



91
24
Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

**DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO
ANALITICO POR CROMATOGRAFIA DE
LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION PARA
CUANTIFICAR GLICINA EN UN POLVO ORAL.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Quimico Farmaceutico Biologo

P R E S E N T A:

CLAUDIA VERONICA NORIEGA ABSALON

México, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1991.



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.

DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR
GLICINA EN UN POLVO ORAL.

INDICE:

| | PAGINAS: |
|---|----------|
| I. - INTRODUCCION | 1 |
| II.- GENERALIDADES..... | 2 |
| A) Monografía de Glicina | 2 |
| II.- FUNDAMENTOS DE LA TECNICA DESARROLLADA | 4 |
| A) Generalidades sobre Cromatografía de | |
| líquidos de Alta Resolución | 4 |
| 1.- Definición | 4 |
| 2.- Ventajas y limitaciones | 5 |
| 3.- Teoría | 5 |
| 4.- Instrumentación | 9 |
| 5.- Tipos de Cromatografía | 15 |
| B) Técnicas de derivación para cuantificar | |
| aminoácidos..... | 17 |
| 1.- Por Intercambio Iónico | 18 |
| 2.- Por Fase Inversa | 19 |
| 2.1.- Formación de Derivados OPA-Aminoácidos.... | 21 |
| IV.- PLANTEAMIENTO TEORICO | 25 |
| A) Validación | 25 |
| B) Parámetros de Validación | 26 |

| | |
|---|----|
| C) Valoración estadística | 30 |
| V.- PARTE EXPERIMENTAL | 32 |
| A) Desarrollo del método | 32 |
| B) Método Desarrollado | 35 |
| 1.- Equipo, material y reactivos utilizados | 35 |
| 2.- Procedimiento | 36 |
| 3.- Condiciones cromatográficas | 38 |
| 4.- Cálculos | 38 |
| C) Validación del método analítico | 41 |
| D) Resultados y análisis de resultados | 45 |
| 1.- Linealidad del sistema | 45 |
| 2.- Precisión y exactitud del Sistema | 47 |
| 3.- Linealidad del método | 49 |
| 4.- Precisión y exactitud del método | 50 |
| 5.- Repetibilidad | 53 |
| 6.- Reproducibilidad | 55 |
| 7.- Estabilidad de la muestra | 58 |
| 8.- Tolerancia | 63 |
| 9.- Especificidad | 65 |
| VI.- CONCLUSIONES | 88 |
| VII.-BIBLIOGRAFIA | 90 |

INTRODUCCION.

Dentro de la investigación de nuevos medicamentos, el desarrollo analítico juega un papel muy importante, ya que sin el apoyo que brinda una técnica analítica confiable sería imposible conocer las características que tendría un nuevo medicamento o una nueva formulación. Por lo tanto para que exista el desarrollo farmacéutico es necesario el desarrollo analítico.

Una de las técnicas analíticas más utilizadas en nuestros días para la cuantificación de fármacos es la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) porque reúne características de sensibilidad, rapidez y especificidad, mismas que son de suma importancia en los métodos analíticos actuales.

En el presente trabajo de investigación se pretende en primer lugar desarrollar un método analítico para cuantificar Glicina (ácido aminoacético) contenida en un nuevo medicamento cuya forma farmacéutica es en polvo oral, utilizando la técnica de CLAR. El método deberá ser específico puesto que se pretende utilizarlo para monitoriar la estabilidad del producto. Una vez desarrollado el método se procederá a validarlo puesto que se debe demostrar su linealidad, precisión, reproducibilidad, tolerancia y especificidad; para así poder utilizar el método con confiabilidad.

MONOGRAFIA DEL ACIDO AMINOACETICO (GLICINA) (1,2,3)

El ácido aminoacético es el más simple de los aminoácidos y es clasificado como un aminoácido no esencial.

Fórmula Molecular: $C_2H_5NO_2$

Peso Molecular: 75.07

Fórmula Desarrollada: NH_2-CH_2-COOH

Descripción y Propiedades Físicas: Polvo blanco cristalino, inodoro, tiene un sabor algo dulce, muy soluble en agua (un gramo en cuatro mililitros de agua), ligeramente soluble en alcohol, etanol y en éter.

Sus pKa son: $pK_1 = 2.34$, $pK_2 = 9.60$

La fórmula del ácido aminoacético se escribe comúnmente NH_2-CH_2-COOH , pero varias de sus propiedades físicas y químicas indican que no existe en esta forma. La tendencia del grupo carboxilo es donar un protón y la tendencia del grupo amino es aceptar un protón, resultando en la migración de un protón del grupo carboxilo al grupo amino, para dar lugar a un ión neutro $NH_3^+-CH_2-COO^-$, tal ión recibe el nombre de ión dipolar o "zwitterion"; esta propiedad es característica de los aminoácidos. Por esta razón el ácido aminoacético es capaz de actuar como ácido o base dependiendo de la existencia en el medio de disolución de una base o ácido.

Usos: Se ha utilizado para el tratamiento de varias miopatías e insuficiencias periféricas vasculares, así como

antiácido gástrico. Es utilizado algunas veces junto con el carbonato de calcio u otros antiácidos en el tratamiento de la hiperacidez gástrica. También se utiliza como ingrediente de algunas tabletas de aspirina con el objetivo de disminuir la irritación gástrica. Soluciones estériles de ácido aminoacético al 1.5% en agua son utilizadas para la irrigación de la vesícula durante cirugías genito-uritarias.

GENERALIDADES SOBRE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS

DE ALTA RESOLUCION (CLAR) (4,5,6,7)

La cromatografía líquida de alta resolución es la técnica analítica cromatográfica más ampliamente utilizada. La cromatografía es, esencialmente, un método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de ellas es un lecho estacionario, mientras la otra se mueve por percolación a través de este lecho. En la cromatografía líquida la fase móvil es un líquido.

La moderna cromatografía líquida, se caracteriza por:

- Columnas reutilizables de pequeño diámetro (2-5 mm.)
- Rellenos de columna de partículas muy pequeñas (5-50 μ m)
- Presiones de entrada relativamente altas y flujo controlado de la fase móvil
- Introducción precisa de la muestra, sin necesidad de grandes cantidades.
- Detectores continuos especiales, capaces de operar a caudales muy bajos y de detectar cantidades muy pequeñas.
- Instrumentos normalizados y automatizados, análisis rápidos y alta resolución.

Entre estas características, se eligió inicialmente la presión como criterio principal de la moderna cromatografía líquida, por ello se denominó cromatografía líquida de alta presión (HPLC, High pressure liquid chromatography). Sin embargo, la presión constituye un factor negativo que no

contribuye a mejorar la separación. En reconocimiento de este hecho, actualmente se denominan a esta técnica cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, High performance liquid chromatography)

VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA

ALTA RESOLUCION.

Al igual que toda técnica analítica la cromatografía líquida de alta resolución tiene ventajas y limitaciones, las cuales, se pueden apreciar en la tabla siguiente:

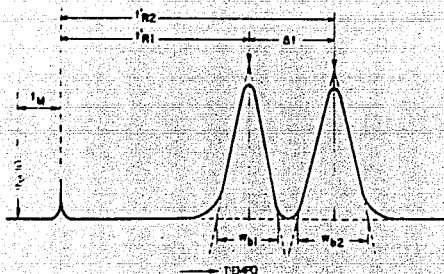
| VENTAJAS | LIMITACIONES |
|-----------------------------------|-------------------------------------|
| - Rapidez de análisis | - Instrumentación costosa |
| - Alta resolución | - Difícil análisis cualitativo |
| - Automatización | - Ausencia de un detector universal |
| - Alta precisión cuantitativa | - Elevado costo de operación |
| - Amplio espectro de aplicaciones | - Experiencia indispensable |
| - Alta sensibilidad | |
| - Alta especificidad | |

TEORIA (1,5,6,7)

Toda la información que se puede obtener de cualquier proceso cromatográfico queda registrada gráficamente en un cromatograma.

Para poder utilizar dicha información se han desarrollado relaciones matemáticas que definen a los parámetros cromatográficos.

Dentro de los parámetros más importantes, se encuentran: el tiempo de retención (t_r), el tiempo de retención ajustado (t_r'), el tiempo muerto (t_m), área del pico (A), ancho de la base (W_b), número de platos teóricos (n), altura equivalente a un plato teórico (AEPT), coeficiente de reparto (K), factor de capacidad (K'), retención relativa o selectividad (α), razón de fase (β), resolución (R), y velocidad lineal promedio de la fase móvil (μ).



El tiempo de retención (t_r), es el tiempo transcurrido desde la introducción de la muestra hasta que el detector registre el máximo del pico. Es característico para un soluto dado, siempre y cuando se conserven las mismas condiciones de operación.

El tiempo muerto (t_m), es el tiempo requerido para eluir una muestra no retenida en la columna y se determina

midiendo el tiempo de retención de la fase móvil misma, o bien de una muestra similar.

El tiempo de retención ajustado (tr'), es el tiempo que permanece el soluto en la fase estacionaria.

Los tres parámetros anteriores se encuentran relacionados por la siguiente ecuación:

$$tr = tr' + tm$$

Anchura de la base de las señales (Wb), es la porción de línea base interceptada por tangentes trazadas a ambos lados de una señal cromatográfica.

La eficiencia de la columna se mide con el número de platos teóricos (n), o bien con la altura equivalente a un plato teórico (AEPT). Un plato teórico se define como un equilibrio del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria y se calcula mediante cualquiera de las siguientes ecuaciones:

$$N = 16 \left[\frac{tr'}{Wb} \right]^2 = 5.54 \left[\frac{tr'}{W/2} \right]^2$$

Donde W/2, es el ancho a la mitad de la altura del pico. El ancho de la base se relaciona con el ancho a la mitad de la altura del pico por medio de: $Wb = 1.699W/2$

La altura equivalente a un plato teórico es la longitud de la columna requerida para un plato teórico. La longitud generalmente se expresa en mm:

$$AEPT = \frac{L}{N}$$

Se observa fácilmente que a mayor número de platos teóricos, y menor AEPT, es más eficiente la columna.

