

Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales ZARAGOZA



**APLICACION DE LA CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS A ALTA
PRESION EN EL ANALISIS DE VITAMINAS**

(Determinación Simultánea de ácido ascórbico, riboflavina,
nicotinamida y clorhidrato de piridoxina por formación de
Par-iónico en una columna de fase inversa)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A:

PATRICIA LOZADA MUNGUIA

MEXICO, D. F.

1982



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

I N D I C E .

	pgs.
I.- Introducción	3
II.- Generalidades	
1.- Vitaminas Hidrosolubles	4
1.1.- Acido Ascórbico.....	5
1.2.- Riboflavina Base	7
1.3.- Clorhidrato de Piridoxina	9
1.4.- Nicotinamida	12
2.- Principios de Cromatografía de Líquidos a Alta Presión (CLAP).....	14
2.1.- Columnas y Fases Estacionarias	17
2.2.- Elección de la Fase Móvil	20
2.3.- Tipos de detectores	22
2.4.- Funcionamiento del Cromatógrafo de Líqui- dos a Alta Presión	23
III.- Fundamento del Tema	25
IV .- Planteamiento del Problema	25
V .- Objetivos	25
VI.- Hipótesis	25
VII.- Parte Experimental	
1.- Formulación	26
2.- Material y Equipo	27
3.- Método Analítico	28
4.- Cromatogramas	29
5.- Principios de Formación de Par-iónico ..	32
6.- Mecanismos de Separación	33
7.- Linearidad del Método	38
8.- Validación del Método	47
VIII.- Discusión y Resultados	51
IX.- Conclusiones	53
X.- Bibliografía	54

I. INTRODUCCION.

Es frecuente encontrar preparaciones farmacéuticas que contienen algunas de las vitaminas hidrosolubles que deben ser valoradas individualmente, para ello el analista se enfrenta al problema de separar estas sustancias y cuantificar cada una de ellas. La determinación de estos principios activos es larga y costosa pues se requiere la preparación de soluciones reactivos específicas y el uso de equipo diferente para cada vitamina, lo que representa muchas horas de trabajo.

Existen muchos métodos de análisis para estas vitaminas, pero frecuentemente se presenta el problema de la existencia de sustancias que interfieren en su valoración. Para eliminar estos problemas la cromatografía ha desempeñado un papel muy importante en su separación. Ya se han desarrollado métodos de análisis para la determinación de vitaminas en diferentes formas farmacéuticas después de una separación cromatográfica con posterior valoración (1).

En el presente trabajo se hace un análisis simultáneo de algunas vitaminas hidrosolubles como son: ácido ascórbico, riboflavina base, nicotinamida y clorhidrato de piridoxina en una muestra común de tabletas masticables aplicando la técnica de Cromatografía de Líquidos a Alta Presión, utilizando sulfato de sodio y dodecilo para formar un par iónico con las vitaminas en una columna de fase inversa.

También se realiza la validación del método analítico incluyendo su linealidad y el tratamiento estadístico de los resultados encontrados para cada una de las vitaminas.

II. GENERALIDADES.

1.- VITAMINAS HIDROSOLUBLES.

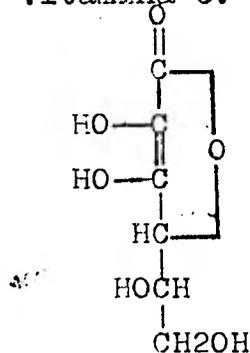
El número de preparaciones multivitamínicas disponibles comercialmente se ha incrementado notablemente en los últimos años, por lo que se hace necesario contar con métodos de análisis rápidos y confiables, que determinen el contenido real de cada vitamina.

Existen métodos biológicos, químicos y fisico-químicos que se han empleado en la valoración de vitaminas hidrosolubles; de estos métodos los químicos y fisico-químicos han reemplazado gradualmente a los métodos biológicos en el trabajo de control de calidad (especialmente en la Industria Farmacéutica), debido a que son más rápidos y baratos y en general sus límites de error son menores, sin embargo tienen poca especificidad y deben emplearse con cierta reserva (2) ya que puede existir la presencia de impurezas que interfieran notablemente con la determinación química ó fisico-química de las vitaminas en los productos farmacéuticos.

Ya se mencionó la poca especificidad de los métodos químicos de análisis que se debe a las sustancias interferentes, en este caso se recurrirá a técnicas de separación como lo es la cromatografía, que es el método más apropiado para este fin por ser versátil, tanto en su aplicación como en su manipulación, y que además se ha incorporado con gran éxito a los procedimientos de determinación química y fisico-química de una gran cantidad de compuestos.

A continuación se hace una descripción general de los métodos que se han escrito para el análisis de vitaminas hidrosolubles.

1.1.- Acido Ascórbico, Vitamina C.



Vitamina C ácido (L(+)) - ascórbico).

Los métodos utilizados en la determinación de vitamina C son los siguientes:

- Valoración con 2,6 diclorofenol indofenol.

Este método es muy utilizado. Se basa en que el colorante 2,6 diclorofenol indofenol en medio neutro y alcalino es azul y en medio ácido es rosa (3). El ácido ascórbico se oxida a ácido dehidroascórbico y la coloración producida por la reducción del 2,6 dicloroindofenol puede leerse en un espectrofotómetro. El método es específico para ácido ascórbico puro.

- Valoración con Yodo 0.1N con cloramina 0.1 N.

Las soluciones de yodo y cloramina 0.1N oxidan cuantitativamente al ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico. La solución de cloramina es más estable ya que en el método con yodo 0.1N el indicador utilizado retarda la reacción del ácido ascórbico(4), de tal manera que el análisis se ve afectado y el punto final es poco definido. Este método es específico para soluciones de ácido ascórbico puro.

- Valoración volumétrica de vitamina C mediante el aislamiento de ésta por cromatografía en papel y valoración espectrofotométrica con 2,6 diclorofenol indofenol (3,4).

La vitamina C se separa de otras sustancias reductoras mediante cromatografía en papel, con posterior cuantificación usando 2,6, dicloroindofenol. El método es utilizado en alimentos y productos farmacéuticos.

-Valoración fotométrica del ácido ascórbico, con 2 nitroanilina por el procedimiento de Mohr (5).

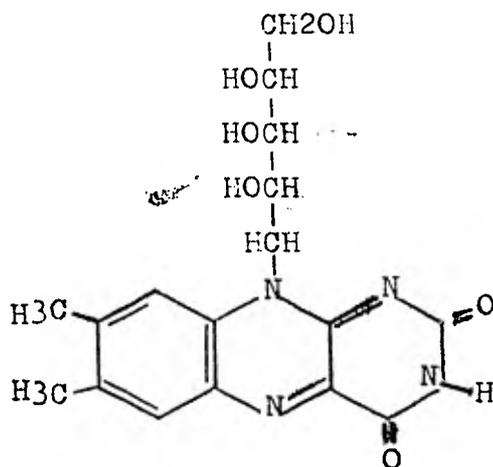
El ácido ascórbico se convierte en la 2-nitrofenil hidracida del ácido oxálico por tratamiento con 2-nitroanilina--diazada (5,6), en presencia de un exceso de la solución de hidróxido de sodio. Este compuesto forma una sal sódica de coloración rojiza-violeta que absorbe a 540 nm. El método es adecuado en el análisis de frutas y productos farmacéuticos.

-Valoración fotométrica de vitamina C con 2,4, dinitrofenil hidracina.

El ácido ascórbico reacciona con 2,4 dinitrofenil hidracina para formar la 2,4-dinitro-fenil-hidrazona que se solubiliza en ácido sulfúrico y produce un color rojo que absorbe a 520 nm (6). Da resultados satisfactorios en el caso de preparaciones farmacéuticas.

-Valoración Polarográfica de ácido ascórbico.

En este tipo de análisis el pH es importante. Los límites de pH para este análisis está entre 3-6 porque a valores mayores la vitamina C se oxida rápidamente y a pH ácidos la onda anódica presenta una curva poco aguda y por lo tanto no se puede determinar con exactitud (6). Este método es específico para vitamina C pura.

1.2.- Riboflavina, Vitamina B₂

Los métodos más usados se basan en la medida directa del color amarillo intrínseco de la riboflavina para su análisis en preparaciones farmacéuticas; sin embargo esos métodos no son adecuados ya que se pueden encontrar presentes otras -- sustancias de color amarillo que falsean los resultados.

Para el análisis de vitamina B₂ pueden emplearse los siguientes métodos químicos y fisicoquímicos.

- Medida fluorométrica de la fluorescencia amarillo-verdosa característica de la riboflavina.

La fluorescencia que presenta la riboflavina depende del pH de la solución y de su concentración. La presencia de tiamina no interfiere con el análisis fluorométrico de la vitamina B₂, sea cual sea la cantidad existente en la muestra (5,6), pero sí lo hacen sus productos de degradación.

- Medida fotométrica de la coloración amarilla de la riboflavina. Este método puede aplicarse únicamente a concentrados de riboflavina y medicamentos que contengan esta vitamina siempre que se encuentren exentos de sustancias coloreadas. Los resultados obtenidos frecuentemente son poco reproducibles y poco exactos, ya que existen productos farmacéuticos sensibles, que contienen sustancias complementarias que desarrollan cierta coloración.

- Método de la Lumiflavina.

Se basa en que la riboflavina, insoluble en cloroformo, se convierte a lumiflavina, soluble en cloroformo, por irradiación (6) en solución alcalina; esta reacción es específica de la riboflavina, ya que no interfieren otras flavinas aunque la desventaja es que la irradiación a la cadena lateral de la ribosa que conduce a la formación de la lumiflavina no es cuantitativa por lo tanto el rendimiento depende de las condiciones de operación.

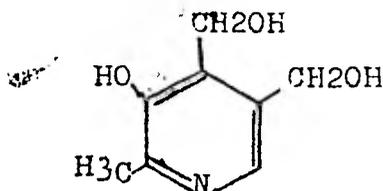
- Método Polarográfico.

Se emplea un electrodo de goteo de mercurio. La solución de riboflavina debe estar a pH 7.5 que es donde presenta una onda característica (6,7).

- Método Microbiológico.

Los resultados de esta prueba pueden afectarse por la presencia de almidón, glucógeno, ácidos grasos libres y ciertos compuestos proteínicos. En consecuencia estas sustancias deben eliminarse antes de empezar el ensayo microbiológico, mediante tratamientos adecuados (5,6).

1.3.- Piridoxina Clorhidrato, Vitamina B₆



- La vitamina B₆ se encuentra en tres formas: piridoxina, piridoxal y piridoxamina, los cuales difieren únicamente en los sustituyentes en la posición 4, puesto que se hallan relacionados tan estrechamente que reaccionan en forma muy parecida con los reactivos apropiados para su análisis fotométrico (4,5,); es decir producen colores muy similares, de tal modo que este método carece de exactitud para analizar vitamina B₆.

