

24.26



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"Z A R A G O Z A"

**" DESARROLLO DE UN METODO
ANALITICO PARA LA DETERMINACION
DE ACETATO DE HIDROXOCOBALAMINA
POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE
ALTA RESOLUCION EN UN INYECTABLE "**

T E S I S

Que para obtener el título de :

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

SERGIO FEDERICO RAMIREZ PACHECO

México, D. F.

1 9 8 7



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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

I.- INTRODUCCION	1
II.- FUNDAMENTACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBELMA.....	3
III.- OBJETIVOS	5
IV.- HIPOTESIS.....	6
V.- GENERALIDADES	7
5.1. VITAMINAS.....	7
5.2. METODO CROMATOGRAFICO.....	11
VI.- MONOGRAFIA.....	36
6.1. NOMBRES QUIMICOS Y SINONIMOS	36
6.2. FORMULA DESARROLLADA	36
6.3. FORMULA CONDENSADA	36
6.4. PESO MOLECULAR	36
6.5. DESCRIPCION.....	37
6.6. SOLUBILIDAD.....	37
6.7. ENSAYOS DE IDENTIDAD	37
6.8. ENSAYOS DE PUREZA	38
6.9. CONSERVACION	39
6.10. TOXICOLOGIA	39
6.11. FARMACODINAMIA	39
6.12. ABSORCION	40
6.13. DISTRIBUCION Y DESTINO	41
6.14. EXCRESION	42
VII.- VALIDACION DE METODOS ANALITICOS	43
7.1. ESPECIFICIDAD	43
7.2. EXACTITUD	43

7.3. LINEARIDAD	44
7.4. PRECISION	45
VIII.- MATERIAL Y METODO.....	46
IX.- PARTE EXPERIMENTAL	57
9.1. SELECCION DE FASE MOUIL	57
9.2. LINEARIDAD DEL METODO	57
9.3. EXACTITUD Y PRECISION DEL METODO	58
X.- RESULTADOS	59
XI.- CONCLUSIONES	74
XII.- BIBLIOGRAFIA.....	75

I. INTRODUCCION.

Los métodos oficiales descritos en la Farmacopea Nacional de Los Estados Unidos Mexicanos (F.N.E.U.M.) para valorar Acetato de Hidroxocobalamina son: Método espectrofotométrico, el que se basa en la absorción del Acetato de Hidroxocobalamina a una longitud de onda de 351 nm , en la cual ésta sustancia presenta uno de sus máximos de absorción, no obstante que es un método específico, confiable y rápido, no es posible utilizarlo para estudios de estabilidad, porque al descomponerse el Acetato de Hidroxocobalamina, sus productos de degradación también presentan absorción a ésta misma longitud de onda. Por otro lado, el método microbiológico es muy tardado y costoso, éste consiste en preparar muestras de Acetato de Hidroxocobalamina a diferentes concentraciones con medios de cultivo adecuados y un microorganismo determinado. Después de un tiempo de incubación se mide la absorbancia de los diferentes medios de cultivo, cuyo contenido de Acetato de Hidroxocobalamina es conocida y la absorbancia de la muestra problema. Para determinar la cantidad de Acetato de Hidroxocobalamina en la muestra problema, se interpola la absorbancia de ésta en una gráfica de calibración (absorbancia contra concentración de Acetato de Hidroxocobalamina) (11).

Para poder realizar estudios de estabilidad, es de suma importancia desarrollar métodos analíticos que sean rápidos, reproducibles, confiables y sobre todo indicadores de estabilidad; por ello el presente trabajo, describe una técnica analítica por Cromatografía de Líquidos de Alta resolución (CLAR) y la validación de la misma.

En inglés ésta técnica se conoce como High Performance Liquid Chromatographic o HPLC. A lo largo de éste trabajo, el término CLAR será utilizado como sinónimo de dicha técnica.

II. FUNDAMENTACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Entre los muchos requisitos que debe de cumplir un medicamento para que pueda salir al mercado, destacan los estudios de estabilidad del mismo. Estos estudios consisten en poner el medicamento a diferentes condiciones de temperatura e ir determinando la concentración del principio activo a diferente tiempo; de los resultados obtenidos, es posible calcular la constante de velocidad de degradación del activo en el medicamento y el orden de reacción; ya con éstos datos, es posible calcular la fecha de caducidad a temperatura ambiente, haciendo uso del modelo matemático de Arrhenius.

El problema planteado es el de desarrollar una técnica analítica específica, esto es, que al medir alguna propiedad fisicoquímica del activo, la respuesta que se obtenga sea directamente proporcional a la concentración del mismo y que al disminuir la concentración (por degradación), la intensidad de la respuesta medida, también disminuya en forma proporcional, sin que interfieran en la medición los productos de degradación del activo o los productos de degradación del placebo, de tal manera que, se puedan tener datos confiables de la

vida útil del medicamento. Por tal motivo, se ha propuesto desarrollar una técnica analítica por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), dada su versatilidad, rapidez, reproducibilidad, precisión y exactitud.

III. OBJETIVOS.

A) Desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) indicador de estabilidad que sea confiable y reproducible.

B) Validar el método analítico desarrollado para valorar Acetato de Hidroxocobalamina.

IV. HIPOTESIS.

Si los productos de degradación del Acetato de Hidroxocobalamina así como los productos de degradación del placebo, no absorben a una longitud de onda de 351 nm. además de poseer diferente polaridad en comparación con el Acetato de Hidroxocobalamina, entonces será posible desarrollar un método analítico específico indicador de estabilidad por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

V. GENERALIDADES.

5.1. Vitaminas.

5.1.1. Antecedentes.

El individuo sano cuya dieta está bien equilibrada normalmente recibe de los alimentos, cantidades suficientes de vitaminas, las vitaminas obtenidas de ésta forma difícilmente pueden considerarse como medicamentos. Sin embargo en muchas circunstancias, la concentración de una o varias vitaminas en los tejidos del organismo es inferior a la óptima; cuando surge ésta situación, o cuando se prevé que pueda ocurrir, suelen administrarse las vitaminas en su forma químicamente pura. Empleandose de ésta manera, las vitaminas tienen que considerarse como medicamentos, por lo que es necesario reconocer sus propiedades farmacológicas (6).

Las vitaminas son sustancias orgánicas que existen en los alimentos, capaces o no de ser sintetizadas en el organismo en cantidades adecuadas, que actúan en pequeñas dosis y no son usadas como fuente material o energética, pero que son necesarias para el mantenimiento de las funciones metabólicas normales del organismo y de la salud.

En 1912, el inglés F.G. Hopkins demostró experimentalmente que los animales necesitan más que proteínas y grasas para su normal crecimiento. Postuló que uno o más "factores accesorios"

presentes en los alimentos naturales eran también necesarios para la nutrición animal. En ese mismo año, Casimir Funk, obtuvo un concentrado de una amina a partir de la cascarilla del arroz que aliviaba los síntomas del beriberi, enfermedad común entre los marineros japoneses limitados a una dieta de arroz molido o descascarillado. De ahí derivó el nombre de vitamina, indicativo de amina esencial para la vida, aunque muchas de las sustancias de esta clase no son aminas.

Ya desde el siglo XVII se utilizaba el aceite de hígado de bacalao para el tratamiento del raquitismo, y más tarde se descubrió que el jugo de la liina era un preventivo para los síntomas del escorbuto (10).

Mediante un fraccionamiento sistemático de las fuentes naturales de los factores de crecimiento y ensayando la potencia de los concentrados sobre el ritmo del crecimiento de los animales, se logró finalmente obtener dichos factores en forma pura, lo cual permitió su identificación química. Se produjo un cambio profundo a mediados de la década de los años treinta, en que fueron aisladas por primera vez algunas vitaminas y , se establecieron sus estructuras moleculares, hazaña de laboratorio durante esa época, ya que solamente podían obtenerse cantidades del orden de miligramos de sustancia pura, partiendo de centenares de kilogramos

del material de partida. Se identificaron en unos años la tiamina (vitamina B 1), la riboflavina (vitamina B2) y el ácido nicotínico, que es el factor antipelagra (10).

Poco después se descubrió que esas vitaminas actúan como componentes fundamentales de algunas coenzimas. Estos descubrimientos demostraron no sólo el papel biológico de muchas vitaminas y por qué actúan en cantidades mínimas, sino que han señalado además el camino para la comprensión molecular del mecanismo mediante el cuál las coenzimas y enzimas aceleran la velocidad de las reacciones químicas.

5.1.2. Clasificación de las vitaminas.

Las vitaminas se clasifican por su solubilidad en dos grupos, las solubles en agua (Hidrosolubles) y las solubles en disolventes orgánicos comunes (liposolubles)

a) Vitaminas hidrosolubles . El complejo vitamínico B comprende un gran número de vitaminas que difieren mucho en su estructura química y acción biológica, se ha formado un grupo con ellas porque todas son hidrosolubles y se obtienen, en cantidades de alguna importancia, de las mismas fuentes, especialmente del hígado y de la levadura.

Nueve de los compuestos generalmente considerados como miembros del complejo B son : Tiamina, Riboflavina, Acido nicotínico, Piridoxina, Acido pantoténico

co , Biotina , Colina , Inositol, Acido p-aminobenzóico , Acido fólico y Cianocobalamina . La función coenzimática de todas las vitaminas hidrosolubles es razonablemente bien conocida con la excepción de la vitamina C. (6,9,12).

b) Vitaminas liposolubles . Las vitaminas liposolubles comprenden a las vitaminas A, D, E y K . Sólomente los animales superiores parecen prescindir de procedencia exógena . Todas las vitaminas liposolubles tienen características en común , existen en los tejidos vegetales como vitaminas o provitaminas , a diferencia de los animales en dónde están concentrados en unos cuantos tejidos .

