

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 028**

51 Int. Cl.:

C07D 489/02 (2006.01)

C07B 43/04 (2006.01)

B01J 23/72 (2006.01)

B01J 23/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2008** **E 08772839 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016** **EP 2170898**

54 Título: **Métodos para N-desmetilación de alcaloides de morfina y tropano**

30 Prioridad:

29.06.2007 US 771227

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.09.2016

73 Titular/es:

**BROCK UNIVERSITY (100.0%)
500 GLENRIDGE AVENUE
ST. CATHARINES, ONTARIO L2S 3A, CA**

72 Inventor/es:

**CARROLL, ROBERT;
LEISCH, HANNES y
HUDLICKY, TOMAS**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 584 028 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

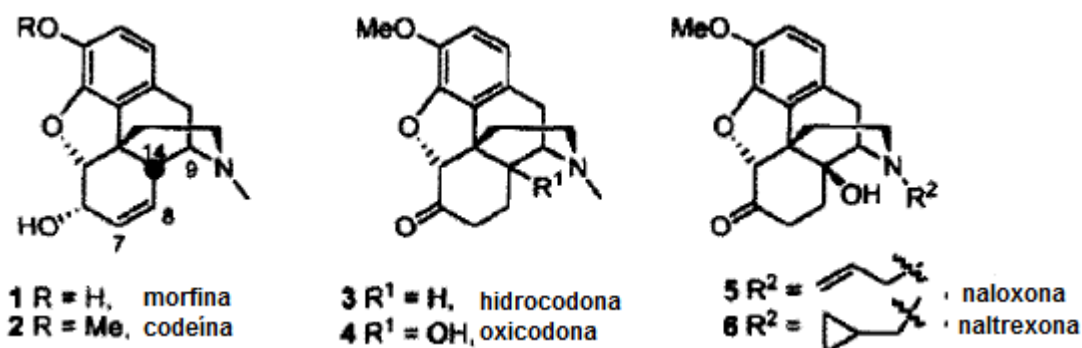
Métodos para N-desmetilación de alcaloides de morfina y tropano

Campo de la Invención

La presente invención se relaciona con compuestos N-metilados y métodos para N-desmetilación de los mismos. En particular la presente invención se relaciona con alcaloides de morfina y de tropano y sus derivados y métodos para N-desmetilación de los mismos.

Antecedentes de la Invención

La semisíntesis de los antagonistas derivados de morfina, tales como naloxona, véase el compuesto 5 adelante, y naltrexona véase el compuesto 6 adelante, y otros compuestos medicinalmente importantes, a partir de productos naturales derivados del opio tradicionalmente implica procedimientos estándar para la desmetilación seguida de procedimientos posteriores tales como procedimientos oxidativos para la introducción de un grupo hidroxilo C-14.



La mayoría de los procedimientos comerciales para la producción de especies C-14 hidroxiladas tienen la ventaja de especies insaturadas Δ_{7-8} , sin embargo, recientemente se han identificado compuestos que contienen cetonas α , β -insaturadas como genotoxinas potenciales debido a su carácter aceptor de Michael, y por lo tanto las rutas a los derivados oxigenados deben evitar estos productos intermedios.

Por lo tanto, cualquier método que evite estos procedimientos estándar puede contener inmenso potencial comercial para la producción de antagonistas derivados de morfina, tales como naloxona 5, naltrexona 6, y otros compuestos medicinalmente significativos.

El desarrollo de un protocolo catalítico leve para la N-desmetilación de morfina saturados de anillo C simplificaría las estrategias hacia derivados oxigenados de C-14 a través del uso potencial de un proceso intramolecular mediante funcionalización atada y anclada en el átomo de nitrógeno.

Se ha estudiado ampliamente la N-desmetilación de alcaloides del tipo de morfina. Los procedimientos estándar para la N-desmetilación de sustratos, que incluyen compuestos derivados de morfina incluyen el uso de bromuro de cianógeno (la reacción Braun von), la reacción de una amina terciaria con cloroformatos seguido por hidrólisis, así como un procedimiento de desmetilación fotoquímica. Otros métodos que se han utilizado para efectuar la desmetilación incluyen, entre otros, reacciones de tipo Polonovski. Precedente a un procedimiento de desmetilación oxidativa catalizada por Pd que utiliza cantidades estequiométricas de Pd/C, aparece en un solo informe por Chaudhuri.