Los siguientes métodos químicos y fisicoquímicos pueden emplearse en el análisis de piridoxina.

- Medida espectrofotométrica de piridoxina ó piridoxal (aplicable únicamente a soluciones puras, que no contengan sustancias que interfieran al ultravioleta (6)).

La absorción al ultravioleta depende del pH de la solución. El método es bueno para el análisis sistemático en el control de soluciones inyectables de vitamina B₆.

- Medida fotométrica de la coloración que se produce con el cloruro férrico (reacción no específica, apropiada para analizar piridoxina pura).

La molécula de piridoxina posee un grupo hidroxilofenólico que origina una coloración parda característica al reaccionar con cloruro férrico. La aplicación de este método limita a preparaciones de vitamina B₆ que no contengan otras sustancias (ácido ascórbico, fenoles, etc.,) (5,6) que pueden reaccionar con cloruro férrico.

- Medida volumétrica con ácido perclórico en medio no acuoso.

Esta valoración se utiliza solamente para determinar piridoxina en soluciones puras.

- Medida fotométrica de la coloración azul que se desarrolla con 2,6 dicloroquinona cloroimida (apropiado para el ensayo de piridoxina en preparados multivitamínicos (4)).

La adición de 2,6 dicloroquinona cloroimida a una solución amortiguadora de piridoxina, que contenga isopropanol, convierte a la vitamina en una solución colorante azul - de indofenol, esta reacción no es específica para la vitamina-B₆, sin embargo la especificidad puede incrementarse añadiendo ácido bórico (5), que evita la coloración y que forma -- un complejo con los dos grupos -CH₂OH adyacentes. Este método es poco estable, por lo que se debe medir dentro de un intervalo limitado de tiempo.

- Medida fotométrica de la coloración producida por p-dietil amino anilina en presencia de un agente oxidante (se usa para mezclas multivitamínicas). (6,7).

La adición de ferricianuro potásico u otros agentes oxidantes a una solución que contiene piridoxina y p-dietil -- aminoanilina produce un derivado indofenólico de coloración azul intenso. El color producido se extrae con benceno y se lee a 605 nm. La desventaja es que otros fenoles pueden reaccionar con este reactivo.

- Medida fluorométrica de la piridoxina, previa oxidación de ácido 4- piridóxico.

Este método es sensible para la valoración de los tres factores vitamínicos B₆. Se basa en la oxidación de piridoxina y piridoxal a ácido 4-piridóxico con permanganato de potasio (5). La lactona de ácido 4-piridóxico produce fluorescencia azulosa en soluciones alcalinas. La piridoxamina se convierte a piridoxina con ácido nitroso, y en esta forma se oxida a ácido 4-piridóxico.

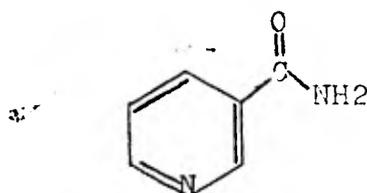
- Separación de piridoxina, piridoxal y piridoxamina mediante cromatografía en capa fina (5,6).

Los tres factores pueden separarse fácilmente sobre placas de gel de sílice y analizarse individualmente. A causa de la gran fotosensibilidad de la vitamina B6, el cromatograma debe desarrollarse al abrigo de la luz. La cromatografía puede emplearse también para eliminar sustancias interferentes en los análisis fotométricos o fluorométricos de la piridoxina (4,5).

- Análisis Microbiológico.

Cantidades equimoleculares de los factores antes mencionados muestran actividad en el ensayo de Sacharomyces (7).

1.4.- Nicotinamida.



Piridina-3-carboxamida.

Los métodos fotométricos son más empleados en el análisis de ácido nicotínico y su amida; ambos absorben al ultravioleta en una región muy parecida, este análisis se utiliza solo para soluciones acuosas muy puras.

Los siguientes métodos químicos y fisicoquímicos -- son aplicables en la determinación de ácido nicotínico y nicotinamida.

- Valoración espectrofotométrica de nicotinamida.

El empleo del procedimiento espectrofotométrico -- se restringe a soluciones que contienen exclusivamente ácido nicotínico y nicotinamida, que se encuentran exentos de otras sustancias que absorben al ultravioleta (5).

- Valoración fotométrica para el análisis de nicotinamida . Se trata de una reacción típica de piridina y -- sus derivados al reaccionar con bromuro de cianógeno. El anillo piridínico se abre para formar una solución amarilla cuya absorbancia se determina (4,5).

- Valoración de nicotinamida en preparaciones polivitamínicas por el método del ácido barbitúrico.

El anillo piridínico de la nicotinamida se abre con bromuro de cianógeno en una solución que contiene fosfato mono potásico. La combinación de la solución resultante con el reactivo del ácido barbitúrico produce una coloración violeta con un máximo de absorción a 550 nm (5,6). El ácido nicotínico no interfiere con la nicotinamida. En consecuencia, el método es altamente selectivo y se aplica al análisis de nicotinamida en productos que han sido almacenados durante algún tiempo.

- Valoración Polarográfica de nicotinamida.

La determinación polarográfica de la nicotinamida en preparaciones vitamínicas, después de la adición del electrolito (Mercurio con hidróxido de tetrametilamonio al 1%) -- (5,6), se utiliza para analizar preparados que contengan únicamente nicotinamida.

- Separación del ácido nicotínico y de la nicotinamida por cromatografía en capa fina.

La cromatografía sobre placa de gel de sílice -- proporciona separaciones muy buenas de la vitamina y sus impurezas, este método puede emplearse para la detección cuantitativa o cualitativa de la nicotinamida.

- Valoración Microbiológica .

El Lactobacillus arabionasus presenta crecimiento no solo frente al ácido nicotínico y su amida. En cambio el -- crecimiento de Leuconostoc mesenteroides se estimula únicamente por el ácido nicotínico, y de esta manera que si se realizan -- simultáneamente ambos ensayos, puede calcularse por diferencia la cantidad de nicotinamida.

Se han explicado brevemente los diferentes métodos oficiales para el análisis de vitaminas hidrosolubles, con lo cual podemos darnos cuenta que estos métodos son largos y no selectivos, pero muy útiles en el análisis de materia prima o de preparados univitaminicos.

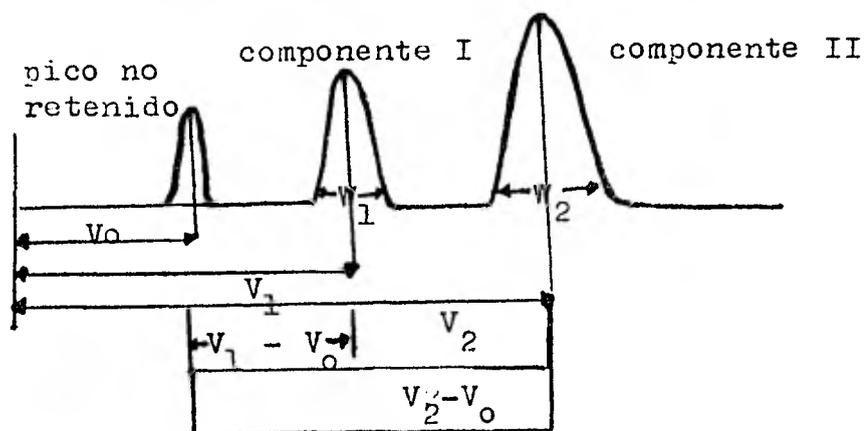
2.- Cromatografía de Líquidos a Alta Presión.

La Cromatografía de Líquidos a Alta Presión (CLAP) - es una técnica que nos permite separar, aislar e identificar - los componentes de una mezcla química. La muestra se distribuye entre dos fases, una móvil y la otra estacionaria, de tal - manera que cada uno de los componentes de la mezcla es retenido selectivamente en la fase estacionaria.

La separación se lleva a cabo en una columna tubular rellena de un sólido poroso finamente dividido, el cual puede actuar como fase estacionaria o como soporte de una fase estacionaria líquida; la fase móvil fluye a través del relleno de la columna, arrastrando los componentes de la mezcla que son retenidos selectivamente; el flujo de la fase móvil se mantiene constante a través de todo el proceso y de esta manera se logra que cada componente sea eluido de la columna como un compuesto puro, disuelto en la fase móvil. A esta técnica se le llama "Cromatografía de elución".

En la siguiente figura se representa un cromatograma por elución, en donde se puede ver la distribución de los componentes de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria.

PARAMETROS CROMATOGRAFICOS



Las dos áreas del cromatograma involucran la banda de retención y la banda de amplitud que son características de un sistema cromatográfico (8).

Para la aplicación de la (CLAP) es necesario la consideración de los siguientes parámetros:

- Coeficiente de partición (K).

Este parámetro nos relaciona la concentración de la muestra en las dos fases.

$$K = \frac{\text{conc. en la fase estacionaria}}{\text{conc. en la fase móvil}} \frac{(X)_E}{(X)_M}$$

También se puede expresar el coeficiente de partición o distribución en cantidades molares de la muestra entre las dos fases:

$$K' = \frac{\text{cantidad en la fase estacionaria}}{\text{cantidad en la fase móvil}} \frac{WE}{WM}$$

- Tiempo de Retención (t_R).

Es el tiempo que se requiere para que la muestra pase a través de la columna.

- Plato Teórico (N).

La separación que ocurre a lo largo de la longitud de la columna cromatográfica puede ser equivalente a la que ocurre durante la etapa de equilibrio en una separación o en una destilación.

El número de platos teóricos que se requiere para una separación se calcula de la siguiente manera:

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

t_R = tiempo de retención
 W = anchura del pico -
 cromatográfico en la
 base.

- Capacidad Factor (Cf).

Es una medida de la interacción de los componentes de la muestra, el material de empaque y la combinación de disolventes

$$Cf = \frac{V_R - V_0}{V_0}$$

V_R = volumen de retención
 V_0 = volumen muerto.

- Volumen de Retención (V_R).

Es una medida de la atracción de un componente de la muestra por la fase estacionaria. el V_R está dado por el volumen del disolvente, el cual pasa através de la columna desde el tiempo de inyección al tiempo donde la concentración máxima del componente emerge. También es conocido como volumen de elución .

- Resolución (R).

Es una medida de la separación de los componentes de una muestra. R toma en cuenta la separación al pico máximo y la mitad de los otros picos.

$$R = \frac{V_2 - V_1}{(W_2 + W_1)/2}$$

donde V_2, V_1 = volumen de retención del componente 2 y componente 1.

W_2, W_1 = mitad de los componentes 2,1.

