

00565 / 29'



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Desarrollo de Metodología Analítica para la
Determinación de la Cianocobalamina en
preparaciones Polivitamínicas por Cromato-
grafía de Líquidos de Alta Resolución.

T E S I S

Que para obtener el Grado de:
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
(FARMACIA - CONTROL DE MEDICAMENTOS)

P r e s e n t a :

Biol. Martha Patricia García Camacho

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 GENERAL

I. Introducción.....	1
II. Generalidades.....	4
II.1. Las vitaminas hidrosolubles	4
II.2. La vitamina B12.....	7
II.2.1. Características generales.....	7
II.2.2. Preparaciones, dosificación y administración.....	8
II.2.3. Estructura de la cianocobalamina.....	8
II.2.4. Propiedades generales de la cianocobalamina.....	10
II.3. Aspectos fundamentales de la cromatografía de líquidos..	15
II.3.1. Introducción	15
II.3.2. Tamaño de muestra y eficiencia de las columnas.....	18
II.3.3. Control de la separación.....	20
II.3.4. Gradiente de elución.....	24
II.3.5. Cromatografía en fases químicamente unidas.....	27
II.3.6. Cromatografía de pares de iones.....	29
II.4. Antecedentes.....	34
II.4.1. Análisis de vitaminas hidrosolubles por cromatografía de fase inversa y por cromatografía de pares de iones.....	34
III. Experimentación	38
III.1. Reactivos y aparatos.....	38
III.2. Procedimiento para el método de análisis por cromatografía en fase inversa.....	39
III.2.1. Optimización de las condiciones experimentales.....	39
III.2.2. Condiciones cromatográficas.....	40
III.2.3. Linealidad y precisión del sistema.....	40
III.2.4. Preparación y análisis de la muestra.....	41
III.2.5. Linealidad y exactitud del método.....	44
III.2.6. Precisión del método.....	44
III.2.7. Estabilidad de la muestra.....	44
III.2.8. Especificidad en análisis de estabilidad.....	44

III.3 Procedimiento para el método de análisis por cromatografía de pares de iones.....	45
III.3.1. Condiciones cromatográficas.....	45
III.3.2. Linealidad del sistema.....	47
III.3.3. Linealidad, precisión y exactitud del método.....	47
III.3.4. Especificidad en análisis de estabilidad.....	48
IV. Resultados y Discusión.....	49
IV.1. Método por cromatografía en fase inversa.....	49
IV.1.1. Influencia de la temperatura y el porcentaje de metanolen la retención de las vitaminas.....	49
IV.1.2. Determinación de la longitud de onda óptima para la detección.....	54
IV.1.3. Linealidad y precisión del sistema.....	58
IV.1.4. Linealidad y exactitud del método. Contenido de cianocobalamina en el producto comercial.....	61
IV.1.5. Concentración mínima detectable.....	68
IV.1.6. Precisión del método.....	69
IV.1.7. Estabilidad de la muestra.....	72
IV.1.8. Especificidad en análisis de estabilidad.....	73
IV.2. Método por cromatografía de pares de iones.....	77
IV.2.1. Linealidad y precisión del sistema.....	77
IV.2.2. Linealidad, exactitud y precisión del método.....	81
IV.2.3. Concentración mínima detectable.....	84
IV.2.4. Especificidad en análisis de estabilidad.....	85
V. Conclusiones.....	92
VI. Bibliografía.....	94
VII. Apéndice	97

INDICE DE FIGURAS

2.1. Estructura de la cianocobalamina	9
2.2. Espectro de absorción de la cianocobalamina	13
2.3. Capacidad lineal en cromatografía líquida	19
2.4. Ilustración de la migración de las bandas en un gradiente de elución	26
3.1. Preparación de la muestra para el método por cromatografía en fase inversa	43
4.1. Efecto de la temperatura sobre la retención de las vitaminas del complejo B	51
4.2. Efecto de la composición de la fase móvil sobre la retención de las vitaminas del complejo B	53
4.3. Espectro de absorción de la cianocobalamina en una mezcla metanol/disolución acuosa de acetato de amonio 0.05 M en una proporción 20/80	55
4.4. Solución estándar de cianocobalamina	57
4.5. Análisis de un comprimido	57
4.6. Linealidad del sistema en el análisis de la cianocobalamina por cromatografía en fase inversa	59
4.7. Curva de adiciones patrón para el análisis de la cianocobalamina por cromatografía en fase inversa	63
4.8. Linealidad del método de análisis de la cianocobalamina por cromatografía en fase inversa	66
4.9. Piridoxina después de exposición a la luz solar. Método por cromatografía en fase inversa	74
4.10. Riboflavina después de exposición a la luz solar. Método por cromatografía en fase inversa	74
4.11. Acido fólico después de exposición a la luz solar. Método por cromatografía en fase inversa	75
4.12. Fosfato de riboflavina después de exposición a la luz solar. Método por cromatografía en fase inversa	75
4.13. Cianocobalamina después de exposición a la luz solar. Método por cromatografía en fase inversa	76

4.14. Mezcla de vitaminas hidrosolubles	78
4.15. Linealidad del sistema para el análisis de la cianocobalamina por cromatografía de pares de iones	80
4.16. Linealidad del método para el análisis de la cianocobalamina por cromatografía de pares de iones	83
4.17. Cianocobalamina después de exposición a la luz solar. Método por cromatografía de pares de iones	86
4.18. Niacinamida después de exposición a la luz solar. Método por cromatografía de pares de iones	87
4.19. Piridoxina después de exposición a la luz solar. Método por cromatografía de pares de iones	88
4.20. Riboflavina después de exposición a la luz solar. Método por cromatografía de pares de iones	89
4.21. Acido fólico después de exposición a la luz solar. Método por cromatografía de pares de iones	90
4.22. Tiamina después de exposición a la luz solar. Método por cromatografía de pares de iones	91

INDICE DE TABLAS

2.1. Resumen de los efectos de las diferentes variables sobre el k' y la selectividad en cromatografía de pares de iones.	33
4.1. Influencia de la temperatura en el tiempo de retención relativo de las vitaminas del complejo B	50
4.2. Influencia del porcentaje de metanol de la fase móvil en el tiempo de retención relativo de las vitaminas del complejo B	52
4.3. Linealidad del sistema en el análisis de la cianocobalamina por cromatografía en fase inversa	58
4.4. Precisión del sistema en el análisis de la cianocobalamina por cromatografía en fase inversa	60
4.5. Adiciones patrón para el análisis de la cianocobalamina por cromatografía en fase inversa	62
4.6. Linealidad del método de análisis de la cianocobalamina por cromatografía en fase inversa	65
4.7. Exactitud del método de análisis de la cianocobalamina por cromatografía en fase inversa	67
4.8. Repetibilidad del método de análisis de la cianocobalamina por cromatografía en fase inversa	69
4.9. Datos de la reproducibilidad del método de análisis de la cianocobalamina por cromatografía en fase inversa	70
4.10. Análisis de varianza para la reproducibilidad del método de análisis de la cianocobalamina por cromatografía en fase inversa	71
4.11. Estabilidad de la muestra en el análisis de la cianocobalamina por cromatografía en fase inversa	73
4.12. Linealidad del sistema en el análisis de la cianocobalamina por cromatografía de pares de iones	79
4.13. Precisión del sistema en el análisis de la cianocobalamina por cromatografía de pares de iones	79
4.14. Linealidad y exactitud del método de análisis de la cianocobalamina por cromatografía de pares de iones	82

I. INTRODUCCION

Las vitaminas son compuestos orgánicos que se requieren para el crecimiento, desarrollo y metabolismo normal de los animales, incluyendo al hombre. Es esencial que las vitaminas se encuentren presentes en la dieta alimenticia, ya que no pueden ser sintetizadas completamente en los tejidos o, al menos, no en una velocidad adecuada.

Las vitaminas del complejo B, clasificadas como vitaminas hidrosolubles, son un grupo complejo de sustancias cuyas estructuras químicas no están relacionadas entre sí; incluyen a la tiamina (B₁), la riboflavina (B₂), la piridoxina (B₆), la cianocobalamina (B₁₂) y coenzimas como la niacinamida, la biotina, el ácido fólico y el ácido pantoténico.

La determinación analítica de estas vitaminas es muy importante para la industria farmacéutica y alimentaria. De hecho, existe bastante información relacionada con su cuantificación individual, utilizando diferentes métodos físico-químicos y biológicos.

En lo que se refiere a la cianocobalamina, su determinación en presencia de otras vitaminas por procedimientos físico-químicos es muy difícil debido a las concentraciones excepcionalmente bajas, comparadas con las demás, en que esta se encuentra en las diferentes preparaciones comerciales. En consecuencia, este tipo de métodos puede aplicarse únicamente a preparaciones relativamente concentradas de cianocobalamina, siempre que sea posible evitar al máximo las interferencias.

El método físico-químico más importante empleado para la determinación de la cianocobalamina, está basado en la medida de la absorción de la luz por disoluciones acuosas de la propia vitamina. Este método espectrofotométrico, que es uno de los procedimientos documentados en la Farmacopea Mexicana y en la U.S.P. XXI para materia prima y concentrados inyectables constituidos solamente de cianocobalamina (1,2), no es

específico y por lo tanto puede dar lugar a errores serios cuando en una muestra problema se encuentran compuestos (p. ej. productos de degradación) que presenten absorbancia de la luz a la longitud de onda seleccionada. Otro procedimiento bien documentado es el método microbiológico, en el cual se utilizan microorganismos cuyo crecimiento es promovido por la vitamina B12. Este análisis, como todos los de su tipo, es sumamente específico y sensible puesto que permite detectar cantidades de orden de los miligramos o milimicrogramos, sin embargo es un método muy laborioso, lento y poco reproducible.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) parece ser una alternativa interesante de análisis, pues permite conjugar a la vez características de especificidad a través de la separación de los componentes de la muestra, sensibilidad, rapidez y precisión. Es por esta razón que se están realizando cada vez más estudios comparativos entre los análisis microbiológicos y los análisis por CLAR para vitaminas, en donde los resultados han mostrado que los métodos cromatográficos aventajan a los microbiológicos .

Entre las diversas técnicas de la cromatografía de líquidos, las más apropiadas para el análisis de compuestos como las vitaminas son: la cromatografía en fase inversa simple y la cromatografía en fase inversa con formación de pares de iones.

Se han reportado trabajos sobre la determinación de las vitaminas hidrosolubles en preparaciones polivitámicas utilizando las técnicas anteriormente mencionadas. Los métodos desarrollados por este medio son rápidos, exactos y reproducibles, sin embargo, en algunos de ellos las condiciones consideradas en relación a la cianocobalamina no son claras (como p. ej. concentración, recuperación) y en otros ni siquiera se incluye, ya que debido a su baja concentración resulta difícil de analizar.

El presente trabajo pretende contribuir al estudio de las condiciones adecuadas para el análisis de las vitaminas del complejo B y al establecimiento de metodología analítica confiable y rápida para el análisis rutinario de la cianocobalamina en preparaciones farmacéuticas de polivitamínicos. Para esto se cumplirán los siguientes objetivos:

1) Desarrollar un método para resolver únicamente a la cianocobalamina del conjunto de las otras vitaminas del complejo B que usualmente la acompañan en las preparaciones farmacéuticas.

2) Desarrollar un método que permita resolver a la mayor parte de las vitaminas del complejo B en una sola corrida.

La finalidad del primer objetivo es la de lograr un análisis rápido y sencillo, exclusivamente para la cianocobalamina. Se utilizará la cromatografía de líquidos con fase inversa. La finalidad del segundo objetivo es la de proponer condiciones óptimas para la realización del análisis de cada una de las vitaminas. Se utilizará la cromatografía de líquidos con formación de pares de iones.

A cada uno de los métodos se le determinará la linealidad, exactitud, precisión y especificidad en relación a la cianocobalamina.

II. GENERALIDADES

II.1. LAS VITAMINAS HIDROSOLUBLES.

El grupo de las vitaminas hidrosolubles esta formado por los miembros del complejo B y el ácido ascórbico.

Las vitaminas del complejo B comprenden a una serie de compuestos que difieren notablemente en su estructura química y en su acción biológica. La razón por la que son agrupadas en una sola clase se debe a sus fuentes de aislamiento original, particularmente el hígado y la levadura. Puesto que se encuentran distribuidas similarmente en los alimentos, existe una tendencia a administrar de manera conjunta las vitaminas del complejo B en pacientes con deficiencias dietéticas.

Dentro de este grupo se encuentran la tiamina (B1), la riboflavina (B2), la piridoxina (B6), la cianocobalamina (B12), el ácido fólico y la niacinamida; vitaminas utilizadas en el presente trabajo, por lo que a continuación (a excepción de la cianocobalamina que se describirá con mayor detalle) se hará una breve revisión de cada una de ellas que incluye las diferentes formas farmacéuticas en que se encuentran y los correspondientes métodos oficiales de análisis (1,2,3,6,37).

Tiamina.

Fué el primer miembro del complejo B en ser identificado. Su ausencia en el organismo produce una forma de polineuritis llamada beriberi.

La tiamina es una molécula que contiene un núcleo de pirimidina y uno de tiazol. Funciona en el organismo como la coenzima tiamina pirofosfato (TPP).

Esta vitamina puede prescribirse ya sea como vitamina pura, en mezclas de vitaminas o en concentrados. Las tabletas generalmente contienen entre 5 y 500 mg, los inyectables entre 50 y 100 mg/ml y también esta disponible un elixir que

contiene 2.25 mg/ml. Los métodos oficiales para el análisis, ya sea de la tiamina o del mononitrato, en sus diferentes formas farmacéuticas incluyendo a la materia prima, se llevan a cabo por fluorometría después de tratamiento con un agente oxidante.

Riboflavina.

Las funciones fisiológicas de la riboflavina se realizan en la forma de dos coenzimas de las flavoproteínas respiratorias llamadas flavin mononucleótido (FMN) y flavin adenin-dinucleótido (FAD); éstas tienen una participación activa en el metabolismo.

La riboflavina se encuentra disponible en tabletas con concentraciones de 5 a 50 mg y en inyectables con concentraciones entre 5 a 50 mg/ml; puede encontrarse sola o combinada con otras vitaminas. Los métodos oficiales de análisis, tanto para la riboflavina como para el fosfato en sus diferentes formas farmacéuticas, se realizan también por fluorometría.

Piridoxina.

Existen tres compuestos naturales (piridoxina, piridoxal y piridoxamina) que poseen las mismas propiedades biológicas, por lo que todas ellas son asignadas como vitamina B6 o piridoxina. Estos compuestos difieren por el tipo de sustituyente del átomo de carbono en la posición 4 de un núcleo de piridina : la piridoxina es el alcohol primario, el piridoxal es el aldehído y la piridoxamina contiene un grupo aminometil. Los tres compuestos mencionados son transformados en el organismo a piridoxal fosfato, la forma activa que tiene un papel muy importante en una amplia variedad de transformaciones metabólicas.

La piridoxina se encuentra disponible en tabletas de 5 a 500 mg y en inyectables de 5 a 100 mg/ml, sola o combinada con otras vitaminas. El análisis oficial de estas diferentes formas farmacéuticas se encuentra documentado por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), con ayuda de un estándar interno (el ácido p-hidroxibenzoico).

Acido fólico.

La mayor parte de la molécula del ácido fólico o ácido pteroylglutámico, esta formada por un anillo pteridina unido por medio de un puente metileno al ácido p-aminobenzoico, el cual esta unido por un enlace amida al ácido glutámico. El ácido pteroylglutámico es la forma farmacéutica común, aunque no es el principal folato encontrado en alimentos ni es la coenzima activa en el metabolismo intercelular; pero al entrar al organismo el ácido pteroylglutámico es transformado .

El ácido fólico es expedido en preparaciones orales solo o en combinación con otras vitaminas y minerales y también en inyectables en solución acuosa. Las tabletas de ácido fólico solo, generalmente contienen 0.1, 0.25, 0.4, 0.8 o 1 mg y en combinación, ya sean tabletas o cápsulas, contienen de 100 µg a 1 mg; los inyectables alrededor de 5 mg/ml. Los métodos oficiales de análisis, para cualquiera de estas formas, se realizan por CIAR.

Niacinamida.

La niacinamida también llamada nicotinamida o amida del ácido nicotínico participa en las reacciones biológicas de oxido-reducción como nicotinamida adenin-dinucleótido (NAD) o nicotinamida adenin-dinucleótido fosfato (NADP)

La niacinamida se puede encontrar comercialmente en tabletas con las siguientes cantidades: 25, 50, 100 y 500 mg, también en inyectables en solución acuosa de 50 a 100 mg/ml. El método oficial de análisis para tabletas e inyectables que contengan únicamente niacinamida, es el espectrofotométrico, y en mezclas se utiliza el método microbiológico. Para el análisis de materia prima se reporta la cromatografía líquida de alta resolución.

II.2. LA VITAMINA B12.

II.2.1. CARACTERISTICAS GENERALES. (3,4)

La vitamina B12 fué aislada por primera vez en forma cristalina de las fracciones del hígado e inmediatamente demostró ser específica para el tratamiento de la anemia perniciosa. El hígado continua siendo una fuente dietética importante de vitamina B12, pero los extractos de hígado ya no son muy utilizados terapéuticamente debido a que existe una disponibilidad rápida de las formas cristalinas de la vitamina por otros medios.

Esta vitamina es esencial para el buen funcionamiento de las células de la médula ósea, el sistema nervioso y el tracto gastrointestinal. Interviene principalmente en la formación normal de los elementos sanguíneos.

El requerimiento humano diario alimenticio de la vitamina esta en el rango de 0.5 a 3 μ g. una vez ingerida la cianocobalamina se une al factor intrínseco y a otras proteínas que se encuentran en los jugos gástricos e intestinales. En el intestino delgado a un pH neutro y en presencia de calcio, el complejo vitamina B12-factor intrínseco es unido a una proteína membranar y una vez en la sangre es transportada a los tejidos unida a otras proteínas llamadas transcobalaminas. La transferencia al interior de la célula requiere de una fuerza motora protónica y, tal vez, de un acarreador adicional.

En la anemia perniciosa la vitamina no es absorbida oralmente en cantidades adecuadas, a menos que se administre con el factor intrínseco o en cantidades del orden de los miligramos (relativamente elevadas). Sin embargo, la administración parenteral es utilizada más ampliamente.

II.2.2. PREPARACIONES, DOSIFICACION Y RUTAS DE ADMINISTRACION.

(1,2, 36, 37)

La vitamina B12 esta disponible en forma pura para administración oral o parenteral, y en combinación con otras vitaminas y minerales para administración oral. La elección de la preparación debe hacerse siempre a partir del reconocimiento de la causa de la deficiencia. Las preparaciones orales pueden utilizarse como complemento dietético o para prevenir la deficiencia de esta vitamina, pero tienen poco valor en el tratamiento de pacientes con deficiencia del factor intrínseco, donde se administra intramuscularmente.

La cianocobalamina puede encontrarse en inyectables que contienen 30, 100 hasta 1000 $\mu\text{g/ml}$. Existen además preparaciones polivitámicas que contienen entre 5 y 1000 μg , con o sin el factor intrínseco.

Las preparaciones purificadas del factor intrínseco (f.i) se estandarizan de acuerdo a su capacidad para promover la absorción de la vitamina B12 en los pacientes con anemia perniciosa, así una unidad oral de f.i. se define como la cantidad de material que puede unir y transportar 15 μg de cianocobalamina. La mayoría de las preparaciones de vitamina B12, combinadas con el factor intrínseco, contienen 0.5 unidades orales por tableta.

II.2.3. ESTRUCTURA DE LA CIANOCOBALAMINA. (5)

La cianocobalamina ($\text{C}_{63}\text{H}_{88}\text{CoN}_{14}\text{O}_{14}\text{P}$), es un compuesto de peso molecular igual a 1355.40 que contiene cobalto trivalente con número de coordinación de 6. Esta formada por dos sistemas heterocíclicos: un núcleo corrinoide y un bencimidazol (ver figura No 2.1). El núcleo corrinoide es un núcleo porfirínico modificado parecido al de la hemoglobina, que contiene cuatro anillos del tipo pirrónico, pero que difiere en que cada par de anillos esta unido directamente en vez de por un puente meteno; en coordinación a los 4 nitrógenos internos se encuentra

el átomo de cobalto que a la vez tiene un grupo ciano unido. El segundo sistema es un ribonucleótido que es excepcional por contener como base a un 5-6-dimetilbencimidazol en una unusual unión α -N-glicosil con una D-ribose (la mayoría de los nucleótidos presentan uniones β). Este ribonucleótido está unido al corrinolide por un enlace de coordinación entre uno de sus átomos de nitrógeno y el átomo de cobalto, además de un enlace ester entre el grupo 3-fosfato del ribonucleótido y una cadena lateral del anillo corrinolide.