El método de Chaudhuri describe el uso de Pd/C (1 g/1 g de sustrato) en MeOH a temperatura ambiente para desalquilar aminas terciarias. En ocasiones se observa que se aislaron pequeñas cantidades de especies N-formilo. Esta fue una reacción secundaria no deseada por su metodología. La aplicación de las condiciones descritas en este documento a hidrocodona no resulta en N-desmetilación. El único producto recuperado era N-formil hidrocodona. Por lo tanto, subsiste la necesidad de un método verdaderamente práctico para la producción de derivados de morfina desmetilados.

Resumen de la Invención

Una investigación de la química de alcaloides de morfina y sus derivados, como hidrocodona 3, y oxicodona 4, condujo a la presente invención, que involucra un método para una N-desmetilación oxidativa de un solo tubo.

De acuerdo con la presente invención se proporciona un método de un solo tubo para la N-desmetilación de un heterociclo N-metilado seleccionado del grupo que consiste de un alcaloide de morfina y un alcaloide de tropano que comprende mezclar el heterociclo N-metilado con un catalizador de metal en la presencia de un agente de oxidación, en donde el catalizador de metal se selecciona de CuCl, CuI, Cu(OAc)₂, CuCO₃, CuSO₄, CuCl₂, CuO, Pd(OAc)₂, PdCl₂, PdCl₂(PPh₃)₄, PdBR₂, Pd(acac)₂, Pd₂(dba)₃, Pd(dba)₂ y Pd(PPh₃)₄.

En algunas realizaciones el catalizador de metal y el agente de oxidación son los mismos.

En algunas realizaciones el agente de oxidación se selecciona del grupo que consiste de oxígeno, persulfato de amonio, peróxido de hidrógeno, m-CPBA, ácido peracético, mono peroxifalato de magnesio; paladio, acetato de paladio y combinaciones de los mismos y preferiblemente en donde el agente de oxidación se selecciona de oxígeno, acetato de paladio y persulfato de amonio.

En algunas realizaciones en donde el catalizador se selecciona del grupo que consiste de PdCl₂, Pd(OAc)₂, Pd(PPh₃)₄, Pd₂(dba)₃ y Pd(dba)₂ y más preferiblemente el catalizador es Pd(OAc)₂.

En algunas realizaciones en donde el catalizador se selecciona del grupo que consiste de CuCl, CuI, Cu(OAc)₂, CuCO₃, CuSO₄, CuCl₂, y CuO y más preferiblemente en donde el catalizador es Cu(OAc)₂. Preferiblemente el catalizador está presente en el rango de aproximadamente 0.1 equivalentes a aproximadamente 5.0 equivalentes, preferiblemente en el rango de aproximadamente 1.0 equivalentes a 2.5 equivalentes y más preferiblemente in aproximadamente 2.5 equivalentes.

En algunas realizaciones el catalizador está presente en el rango de aproximadamente 0.1 equivalentes a 5.0 equivalentes y el agente de oxidación está presente en el rango de aproximadamente 1.0 equivalentes a 8.0 equivalentes. Preferiblemente el catalizador está presente en el rango de aproximadamente 1.0 equivalentes a 2.5 equivalentes y el agente de oxidación está presente en el rango de 2.0 equivalentes a 4.0 equivalentes.

En algunas realizaciones preferidas el agente de oxidación es persulfato de amonio y preferiblemente en donde el catalizador está presente en aproximadamente 2.0 equivalentes y el persulfato de amonio está presente en 4.0 equivalentes.

En algunas realizaciones el alcaloide de morfina se selecciona del grupo que consiste de: tebaína, oripavina, 14-hidroxicodeinona, 14-hidroximorfinona, morfina, codeína, hidromorfona, hidrocodona, oximorfona, oxicodona, hidromorfol y oximorfol y en particular en donde el alcaloide de morfina es hidrocodona, y especialmente en donde el alcaloide de tropano se selecciona del grupo que consiste de tropinona, tropano, tropina, atropina, cocaína y cualesquier otras biciclo-[3.2.1]-azabíclicico metilaminas.