Las vitaminas liposolubles se almacenan en el hígado y en menor extensión en otros tejidos adiposos . Las reservas son grandes y la utilización o excreción es extremadamente lenta (6) .

5.2. METODOS CROMATOGRAFICOS.

5.2.1. Desarrollo histórico.

En 1905 Ramsey utilizó por primera vez técnicas cromatográficas para separar mezclas de grasas y vapores. Al año siguiente el botánico ruso Tswett empleó la cromatografía de elución en un experimento que tenía por objeto la separación de clorofila de la clorofila de extractos vegetales , utilizó una columna de vidrio , rellena de carbonato de calcio , introdujo el extracto vegetal disuelto en éter de petróleo , a continuación agregó más éter de petróleo y observó que, a medida que el éter pasaba a través de la columna , se separaban bandas de diversos colores que correspondían a los carotenos , las clorofilas y las xantofilas . De aquí el origen de la palabra cromatografía que, literalmente , significa " color escrito " ; hoy éste método se llama cromatografía líquido-sólido .

En 1952 Martín y James introdujeron la cromatografía de gases , que se ha convertido en una de las técnicas analíticas más útiles para el análisis de gases y compuestos volátiles orgánicos.

No fue sino hasta 1968 que se introdujo un avance considerable en la técnica de cromatografía líquida , no obstante que el primer experimento de cromatografía fue

una forma de cromatografía líquida ; éste avance fue gradual y se debió a la introducción de altas presiones de operación y de sistemas de detección continuo ; es objeto de grandes y nuevas mejoras y cabe resaltar que en un futuro próximo su uso será muy amplio .

La cromatografía constituye un método analítico que permite la separación de una mezcla en sus diferentes componentes . En el cuadro número 1 se presenta un estudio cronológico de la evaluación de la cromatografía desde A. C. hasta inicio de la nueva era con Stahl y Desagra en 1956.

CUADRO No. 1

Estudio cronológico , de la evaluación de la cromatografía desde A.C. hasta inicio de la nueva era con Shal y Desaga.

AUTOR	MATERIAL	APLICACION
Plinio el mayor (79-23 A.C.)	Papiro	FeSO ₄
Pungo-Schonbein Goppel roeder	Papel filtro "Análisis Capilar "	Cationes Aniones
Reed (1893)	Caolín	Cromato de potasio, eosina FeCL ₃ - CuS ₄
Michael Tsweet (1906)	CaCo ₃ (columna)	Clorofila pigmentos vegetales
Ismailow-Schpaiber	Alúmina(columna)	Belladona extractos medicinales.
Martín-Synge(1940) 1952 Premio nobel	Silica gel en columna C. de Partición	Separación de proteínas y A. acetilados.
Crow(1941)	Alúmina en caja de petri	Separación de mezclas y otros compuestos.

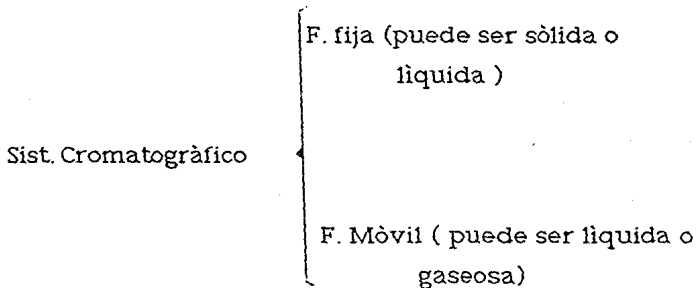
Condsen-Gordon Martín (1944)	C.partition microes- cala, C. en papel .	Separación de to- do tipo de compues- tos .
Período 1939-1945 Suecia/Tiselius- Willstatter y col.	Perfeccionamiento papel Ascendente- Descendente etc.	Preponderancia en identificación de eluido .
Kirchner-Miller (1950)	Papel impregnado , Vidrio, placas .	Terpenos
1952 Primeros reportes de C. de Gases	C.G. en soportes de sílica	Acidos grasos volátiles (Ac. fórmico a dodeca- noico)
Reitserna (1954)	Placas de vidrio .	Aceites esenciales
Stahl-Desaga (1956)	Perfeccionamiento C.C.F. Sílica gel y to- do tipo de absorbentes .	Todo tipo de compuestos

5.2.2. sistema cromatogràfico.

Todo sistema cromatogràfico està integrado por dos componentes , uno llamado fase estacionaria y el otro fase mòvil:

a) Fase fija o estacionaria : Es dònde tendrà lugar la separaciòn . A èsta fase tambièn se le llama Soporte o ADSORVENTE.

b) Fase Mòvil: Llamada tambièn disolvente o ELUYENTE. La fase mòvil serà la que efectùe la separaciòn de la mezcla al desplazarse sobre la fase fija.



Dependiendo de la naturaleza química de la fase mòvil y estacionaria , así como de la mezcla a separar y de la interacciòn fisicoquímica que tenga lugar entre ellas , se tiene lugar a dos clases de cromatografía: Adsorciòn y Partición.

A) ADSORCION.-El soporte (fase fija) posee un alto poder

de atracción electrostática sobre la mezcla. La elución o separación puede efectuarse mediante fuerzas competitivas del disolvente empleado.

B) PARTICION.- Los sitios capaces de poseer una atracción electrostática sobre la mezcla, están ocupados por un líquido. La separación se hace por lo tanto, entre dos fases líquidas en las cuales los compuestos tienden a distribuirse. A este proceso se le llama también de distribución.

Combinando una fase fija y una móvil de diferentes características, se tienen los diferentes tipos de cromatografía más conocidos en la actualidad.

	F. ESTACIONARIA	F. MOVIL	CROMATOGRAFIA	METODO
A	a) Sólido	Líquido	sólido-líquido	C.Columna C.C.F. intercambio iónico CLAR.
	b) Sólido	Gas	gas-líquido	C. gases.
B	a) Líquido	Líquido	Líquido-Líquido	C. Columna
	b) líquida	Gaseosa	gas-líq.	C.Gases C.columna capilar.

CUADRO 2 Diversos tipos de Cromatografía.

5.2.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución.

(C . L . A . R .)

La CLAR es una innovación de la cromatografía en columna tradicional , en la que se utilizan columnas cuyas dimensiones son generalmente de 2 a 6.5mm. de diámetro interno por 10 a 30 cm de largo , las que están rellenas con adsorbentes de aproximadamente 10 mc de diámetro , lo que ofrece una área de contacto de 300 a 350 m² por gramo de sílica gel .

Como resultado de el tamaño de partícula tan pequeña , la resistencia al flujo de la fase móvil , se incrementa mucho , por lo que se hace necesario utilizar sistemas de bombeo que impulsen a la fase móvil (F.M.) a través de la columna , permitiéndolo así la distribución de la sustancia a separar entre la fase estacionaria y la fase móvil; lo que matemáticamente se expresa como :

$k = C_s / C_m$ en donde :

k = coeficiente de distribución

C_s = concentración de la sustancia

en la fase estacionaria (F.E.)

C_m = concentración de la sustancia en la

Fase móvil .

Con respecto a la cromatografía en columna tradicional , las ventajas que brinda la CLAR son : Tiempos de análisis

mucho más rápidos, columnas reusables, adición automática y continua de disolventes , monitoreo automática y continuo de la muestra que se está eluyendo.

Instrumental

Para tener una idea general del equipo , la figura 1 muestra un equipo de CLAR . Dependiendo del fabricante y la calidad del equipo, existen variantes en algunas de las partes aquí mencionadas , pero el principio del funcionamiento es el mismo .

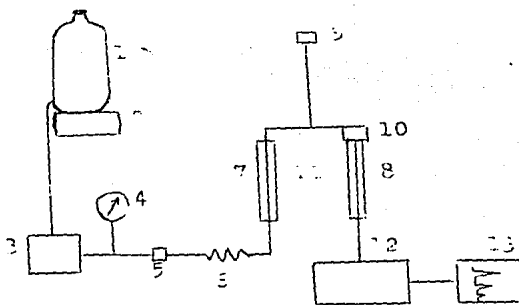


Figura 1. componentes de un equipo de CLAR .1. envase del disolvente.2,unidad de soporte.3,bomba de alta presión.4, barómetro.5,filtro.6,resistencia (para eliminar pulsos) .7,precolumna (opcional).8,columna analítica.9,sensor.

de presión (opcional). 10, sistema introductor de muestra. 11, área con temperatura controlada (opcional). 12, detector. 13, integrador.

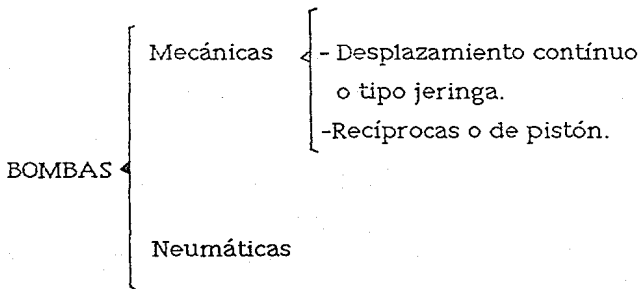
Considerando las partes asociadas con el disolvente , tenemos en primer lugar el envase (parte 1 de la figura) el que puede estar hecho de vidrio o de acero inoxidable , generalmente tienen una capacidad de 1 a 2 L.

Es importante tener en cuenta ciertos aspectos sobre la fase móvil , que aunque no forma parte del equipo , son necesarios para un mejor rendimiento de éste . Los más importantes son : Compatibilidad con el detector utilizado ; no debe de contener aire disuelto , ya que en cualquier momento se pueden desprender burbujas de aire , trayendo como consecuencia la interrupción en la tedección (picos fantasmas) , y , por otro lado , el oxígeno disuelto puede reaccionar con la fase móvil o con la fase estacionaria del sistema ; debe disolver a la muestra ; no debe disolver o degradar a la fase estacionaria ; debe tener baja viscosidad , de no ser así se obtienen presiones muy elevadas que afectan el empaque de la columna además de afectar la eficiencia de la separación ; que el disolvente o disolventes seleccionados

como fase móvil estén libres de partículas o pelusas, esto último se elimina utilizando filtros de 0.45Mc , evitando que se tapen los filtros de la columna , manteniendo una presión mas o menos constante .