- Volumen muerto (V_0).

Es el volumen de disolvente en el empaque de la columna. V_0 , está dado por la cantidad de disolvente que se requiere para eluir la muestra, el cual no interactúa con el material de empaque.

2.1.- Columnas y Fases Estacionarias.

En todo sistema cromatográfico, la columna es el corazón del sistema (8,9), puesto que en ella se lleva a cabo la separación de los componentes de una mezcla. La columna consiste básicamente de un tubo de acero inoxidable que contiene un material de empaque apropiado, este material puede ser peli-
cular y poroso:

- Material pelicular.

Es un adsorbente pelicular llamado también de cen-
tro sólido. Consiste de partículas esféricas no porosas, recu-
biertas con una capa muy fina de un adsorbente poroso, como --
gel de sílice o alumina.

- Material poroso.

Casi siempre es (gel de sílice o alumina). Aquí --
el tamaño de partícula es importante porque es el parámetro --
que regula el proceso de difusión de las moléculas de la mues-
tra hacia adentro y hacia afuera de los poros de la partí --
cula. Estos tipos de materiales tienen muchas cosas en común;--
ambos se introducen fácilmente a la columna, son muy eficiente--
tes y se pueden utilizar en cromatografía líquida-sólida (CLS)
o cromatografía líquida-líquida (CLL); asimismo se pueden unir
químicamente en su superficie a alguna fase líquida y crear un
nuevo tipo de cromatografía. Además, hay materiales de relleno
del tipo pelicular y poroso para Cromatografía de Intercambio -
Iónico.

A continuación se describen tipos de cromatografía -
líquida y el material de empaque utilizado, así como los meca-
nismos de separación.

Hay cuatro métodos o formas de realizar la cromato--
grafía líquida, cada una basada en diferentes mecanismos de se-
paración de los componentes de la muestra. Mediante el inter-
cambio de las columnas con empaque específico es posible tra-
bajar con los tipos de cromatografía que se describen a conti-
nuación.

- Cromatografía Líquida-Líquida (CLL) o Partición.

Se basa en la diferente solubilidad que presenta una molécula de la muestra en la fase móvil y en la fase estacionaria, para que los compuestos más solubles en la fase estacionaria sean selectivamente retenidos por ella, y -- los menos solubles sean transportados más rápidamente por la fase móvil. La (CLL) se utiliza para compuestos moderadamente polares cuya masa molecular sea inferior a 1500 (9), y el tipo de empaque utilizado son derivados organosílicos de sílice que se preparan haciendo reaccionar el octadecil o el fenil silano (8,9), con partículas de sílice para tener un empaque no polar.

Mecanismo.

La fase estacionaria está cubierta con un líquido el cual es capaz de retener selectivamente las moléculas de la muestra en base a su solubilidad tanto en la fase estacionaria como en la fase móvil.

- Cromatografía Líquida-Sólida (CLS) o Adsorción.

En este tipo de cromatografía la naturaleza del grupo funcional es un factor primario que afecta la retención de la molécula del soluto en la columna, ya que es un proceso competitivo, en el cual la polaridad de los grupos funcionales del soluto y los grupos polares de la fase móvil compiten por los sitios activos, rígidamente fijos, sobre la superficie del adsorbente; por lo cual la retención es una función de la interacción entre la superficie polar del adsorbente y la polaridad de las moléculas del soluto en la fase móvil. Los adsorbentes más utilizados son alúmina y gel de sílice.

Mecanismo.

El mecanismo de separación de la CLS se basa en la competencia que existe entre las moléculas de la muestra y las de la fase móvil o disolvente, por ocupar los sitios activos de la superficie de un sólido.

- Cromatografía de Intercambio iónico.

Es un proceso de adsorción en el cual hay un intercambio reversible de iones, que ocurre entre la fase móvil y la superficie cargada de un ión intercambiable en una resina, la cual consta de una matriz de polímeros que es permeable a los solutos iónicos (9).

Existen dos tipos de resinas utilizadas en cromatografía de intercambio iónico:

Las resinas que atraen iones negativos se llaman -- resinas de intercambio aniónico y las que atraen iones positivos se llaman resinas de intercambio catiónico.

Mecanismo.

El mecanismo de separación, por intercambio iónico se basa en la competencia entre la fase móvil y la muestra -- iónica, por los sitios activos de una resina intercambiadora de iones (10).

En la fase móvil se puede variar la fuerza iónica -- o el pH para obtener la elución de los componentes de la mezcla en un tiempo razonable. Esta forma de cromatografía es única y se puede aplicar a especies iónicas.

- Cromatografía Líquida por Exclusión.

La fase estacionaria es químicamente inerte, lo cual involucra la difusión selectiva de las moléculas de soluto dentro y fuera de la fase móvil. El grado de retención depende del tamaño del poro de la fase estacionaria (11).

Mecanismo.

El mecanismo de separación se efectúa de acuerdo al tamaño de la molécula.

La columna se rellena de un gel, cuyos poros son de tamaño similar al tamaño de las moléculas de la muestra. Las moléculas pequeñas penetran dichos poros y quedan retenidos en -- tanto que las grandes no los son. Los límites dimensionales de -- porosemoleculares en que se puede trabajar por cromatografía -- de exclusión varía desde 2000 hasta varios millones de micras -- (11).

2.2.- Elección de la Fase Móvil.

Aunque la fase móvil no es parte instrumental propiamente dicha, el control de la presión, el flujo y la composición de la misma, son muy importantes, de ahí que sea necesario que la fase móvil tenga ciertas características (10,11) para ser útiles a la cromatografía líquida, las cuales son:

- Disolver la muestra
- No degradar o disolver la fase estacionaria
- Tener baja viscosidad
- Ser compatible con el tipo de detector utilizado.

Es indispensable que la muestra sea soluble en la fase móvil para que sea transportada a través de la columna, ya que la velocidad de migración de los componentes de una mezcla está controlada por la interacción entre los acarreadores, el soluto y la fase estacionaria.

Considerando la existencia de los cuatro tipos de cromatografía, se tienen mecanismos de interacción entre la fase móvil, la columna y el soluto; los cuales se describen a continuación.

-Cromatografía Líquida-Líquida o de Partición.

El soluto interactúa con la fase móvil. La fuerza del disolvente se incrementa con la afinidad del soluto, lo que significa que aumenta la fuerza de solvatación del disolvente por el soluto (11), similarmente la retención se incrementa por la fuerza de solvatación de la fase estacionaria.

- Cromatografía Sólido-Líquido o Adsorción.

El disolvente (fase móvil), compete con el soluto por los sitios activos de la fase estacionaria, ya que la fuerza del disolvente se ve incrementada por la afinidad de este a los sitios activos del adsorbente (12).

- Cromatografía de Intercambio iónico.

La fase móvil en este tipo de cromatografía son soluciones reguladoras y sales neutras; donde la retención del soluto es inversamente proporcional a la concentración iónica.

El papel de las soluciones reguladoras es el de mantener el pH deseado en la fase móvil (11,12).

- Cromatografía de Exclusión.

Los disolventes utilizados como fase móvil en la cromatografía de exclusión, necesariamente deben disolver a la muestra.

2.3.- Tipos de Detectores.

El detector en cromatografía líquida es un dispositivo que mide en forma continua una propiedad físico-química de los componentes de la muestra y que genera una señal proporcional a la concentración de ella.

Se han usado diferentes detectores cuyo funcionamiento se basa en diversas propiedades de la solución (8,9), pero la gran mayoría de ellos solo han tenido un uso limitado y esto ha impedido su adopción definitiva (13).

Actualmente existen dos tipos de detectores de uso muy generalizado que se describen a continuación:

- Detector de Luz Ultravioleta.

Su funcionamiento se basa en la absorción de la luz por parte de la muestra. La respuesta es selectiva ya que solo pueden ser detectados los componentes que absorben luz de longitud de onda en que opera el detector.

Este detector es insensible a los cambios de flujo y temperatura, siempre y cuando el disolvente no absorba en grado apreciable.

- Detector de Índice de Refracción.

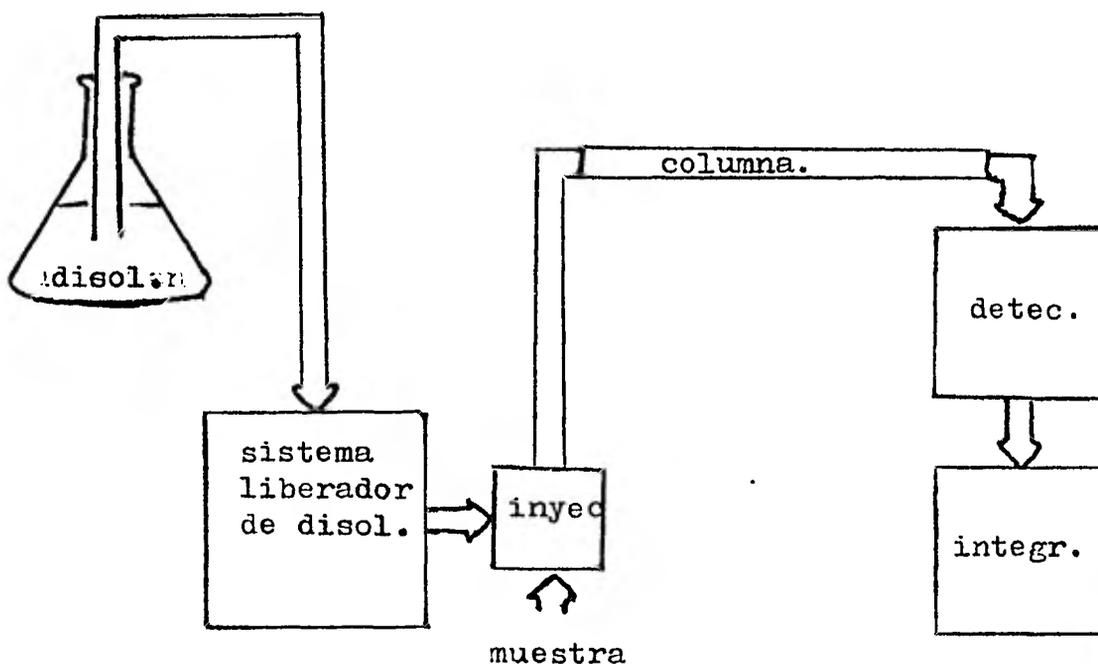
Este detector mide la diferencia entre los índices de refracción del disolvente puro y de la solución de la muestra que sale de la columna; de esta manera se detecta cualquier cambio en la composición de la fase móvil. La respuesta de este es universal y su sensibilidad es moderada, generalmente del orden de microgramos o de partes por millón (12).