En algunas realizaciones el método comprende adicionalmente la adición de por lo menos un solvente en donde dicho solvente se selecciona del grupo que consiste de agua, benceno, dioxano, tolueno, acetonitrilo, alcoholes C1 a C4 y mezclas de los mismos. Preferiblemente el solvente comprende acetonitrilo y agua, más preferiblemente el acetonitrilo y agua están presentes en una relación de aproximadamente 10:0.5, y especialmente el solvente comprende una relación de acetonitrilo: agua de aproximadamente 5:1.

El desarrollo de un catalizador de Pd o Cu medidado por el método de desmetilación para la N-desmetilación de alcaloide de morfinano proporciona una forma muy práctica para obtener productos de normorfina.

Descripción detallada

La presente invención proporciona un método de un solo tubo para N-desmetilación catalizada de heterociclos N-metilado seleccionados a partir de alcaloide de morfina o alcaloides de tropano para proporcionar productos altamente deseados. El método de la invención es altamente reproducible y eficiente.

En resumen, el método comprende hacer reaccionar un sustrato de alcaloide con un catalizador de metal en la presencia de un agente de oxidación. En algunos casos, el metal en sí mismo puede actuar como un agente de oxidación. El oxígeno atmosférico también puede actuar como un agente de oxidación. En otros casos, se agrega un agente de oxidación adicional.

Se pueden desmetilar diversos tipos de alcaloides tal como oripavina, morfina, codeína, hidromorfona, hidrocodona, oximorfona, oxicodona, tropinona, tropano, tropina, atropina, cocaína, y biciclo-[3.2.1]-azabíclicico metilaminas utilizando los métodos de la invención.

Mientras que un derivado de alcaloide de morfina preferido es hidrocodona y los ejemplos se enfocan sobre la desmetilación de hidrocodona, es evidente que otros alcaloides de morfina o alcaloides de tropano también se pueden desmetilar por los presentes métodos.

Se pueden utilizar diversos tipos de catalizador para obtener productos desmetilados. Se ha mostrado que el catalizador a base de paladio tal como PdCl_2 , $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ y $\text{Pd}(\text{dba})_2$ es particularmente útil. El $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ en particular, resulta en rendimientos significativos del producto.

5 También se ha mostrado que los catalizadores a base de cobre son excelentes catalizadores para el uso en el método. Un catalizador particularmente efectivo es $\text{Cu}(\text{OAc})_2$.

Bajo ciertas condiciones, es deseable incluir un solvente. El solvente normalmente es agua, benceno, dioxano, tolueno, acetonitrilo, alcoholes C_1 a C_4 o una mezcla de cualquiera de estos.

Sin estar limitado, frecuentemente se utilizan las siguientes condiciones:

- (a) El sustrato se disuelve en un solvente;
- 10 (b) Se agrega un catalizador;
- (c) Se agrega un oxidante;
- (d) La reacción se desarrolla desde aproximadamente 8 hasta 40 horas, opcionalmente a temperatura ambiente, opcionalmente a una temperatura elevada;
- (e) Se elimina el solvente;
- 15 (f) El residuo se resuspende en un medio básico acuoso;
- (g) La fase acuosa se extrae, se seca y se filtra, y
- (h) Se eliminan las sustancias volátiles restantes.

20 Mientras que las etapas básicas de los métodos se mantienen constantes, las condiciones óptimas para la desmetilación varían, dependiendo del sustrato de partida, catalizador usado, solvente utilizado, duración de la reacción y temperatura de la reacción. Como se discutió anteriormente, se pueden utilizar varios tipos de sustrato, catalizador y oxidantes. Los tiempos de reacción varían normalmente de aproximadamente 8 a 40 horas dependiendo del catalizador y la temperatura. Los compuestos desmetilados se han recuperado a temperaturas de reacción que varían desde la temperatura ambiente hasta aproximadamente 90'. Por ejemplo, cuando se utiliza acetato de paladio como catalizador para la desmetilación de hidrocodona en presencia de benceno, se consigue un rendimiento óptimo

25 cuando la reacción se calienta a aproximadamente 80' y la reacción transcurre durante 36 horas. Por otra parte, se ha mostrado que la combinación de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ como catalizador con $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ con agente oxidante es altamente eficiente después de un tiempo de reacción de 9 horas a temperatura ambiente. Las cantidades relativas del sustrato, el catalizador y el oxidante también afectan el rendimiento.

30 Normalmente se utilizan concentraciones de aproximadamente 0.01 a 100 ml de solvente/gramo de alcaloide en una reacción a pequeña escala.