El coeficiente de Reparto (K), es una constante termodinámica característica para cada soluto a una temperatura dada y a determinadas características de operación:

$$K = \frac{\text{Conc. soluto fase estacionaria}}{\text{conc. soluto fase móvil}}$$

El factor de capacidad (K') relaciona la cantidad del soluto en gramos, de las dos fases

$$K' = \frac{g \text{ soluto fase estacionaria}}{g \text{ soluto fase móvil}}$$

Es posible relacionarlo con el coeficiente de reparto, mediante la ecuación: $K = K'\beta$

Donde β es la razón de fases:

$$\beta = \frac{\text{volumen fase móvil}}{\text{volumen fase estacionaria}}$$

La retención relativa o factor de separación (α) está dada por:

$$\alpha = \frac{tr'(b)}{tr'(a)} = \frac{K_b}{K_a} = \frac{K'b}{K'a}$$

Donde $tr'(b) > tr'(a)$

Es la relación de los tiempos en que dos componentes de la muestra permanecen en la fase estacionaria. Por definición tienen valores iguales o mayores de la unidad y es una medida de la selectividad del sistema cromatográfico.

La resolución es el grado de separación de dos picos. Se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$R_s = \frac{At}{1/2 (W_1 + W_2)}$$

Donde At es la diferencia entre tr_2 y tr_1 .

La resolución también se puede relacionar con los siguientes parámetros cromatográficos:

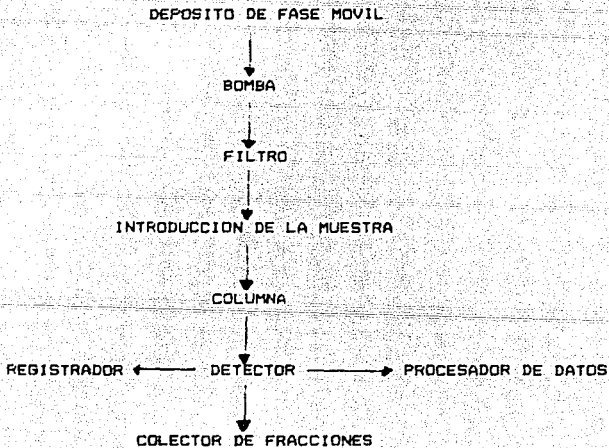
$$R_s = \frac{\sqrt{n}}{4} \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \left[\frac{K_2}{1 + K_2} \right]$$

La velocidad lineal promedio de la fase móvil (μ), se expresa por:

$$\mu = \frac{L}{t}$$

INSTRUMENTACION (4,5,4,7)

En la siguiente figura se representa el esquema funcional de un equipo general de cromatografía líquida:



Como puede apreciarse los componentes básicos de dicho equipo son: una bomba para propulsar la fase móvil, un mecanismo para la introducción de la muestra, una columna que contenga la fase estacionaria y un detector para determinar la separación que tiene lugar.

FASE MOVIL

Aunque la fase móvil no es parte del instrumental propiamente dicho, el control de la presión, el flujo y la composición de la misma, son muy importantes, ya que la fase móvil desempeña una parte activa en la cromatografía líquida.

En la cromatografía líquida podemos usar una única sustancia como fase móvil durante el análisis o bien una mezcla de dos o más sustancias, manteniendo constante la composición de la fase móvil durante el análisis o bien cambiando su composición conforme al tiempo. El primer método se llama OPERACION ISOCRATICA, mientras que el segundo se conoce como ELUCION POR GRADIENTE.

La variación de la fase móvil en elución por gradiente puede ser lineal, o bien seguir diferentes formas no lineales, a continuación la figura A ilustra las posibilidades de varios tipos de elución por gradiente, mientras que la figura B representa el esquema funcional del sistema que efectúa las mezclas y suministra la fase móvil a la columna.

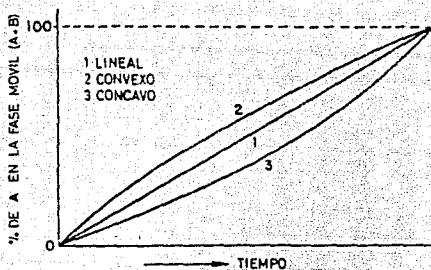


FIGURA A (Diferentes tipos de elución por gradiente)

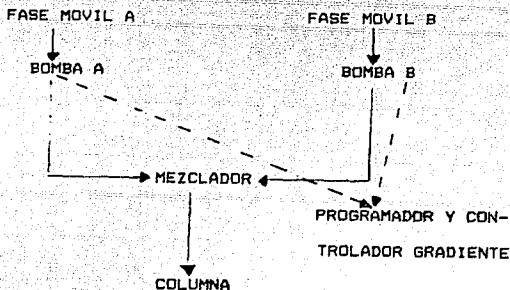


FIGURA B (Esquema funcional de un programador de gradiente)

BOMBAS

De acuerdo con las características de funcionamiento y diseño se pueden considerar básicamente dos tipos de bombas:

- 1.- Bombas mecánicas
- 2.- Bombas neumáticas

En lo que atañe a las primeras, las hay de dos tipos distintos:

- a.- Bombas recíprocas (pistón o diafragma)
- b.- Bombas de desplazamiento continuo.

Bombas recíprocas: Son bombas que desplazan flujos de volumen constante en forma no continua, sino más bien pulsante.

Bombas de desplazamiento continuo: El flujo desplazado por estas bombas es uniforme y continuo.

1.- **Bombas neumáticas:** En este sistema de bombeo el líquido es desplazado mediante la presión ejercida por un gas inerte a alta presión, ya sea en forma directa sobre el líquido o bien sobre el recipiente comprimible que lo contiene.

INTRODUCCION DE LA MUESTRA

Esta parte del instrumento exige un diseño cuidadoso puesto que debe resistir altas presiones, tener un volumen pequeño y sus cavidades deben ser barridas por la fase móvil.

El instrumental moderno emplea en general válvulas inyectoras, la muestra se introduce en la válvula mediante

una jeringa, desplaza el líquido y llena el espacio interno de una pequeña porción del tubo capilar. La muestra se inyecta en la columna accionando la válvula de forma tal que la disposición de entrada y salida se inviertan.

REGISTRADORES

Su función es representar en un registro gráfico la señal dada por el detector. Generalmente se utilizan registradores potenciométricos de 1 a 10 mV, con respuesta rápida de la pluma y velocidad variable del papel.

COLUMNAS

Las columnas más frecuentemente usadas en cromatografía líquida tienen una longitud de 25-50 cm y un diámetro interno de 2 a 5 mm, rellenas de partículas de diámetro muy pequeño (5-15 μ m), características indispensables para optimizar la capacidad de la muestra, consumo de fase móvil, velocidad y resolución.

DETECTORES

Actualmente en los equipos de cromatografía líquida se utilizan principalmente los detectores ópticos.

DETECTOR DE INDICE DE REFRACCION:

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

Hay dos modelos distintos de este tipo de detector, uno de

ellos, llamado refractómetro de desviación, se basa en el desplazamiento óptico de un rayo de luz, que es proporcional a la diferencia del índice de refracción entre dos líquidos.

El otro se basa en el principio de Fresnel, según el cual en la interfase entre el prisma de vidrio y algún líquido la cantidad de luz transmitida y reflejada es proporcional al ángulo de incidencia de la luz y al índice de refracción del líquido.

DETECTOR DE LUZ ULTRAVIOLETA

Actualmente es el más utilizado, su funcionamiento se basa en la absorción de luz por parte de la muestra al pasar a través de ella un haz de luz monocromática ultravioleta. Es lógico suponer que la respuesta de este detector será selectiva, ya que sólo se detectarán los compuestos que absorban luz de la longitud de onda a la que opera el detector.

Hay dos tipos de detectores de luz ultravioleta; el de longitud de onda variable capaz de controlar desde 190 a 800 nm, resultando adecuado para la detección de casi todas las muestras y el llamado fotómetro de luz ultravioleta que funciona a una sola longitud de onda.

DETECTOR DE FLUORESCENCIA

En la actualidad es el detector más sensible de que se dispone, es posible detectar con este instrumento cantidades del orden de picogramos, lo cual es comparable a los detectores de captura de electrones en cromatografía de gases.

Hay dos diseños básicos de estos detectores de fluorescencia, los llamados fluorómetros de filtros que emplean filtros para seleccionar la radiación de excitación y la de emisión, y los espectrofluorómetros que emplean monocromadores.

TIPOS DE CROMATOGRAFIA (4,5,6,7)

Dependiendo de las características del empaque de la columna, de la fase móvil, y de la combinación de ellas la Cromatografía de líquidos de Alta Resolución se puede dividir en cuatro tipos:

- CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO

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

- CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION

Se rellena la columna con un material que posea poros de dimensiones comprendidas entre ciertos límites, con lo que la muestra es retenida o filtrada a través de poros según sea su tamaño molecular. Esta técnica se llama también filtración sobre geles o cromatografía sobre geles.

- CROMATOGRAFIA EN FASE NORMAL

El lecho estacionario es de naturaleza fuertemente

polar (p.ej. sflíce) y la fase móvil es apolar (p. ej. hexano o tetrahidrofurano). Las muestras polares quedan retenidas en la columna durante tiempos mayores que los materiales menos polares o apolares.

- CROMATOGRAFIA EN FASE INVERSA

El lecho es de naturaleza apolar (hidrocarburo), mientras la fase móvil es un líquido polar, normalmente agua o alcohol. En este caso cuanto más apolar sea la muestra mayor será su retención.

TECNICAS DE DERIVACION PARA CUANTIFICAR
AMINOACIDOS (5,8)

Se ha encontrado que la cromatografía líquida de alta resolución, es una técnica útil tanto para el análisis como para la purificación de moléculas biológicas. La capacidad de CLAR para lograr una separación rápida de mezclas complejas ofrece al investigador una técnica ideal para el análisis de aminoácidos.

