas que se utilizan en cromatografía de gases como las de sílice fundida recubierta con la fase estacionaria de alto grado de entrecruzamiento.

3.7 Cromatografía de líquidos de fase enlazada

3.7.1 Cromatografía de líquidos de fase normal

Se conoce como cromatografía en fase normal cuando la fase estacionaria es de elevada polaridad y la fase móvil es no polar.

En cromatografía normal los analitos menos polares eluyen primero debido a que son más solubles en la fase móvil. Cuando más polar es la fase móvil, menor es el tiempo de retención. La elección de la fase estacionaria se hace de tal manera que la polaridad de ésta se aproxime a la de los componentes de la mezcla a separar, siendo la fase móvil de polaridad distinta; sin embargo, si la polaridad de la fase estacionaria y del analito son excesivamente parecidas los tiempos de retención se hacen muy elevados. Por el contrario, si la polaridad del analito y la de la fase móvil son parecidas y la de la fase estacionaria distinta, los tiempos de retención se hacen excesivamente cortos y la separación no resulta adecuada.⁵

3.7.2 Cromatografía de líquidos en fase reversa

En la cromatografía fase reversa, la fase estacionaria es no polar y la fase móvil polar. La fase estacionaria más común es con grupos no polares enlazados con la sílica. El más empleado es la cadena de 18 átomos de carbono (el grupo octadecilo C-18). Los grupos orgánicos enlazados ejercen un efecto similar al que produciría una capa sumamente delgada de disolvente orgánico en la superficie de las partículas de sílica. De este modo, los solutos se reparten entre el recubrimiento superficial y la fase móvil, a semejanza de una extracción líquido-líquido. Además, a medida que la cadena de carbonos es más larga, estas capas se vuelven más orgánicas. Como resultado, las cadenas más prolongadas interaccionan con más fuerza con los solutos que se disuelven preferencialmente en una fase orgánica.⁵

Conforme aumenta al carácter hidrofóbico de los solutos, la retención aumenta. Generalmente, a menor polaridad de la fase móvil, mayor es su fuerza de elución.¹¹

Características de la cromatografía de fase reversa:

- Análisis de compuestos no iónicos, iónicos e ionizables que pueden ser separados en la misma columna y con la misma fase móvil.
- La fuerza de atracción superficie no polar-soluto es débil.
- La adsorción irreversible, frecuentemente es silicagel, raramente ocurre.
- La fase móvil predominante es agua.
- El orden de elución es predecible, en función de la hidrofobicidad del analito y de su ionización.

FASE	NORMAL	REVERSA
Polaridad del relleno	ALTA	BAJA
Polaridad del solvente	BAJA	ALTA
Orden de elución	Primero el menos polar	Primero el mas polar
Efecto del incremento de polaridad del solvente	Reduce los tiempos de retención	Aumenta los tiempos de retención

TABLA 1. Comparación de la cromatografía de líquidos en fase normal y fase reversa⁹

3.7.2.1 Aplicaciones de la cromatografía en fase reversa

La técnica cromatográfica en fase reversa en sus varias formas es el modo mas ampliamente utilizado en cromatografía de líquidos de alta resolución e incluye

cerca de la mitad de los métodos de cromatografía líquida descritos en la literatura. Esta técnica es la que probablemente proporcionará mayor retención y selectividad óptimas cuando los compuestos no tienen grupos para enlaces de hidrogeno o tienen un carácter predominante alifático o aromático. El método es muy apropiado para separar solutos con base en el tamaño y estructura de los grupos alquilo.

En química clínica cada vez se realiza con más frecuencia el análisis cuantitativo de las drogas de abuso por medio de esta técnica. Los productos farmacéuticos que se analizan en forma rutinaria incluyen a los barbitúricos, drogas antiepilépticas y analgésicos. En el campo farmacéutico ha aumentado el uso de esta técnica para las biomoléculas, lipofílicas o iónicas, pequeñas o grandes.¹¹

3.8 Campo de aplicación de la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

La CLAR es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. Las razones de la popularidad de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para las separaciones de especies no volátiles o termolábiles y sobre todo su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general.

Algunos ejemplos de estos materiales incluyen: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, y una variedad de sustancias inorgánicas.¹²