Sistemas de bombeo : La calidad de la bomba es uno de los factores más importantes en la calidad de equipo en general, porque se debe tener una bomba capaz de conducir la fase móvil a todo lo largo de la columna empacada con partículas muy finas , las que han sido compactadas a muy altas presiones . Además , es necesario que en el flujo se reduzcan al mínimo los pulsos , porque éstos inducen gradientes de muestra , interrumpiéndo con ello el proceso de detección automática , especialmente cuando se utilizan detectores de índice de refracción .

Existen dos clases generales de bombas ; bombas mecánicas y bombas neumáticas . Entre las bombas mecánicas tenemos dos tipos ; las recíprocas y las de desplazamiento continuo :



Las bombas de desplazamiento continuo o tipo jeringa mantienen constante la velocidad de flujo evitando pulsaciones en el flujo pero , la desventaja que presenta es su capacidad limitada, teniendo que interrumpir el flujo de la fase mòvil para volver a llenar la càmara y desplazar nuevamente màs volùmen de fase mòvil , èste tipo de bombas se utilizò mucho en los primeros aparatos y, actualmente se utiliza para gradientes de eluciòn, permitièndo una buena reproducibilidad en la eluciòn de muestras.

Las bombas reciprocas o de pistòn , estàn constituidas por dos o tres càmaras , que desplazan volùmenes constantes de disolvente, en forma alternada para permitir el llenado de las mismas , mientras se bombea la fase mòvil , a travès de la columna ; la desventaja de este tipo de bombas es que se obtiene un flujo pulsante, lo que podria interrumpir la detecciòn de la muestra, cosa que no ocurre , debido en primer lugar , por aditamentos del CLAR que corrige èstos pulsos y por otro lado, al pasar la fase mòvil por la columna , las partìculas de adsorbente , por la misma resistencia al flujo que ofrecen , van atenuando las pulsaciones dentro de la columna, de tal manera que se obtiene a la salida de la misma , un flujo màs bien continuo. Este tipo de bombas se està utilizando mucho en los equipos modernos, con muy buenos resultados .

Las bombas neumáticas , están constituidas por una cámara donde se encuentra el disolvente o fase móvil y por medio de la presión ejercida por un gas inerte , pasa a través de la columna , el flujo obtenido de esta forma, es constante, pero la desventaja que presenta es un incremento en el costo de los análisis, una saturación de gas en las últimas porciones del líquido, lo que hace necesaria una degasificación periódica de la fase móvil.

Medidores de presión .La función más importante de los medidores de presión , es el de indicarnos a que presión está trabajando nuestro sistema, la que va a depender de la temperatura del disolvente , la viscosidad del mismo y la velocidad de flujo, de cualquier modo, las columnas que se utilizan , resisten altas presiones (3500 psi) de operación , las que no se deben de exceder para evitar pérdidas de resolución y daño al empaque de las mismas .

Filtros. Los filtros comúnmente utilizados en CLAR , están hechos de acero inoxidable y sirven para evitar que a la columna lleguen partículas de polvo o partículas extrañas , que puedan obstruir el flujo de la fase móvil , trayendo como consecuencia la elevación de presión , dañando el empaque de la columna.

Resistencia. La resistencia es un aditamento que consiste de una tubería a manera de línea quebrada, la que elimina las pulsaciones del flujo, haciéndolo de manera continua , facilitando la detección de las muestras que pasen de la columna al detector .

Precolumnas . Las precolumnas ayudan a la mejor separación de mezclas de difícil resolución , éstas , al igual que las columnas pueden tener diferentes fases estacionarias para brindar una mayor versatilidad de la técnica de CLAR por lo anterior, las precolumnas pueden separar compuestos en base a su peso molecular (cromatografía de exclusión molecular); en base a cargas eléctricas (cromatografía de intercambio iónico); en base a su coeficiente de distribución entre dos líquidos (cromatografía líquido-líquido), de esta manera se puede obtener una mayor eficiencia en la columna analítica (14, 19, 21).

Las precolumnas también se utilizan con frecuencia en cromatografía de fase inversa, para evitar que la fase móvil disuelva a la fase estacionaria de la columna analítica; en este caso la precolumna, está empacada con la misma fase estacionaria que la fase estacionaria de la columna analítica, pero a una mayor concentración, para que se sature la fase móvil, evitando así que solubilice la fase estacionaria de la columna analítica . (14).

Columnas. Para fines de comparación , la cromatografía se divide frecuentemente , en dos tipos, cromatografía de fase normal y cromatografía de fase inversa. Esta simple división se basa en la polaridad relativa de la fase móvil y de la fase estacionaria .

En la cromatografía de fase normal , el grupo funcional predominante de la fase estacionaria , es

màs polar que la fase mòvil comunmente usada en esta tècnica , por ejemplo las columnas empacadas con una fase estacionaria con grupos cianopropilo, generalmente son utilizadas con fases mòviles conteniendo hexano, diclorometano o mezclas de ambos (estos ùltimos tienen una polaridad menor que la de la fase estacionaria) (19). En la cromatografia de fase inversa, la fase estacionaria es usualmente un adsorbente hidrofòbico, como el octadecilsilano u octilsilano, siendo generalmente la fase mòvil un disolvente màs polar, como el agua, metanol, acetnitrilo o isopropanol y sus mezclas. Esta tècnica es la màs extensamente practicada en sus varias formas por las siguientes razones :

- a. Frecuentemente, compuestos ionizables, iònicos y no iònicos, pueden ser separados usando una simple fase mòvil y una misma columna (con o sin adiciòn de sales) (19, 21).
- b. Las columnas de fase inversa son estables y los anàlisis realizados en ellas son fàcilmente reproducibles, siempre y cuando se tengan ciertos cuidados con ellas .
- c. La fase mòvil generalmente utilizada por esta tècnica es muy barata (agua) y las muestras pueden ser inyectadas directamente en la misma fase mòvil (7, 14).

d. El disolvente orgánico más frecuentemente utilizado, para lograr mejores separaciones con el agua (metanol) se obtiene a un precio razonable y a una pureza adecuada en muchos lugares del mundo .

e. El orden de elución es predecible , basándose en el grado de hidrofobisidad del soluto. La porción más hidrofóbica de la molécula es la más retenida .

Características de la sílica gel utilizada como fase estacionaria . La sílica gel es el material de empaque comúnmente utilizado para las columnas de CLAR , existiendo en gran variedad de formas y tamaños . Las de mayor interés , tienen áreas de superficie de 200 a 800

m²/g y un diámetro promedio de 50 a 250 Å. Las sílicas con poro de gran tamaño son apropiadas para cromatografía de exclusión molecular , para separar polímeros y tienen un peso molecular menor de 2000.

Químicamente, la sílica gel amorfa contiene grupos polisiloxano y algunos de silanol. Los grupos silanol son considerados activos en cromatografía de adsorción ya que forman enlaces covalentes con compuestos orgánicos .

Una superficie activa, suele tener aproximadamente ochogrupos silanol por nanómetro cuadrado (nm²), mientras que las sílicas comerciales secadas a temperaturas menores de 2000 C tienen cerca de 5 grupos silanol por 100 Å² de superficie .

La sílica gel calentada, entre los 125º y 175ºC pierde agua retenida en su superficie, entre los 200º y 400ºC, se tiene una mayor cantidad de grupos hidroxilos reactivos, que se liberan en forma de agua, dejando en la superficie grupos siloxano. Los grupos siloxano son considerados cromatográficamente inactivos. El procedimiento de calentamiento de sílica gel cerca de 200 ºC es un método que reduce la superficie activa (9, 7, 14).

La sílica gel es insoluble en disolventes utilizados comunmente en cromatografía de fase normal, como hexano, cloruro de metileno, éter e isopropanol. Sin embargo la sílica exhibe muy ligera solubilidad en disolventes acuosos, un hecho que tiene eventual influencia al utilizar la cromatografía de fase inversa.

El perfil de solubilidad de la sílica gel en medio acuoso se muestra en la figura 2. Notese que la solubilidad se incrementa significativamente por arriba de un pH de 6.5, con la formación de aniones silicato. La solubilidad de la sílica gel es proporcional a el área de superficie y a la temperatura, acelerandose con bases o sales alcalinas en la fásé móvil, especialmente con sales de tetralquilamonio. La solubilidad de la sílica se reduce en médio ácido.

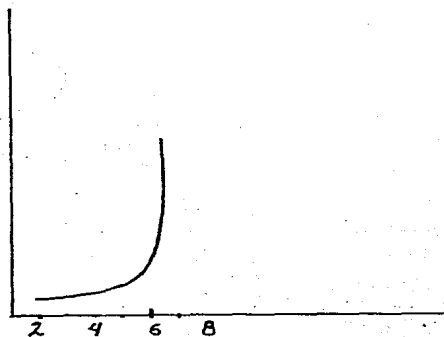


Fig. 2. Perfil de solubilidad de la sílica gel en medio acuoso a diferentes valores de pH.

Sensores de presión. Es importante que el equipo de CLAR tenga éste importante aditamento, porque está generalmente conectado a la bomba por medio de un interruptor, lo que hace que al rebasar un cierto límite de presión, se interrumpa el flujo, evitando que la presión se incremente aún más dañando el empaque de la columna.