Actualmente se conocen como cobamidas a una serie de compuestos con actividad de vitamina B12. Las cobamidas se distinguen por el grupo coordinado al cobalto y las más comunmente utilizadas en productos farmacéuticos son la cianocobalamina y la hidroxocobalamina.

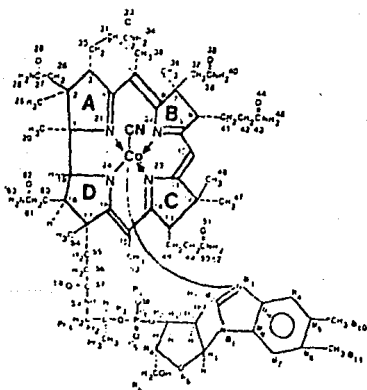


Figura No 2.1. Estructura de la cianocobalamina. El núcleo corrinolide se muestra más oscuro. (3)

11.2.4 PROPIEDADES GENERALES DE LA CIANOCOBALAMINA.

Descripción. (1,6)

La cianocobalamina es un polvo cristalino de color rojo intenso, libre de olores cuya forma anhidra es muy higroscópica.

Velocidad de disolución intrínseca. (3)

La velocidad de disolución intrínseca fué determinada después de compresión bajo 1500 PSIG utilizando moldes en forma de disco de 3/8" de diámetro. El área superficial fué 0.713 cm^2 . En un litro de agua a temperatura ambiente, agitando a una velocidad de 50 r.p.m., la velocidad de disolución intrínseca de la cianocobalamina es $0.275 \text{ mg min}^{-1} \text{ cm}^2$, utilizando espectrofotometría ultravioleta a 361 nm.

Solubilidad. (1,2,3)

Utilizando las definiciones de la U.S.P., se tiene la siguiente lista:

SOLVENTE	SOLUBILIDAD
Agua	ligeramente soluble
HCl 0.1 M	ligeramente soluble
NaOH 0.1M	poco ligeramente soluble
Acetona	poco ligeramente soluble
Acetonitrilo	poco ligeramente soluble
Acetonitrilo:Agua	ligeramente soluble
Cloroformo	prácticamente insoluble
Dimetilsulfoxido	ligeramente soluble
Etanol	ligeramente soluble
Eter etílico	ligeramente soluble
Hexanos	poco ligeramente soluble
Metanol	ligeramente soluble
Metanol:Agua	ligeramente soluble
n-Octanol	prácticamente insoluble
Propilen-glicol	prácticamente insoluble

Coefficientes de partición. (3)

Se han determinado los coeficientes de partición a 22°C hexano/agua, que es de 0.087 y cloroformo/agua que es de 0.023, a 21°C fenol/agua (pH 6.2) que es de 0.055 y a 22°C para butanol/agua (pH 6) que es de 0.045, utilizando una longitud de onda de 361nm.

Síntesis, biosíntesis y producción comercial. (3)

La síntesis de la cianocobalamina realizada por R.B.Woodward y A.Eschenmoser, utiliza como compuesto base a la β -cornosterona y se lleva a cabo en 37 pasos, obteniéndose finalmente una mezcla de 8 diesterosómeros.

La biosíntesis comienza con el ácido δ -amino-levulinico, que es también un precursor de las porfirinas, clorofilas, hemos y citocromos (complejos metálicos biológicos involucrados en las reacciones de oxidación-reducción) y a través de una serie de pasos enzimáticos se obtiene el ácido cobirínico, precursor biológico de la cianocobalamina que está muy relacionado con el ácido cobirrico, el cual a su vez es un intermediario clave en la síntesis química de la vitamina B12.

La cianocobalamina comercial es producida por un gran número de diversos microorganismos como *Streptomyces griseus* y *Propionibacterium shermanii* (8).

Estabilidad. (3,6)

Los cristales hidratados son estables al aire pero fotosensibles. Las soluciones acuosas presentan estabilidad máxima en un pH de 4.5 a 5 e incluso pueden someterse al autoclave a 120°C durante 20 minutos. Las soluciones acuosas se descomponen en presencia de acacia, aldehídos, ácido ascórbico, gluconato ferroso y sulfato ferroso. La adición de ácido a la cianocobalamina causa hidrólisis de los grupos amida y el nucleótido, mientras que la adición de base 0.1 M a 100°C durante 10 minutos en aire, origina la pérdida de actividad biológica, aunque muchas de sus propiedades físicas no cambian. Pierde su actividad en presencia de ciotetraciclina, metilparabeno y

fenildimetilpirazolone metilaminometano de sodio. Los saborizantes inducen la inestabilidad y en las formulaciones de vitaminas se ha encontrado que la tiamina inactiva a la cianocobalamina y el ácido ascórbico la desestabiliza especialmente si se encuentran presentes metales como cobre, manganeso y molibdeno. También se ha reportado inestabilidad en presencia de niacinamida. Se han encontrado pérdidas significativas en cápsulas, tabletas y líquidos después de un año de almacenamiento a temperatura ambiente. La presencia de agentes reductores, aún en cantidades traza, introducidos en los excipientes pueden reducir significativamente la potencia de la vitamina.

Las soluciones de cianocobalamina se estabilizan por la adición de sulfato de amonio, antioxidantes y agentes quelantes, como el ácido cítrico, la cisteína, el dicloroacetato de diisopropil amonio, las sales de hierro, el gluconato y el lactato. Los extractos de hígado se han estabilizado con bisulfito y cloruro de potasio. La vitamina B₁₂ es comúnmente estabilizada antes de las formulaciones en productos vitamínicos minerales.

Pruebas de identidad.(1,2,3)

Se utilizan métodos de fusión de la cianocobalamina con el piro-sulfato de potasio y reacción con una solución de una sal R nitrosa; también se utiliza la digestión y adición con cloruro de acetoamonio seguida de una reacción con ácido hipofosforoso, la destilación y adición de una solución de sulfato de amonio ferroso. Todas estas pruebas producen colores muy fuertes.

Espectro de absorción.(1,2,3,6)

La figura 2.2, muestra el espectro de absorción de la cianocobalamina. Este espectro ilustra las bandas clásicas α , β y γ características de las porfirinas y las clorofilas. El espectro varía con el disolvente, el pH, la temperatura y los cambios en el estado de oxidación del metal central, generalmente conservando el mismo patrón en los máximos de absorción.

El espectro en agua presenta máximos de absorción a $278 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$, a 361 nm y a $550 \pm 2 \text{ nm}$. La relación A_{361}/A_{278} es de 1.70 a 1.90 y la relación A_{361}/A_{550} es de 3.15 a 3.40.

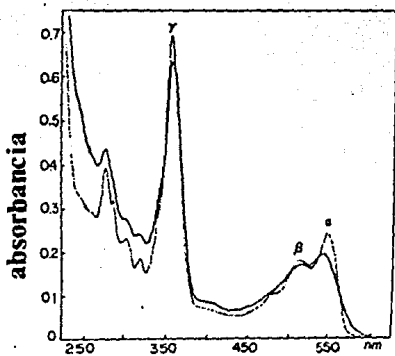


Figura 2.2. Espectro de absorción de la cianocobalamina en etanol. $298 \cdot \text{K}$ (—) y $77 \cdot \text{K}$ (.....). (3)

Métodos de análisis (1,2,3)

Se han reportado una gran variedad de métodos para el análisis de la cianocobalamina, como por ejemplo la absorción atómica en donde el cobalto inorgánico es utilizado como estándar, las titulaciones iodométricas y con HClO_4 en ácido acético glacial, la electroforesis, la polarografía, los radioensayos etc., pero los más ampliamente usados y que están documentados oficialmente son el método espectrofotométrico y el método microbiológico.

El primero está basado en la comparación de la absorbancia de una muestra en agua con la absorbancia de un estándar en el máximo de absorción del espectro de la cianocobalamina, a 361 nm. Como ya se había mencionado en la introducción, la desventaja de este método es la falta de especificidad, por lo que solamente es aplicable a preparaciones que no contengan sustancias interferentes. El segundo, basado en el crecimiento de ciertos microorganismos, promovido por la vitamina B12, es considerado como un método sensible y específico, pero como todos los métodos microbiológicos, para realizarlo se requiere de mucho tiempo y meticulosidad, además no es muy reproducible debido a la variabilidad de las cepas de microorganismos.

Recientemente, para el análisis de una gran variedad de medicamentos, se ha enfocado la atención hacia los métodos cromatográficos, considerando su gran rapidez, sensibilidad y poder de resolución, además de la facilidad de automatizarlos en los análisis de rutina. Se ha hecho énfasis especialmente en la cromatografía de líquidos de alta resolución (C.L.A.R.), que además presenta la ventaja de permitir el análisis directo de compuestos poco volátiles o termolábiles como lo son la mayoría de los productos farmacéuticos, incluyendo a las vitaminas.

Dedido a que la C.L.A.R. es la técnica de análisis utilizada en este trabajo, a continuación se presenta una breve descripción de algunos aspectos teóricos fundamentales de ésta, relacionados con la presente investigación. (8 - 16).

II.3. ASPECTOS FUNDAMENTALES DE LA CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS.

II.3.1. INTRODUCCION.

La cromatografía es una técnica que permite separar, cuantificar y eventualmente aislar los componentes de una mezcla de compuestos químicos. Estos compuestos se distribuyen entre dos fases, una estacionaria y otra móvil, de tal forma que cada uno de ellos migra a una velocidad particular a través del sistema cromatográfico. La separación esta entonces basada en las diferencias en la distribución de los componentes de la muestra entre las dos fases.

La separación se lleva a cabo en una columna tubular rellena de un sólido poroso finamente dividido, el cual puede actuar directamente como fase estacionaria o como soporte para una fase estacionaria líquida. También se puede efectuar utilizando como fase estacionaria papel filtro o un sólido finamente dividido colocado en forma de capa fina sobre una placa de vidrio.

En la cromatografía en columna, la fase móvil puede ser un líquido ó un gas, y según el caso se denominan respectivamente "cromatografía líquida" y "cromatografía de gases". Esta fase móvil fluye a través del relleno de la columna, transportando a los componentes de la mezcla, que son retenidos selectivamente en la fase estacionaria durante su migración.

Por ser la cromatografía de líquidos la técnica de separación y análisis utilizada en este trabajo, en lo que sigue nos referiremos principalmente a ella.

Durante muchos años se utilizó la cromatografía de líquidos en su versión clásica en donde, básicamente se trabajaba con una columna de vidrio de diámetro entre 2 y 10 cm, con algún material como la sílice, la alúmina, etc., cuyas partículas eran aproximadamente de 200 μ ; la muestra (0.1 a 1 g o más) se introducía en la fase móvil o en un disolvente adecuado y la elución se efectuaba haciendo pasar la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad. Finalmente se colectaban las fracciones eluidas para su posterior cuantificación. Actualmente esta versión de la cromatografía de líquidos generalmente se emplea con fines semipreparativos.

La cromatografía líquida moderna o cromatografía líquida de alta resolución (C.L.A.R.) posee grandes ventajas frente a la cromatografía de líquidos "clásica". Se utilizan columnas de diámetro muy reducido, generalmente menor de 5 mm, con empaques de diámetro de partícula de 3 hasta 40 μ , sistemas de bombeo de alta presión para el flujo rápido de la fase móvil a través de la columna, tamaño de muestra muy pequeño (μ g), válvulas de inyección y diversos detectores específicos en línea. Esto ha permitido lograr separaciones eficientes y análisis precisos y sensibles en tiempos muy cortos. Por otra parte, la introducción de microprocesadores en el equipo hace posible, en la actualidad, la automatización completa de los análisis.

Las técnicas en cromatografía de líquidos pueden clasificarse en cuatro grupos de acuerdo al mecanismo de retención de los compuestos de la muestra en la fase estacionaria: la cromatografía de adsorción, la cromatografía de reparto (actualmente desplazada por la cromatografía de fases químicamente unidas), la cromatografía de iones y la cromatografía de exclusión.

La cromatografía de adsorción o cromatografía líquido-sólido requiere de partículas de gran área superficial en las cuales la retención de los compuestos se realiza por interacción con grupos activos en la superficie del adsorbente.

El nombre de cromatografía de reparto se le dió originalmente al proceso cromatográfico que se realiza sobre una fase estacionaria líquida impregnada en un soporte, idealmente inerte, y utilizando una fase móvil constituida por otro líquido inmiscible al primero; entonces el proceso de equilibrio es igual al de la extracción líquido-líquido. Posteriormente se desarrollaron las fases químicamente unidas en donde una fase estacionaria orgánica está unida químicamente a la partícula soporte, siendo estas fases más estables y más eficientes. Posteriormente se tratarán con más detalle, ya que con ellas se trabajó en esta tesis.

En la cromatografía de iones la retención de los solutos ionizados involucra interacciones eléctricas o formación de enlaces de coordinación con especies iónicas que se encuentran adsorbidas o químicamente unidas al soporte. Dentro de este grupo se encuentran clasificadas varias técnicas como: la cromatografía de intercambio iónico en resinas y sílices modificadas, la cromatografía de pares de iones en fase inversa y la cromatografía de intercambio de ligantes (en fase inversa, en resinas y en sílices modificadas con agentes quelantes). La cromatografía de pares de iones, que es probablemente en la actualidad la más popular de este grupo, será descrita con más detalle posteriormente.

Finalmente, en la cromatografía de exclusión la fase estacionaria está formada por un material poroso, en donde los poros son de un tamaño especial, de tal forma que las moléculas de gran área son excluidas y las más pequeñas permean una fracción del volumen poroso que es proporcional a su tamaño.

En general, se puede decir en relación al proceso cromatográfico, que la migración diferencial o el movimiento de los componentes individuales de una mezcla a través de la columna depende del equilibrio de distribución de cada compuesto entre la fase estacionaria y la móvil. Entonces esta migración diferencial está determinada por las variables experimentales que afectan esta distribución, es decir, la composición de la fase móvil, la

composición de la fase estacionaria y la temperatura de la separación.

II.3.2 TAMAÑO DE MUESTRA Y EFICIENCIA DE LAS COLUMNAS.

Cuando se analizan muestras lo suficientemente pequeñas, el área y la altura de los picos en el cromatograma obtenido, aumenta al aumentar la cantidad de muestra inyectada, pero los tiempos de retención no son afectados y la separación relativa entre dos picos se mantiene prácticamente igual. Estas condiciones corresponden a lo que se conoce como intervalo lineal de la isoterma de distribución; sin embargo existe un tamaño crítico de muestra a partir del cual se observa un decremento notable en el tiempo de retención y una deformación (coleo o cabeceo) de los picos conforme aumenta la concentración de la muestra y por lo tanto la separación se va perdiendo.

La figura No 2.3, muestra el efecto provocado por el incremento en la cantidad de muestra inyectada sobre el factor de capacidad de un soluto y sobre el número de platos teóricos calculado en base al cromatograma resultante.

Snyder (9) define la capacidad lineal (θ) de un adsorbente como: "la masa de un soluto inyectado por gramo de adsorbente que provoca una variación del 10% en el volumen de retención específico de un compuesto patrón bien retenido (factor de capacidad >1), con respecto al volumen de retención constante del mismo compuesto patrón, observado cuando se inyectan pequeñas cantidades de éste ".

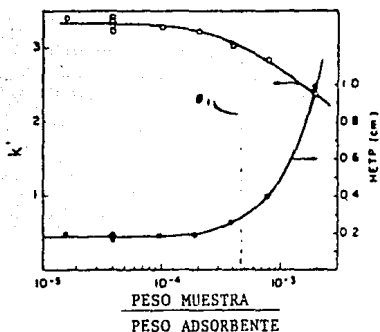


Figura 2.3. Capacidad lineal en cromatografía líquida (9)

Sin embargo, se ha demostrado que en columnas muy eficientes puede haber una pérdida muy importante de la eficiencia al aumentar la cantidad de soluto inyectado, sin que haya cambio en el volumen de retención.

Por lo anterior, algunos autores prefieren definir la capacidad lineal como: "la masa de soluto inyectado por gramo de adsorbente que provoque una pérdida del 10 % en la eficiencia (medida como altura del plato teórico, H), con respecto a la máxima eficiencia obtenida cuando se inyectan pequeñas cantidades de soluto".

Esta discusión muestra que es importante trabajar en el intervalo lineal de las isotermas para tener buenas separaciones. Sin embargo, cuando se analizan compuestos menores (p. ej. trazas) en matrices complejas, es a veces necesario inyectar cantidades de muestra importantes para tener una buena detección del compuesto de interés. En estos casos, la cantidad inyectada de algunos de los solutos mayoritarios rebasará la capacidad lineal de la fase estacionaria en la columna y por ello, en el cromatograma obtenido, se observarán picos anchos y deformados (generalmente coleados)

11.3.3 CONTROL DE LA SEPARACION.

El parámetro resolución (R_s) sirve para cuantificar el grado de separación entre dos compuestos. La resolución entre dos picos adyacentes (1 y 2) se calcula a partir de los datos experimentales mediante la siguiente ecuación:

$$R_s = \frac{(t_{r2} - t_{r1})}{(1/2)(t_{w1} + t_{w2})} \quad (2.1)$$

donde t_{r1} y t_{r2} son los tiempos de retención de los compuestos 1 y 2, t_{w1} y t_{w2} son el tiempo correspondiente a la anchura de la base determinada por las tangentes al punto de inflexión de los picos 1 y 2.

Cuando la anchura de los picos 1 y 2 es muy similar se puede expresar de la siguiente manera:

$$R_s = 1/4 \frac{(\alpha - 1)}{a} (N)^{1/2} \left[\frac{k'2}{1 + k'2} \right] \quad (2.2)$$

donde α es el factor de selectividad, N es el número de platos teóricos y k' es el factor de capacidad.

La ecuación (2.2), conocida como " la ecuación general de la resolución ", permite poner de manifiesto los tres factores responsables de la separación: la selectividad (término a), la eficiencia (término b), y la retención (término c).

Para poder obtener una buena separación ($R_s > 1$) es decir ($t_{r2} - t_{r1} > 4\sigma$) es necesario ajustar estos factores a valores adecuados. A continuación se describen los parámetros que permiten optimizar por separado cada uno de ellos.

Selectividad (α).

El término α es definido como la retención relativa, o la relación del tiempo que dos compuestos permanecen en la fase estacionaria:

$$\alpha = \frac{t_{r2} - t_0}{t_{r1} - t_0} = \frac{t_{r2}'}{t_{r1}'} \quad (2.3)$$

donde t_{r}' es el tiempo de retención relativo, y t_0 es el tiempo muerto.

Para que la separación sea posible se requiere que $\alpha > 1$. Un incremento de α siempre tiene un efecto positivo sobre la resolución, pero su impacto es mayor cuando esta variación se produce en la vecindad de la unidad.

Este parámetro puede ser modificado para mejorar la resolución a través de los siguientes cambios:

- naturaleza de (o los) disolventes que componen la fase móvil
- pH
- naturaleza o tipo de la fase estacionaria
- temperatura
- efectos químicos especiales

La magnitud de los cambios en la selectividad causados por un cambio de disolvente, depende de que las interacciones entre las moléculas del disolvente y de los compuestos de la muestra sean cambiados notablemente. Estas

interacciones son principalmente: dispersión, dipolo-dipolo, ácido-base y eléctricas.

La capacidad de una molécula, sea de solvente o de soluto, para interactuar en las cuatro formas mencionadas, se conoce como polaridad. En la literatura se reportan (9,10) clasificaciones de los disolventes en base a su polaridad (parámetro de solubilidad de Hildebrand (δ) o parámetro P' de Snyder) y a las interacciones específicas que ejercen sobre las moléculas adyacentes (parámetros de solubilidad parciales y triángulo de selectividad de Snyder). Estas clasificaciones son muy útiles en la selección de los disolventes adecuados para obtener la selectividad requerida .

La variación del pH para obtener cambios en la selectividad esta restringida a las muestras compuestas por solutos con propiedades ácido-base.