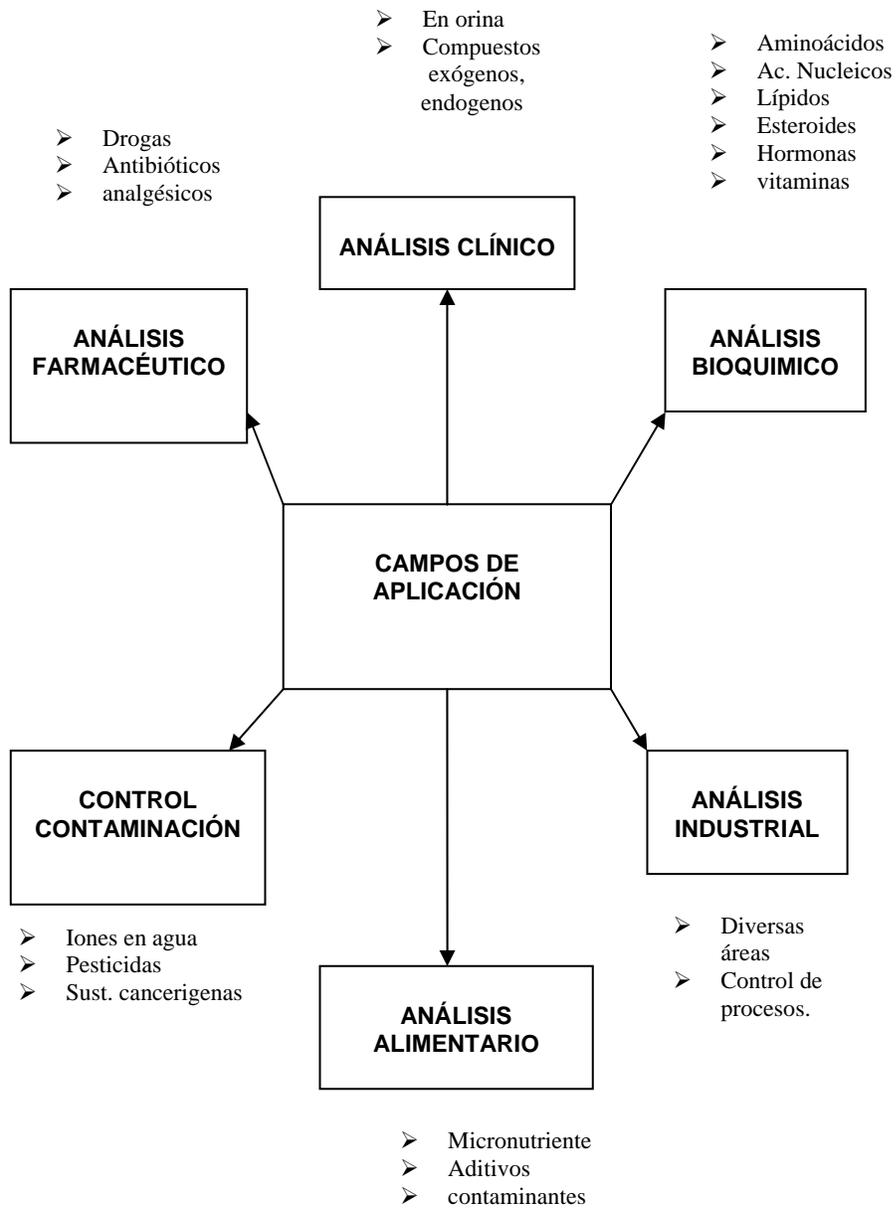


Figura 7. Campo de aplicación de la CLAR

3.9 Componentes de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución

En la figura 8, se representan los componentes básicos de un sistema de CLAR

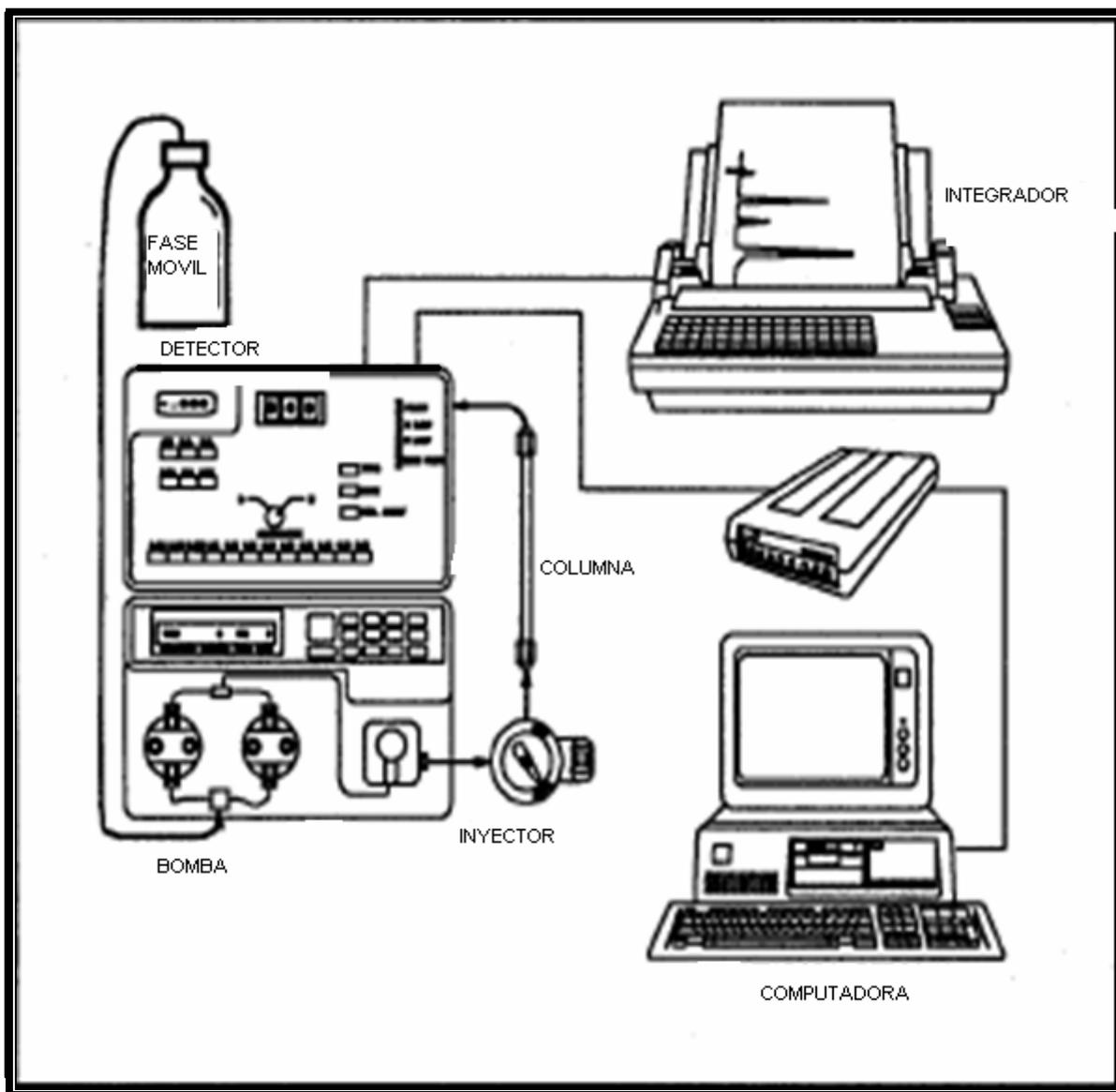


Figura 8. Componentes básicos de un sistema de CLAR

3.9.1 Fase móvil

El reservorio de la fase móvil puede ser cualquier recipiente, desde un matraz Erlenmeyer hasta un vaso, cada uno de los cuales con capacidad de 200 a

1000 mL. La fase móvil puede ser un disolvente puro o una mezcla de disolventes. Una forma conveniente de tratar los disolventes antes de introducirlos en el recipiente, consiste en filtrarlos a vacío a través de un filtro (millipore) de tamaño de poro de 0.45 μm , para eliminar la materia en suspensión .¹²

3.9.1.1 Características de los disolventes empleados en CLAR

Las siguientes características son deseables en los disolventes empleados en CLAR

- Disponible comercialmente
- Pureza y Estabilidad. En la actualidad se cuenta con productos de calidad de pureza cromatográfica. Bajo contenido de impurezas.
- Disolver la muestra
- Miscible con otros solventes para formar mezclas útiles
- No degradar o disolver la fase estacionaria
- Tener baja viscosidad para reducir las caídas de presión
- Ser compatible con el detector utilizado. Transparencia óptica (cuando se usan detectores UV)
- Si la polaridad del analito y la de la fase móvil son parecidas y la de la fase estacionaria distinta, los tiempos de retención se hacen excesivamente cortos y la separación no resulta adecuada. ^{1, 13,14}

La elección de la fase estacionaria se hace de tal manera que la polaridad de ésta se aproxime a la de los componentes de la mezcla a separar, siendo la fase móvil de polaridad distinta; sin embargo, si la polaridad de la fase estacionaria y del analito son excesivamente parecidas los tiempos de retención se hacen muy elevados.

En la práctica es preciso armonizar estos intereses para obtener tiempos de retención razonables, lo que lleva a elegir en primer lugar la fase estacionaria en función de los analitos y posteriormente realizar ensayos para seleccionar la fase móvil más adecuada. El objetivo final de la elección ha de ser mejorar la

resolución de la columna, en cromatografía líquida la variable que más influye es el factor de capacidad.¹⁵

Las fases móviles de fase reversa están constituidas por mezclas de disolventes polares, en general agua, y un modificador orgánico (metanol, acetonitrilo, THF), con o sin agregado de aditivos (sales inorgánicas).⁹

En la figura 9 se muestra la fuerza de los disolventes empleados en CLAR

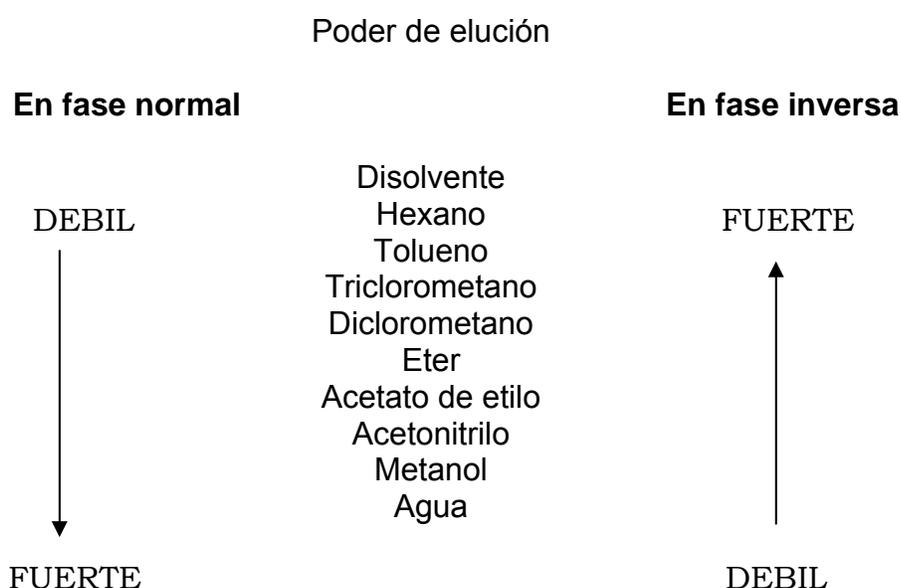


Figura 9 .Fuerza de los disolventes utilizados como fases móviles.¹⁶

3.9.1.2 Programación de la fase móvil

Cuando se trata de una mezcla, puede programarse la bomba para que tome disolventes de diferentes botellas en una proporción determinada y realice la mezcla en una cámara de mezclado. Una separación que utiliza siempre la misma fase móvil, se denomina isocrática.

Existen tres tipos de gradiente en CLAR: gradiente de elución, gradiente de flujo y gradiente de temperatura. Gradiente de elución en este caso se utilizan dos o mas disolventes con una polaridad significativamente distinta sin embargo es normal realizar un gradiente de composición del solvente a lo largo de la cromatografía, con esto se mejora la resolución y se acorta la duración del proceso. Estos gradientes de solvente también son realizados en forma automática por las bombas.¹⁵

El gradiente de flujo se utiliza cuando el último pico aparece mucho más retenido que el resto de los picos a un tiempo de retención muy largo: Si se aumenta el flujo todos los picos eluirían en tiempos menores, pero se observa que se pierde resolución en algunos casos, a causa de haber empleado otra velocidad de flujo, que probablemente no era la óptima.

Por lo tanto, la solución ideal sería mantener la elución al principio con el mismo flujo, y después aumentarlo para que el pico más retenido eluya más rápido.⁸

El gradiente de la temperatura se realiza para mejorar la selectividad en determinados casos, se emplea un termostato que puede ser programado en un rango de temperatura entre 20 °C y 60 °C. Este termostato envuelve la columna cromatográfica, se recomienda su uso para evitar cambios de temperatura que modifican los tiempos de retención de los solutos, cuando la elución es isotérmica.

3.9.2 Sistema de bombeo

Los requisitos que debe reunir una bomba en CLAR es primordialmente producir presiones estables hasta 6000 psi, mantener el flujo libre de pulsaciones, generar intervalos de caudales de flujo (0,1 a 10 mL/min), control y reproducibilidad del flujo de disolventes. Los componentes de la bomba deben ser resistentes a la corrosión.

Se utilizan tres tipos de bombas: bombas recíprocas, de desplazamiento y Neumáticas.

Las Bombas recíprocas son utilizadas en un 90 % de los equipos. Consisten en una pequeña cámara en la que el disolvente es impelido por el movimiento de vaivén de un pistón accionado por un motor de arrastre. Dos válvulas de cierre de bola, que se abren y cierran alternativamente, controlan el flujo de disolvente hacia dentro y hacia afuera de un cilindro. El disolvente está en contacto con el pistón. Tienen la desventaja que producen un flujo pulsante, que se ha de amortiguar y se manifiesta como ruido en la línea base del cromatograma. Sus ventajas se pueden citar en su pequeño volumen interno (35 a 400 μL), sus altas presiones de salida por encima de 10.000 psi, su fácil adaptación a la elusión por gradiente.^{12,17}

Bombas de desplazamiento. Las bombas de desplazamiento tienen un sistema de funcionamiento similar al de una jeringa, con un flujo uniforme, no pulsante; en ella, un émbolo desplaza un determinado volumen de líquido. Son bombas de baja capacidad (250 mL) e incómodas para cambios de disolventes.¹²

Bombas Neumáticas. En las bombas neumáticas el disolvente se encuentra en un recipiente cerrado, con una salida, por la que se desplaza el líquido mediante la presión ejercida por un gas en el interior del recipiente. Tienen una capacidad y presiones limitadas de 2000 psi son baratas y están exentas de impulsos y no funcionan para elución por gradiente.¹²

3.9.3 Sistema de inyección

Es un dispositivo integrado en el equipo cromatográfico que permite la inyección de la muestra en las condiciones de presión de la fase móvil. Consiste en bucles o válvulas de seis vías que permiten introducir en el flujo de disolvente, la muestra contenida en un aro o loop de volumen calibrado, con capacidad para un determinado tamaño de muestra desde 5 a 500 μL y una jeringa para inyectar la

muestra. La aguja no debe tocar la parte superior del empaquetamiento de la columna, pero debe llegar cerca de él.