Sistema introductor de muestra. La forma de introducir la muestra a la columna es por medio de jeringas de alta presión, lo que en la actualidad no tiene mucha difusión porque está limitado a presiones de operación menores de 100 atm. Otra forma de introducir la muestra a la

columna es interrumpiendo el flujo de la fase móvil, la desventaja de esta técnica es que requiere de algunos minutos para que la presión de la columna baje a cero y así introducir la muestra. La mejor forma de introducir la muestra es sin duda por medio de balbulas o cámaras de inyección, porque introducen la muestra en unos cuantos segundos, operando a presiones de 300 atm, obteniendo buena reproducibilidad entre inyección e inyección.

Area con temperatura controlada. Esta área es un compartimento donde se encuentra la columna para mantener la temperatura del análisis constante; la influencia de la temperatura sobre la fase móvil y la separación de compuestos se observa claramente en la figura 4, a medida que aumenta la temperatura, la viscosidad de la fase móvil disminuye y aumenta la resolución, sin embargo, cuando se analizan vitaminas y/o enzimas, se prefiere utilizar temperaturas bajas para asegurar la estabilidad de la muestra, la desventaja que presenta es el costo tan elevado de este sistema.

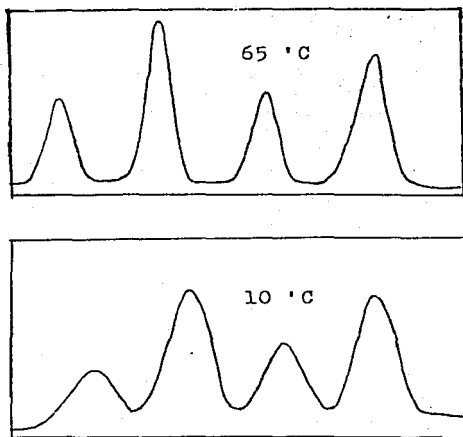


Fig. 4. Efecto de la temperatura sobre la viscosidad de la fase móvil y la resolución.

Detectores. Los detectores más comunmente usados para CLAR. son: de índice de refracción (IR), de luz ultravioleta y visible, aunque tambien hay polarográficos, de ionización de flama, fluorométricos, conductividad térmica, espectroscopia de masa, infra rojos, entre otros.

Los detectores de luz ultravioleta y visible, son relativamente insensibles a los cambios de flujo y temperatura, siempre y cuando el disolvente no absorba en grado apreciable en la longitud de onda que opera el fotómetro, por lo que es fácil efectuar programaciones de fase móvil.

Un diseño esquemático de este detector se muestra en la figura 7. El haz de luz, proveniente de una lámpara de mercurio o tungsteno, es primeramente colimado y después se hace pasar a través de dos celdas, una de ellas de compensación o referencia; los rayos de luz emergentes, se hacen pasar por filtros específicos con el objeto de obtener la longitud de onda requerida. La intensidad es medida por una fotocelda doble que genera una señal que, después de amplificarse, se representa gráficamente por el registrador. Dicha señal se puede obtener como porcentaje de luz absorbida.

Para evitar problemas con la fase móvil y ruido en el detector, se emplean disolventes de grado espectroscópico como fase móvil y se toman precauciones adecuadas para que no se formen burbujas en las celdas.

que resulta de la diferencia entre los índices de refracción de los líquidos en ambas celdas. Conforme el rayo cambia su ángulo de incidencia sobre la fotocelda, se genera una señal, que es amplificada y representada gráficamente por el registrador.

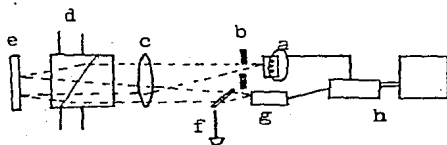


Fig. 5. Detector de índice de refracción, tipo "Desviación" a. fuente luminosa; b. abertura; c. lente colimador; d. celdas analítica y de referencia; e. espejo; f. ajuste óptico de cero; g. fotocelda; y h. amplificador.

Refractómetro tipo Fresnel (fig. 6). Este refractómetro consta de dos rayos de luz colimados y de igual intensidad, que pasan a través de un prisma e inciden

sobre la interfase vidrio-líquido de las celdas de referencia y muestra, respectivamente. Dichas celdas, de aproximadamente 3 ml cada una, consisten en cavidades ovaladas en una pequeña pieza de teflón, ubicada entre el prisma y una placa de sostén. El ajuste grueso del ángulo de incidencia de la luz se realiza rotando el cuerpo del proyector. La diferencia de la intensidad de la luz emitida a través de las celdas está en función de los índices de refracción de ambos líquidos y se mide por medio de una fotocelda doble, la cual genera una señal que se registra gráficamente.

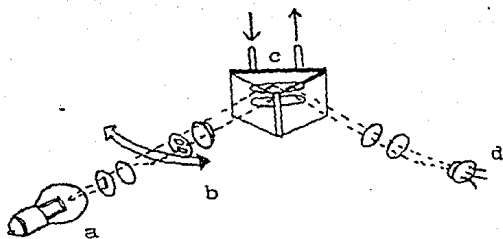


Fig. 6. Detector de índice de refracción tipo "Fresnel". a. fuente luminosa; b. proyector; c. prisma y celdas; d. fotocelda.

Los detectores de índice de refracción , miden la diferencia entre el IR del disolvente puro y el IR de la solución de la muestra que sale de la columna, de esta manera se observa cualquier cambio en la composición de la fase móvil. La respuesta de este detector es universal y sensible a cambios de disolvente y temperatura , por lo que es difícil efectuar programaciones de fase móvil.

Hay dos modelos distintos de este tipo de detectores, que se ilustran en las figuras 5 y 6 . Uno de ellos , llamado refractómetro de desviación , se basa en el desplazamiento óptico de un rayo de luz, que es proporcional a la diferencia del índice de refracción entre dos líquidos . El otro se funda en el principio de Fresnel , según el cual en la interfase entre el prisma de vidrio y algún líquido , la cantidad de luz transmitida y reflejada es proporcional al ángulo de incidencia de la luz y al índice de refracción del líquido .

Refractómetro de desviación (fig. 5). Un rayo de luz pasa a través de una abertura (b) y es colimado por el lente (c) , atraviesa luego las celdas (d) , que contienen , respectivamente , el disolvente puro y el disolvente que sale de la columna, es reflejado por un espejo (e) y enfocado a través de un mecanismo de ajuste óptico (f), insidiendo más tarde sobre la superficie del rayo sobre la fotocelda (g).

El ángulo de incidencia del rayo de luz sobre la fotocelda está determinado por el ángulo de desviación .

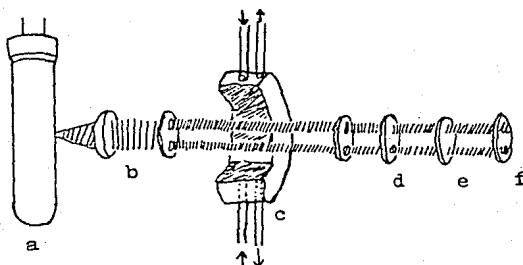


Fig. 7. Detector de luz ultravioleta y visible. a. Fuente luminosa b. Lente colimador. c. celdas analítica y de referencia. d. ventana de cuarzo. e. filtro. f. fotocelda.

Integradores electrónicos. Los métodos de integración electrónica proporcionan datos de una precisión en muchas ocasiones superior a la del mismo cromatógrafo, de aquí la importancia de saber manejar adecuadamente los integradores. La señal que recibe el registrador es transformada directamente en unidades relacionadas con el área y concentración. También se emplean sistemas de computación; muchos de estos instrumentos proporcionan o son capaces de presentar directamente resultados y datos completos del análisis, tales como tiempo de retención, porcentos de área, áreas bajo las curvas,

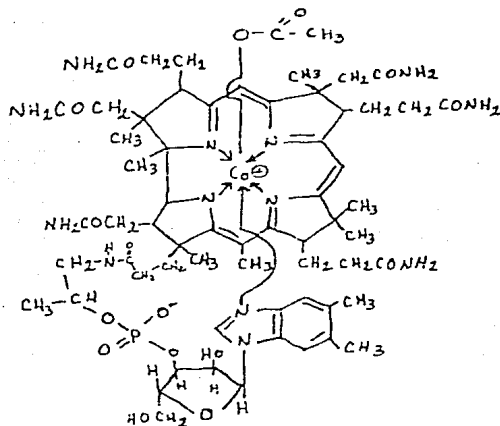
factores de corrección, porcentajes de composición, tablas de resultados, entre otros.

VI. MONOGRAFIA (ACETATO DE HIDROXOCOBALAMINA)

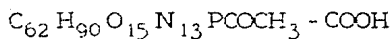
6.1 Nombres quimicos y sinónimos .

Acetato de cobalamina , Iodoxo-B12, Novidroxin,
Cobinamida acetato fosfato 3' - ester con
5,5-dimetil-1-d-ribofuranosilbencimida-L-sal inerte,
Acetato de acuocobalamina .

6.2 Fòrmula desarrollada.



6.3 Fòrmula condensada (15 , 16).



6.4. Peso Molecular .

1406 g/mol.

6.5. Descripción .

Cristales o polvo cristalino higroscòpico, de color rojo oscuro , inodoro. Se descompone cuando se expone al calor. Contiene cuando menos el 91% y 0.5 ml. de 1116 % y no màs de 102 % de Acetato de Hidroxocobalamina calculado sobre sustancia deseada (3).

6.6. Solubilidad.

Soluble en agua y alcohol . Pràcticamente insoluble en èter, acetona y cloroformo. (3, 4, 15).