Para seleccionar un sistema de detección hay varias alternativas: detección directa por índice de refracción o por absorción ultravioleta, pero por lo general carece de especificidad y sensibilidad adecuada o especificidad para la mayoría de los análisis de aminoácidos. Se ha encontrado que es necesario hacer reaccionar el grupo amino, común en todos los aminoácidos, con un agente derivante para dar un producto de derivación que pueda ser detectado con gran especificidad y alta sensibilidad. La estructura química del producto de derivación determinará el sistema de detección. Generalmente los productos de derivación fluorescen o absorben luz en la región ultravioleta y visible.

La derivación de aminoácidos para su detección ofrece dos posibilidades:

- 1.- Separación cromatográfica de los componentes de la muestra seguida por una derivación.
- 2.- Derivación de todos los componentes de interés,

seguido por una separación cromatográfica de los derivados.

En el primer caso, los aminoácidos libres son separados por cromatografía de intercambio iónico; posteriormente se lleva a cabo la reacción de derivación, por lo que es posible usar reacciones químicas que den productos múltiples o únicos para los aminoácidos en la muestra.

En el segundo caso, los aminoácidos reaccionan con el agente derivatizante antes de la separación cromatográfica, siendo separados en la columna con su detección inmediata. El mecanismo de separación utilizado con mayor frecuencia es basado en una interacción hidrofóbica con una columna de fase inversa. En este caso cada aminoácido debe formar un producto de derivación sencillo y único que puede ser separado cromatográficamente de los otros.

ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS POR INTERCAMBIO IÓNICO

La separación por intercambio iónico de aminoácidos se lleva a cabo en resinas de polietileno sulfonadas, utilizando elución por gradiente (variando pH). La reacción de derivación más utilizada en este caso es aquella que se lleva a cabo con ninhidrina. Esta reacción produce un derivado colorido con aminoácidos primarios y secundarios. La reacción con ninhidrina requiere elevadas temperaturas para que se lleve a cabo (130° C).

Una alternativa muy útil al método anterior es la utilización de reactivos fluorescentes, entre ellos se

encuentra el reactivo ortoftaldialdehído (OPA).

Las reacciones de postderivación, requieren los siguientes componentes:

- 1.- Algún contenedor, medidor de reactivo para conducir el agente derivatizante a la fase móvil que sale de la columna.
- 2.- Un medio de mezclado de la fase móvil que sale de la columna y el agente derivatizante.
- 3.- Un medio adecuado para proveer un tiempo de retraso entre el mezclador y la detección con el fin de que la reacción se pueda completar.

ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS POR FASE INVERSA

La cromatografía por fase inversa se ha convertido en la técnica por CLAR más ampliamente utilizada hoy en día, respondiendo por más del 70% de las aplicaciones.

En cromatografía por fase inversa, la fase estacionaria consiste de partículas de sílica porosa de 5 a 10 μm con una molécula hidrofóbica unida covalentemente a la superficie. El reactivo organosilano más comúnmente utilizado es el octadecilclorosilano unido a la superficie a través de una unión siloxano dando como resultado $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-\text{C}_{18}-\text{H}_{37}$.

Las separaciones son logradas en la superficie hidrofóbica, usando eluyentes polares, generalmente consisten en agua/metanol o agua/acetonitrilo. Estos eluyentes son adecuados, baratos y dan resultados reproducibles.

De acuerdo a la teoría solvofóbica de Horvath, la retención de un compuesto en una columna de fase inversa esta en relación directa con sus características

hidrofóbicas; por lo tanto compuestos ionizados interactúan muy débilmente con columnas de fase inversa. Los ácidos y bases se convierten a su forma hidrofóbica por la supresión total de su ionización. Esto ocurre a pH menores que el pKa de ácidos y a pH mayores que el pKa de bases. Ya que el pH de trabajo es de 2 a 8, esta técnica solamente se logra para ácidos y bases débiles.

Los aminoácidos son compuestos iónicos llamados "zwitterion" con un pKa del grupo carboxilo menor a 5 y un pKa del grupo amino mayor a 8. Por lo tanto se puede ver que no existe un pH al cual la ionización de ambos grupos se suprime simultáneamente. Fases móviles con pH ácidos suprimirán la ionización del grupo carboxilo, pero dejarán al grupo amino completamente ionizado por lo que en fase inversa se obtendrán tiempos de retención muy pobres y picos sesgados. Las fases móviles que emplean reactivos ácidos alquilsulfónicos para cromatografía por par-iónico pueden aumentar la retención de especies cargadas positivamente pero por lo general tienen insuficiente selectividad y reproducibilidad para cuantificar aminoácidos.

La técnica más exitosa para el análisis de aminoácidos por fase inversa, es la realización de un derivado.

Mediante la derivación se obtienen las siguientes ventajas:

- El derivado elimina el ión "zwitterion" del aminoácido dando una especie que interactúa más fuertemente con el soporte de la fase inversa.

- El derivado produce grupos fluoróforos y cromóforos para una detección específica y sensible.

- Variaciones en la química de derivación pueden utilizarse para aumentar la selectividad o la detección cromatográfica

REACTIVOS PARA DERIVACION

Para la selección de un reactivo para la derivación de un aminoácido, deben considerarse las siguientes características:

- La reacción debe dar un derivado simple y único para cada aminoácido.

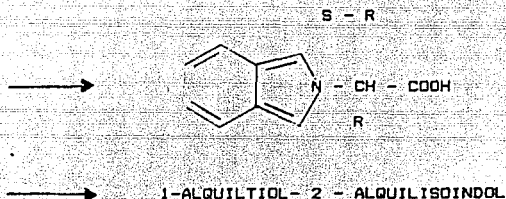
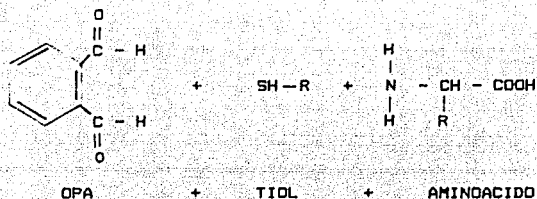
- El derivado debe detectarse con buena sensibilidad y especificidad.

- La formación del derivado debe ser fácil y reproducible.

Investigaciones recientes han recomendado el ortoftaldialdehído (OPA), como el reactivo ideal para el análisis de derivados de aminoácidos por fase inversa, ya que los productos de reacción se forman rápidamente a temperatura ambiente, originando productos simples para cada aminoácido.

Roth reportó por primera vez la producción de un compuesto altamente fluorescente con una amina primaria, OPA y mercaptoetanol. (3)

Simons y Johnson identificaron la estructura de este producto fluorescente como un isoindol sustituido. (4)



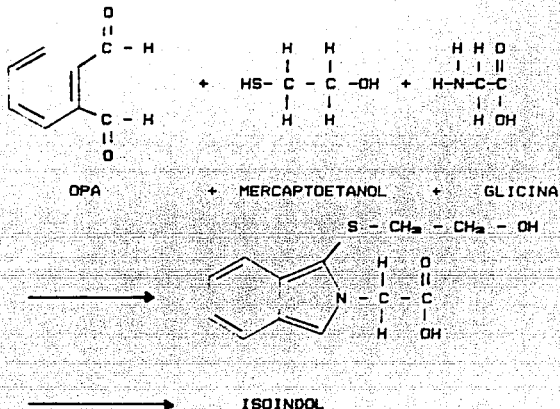
Ellos demostraron que además del mercaptoetanol se pueden utilizar otros tioles en esta reacción. Debido a que el agente reductor se incorpora en el producto de reacción, otros tioles producen derivados con estabilidades y selectividades cromatográficas diferentes.

FORMACION DE DERIVADOS DE OPA-AMINOACIDOS

Los derivados OPA/tiol con aminoácidos son formados fácil y rápidamente. La reacción se completa a temperatura ambiente en 1-3 minutos, usando mercaptoetanol o etanotiol como agente reductor. La mezcla de derivación comprende los siguientes componentes: OPA cristalino, un tiol y un buffer básico de boratos (pH entre 9.5-10.5) en metanol. El

reactivo OPA/tiol no reacciona con aminos secundarias.

La reacción que se lleva a cabo en este trabajo es:



SEPARACION CROMATOGRAFICA DE LOS DERIVADOS AMINOACIDOS/OPA

La fluorescencia provocada por los derivados OPA es directamente dependiente del pH, por lo tanto las separaciones por fase inversa deben llevarse a cabo dentro de un rango de pH de 6 a 7.5, fases móviles con pH neutros dan como resultado la ionización del grupo carboxilo de los derivados de los aminoácidos. El mecanismo de retención en un sistema de fase inversa sera una mezcla de ionización-solvofóbico. Bajo estas condiciones es crítico que la fase móvil sea amortiguada correctamente para lograr un tiempo de retención reproducible.

DETECCION Y SENSIBILIDAD DE LOS DERIVADOS

OPA-AMINOACIDOS.

Estos derivados muestran una excitación máxima a 340 nm cuando se utiliza un fluorómetro equipado con una lámpara de xenón o mercurio. Cuando se utiliza una lámpara de deuterium la excitación máxima es lograda a 229 nm.

Se debe hacer notar que estos derivados se pueden detectar con un detector UV a 340 nm cuando se requieren sensibilidades de unos cuantos nanmoles.

ESTABILIDAD DE LOS DERIVADOS OPA-AMINOACIDOS

Se ha mostrado que la estabilidad de los derivados OPA es dependiente del agente reductor empleado en la reacción. Se ha visto que los derivados formados con mercaptoetanol son poco estables ya que decrece significativamente su fluorescencia 15 minutos después de haberse formado el derivado. Estos experimentos de estabilidad indican que esta metodología requiere tiempo preciso en la preparación de la muestra y la inyección.

Los parámetros que afectan la estabilidad de los derivados OPA, son concentración del disolvente no acuoso, concentración de oxígeno, pH y concentración del reactivo de derivación.

VALIDACION (9,10,11,12)

La validación es la comprobación de que un método, proceso o evento funciona de acuerdo a los objetivos establecidos.

