

20179

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



**“CUANTIFICACION DE PENICILINA G SODICA Y
PENICILINA G PROCAINA POR HPLC. EN UN
POLVO PARA SUSPENSION INYECTABLE”**

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

México, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

1987



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.

C O N T E N I D O .

| | Página. |
|---|---------|
| I. INTRODUCCION. | 1 |
| II. ANTECEDENTES. | |
| 2.1 Las penicilinas | 3 |
| 2.2 Clasificación. | 4 |
| 2.3 Penicilina G sódica. | 5 |
| 2.4 Penicilina G procaína. | 7 |
| 2.5 Absorción, distribución y excreción de la penicilina G. | 9 |
| 2.6 Reacciones secundarias y tóxicas a las penicilinas. | 11 |
| 2.7 Usos clínicos de las penicilinas. | 12 |
| 2.8 Métodos para la determinación de penicilina G | 14 |
| a) Análisis microbiológico | |
| a.1 Método de cilindros sobre placa | 14 |
| b) Análisis químicos | |
| b.1 Método iodométrico | 14 |
| b.2 Determinación colorimétrica de hidroxilamina. | 16 |
| b.3 Determinación gravimétrica de penicilina G. | 16 |
| c) Análisis cromatográficos. | |
| c.1 Cromatografía de gases. | 17 |
| c.2 Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia. | 20 |
| c.2.1 Clasificación de la cromatografía líquida en columna. | 24 |
| c.2.2 Conceptos y definiciones básicas en cromatografía. | 27 |
| 2.9 El cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia. | 32 |
| III. PARTE EXPERIMENTAL. | |
| 3.1 Desarrollo del método. | 40 |
| IV. RESULTADOS. | |
| 4.1 Especificidad del método. | 43 |
| 4.2 Validación estadística del método. | 51 |
| 4.3 Cálculos para la cuantificación. | 64 |
| 4.4 Descripción de los cromatogramas. | 65 |
| V. CONCLUSIONES. | 68 |
| VI. BIBLIOGRAFIA. | 70 |

INTRODUCCION.

I. I N T R O D U C C I O N

El campo de acción del control de la calidad ha estado aumentando tanto en su técnica como en su organización, todo esto en respuesta a la experiencia operativa de la industria en los últimos años. De esta ha surgido un conjunto sistemático de principios, de prácticas y de tecnologías para el buen desarrollo del control de la calidad de un producto, con resultados más confiables.

Una técnica de análisis que permite la identificación y cuantificación de los componentes de una mezcla en forma exacta, reproducible, rápida y específica de una gran variedad de sustancias no volátiles, termolábiles, iónicas etc, es la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, (HPLC: High Performance Liquid Chromatography).

La HPLC en los últimos años ha resultado ser una contribución significativa para los análisis farmacéuticos, bioquímicos y clínicos.

El motivo del presente trabajo es mostrar una aplicación importante de la HPLC en la cuantificación de la penicilina G sódica y penicilina G procaína en un polvo para suspensión inyectable; ya que por otras técnicas analíticas solo se lograba determinar la cantidad total de penicilina G, sin conocer qué cantidad correspondía a la sal sódica y cual a la procaína.

La cuantificación de estas sales de penicilina G es de gran importancia, ya que señala la efectividad de este antibiótico en cuanto a su actividad anti-bacteriana, al presentarse en las concentraciones adecua-

das y en ausencia de productos de degradación u otras sustancias ajenas que pudieran disminuir la actividad farmacológica del mismo.

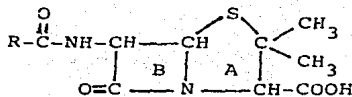
A N T E C E D E N T E S .

II. ANTECEDENTES .

2.1 Las penicilinas. 4,11,17,18 .

Penicilina es el término genérico de un grupo de sustancias naturales y semisintéticas de carácter antibiótico. Su acción es a nivel de inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana, y por esto se considera bactericida.

La estructura básica de las penicilinas está constituida por el anillo tiazolidínico (A), unido a un anillo beta-lactámico (B), el cual está unido a una cadena lateral (R).



Estructura básica de las penicilinas.

El núcleo de la penicilina (ac. 6-aminopenicilánico) es la base estructural principal a la que se debe su actividad biológica; la transformación metabólica o la alteración química de esta porción de la molécula le hace perder toda eficacia antibacteriana importante.

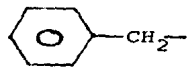
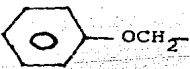
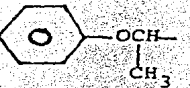
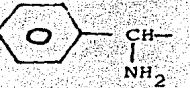
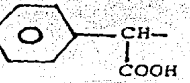
La cadena lateral (R) establece muchas de las características antibacterianas y farmacológicas de cada tipo particular de penicilina.

2.2 Clasificación.

Ya en 1943 se vió que la penicilina preparada en Estados Unidos de Norteamérica era diferente a la obtenida en Inglaterra. Pronto se demostró que la penicilina estadounidense tenía una cadena lateral bencilica, mientras que la inglesa tenía por cadena lateral un grupo 2-pentenilo.

Por haberse descubierto otras penicilinas naturales, fue preciso establecer una nomenclatura. En Estados Unidos se emplearon letras mayúsculas para designar las diversas penicilinas. Algunas de las primeras penicilinas naturales (F,X,K) fueron objeto de estudios clínicos, y resultaron inferiores a la bencilpenicilina (penicilina G).

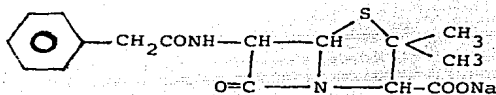
Estructura Química de Algunas Penicilinas.

| Cadena Lateral | Nombre Genérico |
|---|-----------------|
|  | Penicilina G |
|  | Penicilina V |
|  | Feneticilina |
|  | Ampicilina |
|  | Carbenicilina |

2.3 Penicilina G sódica. 4,6,7

- Fórmula condensada: $C_{16}H_{17}N_2NaO_4S$

- Fórmula desarrollada:



- Peso molecular: 356.37
- pH: entre 6 y 7.5 en solución acuosa conteniendo 50 mg/ml.
- Descripción: polvo cristalino blanco o ligeramente amarillento.
- Solubilidad: muy soluble en agua, poco soluble en alcohol.
- Penicilina G sódica contiene entre 80 y 93.8% de penicilina ($C_{16}H_{18}N_2O_4S$).
- Identificación:

- Colorea la flama de amarillo intenso.
- A 5 ml de una solución acuosa de penicilina 1:50, añadir una gota de HCL: Se forma un precipitado blanco.
- El espectro de absorción infrarrojo de la muestra exhibe máximos a las mismas longitudes de onda y tiene intensidades relativas similares al de penicilina G sódica, patrón de referencia.
- Llevar a ignición 10 mg de penicilina G sódica en un crisol

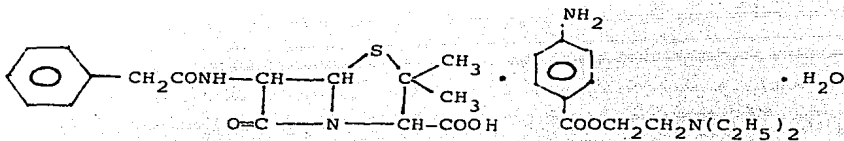
de platino, agragar un poco de agua y una gota de HCL y filtrar. El filtrado responde a la prueba de sodio a la flama.

- Valoración. Métodos oficiales: Yodométrico y Microbiológico.

4,6,7

2.4 Penicilina G procaína.

- Fórmula condensada: $C_{16}H_{18}N_2O_4S \cdot C_{13}H_{20}N_2O_2 \cdot H_2O$
- Fórmula desarrollada:



- Peso molecular: 588.72
- pH: 5-7.5 en una solución acuosa conteniendo aproximadamente 300mg/ml.
- Descripción: cristales blancos o casi blancos o polvo microcristalino, inodoro, relativamente estable al aire y la luz.
- Solubilidad: poco soluble en agua; soluble en alcohol y en cloroformo; sus soluciones son dextrorrotatorias y se inactivan rápidamente con ácidos, álcalis y agentes oxidantes.
- Penicilina G procaína contiene entre 51.0% y 59.6% de penicilina ($C_{16}H_{18}N_2O_4S$).
- Identificación:
 - El espectro de absorción infrarrojo de la muestra exhibe máximos a las mismas longitudes de onda que el de penicilina G procaína patrón de referencia y con intensidades relativas iguales.

- Una solución saturada de penicilina G procaína produce un precipitado café con S.R de vado y un precipitado blanco con S.R la rotura de rotasio mecánico.
- A 5 ml de una solución saturada de penicilina G procaína agregar 3 gotas de HCL dil, mezclar, agregar una gota de solución de nitrato de sodio (1:10) y agregar a la solución 50 mg de B-naftol en una mezcla de 2 ml de S.R de NaOH y 3ml de agua: Se forma un precipitado rojo escarlata.

- Valoración. Métodos oficiales: Yodométrico y Microbiológico.

2.5 Absorción, distribución y excreción de la penicilina G.

Absorción.

Por vía oral. Aproximadamente un tercio de la penicilina G ingerida es absorbida en el intestino si las condiciones son favorables. La absorción tiene lugar principalmente en el duodeno, con tal rapidez que la concentración máxima en la sangre se alcanza en 30 a 60 minutos.

Dos tercios, quizá más, de dosis ingerida llegan al colon sin ser absorbidos, y en él son inactivados por bacterias; solo una pequeña cantidad es excretada en heces. La dosis oral de penicilina G debe ser el cuádruplo o el quintuplo de la dosis intramuscular a fin de obtener niveles sanguíneos de igual altura y duración.

Por inyección intramuscular. La velocidad de absorción de la penicilina G inyectada y la magnitud y persistencia de los niveles sanguíneos alcanzados dependen de muchos factores; entre ellos, la dosis, el vehículo, la concentración, forma física y solubilidad de la sal o del éster de la penicilina G.

Otros factores, especialmente la excreción renal, influyen en la concentración y duración de los niveles del antibiótico en el plasma. Por ejemplo, es tan rápida la eliminación de la penicilina G por los riñones que la concentración plasmática cae a la mitad de su valor en el término de una hora de haber inyectado un preparado acuoso.

Se han ensayado muchos medios para prolongar la persistencia del an

tibiótico en el cuerpo y, por lo tanto, disminuir la frecuencia de las inyecciones. Lo que más frecuentemente se utiliza, son los preparados de penicilina G de acción prolongada, estos están destinados a la inyección intramuscular profunda para formar en el seno del músculo un depósito del antibiótico que será absorbido paulatinamente en el curso de 12 hrs o de varios días.

Los dos compuestos de acción prolongada actualmente más en uso son la penicilina G procaína y la penicilina G benzatínica.

Distribución.

La penicilina G se difunde en todo el organismo, pero hay marcadas diferencias de concentración en varios líquidos y tejidos. Más del 90% de la penicilina G de la sangre está en el plasma, y menos del 10% está en los eritrocitos; aproximadamente 65% está unida en forma reversible a la albúmina plasmática. La baja concentración de proteína en otros líquidos corporales, y por lo tanto el grado reducido de fijación de penicilina, contribuyen a la eficacia del medicamento. Aparecen cantidades importantes en hígado, bilis, riñón, semen, linfa e intestino.

Excreción.

En circunstancias normales, la penicilina G es rápidamente excretada por el organismo, principalmente por los riñones, pero en pequeña cantidad por la bilis y otras vías.

La rápida excreción renal del antibiótico es la razón de que se re-

quieran medios especiales para prolongar la permanencia del medicamento en el cuerpo.

2.6 Reacciones secundarias y tóxicas a las penicilinas. 11,17,18

Las penicilinas, como todos los agentes antimicrobianos, provocan diversos efectos adversos. Las reacciones tienen gravedad diversa desde las muy leves y evanescentes hasta las más graves, incluso mortales. Se han producido después de emplear el producto por cualquier vía, y han afectado la mayor parte de los tejidos y órganos, por separado o en forma difusa.