6.7. Ensayos de identidad.

6.7.1. Espectrofotomètrico: Disolver 50 mg . de la muestra en 5 ml. de agua , agregar 1g. de sulfato monoàcido de potasio y en B.V. (bomba de vacio), evaporar hasta cerca de 0.5 ml. agregar 1.5 ml. de etilenglicol y 0.5 ml. de soluciòn al 60 % de àcido sulfùrico . Hervir la mezcla en B.V. durante 3 minutos y en seguida enfriar , agregar 0.5 ml. de soluciòn acuosa al 7 % , P/V (peso a volùmen) , de clorhidrato de hidroxilamina y 2 ml. de soluciòn 10:100 de hidroxido de sodio y mezclar . Dejar reposar un minuto y agregar 2ml. de àcido sulfùrico diluido y 0.2 ml. de soluciòn 15:100 de cloruro fèrrico : aparece coloraciòn roja violacea correspondiente al iòn acetato .

La soluciòn al 1 % de Acetato de Hidroxocobalamina exhibe màximos de absorciòn a las longitudes de onda de 523 nm. + - 1 nm . utilizar celdas de 1 cm. y agua como blanco , en espectrofotòmetro adecuado (3, 4).

6.7.2. Desarrollo de color : En un crisol de porcelana calentar suavemente hasta fusión aproximadamente 1 mg. de la muestra con 50 mg. de sulfato monoácido de potasio, enfriar y disolver el residuo en 3 ml. de agua hirviendo , con ayuda de una varilla de vidrio , agregar a la solución una gota de S.I. (solución indicadora) de fenolftaleína y en seguida gota a gota solución al 10 % de hidróxido de sodio , hasta una coloración rosa persistente . Agregar 500mg. de acetato de sodio , 0.5ml.

de S.R.(solución reactivo de ácido acético, 0.5 ml.de una solución 1:500 de nitroso -1hidroxi-2-naftalenodisulfonato-3,6-disódico: se produce inmediatamente una coloración roja-anaranjada, que desaparece cuando se agregan 0.5ml. de ácido clorhídrico al hervir durante un minuto .

6.8. Ensayos de pureza.

6.8.1. Pérdida al secado : Pasar aproximadamente 100mg. de la muestra y transferir en una pasafiltros adecuado. Introducir el pasafiltros a una estufa, a la que se le aplica vacío menor de 5 mm. de mercurio. Mantener la temperatura entre 100' y 105' C durante una hora .

La pérdida es entre 10 % y 14 % .

6.8.2. Determinación Espectrofotométrica: Determinar las absorbancias de soluciones de acetato de hidroxocobalamina standar y problema en agua a una concentración de 0.04 mg/ml. a una longitud de onda de 351 nm. usando agua como blanco .

6.9. Conservació n .

En recipientes hermèticament cerrados , protegidos de la luz y en lugar fresco.

6.10. Toxicología.

No se han señalado aparición de efectos tóxicos en el uso clínico en su forma cristalina , raramente se ven reacciones alérgicas a impurezas de los preparados de cianocobalamina e hidroxocobalamina . La reacción local se parece a un fenómeno de tipo Arthus, sin necrosis. Los efectos generales incluyen : bochornos, cefaleas, escalofríos , fiebre , disnea, prurito, urticaria , choque . Los pacientes hipersensibles al extracto hepático toleran bien la cianocobalamina.

6.11. Farmacodinamia.

Existen dos mecanismos de absorción de la vitamina B12 El más importante de los dos es aplicable a las pequeñas cantidades de vitamina presentes en la dieta . En el estómago , la vitamina B12 es liberada de las proteínas presentes en la dieta . En el estómago , la vitamina B12 es liberada de las proteínas y péptidos asociados y se combinan con el factor intrínseco (glucoproteína de peso molecular entre 50.000 y 60.000)secretado por las células principales o parietales del fondo y del cuerpo del estómago . La absorción de la vitamina B12 tiene lugar entonces en la parte inferior del íleon , muy poco en el yeyuno y colon.

Dicha absorción se realiza en varias etapas :

a) Combinación de cobalamina y factor intrínseco .

b) Unión de dicho complejo a un receptor de la membrana celular del epitelio celular .

c) Desdoblamiento del complejo y liberación de la vitamina B₁₂ con entrada de la misma a la célula epitelial ilial.

d) Pasaje de la vitamina B₁₂ a la sangre.

Necesita también un sistema de transporte que requiere calcio y un pH superior a 5.7, la vitamina B₁₂ así absorbida, se une principalmente a una β -globulina específica formando la transcobalamina II y en menor cantidad a una α_2 -globulina específica, con la que forma la transcobalamina I y a una inter α -glucoproteína (transcobalamina III). Las transcobalaminas I y III guardan relación con los granulocitos y en conjunto constituyen el 10% de la capacidad de fijación de la vitamina B₁₂ circulante no saturada. Ésta vitamina unida a la transcobalamina II casi instantáneamente es liberada para hígado, médula ósea y otros tejidos, por lo que no se le encuentra normalmente asociada en el plasma humano. El complejo vitamina B₁₂ unida a la transcobalamina I sigue circulando como un almacenamiento de reserva; por lo tanto la transcobalamina II puede considerarse primariamente proteína de transporte y la transcobalamina I como proteína de almacenamiento.

6.12 Absorción.

La ciano y la hidroxocobalamina se absorben muy fácil cuando se administran intramuscular y subcutáneamente y cuando se suministran en ésta forma a personas afectadas de anemia

perniciosa , la concentración sanguínea se eleva llegando a un máximo en 4 ó 5 horas y disminuye en el transcurso de 72 horas . (6, 9 , 12)

Cuando falta el factor intrínseco , la absorción intestinal es muy pobre requiriéndose dosis de por lo menos 100 veces mayores por vía bucal que por la parenteral para conseguir efectos eritropoyéticos similares . En éstos erfermos la mayor parte de la vitamina B₁₂ administrada por vía bucal aparece en las heces (más del 98 %) ; si se agrega factor intrínseco en forma de polvo de estómago de cerdo, la absorción aumenta apareciendo poca cobalamina en heces , en forma semejante que en condiciones normales y la misma ejerce su acción eritropoyética a pocas dosis.

Desgraciadamente éste último procedimiento al administrar vitamina B₁₂ no es conveniente pues da lugar a efecto de refractariedad ; por la formación de anticuerpos en la mucosa gastrointestinal contra el factor intrínseco.

6.13. Distribución y destino.

Una vez absorbida la vitamina B₁₂ pasa al plasma sanguíneo en su mayor parte , de 80 a 85 % , combinada con las globulinas gama , globulina o transcobalamina I y sobre todo con la transcobalamina II o β globulina , almacenándose en diversos órganos viscerales , pero

especialmente en hígado (de 60 a 90 %), lo que explica la actividad de los preparados hepáticos en la anemia perniciosa ; tanto en el hígado como en el epitelio intestinal y demás órganos , las cobalaminas (ciano e hidróxocobalamina) , se transforman en las coenzimas metilcobalamina y 5' desoxiadenosilcobalamina , pasando a la médula ósea de la misma manera que la vitamina B₁₂, donde son utilizadas para la eritropoyésis.

6.14. Excreción.

La vitamina B₁₂ se excreta principalmente por el riñón en forma libre , ocurriendo su máxima eliminación dentro de la 72 horas . También se excreta en la bilis y se absorbe nuevamente en el intestino (circulación enterohepática). La vida media de la vitamina B₁₂ es de 5 días .

VII. Validación de métodos analíticos.

Cuando se desarrollan nuevos métodos analíticos, es necesario conocer la confiabilidad de los resultados obtenidos, ésto se lleva a cabo por medio de la validación de dichos métodos al determinar la especificidad, exactitud, linealidad y precisión.

7.1 Especificidad. Este tipo de prueba define el grado en que los resultados inferidos del método se deben sólo a la sustancia que se desea valorar y no a otras sustancias que pudieran estar presentes en el material que se analiza, esto es, que pudiera haber interferencia en los resultados por excipientes de la formulación y/o productos de degradación, formados durante el almacenamiento del medicamento. En la práctica, se demuestra la especificidad al analizar: el placebo de la formulación bajo las mismas condiciones en que se analiza la formulación; los productos de degradación del principio activo y el principio activo, el placebo y la formulación que ayan estado sometidas a condiciones de degradación acelerada, con el objeto de obtener cualquier producto de formación por la interacción fármaco-excipientes que pudiera ocurrir al encontrarse el medicamento en condiciones de almacenamiento.

7.2. Exactitud. Se entiende por exactitud la concordancia existente entre un valor determinado experimentalmente y su valor real, en la práctica para verificar lo anterior se

cuantifica experimentalmente el compuesto de interés (en cantidades conocidas) adicionando al placebo de la formulación donde se encuentra el activo. Una forma de evaluar la exactitud en función de los datos experimentales es, efectuando inferencias estadísticas respecto del valor real (cantidades adicionadas) mediante:

a. Prueba de hipótesis: el procedimiento se basa en verificar si los datos experimentales pertenecen a una distribución teórica cuyo parámetro es el valor real. Una estadística de prueba que nos permite determinar lo anterior a partir de los datos muestrales es el estadígrafo "t" que se expresa por:

$$t = \frac{\text{Valor promedio de los datos} - \text{Valor real}}{\text{Error experimental}}$$

7.3. Linearidad. La linealidad mide el grado en que la respuesta del método se aproxima a una función lineal del tipo $Y=b+mX$ (donde b se aproxima a cero y m a uno) al trabajar a diferentes concentraciones.

En la práctica se grafican los datos experimentales, de tal manera que la cantidad recobrada esté en función de la cantidad adicionada para observar el grado en que los resultados se comportan como una función lineal.

7.4. Precisión. Se refiere a una medida de la concordancia de un conjunto de valores experimentales respecto a un valor central.

Para inferir la variabilidad a partir de los datos muestrales, se determina por un estadístico de prueba llamado χ^2 (ji-cuadrada), el cual se expresa por:

$$\chi^2 = \frac{(n-1) * (s^2)}{S^2}$$

Donde:

n=número de observaciones de muestras independientes .

s^2 = varianza muestral

S^2 = varianza poblacional.