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es su validación. Esto es, que el método debe ser evaluado para probar su efectividad. La validación generalmente incluye una evaluación de la precisión, linealidad, tolerancia, especificidad y reproducibilidad de un método analítico. El desarrollo de un procedimiento es terminado una vez que el método ha sido evaluado y se ha demostrado un funcionamiento analítico aceptable. La validación puede dividirse en tres etapas:

- Identificación de los parámetros apropiados de validación.
- Diseño de experimentos para la evaluación de parámetros.
- Traslación de los resultados dentro de los procedimientos de operación.

La validación es única para cada método y debe ser consistente con el propósito del método, el principio activo que se va a determinar y los excipientes que contiene la formulación.

PARAMETROS DE VALIDACION (9,10,11,12)

Dentro de los parámetros básicos que forman la validación de los métodos analíticos están:

1.- LINEALIDAD: Es la medida del grado en el cual la curva de calibración analítica se aproxima a una línea recta, o bien el grado en el cual la sensibilidad (r) es constante, siendo esta última la relación entre la pendiente de una curva de calibración (m) y la variabilidad de los puntos experimentales o error estandar de regresión (Sy/x):

$$r = \frac{m}{Sx/y}$$

La linealidad de una respuesta obtenida (areas, alturas de picos, relación de areas, etc.) graficado contra la concentración del principio activo es evaluado para asegurar una proporción directa sobre un rango de trabajo anticipado.

Los métodos utilizados para evaluar este parámetro son:

Coficiente de variación de los porcentajes recuperados (CV), coeficiente de correlación ($r = 0.999$), pendiente (m), intercepto de la curva con el eje de las ordenadas (b). Estos tres últimos parámetros se obtienen con el método de mínimos cuadrados. Para evaluar el modelo de regresión se utilizan las siguientes pruebas estadísticas: Prueba t de Student ya que con esta prueba se obtienen los intervalos de confianza para la pendiente y la ordenada al origen, se plantean también las pruebas de hipótesis para demostrar que el modelo de regresión es adecuado.

1.2.- EXACTITUD: Es la concordancia entre un valor determinado experimentalmente (promedio de la población) y el valor aceptado como referencia o verdadero.

1.3.- PRECISION: Es la concordancia entre mediciones repetidas de una misma propiedad; es decir la distribución de medidas individuales alrededor de su promedio; se expresa en términos de repetibilidad y/o reproducibilidad.

Para evaluar la precisión del método se realiza el método completo en seis réplicas de una muestra compuesta (completa); en cambio, la precisión del sistema se realiza para considerar solamente el error debido al sistema de operación y no al error atribuido a la preparación de la muestra.

Para evaluar este parámetro se utiliza el coeficiente de variación (CV), el cual para el sistema debe de ser menor al 1.5% y para el método menor al 2.0%.

1.3.1.- REPETIBILIDAD: Es la precisión de un método expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un analista, utilizando el mismo aparato y las mismas técnicas.

Para evaluar este parámetro se utiliza el coeficiente de variación, el cual debe de ser menor al 2%. Además se utiliza la prueba "t" de Student.

1.3.2.- REPRODUCIBILIDAD: Es la precisión de un método expresada como la concordancia entre determinaciones

realizadas ya sea por diferentes analistas, en distintos días, en el mismo y/o diferentes laboratorios, con el mismo equipo y con otro diferente.

Para evaluar este parámetro se utiliza el coeficiente de variación, además también se evalúa mediante una comparación de varianzas y comparación de medias de ambos analistas mediante una prueba "t" de Student.

1.4.- ESPECIFICIDAD: Es el grado en el cual la medición se debe a la sustancia a ser determinada y no a otras sustancias. El sistema cromatográfico debe mostrar ser capaz de separar el pico de interés de otras sustancias que puedan dar al detector alguna señal, estas sustancias incluyen impurezas conocidas o desconocidas, excipientes, contaminantes y productos de degradación.

Cuando se trata de productos de degradación la especificidad se llama "Especificidad en estabilidad", en un método indicativo de estabilidad, un estudio de estabilidad acelerada debe llevarse a cabo, para demostrar que la degradación de productos no interfiere.

Cuando se demuestre que la señal analítica obtenida sólo se debe a la sustancia de interés, el método se llamara específico y podrá ser utilizado como indicativo de estabilidad.

1.5.- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA: En este parámetro se establece el periodo de tiempo en que la solución (sustancia de interés en el disolvente utilizado para la preparación de la muestra) puede retenerse antes de

analizarse sin exponer exactitud.

El criterio que califica a este parámetro está dado por la relación entre la media del porcentaje recuperado del segundo análisis (s) y la del primero (I), la cual debe de ser aproximadamente igual a uno.

$$s/I = 1$$

1.6.- TOLERANCIA: En este parámetro se determina cómo se afecta la separación cuando se varía una condición de operación determinante. Para CLAR se puede variar:

Composición de la fase móvil

pH de la fase móvil

Velocidad de flujo

VALORACION ESTADISTICA [1,14,15]

Para el cálculo de los estadísticos mencionados para efectuar la validación de un método analítico se emplean las siguientes fórmulas:

$$1.- \text{Media } (\bar{x}) = \frac{\sum (x)}{n}$$

$$2.- \text{Pendiente de la curva } (m) = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n(\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

$$3.- \text{Intercepto con el eje de las ordenadas } (b) = \bar{y} - m\bar{x}$$

$$4.- \text{Coeficiente de correlación } (r) :$$

$$r = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[n\sum x^2 - (\sum x)^2][n\sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

$$5.- \text{Error estándar de la regresión } (S_{x/y}) = \sqrt{\frac{\sum (y - \bar{y})^2}{n - 2}}$$

donde \bar{y} es el valor predicho a partir de la curva de regresión: $y = mx + b$

$$6.- \text{Sensitividad } (s) = \frac{m}{S_{x/y}}$$

$$7.- \text{Desviación estándar } (DE) = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$8.- \text{Coeficiente de variación } (CV) = \frac{DE}{\bar{x}} \times 100$$

$$9.- \text{Error estándar } (Es) = \frac{DE}{\sqrt{n}}$$

10.- Intervalo de confianza para el 95% de probabilidad:

$$IC = Es \times t_{95\%}$$

11.- Límites de confianza para el 95% de probabilidad:

$$LC = \bar{x} \pm IC$$

12.- Distribución "t" de Student:

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{s/\sqrt{N}}$$

DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR GLICINA.

A continuación se resumen los pasos principales que se siguieron para desarrollar un método para cuantificar Glicina en un polvo oral:

- Se decidió desarrollar un método analítico por CLAR, ya que actualmente es una de las técnicas analíticas más utilizadas porque reúne características de sensibilidad, rapidez y especificidad.

- Se realizó una reacción de derivación para obtener un producto que pueda ser detectado con gran especificidad y alta sensibilidad por CLAR, ya que la detección de la Glicina por lo general carece de especificidad y de sensibilidad adecuada, ya que se trata de un ión dipolar que carece de grupos cromóforos o fluoróforos.

- Se decidió utilizar cromatografía por fase inversa ya que actualmente se ha convertido en la técnica por CLAR más ampliamente utilizada.

- Se utilizó ortoftaldialdehído (OPA) como agente derivatizante, ya que sus productos de reacción se forman rápidamente a temperatura ambiente, originando productos simples, los cuales pueden detectarse con buena sensibilidad y especificidad.

- Para que se lleve a cabo la reacción de derivación, no solo se necesita del reactivo OPA, sino de

una mezcla que comprende de los siguientes componentes: DPA cristalino, un tiol (mercaptoetanol) y un buffer básico de boratos con pH entre 9.5 - 10.5 en metanol, se investigó donde se podrían encontrar los reactivos mencionados y se encontró que Beckman tiene la mezcla completa de los componentes necesarios para la realización de la derivación (Fluo-R High Performance Fluorescent Detection Reagent).

- Se escogió el siguiente sistema de elución: Acetato de Sodio 0.05M/Metanol con un pH de 6.2; ya que con el se obtiene una buena separación del pico de Glicina y del reactivo DPA.

- Como la formación del derivado DPA/mercaptoetanol decrece significativamente en 15 minutos, se requiere tiempo preciso entre la preparación de la reacción de derivación y la inyección. Ya que la bibliografía reporta que la reacción se completa en dos a tres minutos, inicialmente se escogieron los siguientes tiempos de reacción: 2 minutos, 2 minutos 30 segundos y 3 minutos; observándose una respuesta máxima (absorbancia) a los 2 minutos 30 segundos.

- Por cuestiones de disponibilidad se utilizó Leucina como estándar interno.

- Al utilizar leucina como estándar interno, se observó que había más de 30 minutos de diferencia entre los tiempos de retención de Glicina y Leucina, utilizando un

sistema de elución Isocrático; por lo tanto se vió la necesidad de utilizar un gradiente para la fase móvil.

- Se evaluaron varios tipos de curvas y porcentajes de gradiente hasta obtener la óptima separación de picos en el menor tiempo posible.

METODO DESARROLLADO PARA CUANTIFICAR GLICINA

- EQUIPO:

- Balanza analítica
- Centrifuga
- Vortex
- Bomba de vacío
- Sistema de filtración
- Cromatografo de líquidos Waters:
 - Procesador de datos, Mod. 730
 - Detector de UV, Mod. 440
 - Bomba 51, Mod. 6000A
 - Programador de solventes, Mod. 660
 - Inyector universal, Mod. U6K
- Baño de ultrasonido

MATERIAL:

- Filtros Millipore, F.G. de 0.2 μ m
- Tubos de centrifuga de vidrio de 50 ml
- Pipetas volumétricas de 1, 2 y 25 ml
- Matraces volumétricos de 25, 50 y 1000 ml
- Viales de reacción de 3 ml, marca Pierce
- Cronometro
- Jeringa Hamilton de 25 μ l
- Frascos viales con tapa de teflón
- Micropipeta Lab. Pipette de 100 μ l

- REACTIVOS:

- Agua grado CLAR (Milli-Q)

- Metanol grado CLAR, Cromasol o equivalente
- Acetato de sodio grado reactivo
- Fluo-R High-Performance Fluorescent Detection Reagent. (OPA). (Beckman)

I.- PROCEDIMIENTO:

- Solución de referencia de glicina, (Solución A)

- 1.- Pesar con exactitud, aproximadamente 25 mg de glicina.
- 2.- Transferir los mg de glicina a un matraz volumétrico de 25 ml, aforar con agua grado CLAR (Concentración aproximada 1.0 mg/ml).