Para la introducción de la muestra a alta presión o para una operación automatizada se requiere una válvula de muestreo. Como se muestra en la figura 10.^{1, 17}

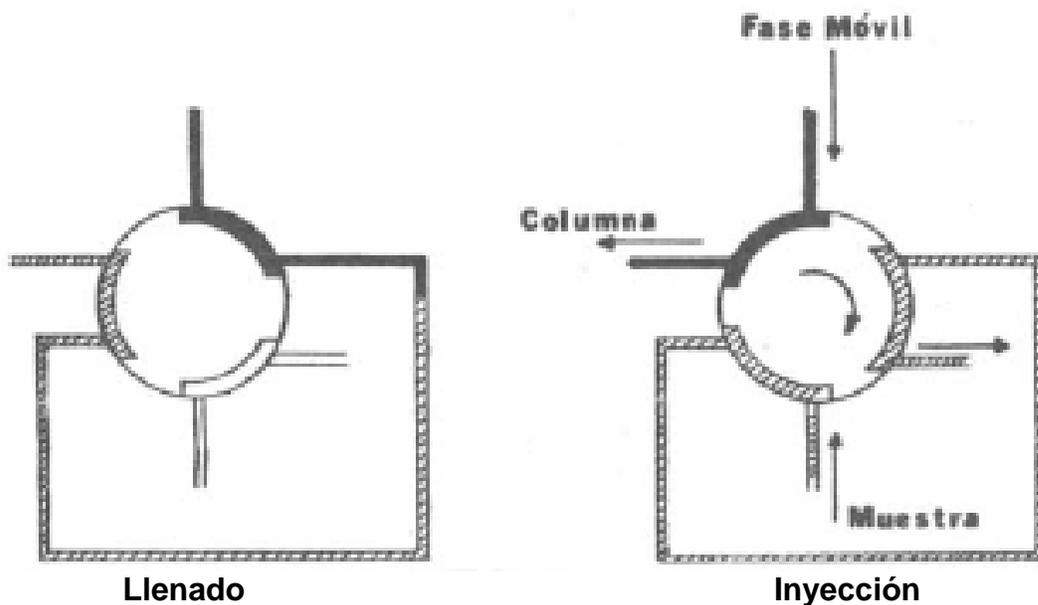


Figura 10. Sistema de inyección en CLAR

3.9.4 Columna

Contiene la fase estacionaria y en ella tiene lugar la separación cromatográfica. La columna consiste en un tubo de acero inoxidable o de polímero PEEK con paredes muy gruesas con una longitud entre 3 y 30 cm, y un diámetro interno de 2 a 10 mm. El relleno que se utiliza en muchas de estas columnas está formado de microesferas de sílice porosa que tienen un diámetro de 3 a 10 μm y un área superficial de 200-400 m^2/g . La columna más común es la de 25 cm de longitud y 4.6mm de diámetro interno y rellena con partículas de 5 μm .

Recientemente, se han empezado a fabricar columnas de alta eficiencia, más rápidas, tienen diámetros internos que oscilan entre 1 y 4.6 mm y se rellenan con partículas de tamaño de 3 a 5µm, su longitud es de 3 a 7.5 cm.

Para aumentar la vida de la columna, se puede instalar una precolumna, antes de la columna analítica que permita eliminar las impurezas del disolvente y saturar la fase móvil de fase estacionaria. El relleno es químicamente igual al de la columna.¹²

3.9.4.1 Fuentes que dañan a una columna de CLAR:

- Obstrucción por partículas pequeñas en los disolventes o fases móviles
- Obstrucción por materiales no eluidos en las muestras.
- Variación de las características de retención por incremento de materiales no eluidos.
- pH inadecuado
- Temperatura elevada
- Golpeteo o caída de la columna.¹⁸

3.9.4.2 Tipos de fase estacionaria

- **Partículas con lecho poroso** que consisten en esferas de vidrio o de polímero, no porosas con un diámetro de 30 a 40 µm. En la superficie de éstas se deposita una capa delgada y porosa de sílice. Las áreas superficiales de estas partículas varían de 5 a 15 m²/g Por lo general, los rellenos peculiares se utilizan ampliamente en las precolumnas y no en las columnas.¹¹
- **Partícula porosa** están formados por micropartículas porosas con diámetros entre 3 y 10 µm , con una área superficial grande y con la menor dispersión posible con respecto a un tamaño determinado. Las partículas son de sílice. Las sílices con poros grandes tienen áreas superficiales específicas bajas y viceversa.¹¹

- **Polímeros macroporosos.** Los polímeros de poliestireno-divinilbenceno macroporosos tienen canales grandes, adicionalmente a los microporos, que ofrecen a los iones un acceso fácil a los grupos funcionales del intercambiador. Son apropiadas para realizar separaciones en medios no acuosos.¹¹

3.9.5 Detectores

El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite ver y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica.

Cualquier detector debe reunir cierto número de cualidades. Siendo los más importantes el dar a cada compuesto detectado una respuesta proporcional a su concentración instantánea, ser sensible y tener poco ruido de fondo; además de ser estable en el tiempo.¹

Los detectores más utilizados en CLAR son:

- **Detector espectrofotométricos**

Es el detector más empleado en CLAR. Posee buena sensibilidad y rango lineal, es un detector poco sensible a los cambios de caudal y de temperatura, opera en un rango de 190 a 350 nm

La detección se basa en la ley de Lambert -Beer ($A = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c$)

Donde:

A: es la absorbancia

ϵ_{λ} :es el coeficiente de absortividad molar

l: ancho de la celda

c: concentración e expresada en moles/L.¹⁵

➤ **Detector de Onda Fija**

El modelo básico se compone de una fuente de deuterio o de vapor de mercurio, de un monocromador para aislar una banda de paso estrecha (de 10nm) o una línea, de una cubeta de flujo con un volumen de unos cuantos μL y de un dispositivo de detección óptica.⁴

➤ **Detector de longitud de onda Variable**

Este modelo permite cambiar de longitud de onda durante el análisis o registrar la absorbancia en varias longitudes de onda simultanea o también percibir todo un campo de longitudes de onda sin interrumpir la circulación en la columna.⁴

➤ **Detector de Arreglo de Diodos**

Este detector de fila de diodos permite no solamente obtener un cromatograma, sino también proporcionar informaciones espectrales que puedan servir para asegurar la identidad de los compuestos separados.¹⁹

➤ **Detector espectrofluorimétrico**

Este detector solamente puede detectar compuestos que tengan fluorescencia nativa. La intensidad de fluorescencia es proporcional a la concentración de la condición de que esta sea débil. Su ventaja es su elevada sensibilidad y selectividad.¹⁹

➤ **Detector refractométrico**

Se basa en lo que ocurre cuando un haz luminoso pasa a través de una célula que contiene dos compartimientos, uno de los cuales se rellena solo con la fase móvil y el otro con el eluyente a la salida de la columna. La diferencia de los

índices de refracción entre los dos líquidos que aparecen cuando un soluto se mezcla con el eluyente, se traduce por un desplazamiento angular del haz refractado. Presenta un inconveniente de ser mucho menos sensible que el UV, y ser sensible a las variaciones de temperatura. ⁴

➤ **Detector de dispersión de luz**

Un detector de dispersión de luz responde a todos los solutos que son claramente menos volátiles que la fase móvil, el eluato entra en este detector por la parte superior. En el nebulizador, el eluato se mezcla con nitrógeno, y se le fuerza a pasar por un capilar, a cuya salida forma una fina dispersión de gotitas. El disolvente se evapora en un tubo caliente que se le hace recorrer, dejando una nube de finas partículas sólidas, que entran en la zona de detección por la parte inferior. Las partículas se detectan por la luz que procede de un diodo láser y llega al fotodiodo por dispersión.

El detector de dispersión de luz responde a la masa del analito, no a su estructura o peso molecular. ^{4,19}

3.10 Optimización de un análisis

La cromatografía analítica se utiliza esencialmente en análisis cuantitativo. En el trabajo de optimización del análisis se aprovechan todos los recursos del equipo y del software para simular los resultados y predecir el comportamiento para modificaciones de temperatura, de fases y otros parámetros físico-químicos.

La resolución y el tiempo de elución son las dos variables dependientes más importantes. El objetivo de toda optimización es lograr una separación suficiente del o de los compuestos de interés en un mínimo de tiempo. ⁴

3.11 Cromatograma

El cromatograma es una representación gráfica que se traduce visualmente en una pantalla o en un papel la evolución, en función de tiempo, de un parámetro que depende de la concentración instantánea de soluto a la salida de la columna. Esta señal consiste en una serie de picos en función del número de compuestos separados, el cual es llamado cromatograma, El tiempo de elución se lleva al eje de las abcisas y la intensidad de la señal detectada, al eje de las ordenadas.(Figura 11)

La línea base corresponde al trazado obtenido en ausencia del compuesto eluido, cuando solo sale fase móvil. Tiempo de retención (t_R) es el tiempo que tarda un compuesto en salir de la columna. Tiempo muerto (t_M o t_0) es el tiempo de retención de una sustancia no retenida. ¹

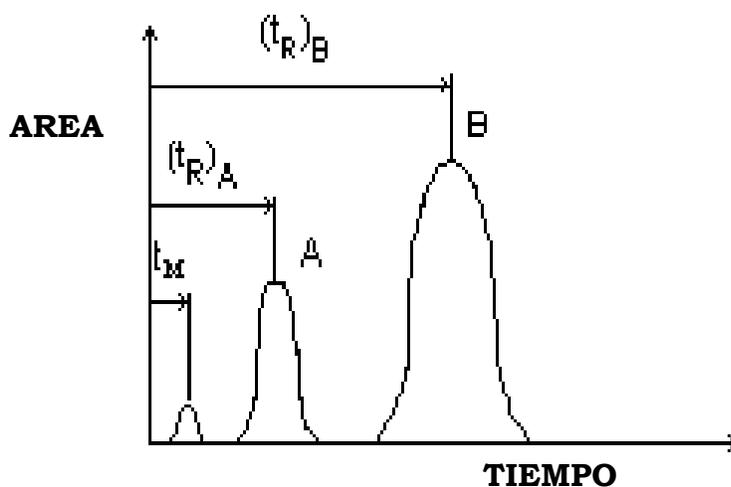


Figura 11. Representación grafica de un cromatograma

3.12 Parámetros cromatográficos

3.12.1 Tiempo de retención (t_R)

Es el tiempo que tarda en aparecer el máximo del pico en la elución de un compuesto o tiempo que tarda un compuesto en salir de la columna se denomina tiempo de retención .⁴

3.12.2 Tiempo muerto (t_M)

Es el tiempo de retención de una sustancia no retenida en la fase líquida.⁴

3.12.3 Tiempo de retención reducido (t'_R)

Es el tiempo de retención menos el tiempo muerto. ⁴

3.12.4 Volumen de retención (V_R)

Corresponde al volumen de fase móvil que fluye entre el instante de inyección y el correspondiente a la aparición del máximo del pico.⁴

$$V_R = t_R \cdot F$$

Donde:
 t_R : Tiempo de retención
F = flujo

3.12.5 Volumen muerto (V_M)

Es el volumen de fase móvil en la columna, depende del volumen extracolumna hasta llegar al detector.