VIII MATERIAL Y METODO

MATERIAL EMPLEADO:

Cromatógrafo de líquidos de alta presión waters con los siguientes módulos :

- Bomba waters modelo 590.
- Detector waters lambda max modelo 481.
- Wisp (automuestreador) modelo 590.
- Integrador Hewlett Packard modelo NP 3392-A.
- Columna para CLAR micro Bondapak c18 waters
 - filtro millipore
 - degasificador
- Matraces aforados de 10 ml. , 50ml. , 100ml. y 250ml. de bajo contenido actínico .
- Pipetas volumétricas de 1 , 2 , 4 , 5 , 10 y 20 ml .
- Matraz Kitazato de 100 ml.
- Bomba de vacío .

Reactivos:

- Metanol absoluto grado espectro .
- Agua destilada .
- Acido acético glacial grado reactivo .

METODO.

Para poder realizar estudios de estabilidad de un inyectable conteniendo 1.2 mg/ml. de Acetato de Hidroxocobalamina, se desarrolló una técnica analítica por CLAR. La que se describe en el presente trabajo.

Para validar dicha técnica, se preparó un placebo del inyectable al que se le adicionaron diferentes cantidades conocidas de Acetato de Hidroxocobalamina como materia prima y posteriormente se determinó su concentración por CLAR. utilizando como estándar de referencia secundario la misma materia prima, valorada espectrofotométricamente como se describe en la FNEUM. (3) (como se describió en la monografía de Acetato de Hidroxocobalamina) cuya concentración se determinó de 82.96% y como estándar interno se utilizó Riboflavina base.

Determinandose de ésta manera la Linearidad, Exactitud y Precisión de la técnica analítica desarrollada.

Para determinar la linealidad del método desarrollado se prepararon muestras de Acetato de Hidroxocobalamina a diferentes concentraciones (40%, 60%, 80%, 100% y 120%) determinando la concentración del activo por CLAR., los resultados obtenidos se graficaron y se sometieron a un análisis estadístico para poder concluir acerca de la linealidad del método.

Las muestras fueron preparadas por duplicado y cada una de ellas se inyectó también por duplicado al CLAR.

Para determinar la precisión y la exactitud de la técnica, se prepararon muestras de concentración de Acetato de Hidroxocobalamina de 80%, 100%, y 120% con respecto a la cantidad de Acetato de Hidroxocobalamina presente en el inyectable. Cada una de las cuales se preparó por quintuplicado y se hicieron inyecciones por duplicado de cada una de ellas en el cromatógrafo para determinar la concentración del activo presente; los resultados obtenidos, fueron igualmente sometidos a análisis estadístico para demostrar la exactitud y la precisión de la técnica.

Finalmente, para demostrar que el método es indicador de estabildades, se sometió el principio activo, la formulación y el placebo a 60°C en solución ácida, durante un mes, después del cual se corrieron los cromatogramas respectivos sin detectar ningún compuesto en concentraciones apreciables,

indicandonos que el principio activo se degradó totalmente y que los productos de degradación no absorben a la longitud de onda estudiada o que dichos productos de degradación se quedan retenidos en la columna.

Los reactivos y soluciones se prepararon como se indica a continuación:

Solución de estándar interno: Pesar con exactitud aproximadamente 29 mg. de riboflavina base en un matraz aforado de 250ml. de bajo contenido actínico; disolver con 200 ml de ácido acético 0.02N y calentar si es necesario, enfriar y aforar con el mismo ácido.

Solución estándar: Pesar con exactitud aproximadamente 14 mg de Acetato de Hidroxocobalamina (82.95% de pureza) en un matraz aforado de 10 ml. de bajo contenido actínico, disolver con agua y aforar (preparar dos estándares de la misma forma).

Solución stock 1: Pesar con exactitud aproximadamente 28.3 mg de Acetato de Hidroxocobalamina (82.95%) en un matraz aforado de 50 ml de bajo contenido actínico, disolver con agua destilada y aforar.

Solución stock 2: Pesar con exactitud aproximadamente 10.5 mg de Acetato de Hidroxocobalamina (82.95%) en un matraz aforado de 10 ml de bajo contenido actínico, disolver con agua y

aforar.

Muestras de 40%: De la solución stock 1 tomar 2 ml con pipeta volumétrica y transferirlos cuantitativamente a un matraz aforado de 100 ml de bajo contenido actínico, adicionar con pipeta volumétrica 10 ml de solución estándar interno; 2 ml de placebo; 24 ml de metanol absoluto y aforar con agua destilada.

Muestras de 60 %: De la solución stock 1 tomar 3 ml con pipeta volumétrica y transferirlos a un matraz aforado de 100 ml de bajo contenido actínico, adicionar con pipeta volumétrica 10 ml de solución estándar interno; 24 ml de metanol y aforar con agua.

Muestras de 80%: De la solución stock i tomar 4 ml con pipeta volumétrica y transferirlos cuantitativamente a un matraz aforado de 100 ml de bajo contenido actínico, adicionar con pipeta volumétrica 10 ml de estándar interno; 2ml de placebo; 24ml de metanol absoluto y aforar con agua destilada.

Muestras de 100% (1.2 mg/ml): De la solución stock 1 tomar 5ml con pipeta volumétrica y transferirlos cuantitativamente a un matraz aforado de 100 ml de bajo contenido actínico; adicionar con pipeta volumétrica 10 ml de solución de estándar interno; 2ml de placebo; 24ml de metanol y aforar con agua.

Muestras de 120%: De la solución stock 2 tomar 3 ml.

con pipeta volumétrica y transferirlos cuantitativamente a un matraz aforado de 100 ml. de bajo contenido actínico ; adicionar con pipeta volumétrica 10 ml. de la solución estándar interno ; 2ml. de placebo ; 24 ml . de metanol absoluto y aforar con agua destilada .

Fase móvil : Transferir 240 ml. de metanol absoluto a un matraz aforado de 1000 ml. ; adicionar 2 ml. de ácido acético glacial y aforar con agua destilada . Filtrar por membrana millipor de 0.2 mc. y degasificar por 15 minutos en ultrasonico antes de usar .

Condiciones del cromatógrafo :

Velocidad de flujo 1.7 ml /min.

Presión 1500 psi.

Detector de ultravioleta 351 nm.

Sensibilidad 0.05 UAET.

Condiciones del registrador :

Velocidad de carta 0.4 cm/ min.

Atenuación 4

Amplitud de pico 0.16

Umbral de integración 8

Atenuación 3 al tiempo de 9 minutos .

Umbral de integración 4 al tiempo 9 minutos .

Tipo de integración #2 al tiempo 1 minuto .

Tipo de integración #-2 al tiempo 15 minutos .

CALCULOS.

Calcular el área relativa de los picos de la siguiente manera: Área relativa del pico de acetato de hidroxocobalamina en el estándar externo (Ars):

$$\text{Ars} = B/C$$

Donde : B = Área del pico del acetato de hidroxocobalamina en el estándar externo .

C= Área del pico de la riboflavina (estándar interno).

Área relativa del pico del acetato de hidroxocobalamina en la muestra (Arm).

$$\text{Arm} = D/E$$

Donde : D= Área del pico del acetato de hidroxocobalamina en la muestra .

E= Área del pico de la riboflavina en la muestra (estándar interno).

Para calcular la cantidad en mg./ml. de acetato de hidroxocobalamina recuperados por el análisis de CLAR , tenemos la siguiente ecuación :

$$A(\text{mg./ml.}) = \frac{\text{Arm} * \text{mg. As} * \text{Ps} * \text{FD}}{\text{Ars} * 2}$$

Donde : A= concentración de acetato de hidroxocobalamina recuperados en mg./ml.

As= Cantidad de acetato de hidroxocobalamina .

en el estándar (en mg) .

Ps= Pureza del estándar de Acetato de
Hidroxocobalamina .

FD= Factor de dilución (0.2) .

Para calcular la pendiente ordenada al origen y el coeficiente de correlación (r) se utilizan las siguientes ecuaciones respectivamente:

$$m = \frac{(N * \sum EX_i Y_i) - (\sum EX_i * \sum EY_i)}{(N * \sum EX_i^2) - (\sum EX_i)^2} \quad (1)$$

$$b = \frac{(\sum EY_i * \sum EX_i^2) - (\sum EX_i * \sum EX_i Y_i)}{(N * \sum EX_i^2) - (\sum EX_i)^2} \quad (2)$$

$$r = \frac{(N * \sum EX_i Y_i) - (\sum EX_i * \sum EY_i)}{\{[(N * \sum EX_i^2) - (\sum EX_i)^2] * [(N * \sum EY_i^2) - (\sum EY_i)^2]\}^{0.5}} \quad (3)$$

Las pruebas correspondientes a las pruebas de hipótesis de la pendiente (m) y la ordenada al origen (b) son las siguientes :

$$t_b = \frac{b-B}{\hat{S}_{y/x} [(EX_i^2/N) (E(X_i - \bar{X})^2)]^{0.5}} \quad (4)$$

$$S_{y/x} = \frac{[(\sum EY_i)^2 - b \sum EY_i - m \sum EX_i Y_i]}{N^{1/2}} \quad (5)$$

$$\hat{s}_{y/x} = s_{y/x} \sqrt{\frac{[N]}{[N-2]}} \quad (6)$$

Fórmulas para la prueba de hipótesis de la pendiente :

$$t_m = \frac{m - M \sqrt{[N-1]} \cdot s_{y/x}}{s_{y/x}} \quad (7)$$

Para probar la hipótesis de que el método desarrollado es exacto, es necesario aplicar la ecuación de t de estudent. Como deseamos probar que los resultados obtenidos están dentro del 100% del activo recuperado La hipótesis a probar que la media aritmética (\bar{x}) obtenida experimentalmente es igual a la media aritmética poblacional (M) es igual al 100%.

$$t = \frac{\bar{x} - M}{s / [N]^{0.5}} \quad (8)$$

Para Ho : $\bar{x} = M = 100\%$

Para demostrar que el método es preciso, debemos hacer uso de la ecuación de Chi-cuadrada:

$$\chi^2 = (N-1) s^2 / S^2 \quad (9)$$

Para métodos analíticos precisos, la desviación estándar aceptable es de 1.5 (varianza 2.25) por lo que la hipótesis a probar es $H_0: S^2 = s^2 = 2.25$.