La frecuencia de los efectos no deseados varía según el preparado y la vía de administración. De las penicilinas inyectables, la penicilina G procaína produce la más alta frecuencia de reacciones, aproximadamente 5%; la penicilina G acuosa, de 2 a 2,5%; la penicilina G benzatínica produce efectos secundarios en 0.3% de los pacientes. Por lo general la vía parenteral entraña mayores riesgos que la vía oral.

El mecanismo más común en la patogénesis de los efectos adversos de cualquier clase de penicilina es la hipersensibilización. Las reacciones alérgicas a la penicilina varían en frecuencia de 0.7 a 10%. Se cree que la penicilina es la causa más general de alergia a los medicamentos, y en sus manifestaciones abarca casi toda la gama de reacciones por alergia y mecanismos inmunitarios.

Pueden observarse reacciones de hipersensibilidad con cualquier dosis y forma de penicilina, sin que haya habido exposición anterior al mg

dicamento o inmediatamente después de la administración de la primera dosis. Aunque con la eliminación del antibiótico suelen desaparecer pronto las manifestaciones alérgicas, puede que persistan por una o dos semanas después de terminado el tratamiento. En algunos casos la reacción es leve y persiste mientras continúa el uso de la penicilina. En otros, la reacción es más seria y requiere la inmediata cesación del tratamiento. En otros casos es necesario prohibir todo futuro uso de la penicilina, por que hay riesgo de muerte, y el paciente debe de ser advertido de ello.

Se ha visto reacciones de sensibilización a la penicilina tan variadas como las siguientes: erupciones cutáneas de varias clases, lesiones bucales, fiebre, nefritis intersticial, así como también reacciones más graves como enfermedad del suero, fenómeno de Arthus y las reacciones más peligrosas como anafilaxia.

2.7 Usos clínicos de las penicilinas. 11,17,18

A pesar de las ventajas de los nuevos antimicrobianos, los anteriores como la penicilina G son muy útiles en innumerables situaciones frecuentes en la práctica diaria.

Tomemos, por ejemplo, las infecciones por anaerobios; prácticamente todos estos gérmenes, salvo el Bacteroides fragilis, son sensibles a la penicilina, contra esta bacteria resultan eficaces la clindamicina y el cloranfenicol, pero mientras, la penicilina G es excelente en infecciones anaerobias graves que afectan el sistema nervioso central.

Para algunos clínicos la penicilina constituye el mejor tratamiento de las infecciones del aparato respiratorio superior, si se tiene en

cuenta que la mayoría son causadas por cocos grampositivos todavía no resistentes al medicamento.

Los neumococos todavía son responsables de la mayoría de las neumonías bacterianas no adquiridas en el hospital y la penicilina G es aún el fármaco de primera elección, con las cefalosporinas como la mejor alternativa.

La neumonitis por aspiración (más frecuente en ancianos) se debe por lo general a estreptococos anaerobios, Bacteroides melaninogenicus y Fusobacterium nucleatum, susceptibles a la penicilina G procaína en grandes dosis.

La meningitis en los adultos, por lo general, es producida por meningococos o neumococos y todos los casos son sensibles a la penicilina.

2.8 Métodos para la determinación de penicilina G. ^{3,4,5,7}

- a) Análisis microbiológico: a.1) Método de cilindros sobre placa.
- b) Análisis químicos { b.1) Método iodométrico.
b.2) Determinación colorimétrica de hidroxilamina
b.3) Determinación gravimétrica de penicilina G
- c) Análisis cromatográficos { c.1) Cromatografía de gases
c.2) Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.

a) Análisis microbiológico.

a.1) Método de cilindros sobre placa.

La eficacia de los antibióticos, desde el punto de vista terapéutico, se demuestra por la inhibición que efectúan sobre microorganismos específicos, bajo condiciones especiales. La disminución de la actividad antimicrobiana, aún no se puede demostrar por métodos químicos, pero sí mediante valoraciones microbiológicas, utilizando medios de cultivo especiales.

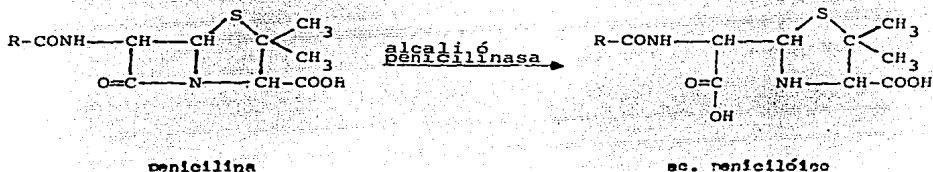
El método oficial para valoración terapéutica de penicilina G es el de cilindros sobre placa, que se basa en la difusión del antibiótico desde un cilindro vertical, sobre una capa de agar solidificada que contiene el germen de prueba, depositada en una caja petri. La zona de inhibición prevista del microorganismo es un área circular que queda enteramente alrededor del cilindro que contiene la solución del antibiótico.

b) Análisis químicos.

b.1) Método iodométrico.

La penicilina puede ser inactivada por descomposición hidrolítica del anillo B-lactámico por influencia de un álcali o por acción de una enzima eg

pecífica como lo es la penicilinasa. El producto de esta hidrólisis es el ácido penicilínico.



Reacción de Hidrólisis de la Penicilina.

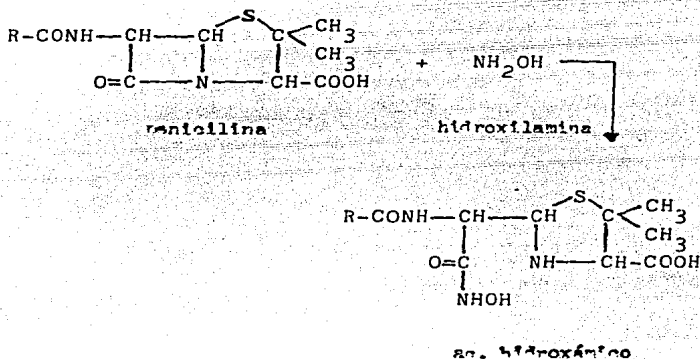
En el ensayo iodométrico se aprovecha este comportamiento: dos alícuotas idénticas de una solución acuosa de penicilina son transferidas a matraces separados. A uno se le adiciona NaOH o penicilinasas; después de cierto tiempo se le adiciona HCl para neutralizar la solución y enseguida se agrega un exceso de solución de iodo. El exceso de iodo es titulado por retroceso con tiosulfato. A el otro, el blanco se le adiciona iodo directamente, sin la inactivación inicial que se hizo en la alícuota anterior. El iodo es titulado por retroceso con tiosulfato.

La diferencia en los volúmenes de solución de iodo consumido es relativo a la cantidad de penicilina en la alícuota.

Todo esto se lleva a cabo trabajando simultáneamente una muestra estándar de referencia.

b.2) Determinación colorimétrica de hidroxilamina.

Esta determinación se basa en la formación de un complejo colorido (rojo), al combinarse el ion Hierro (III) con el producto de la reacción previa que se lleva a cabo entre la penicilina G y la hidroxilamina (un ácido hidroxámico).



b.3) Determinación gravimétrica de penicilina G.

Este método se considera gravimétrico debido a que permite una determinación cuantitativa de penicilina G mediante precipitación, filtrado y pesado del precipitado obtenido.

Esta determinación se basa en la formación de una sal de la penicilina llamada penicilato de N-etil piperidonio, que se precipita en forma de cristales estables a temperatura ambiente que con facilidad se pueda pesar y determinar así la cantidad de penicilina existente en una muestra.

c) Métodos de análisis por Cromatografía.

La cromatografía es un método físico químico de separación. Las técnicas cromatográficas incluyen todo proceso en que la separación de los componentes de una mezcla es realizada por la adsorción diferencial o solución de los componentes individuales entre dos fases inmiscibles (estacionaria y móvil).

c.1) Cromatografía de gases. 12,15,16,22

Hay varias clases de cromatografía, dependiendo del estado físico de la fase estacionaria y la fase móvil:

| Fase móvil | Fase estacionaria | Tipo de cromatografía. |
|------------|-------------------|-------------------------------|
| gas | líquido | cromatografía gas-líquido |
| gas | sólido | cromatografía gas-sólido |
| líquido | líquido | cromatografía líquido-líquido |
| líquido | sólido | cromatografía líquido-sólido |

Como se puede ver, si la fase estacionaria es un sólido se habla de cromatografía gas-sólido. Esta técnica depende de las propiedades de adsorción del empaque de la columna para separar muestras, en especial gases.

La amplia variedad de fases líquidas con que se cuenta en la actualidad, hacen de la cromatografía gas-líquido, la forma más versátil y selectiva de la cromatografía de gases.

En la cromatografía gas-líquido, la separación de los componentes de una muestra se lleva a cabo en una columna casi siempre de pequeño

diámetro. la columna es la parte donde la separación tiene lugar y está empacada con un material inerte que en la mayoría de los casos es tierra de infusorios, ladrillo molido o carbón, dicho material recibe el nombre de soporte. Este soporte está recubierto por un líquido semisólido llamado fase estacionaria.

El gas que transporta la muestra a analizar y que se cuela a través de la fase estacionaria recibe el nombre de fase móvil; un diagrama que ejemplifica esto es el de la figura No. 1.

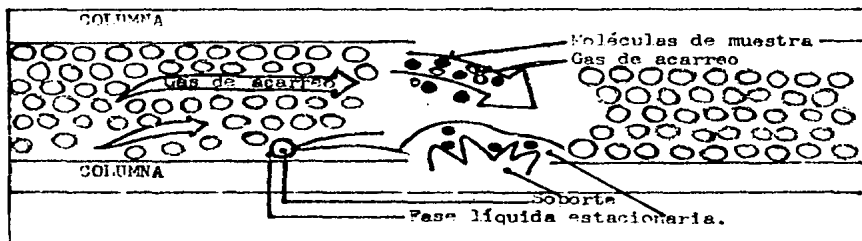


Figura No. 1. Partes que integran el interior de una columna de separación en Cromatografía de gases.

El proceso responsable de la separación cromatográfica gas-líquido es la partición. En este proceso la mezcla muestra es introducida en la corriente del gas portador a la columna donde se efectúa la separación, moviéndose los compuestos individualmente a diferentes velocidades dependiendo de la solubilidad de ellos en la fase líquida estacionaria. Como es de esperar, entre mayor sea la solubilidad de los componentes de la

nuestra en la fase líquida su presión de vapor será menor, por lo tanto, los componentes serán retenidos más tiempo en la columna; por el contrario, entre menor sea la solubilidad aumentará la presión de vapor y los componentes serán poco retenidos en la columna. Este proceso de separación está ilustrado en la figura No. 2.

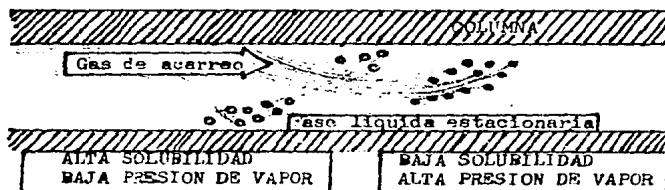


Figura No. 2. Separación por partición en Cromatografía gas-líquido.

La cromatografía gas líquido es una técnica de elución. Aquí el gas portador fluye a través de la columna de modo continuo durante la operación. En un momento dado se inyecta la muestra a través de un tapón de hule con una jeringa de precisión generalmente de 1 a 10 μ l, una pequeña cantidad de muestra que es generalmente del orden de 0.2 a 5 μ l y en esta forma se hace llegar la muestra líquida a una zona de calentamiento o bloque de inyección en donde la muestra es introducida, evaporada y arrastrada por el gas de acarreo que generalmente es nitrógeno o helio, hasta la entrada de la columna; (por esto es que las sustancias a analizar por cromatografía de gases deben tener una adecuada volatilidad y ser térmicamente estables). Es entonces que la mezcla empieza a ponerse en con-

tacto con la fase líquida de la columna. La separación de los componentes que comprenden la mezcla resulta de una diferencia de las múltiples fuerzas por las cuales los materiales de la columna tienden a retener cada uno de los componentes, ya sea que la naturaleza de la retención sea adsorción, solubilidad, ligaduras químicas, polaridad o filtración molecular. La columna retiene algunos componentes más tiempo que otros. Como consecuencia, todos los componentes pasan a través de la columna a velocidades variables y emergen en orden inverso a su retención en los materiales de la columna.