$$V_M = t_M \cdot F$$

Donde:
 T_M : Tiempo muerto
F = flujo

3.12.6 Resolución (Rs)

La resolución de una columna constituye una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos analitos, en este término si se toma en cuenta el ensanchamiento de los picos, así que la magnitud de este valor si permite asegurar la separación de dos picos.¹

$$R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$

Donde:

t_R = Tiempo de retención del analito A y B

W_A y W_B = anchura de los picos A y B. Corresponde a 4σ

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

Donde:

N = numero de platos teóricos

α = factor de selectividad

k'_B = factor de capacidad del analito B

Si $R > 1,5$ la separación es total. La resolución es una variable adimensional por lo tanto el t_R y W deben estar en las mismas unidades.(Figura 12)

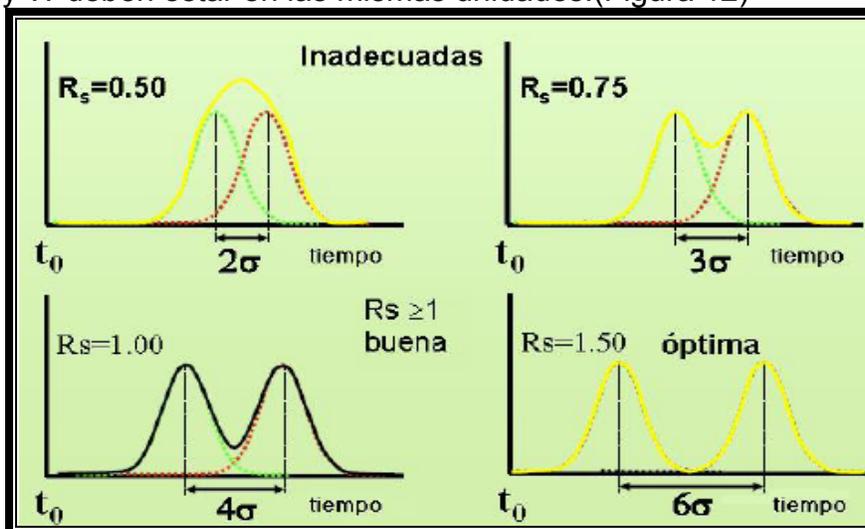


Figura 12. Representación grafica de la resolución de picos

3.12.6.1 Factores que afectan la resolución

- Para incrementar la resolución se incrementa la longitud de la columna
- Utilizando una fase fija constituida por partículas de menor tamaño
- Disminución del diámetro de la columna
- Disminución del tamaño de muestra
- Selección adecuada de la fase móvil
- Selección adecuada de la fase estacionaria
- Empaquetamiento regular de la columna.²
- La velocidad de flujo tiene un efecto considerable sobre el tiempo de retención de los constituyentes de la muestra. A mayor velocidad de flujo menor tiempo de retención. La velocidad de flujo mas rápida puede o no mejorar la forma del pico, pero la correlación velocidad de flujo-tiempo de retención es invariable.²³
- Incrementando la temperatura de la columna decrece el tiempo de retención para todos los constituyentes de una muestra. Además se tiende a obtener mejores separaciones aumentando la temperatura de la columna.¹⁷

3.12.7 Plato teórico (N)

Se considera que una columna cromatográfica está compuesta por una serie de estrechas capas horizontales y contiguas separadas, a las que se les denomina plato teórico (N) . En cada uno de ellos tiene lugar el equilibrio del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria; el movimiento del soluto, en el desarrollo cromatografico, consiste en una serie de transferencias sucesivas de un plato al siguiente. Refleja el número de veces que el soluto se distribuye entre las dos fases durante su paso a través de la columna.

A un valor alto de N, se mejora la calidad de pico. El número de platos teóricos de una columna, para un analito, se mide en función del tiempo de retención (t_R) y de la anchura del pico (W_b).⁶

El número de platos es indicativo de la eficiencia del empaque de la columna.¹¹

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2$$

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

Donde:

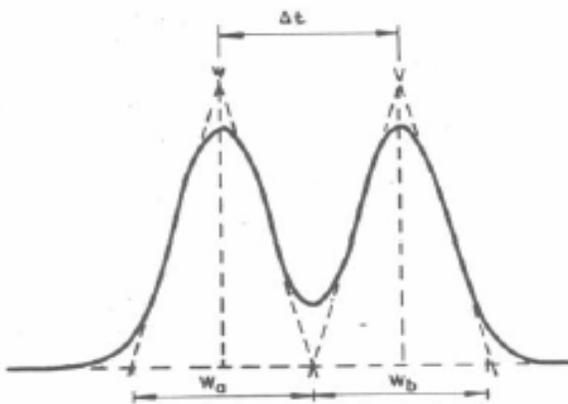
N = número de platos teóricos

T_R = tiempo de retención

W_b = ancho del pico = 4σ

L = longitud de la columna

H = Altura del plato



La eficacia de la columna aumenta cuanto mayor es el número de platos teóricos y cuanto menor es la altura del plato.

3.12.7.1 Variables que afectan la eficacia

- La eficiencia de la separación aumenta cuando el número de platos teóricos aumenta y disminuye la altura del plato.
- **Longitud de la columna:** Al aumentar la longitud de la columna, aumenta el número de platos y la eficiencia aumenta.
- **Viscosidad:** Al disminuir la viscosidad, aumenta el número de platos y disminuye la altura del plato.

- **Tamaño de la partícula:** A menor tamaño de partícula, aumenta el número de platos y disminuye la altura del plato, logrando mayor eficacia de la columna

3.12.8 Longitud de la columna (L)

La longitud de la columna L esta dividida en N equilibrios individuales de una misma altura H, numerados de 1 a n. El cálculo se puede obtener a partir de la eficiencia. ⁴

$$L = N \cdot H$$

Donde:

L = longitud de la columna

N = número de platos teóricos

H = Altura del plato

3.12.9 Altura del plato teórico (H)

Este parámetro está relacionado con la longitud de la columna (L) y número de platos teóricos (N). Este parámetro se calcula para compuestos de referencia, ya que permite comparar columnas de longitud diferente, aunque no se trate de un valor constante.

Cuanto menor sea la altura del plato teórico (H) mayor será el número de platos teóricos en una columna cromatográfica y consecuentemente mayor será la eficacia de la misma. La medida cuantitativa de la eficiencia se hace mediante la altura de plato teórico (H). Por ello las separaciones de buena calidad se asocian con pequeños valores de H. ⁶

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

Donde:

L = longitud de la columna

N = número de platos teóricos

H = Altura del plato

Para una columna eficiente H es un número pequeño. ¹¹

3.12.10 Altura de plato reducida (h)

En las cromatografías donde la fase móvil es un líquido y para las columnas cuyo relleno está formado por partículas esféricas, se aplica frecuentemente la altura de plato reducida h , que tiene en cuenta el diámetro medio de partículas d_m . Esto permite comparar la eficiencia de las columnas rellenas de partículas de tamaño diferente. Las columnas que tienen la misma relación presentan rendimiento similar.

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

Donde:

h = Altura de plato reducida

H = Altura del plato

d_m = diámetro de partícula

Si $h \leq 3$ columna buena

$4 \leq h \leq 5$ Aceptable

≥ 6 Columna muy deteriorada

3.12.11 Factor de selectividad (α)

Permite precisar las posiciones relativas de dos picos adyacentes en un cromatograma. El factor de capacidad α de una columna, como su nombre lo indica, es un término que define que tan selectiva es una columna para separar dos picos. Es de hacer notar, que la columna puede ser selectiva a una separación, que se identifica por un valor alto de este factor, pero si no se considera la mejora de los parámetros que pueden afectar el ancho de un pico, aun así no se lograría la separación de los mismos. La α es siempre mayor de la unidad. ^{4,18}

La selectividad de un sistema depende de la naturaleza de cada uno de los componentes, fase móvil, columna y muestra, de su afinidad mutua y del modo en que interactúan entre sí.

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

Donde:

k'_B = es el factor de capacidad del compuesto B, que es el mas retenido

k'_A = es el factor de capacidad del compuesto A, que es el menos retenido.

$$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$$

Donde:

t_R = tiempo de retención del analito A y B

t_M = tiempo muerto

3.12.12 Factor de capacidad (k')

Es un parámetro se utiliza para describir las velocidades de migración de los analitos en las columnas y se interpreta considerando que mientras mayor sea el valor de este factor menor es la velocidad de migración de los solutos en la columna.

Es un parámetro que describe la velocidad de migración de los analitos en la columna.

La k' debe tener valores de 2 a 5

Si el valor es superior los tiempos de retención son demasiado largos.⁷

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Donde

t_R = Tiempo de retención del analito

t_M =Tiempo muerto

3.12.13 Velocidad lineal (u)

La velocidad lineal, de la fase móvil, se mide con el tiempo de tránsito de un soluto no retenido, t_M . En cromatografía interactiva ningún material puede eluir antes de este tiempo. Las unidades resultantes de la velocidad lineal son cm/s.¹¹

$$u = \frac{L}{t_M}$$

Donde:

L = longitud de la columna

t_M =Tiempo muerto

3.12.14 Coeficiente de reparto (K)

Cuando un soluto entra al sistema cromatografico inmediatamente se reparte o distribuye entre la fase móvil y la fase estacionaria. Si la fase móvil se para en cualquier momento, el soluto establece un equilibrio de distribución entre las dos fases. La concentración en cada fase esta dada de por el coeficiente de reparto:¹¹

$$K = \frac{C_E}{C_M}$$

Donde:

C_E = concentración de soluto en la fase estacionaria (mol/L)

C_M = concentración de soluto en la fase móvil (mol/L)

3.12.15 Asimetría

La asimetría (tailing) es una de las formas mas comunes de alejamiento de la curva gaussiana y su medición es importante puesto que puede llevar, de acuerdo a su magnitud, a errores considerables de cuantificación, e incluso a oscurecer picos adyacentes.¹

Uno de los problemas frecuentemente en cromatografía es el tailing o asimetría, que puede ser anterior o posterior respecto al máximo de retención ($As < 1$ o $As > 1$ respectivamente). La asimetría es normal en la cromatografía. Los picos perfectamente gaussianos son realmente infrecuentes, pero es la magnitud de la desviación de ese ideal la que determina que pueda o no tolerarse.¹⁹

En la figura 13, se representa los diferentes grados de asimetría.