Es lícito considerar que el detector ultravioleta es más sensible y de uso más generalizado en cromatografía de líquidos, debido a que la mayoría de los compuestos especialmente los de interés farmacéutico absorben intensamente en la región de ultravioleta.

2.4.- Funcionamiento del Cromatografo de Líquidos a Alta Presión.

Todos los sistemas del cromatógrafo de líquidos funcionan de acuerdo al mismo principio básico, el cual consiste de rapidez y eficiencia en la separación, así como alta resolución.

El sistema típico de cromatografía de líquidos de alta presión consiste de diferentes componentes, los cuales se describen a continuación.



- Inyector.

Es usado para introducir la muestra dentro de la columna.

- Bombas.

Es el llamado sistema liberador de disolvente, ya que lo libera continua y uniformemente. El flujo pasa libremente constituyendo la fase móvil.

- Columnas.

Es el corazón del sistema cromatográfico, es aquí donde se lleva a cabo la separación de los componentes de una mezcla.

- Sistema de detección.

Consiste de uno o más detectores diferentes, conectados en serie. Cada detector manda la señal cuantitativamente cuando emergen de la columna los componentes de la mezcla, la señal se representa como un cromatograma en un registrador.

- Registrador.

Su función es representar en un sistema gráfico la señal dada por el detector. Generalmente se utilizan registradores potenciométricos de 1 o 10 milivoltios. Otra característica deseable de los registradores es la respuesta rápida de la pluma y el tener una velocidad variable en el el papel.

Antes de cualquier procedimiento cromatográfico la muestra tiene que estar en forma líquida y libre de cualquier partícula sólida que obstruya al sistema. La muestra es introducida por el inyector al sistema de disolventes y es bombeada a través de la columna donde los componentes interactúan con el disolvente y el material de empaque, lo que tiene como consecuencia la separación. Cada componente emerge de la columna y pasa a un detector, el cual manda una señal a un registrador.

III.- Fundamento del Tema.

La Cromatografía de Líquidos a Alta Presión nos ayuda a lograr una separación e identificación fácil y rápida de los diferentes componentes que estén presentes en una mezcla proporcionando así un método sencillo y confiable en el análisis de mezclas analíticas.

IV.- Planteamiento del Problema.

Se requiere el desarrollo de un método de análisis rápido y sencillo, aplicando la técnica de cromatografía líquida en una mezcla multivitamínica (tabletas masticables); que contiene ácido ascórbico, riboflavina base, nicotinamida y clorhidrato de piridoxina, de tal manera que haya una buena separación y reproducibilidad de estos compuestos.

V.- Objetivos.

El presente trabajo tiene como objetivos: el desarrollo de un método analítico simultáneo para la determinación de riboflavina base, nicotinamida, ácido ascórbico y clorhidrato de piridoxina en una muestra común de tabletas masticables; por Cromatografía de Líquidos a Alta Presión, así como reducir el tiempo y costo de análisis que representa cada una si se hiciera por los métodos oficiales.

VI.- Hipótesis.

Dadas las estructuras diferentes que presentan la riboflavina base, nicotinamida, ácido ascórbico y el clorhidrato de piridoxina, considero que mediante la aplicación de la técnica de (CLAP) se puede hacer una determinación simultánea de estas vitaminas en una muestra común; basándose en el principio de la formación de par-iónico en una columna de fase inversa.

VII.- Parte Experimental.

- FORMULACION.

tabletas masticables.

1.- Acetato de vitamina A	10.00 mg
2.- Vitamina D(calciferol)	0.01 mg
3.- Vitamina C (protegida)	60.00 mg
4.- Acetato de vitamina E (al 50%) [*]	50.00 mg
5.- Nicotinamida	20.00 mg
6.- Mononitrato de tiamina	2.00 mg
7.- Riboflavina	2.00 mg
8.- Clorhidrato de Piridoxina	2.00 mg
9.- Cianocobalamina	0.60 mg
10.- Acido fólico	0.40 mg
11.- Excipiente c.b.p	1 tableta.

Nota ' recubierta con gelatina para proteger su estabilidad.

- Material y Equipo.

Equipo.

- 1.- Cromatografo de Líquidos a Alta Presión
"Spectra Physics" modelo 3500 B.
- 2.- Detector de longitud de onda variable
"Spectra Physics" modelo 7200
- 3.- Integrador "Spectra Physics" modelo 4100
- 4.- Columna ODS micro-bondapack C₁₈ (3.9 x 30 cm)
"Waters Assoc." ; Inc.; Milford, Mass.
- 5.- Válvula loop de 10 microlitros
- 6.- Parrilla de agitación.
- 7.- Matraces aforados de 50 ml.

- Reactivos.

- 1.- Dodecil sulfato de sodio R.A
- 2.- Acido acético glacial R.A
- 3.- Metanol absoluto R.A
- 4.- Patrones de referencia de:
 - Riboflavina (Roche).
 - Nicotinamida(Roche).
 - Acido Ascórbico (Roche).
 - Clorhidrato de Piridoxina (Roche).

- Método Analítico.

Procedimiento:

Solución Tipo.- Preparar una solución tipo que contenga 900 mcg/ml de ácido ascórbico; 300 mcg/ml de nicotina - mida; 30 mcg/ml de clorhidrato de piridoxina y 30 mcg/ml de - riboflavina en agua destilada.

Solución Problema.- Pesar exactamente una cantidad de polvo equivalente a 50 mg de ácido ascórbico, el cual contiene (16.66 mg de nicotinamida, 1.66 mg de riboflavina y -- 1.66 mg de clorhidrato de piridoxina; transferir a un matraz- volumétrico de 50 ml y llevar a volumen con agua destilada, - agitar mecánicamente durante 30 minutos; filtrar a través de- un embudo de filtración rápida con papel Whattman # 2.

(Todo el material debe estar protegido de la luz).

La solución tipo y la solución problema se inyec-- tan al cromatógrafo de líquidos con las siguientes condicio- nes de operación:

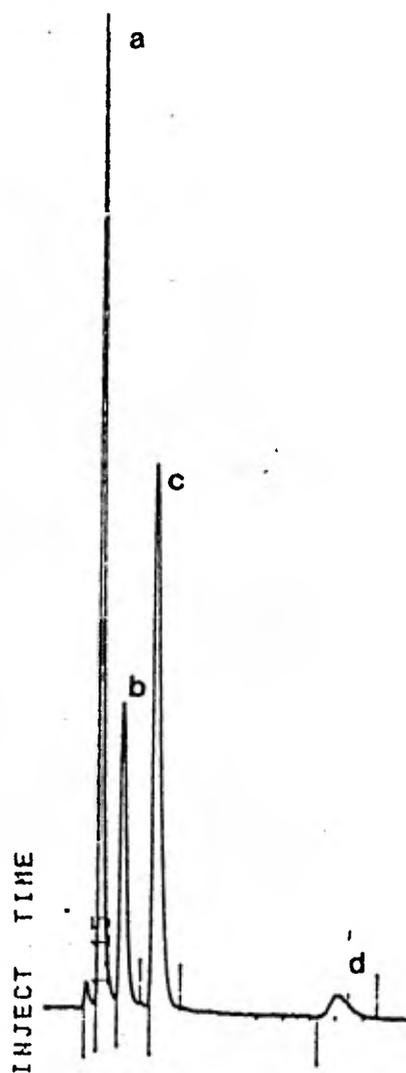
- Columna ODS micro-Bondapack C₁₈
- Fase móvil..... Dodecil sulfato-
de sodio 0.005M en 1% de áci-
do acético glacial : Metanol
absoluto. (60 : 40).
- Velocidad de flujo 2 ml/min
- Velocidad de la carta 0.5 cm/min
- Detector ultravioleta 270 nm
- Atenuación 0.02 AUFS
- Celda de Referencia aire
- Volumen de inyección válvula loop de 10 µcl.

INJECT TIME



P L A C E B O

LOS CROMATOGRAMAS OBTENIDOS SE REPRESENTAN EN LA SIGUIENTE FIGURA.



PROBLEMA

COMPONENTE

TIEMPO DE RETENCION:

VITAMINAS

a.- 1.17

ACIDO ASCORBICO

b.- 2.26

RIBOFLAVINA

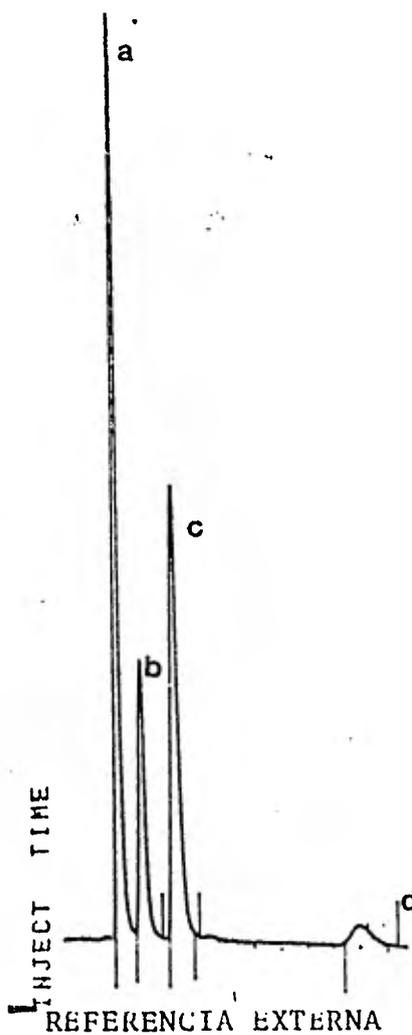
c.- 3.29

NICOTINAMIDA

d.- 9.12

CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA

LOS CROMATOGRAMAS OBTENIDOS SE REPRESENTAN EN LA SIGUIENTE FIGURA:



TIEMPOS DE RETENCION :

a.- 1.18

b.- 2.26

c.- 3.33

d.- 9.11

COMPONENTE:

VITAMINA

ACIDO ASCORBICO

RIBOFLAVINA

NICOTINAMIDA

CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA

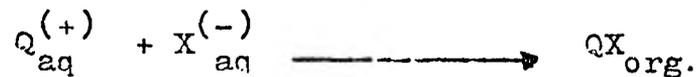
- Principio de la formación de Par- iónico en Cromatografía Líquida de fase inversa.

La separación cromatográfica de estas vitaminas se lleva a cabo mediante la formación de un par-iónico, que es una técnica en la separación de compuestos iónicos y que se comportan como especies no-iónicas con características lipofílicas.

Los compuestos que forman par-iónico son reactivos de cadena larga con ión contrario a las especies involucradas en la separación y que se disuelven en la fase móvil de la cromatografía líquida.

Estas sustancias, al formar la fase líquida estacionaria en la columna forman un complejo que está en equilibrio con la muestra iónica. La especie resultante puede ser fácilmente cromatografiada por Cromatografía Líquida en fase inversa.