Al emerger de la columna, la fase gaseosa entra inmediatamente a un detector contiguo a la columna. Aquí los componentes individuales son registrados como una serie de señales que aparecen en una gráfica como una sucesión de picos, formando así el cromatograma.

5,14,21,25,27

b.2) Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.

En base a las diversas necesidades del análisis, se llegó a desarrollar técnicas cromatográficas tan valiosas como la HPLC (High Performance Liquid Chromatography = Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia).

La técnica de HPLC hace posible los análisis rápidos de compuestos no volátiles, iónicos y termolábiles que anteriormente era casi imposible determinar; así como también ofrece ventajas tan grandes como la alta sensibilidad, exactitud, rapidez y gran poder de resolución, el tiempo de retención es reproducible y muy corto, la instrumentación necesaria es versátil y fácil de manejar.

En la cromatografía líquida clásica, una columna de vidrio de una longitud aproximada de 30cm, se llena con un sólido granular adecuado con o sin una película de líquidos y sin movimiento, agregándose el líquido transportador y la muestra. La dificultad principal es la lentitud. Si los granulos son lo suficientemente pequeños para dar una buena separación, entonces la velocidad de elución por gravedad decrece en unas cuantas gotas por minuto. Este sistema se muestra en la figura No.3.

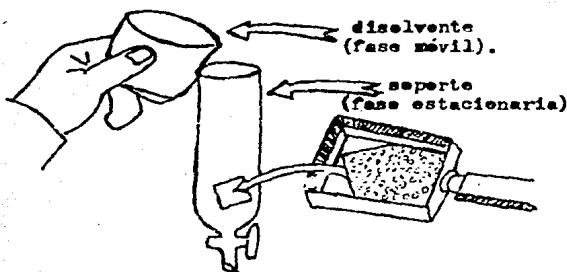


Figura No. 3. Sistema típico de Cromatografía Líquida Clásica.

La manera obvia de aumentar la velocidad de elución consistía en forzar al líquido por medio de una bomba de desplazamiento positivo o por la presión de un gas. Los aparatos antiguos no podían soportar altas presiones sin alterarse, de modo que para hacer un nuevo diseño se necesitaron mayores adelantos.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia tiene la ventaja de que opera a más baja temperatura; el intervalo obviamente se limita con los puntos de congelación y de ebullición del disolvente.

Todo lo anterior hace ver que la HPLC es una técnica viable para la separación de sustancias que no soportan temperaturas elevadas y mucho menos que sean capaces de volatilizarse.

La cromatografía líquida separa los compuestos de acuerdo a sus funciones moleculares. El mecanismo mediante el cual se separa un compuesto de otro, envuelve una interacción selectiva entre las moléculas del soluto (muestra) y dos fases, una estacionaria y una móvil.

La fase estacionaria se refiere a la columna, la cual es un cilindro rígido dentro del cual, se encuentra el material de empaque formado por pequeñas partículas. La fase móvil o disolvente fluye continuamente a través de la columna y detector.

Los dos sistemas de cromatografía líquida funcionan de acuerdo a los mismos principios, con la diferencia de que la cromatografía líquida de columna clásica se trabaja a la presión ambiental y en la cromatografía líquida de alta eficiencia se trabaja a presiones altas.

El mecanismo de separación de los componentes de una mezcla por HPLC se resume de la siguiente manera:

El disolvente que conocemos en cromatografía líquida como fase móvil se bombea a alta presión al cromatógrafo situado en una cámara a temperatura controlada. La muestra es introducida, en el sistema vía inyector, desde donde se transporta hacia la columna por la fase móvil, así la separación de los componentes de la mezcla será el resultado de la adhesión

o difusión de los componentes en las partículas que forman el empaque de la columna.

La bomba que succiona la fase móvil que proviene del reservorio, la lleva a través del sistema a flujo constante; cuando la muestra es inyectada, es forzada a través de la columna, separándose en bandas, las cuales eluyen de la misma hacia el detector y de allí la señal es enviada hacia el registrador. El resultado de este mecanismo llevará a separaciones más eficientes y rápidas.

c.2.1) Clasificación de la Cromatografía Líquida en Columna.

Existen muchas maneras de clasificar la cromatografía líquida en columna. Basándose en la naturaleza de la fase estacionaria y en los procesos de la separación, pueden enumerarse cuatro tipos.

- Cromatografía de adsorción. La fase estacionaria es un adsorbente y la separación se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción.

- Cromatografía de partición. La separación no se basa en la adsorción, sino en una verdadera partición entre la fase móvil y la fase estacionaria.

- Cromatografía de intercambio iónico. El lecho estacionario tiene una superficie cargada iónicamente, con carga contraria a la de la muestra. Esta técnica se usa casi exclusivamente con muestras iónicas o ionizables. Cuanto mayor sea la carga de la muestra, más fuertemente será atraída hacia la superficie iónica y, por tanto, más tiempo tardará en ser eluida. La fase móvil es un tapón acuoso, en el que el pH y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de elución.

- Cromatografía de exclusión. Se rellena la columna con un material que posea poros de dimensiones comprendidas entre ciertos límites, con lo que la muestra es retenida o filtrada según sea su tamaño molecular.

Dependiendo de la polaridad de las fases, podemos dividir a la cromatografía líquida en:

- Cromatografía en fase normal. Aquí el lecho estacionario es de naturaleza fuertemente polar y la fase móvil es no polar, de esta forma las muestras polares quedan retenidas en la columna durante tiempos mayores que los materiales menos polares o no polares.

- Cromatografía en fase inversa. En este caso el lecho estacionario es de naturaleza no polar, mientras que la fase móvil es un líquido polar. En este caso, cuanto más no polar sea la muestra, mayor será su retención.

Algunas veces se puede modificar la fase móvil para ajustar su polaridad. En fase normal, puede hacerse por adición de una sustancia más polar, en tanto que en la fase inversa el aditivo será una sustancia menos polar.

En la figura No. 4. se presentan estas dos técnicas, al tiempo que se indica el orden de elución de los distintos componentes de una muestra en función de sus diferentes polaridades.

Entonces cuando se habla de cromatografía líquida en fase normal o inversa el proceso se desarrolla tomando en cuenta la polaridad de la muestra, el empaque de la columna y la fase móvil, las cuales se encuentran en interrelación constante.

El parámetro que en HPLC nos va dar la elección de la columna y de la fase móvil, viene dado por la polaridad de la muestra que vamos a separar. Normalmente esta idea viene dada, por el disolvente de la muestra y por supuesto sabiendo que lo similar disuelve lo similar, la polaridad de la muestra será la misma del disolvente que se utilice.

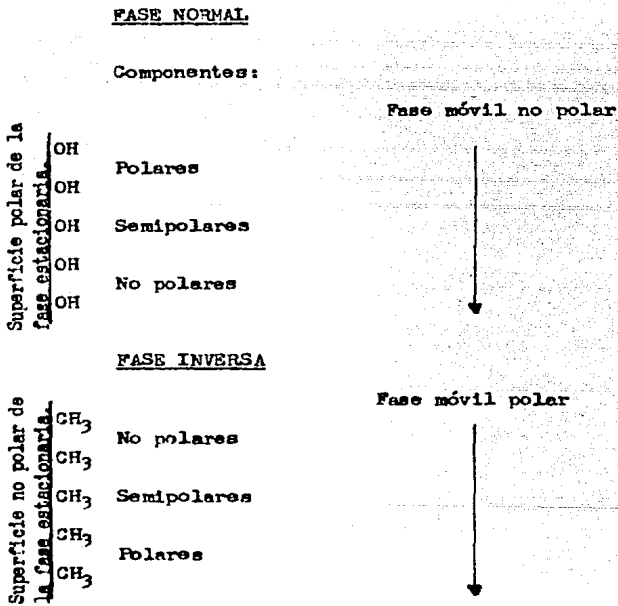


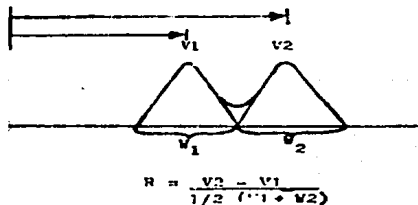
Figura No. 4. Ilustración gráfica de la cromatografía líquida en fase normal y en fase inversa. Se indica el tipo de compuestos presentes en la muestra y su posición relativa en la dirección del flujo.

c.2.2) Conceptos y Definiciones Básicas en Cromatografía. ^{21,25,27}

La separación cromatográfica de una mezcla depende de las interacciones entre las fases móvil y estacionaria; esta separación involucra factores y variables tales como:

- Resolución.

El término resolución, describe el grado o la magnitud de la separación; por tanto hablamos de que también un componente es separado de otro. La resolución es definida matemáticamente para dos componentes de una mezcla, como la diferencia de los volúmenes de elución, dividida por el promedio de los anchos del pico. Esta medición se realiza como lo indica el cromatograma de la figura No. 5.



donde:

R = resolución.

V_1 = volumen de retención del pico 1.

V_2 = volumen de retención del pico 2.

W_1 = ancho del pico 1.

W_2 = ancho del pico 2.

Figura No. 5. Cromatograma que muestra los parámetros necesarios para la determinación de la resolución en una separación cromatográfica de dos componentes.

Los valores de V_1 , V_2 , W_1 y W_2 podrán ser medidos en unidades de volumen, tiempo o distancia de retención en el cromatograma.

La resolución dentro de la separación cromatográfica está íntimamente relacionada con otros parámetros como son:

- Factor de capacidad.

Un pico es generalmente identificado, usando la medida de retención, a menudo, el término tiempo de retención es utilizado midiendo desde que se efectúa la inyección hasta el punto en donde aparece el ápice del pico o banda. El término universal más frecuentemente usado para identificar o localizar un pico, es el factor de capacidad (K'). El factor de capacidad de un componente dado es definido como sigue:

$$K' = \frac{V_1 - V_0}{V_0}$$

donde:

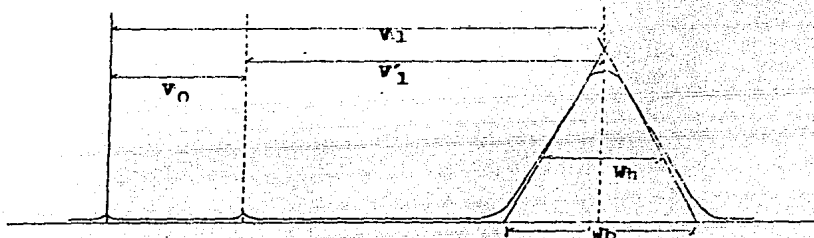
K' = Factor de capacidad.
 V_0 = Volumen muerto.
 V_1 = Volumen de retención.

Los valores de V_1 y V_0 estarán medidos en términos de las mismas unidades; V_0 es llamado volumen muerto y es una medida de la retención (en términos de volumen, tiempo o distancia) para un componente no retenido. El volumen muerto de un sistema, en términos de volumen, es la medición del volumen del sistema desde el inyector hasta el detector.

El volumen muerto, es usualmente sencillo de medir, como la distancia en el cromatograma, entre el punto de inyección, hasta el primer pico.

co y se asume que en este punto un volumen de disolvente correspondiente a la columna, ha pasado por el detector.

En la figura No. 6 se muestra un cromatograma en el que se indica la forma de interpretar los parámetros de V_0 , V_1 , V'_1 , w_b y w_h .



donde:

V_0 = volumen muerto.

V_1 = volumen de retención.

V'_1 = volumen de retención corregido.

w_b = anchura de la base.

w_h = anchura medida al 50% de la altura total del pico.

Figura No. 6 Esquema de un cromatograma.

- Factor de separación.

El factor de selectividad o de separación (α) indica la capacidad que tiene la columna para separar dos o más compuestos de una mezcla al pasar por ella y es una relación de los factores de capacidad y los coeficientes de partición de los solutos; así α está definido solo por dos picos y es igual a:

$$\alpha = \frac{V_2 - V_0}{V_1 - V_0} = \frac{K'_2}{K'_1}$$

donde:

- α = Factor de separación.
- V_1 = Volumen de retención del pico 1.
- V_2 = Volumen de retención del pico 2.
- V_0 = Volumen muerto.
- K_1 = Factor de capacidad para el pico 1.
- K_2 = Factor de capacidad para el pico 2.