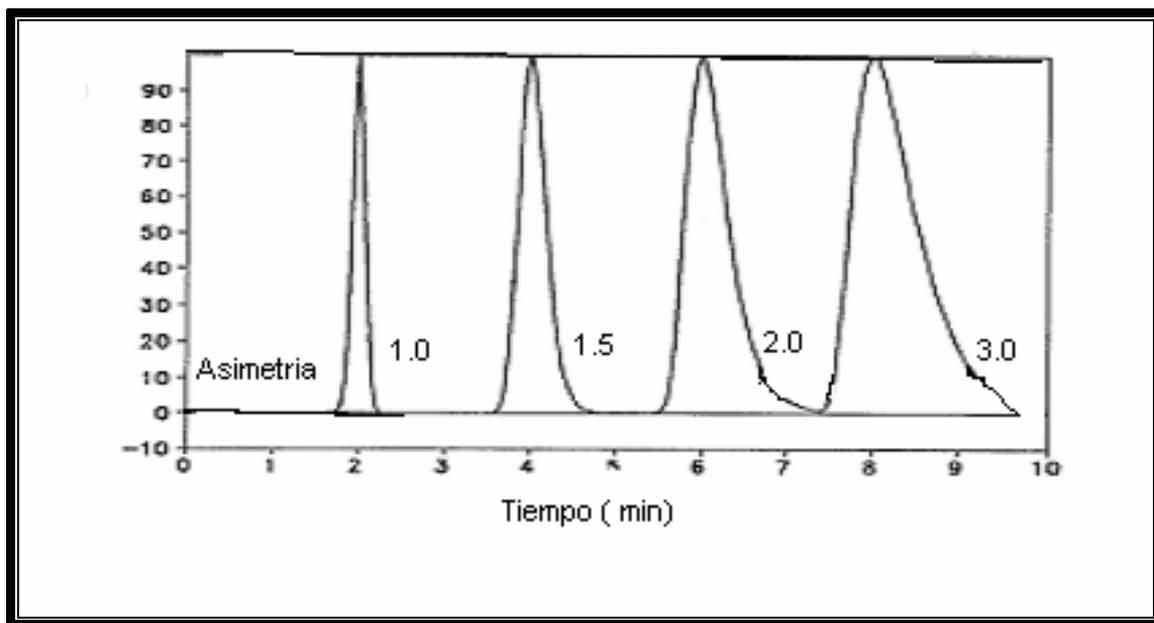


Figura 13. Simulación de picos con diferentes grados de asimetría.

3.13 Aplicaciones Cualitativas

El análisis cualitativo se hace para la determinación del tiempo de retención de compuestos puros conocidos que se supone que están presentes en la muestra. Estos valores son comparados después con los tiempos de retención de los picos producidos por la muestra. Esta aproximación es válida solo cuando todas las condiciones cromatográficas son idénticas, cuando se realizan todas las medidas, y se usa la misma columna cromatográfica para hacer dichas mediciones.¹⁷

3.14 Aplicaciones Cuantitativas

Para que sea posible el análisis cuantitativo es necesario que la respuesta del detector sea lineal con la concentración; en cuyo caso, la cantidad de cada compuesto en la muestra es proporcional al área de su pico cromatográfico.

3.14.1 Adición de estándar

Los detectores proporcionan distintas respuestas para la misma concentración de dos solutos diferentes, lo que hace necesaria la calibración o cálculo del factor de respuesta del detector para cada analito. Para construir la recta de calibrado se preparan unos patrones de concentraciones conocidas y próximas a la del problema; se realiza la cromatografía para los patrones y se calcula el área de los picos para cada patrón. A continuación se obtiene la gráfica correspondiente, representando en ordenadas la respuesta del detector (áreas) y en abscisas la concentración de los patrones. Esta debe ser una recta que pasa por el origen. Obteniendo, posteriormente, el cromatograma del problema, se interpola su área en la gráfica, para determinar la concentración. (Figura 14).¹⁷

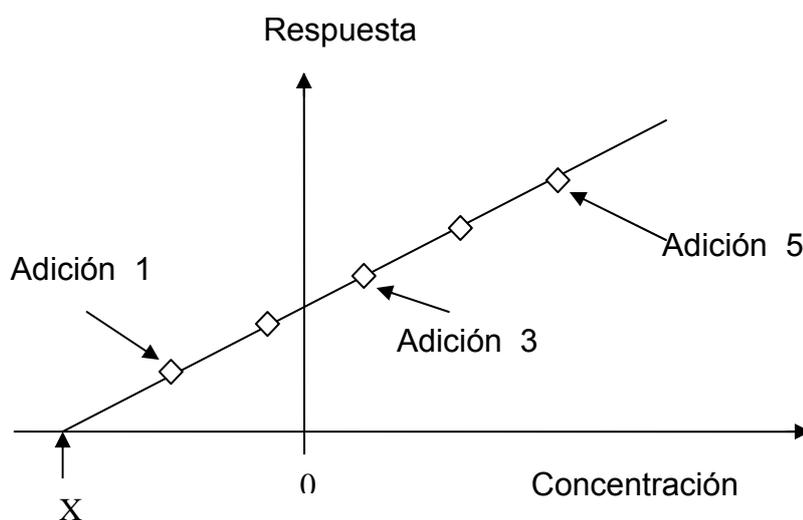


Figura 14. Representación de análisis cuantitativo por adición estándar.²¹

3.14.2 Normalización interna

Este procedimiento evita las incertidumbres asociadas a la inyección de la muestra; es el método de la normalización de las áreas. Es necesario que se separen todos los picos completamente. Permite conocer la composición de la muestra en porcentaje referida al total, la concentración del analito se calcula por la relación de su área con el área total de los picos.

$$C_i = \frac{A_i}{\sum A_i} 100$$

Donde A_i es el área del pico y $\sum A_i$ es la sumatoria de todas las áreas del cromatograma.

3.14.3 Patrón interno

Permite obtener mayor precisión en la obtención de la recta de calibrado y por tanto en el análisis cuantitativo, porque evita la incertidumbre causada por la inyección de la muestra, reduce errores causados por variación de las condiciones. Es el método empleado cuando existe una gran manipulación al preparar la muestra

La obtención de la recta de calibrado difiere de lo expuesto anteriormente en que tanto en la preparación de los patrones como en la del analito, se añade una cantidad idéntica de una sustancia que actúa de "patrón interno". La recta de calibrado se obtiene representando en ordenadas el cociente (Área patrón/Área patrón interno) frente a concentraciones de los patrones, en abscisas. (Figura 15)

Las características que debe cumplir la sustancia empleada como patrón interno" son:

- No ser un componente original de la muestra
- Naturaleza similar al resto de los solutos
- agregarse en concentraciones similares a los analitos de interés. ¹²

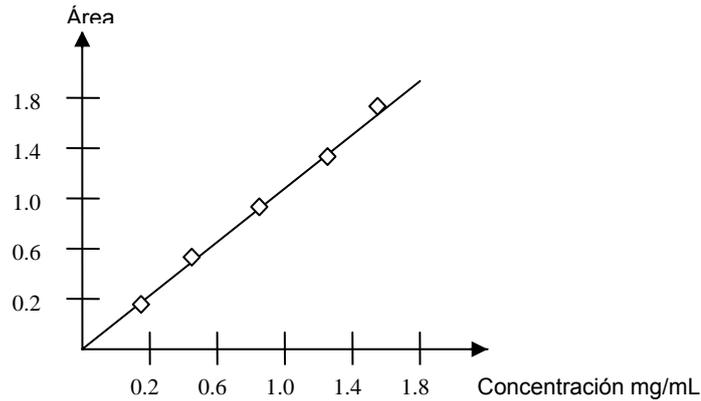


Figura 15. Análisis cuantitativo empleando patrón interno.¹²

3.15 Adecuabilidad del sistema

Definición. La adecuabilidad del sistema son pruebas utilizadas para verificar que el sistema (instrumento, analista, equipo, sustancia de referencia entre otros) funciona correctamente, con base en criterios establecidos previamente, que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico.

Las pruebas de adecuabilidad del sistema se basan en el concepto de que: el equipo e instrumentos de medición, las operaciones analíticas y las muestras que van a ser analizadas constituyen un sistema integral, que puede ser evaluado como tal. Las características que se establecen como representativas de la adecuabilidad, dependen del tipo de método a ser evaluado. Éstas son importantes especialmente en el caso de los métodos cromatográficos.²⁶

Determinación. Inyectar por quintuplicado la solución del analito. Reportar la respuesta del analito, calcular el CV y para cada inyección determinar:

- Factor de capacidad (k')
- Resolución (R)
- Factor de coleo
- Numero de platos teóricos (N)

Criterios de aceptación

CV \leq 2% para la respuesta analítica

k' > 2

R > 2

Factor de coleo < 2

N > 2000

3.16 Parabenos

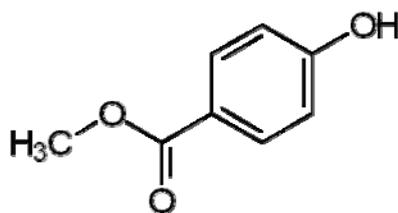
Es un nombre genérico dado a los alquilésteres de ácido parahidroxibenzóico, relacionados estructuralmente al ácido benzóico. La acción antimicrobiana de los parabenos fue descubierta en 1924. Estos son versátiles en su uso. Además, las moléculas se mantienen activas en un amplio rango de pH. La acción antimicrobiana es directamente proporcional a la longitud de la cadena, pero la solubilidad decrece al aumentar ésta.

Por otro lado, se ha demostrado que pueden ser inhibidores del *Clostridium botulinum* así como inhibir la formación de su toxina. Generalmente los parabenos son más activos contra levaduras y hongos y menos efectivos contra bacterias Gram negativas.

Los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico y sus derivados sódicos, denominados en general parabenos, son compuestos sintéticos especialmente útiles contra mohos y levaduras, y menos contra bacterias.