Este principio general de separación puede ser ilustrado con la siguiente ecuación:



$Q^{(+)}$ = Forma iónica de la vitamina

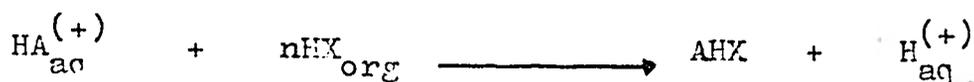
$X^{(-)}$ = Dodecil sulfato de sodio (ión-contrario).

La ecuación nos muestra que los solutos solubles en agua se combinan con la sustancia que contiene el ión-contrario y forman una molécula no-polar. El pH de la muestra se ajusta para inducir la ionización y así facilitar su combinación con el ión-contrario (14). De esta manera el par-iónico formado se distribuye entre las dos fases (acuosa y orgánica). La velocidad de distribución depende de la estructura del complejo y de la concentración del ión en la fase móvil.

La elección de sustancias con ión contrario se basa en la composición de la fase móvil y en las pruebas cromatográficas (14,15).

- Mecanismo de separación cromatográfica.

La separación cromatográfica por formación de par-iónico dentro de la columna de fase reversa que se llevó a cabo en la determinación de las vitaminas hidrosolubles sigue el siguiente mecanismo:



✓ muestra ionizada

fase estacionaria

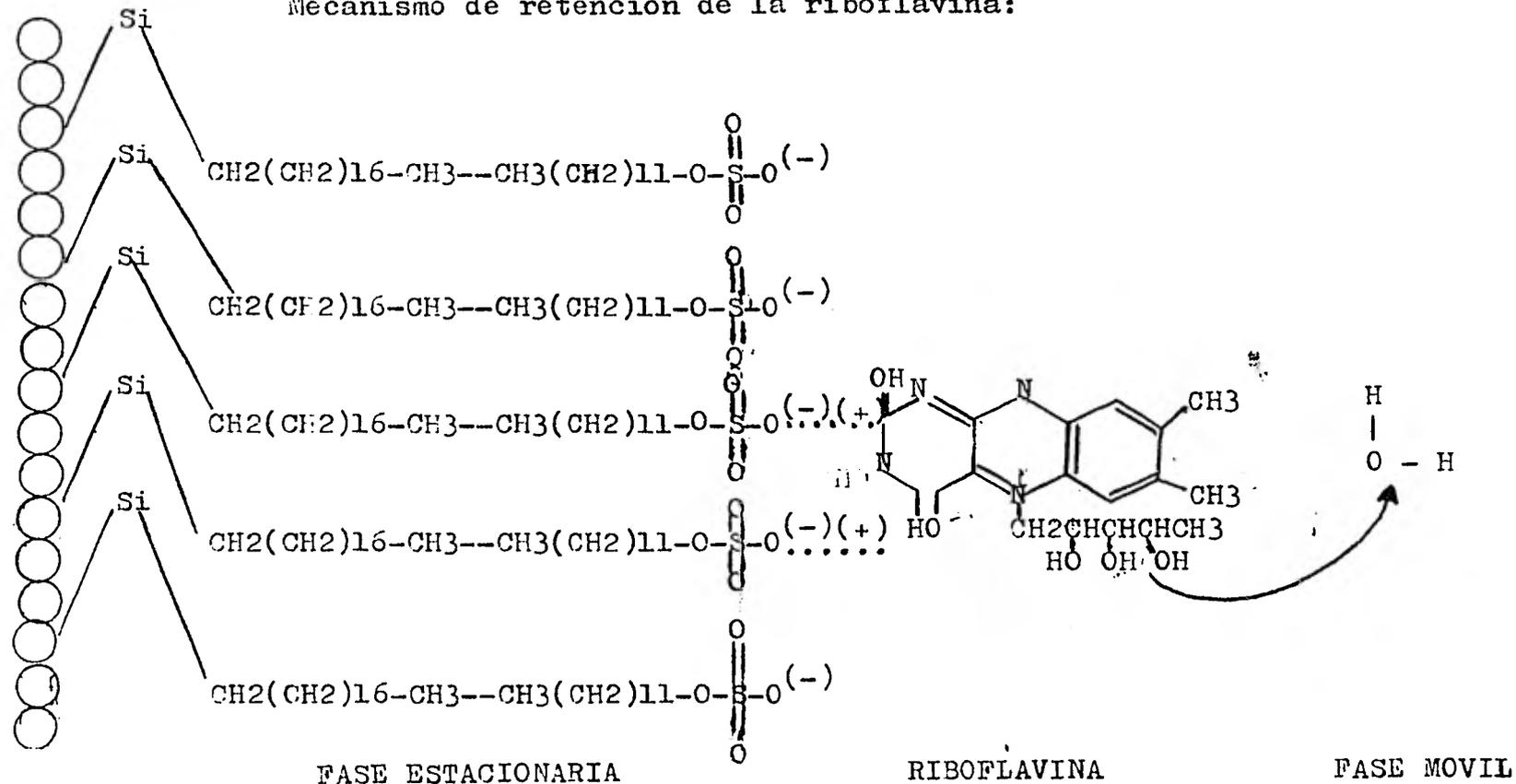
par-iónico

Mecanismo de retención del ácido ascórbico:



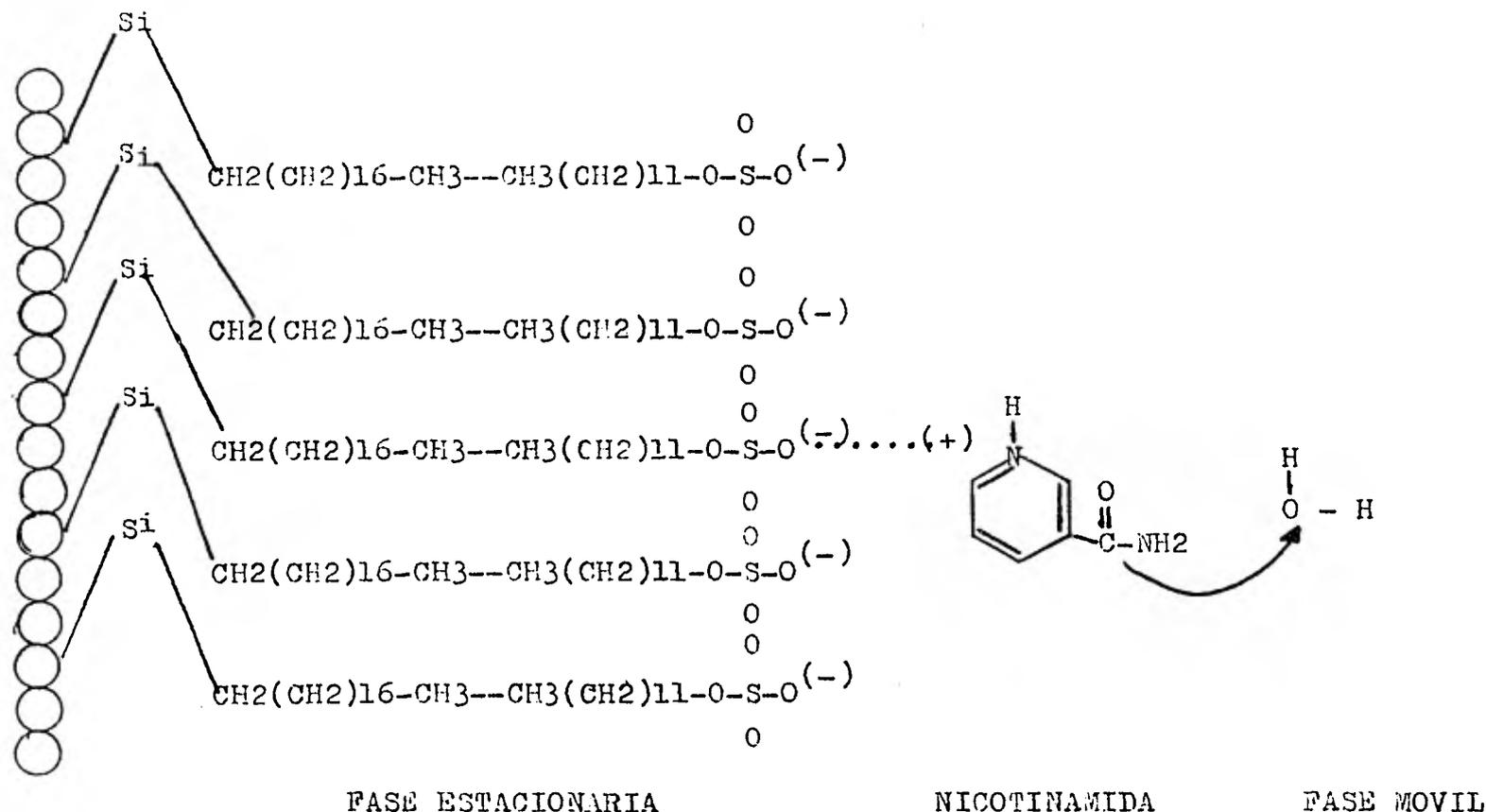
En la molécula del ácido ascórbico, la cetona se protona debido al medio ácido existente dentro de la columna, la cual se va a unir al grupo sulfato para formar par-iónico que se retiene debilmente a la fase estacionaria. Además la polaridad que presenta la molécula y su afinidad por la fase móvil hace que sea eluida en primer lugar.