Si dos compuestos eluyen con $\alpha = 1.0$ cada valor de K es idéntico al otro y se observa un solo pico en el cromatograma.

- Número de platos teóricos.

El número de platos teóricos mide el ancho del pico en el sistema completo, desde el inyector hasta el detector y usualmente es medido y comparado con el estándar.

El número de platos teóricos (N) de un sistema, describe la desviación del pico en relación a su centro. Y se define como:

$$N = 16 \left(\frac{V}{W} \right)^2$$

donde:

- N = Número de platos teóricos.
- V = Volumen de retención, que también puede ser medido en términos de tiempo o distancia de retención.
- W = ancho del pico, obtenido por la extrapolación con la línea base.

El número de platos teóricos existentes, expresa la eficiencia de la columna para dar bandas estrechas. Y se calcula como:

$$\text{Eficiencia} = \sqrt{N} = \frac{4 \times V}{W}$$

donde:

- N = Número de platos teóricos.
- V = Volumen de retención (también puede estar dado en términos de tiempo (t_r) o distancia (d_r)).
- W = Amplitud de la base del pico.

La forma de interpretar en el cromatograma los parámetros necesarios para calcular el número de platos teóricos (N), se muestra en la figura No. 7.

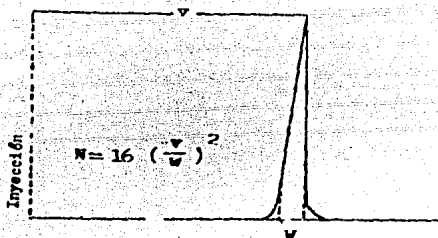


Figura No. 7. Diagrama para calcular el número de platos teóricos.

2.9 El Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia.

Si se observa un cromatógrafo de líquidos, encontramos que el instrumento está formado por varios módulos, y cada uno de ellos realiza una función propia.

Las partes más importantes de un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia son:

- 1.- Bomba
- 2.- Sistema de inyección
- 3.- Columna
- 4.- Detector
- 5.- Sistema de registro
- 6.- Integrador

El esquema correspondiente de la figura No. 8 muestra los componentes principales de un equipo de cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

1.- Bomba.

En HPLC se emplean columnas que tienen diámetros muy reducidos y están empaçadas con materiales especiales de partículas muy pequeñas, esto provoca que la fase móvil presente una resistencia elevada al flujo, por lo tanto, se requiere de una presión alta que al aplicarse al líquido lo fuerza a pasar por la columna a una velocidad satisfactoria.

Esta presión alta y satisfactoria se obtiene con una bomba movida por un motor. La bomba debe ser capaz de liberar líquido a una velocidad

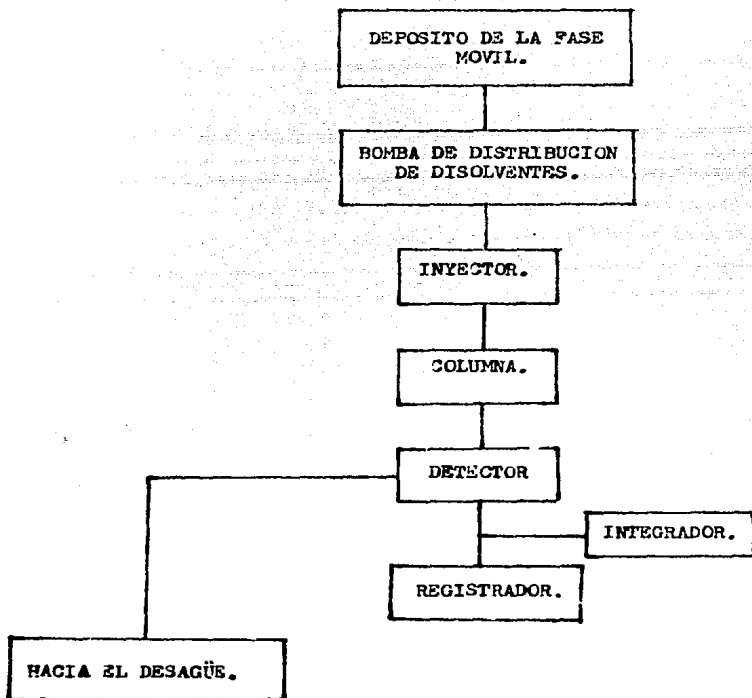


Figura No. 8. Esquema funcional de un equipo de cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.

constante sin pulsaciones. Los fabricantes usan varios métodos ingeniosos para alcanzar esta condición. Una forma consiste en introducir los cilindros y pistones programados de tal modo que uno se llene rápidamente mientras el otro se vacía en forma lenta; después este último lleva a cabo la función de llenado mientras el primero se vacía, repitiéndose el ciclo.

2.- Sistemas de inyección.

El método de introducción de la muestra es de gran importancia en HPLC. Si un dispositivo de inyección poco eficiente da lugar a una aplicación de los componentes de la muestra en forma de bandas largas y anchas, ni siquiera las mejores columnas podrán dar lugar a picos agudos.

La principal consideración a tener en cuenta en el diseño de un inyector es la necesidad de proporcionar una zona de poco volumen completamente barrida por la fase móvil, para evitar la difusión de la muestra - así como también su dilución.

A medida que la tecnología en instrumentación y columnas ofrecen equipos analíticos que proporcionan separaciones extremadamente rápidas y eficaces de cantidades de material increíblemente pequeñas, el nivel de exigencia en los sistemas de inyección aumenta enormemente. Por tanto mientras que la inyección a través de un septum históricamente ha sido el método de introducción de muestra más utilizado, los inyectores con septum están siendo sustituidos rápidamente por válvulas impelentes de inyección sin septum.

3.- Columna.

Una columna es usualmente un tubo cilíndrico, que podrá tener entre

2mm y 7mm de diámetro, y servirá para contener la fase estacionaria (empaquete) en su interior. La longitud de la columna en HPLC varía de 15 a 30cm y generalmente son de acero inoxidable.

El empaque de la columna debe conservar su configuración de forma tal, que actúe como un lecho cromatográfico, y las partículas deberán ser rígidas para poder mantener su forma, aún cuando se someta el lecho a altas presiones durante su uso.

Las dimensiones de las partículas de la fase estacionaria son muy pequeñas, a algunos de estos materiales se les llama "películas", y otros contienen fases líquidas químicamente unidas a la superficie del material. El tamaño de la partícula controla el proceso de difusión de las moléculas de la muestra hacia adentro y hacia afuera de los poros de la partícula. Conforme disminuye el tamaño de la partícula, la profundidad de los poros también disminuye y el proceso de transferencia de masa se hace más rápido, permitiendo obtener análisis rápidos sin pérdidas en la resolución.

4.- Detector.

A los detectores los podemos clasificar en dos categorías: si el detector es capaz de captar la respuesta de todos los compuestos que están emergiendo de la columna se le denomina detector no selectivo, entre estos tenemos a los detectores de índice de refracción y de ionización por flama. Si este solo capta algunos de los componentes que eluyen se conoce como detector selectivo, ejemplos de estos son: el detector de luz ultravioleta y luz visible y el de fluorescencia.

- Detector de índice de refracción.

Con este detector se miden las diferencias en los índices de refracción hasta una parte en 10^6 o más, lo que corresponde a unas cuantas partes por millón de un soluto orgánico en agua. Esto proporciona un método de detección para la cromatografía líquida no específico, cuya sensibilidad depende solamente de la diferencia considerable en la cantidad medida entre los solutos y el disolvente. La ventaja de la detección del índice de refracción es que puede emplearse con disolventes cuyas propiedades físicas (como absorción ultravioleta) interfieren con otras formas de detección. La desventaja es que no puede usarse con gradientes de elución ya que el cambio en el índice de refracción debido a la programación completa del disolvente transforma cualquier señal producida por los componentes eluidos.

- Detector de ionización por flama (DIF).

Un alambre de acero inoxidable de aproximadamente 0.1mm de diámetro sirve para transportar el efluente de la columna a través de una serie de manipulaciones. Primero se limpia el alambre y luego se oxida superficialmente al calentarlo en una corriente de aire. Se cubre con una capa delgada del líquido de la columna. El alambre mojado pasa por una pequeña estufa, en donde se evapora el disolvente, y después se mete a una estufa oxidante en donde la muestra se quema hasta CO_2 y H_2O . El producto CO_2 se transporta con H_2 y N_2 , se pasa sobre un catalizador de Ni, que lo reduce hasta CH_4 . El CH_4 se lleva directamente al DIF.

La ventaja del detector de alambre móvil es su adaptabilidad única al gradiente de elución; la desventaja consiste en que mecánicamente es

muy complejo y está propenso a un mal funcionamiento.

- Detector de luz ultravioleta y visible.

Este detector es sensible y preciso, la concentración de la muestra es inversamente proporcional a la fracción de luz transmitida a través de la celda, de acuerdo con la ley de Beer. Su funcionamiento se basa en la absorción de la luz por parte de la muestra al pasar a través de ella un haz de luz monocromática UV o VIS.

La respuesta de este detector es selectiva, sólo se detectarán los compuestos que absorban luz de longitud de onda a la que opera el detector.

El fotómetro de luz UV y VIS es relativamente insensible a los cambios de flujo o de temperatura, fácilmente se efectúan programaciones de fase móvil.

- Detector fluorométrico.

Es un detector relacionado con la absorción ultravioleta que se basa en las medidas de fluorescencia. Esta técnica es de especial importancia en las muchas aplicaciones bioquímicas de la cromatografía líquida.

Para los compuestos que presentan fluorescencia natural, así como para los que pueden convertirse en fluorescentes por simple derivatización, es el tipo de detección más simple que existe.

Los detectores de fluorescencia son los más sensibles y específicos de todos los detectores ópticos, lo cual se usa ventajosamente en la determinación de especies con fluorescencia específica en muestras complejas.

La fluorescencia tiene lugar cuando los compuestos que poseen determinados grupos funcionales específicos se excitan con energía de ciertas longitudes de onda (cortas) y emiten radiación de mayores longitudes.

Normalmente la emisión se determina en dirección perpendicular a la excitación, y naturalmente la capacidad real de fluorescencia de grupos químicos específicos es función de las longitudes de onda de la excitación y de la emisión.

5.- Registrador.

La función de un registrador es representar en un registro gráfico la señal dada por el detector. Generalmente se utilizan potenciómetros de 1 a 10 mv.

Los registradores deben ser de respuesta rápida de la pluma y velocidad variable del papel.

6.- Integrador.

Los integradores son instrumentos electrónicos, los cuales están conectados directamente a un amplificador en serie entre el registrador y el detector, contienen un acumulador numérico de información. Las unidades más complejas pueden ser programables para compensar cualquier graficador cromatográfico con anomalías en los picos de baja resolución, y pueden programarse automáticamente para corregir cada componente por un factor de corrección preseleccionado.

La función principal de los integradores es proporcionar directamente el área de los picos; sin embargo existen algunos más modernos los cuales tienen un computador el cual permite a la unidad proveer los aná-

lisis múltiples más complejos, incluyendo la habilidad para operar otros instrumentos como son los dispositivos para seleccionar los tiempos y manipular los datos obtenidos.

Entre los datos que registran, podemos mencionar: tiempo de retención, métodos de corrección de la línea base, integración de los puntos de inicio y terminación y al final del análisis proporciona un informe completo incluyendo tiempo de retención ajustado, volumen de retención y concentración individual de los componentes de la mezcla y del estándar utilizado.

PARTE EXPERIMENTAL.

III. PARTE EXPERIMENTAL.

3.1 Desarrollo del método para la cuantificación de penicilina G sódica y penicilina G procaína en un polvo para suspensión inyectable.

Material.

- probeta de 500 ml.
- 5 matraces aforados de 50 ml.
- 3 matraces E.M de 500 ml.
- Equipo de filtración por membrana (Millipore).
- Membranas de filtración para soluciones orgánicas y acuosas.