- Solución de estándar interno (leucina), (Solución B)

- 1.- Pesar con exactitud, aproximadamente 60 mg de leucina.
- 2.- Transferir los mg de leucina a un matraz volumétrico de 50 ml, aforar con agua grado CLAR (Concentración aproximada 1.2 mg/ml).

- Solución Factor respuesta (Solución F.R.)

- 1.- Transferir una alícuota de 1 ml de la solución A a un matraz volumétrico de 25 ml.
- 2.- Adicionar una alícuota de 2 ml de la solución B al mismo matraz.
- 3.- Aforar con agua grado CLAR, (Conc. aproximada 40 µg/ml de glicina y 96 µg/ml de leucina)

- Preparación de muestra (Solución S)

- 1.- Pesar con exactitud, aproximadamente una cantidad de polvo oral problema equivalente a 25 mg de glicina.
- 2.- Transferir los mg de muestra a un tubo de centrifuga de 50 ml, adicionar con una pipeta volumétrica 25 ml de

agua grado CLAR.

- 3.- Agitar durante 5 minutos en el vortex.
- 4.- Centrifugar durante 5 minutos a 3 000 RPM y separar el sobrenadante.
- 5.- Transferir 1 ml del sobrenadante a un matraz volumétrico de 25 ml y adicionar 2 ml de la solución B.
- 6.- Aforar con agua grado CLAR (Concentración teórica 40 µg/ml de glicina y 96 µg/ml de leucina).

II.- REACCION DE DERIVACION

Desde este punto se tratan igual las soluciones F.R y S.

- 1.- Con ayuda de una micropipeta, transferir por separado 100 µl de las soluciones F.R. y S a viales de reacción.
- 2.- Adicionar al vial de reacción 100 µl de reactivo DPA.
- 3.- Cronometrar el tiempo de reacción (comenzar desde el momento en que se adiciona el reactivo DPA al vial).
- 4.- Agitar en el vortex durante 60 segundos.
- 5.- Con ayuda de una microjeringa colocar 15 µl de muestra en el loop del inyector.
- 6.- Cuando el cronometro marque 2 minutos con 30 segundos proceder a inyectar la muestra.

III.- ANALISIS DE LAS SOLUCIONES.

- 1.- Se preparan por duplicado c/u de las soluciones F.R y S y se inyectan una vez.
- 2.- Se promedian los resultados de las soluciones F.R con el fin de obtener un solo valor de F.R el cual se utilizara para realizar los cálculos de las soluciones S.

IV.- CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

- Columna: μ Bondapak C 18
(10 μ m, 300 X 3.9 mm)
(Waters)
- Detector: U.V. a 340 nm.
- Volumen de inyección: 15 μ l
- Flujo: 1.5 ml/min
- Tiempo de corrida (gradiente): 20 minutos (curva N. 6)
- AUFs: 0.1
- Fase móvil: Buffer/Metanol

Gradiente: 30-82% metanol

Preparación fase móvil:

A: Acetato de sodio 0.05 M pH= 6.2

- 1.- Pesar 4.1 g de acetato de sodio y colocar en un matraz volumétrico de 1 litro, aforar con agua grado CLAR.
- 2.- Ajustar el pH a 6.2 con ácido acético diluido (1:10).
- 3.- Filtrar a través de una membrana F. h 0.2 μ m (millipore)
- 4.- Desgasificar con vacío y agitación.

B: Metanol HPLC

- 1.- Filtrar a través de una membrana de 0.2 μ m (millipore).
- 2.- Desgasificar con vacío y agitación.

V.- CALCULOS:

A) Factor respuesta (K):

$$K = \frac{A_g}{A_l} \times \frac{W_l}{50} \times \frac{2}{25} \times \frac{25}{W_g} \times \frac{25}{1}$$

$$K = \frac{A_g}{A_l} \times \frac{W_l}{W_g} \times 1$$

Donde:

Ag = Area de glicina en la solución factor respuesta.

Al = Area de leucina en la solución factor respuesta.

Wl = Peso en mg de leucina en la solución factor respuesta.

Wg = Peso en mg de glicina en la solución factor respuesta

B) Cálculo de mg de glicina por gramo de muestra recuperados:

$$\frac{A_g}{A_l} \times \frac{W_l}{50} \times \frac{2}{25} \times \frac{25}{W_m} \times \frac{25}{1} \times \frac{1}{K} =$$

$$\frac{A_g}{A_l} \times \frac{W_l}{W_m} \times \frac{1}{K} \times 1 =$$

$$\frac{A_g}{A_l} \times \frac{W_l}{W_m} \times \frac{1}{K} = \text{mg glicina/g muestra}$$

Donde:

Ag = Area de glicina en la muestra.

Al = Area de leucina en la muestra.

Wl = Peso en mg de leucina en la muestra.

Wm = Peso en gramos (g) de la muestra.

C) Porcentaje de recuperación:

$$\frac{\text{mg glicina}}{\text{g muestra}} \times \frac{100}{C_g} = \% \text{ de recuperación}$$

Donde:

Cg = Cantidad en mg de glicina por gramo de muestra.

VI.- PROCEDIMIENTO PARA LA UTILIZACION DEL REACTIVO OPA

- Distribuir parte de su contenido en tres frascos con tapa
- Desplazar el oxígeno que atrapa el frasco de reactivo con una corriente de nitrógeno: La manguera para introducir el nitrógeno no debe tocar el líquido.
- Cerrar inmediatamente el frasco.
- Guardar en refrigeración (5.C)

CUIDADOS QUE DEBE TENERSE CON EL REACTIVO:

- Mantener en refrigeración.
- Proteger de la luz.
- No introducir ningún material en el reactivo.

NOTA:

El contenido de los frascos viales debe de ser suficiente para un mes de trabajo.

Cada vez que se utilice este reactivo, se debe desplazar el oxígeno de una corriente de nitrógeno.

Mantener estos frascos en refrigeración y protegidos de la luz.

VALIDACION DEL METODO ANALITICO

- LINEALIDAD:

A) SISTEMA:

En esta prueba se determinó el rango de concentración de glicina en donde la respuesta es lineal, y se obtuvo analizando por duplicado diferentes soluciones estándares de glicina, que van desde una concentración del 33% al 166% del nivel normal de análisis. La concentración del estándar interno (leucina) se mantiene constante en todas las soluciones.

La figura Nº 1 y 2 muestran la linealidad del sistema y en la tabla Nº 1 se muestran los resultados obtenidos y su análisis estadístico.

B) METODO:

Se determinó analizando placebos, a los cuales se les adicionó el estándar del principio activo (glicina) a diferentes concentraciones. La concentración del estándar interno (leucina) se mantiene constante en todas las soluciones.

Se prepararon 5 concentraciones diferentes (60, 80, 100, 120, y 140% de la concentración normal de análisis), de cada concentración se preparan dos muestras y cada muestra se inyecta una vez.

La figura Nº 3 muestra la linealidad del método y en la tabla Nº 3 se muestran los resultados obtenidos y el análisis estadístico.

- PRECISION Y EXACTITUD DEL SISTEMA.

Esta prueba se realizó analizando seis soluciones con una concentración del 100% de glicina del nivel normal de análisis.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla Nº 2.

- EXACTITUD DEL METODO.

Esta prueba se realizó analizando seis placebos, a los cuales se les adicionó el estándar del principio activo. Se realizó a tres diferentes concentraciones, (80, 100 y 120% de la concentración normal de análisis.

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas Nº 4, 5 y 6.

- PRECISION DEL METODO.

A) REPETIBILIDAD.

Esta prueba se realizó analizando 12 muestras de un lote piloto del producto en cantidades exactas correspondientes al 100% del compuesto por analizar.

Las muestras fueron analizadas por un mismo analista en el mismo equipo, en diferentes días, (seis muestras por día).

Los resultados se muestran en la tabla Nº 7.

B) REPRODUCIBILIDAD.

Esta prueba se realizó analizando muestras de un lote piloto del producto por dos analistas, durante dos días, realizando el análisis de 3 muestras por cada analista en un mismo aparato.

Los resultados se muestran en la tabla Nº 8.

- ESPECIFICIDAD DEL METODO.

1.- La especificidad se evaluó analizando el principio activo (glicina), estándar interno (leucina) y el reactivo OPA.

2.- La especificidad en estabilidad se evaluó sometiendo el principio activo, placebo, mezcla de excipientes y fórmula completa en condiciones extremas de temperatura y humedad relativa (H.R), de acuerdo al siguiente programa:

| MUESTRA | CONDICIONES | TIEMPO |
|--|--------------------------------------|-------------------|
| - Glicina | a) Temperatura ambiente | 14 días |
| | b) 35°C / 75% H.R. | 14 días |
| | c) 60°C | 14 días |
| | d) Ciclo: 35°C / 75% H.R. 60°C | 12 días 2 días |
| - Placebo Sabor: melón durazno y naranja | a) Temperatura ambiente | 14 días |
| | b) 35°C / 75% H.R. | 14 días |
| | c) 60°C | 14 días |
| | d) Ciclo: 35°C / 75% H.R. 60°C | 12 días |
| - Producto completo | a) Temperatura ambiente | 14 días |
| | b) 35°C / 75% H.R. | 14 días |
| | c) 60°C | 14 días |
| | d) Ciclo: 35°C / 75% H.R. 60°C | 12 días 2 días |
| - Mezcla excipientes glucosa + glicina | a) Temperatura ambiente | 14 días |
| | b) 35°C / 75% H.R. | 14 días |
| | c) 60°C | 14 días |
| | d) Ciclo: 35°C / 75% H.R. 60°C | 12 días 2 días |
| - PRODUCTO TERMINADO (en material de empaque) | a) Temperatura ambiente | 3 meses |
| | b) 35°C / 75% HR | 3 meses |
| | c) 45°C | 3 meses |

NOTA: Entre los excipientes que contiene la formulación, se selecciona la glucosa, para someterla junto con la glicina a condiciones extremas de temperatura y humedad relativa, debido a que se lleva a cabo una reacción entre la glucosa y la glicina, la cual se explicara más adelante.