Mecanismo de retención de la riboflavina:



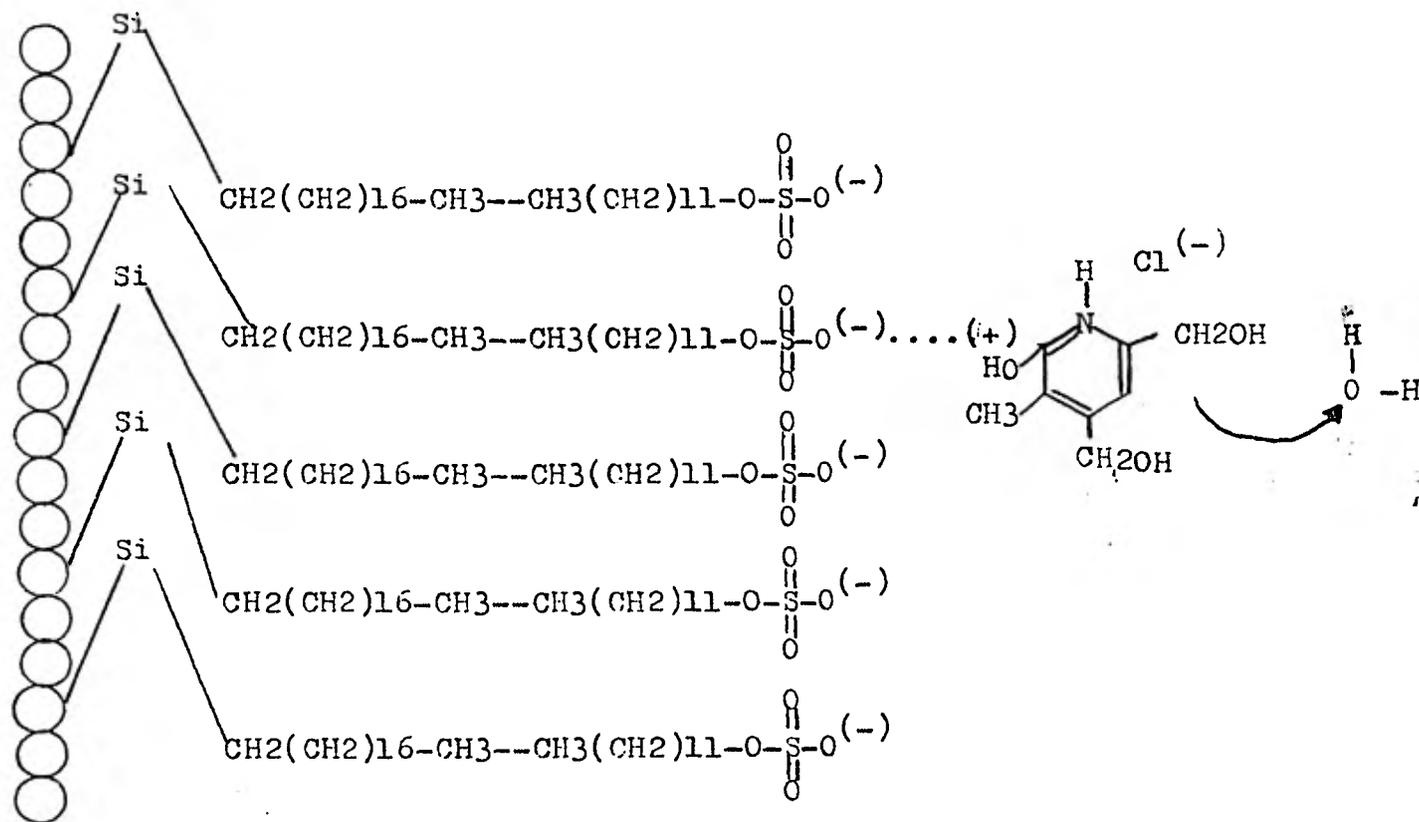
La riboflavina es retenida selectivamente por los sitios activos de la fase estacionaria; existen dos sitios activos de protonación en la molécula, pero la polaridad que presentan sus otros grupos funcionales la hacen afín a la fase móvil que la eluye de la columna cromatográfica.

Mecanismo de retención de la nicotinamida:



El nitrógeno del anillo piridínico es protonado por el medio ácido existente y va a formar par-iónico con el anión del grupo sulfato. La retención es mayor debido a la fuerza de unión con la fase estacionaria, el grupo funcional amida tiene afinidad por la fase móvil polar, lo que hace que pueda eluir de la columna cromatográfica

Mecanismo de retención del clorhidrato de piridoxina:



FASE ESTACIONARIA

PIRIDOXINA HCl

FASE MOVIL

Se observa que la molécula de clorhidrato de piridoxina es la que se retiene fuertemente a la fase estacionaria, y aunque contenga grupos funcionales polares que la hacen afín a la fase móvil, se observa que hay impedimento estérico, lo que hace que eluya al final.

Linealidad del Método.

El objeto de obtener linealidad en el método es encontrar la relación entre la cantidad adicionada de vitaminas y las cantidades encontradas de las mismas y demostrar que -- los cambios de concentración tienen un comportamiento lineal.

De acuerdo al método de cuantificación anteriormente descrito, se determinaron las concentraciones de diferentes muestras correspondientes a:

Ac. ascórbico	Clor.de piridoxina	Nicotinamida	Riboflavina.
mcg/ml	mcg/ml	mcg/ml	mcg/ml
700	10	100	10
800	20	200	10
900	30	300	30
1000	40	400	40
1100	50	500	50
1200	60	600	60

Tratamiento Estadístico de Correlación Regresión.

Análisis de Acido ascórbico en la mezcla multivita-
mínica.

Concentración (mcg/ml) Area de los picos.

X_A	X_E^2	Y_A	Y_E^2
700	490000	695.8	484137.64
800	640000	800.0	640000.00
900	810000	886.5	785882.25
1000	1000000	976.0	952676.00
1100	1210000	1100.0	1210000.00
1200	1440000	1200.0	1440000.00

$$\bar{X} = 950$$

$$S_X = 187.03$$

$$\bar{Y} = 943.05$$

$$S_Y = 187.90$$

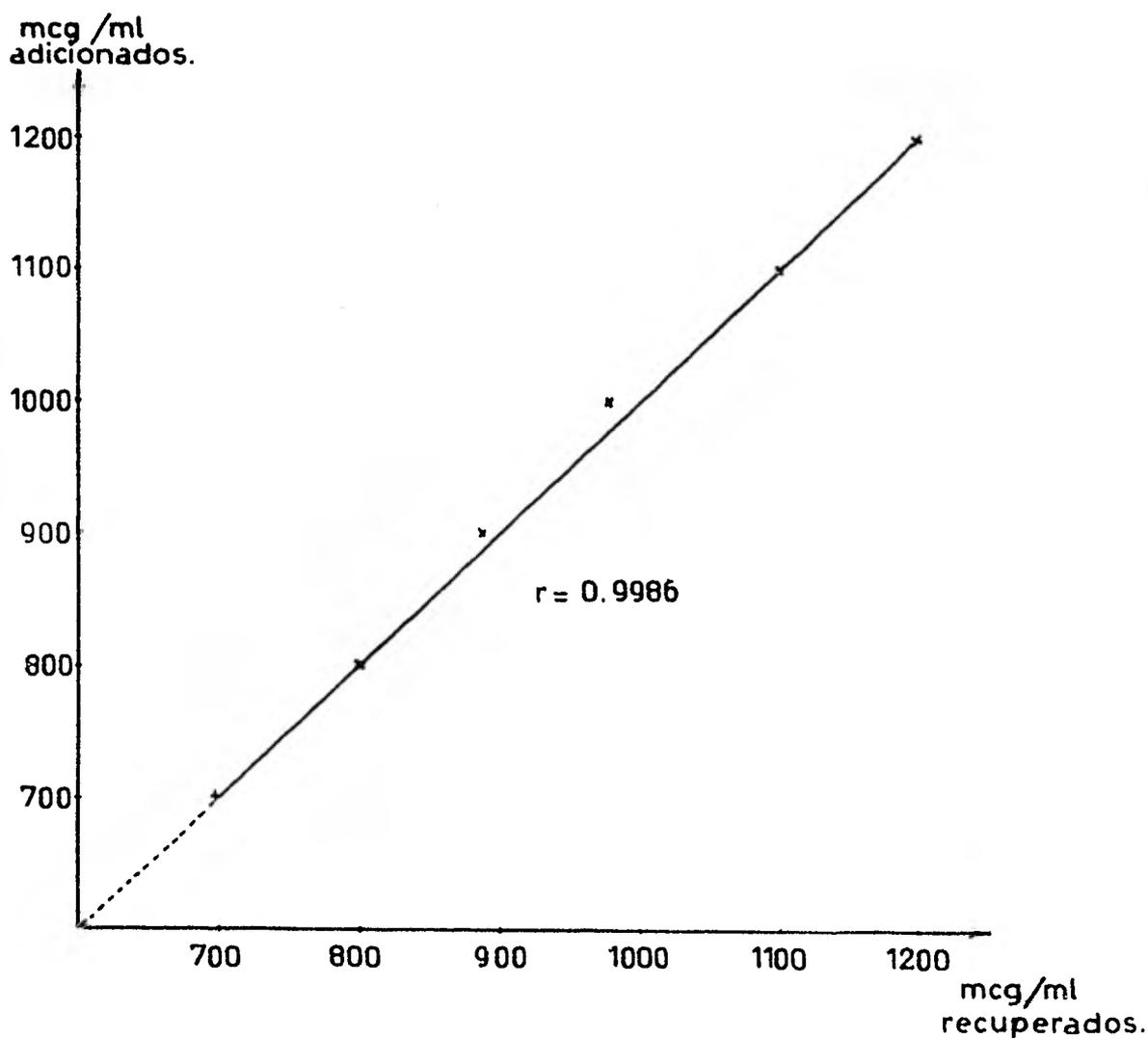
$$m = 1.003$$

$$b = -9.8$$

$$r = 0.9986$$

Linealidad del método para Acido Ascórbico

mcg/ml adicionados	mcg/ml recuperados
700	695.8
800	800.0
900	886.5
1000	976.0
1100	1100.0
1200	1200.0



Tratamiento Estadístico de Correlación Regresión.

Análisis de Nicotinamida en la mezcla multivitamínica.

Concentración (mcg/ml) Area de los picos.

X_A	X_E^2	Y_A	Y_E^2
100	10000	94.3	9860.49
200	40000	196.6	38651.56
300	90000	292.6	85614.74
400	160000	390.8	152724.64
500	250000	465.0	216225.00
600	360000	596.0	355216.00