Reactivos.

- Metanol absoluto Lichrosolv (Merck).
- Agua bidestilada.
- Reactivo D₄ (fosfato de dibutilamina).
- Fosfato potásico monobásico.
- Ac fosfórico.
- Penicilina G sódica estándar.
- Penicilina G procaína estándar.
- Clorhidrato de procaína estándar.

Equipo.

- Cromatografo de Líquidos de Alta Eficiencia, Varian modelo 5000. equipado con:
 - Detector de onda variable modelo vari-chrom.

- Integrador modelo CDS 111 L.
- Graficador modelo 9176.
- Inyector Rheodyne modelo 7125.
- Columna Micropack MCH 10.

Preparación de soluciones.

- Solución de referencia externa (estándar): pesar exactamente 0.0400g de penicilina G sódica estándar en un matraz volumétrico de 50ml y añadir a este mismo 0.0200g de clorhidrato de procaína estándar disolver y llevar al aforo con una mezcla de metanol-agua (1:1).

- Solución problema: pesar exactamente 0.0600g del polvo para suspensión inyectable que contiene una mezcla de penicilina G sódica y penicilina G procaína en un matraz de 50ml, disolver y llevar al aforo con metanol-agua (1:1).

- Buffer de fosfatos: pesar 4.24g de fosfato potásico monobásico en un matraz volumétrico de 500ml y llevar al aforo con agua bidestilada.

Condiciones de trabajo.

Las muestras se analizaron en el cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia bajo las siguientes condiciones:

- Fase móvil: Metanol-buffer de fosfatos (1:1), más reactivo D_4^* , pH final: 6.4
- Velocidad de flujo: 1.5 ml/min.

- Velocidad de carta: 1 cm/min.
- Sensibilidad: 0.1 a.u.s.
- Longitud de onda: 230 nm
- Volumen de inyección: 20 μ l

* la concentración del reactivo D_4 utilizada en la fase móvil es de 1.5 ml por cada 100 ml de buffer.

RESULTADOS.

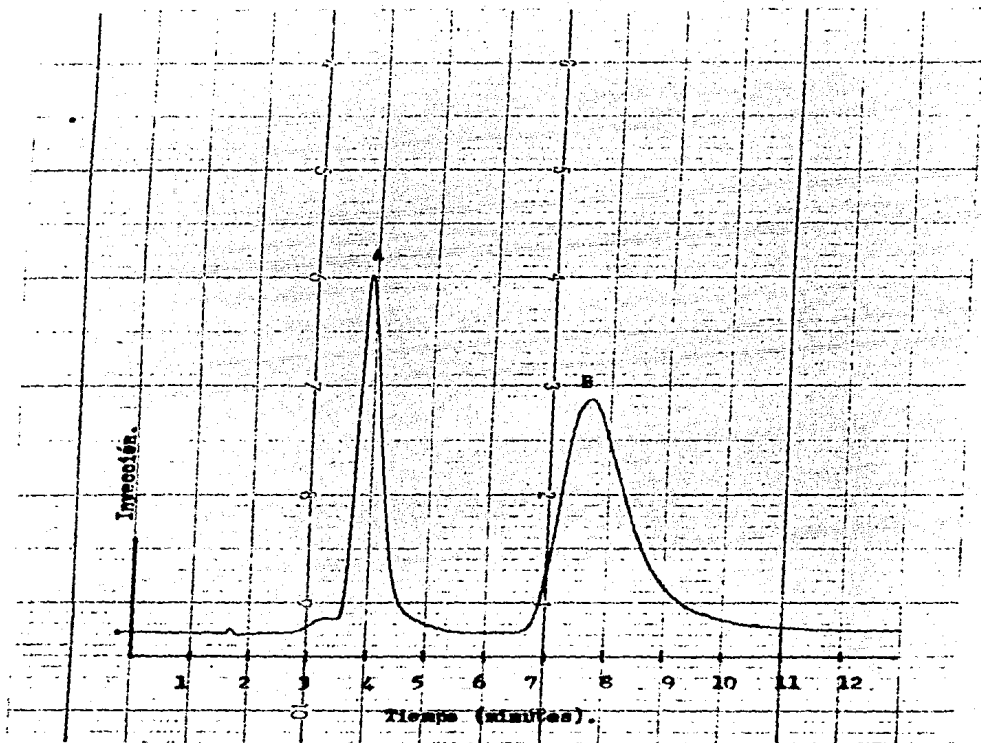
IV. RESULTADOS .

4.1 Especificidad del método analítico.

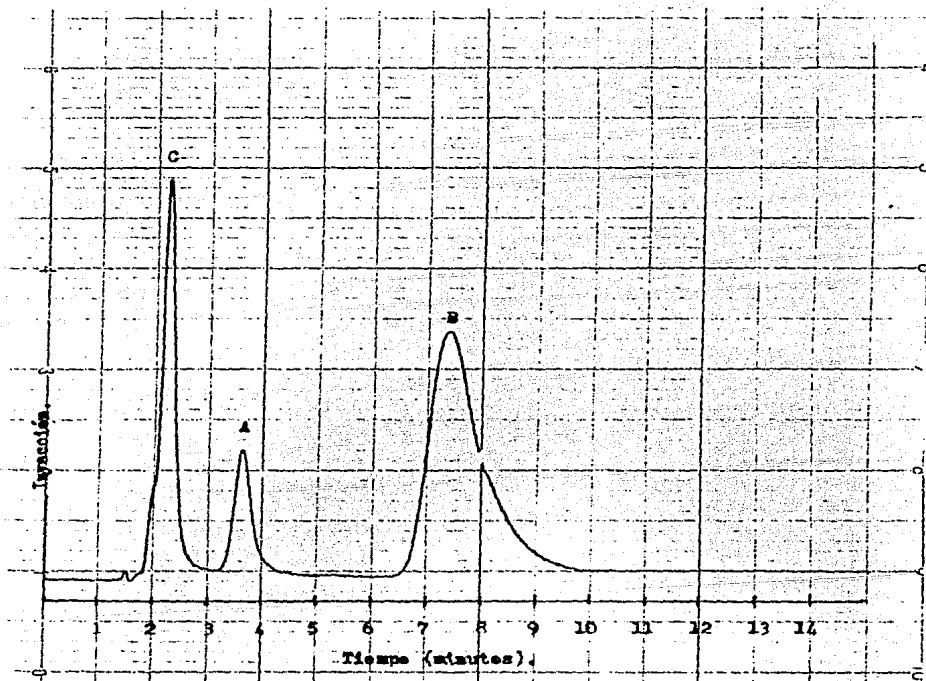
En los cromatogramas correspondientes al análisis de la solución estándar y problema que consistían en una mezcla de penicilina G sódica y penicilina G procaína, se observa que no existe sustancia ajena que interfiriera en los tiempos de retención de los componentes de importancia para la suantificación.

Al sometiéndolo las soluciones a degradación en medio ácido, básico y oxidante, los productos de esta degradación formados, tuvieron tiempos de retención distintos a las sustancias de interés, indicando con esto que el método de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia bajo las condiciones ideales de análisis para penicilina G y procaína es específico.

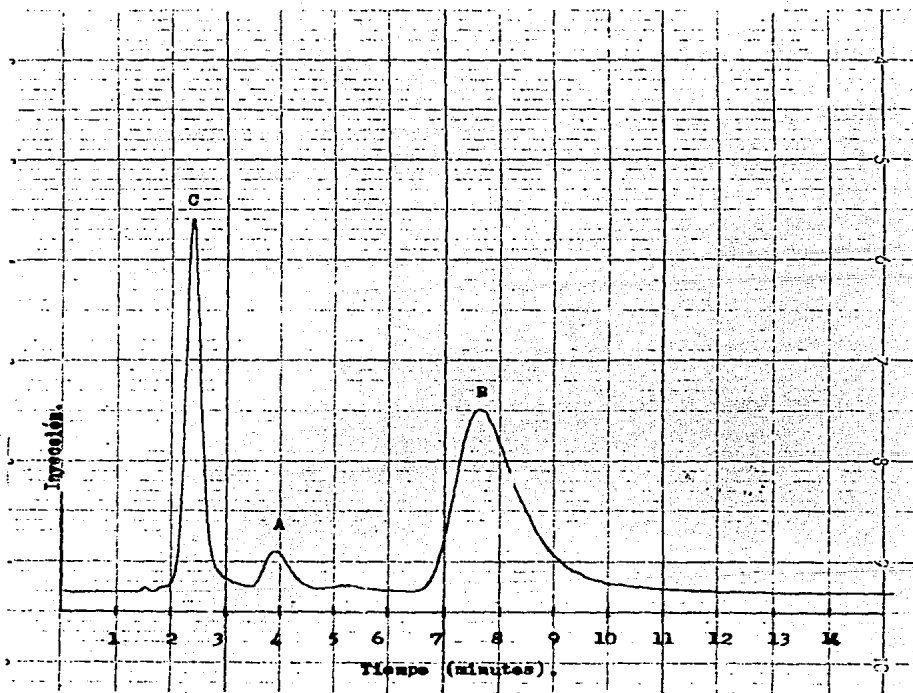
En los cromatogramas 1, 2, 3, 4, 5, 6, y 7 se muestran los resultados obtenidos para determinar la especificidad del método de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia para penicilina G y procaína.



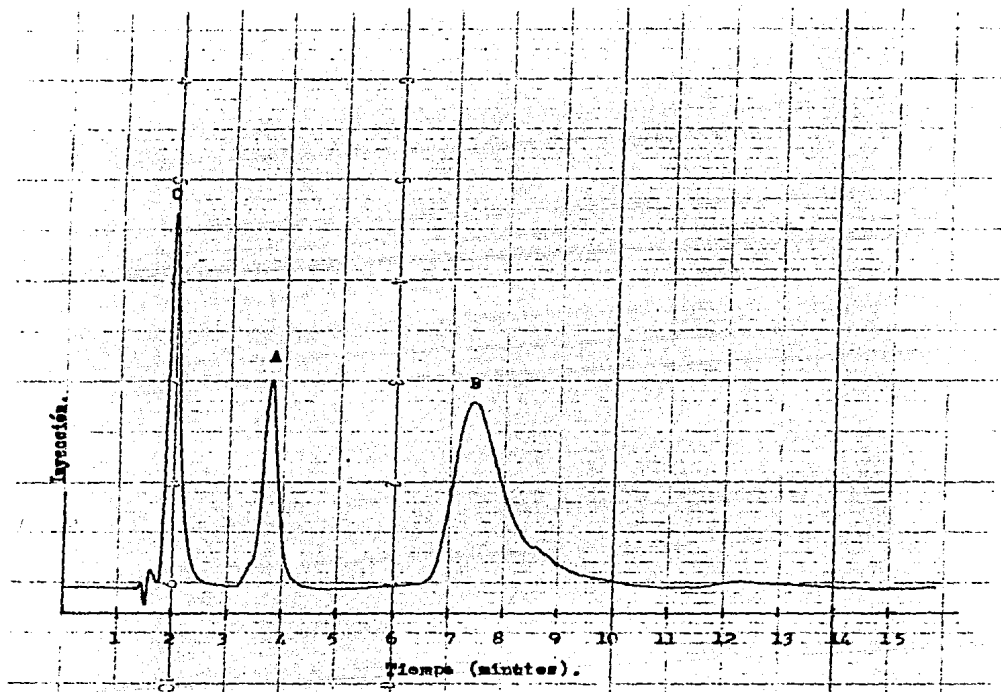
CROMATOGRAMA No. 1. Este cromatograma muestra el efecto de los solar durante 30 días, en el polvo que con tenía una mezcla de penicilina G sódica y penicilina G procaína. A) Penicilina G con un tiempo de retención de 3.9 minutos. B)- Procaína con un tiempo de retención de 7.7 minutos.