Normalmente la cantidad de catalizador está en el rango de aproximadamente 1 equivalente a 4 equivalentes, más preferiblemente aproximadamente 2.0 equivalentes a 2.5 equivalentes, aún más preferiblemente aproximadamente 2.5 equivalentes.

35 Los solventes preferidos son dioxano, benceno y acetonitrilo. En particular es efectiva una relación de aproximadamente 5:1 acetonitrilo a agua.

Se muestran unos pocos procedimientos de ejemplo en los Ejemplos a continuación. Aunque estos ejemplos se centran en la desmetilación de hidrocodona y codeína, es evidente que se puede aplicar la química general a otros alcaloides de morfina y tropano y que otros catalizadores y oxidantes que funcionan de una manera similar a aquellos utilizados en los ejemplos específicos también son útiles en la invención.

40 La divulgación anterior describe en general la presente invención. Se considera que un experto en la técnica puede, utilizando la descripción precedente, hacer y utilizar las composiciones y practicar los métodos de la presente invención. Un entendimiento más completo se puede obtener mediante referencia a los siguientes ejemplos específicos. Estos ejemplos solo se describen para ilustrar realizaciones preferidas de la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la invención. Los cambios en la forma y sustitución de equivalentes que se contemplan como circunstancias

45 que se pueden sugerir o hacerse convenientes. Otras configuraciones genéricas serán evidentes para un experto

común en la técnica. Todos los artículos de revistas y otros documentos tales como patentes o solicitudes de patentes mencionadas aquí se incorporan como referencia.

EJEMPLOS

Aunque se han utilizado términos específicos en estos ejemplos, dichos términos están destinados en un sentido descriptivo y no con propósitos de limitación. Los métodos de biología molecular, bioquímica y química hacen referencia pero no se describen explícitamente en la descripción y se reportan estos ejemplos en la bibliografía científica y son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Ejemplo 1. Procedimiento general para desmetilación utilizando acetato de paladio

La amina terciaria (0.1 mmol, 1.0 eq.) se disuelve en benceno (1 ml) y se agrega $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0.25 mmol, 2.5 eq.). La reacción se calienta a reflujo durante 36 horas, se enfría a temperatura ambiente y se pasa a través de un tapón de sílice utilizando $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$ 80:20:1 como eluyente. Los volátiles se eliminan en vacío, y el residuo se suspende en una solución acuosa saturada de NaHCO_3 . La fase acuosa se extrae con CHCl_3 , se seca sobre sulfato de magnesio, se filtra y los volátiles se eliminan en vacío. La cromatografía de columna (gel de sílice; $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$ 96:4:1) del material crudo proporciona producto desmetilado analíticamente puro.

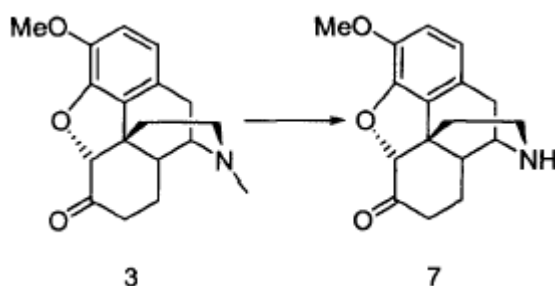
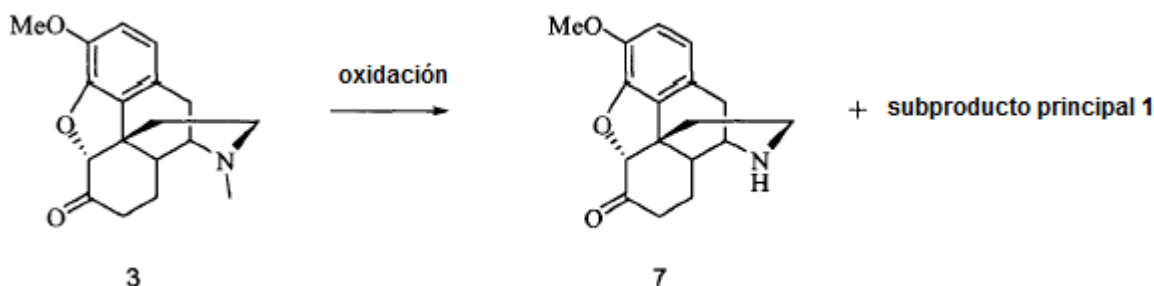