En la cromatografía de líquidos el cambio de la naturaleza de la fase estacionaria es poco usual ya que resulta más práctico realizar cambios en la fase móvil que en la estacionaria.

El cambio de la temperatura es particularmente importante en cromatografía de iones, en donde es más prometedor cambiar ésta, que cambiar la fase estacionaria.

Finalmente, en lo que se consideró como efectos químicos especiales, estan involucrados los equilibrios secundarios como la complejación.

Factor de capacidad (k')

Para obtener una buena resolución y un tiempo de análisis adecuado de los solutos en la muestra, los valores óptimos de k' deberán encontrarse en el intervalo de $2 \leq k' \leq 5$ o $1 \leq k' \leq 10$, para mezclas complejas.

El ajuste de la retención se lleva a cabo mediante el control de la fuerza de la fase móvil. Una fase móvil fuerte disminuye los valores de k' , mientras que una fase móvil débil los aumenta.

Como generalmente se utilizan mezclas de disolventes en las fases móviles, la fuerza de éstas puede incrementarse al aumentar la proporción del o los disolventes más fuertes.

El concepto de fuerza del disolvente es un concepto relativo y depende de la técnica cromatográfica utilizada. Así, por ejemplo, en cromatografía en fase normal los disolventes más fuertes son los más polares, mientras que en cromatografía en fase inversa sucede lo contrario.

Al igual que en el caso de la selectividad, las tablas de clasificación de los disolventes son muy útiles para seleccionar el disolvente de fuerza adecuada para la muestra que se trata.

Eficiencia (N)

La anchura de los picos en el cromatograma esta relacionada con la eficiencia de la columna, la cual se evalúa calculando el número de platos teóricos (N) al que es equivalente. Este cálculo se efectúa a partir de los datos experimentales mediante :

$$N = 16 \left[\frac{t_r}{t_w} \right]^2 \quad (2.4)$$

$$N = 5.54 \left[\frac{t_r}{t_{w1/2}} \right]^2 \quad (2.5)$$

Existe una proporcionalidad entre el número de platos teóricos (N) y la longitud de la columna (L) que se expresa como la altura equivalente a un plato teórico (H) :

$$H = \frac{L}{N} \quad (2.6)$$

en donde valores pequeños de H corresponden a mayor eficiencia de la columna. Este parámetro permite comparar entre si la eficiencia de columnas con diferentes características geométricas.

Las columnas de alta resolución deben provocar un ensanchamiento mínimo de las bandas de los diferentes compuestos de una muestra. La teoría de ensanchamiento de bandas (que no describiremos aquí) permite deducir que la altura equivalente a un plato teórico será menor cuando :

- se utilicen empaques con diámetro de partículas más pequeños
- se utilicen velocidades de flujo óptimas (deducidas de la curva de Van Deemter)
- las fases móviles sean menos viscosas
- las temperaturas de análisis sean mayores
- sean de menor tamaño las moléculas de los solutos

Por otra parte, los valores de N también pueden aumentar al incrementar la longitud de la columna, pero debe considerarse que también aumentarán los tiempos de retención y la caída de presión, por lo que no resulta muy ventajoso.

En la actualidad es más recomendable utilizar columnas cortas de diámetro de partícula uniforme y pequeño de 3 a 10 μ , que son altamente eficientes y por lo tanto es más cómodo optimizar la resolución mediante cambios en k' ó α , es decir en la composición de la fase móvil.

II.3.4 GRADIENTE DE ELUCION

El problema general de la elución, se presenta, cuando, en una muestra multicomponente los solutos difieren mucho en su estructura, lo que conduce a valores de k' muy diferentes en un sistema cromatográfico constituido por un par fase estacionaria-fase móvil dado. En este caso se observa que los valores de k' de las primeras bandas son demasiado pequeños, teniéndose una resolución muy pobre, mientras que los valores de k' de las últimas bandas son muy grandes, lo que da lugar a picos muy anchos y bajos.

Para resolver este problema se deben cambiar las condiciones durante la separación, de tal forma que se permita la optimización de los valores de k' de cada una de las bandas. En

cromatografía de líquidos esto se realiza mediante un gradiente de elución.

El gradiente de elución se realiza con la mezcla de dos (o más) disolventes; un disolvente inicial débil A y un disolvente fuerte B, de tal forma que la concentración de B en la fase móvil se va incrementando a lo largo de la separación; así inicialmente, gracias a la fase móvil se obtienen valores de k' grandes y al final, valores de k' pequeños.

En la figura 2.4, se muestra la interrelación de la fuerza del solvente y la migración de las bandas correspondientes a los compuestos. Se consideran tres compuestos (X, Y y Z), en los cuales X es el menos retenido y Z es el más retenido. Las líneas sólidas muestran la posición de cada banda dentro de la columna en función del tiempo, ya que r es la fracción de distancia entre la entrada y la salida de la columna. La elución de cada banda sigue un patrón similar y utilizando como ejemplo al compuesto X se observa que al tiempo t_x , el valor de k' (representado por la curva punteada) del compuesto X disminuirá hasta el punto donde X comienza a migrar en la columna. Conforme el valor de k' continúa disminuyendo en el tiempo, el compuesto X se mueve más rápidamente a lo largo de la columna, obteniéndose así la curva cóncava característica r vs t . Cuando $r = 1$ para X, la banda abandona la columna al tiempo de retención t_x , y entonces comienza a migrar el compuesto Y al tiempo t_y , después de sufrir el mismo comportamiento, empezará a migrar el compuesto Z.

De esta figura pueden obtenerse cuatro puntos importantes :

- 1) Los valores de k' promedios de los compuestos durante la separación caen en un rango óptimo $1 \leq k' \leq 5$.
- 2) Como el valor de k' de cada banda es muy pequeño (aprox. 1) cuando el compuesto abandona la columna, se obtienen picos más estrechos en el tiempo de elución y por lo tanto incrementa la sensibilidad y se tiene una máxima resolución. Este fenómeno representa una ventaja que tiene el gradiente de elución con la elución isocrática.

3) Se puede observar que los compuestos que en el principio de la separación tienen valores muy grandes de k' (como Z), eluyen rápidamente debido al decremento exponencial de k' con el tiempo.

4) El gradiente de k' en función del tiempo produce una disminución en el coeio de los picos, ya que la parte de la cola de la banda de un compuesto se mueve continuamente en la región de los k' más pequeños en comparación de los valores de k' del frente de la banda.

Gracias a estas características, con el gradiente de elución se pueden realizar separaciones de muestras complejas que no pueden hacerse con la elución isocrática.

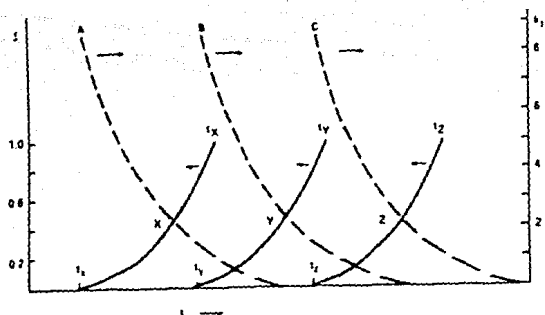


Figura 2.4. Ilustración de la migración de bandas en un gradiente de elución. La línea sólida muestra la migración fraccional r de la banda a lo largo de la columna, en función del tiempo; la línea punteada muestra el valor de k' de la banda en función del tiempo (valor instantáneo k_t). (9).

11.3.5. CROMATOGRAFIA EN FASES QUIMICAMENTE UNIDAS.

Las fases químicamente unidas (FCU) se desarrollaron en la década de los 70's para tratar de eliminar los inconvenientes presentados por las fases impregnadas de la cromatografía líquido-líquido. La estabilidad de estas fases es muy buena lo que permite trabajar a velocidades de flujo mayores y no se requiere presaturar la fase móvil con la fase estacionaria. Por lo tanto son ideales para analizar muestras cuyos componentes se encuentran en un amplio intervalo de valores de k' y requieren gradientes de elución para su separación.

Cuando se utilizan empaques con grupos polares, la técnica se denomina cromatografía en fase normal y con ella se pueden separar muestras de polaridad moderada a fuerte. Cuando los empaques no son polares, entonces se le denomina cromatografía en fase inversa y al usarse con una fase móvil muy polar, se pueden separar una amplia variedad de solutos, incluso especies iónicas con la cromatografía de formación de pares de iones.

La mayor parte de las fases químicamente unidas están formadas por un soporte de sílica de granulometría pequeña y uniforme que proporciona una alta eficiencia y excelente estabilidad mecánica.

Las fases estacionarias se ligan químicamente al soporte mediante una reacción de silanización, en donde los grupos OH de la sílica reaccionan con un cloroalquil-silano para dar una ligadura Si-O-Si-R, estable térmicamente y no hidrolizable. Dependiendo del tipo de cloroalquil-silano, la estequiometría de los reactivos y las condiciones experimentales de reacción, se obtendrá una capa orgánica del tipo cepillo (monomolecular) o del tipo enjambre (polimérica).

En adelante se tratará solo lo referente a la cromatografía de reparto a polaridad de fases invertida sobre fases estacionarias químicamente unidas al soporte, ya que es la técnica cromatográfica más utilizada en la actualidad debido a su gran reproducibilidad, estabilidad de las columnas, disponibilidad

de los disolventes para las fases móviles y facilidad de operación.

En la cromatografía de fase inversa, la superficie de la sílice ha sido modificada por la unión química de cadenas hidrocarbonadas (octilo y octadecilo). El mecanismo de retención puede ser explicado por la teoría del efecto solvofóbico desarrollada por Sinagolgiu y aplicada por Horvath (10) a la cromatografía de líquidos. Según esta teoría una molécula de un soluto, de los que típicamente se tratan en este tipo de sistemas, se encuentra constituida por grupos polares y por una parte hidrocarbonada apolar, la cual experimenta un efecto hidrofóbico hacia la fase móvil polar, asociándose reversiblemente con las cadenas hidrocarbonadas de la fase estacionaria. La interacción no es debida a fuerzas de atracción entre el soluto y la fase estacionaria, sino a la repulsión neta que existe entre el agua y la parte apolar de la molécula de soluto. La configuración más estable es entonces la que presenta el mínimo de superficie hidrocarbonada expuesta al disolvente.

Por lo tanto, se deduce que el efecto solvofóbico es más fuerte cuando: la parte apolar de la molécula de soluto es mayor, el porcentaje de carbono en la fase estacionaria es mayor, la polaridad de la fase móvil es mayor.

En la cromatografía de fase inversa, el disolvente base comúnmente utilizado es el agua, a la cual se le adicionan otros disolventes orgánicos miscibles en diferentes proporciones, el más común es el metanol, seguido por el acetnitrilo y el tetrahidrofurano.

Como ya se mencionó anteriormente, la selectividad puede ser modificada por cambios en el disolvente orgánico, en el pH etc, además de la adición de sales a la fase móvil. En relación a la temperatura se observa que la retención disminuye al aumentar aquella y la gráfica de $\log k'$ contra $1/T$ generalmente es lineal. El cambio en temperatura se utiliza principalmente para disminuir la viscosidad de la fase móvil (mejorando la eficiencia de separación), para incrementar la capacidad de la fase móvil

para disolver la muestra, y finalmente, para alterar la selectividad, aunque esto último no es recomendable ya que estos cambios son difíciles de predecir.

11.3.6. CROMATOGRAFIA DE PARES DE IONES

La cromatografía de pares de iones se desarrolló a mediados de la década de los setenta como una técnica alternativa al intercambio iónico en resinas, buscando mejorar la eficiencia y la selectividad de las separaciones de los compuestos orgánicos iónicos o ionizables.

La cromatografía de pares de iones puede llevarse a cabo a polaridad de fases invertida, la fase estacionaria es una fase apolar químicamente unida. La fase móvil está constituida por una mezcla buffer acuoso/disolvente orgánico, un "contraión" de carga opuesta a la de las moléculas que se desea separar y además puede incluir otras sales orgánicas.

En esta técnica se pueden modificar una amplia variedad de parámetros para obtener cambios en la selectividad y la retención de los solutos. Estos son: la concentración y naturaleza del contraión o de las sales, la proporción del disolvente orgánico en la fase móvil, el tipo de disolvente orgánico y el pH.

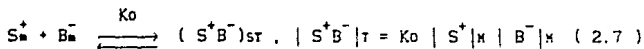
El contraión es un ión orgánico cuya molécula está compuesta por una parte hidrocarbonada relativamente importante. Los contraiones pueden ser de tipo aniónico o catiónico; los primeros (para separar solutos catiónicos) son generalmente alquilsulfatos o alquilsulfonatos y los segundos (para separar solutos aniónicos) son tetraalquilamonios o aminas terciarias.

El mecanismo de retención en cromatografía de pares de iones involucra a la vez un proceso de intercambio dinámico de iones y una formación suplementaria de pares de iones en la superficie de la fase estacionaria (11-16).

Los equilibrios que tienen lugar en estos sistemas son los siguientes:

1) Adsorción del soluto iónico en la fase estacionaria.

Sean S^+ el soluto y B^- un anión cualquiera presente en la fase móvil (anión del buffer o alguna sal). Se tiene el equilibrio:



La adsorción del soluto se hace bajo la forma de un par de iones para mantener la electroneutralidad en las dos fases. Este equilibrio está poco desplazado a la derecha y coopera poco a la retención en el caso de solutos de molécula pequeña.

2) Adsorción del contraión en la fase estacionaria.

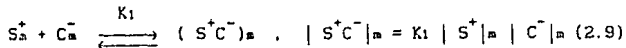
La cadena hidrocarbonada del contraión mostrará un efecto hidrofóbico y se fijará según su isoterma de adsorción (del tipo Freundlich), obedeciendo a la siguiente ecuación:

Sean C_a^- un contraión aniónico y P_a^+ un catión cualquiera presente en la fase móvil



A y B son constantes cuyo valor depende de las condiciones experimentales como el tipo de disolvente orgánico, proporción del mismo, tipo de contraión, concentración de sales y buffers etc.

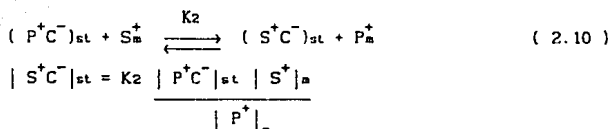
3) Formación de pares de iones soluto/contraión en el eluyente.



Hay controversias en relación a este equilibrio, algunos autores lo consideran importante, pero otros han demostrado que, generalmente, K_1 es muy pequeño, y por lo tanto no contribuye apreciablemente a la retención del soluto.

4) Intercambio iónico.

Retención del soluto en la fase estacionaria por una reacción de intercambio iónico con el catión P^+ asociado al contra-ión previamente fijado en la fase.



Considerando estos equilibrios, la constante de partición queda dada por:

$$K = \frac{|S^+B^-|_{st} + |S^+C^-|_{st}}{|S^+|_m + |S^+C^-|_m} = \frac{K_0 |B^-|_m + K_2 (|P^+C^-|_{st} |P^+|_m)}{1 + K_1 |C^-|_m} \quad (2.11)$$

Para el factor de capacidad del soluto se tendrá;

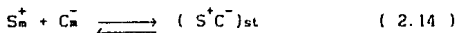
$$k' = \frac{k'_0}{1 + K_1 |C^-|_m} + \frac{K_2 (|P^+C^-|_{st} |P^+|_m)}{1 + K_1 |C^-|_m} \quad (2.12)$$

donde k'_0 , es el factor de capacidad del soluto en ausencia del contra-ión. Si consideramos que K_1 es despreciable, se simplifica la relación, pareciéndose a una ecuación típica de intercambiador de iones:

$$k' = k'_0 + K_2 (|P^+C^-|_{st} |P^+|_m) \quad (2.13)$$

donde P^+C^- representa la capacidad del intercambiador de iones.

A pesar de que en la mayoría de las observaciones experimentales se coincide con esta relación, ciertas discrepancias han hecho que se considere el equilibrio:



que contribuye también a la retención del soluto, aunque no implique formación de pares de iones en la fase móvil. Entonces como se tienen dos equilibrios simultáneos, no se puede determinar

qué proporción del par de iones S^+C^- en la fase estacionaria corresponde al intercambio iónico y cuál a este último equilibrio.

A pesar de esto, es posible predecir cómo afectarán los cambios de los diferentes parámetros a la retención de los solutos.

Los factores que aumentan la retención de los solutos son los siguientes:

- aumento de la superficie hidrocarbonada del soluto y/o del contralón.
- aumento de la proporción de agua en la fase móvil.
- cambio del disolvente orgánico en la fase móvil por otro más polar
- aumento del número de carbonos o de la concentración de las cadenas alquilo de la fase estacionaria

Por otra parte, si aumenta la concentración de sales en la fase móvil, especialmente la concentración de iones con carga del mismo signo que la del soluto, el equilibrio de intercambio iónico se desplaza a la izquierda y disminuye la retención del soluto. Si aumenta la concentración del contralón en la fase móvil, aumentará la retención del soluto pues aumentará la fijación del contralón y por lo tanto la capacidad del intercambio iónico, pero cuando la fase estacionaria esté saturada de contralón, éste dejará de fijarse y habrá más probabilidad de que se formen pares de iones con el soluto en la fase móvil y la retención disminuirá.

En la tabla No 2.1, se resumen los efectos de las diferentes variables sobre el k' y la selectividad en cromatografía de pares de iones en fase inversa.

VARIABLE	EFEECTO EN k'	EFEECTO EN LA SELECTIVIDAD
Contraión :		
augmenta concentración	augmenta	sin efecto *
augmenta sup. hidrocarb.	augmenta	efecto pequeño
Aumento del pH :		
muestra de aniones	augmenta	efecto grande
muestra de cationes	disminuye	efecto grande
Disolvente orgánico :		
aumento de concentración.	disminuye	efecto pequeño *
cambio	cambia	cambio
Temperatura :		
disminución.	augmenta	cambio
aumento	disminuye	cambio

Tabla No 2.1 . Resumen de los efectos de las diferentes variables sobre el k' y la selectividad en cromatografía de pares de iones. (9).* En moléculas parcialmente ionizadas hay efectos grandes.

II.4. ANTECEDENTES.

II.4.1. ANALISIS DE VITAMINAS HIDROSOLUBLES POR CROMATOGRAFIA DE FASE INVERSA Y POR CROMATOGRAFIA DE PARES DE IONES.

Las técnicas de cromatografía de líquidos de alta resolución con fases estacionarias a polaridad de fases invertida simple y con formación de pares de iones están siendo utilizadas cada vez más para el análisis de las vitaminas, debido a su gran versatilidad, poder de resolución, facilidad de operación, bajo costo, y reproducibilidad.

El análisis cromatográfico de las vitaminas hidrosolubles se ha realizado individualmente para aplicaciones fisiológicas, bioquímicas, en alimentos y en productos farmacéuticos (1,2,3); así por ejemplo existen reportadas separaciones de cobalaminas (17), compuestos con actividad de piridoxina (18,19), tiamina (20) y riboflavina (21). El análisis individual de la cianocobalamina en preparaciones farmacéuticas que contienen vitaminas liposolubles, colorantes etc, se ha reportado empleando la detección espectrofotométrica a 550 nm, región del visible, en donde se tiene una gran selectividad para la detección de la cianocobalamina, (22). Existen algunas vitaminas, (como por ejemplo la riboflavina) que también pueden detectarse en esa región espectral, pero su coeficiente de absorbtividad es comparativamente más pequeño.

Por otra parte, en relación al análisis simultáneo de las vitaminas hidrosolubles en preparaciones farmacéuticas, se ha observado que casi no existen reportes en donde se incluyan a todas las vitaminas del complejo B.

Kothary y Taylor (23) hicieron la separación de la niacinamida, la piridoxina, la riboflavina, el ácido fólico, la tiamina y la cianocobalamina por cromatografía de fase inversa con un gradiente de dos pasos, utilizando una fase débil formada solamente por un buffer acuoso y una fase fuerte formada por una mezcla metanol/agua (30:70). La mayor parte de las vitaminas

eluyeron inicialmente con la fase débil y en cuanto sale la última se realizó un cambio completo hacia la fase fuerte para que eluyeran la cianocobalamina y la riboflavina. Con este método los autores reportan cuantificaciones de cada una de las vitaminas en preparados comerciales concentrados con un error que va del 3 al 6%, calificándolas de reproducibles, pero cabe aclarar que el uso de una fase móvil completamente acuosa les causó un ensanchamiento considerable de los picos. Por otra parte, la cianocobalamina no estaba incluida en el polivitamínico analizado; se aclaró que ésta fué agregada a la muestra, sin mencionar su concentración.