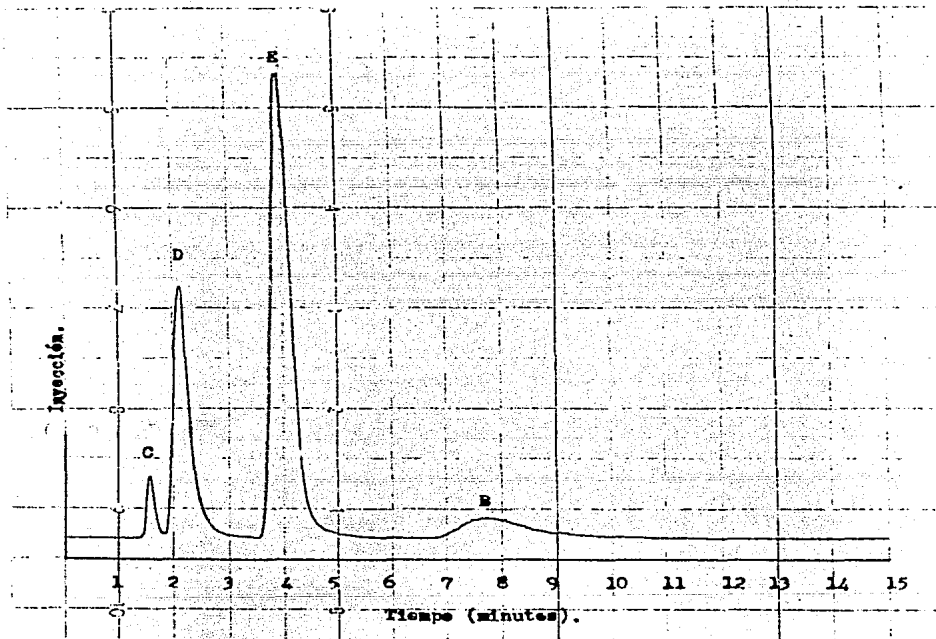
CRONATOGRAMA No. 2. En este cronatograma se muestra la degradación en medio ácido (pH= 2), en un tiempo de reacción de 2 hrs. A) Penicilina G con un tiempo de retención de 3.7 minutos. B) Procaína con un tiempo de retención de 7.5 minutos. C) Producto de degradación con un tiempo de retención de 2.2 minutos.



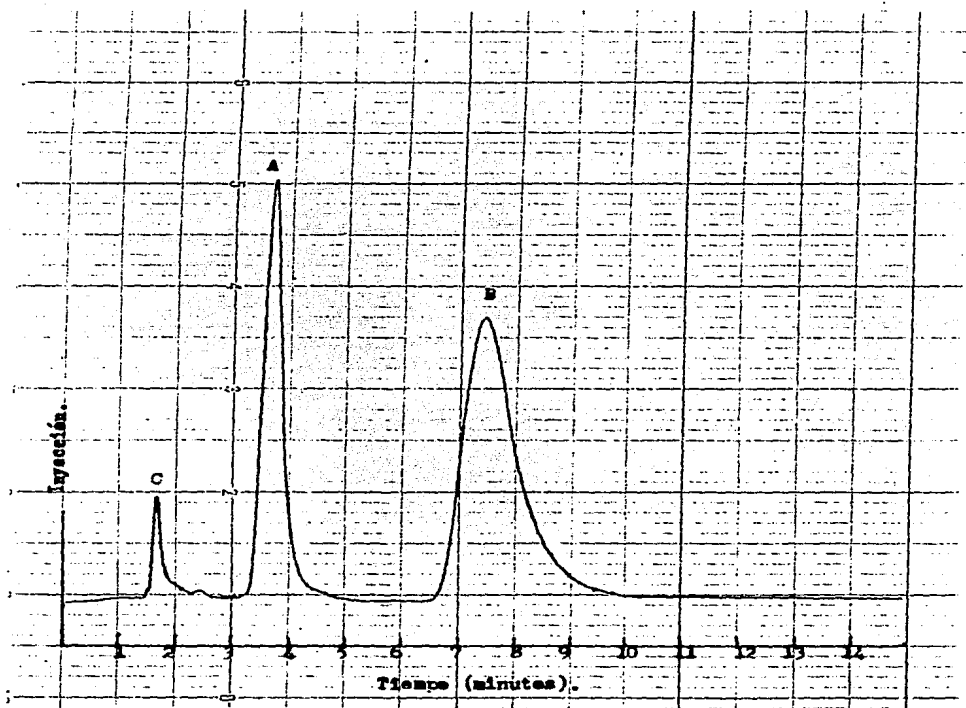
CHROMATOGRAMA No. 3. Aquí se muestra la degradación en medio ácido (pH = 2) en un tiempo de reacción de 24 hrs. A) Penicilina G con un tiempo de retención de 3.9 minutos. B) Procaina con un tiempo de retención de 7.7 minutos. C) Producto de degradación con un tiempo de retención de 2.3 minutos.



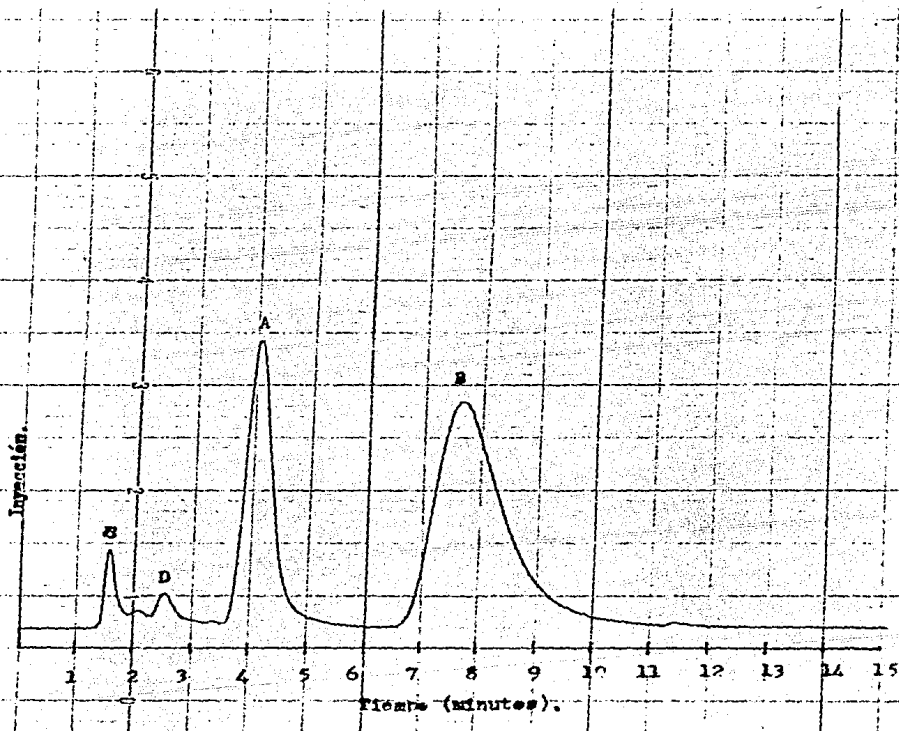
CROMATOGRAMA No. 4. Este cromatograma muestra la degradación alcalina ($\text{pH} = 12$) de una mezcla de penicilina G sódica y penicilina G procaína, en un tiempo de reacción de 2 hrs. A) Penicilina G con un tiempo de retención de 3.7 minutos. B) Procaína con un tiempo de retención de 7.5 minutos. C) Producto de degradación con un tiempo de retención de 2.0 minutos.



CROMATOGRAMA No. 5. Este cromatograma muestra la degradación alcalina (pH= 12), de la mezcla de penicilina G sódica y penicilina G procaína, en un tiempo de reacción de 24 hrs. Nótese que la penicilina G y procaína fueron degradadas totalmente. C,D y E) Productos de degradación alcalina. B) procaína.



CROMATOGRAMA No. 6. En este cromatograma se muestra la degradación en medio oxidante de la mezcla de penicilina G sódica y penicilina G procaína, en un tiempo de reacción de 2 hrs. Como se puede observar, aún no se detecta ningún producto de degradación. A) Penicilina G con un tiempo de retención de 3.7 minutos. B) Procaína con un tiempo de retención de 7.5 minutos. C) H_2O_2 con un tiempo de retención de 1.7 minutos.



CROMATOGRAMA No. 7. Cromatograma que presenta la degradación en medio oxidante, con un tiempo de reacción de 24 hrs. A) Penicilina G con un tiempo de retención de 4.0 minutos. B) - Procaína con un tiempo de retención de 7.7 minutos. C) H_2O_2 con un tiempo de retención de 1.5 minutos. y D) Producto de degradación con un tiempo de retención de 2.5 minutos.

4.2 Validación estadística del método analítico.

Para que un método se considere estadísticamente válido, se deben establecer criterios estadísticos para evaluar la exactitud, linealidad y precisión del método analítico.

Penicilina G sódica.

a) Exactitud.

Se prepararon 10 soluciones de penicilina G sódica y se analizaron dentro de las condiciones ideales del método. Los resultados se enlistan en la tabla No. 1.

TABLA No. 1. Evaluación estadística del método para la determinación de penicilina G sódica por RPLC.

| mg. agregados. | mg. recuperados. | % de recuperación. |
|----------------|------------------|--------------------|
| 40.0 | 40.0 | 100.0 |
| 40.0 | 39.6 | 99.1 |
| 40.0 | 40.1 | 100.2 |
| 40.0 | 40.3 | 100.7 |
| 40.0 | 40.1 | 100.2 |
| 40.0 | 39.5 | 98.6 |
| 40.0 | 40.5 | 101.3 |
| 40.0 | 39.7 | 99.4 |
| 40.0 | 39.8 | 99.6 |
| 40.0 | 39.2 | 97.9 |

Media \bar{X} = 99.709

Desviación estándar S = 0.9492

Varianza S^2 = 0.9009

Error estándar E.S = 0.30016

Intervalo de confianza I.C = 0.67837

Límite de confianza L.C = 99.0306 - 100.3873

$T_{teo} = 12.26??$ para un nivel de significancia de 0.05 y 9 grados libertad.

$T_{exp} = - 0.96\%$.

Debido a que T experimental es menor que T teórica, se concluye que el método es exacto para penicilina G sódica por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.

b) Linealidad.

Para demostrar que este método analítico es lineal para penicilina G sódica, se prepararon 3 soluciones de cada una de las 5 diferentes concentraciones y se analizaron según el método. Los resultados se presentan en la tabla No. 2 y la grafica No. 1.

TABLA No. 2. Resultados promedio de tres mediciones de cada concentración, obtenidos para la linealidad de penicilina G sódica por HPLC.

| mg. agregados (X) | mg. recuperados (Y) | % de recuperación |
|----------------------|------------------------|-------------------|
| 20.0 | 20.5 | 102.3 |
| 30.0 | 30.5 | 101.6 |
| 40.0 | 39.5 | 98.7 |
| 50.0 | 50.1 | 100.3 |
| 60.0 | 59.9 | 99.9 |

$$\bar{Y} = 40.1$$

$$\bar{X} = 40$$

$$S_x = 14.1421$$

$$S_y = 13.9448$$

$$\text{Intercepto a la ordenada } a = 0.668$$

$$\text{pendiente } b = 0.9858$$

$$\text{Coeficiente de correlación } r = 0.9997$$

Inferencia acerca de a .