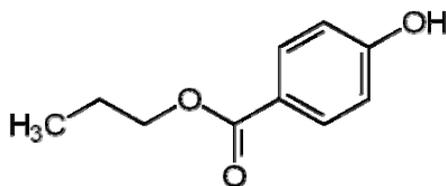
La concentración normal de uso es de 0,1%. Sin embargo, esta concentración también puede ejercer un efecto de anestesia local. Adicionalmente se puede considerar como vasodilatadores y espasmolíticos.²⁴

3.16.1 Metilparabeno



- Nombre químico: metil p-hidroxibenzoato, Tego-sept M
4-hidroxibenzoato de metilo
- Nombre común: Nipagim, Nipagim M, microlase, metilparabeno.
- Fórmula química: $C_8H_8O_3$
- Peso molecular 152,14 g/mol
- Punto de fusión: 131 °C.
- Punto de ebullición : 270 ° C
- Descripción: Cristales pequeños incoloros o polvo cristalino blanco
- Solubilidad: Fácilmente soluble en alcohol, éter dietílico y propilenglicol: soluble en agua a ebullición; ligeramente soluble en agua y en tetracloruro de carbono.²⁵

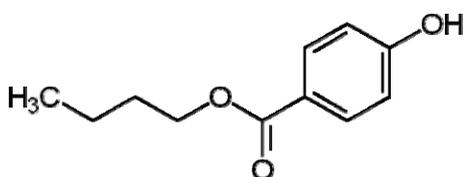
3.16.2 Propilparabeno.



- Nombre químico: ácido propil 4-hidroxibenzóico
4- hidroxibenzoato de propilo

- Nombre común: propilparabeno, propil p-hidroxibenzoato, microlase, nipasol.
- Fórmula química: $C_{10}H_{12}O_3$
- peso molecular: 180,20 g/mol
- Punto de fusión: 96-7 °C.
- Descripción: Cristales incoloros o polvo cristalino blanco
- Solubilidad: Muy soluble en metanol, alcohol, alcohol anhidrido, acetona y éter dietílico; ligeramente insoluble en agua a ebullición, muy ligeramente soluble en agua.²⁵

3.16.3 Butilparabeno



- Nombre químico: 4-hidroxibenzoato de butilo.
- Nombre común: Nipabutil, butilparabeno
- Fórmula química: $C_{11}H_{14}O_3$
- Peso molecular: 194,22 g/mol
- Punto de fusión : 70 °C
- Descripción: Cristales pequeños incoloros o polvo blanco
- Solubilidad: Fácilmente soluble en acetona, alcohol, éter dietílico y propilenglicol ; muy ligeramente soluble en agua y glicerina.²⁵

4. Planteamiento del problema

La CLAR permite alcanzar altos niveles de selectividad, sensibilidad y resolución. Para el mejor aprovechamiento de estas posibilidades instrumentales, el analista debe considerar detalles importantes del método analítico, para seleccionar la combinación apropiada de las condiciones cromatográficas.

El análisis cromatográfico por elución isométrica es el más común, sin embargo una alternativa para resolver picos cromatográficos poco eficientes y de tiempos de elución largos es modificar la velocidad de flujo en un programa de gradiente.

La resolución y eficiencia se pueden manipular para ajustarlos a los requerimientos que exige la FEUM en función de la adecuabilidad del sistema.

Por esta razón una alternativa para mejorar la separación y cuantificación de metil, propil y butilparabeno es comparar un análisis isométrico vs gradiente de flujo y evaluar las ventajas y desventajas de esta metodología en los cambios de eficiencia y resolución empleando una columna de fase reversa C-18 con detector UV .

5. Objetivos

- Realizar un programa de gradiente de flujo para la separación de metilparabeno, propilparabeno y butilparabeno.
- Realizar y comparar la elución isométrica contra la elución por gradiente de flujo.
- Evaluar los cambios en eficiencia y resolución de las dos metodologías de elución

6. Hipótesis

Al realizar un programa de gradiente de flujo se espera que la eficiencia y resolución de la mezcla de parabenos se ajuste a los requerimientos de adecuabilidad del sistema mínimos requeridos en la FEUM 7ª edición.

7. Parte experimental

7.1 EQUIPO

- Cromatógrafo Varian Prostar con automuestrador Modelo 410
- Programa Galaxia Workstation
- Detector UV Varian Modelo Cary 50Bio
- Bomba Varian modelo Cary
- Des-ionizador Milli-Q Millipore Síntesis
- Columna Microsorb MV C₁₈
No. de catalogo: R0086200D5
No de columna: 285179
Material de empaque; Microsorb-MV 100 C₁₈
Tamaño de partícula: 5µm
Longitud: 150mm
Diámetro interno: 4.6mm
Diámetro externo: 1/4 pulgadas
Material: acero inoxidable

7.2 MATERIAL

- Vasos de precipitados de 10 mL
- Matraz aforado 10 mL
- Pipetas volumétricas
- Viales para automuestreador Varian Modelo 410
- Recipientes de vidrio para fase móvil

7.3 REACTIVOS

- Agua biodestillada (Milli-Q Millipore)
- Metanol (Merck México S.A.)
- Metilparabeno (J. T. Baker)
- Propilparabeno (J. T. Baker)
- Butilparabeno (J. T. Baker)

7.4 CONDICIONES

Longitud de onda: 254nm
Tiempo muerto: 1.6min
Fase móvil: (38:62) agua-metanol
Columna: C18 15cm de longitud, 4.6mm di.
Volumen de inyección: 5 µL
Velocidad de flujo: 1mL/min.

7.5 METODOLOGIA

FASE MÓVIL: Esta fase esta compuesta en una proporción de 62% agua y 38% metanol.

SOLUCIÓN STOCK

Se pesaron 10mg de metilparabeno y se adicionó a un matraz aforado de 10mL, se aforo con metanol (10µg/mL)

Se pesaron 10mg de propilparabeno y se adicionó a un matraz aforado de 10mL, se aforo con metanol (10µg/mL)

Se pesaron 10mg de butilparabeno y se adicionó a un matraz aforado de 10mL, se aforo con metanol (10µg/mL)

En un vial se adicionaron 200µL de solución de metilparabeno, 300µL de solución propilparabeno y 500µL de solución de butilparabeno.

Se inyectó inicialmente metilparabeno, propilparabeno y butilparabeno cada uno por separado y después la mezcla de los tres, con condiciones normales, se realizo un gradiente de flujo y se obtuvieron los cromatogramas con los parámetros cromatograficos respectivos.

El primer gradiente de flujo se programo así:

Tiempo (min)	Flujo (µL/min)
2.0	0.6
2.6	0.8
2.8	1.0
3.0	1.2
3.2	1.5

Y el segundo gradiente fue:

Tiempo (min)	Flujo (µL/min)
1.5	0.6
3.0	1.0
5.0	1.5

8. Resultados

En la figura 16 se muestra el cromatograma de metilparabeno por elución a flujo constante (isométrica)

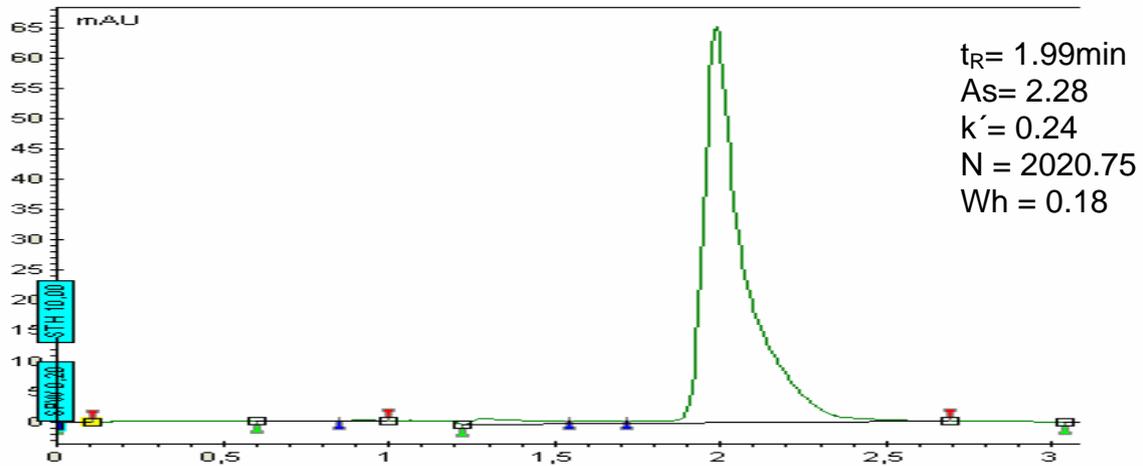


Figura 16. Cromatograma del metilparabeno por elución isométrica

En la figura 17 se muestra el cromatograma de propilparabeno por elución a flujo constante (isométrica)

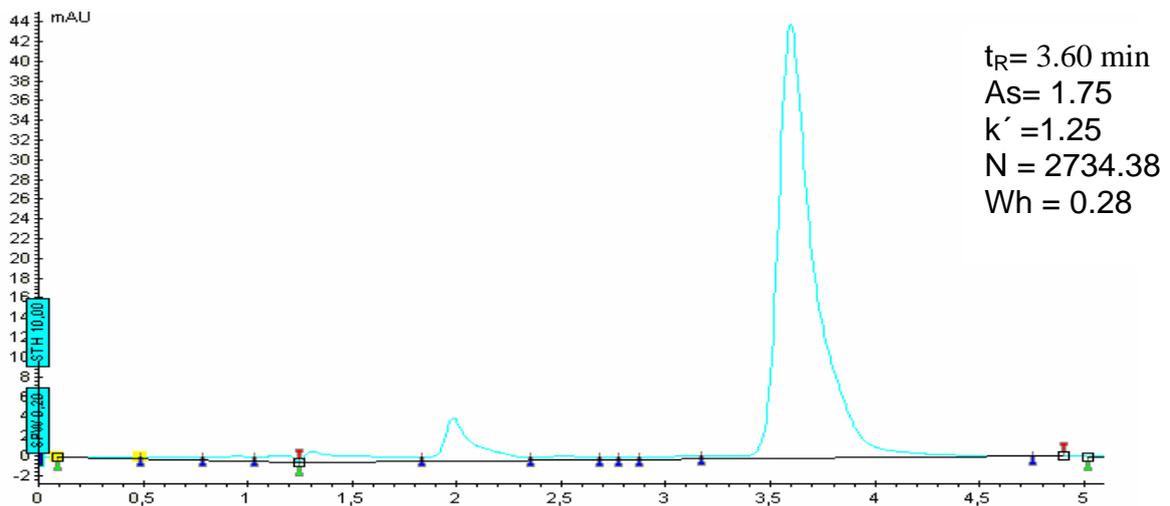


Figura 17. Cromatograma del propilparabeno por elución isométrica

En la figura 18 se muestra el cromatograma de butilparabeno por elución a flujo constante (isométrica)