Se han reportado dos estudios (24,25) sobre el comportamiento que presentan estas mismas vitaminas en cromatografía de pares de iones, para poder establecer condiciones óptimas de separación. En ambos se observó que el efecto del pH y del porcentaje de disolvente orgánico en la fase móvil es muy marcado para algunas vitaminas. El primero fué el estudio de Willis y colaboradores (24) que reportaron un método de separación isocrático por cromatografía de pares de iones con contraión catiónico. Con este método la piridoxina eluyó en un pico tan ancho que dificultó el análisis y por lo tanto fué eliminada de la separación. La aparente ventaja fué el logro de una separación isocrática (más sencilla), sin embargo la aplicación es riesgosa, debido al uso de un contraión catiónico en una fase móvil con $\text{pH} > 7.9$ perjudicial para la estabilidad de las columnas. Por otra parte, la anchura de los picos en el cromatograma fué considerable y tampoco mencionó la concentración utilizada en el análisis de cada una de la vitaminas. El segundo fué el estudio de Dong y colaboradores (25) que realizaron un análisis más completo de los factores que afectan la retención de las vitaminas hidrosolubles en la cromatografía de pares de iones. Estudiaron además la relación entre los tiempos de retención y el tipo de alquilsulfonato, empleando fases estacionarias con diferentes longitudes de cadenas hidrocarbonadas. La detección se llevo a cabo por espectrofotometría con programación de la longitud de onda, para lograr la mejor respuesta de cada una de

las vitaminas. El análisis fué preciso y exacto pero la cianocobalamina no estuvo incluida.

La mayoría de las separaciones reportadas en la literatura se realizan con la técnica de cromatografía de pares de iones utilizando como contralón a los alquilsulfonatos (fácilmente disponibles en el comercio). También se han ensayado otros agentes formadores de pares de iones como por ejemplo el dioctilsulfosuccinato de sodio (26), que tiene la ventaja de ser más barato. Con este compuesto se logró una separación muy buena de la riboflavina, la niacinamida, la tiamina, el ácido fólico y la piridoxina mediante un gradiente de elución.

En productos polivitamínicos con matrices más complejas que contienen minerales, vitaminas liposolubles, colorantes etc, la extracción de las vitaminas hidrosolubles es más complicada (27,28), pero se han obtenido buenos rendimientos en muestras extraídas directamente con la fase móvil (29). En éstos trabajos, se desarrollaron métodos de análisis lineales, exactos y reproducibles para algunas vitaminas del complejo B. Además se observó que los probables compuestos polares que pudieran acompañar a las vitaminas hidrosolubles, después de la extracción de matrices complejas, no interfieren en el análisis cromatográfico, porque generalmente eluyen muy rápido. En caso de encontrarse compuestos lipofílicos con solubilidad limitada en la fase móvil, éstos tampoco interfieren porque eluyen mucho después.

En lo que se refiere a la detección de las vitaminas hidrosolubles, la mayor parte de las publicaciones reportan el uso de espectrofotómetros, ya sea en la región ultravioleta o en el visible. Sin embargo, para algunas aplicaciones específicas se ha utilizado también el detector electroquímico (30) y el de fluorescencia (21).

En el análisis de las vitaminas cada problema es específico debido a la gran variedad de formulaciones en los productos productos polivitámicos farmacéuticos (31), y en cada caso se requieren condiciones diferentes. La cromatografía líquida de alta resolución puede proveer de una amplia variedad de alternativas para resolverlas.

I I I . E X P E R I M E N T A C I O N

El trabajo se efectuó en dos partes : la primera correspondiente al desarrollo de un método por CLAR en fase inversa, en donde se puede analizar exclusivamente a la cianocobalamina, y la segunda correspondiente al desarrollo de un método por CLAR con formación de pares de iones, en donde se pueden analizar simultáneamente todas las vitaminas usadas.

III.1. REACTIVOS Y APARATOS

- Agua destilada.
- Metanol, Merck.
- Acetato de Amonio, Merck.
- Acido Perclórico, Anallit.
- Octansulfonato de sodio, Sigma.
- Estándard de cianocobalamina, Rhône-Poulenc.
- Materia prima de : niacinamida, tiamina, piridoxina, riboflavina, fosfato de riboflavina, ácido fólico y cianocobalamina, USV Grossman.
- Filtros acrodiscos 13 de 0.45 μ , Gelman Sciences I.N.C.
- Jeringas Hamilton de 25 μ l.
- Cromatógrafo de líquidos de marca Varian 5000 con control de la temperatura de la columna integrado, inyector manual equipado con válvula de inyección Rheodyne 7125, detector UV-VIS de longitud de onda variable Varian modelo UV-110.
- Columnas de acero inoxidable de 15 cm de longitud y 4.6mm de diámetro interno (tubo Lichroma con paredes interiores pulidas) de Alltech. Como fase estacionaria se empleó RS11HLRP18 (Alltech) de 5 μ y 10 μ de diámetro de partícula.
- Integrador Hewlett Packard 3396A.
- Centrifuga Beckman J221.
- Espectrofotómetro Perkin Elmer Hitachi 200.

III.2. PROCEDIMIENTO PARA EL METODO DE ANALISIS POR CROMATOGRAFIA EN FASE INVERSA.

El objetivo de esta primera parte del trabajo fué el de desarrollar un método simple para analizar exclusivamente a la cianocobalamina en comprimidos orales en los cuales se encuentran presentes otras vitaminas del complejo B, en muy alta concentración con respecto a la vitamina B12.

III.2.1. OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES

A) Composición de la fase móvil.

Se prepararon soluciones individuales y en mezcla de las vitaminas con una concentración aproximada de 0.1 mg para la cianocobalamina y 100 veces mayor para las otras vitaminas.

Se inyectó cada vitamina utilizando fases móviles con diferente contenido de disolvente orgánico (metanol). En estos ensayos la temperatura se fijó a 28°C y los solutos se detectaron por espectrofotometría a 254 nm, longitud de onda en la cuál todas las vitaminas ensayadas presentan una buena absorbancia.

En todas estas pruebas se empleó una concentración 0.05 M de acetato de amonio en la fase móvil para fijar el pH y la fuerza iónica, ya que varias de las vitaminas tienen propiedades ácido-base.

B) Temperatura.

Conociendo que la cianocobalamina es un soluto cuya retención es notablemente alterada por pequeños cambios en las condiciones experimentales, incluyendo la temperatura, se efectuó un estudio de la variación del tiempo de retención de cada vitamina en el intervalo de temperaturas de 24 a 40°C. Se utilizó como fase móvil una mezcla MeOH : disolución acuosa de acetato de amonio 0.05 M 18.5 : 81.5 v/v.

C) Detección.

Para determinar las condiciones óptimas de detección de la cianocobalamina, se trazaron los espectros de absorción de disoluciones de este compuesto en varias mezclas metanol/agua (80:20, 50:50 y 20:80 v/v).

III.2.2. CONDICIONES CROMATOGRAFICAS.

Las condiciones cromatográficas que finalmente se utilizaron para el análisis de la cianocobalamina en comprimidos orales fueron las siguientes :

Columna : De acero inoxidable (15 cm x 4.6 mm de diámetro interior) empacada con fase inversa Rs11 C18HL con un diámetro de partícula de 10 μ .

Fase móvil : Metanol 19 % v/v

Disolución de acetato de amonio 0.05 M 81% v/v

Inyección : Por válvula con rizo de 10 μ l

Temperatura : 28°C

Flujo : 1ml/min

Detección : 361 nm

Sensibilidad del detector : 0.01 UA/mV

Integrador : atenuación = 2

ventana del pico = 1.5

nivel de ruido = 2

III.2.3. LINEALIDAD Y PRECISION DEL SISTEMA.

Para probar la linealidad del sistema se construyó una curva de calibración utilizando diferentes diluciones (con una disolución de acetato de amonio 0.05 M) de una disolución patrón de cianocobalamina estándar con una concentración aproximada de 1 mg/ml. Las concentraciones de estas diluciones tomando en cuenta las correcciones por calibración del material volumétrico y por la pureza y humedad del estándar son las siguientes :

dilución	concentración (mg/ml)
1	0.0193
2	0.0385
3	0.0777
4	0.0973
5	0.1159
7	0.1544
8	0.2421

El intervalo de concentraciones de los estándares de calibración se sitúa alrededor del valor de la concentración que se tendría si el contenido de cianocobalamina de un comprimido con 1 mg se disolviera en 10 ml.

Se inyectaron 10 µl de cada dilución estándar por duplicado y con los datos obtenidos se realizó el análisis de regresión lineal. Para estos cálculos se utilizó la medida de áreas debido a que con la medida de alturas se obtuvieron coeficientes de variación muy grandes. El pico de la cianocobalamina es ligeramente coleado y como este compuesto es sensible a la temperatura, la reproducibilidad de los tiempos de retención no es muy buena.

La precisión del sistema se determinó por la inyección por sextuplicado de una misma disolución estándar (concentración 0.0973 mg/ml).

III.2.4. PREPARACION Y ANALISIS DE LA MUESTRA.

Para el desarrollo de este método se utilizó como muestra un producto comercial con la siguiente composición nominal:

Vitamina B1 (clorhidrato de tiamina)250 mg
Vitamina B6 (clorhidrato de piridoxina)250 mg
Vitamina B12 (cianocobalamina) 1 mg
Exipiente c.b.p.607 mg

Cabe aclarar que en este trabajo se propuso un método de análisis por adiciones patrón por dos razones:

1) no se consiguieron placebos de productos comerciales.

2) dado que los comprimidos orales de la cianocobalamina que se expenden comercialmente están formados por diferentes placebos, se consideró que un método de análisis por adiciones patrón sería de mayor aplicabilidad, pues esta técnica permite corregir algunos efectos de la matriz sobre el compuesto de interés.

La preparación de las muestras se realizó de la siguiente manera (figura No 3.1) :

Se pulverizaron varios comprimidos hasta obtener una muestra homogénea. En 5 tubos de centrifuga se pesaron por separado la cantidad de polvo equivalente a una tableta y se le adicionaron 10 ml de una disolución de cianocobalamina estándar , en acetato de amonio 0.05 M , de la siguiente manera :

tubo	concentración adicionada (mg/ml)
1	0.000
2	0.0912
3	0.1356
4	0.1820

Las concentraciones adicionadas que se reportan consideran las correcciones de pureza y humedad del estándar , así como de la calibración volumétrica.

Los tubos con la disolución adicionada se agitaron y se sonicaron durante 10 minutos, para después ser centrifugados a 4000 r.p.m. durante 10 minutos. Se tomó una porción del sobrenadante de aproximadamente 5 ml y se volvió a centrifugar durante 15 minutos a 15000 r.p.m. para eliminar las partículas finas que quedaron en suspensión. Finalmente el sobrenadante se filtró através de una membrana con diámetro de poro de 0.45 μ . El filtrado se inyectó al cromatógrafo .

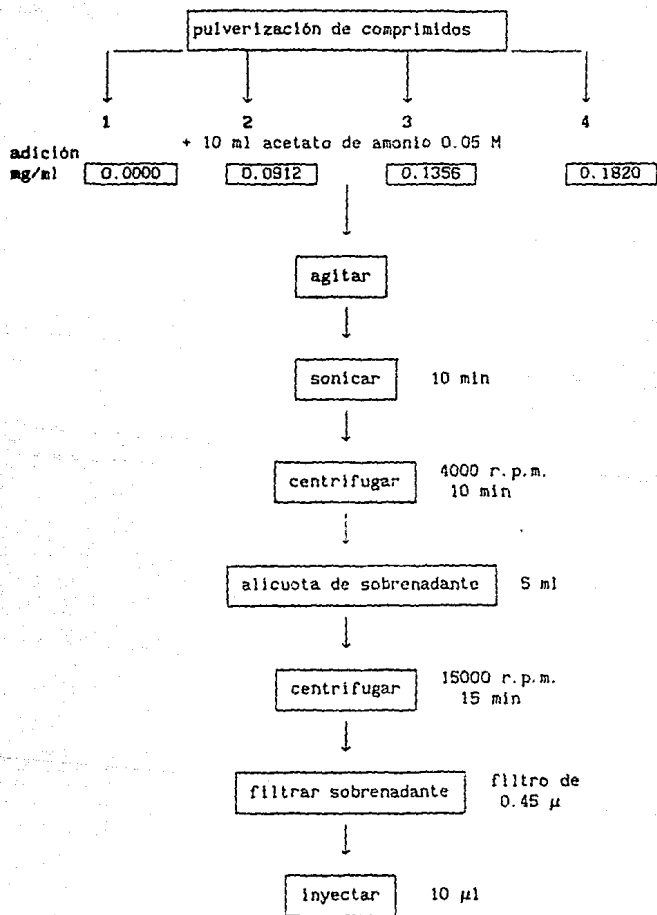


Figura No 3.1. Preparación de la muestra para el método por cromatografía en fase inversa.

III.2.5. LINEALIDAD Y EXACTITUD DEL METODO

Cada una de las muestras con diferentes adiciones patrón se analizó por duplicado, con los resultados se determinó la linealidad y exactitud del método y se calculó el contenido promedio de cianocobalamina en el producto comercial.

III.2.6. PRECISION DEL METODO

Para determinar la repetibilidad del método se analizaron 4 muestras diferentes por triplicado, bajo las mismas condiciones de trabajo durante el mismo día y para la reproducibilidad se analizaron 3 muestras por triplicado cada día durante dos días diferentes y con dos analistas.

III.2.7. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Para determinar si las muestras, listas para ser inyectadas, seguían siendo útiles después de 24 horas, en caso de presentarse situaciones imprevistas, se efectuó lo siguiente: 4 muestras del experimento de precisión se mantuvieron a temperatura ambiente protegidas de la luz y bien tapadas durante 24 horas, tiempo en que se volvieron a analizar bajo las mismas condiciones.

III.2.8. ESPECIFICIDAD EN ANALISIS DE ESTABILIDAD.

Para conocer la especificidad en estabilidad, se expusieron muestras de las vitaminas que absorben a 361 nm a la luz solar durante un mes. Posteriormente se prepararon disoluciones de cada una con una concentración parecida a la del polivitamínico comercial (0.1 mg/mL para la cianocobalamina y 25.0 mg/mL para las demás) y se inyectaron en el cromatógrafo.

III.3. PROCEDIMIENTO PARA EL METODO DE ANALISIS POR CROMATOGRAFIA DE PARES DE IONES.

El objetivo en este caso fué el de implementar un método en donde las seis vitaminas del complejo B ensayadas, entre las cuales se encuentra la cianocobalamina, estuvieran perfectamente bien separadas para poder eventualmente cuantificarlas en una sola corrida. Se preparó una muestra con todas las vitaminas en concentraciones que generalmente se encuentran en los polivitamínicos inyectables comerciales.

Cabe aclarar que, en esta parte del trabajo, solo se estudiaron las características del método (linealidad exactitud, etc) para el análisis de la cianocobalamina, ya que no se consiguieron estándares de pureza adecuada para las otras vitaminas. Por otra parte, el análisis de mezclas de esas vitaminas (sin incluir a la cianocobalamina), por cromatografía de pares de iones, ha sido reportado varias veces en la literatura como se indicó en la sección de antecedentes.

III.3.1 CONDICIONES CROMATOGRAFICAS.

Para optimizar la separación del grupo de vitaminas, se prepararon disoluciones de cada una de ellas en HClO_4 10^{-2}M . Las condiciones cromatográficas son las siguientes:

Columna : de acero inoxidable (15cm x 4.6mm de diámetro interno)
empacada con una fase inversa $\text{RsilC}_{18}\text{HL}$ de diámetro de partícula de 5μ

Fase móvil : fase débil A = 80% v/v disolución acuosa de HClO_4 10^{-2}M y 20% v/v metanol:tetrahidrofurano (97:3).
Con octansulfonato de sodio 0.005M
fase fuerte B = 55% v/v disolución acuosa de HClO_4 10^{-2}M y 45% metanol:tetrahidrofurano (97:3). Con octansulfonato de sodio 0.005M.

Gradiente (35 min).

tiempo (min)	0	15	25	30	35
% B	0	0	20	50	100

Detección : tiempo 0, $\lambda = 280\text{nm}$

tiempo 25, $\lambda = 361\text{nm}$

tiempo 37, $\lambda = 280\text{nm}$

Sensibilidad del detector : 0.01 UA/mV

Flujo : 1 ml/min

Temperatura : 28°C

Integrador : ventana del pico = 1.5

nivel de ruido = 0

- atenuación
- tiempo 0, 32 (0.032 AUFS \approx 0.05 AUFS)
 - tiempo 25, 1 (0.002 AUFS)
 - tiempo 35, 128 (0.128 AUFS \approx 0.1 AUFS)

La aplicación de este método se realizó en una mezcla con materia prima en buffer de acetato de amonio de todas las vitaminas a excepción de la cianocobalamina (de la cual se agregó estándar) con las concentraciones siguientes (que son comúnmente encontradas en los inyectables) :

Niacinamida	50 mg/ml
Piridoxina	5 mg/ml
Riboflavina	solución saturada
Acido fólico	solución saturada
Cianocobalamina	200 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Tiamina	50 mg/ml

III.3.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA

Para probar la linealidad del sistema se inyectaron varias disoluciones estándar de cianocobalamina con diferentes concentraciones, aplicando en cada caso el gradiente de elución anteriormente descrito. Se obtuvo la curva de calibración área vs concentración y se efectuó el análisis de los resultados por regresión lineal.

Las disoluciones inyectadas fueron las siguientes :

disolución	concentración (mg/ml)
1	0.0211
2	0.0421
3	0.0851
4	0.1057
5	0.1692
6	0.3159

Se reportan las concentraciones corregidas por la pureza y humedad del estándar y por el material volumétrico. Se inyectaron 10 μ l de cada disolución por duplicado.

La precisión del sistema se determinó inyectando por sextuplicado una mezcla con todas las vitaminas, obteniendo el coeficiente de variación de las mediciones de área de la cianocobalamina.

III.3.3. LINEALIDAD, PRECISION Y EXACTITUD DEL METODO

La linealidad, repetibilidad y exactitud del método se evaluaron añadiendo a una matriz de vitaminas, sin la cianocobalamina y con las concentraciones ya establecidas, diferentes concentraciones de cianocobalamina estándar de la siguiente manera :

disolución	concentración añadida (mg/ml)
1	0.1142
2	0.2284
3	0.2998

Se reportan las concentraciones corregidas por la pureza y humedad del estándar y el material volumétrico. Cada disolución se analizó por triplicado, inyectando al cromatógrafo 10 μ l.

(*) La matriz de vitaminas se obtuvo después de filtrar la mezcla en una membrana de 0.45 μ , ya que el ácido fólico y la riboflavina son poco solubles.

La exactitud y la repetibilidad del método se determinaron por el cálculo del porcentaje de recobro de la cianocobalamina en cada una de las disoluciones anteriores.

III.3.4. ESPECIFICIDAD EN ANALISIS DE ESTABILIDAD.

Para conocer la especificidad en estabilidad, se expusieron muestras de materia prima de todas las vitaminas a la luz solar durante un mes y al terminar éste periodo se hicieron disoluciones de cada una de ellas con una concentración parecida a la de la muestra y se inyectaron 10 μ l al cromatógrafo empleando el gradiente de elución descrito.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

IV.1. METODO POR CROMATOGRAFIA EN FASE INVERSA

IV.1.1. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y EL PORCENTAJE DE METANOL EN LOS TIEMPOS DE RETENCION DE LAS VITAMINAS.

En la tabla No 4.1, y la figura No 4.1 se muestran los valores del tiempo de retención relativo (t_r') de cada una de las vitaminas en el intervalo de 25°C a 40 °C.

Se puede observar que la niacinamida, la tiamina, la piridoxina y el ácido fólico no presentan variación notable en los t_r' (s) en este intervalo de temperatura, a diferencia de la riboflavina fosfato, la cianocobalamina y la riboflavina base. La curva de la cianocobalamina presenta una pendiente muy marcada entre 25°C y 32°C, intervalo en el que se encuentran las variaciones normales de la temperatura ambiente, por lo que se deduce que es indispensable controlar estrictamente la temperatura para obtener separaciones reproducibles.