Los cromatogramas obtenidos se muestran en las figuras N° 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

Se estableció analizando muestras retenidas a temperatura ambiente y en refrigeración después de 24 y 48 horas de su preparación.

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas N° 9, 10 y 11.

- TOLERANCIA DEL SISTEMA.

Con el fin de determinar como se afecta la separación de los picos de interés, se realizaron algunos experimentos para determinar como afecta la variación de pH, velocidad de flujo y las condiciones iniciales y finales del gradiente de la fase móvil, en la resolución de los picos de interés.

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas N° 12, 13, 14 y 15.

RESULTADOS OBTENIDOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

TABLA N° 1.-

LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA EL METODO POR HPLC PARA
CUANTIFICAR GLICINA

| miligramos (mg) ANADIDOS | RELACION AREAS Amuest/Astd int | %RECUPERACION | mg RECUPERADOS |
|--------------------------------|-----------------------------------|---------------|-------------------|
| 10.45 | 0.3138 | 99.6 | 10.41 |
| 20.90 | 0.6286 | 100.0 | 20.90 |
| 31.35 | 0.9397 | 99.4 | 31.17 |
| 41.80 | 1.2732 | 101.0 | 42.22 |
| 52.25 | 1.5764 | 100.0 | 52.25 |

MEDIA (\bar{x}) = 100%

DESVIACION ESTANDAR (s) = 0.6164

COEFICIENTE DE VARIACION (CV) = 0.6164%

EVALUACION DE LINEALIDAD

De los datos obtenidos de linealidad se obtienen dos tipos diferentes de graficas:

FIGURA Nº 1.-

A) Relacion de areas contra miligramos añadidos.

De esta grafica se obtienen los siguientes datos:

- 1.- Ordenada al origen, $b = -0.0046$
- 2.- Error estandar de regresión, $S_{y/x} = 0.00729$
- 3.- Coeficiente de regresión, $r = 0.99992$
- 4.- Coeficiente de determinación, $r^2 = 0.99984$
- 5.- Pendiente, $a = 0.030333$

FIGURA Nº 2.-

B) Relacion de miligramos recuperados contra miligramos añadidos (Grafica B).

De esta grafica se obtienen los siguientes datos:

- 1.- Ordenada al origen, $b = -0.11$
- 2.- Pendiente, $a = 1.0048$
- 3.- Coeficiente de regresión, $r = 0.999919$
- 4.- Coeficiente de determinación, $r^2 = 0.9998$
- 5.- Error estandar de regresión, $S_{y/x} = 0.2077$

FIGURA No.1

LINEALIDAD DEL SISTEMA

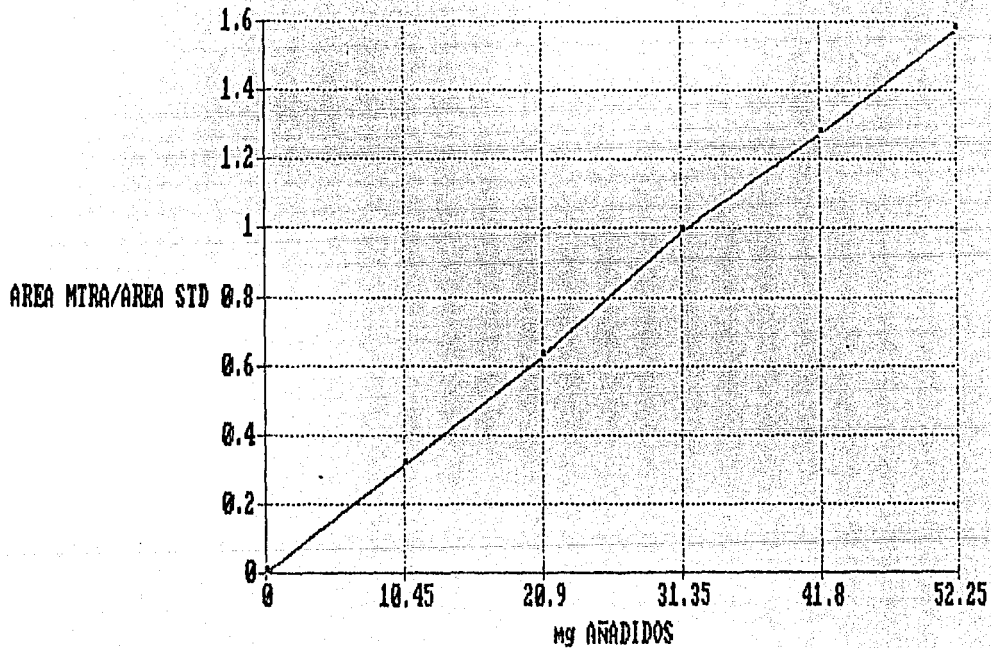


FIGURA No.2

LINEALIDAD DEL SISTEMA

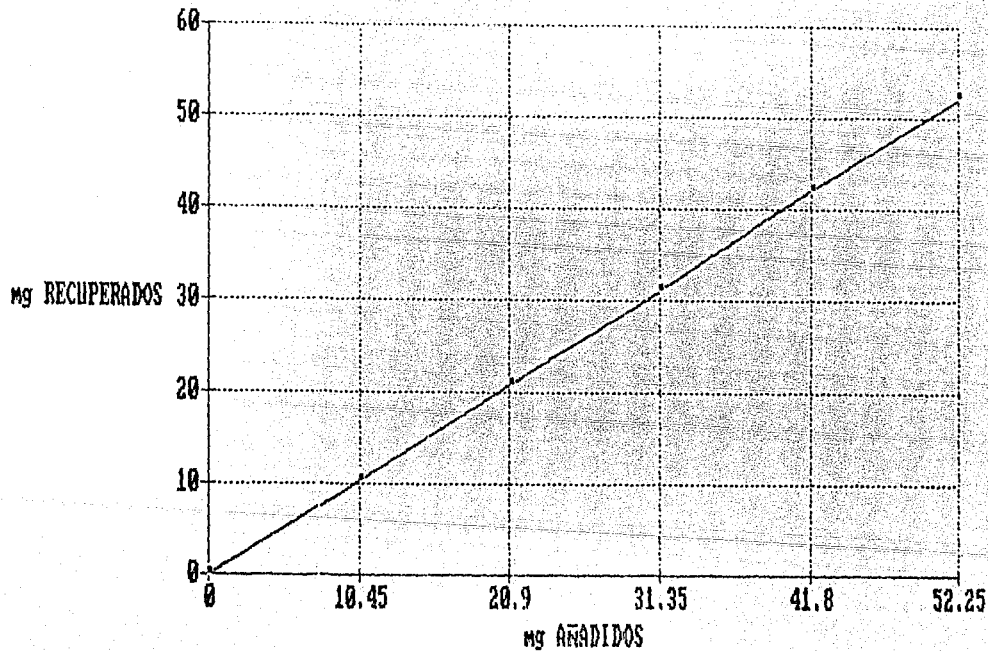


TABLA N° 2.-

PRECISION Y EXACTITUD DEL SISTEMA

| NUMERO DE SOLUCION DE REFERENCIA | FACTOR RESPUESTA (fr) | % RECUPERACION |
|-------------------------------------|--------------------------|----------------|
| 1 | 1.802 | 100.04 |
| 2 | 1.808 | 100.37 |
| 3 | 1.813 | 100.65 |
| 4 | 1.804 | 100.15 |
| 5 | 1.797 | 99.76 |
| 6 | 1.784 | 99.04 |

MEDIA (fr) = 1.8013

DESVIACION ESTANDAR (s) = 0.01007

COEFICIENTE DE VARIACION (CV) = 0.5592%

PROMEDIO DEL PORCIENTO DE RECUPERACION = 100.002%

EVALUACION DE LA PRECISION Y EXACTITUD DEL SISTEMA.

Para evaluar la precisión y exactitud del sistema se obtienen los siguientes datos:

1.- El intervalo de confianza al 95% es:

Para un $\alpha = 0.05$ y para $n-1$ grados de libertad, tenemos que
 $t = 2.571$

$$\bar{x} \pm t_{0.975} \times \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$100.002 \pm 2.571 \times \frac{0.559}{\sqrt{6}}$$

$$100.002 \pm 0.5865$$

(99.4155, 100.5885) Intervalo de confianza al 95%

2.- Inferencias acerca de la media:

La prueba de hipótesis propuesta es :

$$H_0: x = \mu_0 \quad \text{us} \quad H_1: x \neq \mu_0$$

El estadístico de prueba utilizado es:

$$T = \frac{\bar{x} - \mu}{s/\sqrt{N}} = \frac{100.02 - 100}{0.559/\sqrt{6}} = 8.73 \times 10^{-2}$$

Si $-2.571 < x < 2.571$, Se acepta H_0 ;

Como $-2.571 < 0.0876 < 2.571$, Se acepta la hipótesis nula.

Por lo tanto el sistema es exacto.