Tabla 1: N-desmetilación de bitartrato de hidrocodona 3

Entrada	Condiciones (15 hrs, a menos que se indique lo contrario)	rendimiento de 7 (%)
1	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (1.2 equiv.), benceno, 80° C	20% (70% rec. SM)
2	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (2.5 equiv.), benceno, 80° C, 36 hrs	40% (55% rec. SM)

Ejemplo 2. Procedimiento general para desmetilación utilizando acetato de cobre (II)

La amina terciaria (0.1 mmol, 1.0 eq.) se disuelve en $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$; 5 : 1 y se agregan $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (0.2 mmol, 2.0 eq.) y $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (0.4 mmol, 4.0 eq.). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 12 horas. La mezcla de reacción se detiene mediante adición de solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 10% acuosa. El solvente orgánico se elimina en vacío, y el residuo se basifica a pH 9 utilizando NH_4OH acuoso concentrado. La fase acuosa se extrae con DCM, se seca sobre sulfato de magnesio, se filtra y los volátiles se eliminan en vacío. La cromatografía de columna (gel de sílice; $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$ 96:4:1) del material crudo proporciona producto desmetilado analíticamente puro.



ES 2 584 028 T3

Entrada	Catalizador	Oxidante	Condiciones	Norhidrocodona (7)	Subproducto	Hidrocodona
1	Cu(OAc) ₂ 0.5 eq.	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ 2 eq.	20% AcOH, rt (4 hrs) -> 80°C (16 hrs)	varios subproductos		75 %
2	Cu(OAc) ₂ 0.5 eq.	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ 2 eq.	CH ₃ CN/H ₂ O; 5:1; rt	20 %	8 %	64 %

Variación de catalizador y carga de oxidante:

Se llevan a cabo todas las reacciones a temperatura ambiente y bajo una atmósfera de aire, utilizando CH₃CN : H₂O 5 : 1 como solvente y tiempo de reacción 9 horas.

Entrada	Cu(OAc) ₂	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	Norhidrocodona (7)	Subproducto	Hidrocodona
1	0.5 eq.	2 eq.	20 %	8 %	64 %
2	1 eq.	2 eq.	36 %	7 %	46 %
3	2 eq.	4 eq.	64 %	20 %	10 %
4	1 eq.	4 eq.	36 %	12 %	38 %
5	0.5 eq.	4 eq.	24 %	7 %	55 %

Temperatura de reacción 50° C

Entrada	Cu(OAc) ₂	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	Norhidrocodona (7)	Subproducto	Hidrocodona
1	0.5 eq.	2 eq.	42 %	10 %	32 %

Diversas Atmósferas

Condiciones de reacción: 2 eq. Cu(OAc)₂, 4 eq. (NH₄)₂S₂O₈, CH₃CN : H₂O; 5 :1, RT, 16 hrs

Entrada	Atmósfera	Norhidrocodona (7)	Subproducto	Hidrocodona
1	Oxígeno	53 %	23 %	15 %
2	Argón	50 %	18 %	18 %

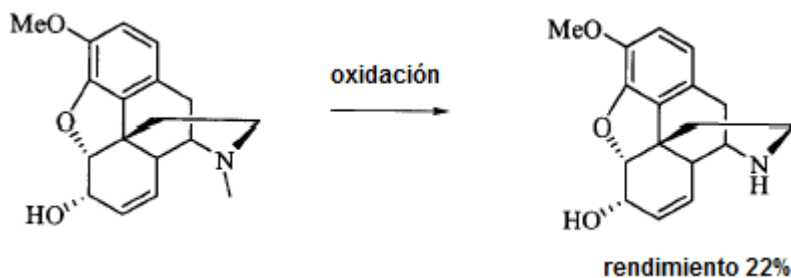
Cribado de solvente

Condiciones de reacción: 2 eq. $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, 4 eq. $(\text{NH})_4\text{S}_2\text{O}_8$, RT, 16 hrs.