En la tabla No 4.2 y la figura No 4.2 se muestran los valores del t_r' de cada una de las vitaminas en función del porcentaje de metanol en la fase móvil.

En este caso, como en el anterior, se observa un efecto muy marcado sobre las riboflavinas y la cianocobalamina, a diferencia de la niacinamida, la tiamina, la piridoxina y el ácido fólico cuyo retención es poco afectada por el contenido de metanol en el intervalo estudiado.

TIEMPO DE RETENCION RELATIVO (tr')
(minutos)

TEMPERATURA (°C)	1	2	3	4	5	6	7
25	1.447	1.273	0.909	0.71	10.775	29.239	34.6
26	1.382	1.211	0.84	0.744	10.455	28.43	33.866
27	1.406	1.267	0.893	0.711	10.845	27.116	34.381
28	1.345	1.219	0.867	0.611	10.826	26.16	33.8
29	1.309	1.096	0.832	1.053	10.135	25.39	32.761
30	1.281	1.138	0.845	1.055	10.115	24.741	31.876
32	1.125	0.923	0.664	0.774	8.841	21.65	28.5
34	1.088	0.945	0.694	0.5	8.458	19.85	26.0
36	1.205	1.057	0.824	0.772	8.336	19.15	25.195
38	1.187	1.033	0.816	0.787	7.99	18.597	23.871
40	1.16	0.962	0.784	0.721	7.696	17.791	23.371

Tabla No 4.1. Influencia de la temperatura en el tiempo de retención relativo de las vitaminas del complejo B. 1 niacinamida, 2 tiamina, 3 piridoxina, 4 ácido fólico, 5 riboflavina fosfato, 6 cianocobalamina, 7 riboflavina base. Fase estacionaria : columna (15cm x 4.6 mm d.i.) empacada con RsilC18HL, 10 μ . Fase móvil : metanol / disolución acuosa de acetato de amonio 0.05 M 18.5 : 81.5 v/v. Detección : 254 nm. Sensibilidad del detector 0.01 UA/mV. Flujo : 1ml/min.

FIGURA 4.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA

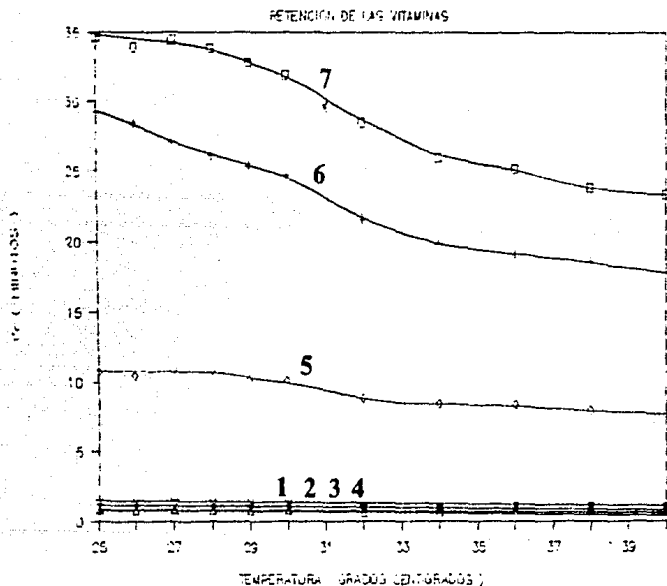


Figura No 4.1. Efecto de la temperatura sobre la retención de las vitaminas del complejo B. 1 niacinamida, 2 tiamina, 3 piridoxina, 4 ácido fólico, 5 riboflavina fosfato, 6 cianocobalamina, 7 riboflavina base. Fase estacionaria : columna (15 cm x 4.6 mm d.i.) empacada con $R_{Si}C_{18}H_{33}N$, 10 μ . Fase móvil : metanol / disolución acuosa de acetato de amonio 0.05 M 18.5 : 81.5. Detección : 254 nm. Sensibilidad del detector 0.01 UA/mV. Flujo 1 ml/min.

TIEMPO DE RETENCIÓN RELATIVO (t_r')
(minutos)

FASE MOVIL (MeOH:H ₂ O)	1	2	3	4	5	6	7
24 : 76	1.054	0.988	0.808	0.073	4.591	6.215	12.326
22 : 78	1.34	1.234	0.997	0.726	6.171	10.414	17.496
21 : 79	1.502	1.475	1.158	0.7	7.06	12.89	20.155
20 : 80	1.297	1.278	0.916	0.524	7.952	16.358	23.898
19.5 : 80.5	1.815	1.782	0.983	0.993	9.188	20.134	27.66
19 : 81	1.606	1.45	1.195	0.917	9.417	21.959	29.012
18.5 : 81.5	1.293	1.169	0.817	1.05	10.776	26.11	31.24
18 : 82	1.563	1.526	0.761	1.0	10.592	26.9	33.277
17.5 : 82.5	1.737	1.649	1.211	1.073	12.24	33.15	38.473
17 : 83	1.772	1.757	1.186	1.092	12.784	38.497	42.32
16 : 84	2.135	2.151	1.451	1.615	15.777	54.431	.

Tabla No 4.2. Influencia del porcentaje de metanol en la fase móvil en el tiempo de retención relativo de las vitaminas del complejo B. 1 niacinamida, 2 tiamina, 3 piridoxina, 4 ácido fólico, 5 riboflavina fosfato, 6 cianocobalamina, 7 riboflavina base. Fase estacionaria : columna (15 cm x 4.6 mm d.i.0 empa - cada con RsilC18HL, 10 μ . Fase móvil : metanol / disolución acuosa de acetato de amonio 0.05 M, variable. Temperatura : 28 °C. Detección 254 nm. Sensibilidad del detector 0.01 UA/mV. Flujo 1 ml/min. * No eluyó antes de 70 minutos.

FIGURA 4.2. EFECTO DEL % DE METANOL

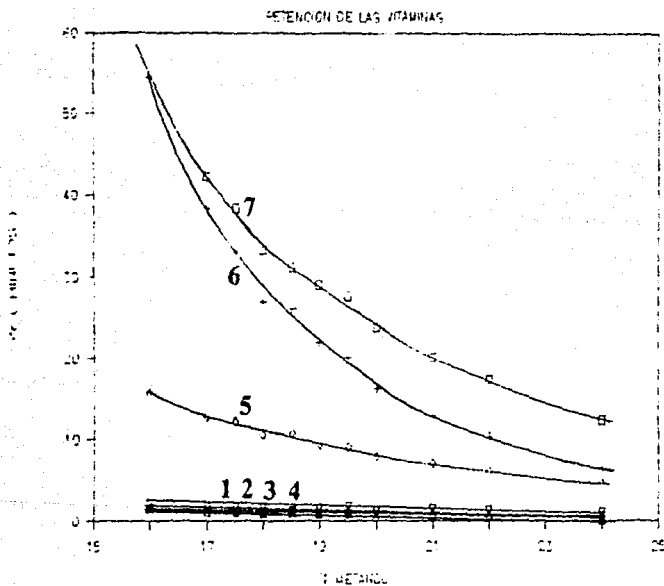


Figura No 4.2. Efecto de la composición de la fase móvil sobre la retención de las vitaminas del complejo B. 1 niacinamida, 2 tiamina, 3 piridoxina, 4 ácido fólico, 5 riboflavina fosfato, 6 cianocobalamina, 7 riboflavina base. Fase estacionaria: columna: empacada con $R_{Si}C_{18}HL$, 10 μ . Fase móvil: metanol: disolución acuosa de acetato de amonio 0.05 M, variable. Temperatura: 28 °C. Detección: 254 nm. Sensibilidad del detector 0.01 UA/mV. Flujo 1 ml/min.

Otras experiencias realizadas a composiciones de fase móvil fuera del intervalo reportado en la figura 4.2 dieron los resultados siguientes :

- con menos del 16% de metanol, la retención de la cianocobalamina y la riboflavina base es excesiva.
- con 30% de metanol en el eluyente, el orden de retención de la cianocobalamina y la riboflavina fosfato se invierte.
- con 50% de metanol todos los solutos eluyen en el volumen muerto de la columna.

De la figura 4.2 se deduce que el intervalo en el cual se pueden obtener buenas separaciones de la cianocobalamina y las riboflavinas, vitaminas que se encuentran cercanas al pico de interés, está aproximadamente entre 22% y 17% de metanol. El porcentaje de metanol a escoger dependerá de las concentraciones relativas de las vitaminas.

Es muy importante notar que el porcentaje de metanol debe ser controlado siempre minuciosamente, ya que cambios pequeños causarán variaciones grandes en el tiempo de retención de la cianocobalamina.

IV.1.2. DETERMINACION DE LA LONGITUD DE ONDA OPTIMA PARA LA DETECCION.

Se obtuvieron los espectros de absorción, en la región ultravioleta-visible, de la cianocobalamina en las mezclas metanol:disolución acuosa de acetato de amonio 0.05 M siguientes :
80 : 20, 50 : 50 y 20 : 80 v/v.

No se observaron cambios en los diferentes espectros, al obtenerlos en las diferentes mezclas, por lo que en la figura 4.3, se presenta solamente el espectro correspondiente a la mezcla 20 : 80.

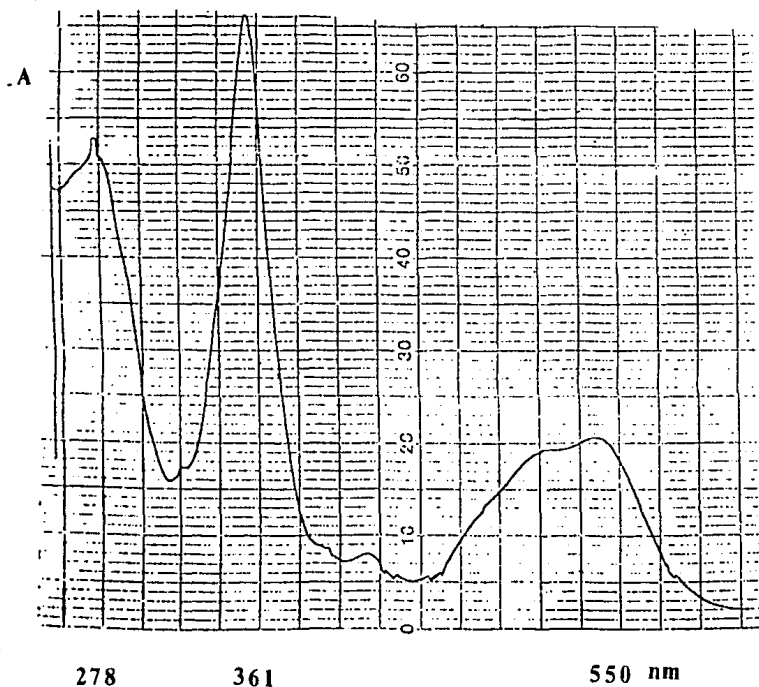


Figura No 4.3. Espectro de absorción de la cianocobalamina en una mezcla metanol/disolución acuosa de acetato de amonio 0.05 M en una proporción 20 : 80 v/v.

Una vez que se determinó que el espectro de absorción de la cianocobalamina no presentó cambios con respecto a la composición de la fase móvil, se eligió el máximo de 361 nm para la detección de la cianocobalamina por las siguientes razones :

- 1) la cianocobalamina presenta mayor absorción
- 2) la tiamina y la niacinamida, que comúnmente se presentan con las concentraciones más altas en las formulaciones, no absorben.
- 3) las vitaminas restantes generalmente absorben menos que a 254 nm, longitud de onda comúnmente utilizada en los análisis cromatográficos.

Finalmente, con la aplicación del método desarrollado, en las figuras 4.4 y 4.5 se muestran los cromatogramas del estándar de cianocobalamina y de la muestra preparada según se describió.

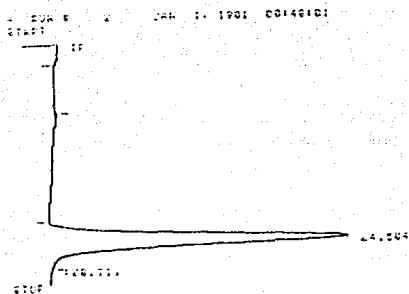


Figura No 4.4. Solución estándar de cianocobalamina 0.0973 mg/ml.
 Fase estacionaria : columna (15 cm x 4.6 mm d.i.) empacada con
 Rsl1CisHL, 10 μ . Fase móvil : metanol/disolución acuosa de acetato
 de amonio 0.05 M 19/81. Temperatura : 28 °C. Detección : 361 nm.
 Sensibilidad del detector : 0.01 UA/mV. Flujo 1 ml/min.

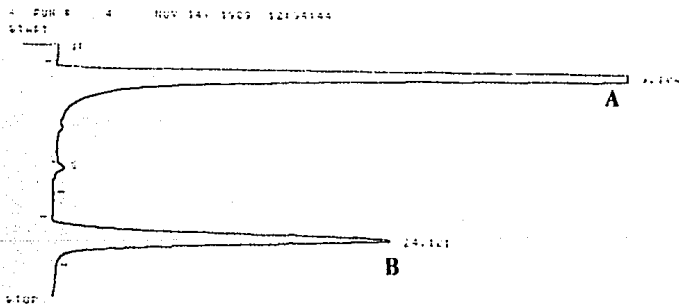


Figura No 4.5 . Análisis de un comprimido. A *piridoxina*,
 B *cianocobalamina*. Fase estacionaria : columna ; (15 cm x 4.6 mm
 d.i.) empacada con Rsl1CisHL, 10 μ . Fase móvil :
 metanol/disolución acuosa de acetato de amonio 0.05 M, 19/81.
 Temperatura 28 °C. Detección 361 nm. Sensibilidad del detector :
 0.01 UA/mV. Flujo 1 ml/min.

IV.1.3. LINEALIDAD Y PRECISION DEL SISTEMA

Con el fin de asegurar que la respuesta del detector, fuera proporcional a la concentración de la cianocobalamina en el intervalo a trabajar, se estudió la linealidad del sistema.

Los resultados se observan en la tabla No 4.3 y en la figura No 4.6 .

Concentración (mg/ml)	Area
0.0193	84581 85551
0.0385	174447 170283
0.0777	342756 319784
0.0973	414845 417864
0.1159	498151 519587
0.1544	702514 693043
0.2421	1040796 1046245

Regresión lineal

$$r = 0.9991$$

$$r^2 = 0.9962$$

$$m = 4343465.865 \pm 116803.19$$

$$b = 2684.0318 \pm 14830.57$$

Prueba de hipótesis para b

$$H_0 : b = \beta \quad \text{donde } \beta = 0$$

$$H_1 : b \neq \beta$$

$$t_{\text{calc.}} = 0.3944$$

$$t_{\text{tablas } \alpha/2, 12} = 2.179$$

$$\text{donde } \alpha = 0.05$$

$$t_{\text{calc.}} < t_{\text{tablas}}$$

Tabla No 4.3. Linealidad del sistema en el método de análisis de la cianocobalamina por cromatografía en fase inversa. r , coeficiente de correlación; m, pendiente; b, ordenada al origen; H_0 , hipótesis nula; H_1 , hipótesis alterna; t valor de student ; α , nivel de significancia.

Figura 4.6. LINEALIDAD DEL SISTEMA

CRONATOGRAFIA EN FASE INVERSA

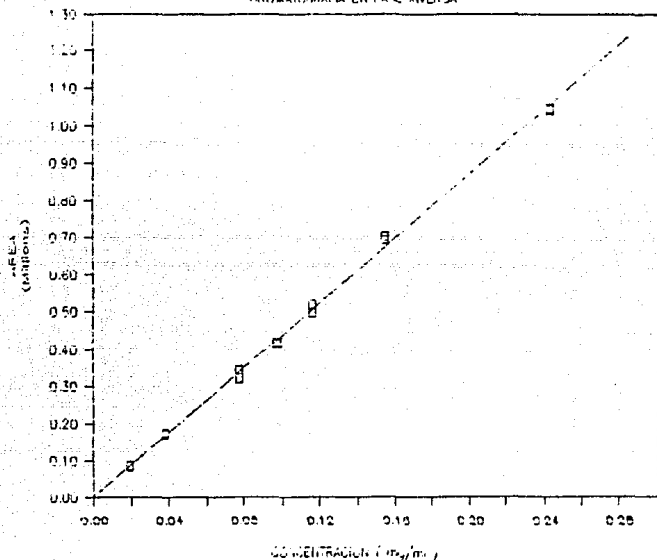


Figura No. 4.6. Linealidad del sistema en el análisis de la cianocobalamina por cromatografía en fase inversa. $r^2 = 0.9982$, $m = 4343465.665$, $b = 2684.0318$. Fase estacionaria; columna (15 cm x 4.6 mm d.i.) empacada con $Rg11C18H_{17}$, 10 μ . Fase móvil: metanol/disolución acuosa de acetato de amonio 0.05 M. v/v. Temperatura: 28 °C. Detección 361 nm. Sensibilidad del detector: 0.01 UA/mV. Flujo; 1 ml/min.

De los resultados se deduce, que el sistema es lineal (con una sensibilidad $\gamma = 80.963$), ya que del análisis de regresión se obtuvo un coeficiente de correlación mayor a 0.98 y la prueba estadística de hipótesis para la ordenada al origen indica que ésta puede considerarse igual a 0.

$$r^2 > 0.98$$

$$b \approx 0$$

Los resultados de la precisión del sistema se muestran en la tabla No 4.4 .

AREA	
427726	$\bar{x} = 420568.5$
412129	D.E = 6695.8032
422731	C.V = 1.59 %
428116	
417854	
414945	

Tabla No 4.4. Precisión del sistema en el análisis de la cianocobalamina por cromatografía en fase inversa. Solución 0.0973 mg/ml. \bar{x} , promedio; D.E., desviación estándar; C.V., coeficiente de variación.

Se obtuvo un coeficiente de variación aceptable considerando que la cianocobalamina es un componente minoritario en la muestra, que su pico esta ligeramente coaleado (factor de coleo $T = 1.166$) y que presenta una anchura de pico relativamente grande, comparada con las otras vitaminas.

IV.1.4. LINEALIDAD Y EXACTITUD DEL METODO. CONTENIDO DE CIANOCOBALAMINA EN EL PRODUCTO COMERCIAL.

Debido a que no se consiguieron los placebos de los comprimidos, la evaluación de la linealidad y exactitud del método se realizó através de una curva de adiciones patrón.

Se adicionaron disoluciones con diferentes concentraciones de cianocobalamina a diferentes porciones de pulverizado del comprimido (con peso conocido) y se analizaron por duplicado.

Se obtuvieron los valores de la concentración adicionada vs area y estos fueron corregidos (para minimizar el error de los diferentes pesos) con el peso del pulverizado para trazar la curva de concentración adicionada/peso de pulverizado vs area/peso de pulverizado, de la cual se obtuvo la concentración de cianocobalamina por mg de pulverizado X_0 (intercepto en la absisa).

Estos resultados se muestran en la tabla 4.5 y en la figura 4.7 .

Posteriormente, a partir de la curva de calibración se calcularon las concentraciones correspondientes a cada uno de los valores de area del experimento de adiciones patrón. Estas concentraciones globales (C.G.) incluyen a los miligramos extraídos del pulverizado y a los miligramos adicionados, por lo que para calcular la concentración recuperada se realizó lo siguiente :

- cada valor de peso de pulverizado (P.P.) fué multiplicado por X_0 para conocer las concentraciones provenientes solamente de los pulverizados (C.P.)

$$(P.P.) (X_0) = (C.P.)$$

- a cada valor de concentración global se le restó el valor correspondiente a la concentración de pulverizado. El resultado fué la concentración recuperada (C.R.)

$$(C.G.) - (C.P.) = C.R.$$

Peso pulv. (P.P.) mg	Conc. adic. mg/ml	Area	Conc adic./P.P. mg/ml / mg	Area/P.P.
618.90	0.00	468975	0.00	757.7557
		472935		764.1541
618.51	0.0912	860479	1.4738×10^{-4}	1391.2128
		846427		1393.2257
618.64	0.1356	1078218	2.1316×10^{-4}	1742.8844
		1102288		1781.7923
618.11	0.1820	1268436	2.9447×10^{-4}	2057.1202
		1245564		2015.1171

Regresión lineal para la curva de conc. adic./P.P. vs area/P.P.:

$$r = 0.9984$$

$$r^2 = 0.9968$$

$$m = 4385880.61 \pm 251455.1$$

$$b = 762.5 \pm 49.7324$$

$$X_0 = 1.7385 \times 10^{-4}$$

Tabla No 4.5. Adiciones patron para el análisis de la ciano - cobalamina por cromatografía en fase inversa. r, coeficiente de correlación; m, pendiente; b, ordenada al origen; X_0 , intercepto en la absisa.