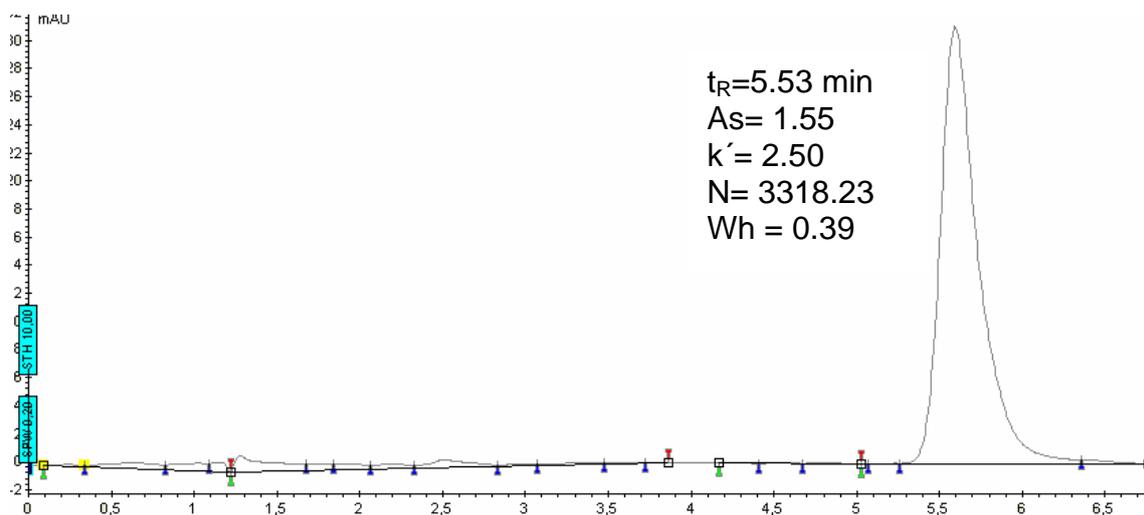


Figura 18. . Cromatograma del butilparabeno por elución isométrica

En la figura 19 se muestra el cromatograma de la mezcla de metilparabeno, propilparabeno y butilparabeno por elución isométrica

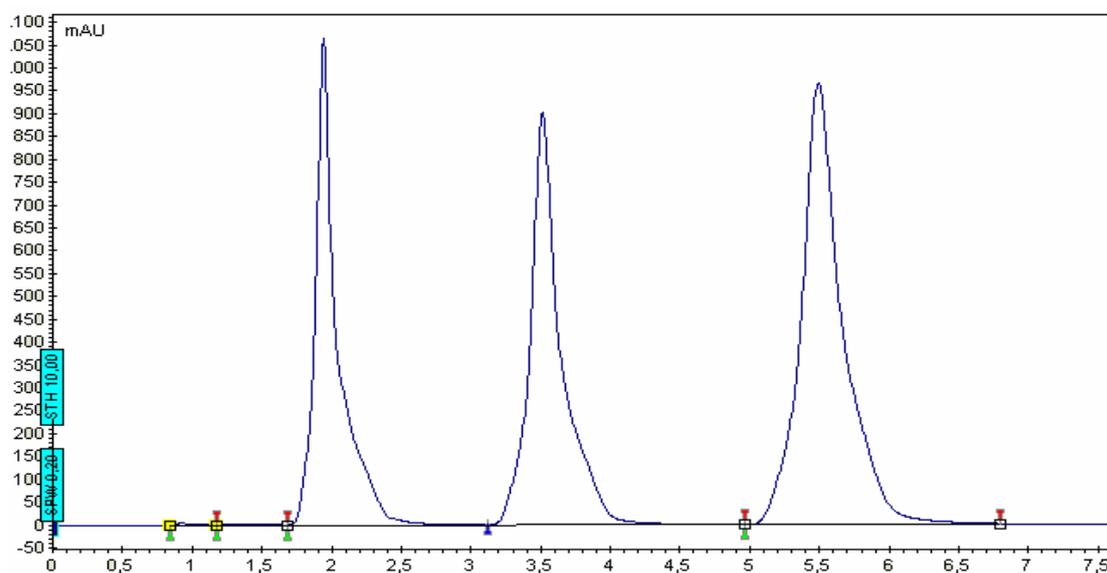


Figura 19. Cromatograma de la mezcla de parabenos por elución isométrica

En la figura 20 se muestra el primer cromatograma de la mezcla de metilparabeno, propilparabeno y butilparabeno por gradiente de flujo.

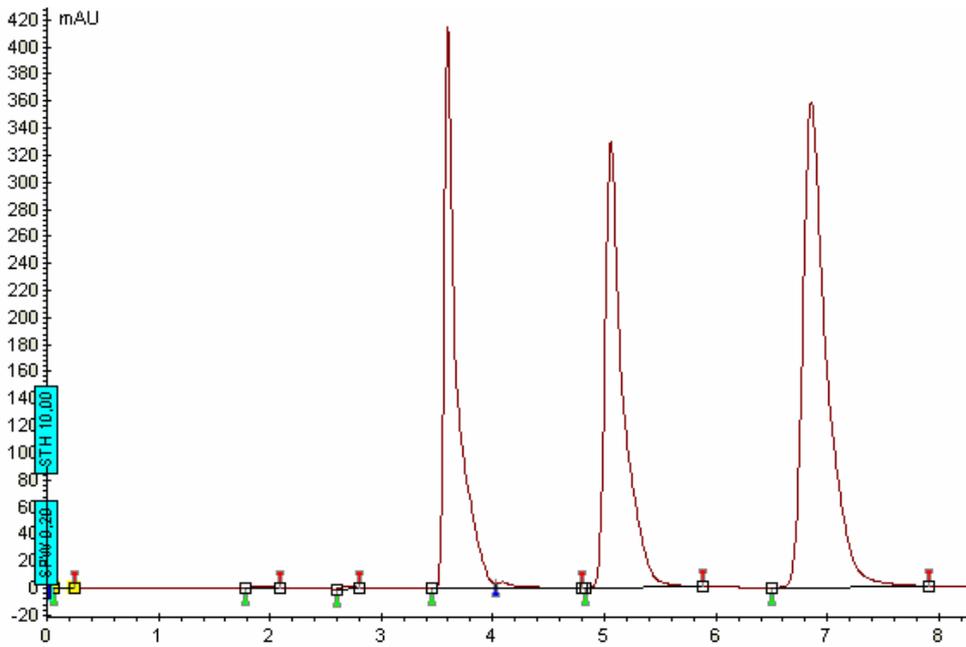


Figura 20. Cromatograma del primer gradiente

En la figura 21 se muestra el segundo cromatograma de la mezcla de metilparabeno, propilparabeno y butilparabeno por gradiente de flujo.

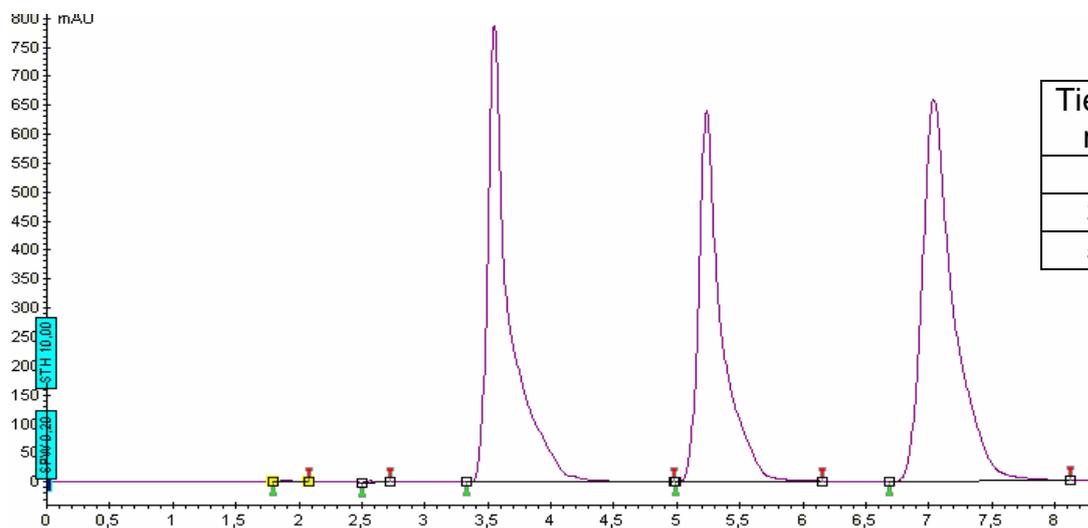


Figura 21. . Cromatograma del segundo gradiente

TABLA 2. Comparación de parámetros cromatográficos de las diferentes eluciones, isométrica y por gradiente de flujo.

PARAMETRO	ELUCIÓN ISOMETRICA	ELUCIÓN GRADIENTE 1	ELUCIÓN GRADIENTE 2
Tiempo de retención (t_R)	1.94	3.59	3.55
	3.51	5.06	5.23
	5.49	6.86	7.04
Resolución (R)	3.65	4.48	4.24
	3.04	3.61	3.24
Factor de capacidad (k')	0.21	1.24	1.21
	1.19	2.16	2.26
	2.43	3.28	3.4
Factor de selectividad (α)	5.62	1.74	1.86
	2.03	1.52	1.34
Número de platos (N)	1478.01	8914.97	4490.98
	2019.07	7026.94	6666.11
	2277.90	6073.98	4988.01
Ancho de pico	0.20	0.15	0.21
	0.31	0.24	0.26
	0.46	0.35	0.40
Factor de asimetría (As)	1.72	2.81	2.38
	1.35	1.98	1.91
	1.22	1.66	1.60

9. Análisis de resultados

En el desarrollo de la práctica la fase móvil que inicialmente se estableció fue agua-metanol en la proporción 38:62 respectivamente, es la más adecuada para eluir y separar la mezcla de parabenos.