$$\bar{X} = 350$$

$$S_X = 170.8$$

$$\bar{Y} = 340.05$$

$$S_Y = 165.6$$

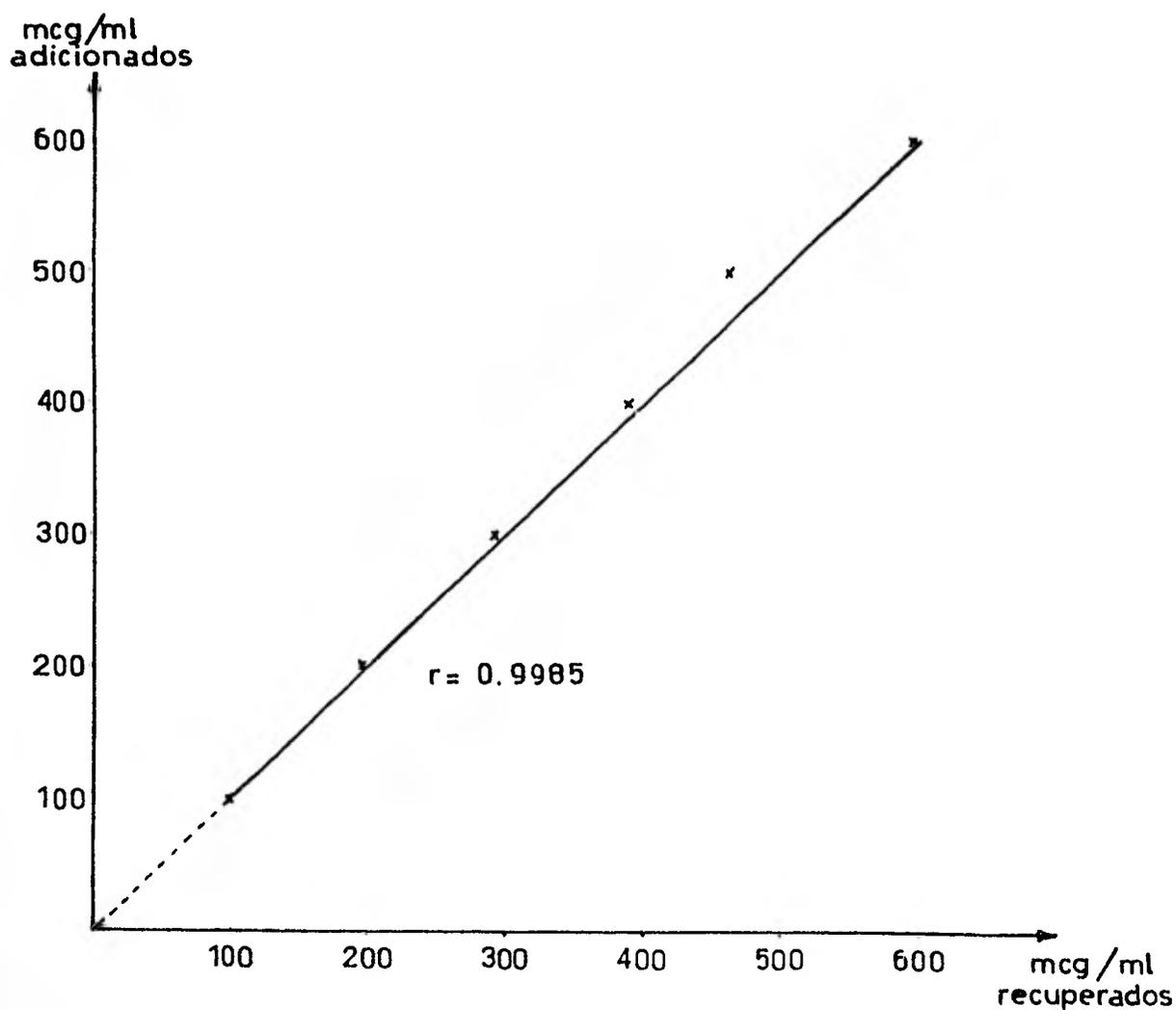
$$m = 0.9680$$

$$b = -1.36$$

$$r = 0.9985$$

Linearidad del método para Nicotinamida.

mcg/ml adicionados	mcg/ml recuperados
100	99.3
200	196.6
300	292.6
400	390.8
500	465.0
600	596.0



Tratamiento Estadístico de Correlación Regresión.

Análisis de Riboflavina en la mezcla multivitamínica.

Concentración (mcg/ml) Area de los picos.

X_A	X_E^2	Y_A	Y_E^2
10	100	9.64	92.93
20	400	19.50	380.25
30	900	27.60	761.76
40	1600	35.00	1225.00
50	2500	47.50	2256.25
60	3600	60.70	3684.49

$$\bar{X} = 35$$

$$S_X = 13.71$$

$$\bar{Y} = 33.3$$

$$S_Y = 18.64$$

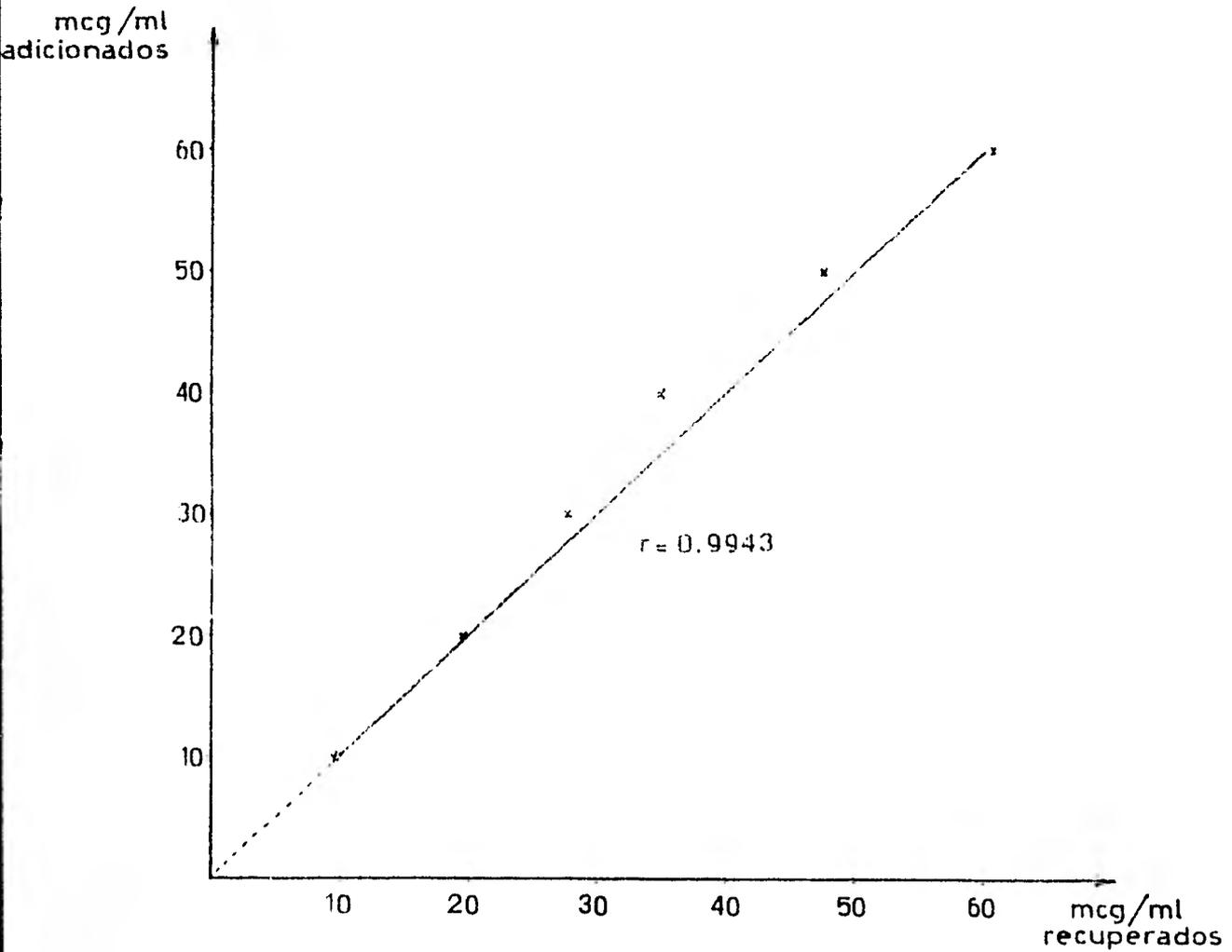
$$m = 0.9906$$

$$b = -1.35$$

$$r = 0.9943$$

Linealidad del método para Riboflavina.

mcg/ml adicionados	mcg/ml recuperados
10	9.64
20	19.5
30	27.6
40	35.0
50	47.5
60	60.7



Tratamiento Estadístico de Correlación Regresión

Análisis de Clorhidrato de piridoxina en la mezcla multivitamínica.

Concentración (mcg/ml) Area de los picos.

X_A	X_E^2	Y_A	Y_E^2
10	100	9.87	97.42
20	400	20.00	400.00
30	900	33.47	1220.24
40	1600	42.16	1777.47
50	2500	45.00	2025.00
60	3600	55.20	3047.04

$$\bar{X} = 35$$

$$S_X = 17.1$$

$$\bar{Y} = 34.28$$

$$S_Y = 15.35$$

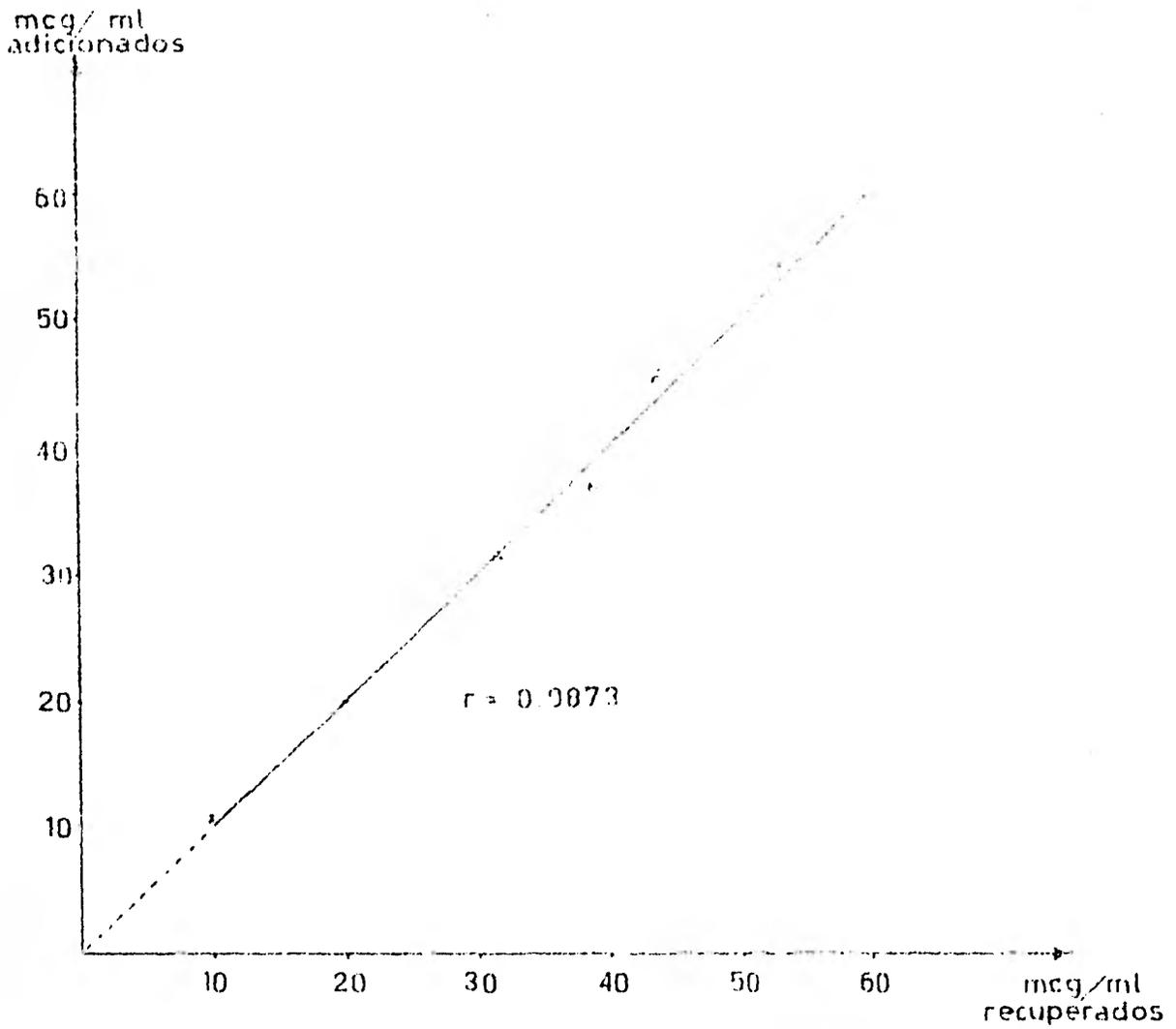
$$m = 0.8867$$

$$b = -3.25$$

$$r = 0.9873$$

Linealidad del método para Piridoxina.

mcg/ml adicionados	mcg/ml recuperados
10	9.87
20	20.00
30	33.47
40	42.16
50	45.00
60	55.20



EVALUACION ESTADISTICA DEL METODO

DETERMINACION DE RIBOFLAVINA BASE.