FIGURA 4.7. ADICIONES PATRON

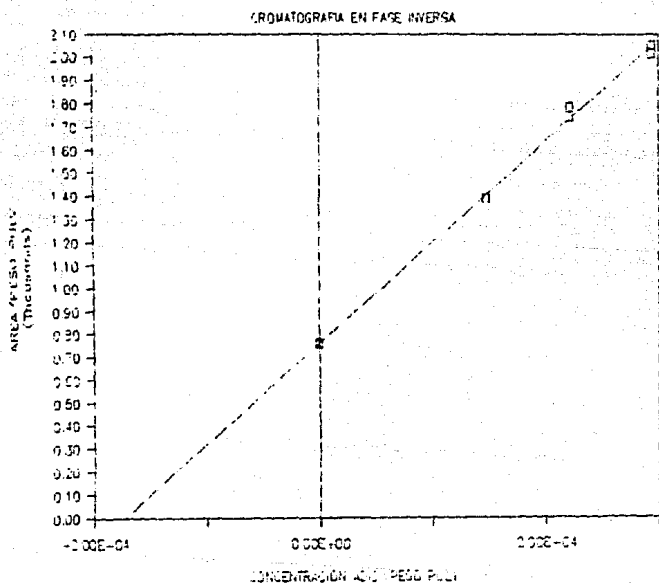


Figura 4.7. Curva de adiciones patrón para el análisis de la cianocobalamina por cromatografía en fase inversa. $r^2 = 0.9968$; $m = 4385880.61$; $b = 762.5$; $X_0 = 1.7385 \times 10^{-4}$. Fase estacionaria ; columna (15 cm x 4.6 mm d.i.) empacada con $\text{RslC}_{18}\text{HL}$, 10 μ . Fase móvil : metanol/disolución acuosa de acetato de amonio 0.05 M. v/v. Temperatura : 28 °C. Detección 361 nm. Sensibilidad del detector : 0.01 UA/mV. Flujo ; 1 ml/min.

Finalmente se hizo el análisis de regresión lineal con los datos de la curva de concentración adicionada vs concentración recuperada.

De los resultados, que se muestran en la tabla No 4.6, y la figura No 4.8, se observa que el método es lineal, ya que el coeficiente de correlación es mayor a 0.98 y de las pruebas de hipótesis se concluye que la pendiente puede considerarse igual a 1 y la ordenada al origen igual a 0.

$$r^2 > 0.98$$

$$m \approx 1$$

$$b \approx 0$$

La exactitud se determinó con los porcentajes recuperados de cianocobalamina en las muestras adicionadas. Estos se presentan en la tabla No 4.7.

De la prueba de hipótesis se deduce que se recupera el 100 %, es decir que el método es exacto, aunque el coeficiente de variación es relativamente alto, probablemente debido a variaciones en la preparación de la muestra.

Peso pulv. (P.P.)	conc. adic. mg/ml	Conc. glob. (C.G.) mg/ml	Conc. pulv. (C.P.) mg/ml	Conc. recup. (C.R.) mg/ml
618.90	0.00	0.1074 0.1083	0.1076	0.00 0.00
618.51	0.0912	0.1975 0.1943	0.1075	0.0899 0.0867
618.64	0.1356	0.2476 0.2532	0.1076	0.1401 0.1456
618.11	0.1820	0.2914 0.2861	0.1075	0.1840 0.1787

Regresión lineal para la curva de concentración adicionada vs concentración recuperada :

$$r = 0.9981$$

$$r^2 = 0.9961$$

$$m = 1.0121 \pm 0.0735$$

$$b = -2.9676 \times 10^{-4} \pm 8.9847 \times 10^{-3}$$

Pruebas de hipótesis.

para la pendiente :

$$H_0 : m = \delta \quad \text{donde } \delta = 1$$

$$t_{calc.} = 0.4030$$

$$H_0 : m \neq \delta$$

$$t_{tablas} \alpha/2, 8 = 2.447$$

$$t_{calc.} < t_{tablas} \quad \alpha = 0.05$$

para la ordenada al origen :

$$H_0 : b = \beta \quad \text{donde } \beta = 0$$

$$t_{calc.} = 0.0808$$

$$H_0 : b \neq \beta$$

$$t_{tablas} \alpha/2, 8 = 2.447$$

$$t_{calc.} < t_{tablas}, \alpha = 0.05$$

Tabla No 4.6 .Linealidad del método del análisis de la cianocobalamina por cromatografía en fase inversa. r, coeficiente de correlación; m, pendiente; b, ordenada al origen; H_0 , hipótesis nula; H_1 , hipótesis alterna; α , nivel de significancia; t, valor de student.

FIGURA 4.8. LINEALIDAD DEL METODO

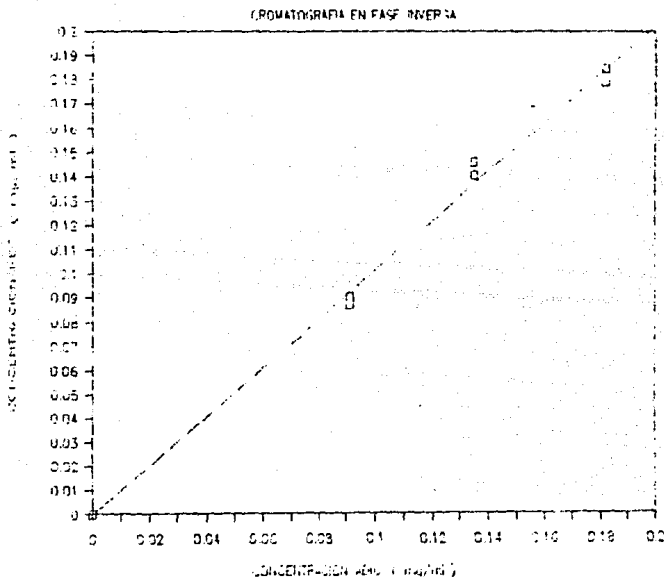


Figura No. 4.8. Linealidad del método de análisis de la cianocobalamina por cromatografía en fase inversa. $r^2 = 0.9961$; $m = 1.0121$; $b = -2.9676 \times 10^{-4}$. Fase estacionaria ; columna (15 cm x 4.6 mm d.i.) empacada con RsilC18HLL, 10 µ. Fase móvil : metanol/disolución acuosa de acetato de amonio 0.05 M. v/v. Temperatura : 28 °C. Detección 361 nm. Sensibilidad del detector : 0.01 UA/mV. Flujo ; 1 ml/min.

Conc. Adic.	Conc. Recup.	% Recobro
0.0912	0.0899	98.6868
	0.0867	99.0028
0.1356	0.1401	103.3080
	0.1456	107.3953
0.1820	0.1840	101.0657
	0.1787	98.1727

$$\bar{x} = 101.2719$$

$$D.E. = 3.5530$$

$$C.V. = 3.55 \%$$

Prueba de hipótesis para la exactitud

$$H_0 : \bar{x} = \mu \quad \text{donde } \mu = 100 \quad t_{calc.} = 0.5062$$

$$t_{tablas} \alpha/2, 4 = 2.776$$

$$H_1 : \bar{x} \neq \mu \quad \alpha = 0.05$$

$$t_{calc} < t_{tablas}$$

Tabla No 4.7. Exactitud del método de análisis de la cianocobalamina por cromatografía en fase inversa. \bar{x} , promedio; D.E., desviación estándar; C.V., coeficiente de variación; H_0 , hipótesis nula; H_1 , hipótesis alterna; α , nivel de significancia; t , valor de student. Las concentraciones se dan en mg/ml.

Como ya se mencionó anteriormente, el valor de X_0 es la concentración de cianocobalamina por mg de polvo, entonces, para conocer la concentración de cianocobalamina por comprimido, X_0 se multiplicó por el peso equivalente a un comprimido (607mg).

Así, la concentración es :

$$0.1055\text{mg/ml o } 1.055 \text{ mg/comprimido}$$

Para verificar si la cantidad de cianocobalamina indicada por el fabricante (1 mg por comprimido), fué igual a la determinada, se calculó el intervalo de confianza para X_0 (a partir de un análisis de regresión lineal para la curva de adiciones patrón, con la inversión de las variables.

El valor de X_0 con su intervalo de confianza es :

$$1.7278 \times 10^{-4} \pm 4.875 \times 10^{-5}$$

transformando a valores de concentración :

$$0.1055 \pm 0.0296 \text{ mg/ml}$$

el límite superior es :

$$0.1345 \text{ mg/ml o } 1.345 \text{ mg/comprimido}$$

el límite inferior es :

$$0.07529 \text{ mg/ml o } 0.7529 \text{ mg/comprimido}$$

como el valor reportado por el fabricante esta incluido dentro del intervalo de confianza, el producto si contiene la cantidad especificada.

IV.1.5. CONCENTRACION MINIMA DETECTABLE

La concentración mínima detectable (C.M.D.) fué calculada a partir del límite superior del intervalo de confianza de la ordenada al origen de la curva de la concentración adicionada vs la concentración recuperada. El valor de la ordenada al origen con su intervalo de confianza es :

$$-2.9676 \times 10^{-4} \pm 8.9847 \times 10^{-3}$$

el límite superior es :

$$8.6879 \times 10^{-3}$$

En la ecuación :

$$y = 1.0121x - 2.9676 \times 10^{-4}$$

se sustituye en "y" el valor del límite superior, y se despeja "x" para obtener la concentración mínima detectable. Así :

$$\text{C.M.D.} = x = \frac{8.6879 \times 10^{-3} + 2.9676 \times 10^{-4}}{1.0121}$$

$$\text{C.M.D.} = 8.88 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$$

Como se observa, con este método pueden detectarse bien, hasta decenas de $\mu\text{g/ml}$. Para el caso en que se quisieran cuantificar concentraciones menores, del orden de las unidades de microgramo, se sugiere optimizar y validar el método con una sensibilidad del detector mayor.

IV.1.6. PRECISION DEL METODO

Para conocer el grado de concordancia entre los resultados sucesivos obtenidos con el método, bajo las mismas condiciones de trabajo (analista, aparato, tiempo), se hizo el experimento de repetibilidad analizando por triplicado 4 muestras diferentes (ver tabla No 4.8).

Muestra	mg/ml
1	0.1104
	0.1127
	0.1127
2	0.1137
	0.1163
	0.1172
3	0.1090
	0.1146
	0.1149
4	0.1165
	0.1175
	0.1150

$$\bar{x} = 0.1142$$

$$D.E. = 2.634 \times 10^{-3}$$

$$C.V. = 2.306 \%$$

Tabla No 4.8. Repetibilidad del método de análisis de la cianocobalamina por cromatografía de líquidos en fase inversa. \bar{x} , promedio; D.E., desviación estándar; C.V., coeficiente de variación.

El coeficiente de variación de todas las concentraciones determinadas, aunque es mayor al 2 %, puede considerarse aceptable considerando que la cianocobalamina es un soluto minoritario, que tiene un pico un poco coleado, y que tiene una anchura grande, comparado con el de las otras vitaminas.

Por otra parte, para conocer el grado de concordancia entre los resultados individuales obtenidos con el mismo método pero bajo diferentes condiciones de trabajo, se hizo el experimento de reproducibilidad, analizando por triplicado 3 diferentes muestras cada día, durante 2 días diferentes y con dos analistas.

Las tablas 4.9 y 4.10, muestran respectivamente los datos obtenidos y el análisis de varianza de los mismos.

		ANALISTAS		
D I A		0.0980	0.1000	$\bar{x} = 0.0994$ D.E. = 1.8194 C.V. = 1.823 %
		0.0984	0.1010	
		0.1038	0.0994	
		0.1006	0.0975	
		0.0976	0.0980	
		0.1002	0.0988	

Tabla No 4.9. Datos de la reproducibilidad del método de análisis para la cianocobalamina por cromatografía en fase inversa. \bar{x} , promedio; D.E., desviación estándar; C.V., coeficiente de variación. Las concentraciones se dan en mg/ml.

Fuente	Grados	Suma	Media	Fcalc	Fteor
variación	libertad	Cuadrados	Cuadrados		
α_1	1	1.149×10^{-6}	1.149×10^{-6}	0.33	18.51^1
β_1	2	6.97×10^{-6}	3.486×10^{-6}	0.988	4.46^2
$\epsilon_{k(ij)}$	8	2.822×10^{-5}	3.527×10^{-6}		

Modelo estadístico : $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \delta_{j(i)} + \epsilon_{k(ij)}$

1 Fteórica 0.05, 1/2

2 Fteórica 0.05, 2/8

Tabla No 4.10. Análisis de varianza para la reproducibilidad del método de análisis de la cianocobalamina por cromatografía de líquidos en fase inversa. Y_{ijk} , concentración; μ , media general; α_i , efecto del analista; $\delta_{j(i)}$, efecto del día; $\epsilon_{k(ij)}$, error experimental; F, valor de Snedecor.

Del análisis de varianza se observa que las Fcalculadas son menores que las Fteóricas, por lo tanto, no hay diferencias significativas entre analistas y entre días, siendo reproducible el método, además de que el coeficiente de variación en menor al 2%.

Se utilizó un modelo estadístico con una variable anidada porque los días de análisis fueron diferentes en todos los casos, es decir se realizó todo el estudio en 4 días.

Es interesante notar que el coeficiente de variación del experimento de reproducibilidad sea menor que el coeficiente de variación del experimento de repetibilidad. Cabe aclarar que se realizaron con columnas, que aunque iguales en composición, diferían en eficiencia. La eficiencia de la columna puede influir en la precisión resultante de la integración del pico de la cianocobalamina, ya que como se ha mencionado anteriormente, éste presenta un ligero coleo y una anchura considerable. Así al tenerse picos más delgados, hay menos variación.

IV.1.7. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Se procedió a probar la estabilidad de algunas muestras del experimento de reproducibilidad. Estas muestras, que se guardaron a temperatura ambiente y protegidas de la luz, se volvieron a analizar después de 24 horas.

Se hizo una prueba estadística de hipótesis para conocer si el cociente concentración inicial/concentración después de 24 horas, era igual a 1, ya que éste se acercara más a la unidad conforme menos diferencias existan entre ambas concentraciones.

De la tabla No 4.11, se deduce con una confianza del 95 % que la muestra es estable durante 24 horas porque la t calculada es menor que la t tablas, siempre que ésta sea conservada protegida de la luz.

Muestra	Conc. inic. mg/ml (I)	Conc. 24 hrs. mg/ml (S)	S/I
1	0.1015	0.0992	0.9779
2	0.0987	0.0981	0.9942
3	0.0980	0.0967	0.9863
4	0.1045	0.0981	0.9375

$S/I_{prom} = 0.974$ Prueba de hipótesis para S/I

D.E. = 0.0252 $H_0 : S/I = 1$

C.V. = 2.591% $H_1 : S/I \neq 1$

$t_{calc} = 2.061$

$t_{tablas} \alpha/2, 2 = 4.303$

$t_{calc} < t_{tablas}$, $\alpha = 0.05$

Tabla No 4.11. Estabilidad de la muestra en el análisis de la cianocobalamina por cromatografía en fase inversa. S/I $_{prom}$, promedio del cociente S/I; D.E., desviación estándar; C.V., coeficiente de variación; H_0 , hipótesis nula; H_1 , hipótesis alterna; t, valor de student.

IV.1.8. ESPECIFICIDAD EN ANALISIS DE ESTABILIDAD

Para determinar la especificidad en estabilidad del método en relación a los productos de degradación de las vitaminas, se expusieron a la luz solar muestras de materia prima de las vitaminas que absorben a 361 nm, durante un mes. En las figuras 4.9-4.13, se muestran los cromatogramas de estas vitaminas, después del tiempo mencionado y se observa que los productos de degradación interfieren en el análisis de la cianocobalamina (a excepción de la riboflavina base), por lo que se deduce que el método no puede utilizarse para estudios de estabilidad, solamente para control de calidad.

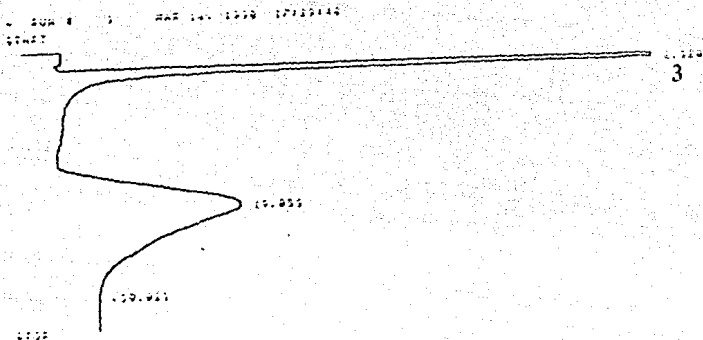


Figura No 4.9 . Piridoxina después de exposición a luz solar. 3, *piridoxina*. Fase estacionaria : columna (15cm X 4.6mm d.i.) empacada con Rsl1CisHL , 10 μ . Fase móvil : metano/disolución acuosa de acetato de amonio 0.05 M 19/81 v/v. Temperatura : 28°C. Detección : 361 nm. Sensibilidad del detector : 0.01 UA/mV. Flujo : 1 ml/min.

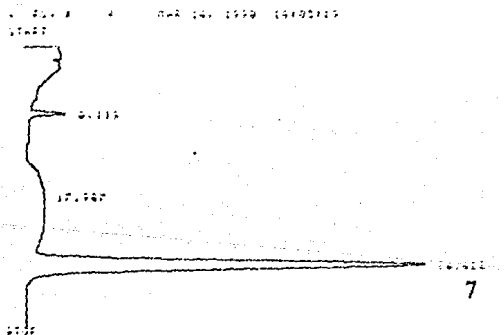


Figura No 4.10. Riboflavina después de exposición a la luz solar 7, *riboflavina*. Fase estacionaria : Columna (15 cm X 4.6 mm d.i.) Rsl1CisHL , 10 μ Fase móvil : metanol/disolución acuosa de acetato de amonio 0.05 M v/v. Temperatura : 28 °C. Detección : 361 nm. Sensibilidad del detector : 0.01 UA/mV. Flujo : 1ml/min.

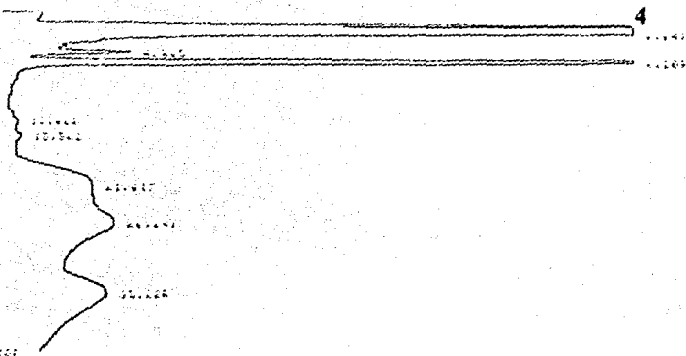


Figura No 4.11 . Acido fólico después de exposición a luz solar.
4. Acido fólico. Fase estacionaria : columna (15ca X 4.8 mm d.i.)
empacada con RsilCnHL, 10 μ . Fase móvil : metanol/disolución
acuosa de acetato de amonio 0.05 M 19/81. Temperatura : 28 °C.
Detección : 361 nm. Sensibilidad del detector : 0.01 UA/mV.
Flujo: 1 ml/min.