$T_{\text{teo}} = \pm 2.35$ para un nivel de significancia de 0.05 y 3 grados de libertad.

$$T_{\text{exp}} = 1.22$$

Debido a que T experimental es menor que T teórica se concluye que $a = 0$

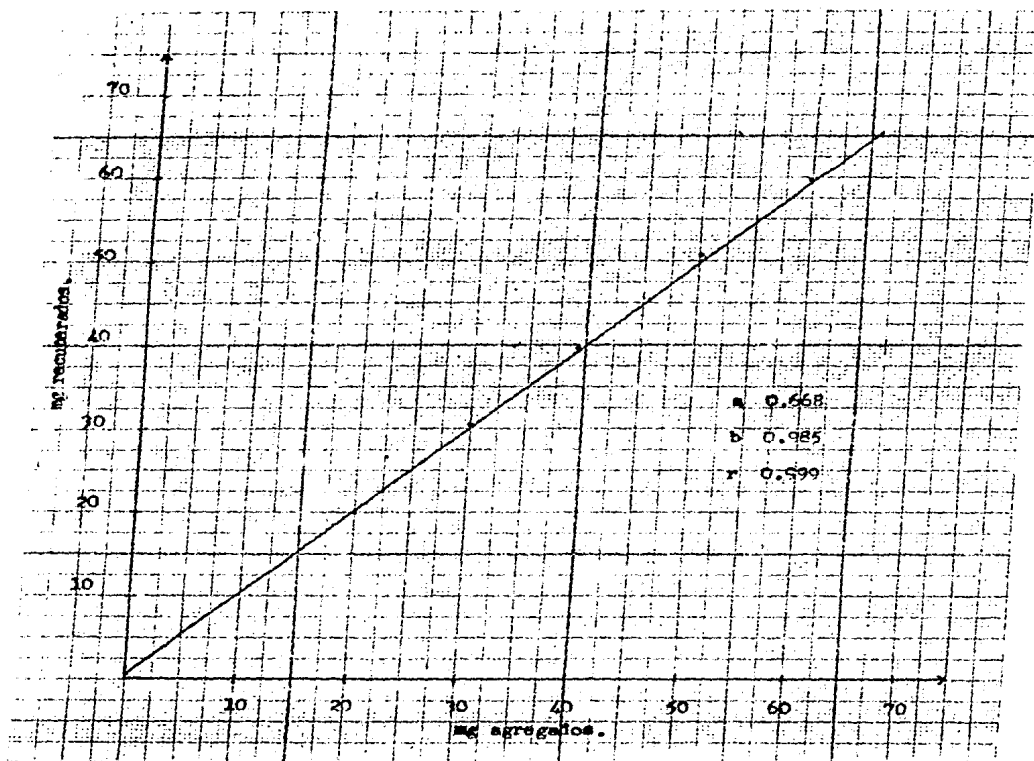
Inferencia acerca de b .

$T_{\text{teo}} = \pm 2.35$ para un nivel de significancia de 0.05 y 3 grados de libertad.

$$T_{\text{exp}} = -1.27$$

Debido a que T experimental es menor que T teórica se concluye que $b = 1$.

Debido a que el valor obtenido de k' es muy cercano a uno y el valor de α muy cercano a cero, se concluye que el método es lineal para penicilina G sódica por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.



GRAFICA No. 1. Linealidad del método de Cromatografía de líquidos de Alta Eficiencia para penicilina G.

c) Precisión (reproducibilidad).

Dos analistas realizaron estas pruebas, haciendo cada uno tres análisis del mismo lote en dos días. Los resultados se presentan en la tabla No. 3 y tabla No. 4.

TABLA No. 3. Resultados obtenidos en el estudio del efecto de analista y día para la reproducibilidad.

| A N A L I S T A. | | |
|------------------|----------|----------|
| | 1(j = 1) | 2(j = 2) |
| | 100.02 | 100.93 |
| 1(i = 1) | 98.48 | 99.91 |
| | 101.27 | 101.54 |
| D I A | | |
| | 100.30 | 99.74 |
| 2(i = 2) | 99.0 | 101.51 |
| | 100.37 | 101.84 |

Modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + D_i + A_j + DA_{ij} + \epsilon_k(1ij)$$

donde:

D_i = día i -ésimo

A_j = analista j -ésimo

DA_{ij} = interacción día-analista al nivel j y al nivel i .

$\epsilon_k(1ij)$ = error experimental.

TABLA No. 4 Esperanzas Medias Cuadradas.

| Fuente de variación. | Grados de libertad. | Sumatoria de cuadrados. | Media cuadrada. | F calc. | F teo. |
|-----------------------------------|---------------------|-------------------------|-----------------|---------|--------|
| D _i | 1 | 215.25 | 215.25 | -0.0143 | 5.32 |
| A _j | 1 | 202.41 | 202.41 | -0.0134 | 5.32 |
| DA _{ij} | 1 | 216.06 | 216.06 | -0.0143 | 5.32 |
| E _k (11 _j) | 8 | -120181.23 | -15022.654 | | |

Debido a que el valor de F calculada es menor que F teórica, se define que no existe ningún efecto de algunas de las fuentes de variación en la determinación de penicilina G por Cromatografía de líquidos de Alta Eficiencia.

Clorhidrato de procaína.

a) Exactitud.

Se analizaron 10 muestras a una concentración dada, bajo las condiciones óptimas del método. Los resultados se enlistan en la tabla No. 5.

TABLA No. 5. Evaluación estadística del método para la determinación de Clorhidrato de procaína por HPLC.

| mg. agregados. | mg. recuperados. | % de recuperación. |
|----------------|------------------|--------------------|
| 20.0 | 20.1 | 100.6 |
| 20.0 | 19.7 | 98.5 |
| 20.0 | 20.4 | 101.9 |
| 20.0 | 20.2 | 101.0 |
| 20.0 | 19.8 | 99.0 |
| 20.0 | 20.2 | 100.9 |
| 20.0 | 20.0 | 99.9 |
| 20.0 | 19.7 | 98.3 |
| 20.0 | 19.8 | 98.9 |
| 20.0 | 20.3 | 101.7 |

Media $\bar{X} = 100.087$

Desviación estándar $S = 1.2681$

Varianza $S^2 = 1.6082$

Error estándar $E.S = 0.4010$

Intervalo de confianza $I.C = 0.9063$

Límite de confianza $L.C = 99.1806 - 100.9933$

$T_{tso} = \pm 2.2622$ para un nivel de significancia de 0.05 y 9 gdos de libertad.

$T_{exp} = 0.2169.$

Debido a que T experimental es menor que T teórica, se concluye que el método es exacto para clorhidrato de procaína por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.

b) Linealidad.

Para demostrar que este método de análisis es lineal para clorhidrato de procaina, se analizaron 3 soluciones de cada una de las 5 diferentes concentraciones preparadas. Los resultados se muestran en la tabla No. 6 y la grafica No. 2.

TABLA No. 6. Resultados promedio de tres mediciones de cada concentración, obtenidos para la linealidad de clorhidrato de procaina por HPLC.

| mg. agregados. (X) | mg. recuperados. (Y) | % de recuperación. |
|-----------------------|-------------------------|--------------------|
| 10.0 | 10.2 | 102.2 |
| 15.0 | 15.2 | 101.7 |
| 20.0 | 20.1 | 100.6 |
| 25.0 | 25.1 | 100.2 |
| 30.0 | 30.4 | 104.6 |

$$\bar{Y} = 20.404$$

$$\bar{X} = 20.0$$

$$S_x = 7.0710$$

$$S_y = 7.3795$$

$$\text{Intercepto a la ordenada } a = -0.44$$

$$\text{pendiente } b = 1.0422$$

$$\text{Coeficiente de correlación } r = 0.9986$$

Inferencia acerca de a .

$T_{teo} = \pm 2.35$ para un nivel de significancia de 0.05 y 3 grados de libertad.

$$T_{exp} = -0.65$$

Debido a que T experimental es menor que T teórica se concluye que $a = 0$

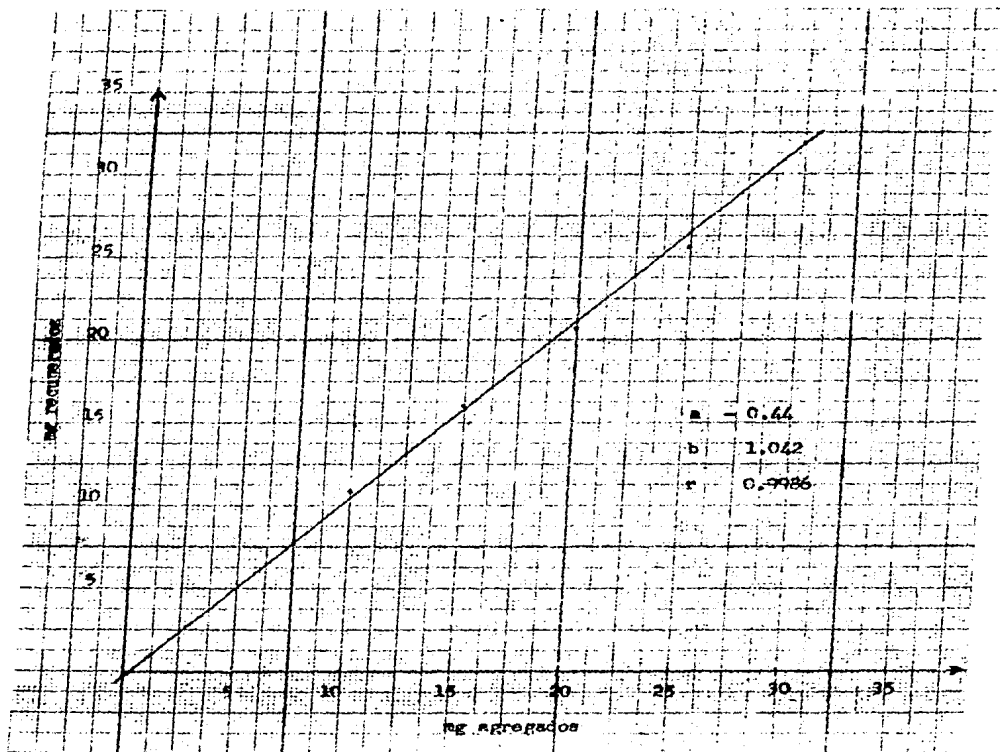
Inferencia acerca de b .

$T_{teo} = \pm 2.35$ para un nivel de significancia de 0.05 y 3 grados de libertad.

$$T_{exp} = -1.27$$

Debido a que T experimental es menor que T teórica se concluye que $b = 1$.

Debido a que el valor obtenido de b es muy cercano a uno y el valor de a muy cercano a cero, se concluye que el método es lineal para clorhidrato de cocaína por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.



GRAFICA No. 2. Linearidad del método de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia para cocaína.

c) Precisión (reproducibilidad).

Dos analistas realizarán estas pruebas, haciendo cada uno tres análisis del mismo lote en dos días. Los resultados se presentan en la tabla No. 7 y tabla No. 8.

TABLA No. 7. Resultados obtenidos en el estudio del efecto de-analista y día para la reproducibilidad.

| A N A L I S T A . | | |
|-------------------|----------|----------|
| | 1(j = 1) | 2(j = 2) |
| | 100.39 | 100.58 |
| 1(i = 1) | 99.48 | 98.99 |
| | 102.33 | 101.21 |
| D I A | | |
| | 100.01 | 101.79 |
| 2(i = 2) | 100.72 | 99.76 |
| | 98.86 | 100.25 |

Modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + D_i + A_j + DA_{ij} + \epsilon_k(1ij)$$

donde:

D_i = día i -ésimo

A_j = analista j -ésimo

DA_{ij} = interacción día-analista al nivel j y al nivel i .

$\epsilon_k(1ij)$ = error experimental.

TARLA No. 8. Esperanzas Medias Cuadradas.

| Fuente de variación. | Grados de libertad. | Sumatoria de cuadrados. | Media cuadrada. | F cal. | F teo. |
|----------------------|---------------------|-------------------------|-----------------|-----------------------|--------|
| D _i | 1 | - 12.01 | - 12.01 | 8.02×10^{-4} | 5.32 |
| A _j | 1 | - 0.16 | - 0.16 | 1.06×10^{-5} | 5.32 |
| DA _{ij} | 1 | 13.32 | 13.32 | -8.9×10^{-4} | 5.32 |
| Ex(11j) | 8 | -119672.58 | -14959.073 | | |

Debido a que el valor de F calculada es menor que F teorica, se define que no existe ningún efecto de algunas de las fuentes de variación en la determinación de clorhidrato de procaína por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.

4.3 Cálculos para la cuantificación.

- Para obtener los mg de procaína:

$$(a/b) (50 C_1) (A. problema/A. estándar) = \text{mg de procaína.}$$

donde:

a = peso molecular de procaína base.

b = peso molecular de clorhidrato de procaína.

C₁ = concentración del estándar de procaína (mg/ml).

A = área del pico correspondiente a procaína.

- Para obtener los mg totales de penicilina G.

$$(50 C_2) (A. problema/A. estándar) = \text{mg de penicilina G.}$$

donde:

C₂ = concentración del estándar de penicilina G sódica (mg/ml).