<u>Mg. AGREGADOS</u>	<u>Mg. ENCONTRADOS</u>	<u>% RECUPERADO</u>
1.0	0.987	98.7
1.0	0.995	99.5
1.0	0.999	99.9
1.0	0.998	99.8
1.0	0.995	99.5
1.5	1.497	99.9
1.5	1.501	100.1
1.5	1.500	100.0
1.5	1.497	99.8
1.5	1.498	99.9
1.5	1.504	100.3
1.5	1.497	99.8
1.5	1.508	100.5
1.5	1.512	100.8
1.5	1.505	100.3
2.0	2.026	101.3
2.0	2.006	100.3
2.0	2.050	102.5
2.0	1.996	99.8
2.0	1.978	98.9

X=100.08

LIMITES DE CONFIANZA 95 %

S=0.814

100.08 \pm 0.3809

EVALUACION ESTADISTICA DEL METODO

DETERMINACION DE NICOTINAMIDA.

<u>Mg. AGREGADOS</u>	<u>Mg. ENCONTRADOS</u>	<u>% RECUPERADO</u>
10	10.02	100.2
10	10.03	100.3
10	10.17	101.7
10	10.15	101.5
10	10.09	100.9
15	15.30	102.0
15	15.28	101.9
15	15.08	100.5
15	15.14	101.9
15	15.23	101.5
15	15.29	101.9
15	15.33	102.2
15	15.08	100.5
15	15.19	101.3
15	15.14	100.9
20	20.20	101.0
20	20.26	101.3
20	20.36	101.8
20	20.40	102.0
20	20.36	101.8

X=101.31

LIMITES DE CONFIANZA 95 %

S=0.6203

101.31 I \pm 0.2903

EVALUACION ESTADISTICA DEL METODO

DETERMINACION DE ACIDO ASCORBICO.

<u>Mg. AGREGADOS</u>	<u>Mg. ENCONTRADOS</u>	<u>% RECUPERADO</u>
40	40.16	100.4
40	40.60	101.5
40	39.92	99.9
40	40.32	100.8
40	40.20	100.5
50	49.75	99.5
50	50.05	100.1
50	49.65	99.3
50	50.29	100.4
50	49.95	99.9
50	49.75	99.5
50	49.90	99.8
50	50.25	100.5
50	49.90	99.8
50	49.85	99.7
60	59.34	98.9
60	59.70	99.5
60	59.94	99.9
60	59.88	99.8
60	59.70	99.5

X=99.96

LIMITES DE CONFIANZA 95 %

S=0.5907

99.96 \pm 0.2761

EVALUACION ESTADISTICA DEL METODO

DETERMINACION DE CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA.

<u>Mg. AGREGADOS</u>	<u>Mg. ENCONTRADOS</u>	<u>% RECUPERADO</u>
1.0	0.993	99.3
1.0	0.995	99.5
1.0	0.998	99.8
1.0	1.001	100.1
1.0	0.993	99.3
1.5	1.499	99.9
1.5	1.496	99.7
1.5	1.506	100.4
1.5	1.493	99.5
1.5	1.493	99.5
1.5	1.497	99.8
1.5	1.508	100.5
1.5	1.497	99.8
1.5	1.496	99.7
1.5	1.505	100.3
2.0	1.990	99.5
2.0	1.974	98.7
2.0	1.970	98.5
2.0	1.960	98.0
2.0	1.982	99.1

X=99.55

LIMITES DE CONFIANZA 95 %

S=0.625

99.55 \pm 0.2909

VIII.- Discusión y Resultados.

- La separación cromatográfica de estas vitaminas hidrosolubles involucró la adición de pequeñas cantidades de un ión-contrario a la fase móvil del sistema cromatográfico de fase reversa, dando como resultado la formación de un complejo lipofílico (par-iónico) cuando se inyecta al cromatógrafo un compuesto iónico. De tal manera que para los compuestos iónicos que son pobremente retenidos en un sistema de fase reversa convencional, al usar este tipo de reactivos se incrementa el tiempo de retención de los diferentes componentes de la mezcla.

El uso de compuestos que contienen un ión contrario presenta grandes ventajas sobre los métodos de intercambio iónico que existen para la separación de estas vitaminas (16) ya que frecuentemente las columnas se contaminan y tienen poca duración. En cambio al usar estos reactivos en preparaciones farmacéuticas, involucran la dilución y filtración de la muestra con posterior inyección.

- La hipótesis formulada está confirmada, puesto que el método desarrollado es reproducible y exacto y además confiable porque la separación está bien definida. Asimismo en poco tiempo se puede realizar la cuantificación de estas vitaminas.

- Los resultados encontrados demuestran que no es necesario el pre-tratamiento de la muestra, sino que simplemente se disuelve en agua, se filtra y se inyecta al cromatógrafo en las condiciones antes mencionadas. Lo que implica que el tiempo de análisis es corto y muy barato; siempre y cuando se cuente con el equipo necesario en el empleo de esta técnica.

VENTAJAS DEL METODO

- 1.- RAPIDEZ EN EL ANALISIS
- 2.- ANALISIS SIMULTANEO DE 4 VITAMINAS EN UNA
MUESTRA COMUN
- 3.- LA MUESTRA NO REQUIERE PRE-TRATAMIENTO.
- 4.- LA EVALUACION ESTADISTICA DEMUESTRA QUE ES UN METODO EXACTO
Y PRECISO.

IX.- C O N C L U S I O N E STIEMPO DE ANALISIS

M E T O D O	t. hrs.	METODO PROPUESTO (CLAP) t. hrs.
ACIDO ASCORBICO TITULACION	1	0.2
RIBOFLAVINA BASE U.V	1	0.2
PIRIDOXINA HCL U.V	3.5	0.2
NICOTINAMIDA U.V	3.5	0.2
T O T A L	9 hrs.	0.80

COSTO DE ANALISIS

	M E T O D O TRADICIONAL	M E T O D O PROPUESTO
	COSTO (\$)	COSTO (\$)
ACIDO ASCORBICO	98.43	
RIBOFLAVINA B	615.24	
PIRIDOXINA HCL	407.00	
NICOTINAMIDA	159.21	
T O T A L	2,279.88	61.73

X.- Bibliografía.

- 1.- Jenkins, G.L.A.M.
"Quantitative Pharmaceutical Chemistry"
Interscience, New York 1971,
pgs. 172-174.
- 2.- Kenneth A. Connors,
"A textbook of Pharmaceutical Analysis"
Wiley-Interscience, Second. Edition,
New York 1975
pgs. 194-196.
- 3.- Higuchi, Brochmann
"Pharmaceutical Analysis"
Interscience, New York 1961,
pgs. 689-691.
- 4.- Strahecher R. and Henning H.W.,
"Vitamin Assay tested Methods"
Co. Cleveland 1966,
pgs. 123.124- 227-229.
- 5.- Hashmi U.U.H.,
"Assay of Vitamin in Pharmaceutical Pre-
parations",
John Wiley and Sons, New York 1973,
pgs. 324-325.
- 6.- Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica,
"Fármacos 1973",
México 1973.
pgs. 264-279.
- 7.- Tatjana Bican-Fister,
"Quantitative Analysis of water-soluble
vitamins in multicomponent Pharmaceuti-
cal forms".
Journal of Chromatography, 77 (1973)
389-395.

- 8.- Kiyoshi Tsuji and Morozowich Walter,
"GLC and HPLC Determination of Therapeutic Agents".
Chromatographic Science series,
Part. I and II .
Marcel Dekker, Inc., New York 1978,
pgs. 50-176, 1335 -1344.
- 9.- Leibrand, R.J.,
"Preparing High Efficiency Packed GC
Columns"
Research Development, Sep. 1973,
pgs. 32-36, 33-40.
- 10.- Williams R.C., Baker D.R.,
"Analysis of Water-Soluble Vitamins by
High-Speed Ion-Exchange Chromatography",
Journal of Chromatographic Science,--
11, (1973) 618 - 624.
- 11.- Roggia, S. "Introduzione alla Cromatografia Líquida ad Alta Pressione",
Boll. Chim. Farm., 115 (1976) 611-623.
- 12.- Twitchett P.J., Moffat A.C.,
"High- Pressure Liquid Chromatography -
of Drug an Evaluation of an octadecyl
silane Stationary Phase",
Journal of Chromatography, 111 (1975)-
149-157.
- 13.- Wehrli, A.
"Component and Accessories for Preparative High-Performace Liquid Chromatography",
Journal Chromatographic. Libr. 13, VI
(1973) 93-111.

- 14.- Staffan Eksborg,
"Ion-Pair Chromatography, 33 (1973)-
99-110
- 15.- Kirchmeier R.L, Upton R.P.,
"Simultaneous Determination of Niacin,
Niacinamide, pyridoxine, thiamine, -
and riboflavin in Multivitamin Blend
by Ion-Pair High-Pressure".,
Journal of Pharmaceutical Sciences,-
67,10 (1978) 1444-1446.
- 16.- Sood, S.P.,
"Simultaneous High-Pressure Liquid --
Chromatographic Determination of ---
Niacin and Niacinamide in Multivita-
min Preparations. Reversed-Phase, --
Ion-Pairing Approach",
Journal of Pharmaceutical Sciences,-
66, I (1977) 40-42.