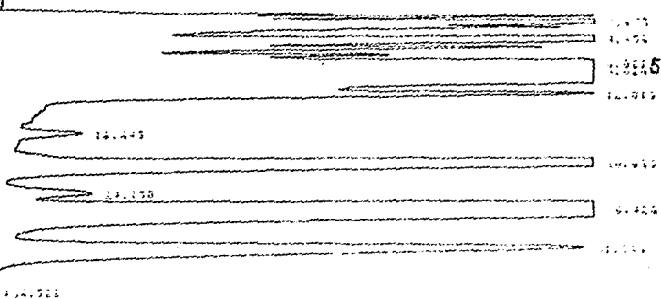


Figura No 4.12 Fosfato de riboflavina después de exposición a la
luz solar. 5. Fosfato de riboflavina Fase estacionaria : columna
(15 cm X 4.8 mm d.i.) empacada con RsilCnHL, 10 μ . Fase móvil ;
metanol/disolución acuosa de acetato de amonio 0.05 M 19/81 v/v.
temperatura : 28 °C. Detección : 361 nm. Sensibilidad del
detector: 0.01 UA/mV. Flujo 1ml/min.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

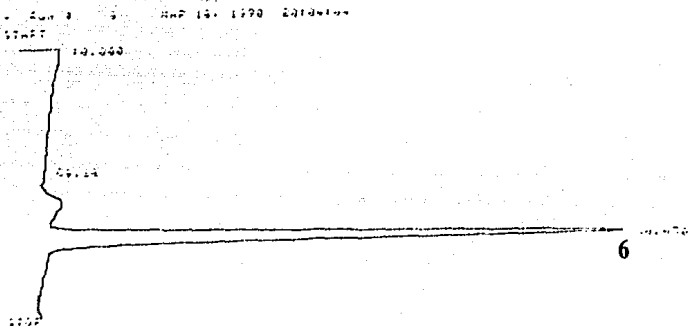


Figura No 4.13. Cianocobalamina después de exposición a la luz solar. 6. cianocobalamina. Fase estacionaria : columna (15 cm x 4.6 mm d.i.) empacada con $R_{Si}C_{18}H_{11}$, 10 μ . Fase móvil : metanol/disolución acuosa de acetato de amonio 0.05 M. v/v. Temperatura : 28 °C. Detección 361 nm. Sensibilidad del detector : 0.01 UA/mV. Flujo ; 1 ml/min.

IV.2. METODO POR CROMATOGRAFIA DE PARES DE IONES.

Como se mencionó anteriormente este método se realizó con un gradiente de elución con la utilización de un formador de pares de iones en la fase móvil, que fué el octansulfonato de sodio. La figura No 4.14, muestra el cromatograma de la separación obtenida.

Se trabajó únicamente con materia prima de las vitaminas mencionadas y un estándar de cianocobalamina, por lo que la aplicación del método se realizó sobre una mezcla de todas las vitaminas en concentraciones semejantes a un inyectable común. Los resultados de los experimentos de linealidad, precisión, exactitud y especificidad se describen a continuación.

IV.2.1. LINEALIDAD Y PRECISION DEL SISTEMA.

Para verificar que la respuesta del detector fuera proporcional a la concentración de la cianocobalamina en el intervalo a trabajar se estudió la linealidad del sistema.

Al igual que el método anterior, se usó la medida de áreas para el análisis de la cianocobalamina, ya que así se pudieron obtener resultados más precisos.

Los resultados que se presentan en la tabla No 4.12 y en la figura No 4.15, muestran que el sistema es lineal. (con una sensibilidad $\gamma = 32.115$) puesto que se obtuvo un coeficiente de correlación mayor a 0.98 y la prueba estadística de hipótesis para la ordenada al origen indica que ésta puede considerarse igual a cero.

$$r^2 > 0.98$$

$$b = 0$$

La precisión del sistema fué determinada inyectando por quintuplicado una mezcla de vitaminas con aproximadamente 100 $\mu\text{g/ml}$ de cianocobalamina, cuyos resultados se muestran en la tabla No.4.13.

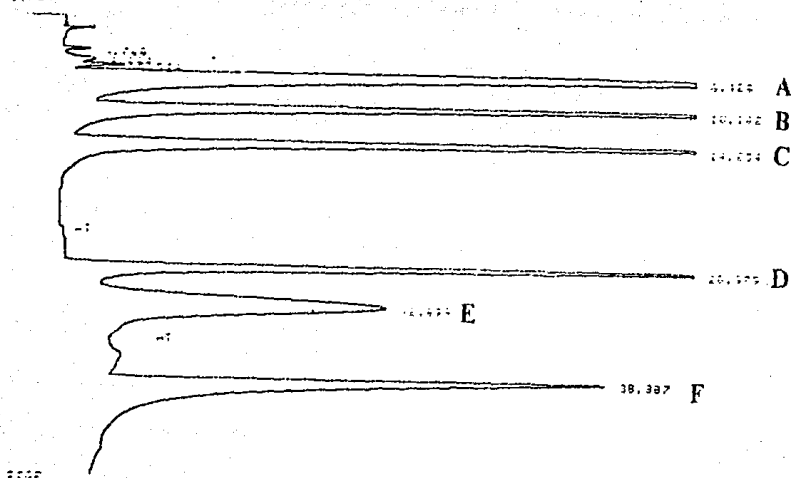


Figura No 4.14. Mezcla de vitaminas hidrosolubles. A, niacinamida; B, piridoxina; C, riboflavina; D, ácido fólico. E, cianocobalamina; F, tiamina. Fase estacionaria : columna (15cm X 4.6mm d.i.) empacada con $RSi(C_8H_{17})_2Si_2O_5$, 5 μ . Fase móvil : A = 20% metanol:tetrahidrofurano (97:3)/80% disolución acuosa de $HClO_4$ 0.01M v/v, con octansulfonato de sodio 0.005M y B = 45% metanol:tetrahidrofurano (97:3)/ disolución acuosa de $HClO_4$ 0.01 M v/v., en gradiente de elución cóncavo. Temperatura 28°C. Detección 254 nm. Sensibilidad del detector : 0.01 UA/mV. Flujo : 1 ml/min.

Concentración mg/ml	Area
0.0211	81507 77792
0.0421	145377 160718
0.0851	406726 408011
0.1057	506356 492041
0.1692	672267 671969
0.3157	1249329 1250472

Regresión lineal

$$r = 0.9952$$

$$r = {}^2 0.9904$$

$$m = 3914477.418 \pm 272042.15$$

$$b = 27954.2242 \pm 42837.439$$

Prueba de hipótesis para b

$$H_0 : b = \beta \text{ donde } b = 0$$

$$H_1 : b \neq \beta$$

$$t_{calc} = 1.453$$

$$t_{tablas} \alpha/2, 10 = 2.228$$

$$\text{donde } \alpha = 0.05$$

$$t_{calc} > t_{tablas}$$

Tabla No 4.12. Linealidad del sistema en el análisis de la cianocobalamina cromatografía de pares de iones. r, coeficiente de correlación; m, pendiente, b, ordenada al origen; H_0 , hipótesis nula; H_1 , hipótesis alterna; α , nivel de significancia; t, valor de Student.

Areas
346910
347661
357282
358976
339757

$$\bar{x} = 355838.4$$

$$D.E. = 8879.475$$

$$C.V. = 2.49 \%$$

Tabla No 4.13. Precisión del sistema para el método de análisis de la cianocobalamina por cromatografía de pares de iones. \bar{x} , promedio; D.E., desviación estándar; C.V., coeficiente de variación.

FIGURA 4.15. LINEALIDAD DEL SISTEMA

CRÓMATOGRAFIA DE PARES DE IONES

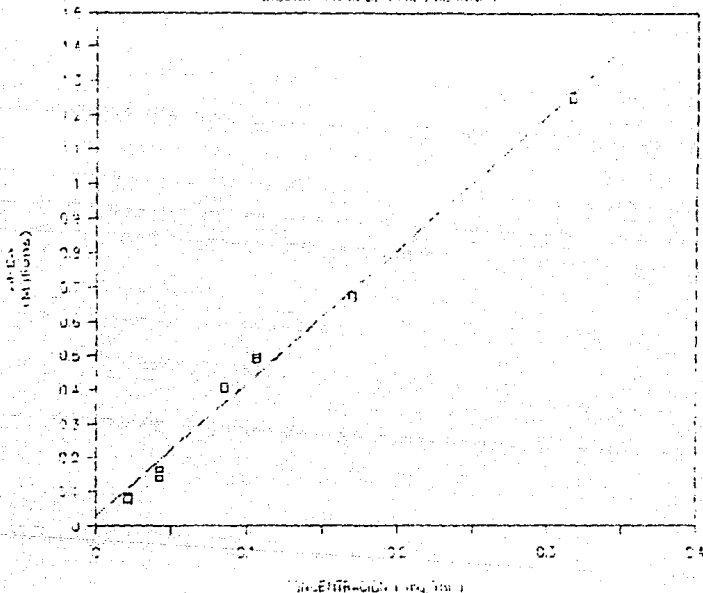


Figura No. 4.15. Linealidad del sistema para el análisis de la cianocobalamina por cromatografía de pares de iones. $r^2 = 0.9904$; $m = 3914477.418$; $b = 27964$. Fase estacionaria : columna (15cm X 4.6mm d.i.) empacada con $R_{Si}Cl_{18}H_{11}$, 5 μ . Fase móvil : A = 20% metanol:tetrahidrofurano (97:3)/80% disolución acuosa de $HClO_4$ 0.01M v/v, con octansulfonato de sodio 0.005M y B = 45% metanol:tetrahidrofurano (97:3)/ disolución acuosa de $HClO_4$ 0.01 M v/v., en gradiente de elución cóncavo. Temperatura 28°C. Detección 254 nm. Sensibilidad del detector : 0.01 UA/mV. Flujo : 1 ml/min.

El coeficiente de variación, aunque es ligeramente mayor al 2 %, puede considerarse aceptable, ya que la cianocobalamina es un componente minoritario que presenta un pico algo coleado (factor de coleo $T = 1.07$) y con anchura considerable, además de que no presenta el efecto de gradiente característico de la mayoría de los picos, en donde éstos no tienen anchuras dependientes del tiempo de retención, a diferencia de lo que sucede en la elución isocrática. También es importante tomar en cuenta que en un análisis cromatográfico por pares de lones, los picos son siempre más anchos.

IV.2.2. LINEALIDAD , EXACTITUD Y PRECISION DEL METODO

La linealidad del método se determinó adicionando a una matriz de vitaminas (sin la cianocobalamina), diferentes concentraciones de cianocobalamina estándar . Del análisis de cada disolución se obtuvo la concentración recuperada de cianocobalamina en base a la curva de calibración.

El análisis de regresión lineal indicó la relación existente entre la concentración adicionada y la concentración recuperada. Como puede observarse en la tabla No 4.14 y en la figura No 4.16 , se presentó una relación lineal aceptable puesto que el coeficiente de correlación fue mayor a 98 y se aceptaron las hipótesis que establecen que la pendiente puede considerarse igual a la unidad y la ordenada al origen igual a cero.

$$r^2 > 98$$

$$m \approx 1$$

$$b \approx 0$$

Con el por ciento de recobro de cada una de las disoluciones, que fueron analizadas por triplicado, se determinó la exactitud del método. Estos cálculos también se encuentran en la tabla No 4.14 , de donde se observa que el método es exacto, puesto que se recuperó el 100 %, como lo indica la prueba de hipótesis para la media .

Conc. adic. mg/ml	Area	Conc. recup. mg/ml	% Recobro
0.1142	464700	0.1157	97.6812
	466851	0.1121	98.1622
	477696	0.1149	100.5880
0.2284	923285	0.2287	100.1246
	906190	0.2244	98.2129
	936473	0.2321	101.5994
0.2998	1197241	0.2987	99.6207
	1241678	0.3101	103.4067
	1266547	0.3164	105.5255

Regresión lineal para curva conc.adic. vs conc. recup.

Datos : $r = 0.9379$

$r^2 = 0.9958$

$m = 1.0495 \pm 0.0607$

$b = -8.2155 \times 10^{-3} \pm 0.0138$

Prueba de hipótesis para m :

$H_0 : m = \delta$ donde $\delta = 1$ $t_{calc} = 1.929$

$H_1 : m \neq \delta$ $t_{tablas} \alpha/2,7 = 2.365$
 $\alpha = 0.05, t_{calc} < t_{tablas}$

Prueba de hipótesis para b :

$H_0 : b = \beta$ donde $\beta = 0$ $t_{calc} = 1.406$

$H_1 : b \neq \beta$ $t_{calc} < t_{tablas}$

Prueba de hipótesis para la exactitud

Datos : $\bar{x} = 100.5468$

D.E. = 2.609

C.V. = 2.595 %

$H_0 : \bar{x} = \mu$ donde $\mu = 100$ $t_{calc} = 0.5575$

$H_1 : \bar{x} \neq \mu$ $t_{tablas} \alpha/2,7 = 2.365$

$t_{calc} < t_{tablas}$

Tabla No 4.14. Linealidad y exactitud del método de

análisis de la cianocobalamina por cromatografía de pa-

res de iones. r, coeficiente de correlación; m, pendien-

te; b, ordenada al origen; \bar{x} , promedio de los porcenta-

jes de recobro, D.E., desviación estándar; C.V., coefi-

ciente de variación; H_0 , hipótesis nula; H_1 , hipótesis

alternativa; t, valor de Student; α , nivel de significancia.

FIGURA 4.16. LINEALIDAD DEL METODO

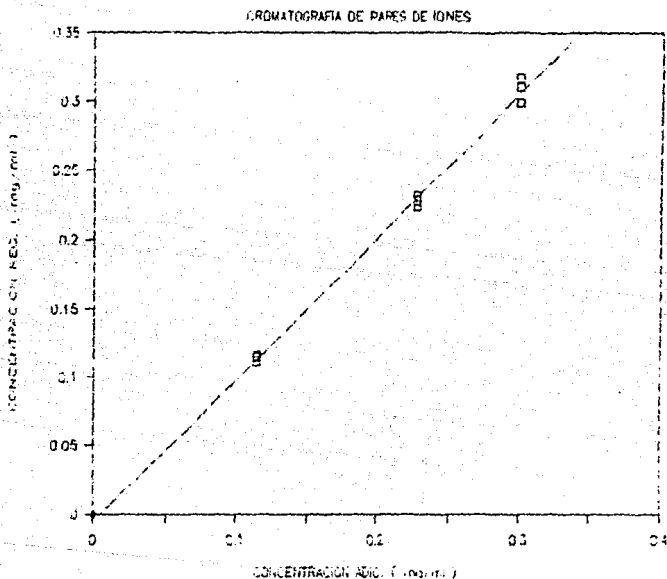


Figura No. 4.16. Linealidad del método de análisis de la cianocobalamina por cromatografía de pares de iones. $r^2=0.9358$; $m = 1.0495$; $b = -8.2155 \times 10^{-2}$. Fase estacionaria: columna (15cm X 4.6mm d.i.) empacada con RslC18HL, 5 μ . Fase móvil: A = 20% metanol:tetrahidrofurano (97:3)/80% disolución acuosa de HClO₄ 0.01M v/v, con octansulfonato de sodio 0.005M y B = 45% metanol:tetrahidrofurano (97:3)/ disolución acuosa de HClO₄ 0.01 M v/v., en gradiente de elución cóncavo. Temperatura 28°C. Detección 254 nm. Sensibilidad del detector: 0.01 UA/mV. Flujo: 1 ml/min.

Cabe notar que se hicieron pruebas para la recuperación con soluciones por abajo del intervalo estudiado, de aproximadamente 0.01 mg/ml y 0.03 mg/ml y se encontró que de las primeras se recuperó alrededor del 55 % y de las segundas alrededor del 80 %. Esto podría deberse a que la cianocobalamina en soluciones más diluidas es inestable en presencia de las otras vitaminas.

La precisión fué evaluada solamente con la repetibilidad en los análisis de cada una de las mezclas adicionadas con cianocobalamina. Se obtuvo un coeficiente de variación que puede considerarse aceptable, tomando en cuenta las características del pico de la cianocobalamina, que ya fueron descritas.

I.V.2.3. CONCENTRACION MINIMA DETECTABLE

La concentración mínima detectable fué calculada a partir del límite superior del intervalo de confianza de la ordenada al origen de la curva de concentración adicionada vs. concentración recuperada.

El valor de la ordenada al origen con su intervalo de confianza es :

$$- 8.2155 \times 10^{-3} \pm 0.0138$$

el límite superior es :

$$5.6004 \times 10^{-3}$$

En la ecuación :

$$y = 1.0495 x - 8.2155 \times 10^{-3}$$

donde x = concentración adicionada y y = concentración recuperada se sustituye en y el valor del límite superior, y se despeja x para obtener la concentración mínima detectable:

$$C.M.D. = x = \frac{5.6004 \times 10^{-3} + 8.2155 \times 10^{-3}}{1.0495}$$

$$C.M.D. = 0.0132 \text{ mg/ml } \text{ o } 13 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Esto indica que se pueden detectar bien las decenas de microgramos por mililitro.

IV.2.4. ESPECIFICIDAD EN ANALISIS DE ESTABILIDAD

Al hacer el estudio de la especificidad, en los cromatogramas se observó (figuras 4.17-4.22)que solo se obtuvieron productos de degradación detectables de la niacinamina, con un pico en 9.159 minutos, que interferiría en el análisis de la piridoxina, y de la riboflavina que es altamente sensible a la luz. De las otras vitaminas no se obtuvieron productos de degradación detectables.

Entonces, este método es específico para la cianocobalamina, siempre y cuando la riboflavina no este presente, y para las demás vitaminas se puede decir lo mismo, a excepción de la piridoxina.

TECHNICAL SERVICE CENTER

• PUN # 6 APR 22, 1998 16:00:43

START

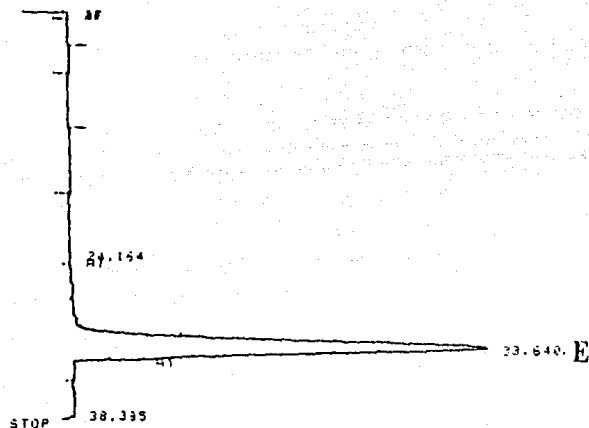


Figura No 4.17. Cianocobalamina después de exposición a la luz solar. **E**, cianocobalamina. Fase estacionaria : columna (15cm X 4.6mm d.i.) empacada con Rsl1C18HL , 5 μ . Fase móvil : A = 20% metanol:tetrahidrofurano (97:3)/80% disolución acuosa de HClO_4 0.01M v/v, con octansulfonato de sodio 0.005M y B = 45% metanol:tetrahidrofurano (97:3)/ disolución acuosa de HClO_4 0.01 M v/v, con octansulfonato de sodio 0.005 M en gradiente de elución cóncavo. Temperatura 28°C. Detección 254 nm. Sensibilidad del detector : 0.01 UA/mV. Flujo : 1 ml/min.

NEW INJECTION 0.01M

Run 8 11/22/1990 11:44:49

Time

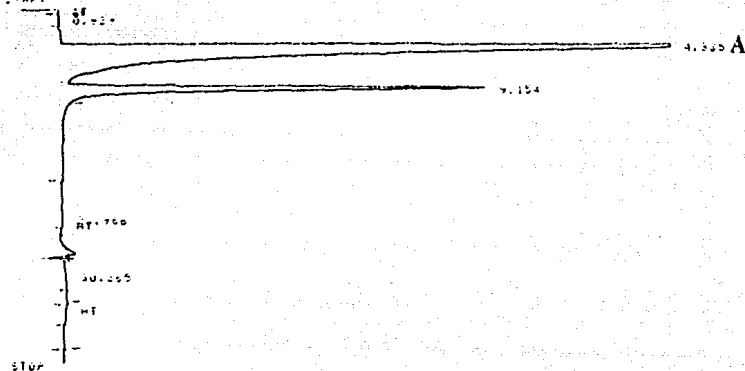


Figura No 4.18. Niacinamida después de exposición a la luz solar.
A. niacinamida. Fase estacionaria : columna (15cm X 4.6mm d.i.)
empacada con $\text{R}_8\text{H}_2\text{C}_{18}\text{HL}$, 5 μ . Fase móvil : A = 20%
metanol:tetrahidrofurano (97:3)/80% disolución acuosa de HClO_4
0.01M v/v. con octansulfonato de sodio 0.005M y B = 45%
metanol:tetrahidrofurano (97:3)/ disolución acuosa de HClO_4 0.01 M
v/v. con octansulfonato de sodio 0.005 M gradiente de elución
cóncavo Temperatura 28°C. Detección 254 nm. Sensibilidad del
detector : 0.01 UA/mV. Flujo : 1 ml/min.