TABLA N° 3.-

LINEALIDAD DEL METODO.

| % ANADIDO | CANTIDAD ADICIONADA (mg) | CANTIDAD RECUPERADA (mg) | % RECUPERACION |
|-----------|--------------------------------|--------------------------------|----------------|
| 60.00 | 18.01 | 17.44 | 96.85 |
| 80.00 | 24.01 | 23.83 | 99.24 |
| 100.00 | 30.02 | 30.31 | 100.97 |
| 120.00 | 36.03 | 35.34 | 98.10 |
| 140.00 | 42.03 | 41.83 | 99.52 |

Número de datos (n) = 5

Media (\bar{x}) = 98.94

Desviación estándar (s) = 1.55

Coefficiente de variación (C.V) = 1.57%

Por medio del análisis de regresión lineal se obtienen los siguientes datos:

- 1.- Ordenada al origen, $b = -0.3847$
- 2.- Error estándar de regresión, $S_{y/x} = 0.4405$
- 3.- Coeficiente de regresión, $r = 0.99919$
- 4.- Coeficiente de determinación, $r^2 = 0.99838$
- 5.- Pendiente, $m = 1.00382$

FIGURA No. 3

LINEALIDAD DEL METODO

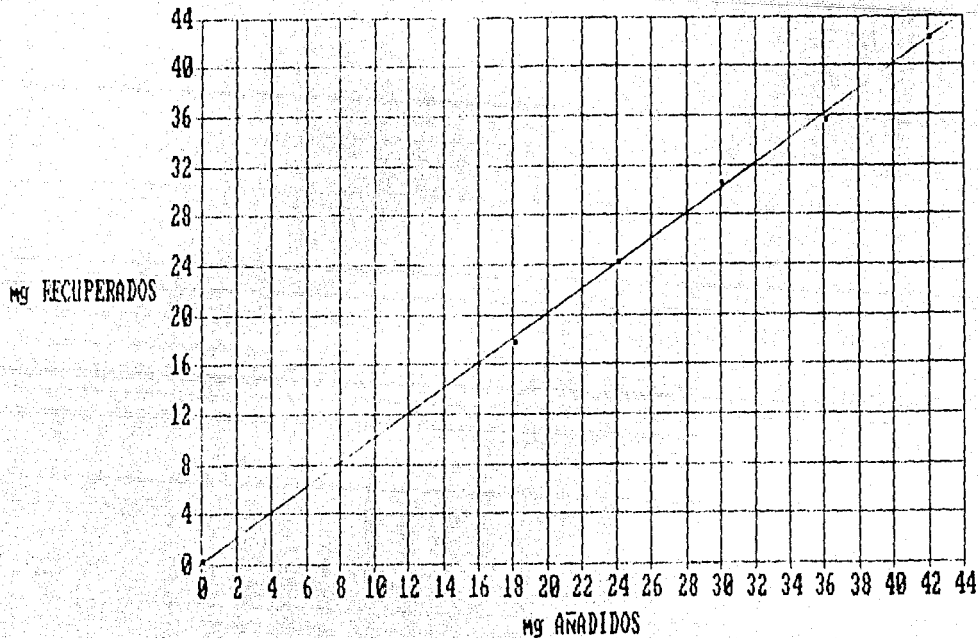


TABLA Nº 4.-

PRECISION Y EXACTITUD DEL METODO.
100% DE LA CONCENTRACION NORMAL DE ANALISIS

| MUESTRA | MILIGRAMOS DE GLICINA RECUPERADOS | % RECUPERACION |
|---------|--------------------------------------|-------------------|
| 1 | 25.47 | 99.38 |
| 2 | 25.77 | 100.57 |
| 3 | 25.58 | 99.82 |
| 4 | 25.96 | 101.30 |
| 5 | 25.73 | 100.41 |
| 6 | 25.11 | 97.99 |
| | | $\bar{x} = 99.91$ |

Promedio del porciento de recuperaci3n (\bar{x}) = 99.912%

Desviaci3n estandar (s) = 1.1483

Coefficiente de variaci3n (C.V) = 1.149 %

Intervalo de confianza al 95% = 99.912 \pm 1.205

(98.707, 101.117)

Inferencias acerca de la media: T calculada = -0.1877

Como $-2.571 < -0.1877 < 2.571$, se acepta H_0 , por lo tanto el m3todo es exacto.

TABLA Nº 5.-

PRECISION Y EXACTITUD DEL METODO
BOX DE LA CONCENTRACION NORMAL DE ANALISIS

| MUESTRA | MILIGRAMOS DE GLICINA RECUPERADOS | %RECUPERACION |
|---------|--------------------------------------|---------------|
| 1 | 20.56 | 100.30 |
| 2 | 20.33 | 99.18 |
| 3 | 20.84 | 101.68 |
| 4 | 20.24 | 98.72 |
| 5 | 20.75 | 101.20 |
| 6 | 20.98 | 102.35 |
| | | X = 100.57 |

Promedio del porciento de recuperaci3n (\bar{x}) = 100.57%

Desviaci3n est3ndar (s) = 1.43

Coficiente de variaci3n (C.V) = 1.42

Intervalo de confianza al 95% = 100.57 + 1.5009

(99.0691, 102.0709)

Inferencias acerca de la media: T calculada = 0.976

Como $-2.571 < 0.976 < 2.571$, Se acepta H_0 , por lo tanto el m3todo es exacto

TABLA Nº 6.-

PRECISION Y EXACTITUD DEL METODO
120% DE LA CONCENTRACION NORMAL DE ANALISIS

| MUESTRA | MILIGRAMOS DE GLICINA RECUPERADOS | %RECUPERACION |
|---------|--------------------------------------|--------------------|
| 1 | 30.43 | 98.96 |
| 2 | 30.51 | 99.20 |
| 3 | 30.63 | 99.60 |
| 4 | 31.25 | 101.64 |
| 5 | 31.31 | 101.80 |
| 6 | 30.86 | 100.37 |
| | | $\bar{x} = 100.26$ |

Promedio del porcentaje de recuperación (\bar{x}) = 100.26%

Desviación estándar (s) = 1.2278

Ceficiente de variación (C.V) = 1.22

Intervalo de confianza al 95% = 100.26 \pm 1.29

(98.97, 101.55)

Inferencias acerca de la media : T calculada 0.5221

Como $-2.571 < 0.5221 < 2.571$, Se acepta H_0 , por lo tanto el método es exacto

TABLA N° 7. -

REPETIBILIDAD DEL METODO.

| DIA | ANALISTA | %RECUPERACION |
|-----|----------|---------------|
| 1 | A | 97.38 |
| 1 | A | 98.12 |
| 1 | A | 100.00 |
| 1 | A | 99.49 |
| 1 | A | 99.26 |
| 1 | A | 101.33 |
| 2 | A | 96.55 |
| 2 | A | 99.51 |
| 2 | A | 98.54 |
| 2 | A | 100.37 |
| 2 | A | 101.46 |
| 2 | A | 97.76 |

Promedio del porcentaje de recuperación (%) = 99.15

Desviación estándar (s) = 1.53

Coefficiente de variación (C.V) = 1.55%

EVALUACION DE LA REPETIBILIDAD DEL METODO.

Para evaluar la repetibilidad del método se obtienen los siguientes datos:

- 1.- La media del porcentaje encontrado es, $\bar{x} = 99.15\%$
- 2.- Desviación estándar, $s = 1.5319$
- 3.- Coeficiente de variación, $CV = 1.55\%$
- 4.- Error estándar, $Es = 0.44$
- 5.- Número de determinaciones, $n = 12$
- 6.- Número de grados de libertad, $n-1 = 11$
- 7.- Varianza, $s^2 = 2.35$
- 8.- La prueba de hipótesis establecida es:

$$H_0: x = \mu_0$$

$$H_1: x \neq \mu_0; \text{ donde } \mu_0 = 100\%$$

El estadístico de prueba es:

$$T\# = \frac{\bar{x} - \mu_0}{s/\sqrt{N}} = 1.9245$$

Con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ y $n - 1$ grados de libertad, tenemos que $t = 2.201$.

Para aceptar H_0 tenemos que $-t < T\# < t$.

Como $-2.201 < 1.9245 < 2.201$, Se acepta la hipótesis nula, por lo tanto el método es preciso (repetible).

10.- Cálculo del intervalo de confianza:

$$I.C = \bar{x} \pm t \cdot 0.975 \cdot S/\sqrt{N}$$

$$I.C = 99.15 \pm 0.9721$$

(99.1778, 100.1221) intervalo de confianza al 95%.

TABLA N° 8.-

REPRODUCIBILIDAD

| DIA | ANALISTA | %RECUPERACION |
|-----|----------|---------------|
| 1 | A | 97.38 |
| 1 | A | 98.12 |
| 1 | A | 100.00 |
| 2 | A | 99.49 |
| 2 | A | 95.26 |
| 2 | A | 101.33 |
| 1 | B | 99.51 |
| 1 | B | 98.54 |
| 1 | B | 100.37 |
| 2 | B | 101.46 |
| 2 | B | 97.76 |
| 2 | B | 97.55 |

Número de datos (n) = 12

Promedio del porcentaje de recuperación (\bar{x}) = 99.23%

Desviación estándar (s) = 1.399

Coefficiente de variación (C.V) = 1.41%

EVALUACION DE LA REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

La reproducibilidad del método se determina de la comparación de las varianzas y de las medias de los resultados obtenidos por los dos analistas en los dos días.

La prueba de hipótesis sobre las varianzas quedaría:

$$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$$

$$H_1: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$$

Como se trata de determinar si las dos muestras provienen de poblaciones con varianzas iguales se utiliza el estadístico F de Snedecor, que se calcula:

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

S_1^2 = Es la varianza muestral mayor con n-1 grados de libertad.

S_2^2 = Es la varianza muestral menor con n-1 grados de libertad.

Se rechaza la hipótesis nula H_0 , si $F > F_{\alpha/2}(n-1, n-1)$

$$F = \frac{5.14}{1.95} = 2.6359$$

Si F de tablas es:

$$F_{\alpha/2} = F_{0.025} = 7.1464$$

Como F calculada es menor que F de tablas.

$$F_{\text{calc}} < F_{0.025}, \quad 2.6359 < 7.1464$$

La hipótesis nula se acepta, es decir, las varianzas de las dos muestras independientes analizadas por diferentes analistas en días distintos son iguales.

La prueba de hipótesis sobre las medias se establece como:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$$

Si con la prueba anterior se demostró que las varianzas son iguales y se trata de muestras pequeñas e independientes, el estadístico de prueba es:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}}$$

Cuando $n_1 = n_2 = n$, es decir, el mismo número de determinaciones para ambos experimentos, la ecuación anterior se reduce a:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{S_1/n + S_2/n}}$$

Como se trata de un ensayo bilateral o "en dos sentidos" con $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad, la hipótesis nula se rechaza cuando $t_{\text{calc}} < -t_{\alpha/2}$ o $t_{\text{calc}} > t_{\alpha/2}$.

$$t = \frac{99.26 - 98.84}{\sqrt{1.95/6 + 5.14/6}} = 0.3864$$

Como $-2.228 < t_{\text{calc}} < 2.228$, es decir, $-2.228 < 0.3864 < 2.228$, la hipótesis nula se acepta, es decir, la media para ambos analistas en los dos días es la misma. Se concluye que el método es reproducible, pues la varianza y la media son iguales para los dos analistas en los dos días distintos.