A = área de los picos correspondientes a penicilina G, tanto del problema como del estándar.

- Para obtener los mg de penicilina G correspondientes a la sal procaína:

$$(c/d) (\text{mg de procaína}) = \text{mg de penicilina G correspondientes a la sal procaína.}$$

donde:

c = peso molecular de penicilina G.

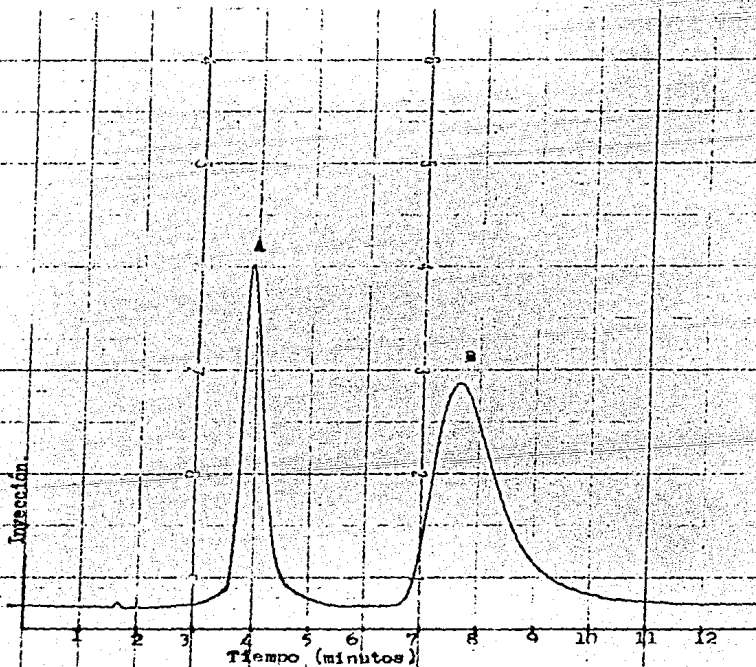
d = peso molecular de procaína base.

- Para obtener mg de penicilina G sódica:

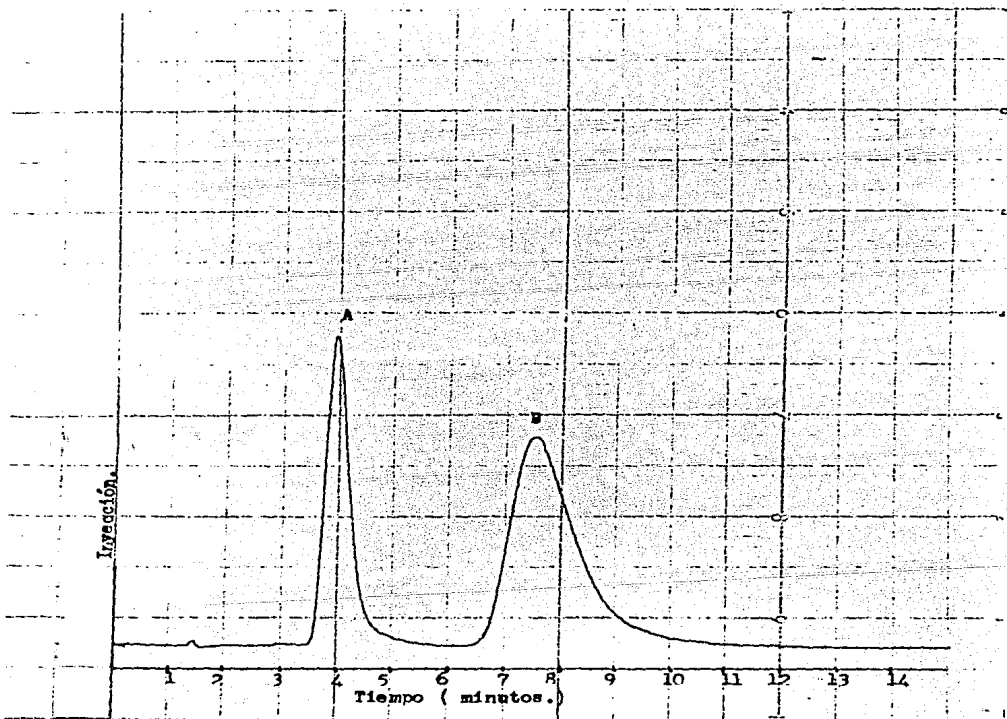
$$\text{mg de penicilina G total} - \text{mg penicilina G correspondientes a la sal procaína.} = \text{mg de penicilina G sódica.}$$

4.4 Descripción de los cromatogramas.

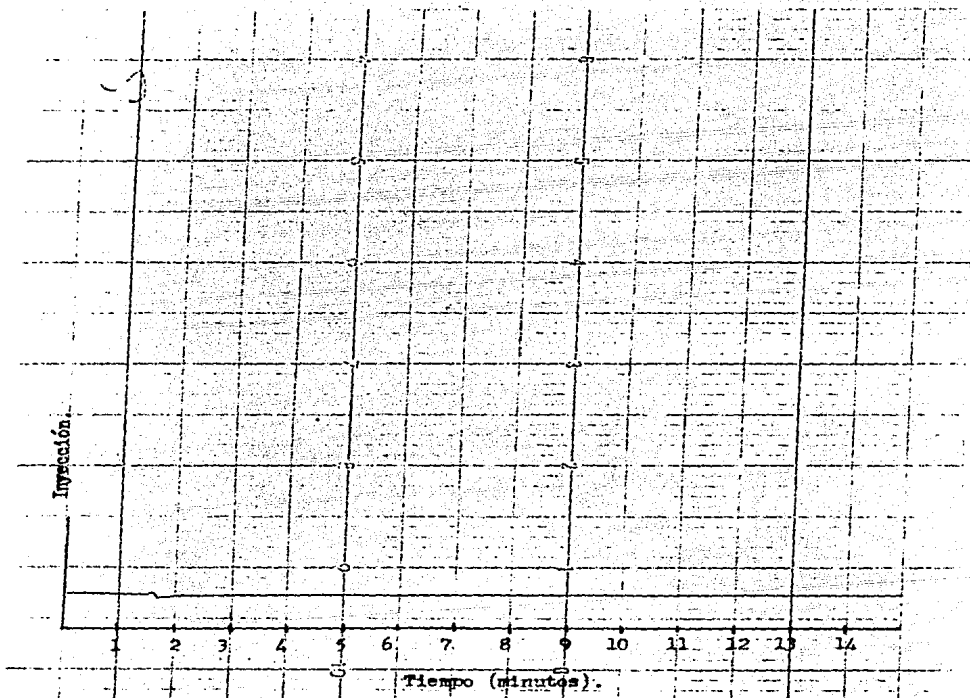
Luego de haber alcanzado las condiciones experimentales óptimas, y de haber efectuado diversas pruebas preliminares, se obtuvo los resultados siguientes expresados en los cromatogramas 8, 9 y 10.



CROMATOGRAMA No. 8. Este cromatograma corresponde a la solución utilizada como estándar externo. A) Penicilina G con un tiempo de retención de 3.9 minutos. B) Procaína con un tiempo de retención de 7.7 minutos.



CROMATOGRAMA No. 9. Cromatograma que representa la solución problema analizada. A) Penicilina G con un tiempo de retención de 3.9 minutos. B) Procaína con un tiempo de retención de 7.7 minutos.



CROMATOGRAMA No. 10. Este cromatograma representa a la solución utilizada como fase móvil. Como se puede observar no hay ninguna interferencia de esta con los picos de interés.

C O N C L U S I O N E S .

IV. C O N C L U S I O N E S .

La Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia permitió llevar a cabo la cuantificación de dos sales distintas de penicilina G (sal sódica y sal procaína) ambas mezcladas para una suspensión inyectable, en forma exacta, precisa, reproducible y específica.

Por los resultados obtenidos en este trabajo, se puede observar que la HPLC al permitir una determinación cuantitativa de penicilina G sódica y penicilina G procaína en forma rápida y sencilla, fácilmente se pueden reemplazar técnicas volumétricas y gravimétricas que por ser laboriosas se invierte un mayor tiempo de análisis.

El contar con un equipo de HPLC, personal capacitado para el manejo de este, la facilidad de implementación de la técnica analítica y bajo costo de los disolventes utilizados, fueron los requisitos fundamentales para lograr este trabajo.

La identificación de productos de degradación de la penicilina G se puede llevar a cabo en forma específica, aunque el único inconveniente sería conseguir los estándares de estos productos que no son de fácil adquisición.

Este método analítico se puede emplear para el control de calidad de este producto inyectable, con un ahorro considerable, tanto de tiempo como de costo de los reactivos utilizados en el análisis, ya que por ejemplo comparando las condiciones de trabajo reportadas hasta la fecha, para cuantificar penicilina G por HPLC, se utiliza como fase móvil di--

solventes costosos como el acetonitrilo. En cambio en las condiciones logradas en este trabajo, la fase móvil consistió en metanol absoluto grado reactivo analítico, que tiene un costo casi cuatro veces menor al del acetonitrilo.

BIBLIOGRAFIA.

VI. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Blaha J, Knevel A and Hem S. J., Pharm Sci., 54, 1384 (1975).
- 2.- Blaha J, Knevel A, Kessler D, Mincy J and Hem S. J., Pharm Sci., 65, 1165 (1976).
- 3.- Code of federal regulations.
V. 21, Parts 300 to 499
Off of the Fed. Reg. Nat. ARCH
1984.
- 4.- Connors K.
A Textbook of Pharmaceutical Analysis.
Interscience Publication 2nd ed. New York, 1975.
- 5.- Ewing G.W
Métodos Instrumentales de Análisis Químicos.
Mc. Graw Hill. New York, 1978.
- 6.- Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos.
4a. ed. Ed. de la Secretaria de Salubridad y Asistencia, México 1974.
- 7.- The United States Pharmacopeia, USP XXI
Washington, 1985.
- 8.- Flynn E. H.
Cephalosporins and Penicillins.
Academic Press. New York, 1972.

- 9.- Fritz J.S
Química Analítica Cuantitativa.
3a ed. Limusa. México, 1979.
- 10.- Ghebre I, Knevel A and Ham S. J., Pharm Sci., 71, 351 (1982).
- 11.- Goodman L and Gilman A.
Bases Farmacológicas de la Terapéutica.
5a. ed. Interamericana, México 1978.
- 12.- Hsieh C, Mays D and Garofalo M., Analytical Chemistry., 43, 1530(1971).
- 13.- How J and Poole J., Journal of Pharmaceutical Sciences., 60, 503(1971).
- 14.- Kiyoshi Tsuji.
GLC & HPLC. Determination of Therapeutic Agents.
Marcel Dekker. Inc, N.Y. 1978.
- 15.- Mc. Nair, Harold M.
Cromatografía de Gases.
Washington., OEA 1981.
- 16.- Margois M., Chromatographic Science., 12, 549(1974).
- 17.- Martindale The Extra Pharmacopeia.
28th ed., The Pharmaceutical Press., London 1982.
- 18.- Remington's Pharmaceutical Sciences.
16th ed. Mack Publishing Corporation, Easton, Pennsylvania, 1980.

- 19.- Roy T. and Szimal S., *Chromatographic Science.*, 14, 580 (1976).
- 20.- Schwartz M., *Journal of Pharmaceutical Sciences.*, 58, 643 (1969).
- 21.- Snyder L. and Kirkland J.
Introduction to Modern Liquid Chromatography.
2nd ed., John Wiley and sons, Inc., N.Y 1979.
- 22.- Storch de Gracia y Asensio.
Fundamentos de la Cromatografía de Gases.
2nd ed., Alhambra. Madrid 1975.
- 23.- The Merck Index; 9th edition., Merck Co., Inc., New Jersey, 1976.
- 24.- Vadino W, Sugita E, Schneare R, Ando H and Niebergall P., *J. Pharm. Sci.*, 68, 1316 (1979).
- 25.- Waters Associates.
Escuela de Cromatografía Líquida.
USA, 1982.
- 26.- Wayne W.
Bioestadística Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud.
Ed. Limusa, México 1982.
- 27.- Yost R.
Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica.
Perkin Elmer, USA, 1981.