Para las ecuaciones anteriores, las variables son las siguientes:

N = número de datos

$\sum X_i$ = Sumatoria de la cantidad adicionada del principio activo al placebo

$\sum Y_i$ = Sumatoria de la cantidad recuperada (detectada por CLAR).

B = Ordenada al origen teórica (0)

M = Pendiente teórica (1)

$S_{y/x}$ = Error estándar de estimación

S_x = Desviación estándar de las X_i

$\hat{S}_{y/x}$ = Error típico de estimación modificado

s^2 = Varianza muestral

S^2 = Varianza poblacional.

IX. PARTE EXPERIMENTAL.

9.1. Selección de fase móvil. Para encontrar la fase móvil adecuada para separar el acetato de hidroxocobalamina de los excipientes del inyectable, se realizaron diferentes pruebas con disolventes utilizados en cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa , encontrando la proporción de agua -metanol-ácido acético de 76:24 y 2ml. de ácido acético por cada litro de fase móvil. Una vez encontrada ésta proporción , se realizó la validación de la técnica desarrollada (linealidad, exactitud y precisión de la misma), al mismo tiempo que se prepararon muestras con placebo, formulación y principio activo del inyectable, sometiénolas a condiciones de degradación (60º C en medio acuoso ácido durante un mes), para demostrar o no especificidad de la técnica para estudios de estabilidad .

9.2. Linealidad del método. Para determinar la linealidad del método desarrollado, se prepararon muestras a diferentes concentraciones por duplicado (40%, 60 %, 80%, 100% y 120%) y dos estándares externos de acetato de hidroxocobalamina como se indica en la parte de métodos . El análisis se desarrolló de la siguiente manera :

Se inyectó al cromatógrafo de líquidos 20 mcl. de estándar uno por duplicado . Posteriormente se inyectaron las dos muestras por duplicado de 40% ; una muestra por duplicado de 60% (dos inyecciones); el estándar uno por duplicado (dos inyecciones); la segunda

muestra por duplicado de 60%; las dos muestras por duplicado de 80%; el estándar dos por duplicado; dos muestras por duplicado de 100% y 120%, y, finalmente los dos estándares por duplicado.

Exactitud y precisión del método: Para determinar la precisión y exactitud de la técnica analítica desarrollada, se prepararon cinco muestras de 80%, 100%, 120% y dos estándares de Acetato de Hidroxocobalamina, (preparados según se indicó en la parte de métodos). El orden del análisis fué el siguiente:

Se inyectó por duplicado al cromatógrafo de líquidos, 20 ml de estándar uno y dos; posteriormente se inyectaron las muestras de 80%, estándares, muestras de 100%, estándares, 120% y finalmente los estándares.

Los resultados y su análisis estadístico, se muestran a continuación.

X. RESULTADOS.

A continuación se presentan los resultados obtenidos al hacer recobros de 40%, 60%, 80%, 100% y 110%.

mg. adicionados (Xi)	mg. recuperados (Yi)	% recuperados
0.4695	0.4760	101.38
0.4695	0.4823	102.73
0.7042	0.7007	99.50
0.7042	0.7028	99.80
0.9390	0.9177	97.73
0.9390	0.9472	100.87
1.1737	1.1637	94.15
1.1737	1.1631	99.10
1.3065	1.3095	100.23
1.3065	1.3152	100.67

$$EXi^2 = 9.36513$$

$$EYi^2 = 9.3350$$

$$EYi = 9.1782$$

Aplicando la fórmula 1 para calcular la pendiente del método tenemos:

$$m = (10 * 9.34954336) - (9.1858 * 9.1782) / (10 * 9.36512566) - (9.1858)^2$$

$$m = 0.9907*$$

Para la ordenada al origen, aplicando la fórmula 2 tenemos:

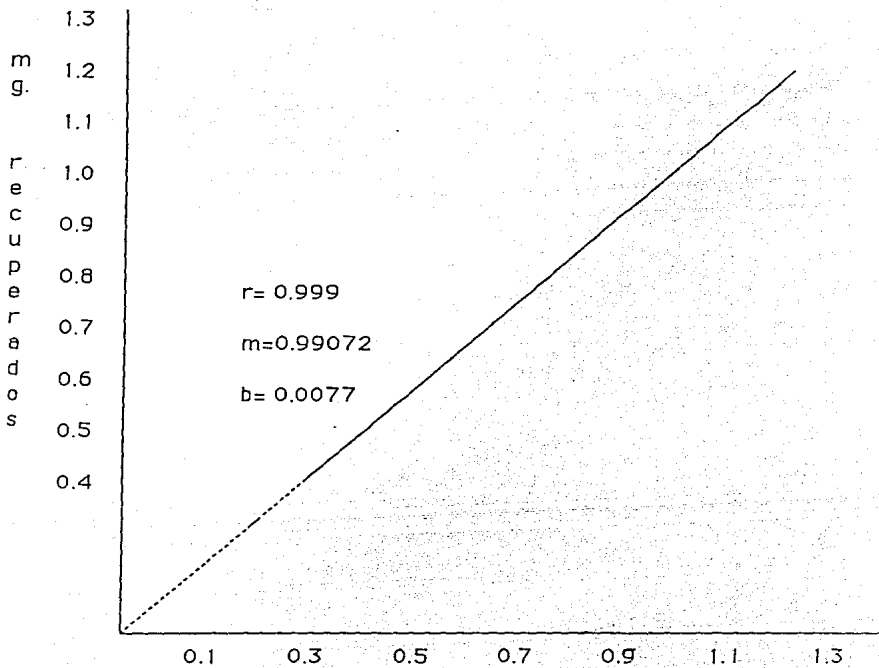
$$b = (9.1782 * 9.36512566) - (9.1858 * 9.34954336) / (10 * 9.36512566) - (9.1858)^2$$

$$b = 0.0077$$

Aplicando la formula 3 para el coeficiente de correlación tenemos:

$$r = \frac{(10 * 9.3495) - (9.1858 * 9.1783)}{[(93.6513) - (84.3789)] * [(9.1106)]}$$

$$r = 0.999$$



mg. adicionados

Gráfica 1. Linealidad del método analítico para la determinación de acetato de hidroxocobalamina por CLAR.

Prueba de hipótesis para la ordenada al origen.

a. $H_0: b=B=0$

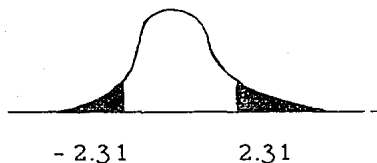
$b.\alpha=0.05$

$H_a: b \neq B \neq 0$

$t_{1-\alpha/2} = 0.975$

$gl = 8$

c.



d. Al aplicar las fórmulas 4, 5 y 6 tenemos:

$$S_{y/x} = \frac{\{[(84.2394) - (0.0077)(9.1782) - (0.9907)(9.349)]\}}{10}$$

$$S_{y/x} = 2.7370 \quad S_{y/x} = 2.7370 * [(10/8)] \quad S_{y/x} = 3.0601$$

$$e. t_b = \frac{0.0077}{3.0601 [(9.3651/10) * (0.9272)]} \quad t_b = 0.0025$$

Como $t_{calculada}$ / es menor que t_{tablas} / no se puede rechazar H_0 por lo tanto la ordenada al origen tiene un valor próximo a cero con una confianza del 95%

Prueba de hipótesis para la pendiente (m).

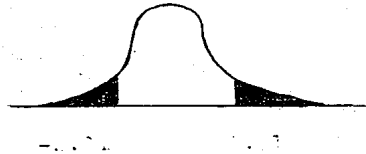
a. $H_0: m=M=1$

b. $\alpha=0.05$

$H_a: m \neq M \neq 1$

$t_{1-\alpha/2} = 0.975$

c.



d. $t_m = \frac{(0.99072-1) [(0.3045)(9)]}{3.060072}$ $t_m = -0.00277$

Como / $t_{calculada}$ / es menor que / t_{tablas} /, no se puede rechazar H_0 , por lo tanto la pendiente es igual a 1 con un 95% de confianza

Exactitud y precisión.