Entrada	Solvente	Norhidrocodona	Subproducto	Hidrocodona
1	$\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$ 5:1	64 %	20 %	10 %
2	CH_3CN	30 %	Trazas	56 %
3	$\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$ 1 : 1	45 %	34 %	18 %

Ejemplo 3. Desmetilación de codeína

- 5 Se desmetila la codeína utilizando las siguientes condiciones: 2 eq. $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, 4 eq. $(\text{NH})_4\text{S}_2\text{O}_8$, $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$; 5 :1, RT, 16 hrs.



Todos los datos analíticos para los compuestos están de acuerdo con lo reportado en la bibliografía.

- 10 Se han descrito a modo de ejemplo una o más realizaciones actualmente preferidas. Será evidente para aquellos expertos en la técnica que se puede realizar un número de variaciones y modificaciones sin apartarse del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

Reivindicaciones

1. Un método de un solo tubo para la N-desmetilación de un heterociclo N-metilado seleccionado del grupo que consiste de un alcaloide de morfina y un alcaloide de tropano que comprende mezclar el heterociclo N- metilado con un catalizador de metal en la presencia de un agente de oxidación, en donde el catalizador de metal se selecciona de CuCl, CuI, Cu(OAc)₂, CuCO₃, CuSO₄, CuCl₂, CuO, Pd(OAc)₂, PdCl₂, PdCl₂(PPh₃)₄, PdBR₂, Pd(acac)₂, Pd₂(dba)₃, Pd(dba)₂ y Pd(PPh₃)₄.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el catalizador de metal y el agente de oxidación son los mismos.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el agente de oxidación se selecciona del grupo que consiste de oxígeno, persulfato de amonio, peróxido de hidrógeno, m-CPBA, ácido peracético, mono peroxifalato de magnesio, paladio, acetato de paladio y combinaciones de los mismos.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3 en donde el agente de oxidación se selecciona de oxígeno, acetato de paladio y persulfato de amonio.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el catalizador se selecciona del grupo que consiste de PdCl₂, Pd(OAc)₂, Pd(PPh₃)₄, Pd₂(dba)₃ y Pd(dba)₂.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el catalizador es Pd(OAc)₂.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el catalizador se selecciona del grupo que consiste de CuCl, CuI, Cu(OAc)₂, CuCO₃, CuSO₄, CuCl₂, y CuO.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el catalizador es Cu(OAc)₂.
9. El método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el catalizador está presente en el rango de aproximadamente 0.1 equivalentes a aproximadamente 5.0 equivalentes.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9 en donde el catalizador está presente en el rango de aproximadamente 1.0 equivalentes a 2.5 equivalentes.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 9 en donde el catalizador está presente en aproximadamente 2.5 equivalentes.
12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el catalizador está presente en el rango de aproximadamente 0.1 equivalentes a 5.0 equivalentes y el agente de oxidación está presente en el rango de aproximadamente 1.0 equivalentes a 8.0 equivalentes.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el catalizador está presente en el rango de aproximadamente 1.0 equivalentes a 2.5 equivalentes y el agente de oxidación está presente en el rango de 2.0 equivalentes a 4.0 equivalentes.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 7 o 8, en donde el agente de oxidación es persulfato de amonio.
15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el catalizador está presente en aproximadamente 2.0 equivalentes y el persulfato de amonio está presente en 4.0 equivalentes.
16. El método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el alcaloide de morfina se selecciona del grupo que consiste de tebaína, oripavina, 14-hidroxicodeinona, 14-hidroximorfinona, morfina, codeína, hidromorфона, hidrocodona, oximorфона, oxicodona, hidromorfol y oximorfol.
17. El método de acuerdo con la reivindicación 16 en donde el alcaloide de morfina es hidrocodona.
18. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde el alcaloide de tropano se selecciona del grupo que consiste de tropinona, tropano, tropina, atropina, cocaína y cualesquier otras biciclo-[3.2.1]-azabícliclo metilaminas.
19. El método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende adicionalmente la adición de por lo menos un solvente en donde dicho solvente se selecciona del grupo que consiste de agua, benceno, dioxano, tolueno, acetonitrilo, alcoholes C1 a C4 y mezclas de los mismos.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el solvente comprende acetonitrilo y agua.

21. El método de acuerdo con la reivindicación 19 en donde el acetonitrilo y agua están presentes en una relación de aproximadamente 10:0.5.

22. El método de acuerdo con la reivindicación 19 en donde el solvente comprende una relación de acetonitrilo: agua de aproximadamente 5:1.

5