Inicialmente se inyectó por separado cada muestra, metilparabeno, propilparabeno y butilparabeno. Obteniendo para el metilparabeno un tiempo de retención de 1.99 min, un pico coleado con un valor de asimetría de 2.28, un valor aceptable de platos teóricos de 2020.75 y una buena resolución, pero una k' muy baja de 0.24. (Figura 16)

El propilparabeno se obtuvo a un tiempo de retención de 3.60 de igual manera se obtuvo coleado con un valor de asimetría de 1.75, una buena eficiencia de 2734.38, una resolución de 1.76 y una k' de 1.25. (Figura 17)

En el caso del butilparabeno (Figura 18) el pico eluyó en un tiempo de retención de 5.53 min. una asimetría de 1.55 y una excelente eficiencia de 3318.23, al igual que una buena resolución y un valor aceptable de k' de 2.50.

Al inyectar la mezcla de los tres parabenos, como era de esperarse el orden de elución dependió de la longitud de la cadena alifática, eluyendo primero el metilparabeno, después el propilparabeno y por último el butilparabeno.

El objetivo primario de la cromatografía es la separación de los componentes de una mezcla y el grado de separación se evalúa por la resolución que debe ser mayor de 1.5 o de 2 en el caso de lo que marca la FEUM para una completa separación, el valor de resolución de la mezcla de parabenos estuvo muy por encima de este valor 3.65 y 3.24.

La resolución está dada en función de tres factores: selectividad (α), factor de capacidad (k'), y eficiencia (N), al modificarlos se afecta directamente a la resolución.

El valor de k' puede variar de 1 a valores muy grandes, este es el parámetro más sencillo de modificar de tal manera que se varía simplemente ajustando la fuerza de la fase móvil, esto es a mayor proporción de disolvente orgánico menor es el valor de k' y menor es la retención.

La resolución aumenta al aumentar el valor de k' , sin embargo la resolución no varía linealmente con el factor de capacidad. En el análisis de los tres analitos se obtuvieron valores de k' de 1.21 para metilparabeno que fue el compuesto menos retenido con un tiempo de retención de 1.94 min, 1.19 para propilparabeno con 3.51 min y el compuesto más retenido butilparabeno 5.49 min con una k' de 2.43. Sin embargo el metiparabeno y el propilparabeno no cumplen con el valor óptimo mínimo de 2 que marca la FEUM para adecuabilidad del sistema.

La eficiencia aumenta, al aumentar el valor de N es decir el número de platos teóricos, este valor numérico resulta perfectamente válido para dar idea sobre la eficiencia separativa de una columna, pues tiene que ser mayor o igual 2000 para lograr cumplir el mínimo que se marca en la adecuabilidad del sistema. Cuando mayor sea N y si el pico es eficiente, este será estrecho. En la práctica se obtuvieron valores de 1478.01, 2019.07 y 2277.90, por lo que el valor del metilparabeno de N es más bajo que el mínimo establecido de 2000.

Este parámetro puede aumentarse de varias formas: empleando columnas más largas, pero aumentan la presión y aumentan los tiempos de retención, usando un tamaño de partícula de menor diámetro, aumentando la temperatura, ó utilizando columnas de partícula esférica.

La selectividad α se obtiene del cociente del factor de capacidad para la especie más retenida entre el factor de capacidad de la especie menos retenida. Este factor de selectividad siempre es mayor que la unidad, en la práctica realizada se obtuvieron valores de 5.62 para el par metilparabeno y propilparabeno y 2.03 para el par propilparabeno y butilparabeno.

Sin embargo algunos picos cromatográficos presentan una cierta asimetría. Dicha asimetría se observa siempre en la parte descendente del pico, representando una distribución y tránsito no simétrico del soluto en la columna, posiblemente debido a retención no específica o al empaque irregular de la fase estacionaria.

El tailing o asimetría si es inferior a 1 indica que hay un cabeceo y si es superior a 1 indica coleo, en este análisis la asimetría fue mayor de 1 por lo que los picos aparecen coleados.

Los cromatogramas obtenidos en este sistema, en el caso del propilparabeno y butilparabeno dieron resultados de 1.35 y 1.22 respectivamente, el metilparabeno su pico está más coleado con un valor de asimetría de 1.72. Sin embargo de acuerdo a lo marcado en adecuabilidad del sistema los 3 picos cumplen ya que son inferiores al valor de 2.

Otra característica importante que afecta la resolución es el ancho del pico obteniéndose valores de 0.20, 0.31 y 0.46, esta anchura está relacionada directamente con el tiempo de permanencia en la columna e inversamente con la velocidad a la que fluye la fase móvil.

Para cumplir con el objetivo planteado se realizaron dos gradientes de flujo a diferentes tiempos. Al observar los resultados en la tabla 2, la resolución obtenida en el primer gradiente es mayor de 4.44 y 3.6 en comparación con el segundo gradiente se obtuvo 4.21 y 3.23 al igual un aumento de N de 8914.97 para metilparabeno, 7026.94 para propilparabeno y 6073.98 de butilparabeno, por otro lado existe una disminución de eficiencia en el segundo gradiente debido a que los picos presentan un mayor ensanchamiento.

A su vez se obtuvieron picos muy coleados con valores de asimetría de 2.81, 1.98 y 1.66 y con tiempos de retención de 3.59, 5.06 y 6.86 en el primer gradiente; lo cual quiere decir que la velocidad lineal del sistema no es la adecuada.

Comparando ambos gradientes con los datos obtenidos, el mejor gradiente es el primero ya que se observó una excelente eficiencia al igual que una buena resolución y aparentemente un menor tiempo de retención ya que este solo fue de décimas, un menor ancho de pico. Sin embargo los picos están muy coleados en este gradiente.

Una ventaja de utilizar elución por gradiente de flujo es disminuir los tiempos de retención, pero en este caso el efecto en el sistema debido a la fase móvil no es satisfactorio, quizá debido a las propiedades de los parabenos, ya que es una mezcla sencilla y muy fácil de eluir.

Una propuesta de cambio para este sistema es disminuir la fuerza de elución de la fase móvil de tal manera que el metilparabeno tenga un k' al menos de 2, para los otros solutos se tendría que aumentar el flujo ya que los tiempos de retención con una fase móvil más débil serían más largos y también se perdería eficiencia.

10. Conclusiones

La hipótesis planteada se cumple para 2 solutos el propilparabeno y el butilparabeno empleando el primero ó segundo gradiente, ya que se logró disminuir los tiempos de retención y se aumento la eficiencia.

A medida que aumenta N disminuye el ancho de pico debido al aumento de la velocidad lineal directamente relacionado con la velocidad de flujo.

Estos 2 solutos el propilparabeno y el butilparabeno cumplen con lo establecido por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 7^a edición para adecuabilidad del sistema.

11. Bibliografías

1. Quattrocchi OA, Abelaira de Andrizzi SI, Laba RF. Introducción a la HPLC, Aplicación y práctica. Buenos Aires: Artes Gráficas Farro SA; Capitulo 2-3. 329-334. 1992
2. Varcancel M. Técnicas analíticas de separación .Reverte S.A. Barcelona..335-385,437-459. 1988
3. Reyes Jorge. Análisis químico e instrumental moderno. Reverte S.A. España.359. 1983
4. Rossevac Francis. Métodos y técnicas instrumentales modernas. Análisis químico. Mc Graw Hill. España. 7-27. 2003
5. Rubinson, K. A. y Rubinson J. Química analítica contemporánea. Primera edición, Prentice Hall, México. 406-429. 2000
6. Harris Daniel. Análisis químico cuantitativo. Iberoamericana. México. 621-625,650-659. 1992
7. Pool, F. Colin A. Chromatography today. USA: Elsevier; 1991.358
8. García de Marina A y Del Castillo B.; Cromatografía líquida de alta resolución Ed. Limusa, México DF. Capitulo 2. 1988
9. Lederer,M. Chromatography for inorganic chemistry. Wiley and Sons, USA.114. 1994
10. Rubinson Judith. Química analítica contemporánea. Primera edición, Prentice Hall, México. 415-120. 2000
11. Willard, Hobart. Métodos Instrumentales de Análisis. Grupo editorial iberoamericana. México, 505-517,603-608. 1991
12. Skoog, D.A. y col. Principios de Análisis Instrumental. Quinta Edición. Mc Graw Hill. España. Capitulo 26 y 28. 2001
13. Lough Wainer. High Performance liquid Chromatography. Fundamental Principles and Practice. Blackie academia and professional. 50-59. 1996
14. Ahuja, Satinder. Chromatography and Separation Chemistry. Washington, D. C: American Chemical Society; Cap.5. 1992
15. Snyder, Lloyd .Introduction to Modern Liquid Chromatography. Second edition Wiley-Interscience. USA. 351-361. 1979.

16. Braihwaite, A. Smith. F. Chromatographic methods. Washington, D. C: Chapman and Hall. 13-23. 1985
17. Gary Bender. Métodos instrumentales de análisis en química clínica. Acribia S.A.Zaragoza España. 187-207. 1987
18. Weston Andrea. HPLC and CE. Principles and practice. Academic Press.USA. 283-286. 1997.
19. Braithwaite, A. Smith, FJ and Smith JF.; Chromatographic methods. Kluwer. Academic Publishers, U.S.A. 13-23.1999
20. Scott, R.Liquid chromatography colum theory. Wiley and Sons, USA .287
21. Miller, JC. y Miller JN.; .Estadística y quimiometria para Química Analítica. 4a. edición. Prentice Hill. España.127.2000.
22. Katz. Chromatography handbook of HPLC. Wiley and Sons, USA. 1245-1247.
23. Walton Harold. Modern chemical analysis and instrumentation. Marcel Dekker. New york. 253-254. 1973
24. Velásquez. Farmacología. 16 ed. España: Interamericana.348. 1993.
25. The Merck Index.11ªed. USA: Merck y Co Inc.959,241,1117.1989
26. Comisión de Validación de Métodos analíticos. Guía de Validación de Métodos Analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A. C. 8,20-21. 2002.