A continuación se presentan los resultados obtenidos al efectuar recobros de cantidades conocidas de Acetato de Hidroxocobalamina, correspondientes al 80%, 100% y 120% de la cantidad etiquetada como el 100% de Acetato de Hidroxocobalamina en el inyectable.

mg. adicionados	mg. recuperados	% recuperado
1.3189	1.3196	100.06
1.3189	1.3272	100.63
1.3189	1.3178	99.92
1.3189	1.3269	100.61
1.3189	1.3369	101.36
1.0991	1.0842	98.64
1.0991	1.1071	100.72
1.0991	1.1067	100.70
1.0991	1.1135	101.30
1.0991	1.0808	98.33
0.8793	0.8747	99.47
0.8793	0.8711	99.07
0.8793	0.8679	98.71
0.8793	0.8735	99.35
0.8793	0.8579	97.56

Exactitud:

Utilizando la ecuación 8 deseamos probar la hipótesis de que el método desarrollado es exacto:

a. $\bar{x} = 99.762$

$s = 1.1046$

$t_{\text{tablas}} = 2.14$

b. $H_0: M = \bar{x} = 100$

$H_a: M \neq \bar{x} \neq 100$



c. $t_{\text{calculada}} = \frac{99.76 - 100}{(1.1046 / \sqrt{15})}$ $t_{\text{calculada}} = 0.8345$

d. Como $|t_{\text{calculada}}|$ es menor que $|t_{\text{tablas}}|$ no se puede rechazar la hipótesis nula, por lo tanto el método es exacto con una confianza del 95 %

Precisión:

Haciendo uso de la ecuación 9, deseamos probar que el método es preciso con una confianza del 95%

a. $N = 15$

$$s^2 = 1.22014$$

$$S^2 = 2.25$$

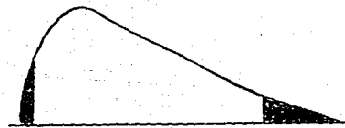
$$X_{\text{tablas}}^2 = 26.1$$

b. $H_0: S^2 = s^2 = 2.25$

$$H_a: S^2 \neq s^2 \neq 2.25$$

c. Grados de libertad = 14

$$= 0.05$$



$$d. X_i^2 = \frac{(15 - 1) * 1.22014}{2.25}$$

$$X_i^2 = 7.5918$$

$$2.25$$

Como X_i^2 calculada / es menor que X_{tablas}^2 /
no se puede rechazar la hipótesis nula (H_0) por lo que el
método es preciso con una confianza de 95%.

En las figuras 8, 9,10 y 11, se muestran los cromatogramas obtenidos para el blanco, estándar de referencia externa, placebo y formulación respectivamente.

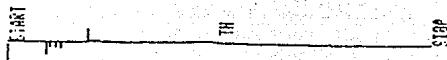


Figura No. 8

Blanco. cromatograma que muestra las señales producidas por el disolvente utilizado para la solubilización de la muestra.

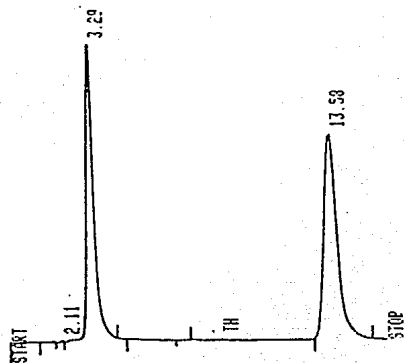


Fig. 9. Estándar de referencia externa. Las señales se identifican de la siguiente manera:

Tiempo de retención:

3.29

13.58

Compuesto:

Acetato de Hidroxocobalamina

Riboflavina (estándar interno)

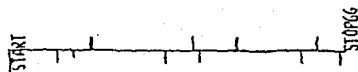


Fig. 10. Placebo. Cromatograma obtenido al prepararlo como se preparó la muestra.

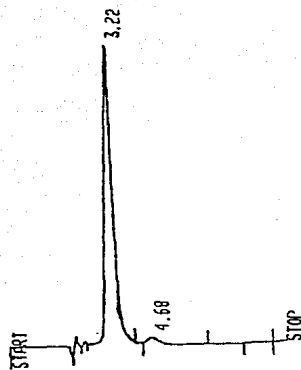


Fig. 11. Formulación sin el estándar interno. al tiempo de retención 3.22 se observa el Acetato de Hidroxocobalamina (tr. 3.22)

Especificidad en estabilidad.

Para determinar que el método desarrollado por CLAR. para valorar Acetato de Hidroxocobalamina es específico, se analizaron muestras de placebo, materia prima de Acetato de Hidroxocobalamina y formulación, sometidas a condiciones de degradación (en solución ácida durante un mes y a 60 °C), los productos de degradación no se observaron a 351 nm., por lo que no interfieren en la determinación, esto significa que el método desarrollado es específico e indicador de estabildades. Los cromatogramas que demuestran lo anterior, se muestran en las siguientes figuras:

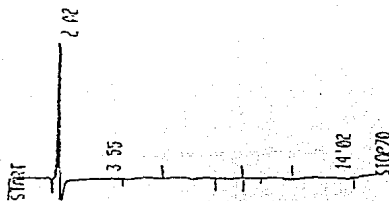


Fig. 12. cromatograma del placebo, después de estar a 60 °C por un mes en solución ácida.



Fig. 13. Cromatograma de la materia prima de Acetato de Hidroxocobalamina degradada durante un mes en solución ácida a 60 °C.

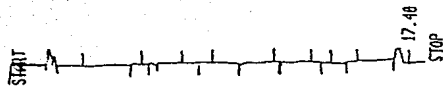


Fig. 14. Cromatograma de la formulación degradada durante un mes a 60 °C en solución ácida.

XI. CONCLUSIONES:

- 1.- El método descrito es original.
- 2.- Con el análisis estadístico se demostró que la técnica desarrollada es precisa y exacta.
- 3.- La respuesta del método por CLAR es lineal en el intervalo de concentraciones de 0.22 mg a 1.71 mg/ml de Acetato de Hidroxocobalamina en el inyectable
- 4.- La técnica analítica es específica e indicadora de estabilidad.
- 5.- El método descrito por su rapidéz y sencillez, es más barato que el método microbiológico
- 6.- Los objetivos y la hipótesis planteados, se cumplieron satisfactoriamente

XII BIBLIOGRAFIA.

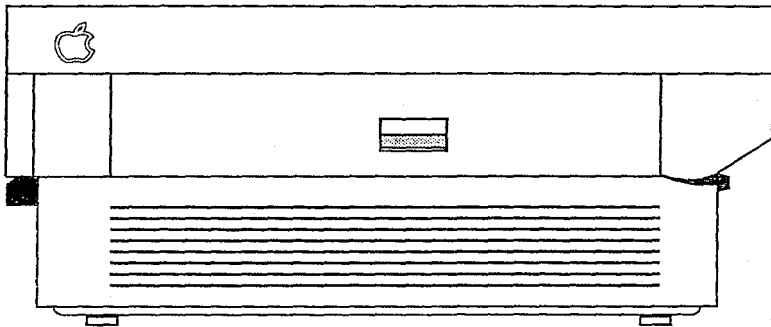
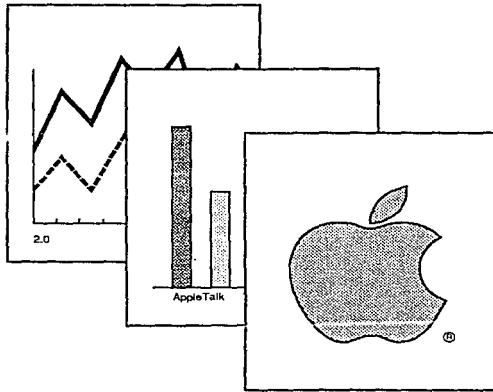
- 1.- Carstensen T.J., "J. Pharmac. Sci". 58, 549-553. (1960).
- 2.- Elmer De Ritter., "J. Pharm. Sci". 71, 1873-1892 (1982)
- 3.- Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos Editada por Manuel Merino Alcántara. Talleres gráficos de la nación. 4a. ed. SSA. México 1974.
- 4.- The Unites States Pharmacopeia-National Formulary, USP. XXI. Printed by Mack Printing Company. Washington D.C. 1985.
- 5.- Gonzalez Aguilar H., "Comparación de dos métodos analíticos específicos para la determinación de acetato de acetónido de fluocinolona en un polifármaco de uso tópico". Tesis profesional, Escuela de Ciencias Químicas Guadalajara Jal. 1983.
- 6.- Goodman L, Gilman A., "Bases Farmacológicas de la Terapéutica". Ed. Interamericana, 5a. ed. México 1978.
- 7.- High Performance, Chromatography, Advances and Perspectives, Edited by Csaba Morvath. 1, Ed. Academic press. USA. 1980.
- 8.- Jonker J.R., P. Rozing G., "Low-Dispersion Liquid Chromatography" , J. Hewlett-Packard. 35, 4:3-8. April 1984.
- 9.- Litter M., "Farmacología", Ed. El Ateneo, 6a ed. Argentina 1980.
- 10.- Lehninger A.L., "Bioquímica", Ed. Omega, 2a ed. Barcelona 1980.

- 11.- Manzur-Ul-Hanque Hashmi., "Assay of Vitamins in Pharmaceutical Preparations", Ed. John Wiley Sons, London 1973.
- 12.- Meyer F., Jawetz E., "Manual de Farmacología Clínica" Ed. El Manual Moderno, 4a ed. México 1980.
- 13.- Milton B., "J. of the American Pharmaceutical Association XLV. 121-134. (1956).
- 14.- Mc Nair H.M., Esquivel H.B., "High Performance Liquid Chromatography", Virginia Polytechnic Inst. and State University Blackburg. Washington D.C. 1973.
- 15.- The Merck Index . An Encyclopedia of Chemical and Drugs Ed. Merck & Co 9a ed. USA 1976.
- 16.- Remington's Pharmaceutical Sciences, 16 th ed. Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1980.
- 17.- R.B.H. Wills, C.G. Shaw and W.R. Day. "Análisis of Water Soluble Vitamins by High Performance Liquid Chromatography". J. of Chromatographic Science. 15: 263 July 1977.
- 18.- R.W. Yost and R.Y. Coulon. "Selection of Optimum Solvent Sistem in Adsorptive Liquid Chromatograph". Liquid Chromatography Application Study No 6. The Perkin Elmer Corporation Instrument Divition March 1972.
- 19.- Shriner R., Fuson R.C., et all., "the Sistematic Identification of organic Compounds". Ed. John Wiley Sons. 6a. ed. London 1964.

20.-Strobecker R., "Análisis de Vitaminas", Ed. Paz Montalvo, Madrid 1967.

21.- Thin Layer Chromatography, a Laboratory Handbook, Ed. Egon Stahl, New York 1969.

LaserWriter



35996