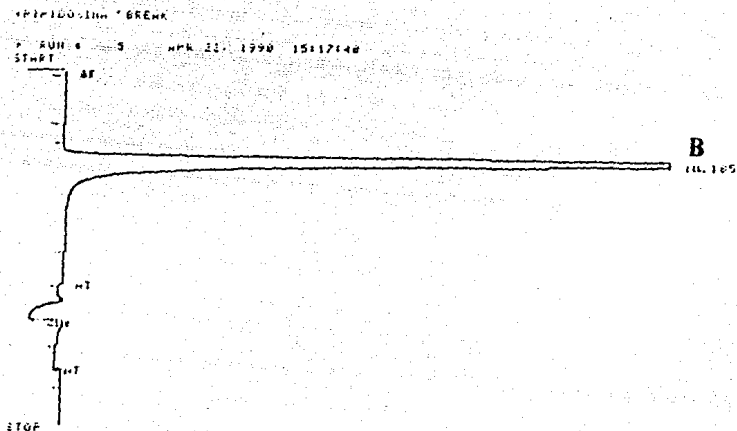


Figura No 4.19. Piridoxina después de exposición a la luz solar.
B. piridoxina. Fase estacionaria : columna (15cm X 4.6mm d.i.)
 empacada con RsilC18HL, 5 μ . Fase móvil : A = 20%
 metanol:tetrahidrofurano (97:3)/80% disolución acuosa de HClO₄
 0.01M v/v, con octansulfonato de sodio 0.005 M y B = 45%
 metanol:tetrahidrofurano (97:3)/ disolución acuosa de HClO₄ 0.01 M
 v/v, con octansulfonato de sodio 0.005 M, en gradiente de elución
 cóncavo. Temperatura 28°C. Detección 254 nm. Sensibilidad del
 detector : 0.01 UA/mV. Flujo : 1 ml/min.

RIBOFLAVINA BREN

* RUN # 2 WPR 22, 1990 12:49:48

START

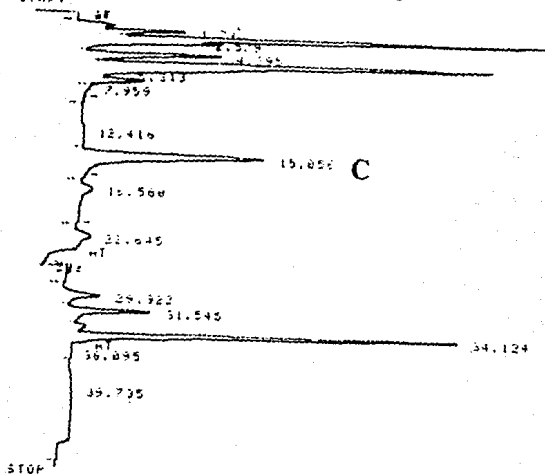


Figura No 4.20 . Riboflavina después de exposición a la luz solar.
C. riboflavina. Fase estacionaria : columna (15cm X 4.6mm d.i.) empacada con $Rs_{11}C_{18}HL$, 5 μ . Fase móvil : A = 20% metanol:tetrahidrofurano (97:3)/80% disolución acuosa de $HClO_4$ 0.01M v/v, con octansulfonato de sodio 0.005 M y B = 45% metanol:tetrahidrofurano (97:3)/ disolución acuosa de $HClO_4$ 0.01 M v/v, con octansulfonato de sodio 0.005 M. en gradiente de elución cóncavo. Temperatura 28°C. Detección 254 nm. Sensibilidad del detector : 0.01 UA/mV. Flujo : 1 ml/min.

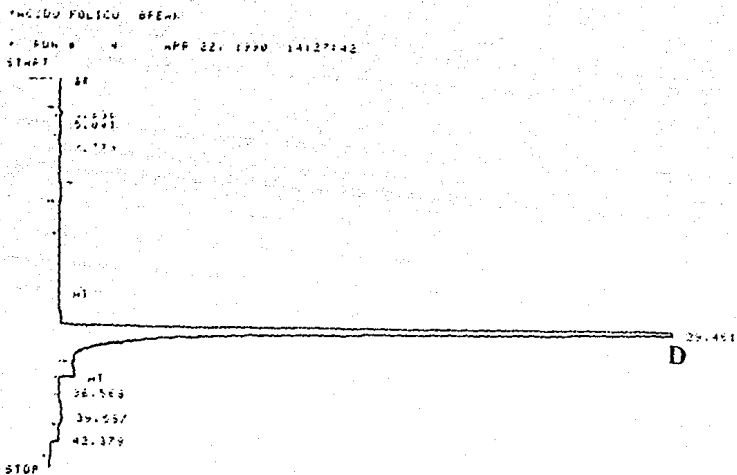


Figura No 4.21. Acido fólico después de exposición a la luz solar.
D. ácido fólico. Fase estacionaria : columna (15cm X 4.6mm d.i.)
 empacada con Rsl1C19HL , 5 μ . Fase móvil : A = 20%
 metanol:tetrahidrofurano (97:3)/80% disolución acuosa de HClO_4
 0.01M v/v. con octansulfonato de sodio 0.005 M y B = 45%
 metanol:tetrahidrofurano (97:3)/ disolución acuosa de HClO_4 0.01 M
 v/v. con octansulfonato de sodio 0.005 M. en gradiente de elución
 cóncavo. Temperatura 28°C. Detección 254 nm. Sensibilidad del
 detector : 0.01 UA/mV. Flujo : 1 ml/min.

• TI-MINIM BREW

• RUN # 1 NPP 22, 1990 11149107
• TIME

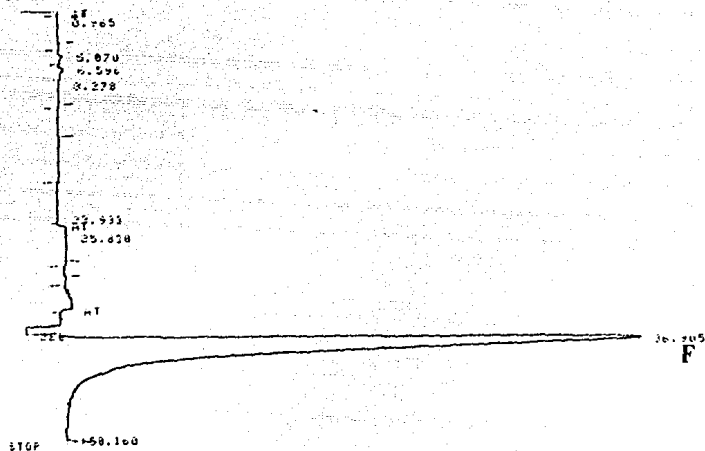


Figura No 4.22 . Tiamina después de exposición a la luz solar. **F**.
Tiamina. Fase estacionaria : columna (15cm X 4.6mm d.i.) empacada
con RS11C16HL, 5 μ . Fase móvil : A = 20% metanol:tetrahidrofurano
(97:3)/80% disolución acuosa de HClO₄ 0.01M v/v, con
octansulfonato de sodio 0.005 M y B = 45% metanol:tetrahidrofurano
(97:3)/ disolución acuosa de HClO₄ 0.01 M v/v. con octansulfonato
de sodio 0.005 M. en gradiente de elución cóncavo. Temperatura
28°C. Detección 254 nm. Sensibilidad del detector : 0.01 UA/mV
Flujo : 1 ml/min.

V. CONCLUSIONES

Se desarrolló metodología analítica exacta, precisa y lineal para la determinación de la cianocobalamina en preparaciones polivitaminicas por cromatografía de líquidos de alta resolución.

El método por cromatografía en fase inversa, exclusivo para la cianocobalamina, puede ser utilizado para hacer un análisis muy rápido y sencillo de ésta, puesto que las condiciones de trabajo son muy simples, es decir, se realiza con elución isocrática y con una longitud de onda fija para la detección.

El método por cromatografía de pares de iones puede utilizarse para el análisis simultáneo de todas las vitaminas estudiadas. Este se realiza con un gradiente de elución relativamente sencillo (de forma cóncava) y con programación de la longitud de onda para la detección, que resuelve el problema de las diferencias en concentraciones tan marcadas entre las vitaminas.

Como se estudió al desarrollar el método por cromatografía en fase inversa, es estrictamente necesario controlar la temperatura y la composición de la fase móvil para tener buena reproducibilidad en el análisis. Para el método por cromatografía de pares de iones, aunque no se hizo un estudio completo como en el caso anterior, también se observó la dependencia de la cianocobalamina de los parámetros mencionados.

Con los métodos aquí desarrollados se puede cuantificar perfectamente a la cianocobalamina en soluciones que contengan del orden de 100 $\mu\text{g/ml}$. En caso de que se quisieran hacer cuantificaciones en preparaciones con concentraciones aún menores, los métodos pueden ser optimizados y evaluados con una sensibilidad del detector mayor.

Es importante notar que la precisión de los métodos puede ser aumentada al utilizar columnas de mayor eficiencia, ya que al presentarse los picos más delgados la variación en la integración de los mismos es menor.

Los métodos no resultaron ser específicos para las condiciones de degradación a que fueron sometidas las vitaminas, por lo que éstos no pueden usarse para estudios de estabilidad; en cambio, para el análisis de control de calidad si son adecuados, ya que estas condiciones tan severas de degradación, no son representativas de las condiciones comunes de almacenamiento de estos productos.

Los métodos pueden utilizarse con confianza para el análisis de materia prima, y aunque fueron probados, el primero con una sola marca de comprimidos, y el segundo, con una mezcla en disolución acuosa, representan un buen avance para la optimización y validación de metodología para diferentes productos con vitaminas hidrosolubles.

Sin dejar de considerar que el análisis de cada formulación es especial, la metodología analítica aquí desarrollada pretende contribuir al análisis general de las preparaciones polivitámicas por cromatografía de líquidos de alta resolución.

VI. BIBLIOGRAFIA

- 1) Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Quinta edición. Secretaría de Salud. México, 1988.
- 2) The United States Pharmacopoeia XXI/National Formulary XVI, USP Convention, Rockville, M.D., 1985.
- 3) Florey, K. Editor. Analytical Profiles of Drug Substances. Vol 10. The Squibb Institute for Medical Research. Academic Press, 1978: 183
- 4) Remington's Pharmaceutical Sciences. 170 Ed. Mack Publishing Company. Easton, Pensilvania, 1985.
- 5) Lehninger, A.L. Biochemistry. Second edition. Worth Publishers INC. New York, 1978.
- 6) The Merck Index. Eleventh edition. Merck & Co INC Rahway. N.J. USA, 1989.
- 7) Vera Avila, L.E. Apuntes de Cromatografía Líquida Moderna. Maestría en Química Analítica. Facultad de Química UNAM.
- 8) Mc Nair, H.M.; Esquivel, B. Cromatografía Líquida de Alta Presión. Segunda edición. Secretaría general de la DEA. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. 1980.
- 9) Snyder, L.R. and Kirkland, J.J. Introduction to Modern Liquid Chromatography. Second edition. John Wiley & Sons INC. New York, 1978.
- 10) Karger, B.L.; Snyder, L.R.; Horvath, C. An Introduction to Separation Science. John Wiley & Sons INC New York, 1973.
- 11) Vera-Avila, L.E.; Caude, M & Rosset, R., Analisis. 10, 1982 : 36.
- 12) Del Rey, M.E. & Vera-Avila, L.E., J. Liq. Chromatogr., 10, 1987 : 2911.
- 13) Del Rey, M.E. & Vera-Avila, L.E., J. Liq. Chromatogr., 11, 1988
- 14) Knox, J.H. & Laird, G.R., J. Chromatogr., 149, 1976 : 297.
- 15) Knox, J.H. & Jurand, J. J Chromatogr., 149, 1978 : 297.
- 16) Kraak, J.C., Jonker, K.M. & Huber, F.K., J. Chromatogr., 142, 1977 : 671.

- 17) Frenkel, E.P. J. Chromatogr., 174, 1979 : 393.
- 18) Morita, E. & Mizuno, N. J. Chromatogr., 202, 1980 : 134.
- 19) Vanderslice, J.T. & Maire, C.E. J. Chromatogr., 196, 1980 : 176.
- 20) Ohta, T; Baba, Y.; Suzuki & Okada, E., J. Chromatogr. 284, 1984 : 281.
- 21) Erlinda, S.P.; Reyes, K.; Norris, M.; Taylor, Ch. & Potts, D. J. Assoc. off Anal. Chem. 71(1), 1988 : 16.
- 22) De Kleijn, J.P. & Jansen, Ch.C. J. Assoc. off. Anal. Chem. 71(1), 1988 : 446.
- 23) Kothari, R.M. & Taylor, M.W., J. Chromatogr., 247, 1982 : 187.
- 24) Wills, C.G. et al. J. Chromatogr. Sci. 15, 1977 : 262.
- 25) Dong, M.W.; Lepore, J. & Tarumoto, T., J. Chromatogr., 442, 1988 : 81.
- 26) Woollard, D.C., J. Chromatogr., 301, 1984 : 470.
- 27) Roderic, P.; Kwok, W.P. ; Rose, R.T. & J. of Pharm. Sci. 70(9). 1981.
- 28) Amin, M., J. Chromatogr., 390, 1987; 448.
- 29) Kirchmeier & Upton, R.P. J. of Pharm. Sci. 67(10), 1978 :
- 30) Wang, E. & Hou, W., J. Chromatogr., 447, 1988 : 256.
- 31) De Ritter, E. J. of Pharm. Sci. 71(10), 1982 : 1073.
- 32) García del Valle, b.G., Tesis de Licenciatura : Desarrollo y validación de un método para la determinación de vitaminas del complejo B en un polifarmaco por cromatografía de líquidos de alta resolución. Facultad de Química, UNAM, 1988.
- 33) Montgomery, D. Design and Analysis of Experiments. Second Edition. John Wiley & Sons. New York, 1984.
- 34) Massart, D.L.; Dijkstra, A. & Kaufman, L. Evaluation and Optimization of Laboratory Methods and Analytical Procedures. Elsevier Scientific Publishing Company, 1985.

- 35) Innav, E. L. et al. J.of Chromatogr. Sci. 25, 1987 : 252.
- 36) The United States Pharmacopeia XXII. USP Convention
Rockville, M.D, 1990.
- 37) Goodman, L.S. & Gilman, A. The Pharmacological basis of
therapeutics. Tercera edición. The Mc. Millan Company New York,
1955.

VII. APENDICE

REGRESION LINEAL.

Pendiente:

$$m = \frac{N (\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{N (\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

Ordenada al origen :

$$b = \frac{\sum y - m (\sum x)}{N}$$

Coefficiente de correlación :

$$r^2 = \frac{\left[N (\sum xy) - (\sum x)(\sum y) \right]^2}{\left[N (\sum x^2) - (\sum x)^2 \right] \left[N (\sum y^2) - (\sum y)^2 \right]}$$

donde :

N = número total de datos

x = variable independiente

y = variable dependiente

$\sum x$ = sumatoria de los valores de x

$\sum y$ = sumatoria de los valores de y

$\sum x^2$ = sumatoria de cada uno de los valores de x elevados al cuadrado

$\sum y^2$ = sumatoria de cada uno de los valores de y elevados al cuadrado.

m = pendiente

b = ordenada al origen

PRUEBAS DE HIPOTESIS.

$$MCE = \frac{\sum y^2 - \left[(b)(\sum xy) + (m)(\sum xy) \right]}{N - 2}$$

$$S_{xx} = \frac{\sum x^2 - (\sum x)^2}{N}$$

Pendiente :

$$t \text{ calculada} = \frac{m - 1}{\left[\frac{MCE}{S_{xx}} \right]^{1/2}}$$

Intervalo de confianza :

$$m \pm t \text{ tablas } \alpha/2, N-2 \left[\frac{MCE}{S_{xx}} \right]^{1/2}$$

Ordenada al origen :

$$t \text{ calculada} = \frac{b - 0}{\left[MCE \left[\frac{1}{N} + \frac{(x)^2}{S_{xx}} \right] \right]^{1/2}}$$

Intervalo de confianza :

$$b \pm t_{\text{tablas } \alpha/2, N-2} \left[\text{MCE} \left[\frac{1}{N} + \frac{(x)^2}{S_{xx}} \right] \right]^{1/2}$$

Intervalo de confianza para un valor ajustado :

$$\hat{y}_1 \pm t_{\text{tablas } \alpha/2, n-2} \left[\text{MCE} \left[\frac{1}{N} + \frac{(x_1 - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right] \right]$$

Exactitud al 100 % :

$$t_{\text{calculada}} = \frac{\text{PROM. del \% rec.} - 1}{\frac{\text{D.E.}}{(N)^{1/2}}}$$

Estabilidad de la muestra :

$$t_{\text{calculada}} = \frac{\text{S/IPROM} - 1}{\frac{\text{D.E.}}{(N)^{1/2}}}$$

donde :

MCE = media cuadrada del error

Sxx = suma de cuadrados corregida de x

t = valor de student

\bar{x} = promedio de los valores de x

PROM = PROMEDIO

S/IPROM = promedio de los valores del cociente:
concentración después de 24 hrs / concentración inicial

DE = desviación estándar

ANALISIS DE VARIANZA.

Cálculo de la tabla de ANADEV.

Con el modelo : $y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_{j(i)} + \epsilon_{k(ij)}$

donde :

μ = media general

α_i = Efecto del analista. Representado por valores de $a = 2$

$\beta_{j(i)}$ = Efecto del día anidado en el analista. Representado por valores de $b = 2$.

$\epsilon_{k(ij)}$ = Error experimental. Representado por valores de $r = 3$.

Matriz de tratamientos :

		ANALISTA	
D		y111	y211
I		y112	y212
		y113	y213
A		y121	y221
		y122	y222
		y123	y223

Tabla de ANADEV

fuente variación	grados libertad	suma de cuadrados	media de cuadrados	F calculada
F.V.	G.L.	S.C.	M.C.	

α_i	$a - 1$	$\sum_{i=1}^a \frac{y_{i..}^2}{br} - \frac{y_{...}^2}{abr}$	$SC\alpha/GL\alpha$	$MC\alpha/MC\beta$
$\beta_{j(i)}$	$(b-1)a$	$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \frac{y_{ij.}^2}{r} - \frac{\sum y_{i..}^2}{br}$	$SC\beta/GL\beta$	$MC\beta/MC\epsilon$
$\epsilon_{k(ij)}$	$(r-1)ab$	$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^r y_{ijk}^2 - \frac{\sum y_{ij.}^2}{r}$		

donde :

$$y_{ijk}^2 = y_{111}^2 + y_{112}^2 + y_{113}^2 + y_{211}^2 + y_{212}^2 + y_{213}^2 + y_{121}^2 + y_{122}^2 + y_{123}^2 + y_{221}^2 + y_{222}^2 + y_{223}^2$$

$$y_{i.}^2 = (y_{111} + y_{112} + y_{113})^2 + (y_{211} + y_{212} + y_{213})^2 + (y_{121} + y_{122} + y_{123})^2 + (y_{221} + y_{222} + y_{223})^2$$

$$y_{i..}^2 = (y_{111} + y_{112} + y_{113} + y_{121} + y_{122} + y_{123})^2 + (y_{211} + y_{212} + y_{213} + y_{221} + y_{222} + y_{223})^2$$

$$y_{...}^2 = y_{111} + y_{112} + y_{113} + y_{211} + y_{212} + y_{213} + y_{121} + y_{122} + y_{123} + y_{221} + y_{222} + y_{223}$$

SENSITIVIDAD.

$$r = \frac{m}{E.S.}$$

donde E.S. es el error estándar de la regresión.

ERROR ESTANDARD DE LA REGRESION.

$$E.S. = \left[\frac{\sum (y - \hat{y})^2}{N - 2} \right]^{1/2}$$

donde \hat{y} es un valor ajustado.

FACTOR DE COLEO.

$$T = \frac{w \cdot 0.05}{2 f}$$

donde :

$w \cdot 0.05$ = distancia de la base del pico tomada al 5 % de su altura.

f = distancia del pico, desde su lado izquierdo hasta la línea vertical que parte desde el máximo del pico, tomada al 5 % de su altura.