TABLA N° 9. -

ESTABILIDAD DE LA SOLUCION A TEMPERATURA AMBIENTE.

| Y INICIAL (S) | Y, DESPUES DE 24 HRS A T. A. (I) | RELACION (S/I) |
|--------------------|--|-------------------|
| 100.54 | 98.15 | 0.976 |
| 101.78 | 100.25 | 0.985 |
| 98.90 | 95.70 | 0.968 |
| 100.49 | 97.21 | 0.967 |
| 103.40 | 102.47 | 0.991 |
| 100.51 | 97.18 | 0.939 |
| $\bar{Y} = 101.44$ | $\bar{Y} = 98.49$ | $\bar{x} = 0.971$ |
| $S = 1.81$ | $S = 2.46$ | |
| $CV = 1.79\%$ | $CV = 2.50\%$ | |
| $S^2 = 3.2761$ | $S^2 = 6.0516$ | |

TABLA N° 10.-

ESTABILIDAD DE LA SOLUCION EN REFRIGERACION.

| % INICIAL (I) | % DESPUES DE 24 HORAS (S) | RELACION (S/I) |
|--------------------|---------------------------------|-------------------|
| 103.47 | 101.96 | 0.985 |
| 99.51 | 98.72 | 0.992 |
| 98.54 | 99.27 | 1.008 |
| 100.37 | 102.18 | 1.018 |
| 101.46 | 102.87 | 1.014 |
| 97.76 | 98.41 | 1.007 |
| $\bar{x} = 100.19$ | $\bar{x} = 100.57$ | $\bar{x} = 1.004$ |
| $S = 2.07$ | $S = 1.98$ | |
| $S^2 = 4.2849$ | $S^2 = 3.9204$ | |
| $CV = 2.07\%$ | $CV = 1.97\%$ | |

TABLA N° 11.-

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN REFRIGERACION.

| % INICIAL (I) | % DESPUES DE 48 HORAS (S) | RELACION (S/I) |
|--------------------|---------------------------------|-------------------|
| 103.47 | 101.67 | 0.983 |
| 99.51 | 98.67 | 0.992 |
| 98.54 | 96.87 | 0.983 |
| 100.37 | 101.09 | 1.007 |
| 101.46 | 101.19 | 0.997 |
| 97.76 | 95.79 | 0.980 |
| $\bar{X} = 100.19$ | $\bar{X} = 99.21$ | $\bar{X} = 0.990$ |
| $S = 2.07$ | $S = 2.49$ | |
| $S^2 = 4.2849$ | $S^2 = 6.2001$ | |
| $CV = 2.07\%$ | $CV = 2.51\%$ | |

A

EVALUACION ESTADISTICA DE LA ESTABILIDAD DE LAS SOLUCIONES.

La estabilidad de las muestras se determina de la comparaci3n de las varianzas y de las medias de los resultados obtenidos a diferentes tiempos de almacenamiento. Las pruebas de hip3tesis establecidas son las mismas que para reproducibilidad del m3todo.

$$H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2$$

$$H_1 : \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2, \text{ y}$$

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 : \mu_1 \neq \mu_2$$

Es decir, no debera haber ninguna diferencia estadística entre los ensayos hechos antes y despu3s del almacenamiento de la muestra

PRUEBA DE HIPOTESIS SOBRE LAS VARIANZAS:

F (Snedecor), para almacenamiento a temperatura ambiente despu3s de 24 horas y para refrigeraci3n despu3s de 24 y 48 horas.

$$F (T.A, 24 \text{ hrs}) = 6.0516/3.2761 = 1.8472$$

$$F (\text{Refri.}, 24 \text{ hrs}) = 4.2849/3.9204 = 1.0929$$

$$F (\text{Refri.}, 48 \text{ hrs}) = 6.2001/4.2849 = 1.4469$$

Si F de tablas es:

$$F_{\alpha/2} = F_{0.025} = 7.1464$$

Como F calculada es menor que F de tablas, la hip3tesis nula se acepta, es decir, las varianzas de las dos muestras

independientes analizadas a diferentes tiempos de almacenamiento son iguales.

PRUEBA DE HIPOTESIS SOBRE LAS MEDIAS:

Se tiene que t de tablas es: $t_{0.025} = 2.228$

Para rechazar H_0 :

$$t_{\text{calc}} < t_{- /2} \text{ b } t_{\text{calc}} > t_{/2}$$

Las t calculadas son las siguientes:

$$t \text{ (24 hrs a T.A)} = 2.3659$$

$$t \text{ (24 hrs en Refg)} = 0.3249$$

$$t \text{ (48 hrs en Refg)} = 0.7414$$

Como $t_{-0.025} < t_{\text{calc}} < t_{0.025}$, para las muestras almacenadas en refrigeración 24 y 48 horas, la hipótesis nula se acepta, es decir, la media en el análisis inicial, a las 24 horas y a las 48 horas en refrigeración es la misma.

Sin embargo para el almacenamiento a temperatura ambiente se rechaza la hipótesis nula, es decir, la media en el análisis inicial y a las 24 horas a temperatura ambiente son diferentes.

También se observa que el coeficiente de variación a las 48 horas en refrigeración es mayor a 2.0%.

Por lo tanto para obtener buenos resultados decimos que las muestras solo son estables no más de 24 horas de almacenamiento en refrigeración

TOLERANCIA DEL SISTEMA

Se realizaron algunos experimentos para determinar como afecta la variación de pH, velocidad de flujo y las condiciones iniciales y finales del gradiente en el tiempo de retención y el factor de resolución entre la glicina (G) y el reactivo OPA y entre la impureza debida al estándar interno (I) y la Leucina (L).

A continuación se muestran los resultados en la tabla siguiente:

TABLA 12.- VARIACION DE pH

| pH | TIEMPOS DE RETENCION | | | | FACTOR DE RESOLUCION | |
|-------|----------------------|-------|-------|-------|----------------------|------|
| | G | OPA | I | L | G-OPA | I-L |
| 6.73 | 8.67 | 10.25 | 17.30 | 17.69 | 2.63 | 1.30 |
| 6.20* | 9.10 | 10.50 | 17.98 | 18.52 | 2.67 | 1.64 |
| 5.64 | 9.26 | 10.44 | 18.21 | 18.77 | 2.05 | 1.39 |

TABLA 13.- VARIACION DE VELOCIDAD DE FLUJO

| ml/min | TIEMPOS DE RETENCION | | | | FACTOR DE RESOLUCION | |
|--------|----------------------|-------|-------|-------|----------------------|------|
| | G | OPA | I | L | G-OPA | I-L |
| 1.0 | 12.77 | 14.23 | 21.55 | 22.21 | 2.53 | 1.15 |
| 1.5* | 8.71 | 10.12 | 17.65 | 18.28 | 2.62 | 1.62 |
| 2.0 | 6.75 | 8.22 | 15.46 | 16.08 | 2.77 | 1.53 |

TABLA 14.- VARIACION DE LA CONDICION INICIAL DEL GRADIENTE

| LIMITES %MEOH | TIEMPOS DE RETENCION | | | | FACTOR DE RESOLUCION | | |
|------------------|----------------------|-------|-------|-------|----------------------|-------|------|
| | MENOR-MAYOR | G | OPA | I | L | OPA-G | L-I |
| 25 - 82 | | 10.25 | 11.81 | 18.67 | 19.20 | 2.17 | 1.23 |
| 30 - 82* | | 9.10 | 10.50 | 17.98 | 18.52 | 2.67 | 1.64 |
| 35 - 82 | | 6.97 | 8.60 | 16.30 | 17.06 | 2.50 | 1.32 |

TABLA 15.- VARIACION DE LA CONDICION FINAL DEL GRADIENTE.

| LIMITES %MEOH | TIEMPOS DE RETENCION | | | | FACTOR DE RESOLUCION | | |
|------------------|----------------------|------|-------|-------|----------------------|-------|-------|
| | MENOR-MAYOR | G | OPA | I | L | OPA-G | I - L |
| 30 - 80 | | 9.22 | 10.93 | 18.48 | 19.07 | 2.70 | 1.69 |
| 30 - 82* | | 9.10 | 10.50 | 17.98 | 18.52 | 2.67 | 1.64 |
| 30 - 84 | | 9.08 | 10.45 | 17.64 | 18.18 | 2.63 | 1.48 |

* CONDICIONES NORMALES DE OPERACION.

RESULTADOS DE ESPECIFICIDAD.

A continuacion se muestran los cromatogramas obtenidos de la prueba de especificidad en el siguiente orden:

A) ESPECIFICIDAD:

FIGURA 1.- (Estándares).

1.1.- Reactivo OPA

1.2.- Acido aminoacético (G)

1.3.- Leucina (L)

1.4.- Factor Respuesta (FR) (Glicina + Leucina)

B) ESPECIFICIDAD EN ESTABILIDAD:

FIGURA 2.- GLICINA (Principio activo)

2.1.- Temperatura ambiente durante 14 días sin estándar interno

2.2.- 35°C/75% H.R. durante 14 días sin estándar interno

2.3.- 60°C durante 14 días sin estándar interno

2.4.- Ciclo: (35°C/75% H.R. - 60°C) durante 14 días sin estándar interno

FIGURA 3.- PLACEBO DE GLICINA.

3.1.- SABOR NARANJA

3.2.- SABOR MELON

3.3.- SABOR DURAZNO

3.1.1.- Temperatura ambiente sin estándar interno durante 14 días

3.1.2.- 35°C/75% H.R. durante 14 días sin estándar interno

3.1.3.- 60°C durante 14 días sin estándar interno

3.1.4.- Ciclo: (35°C/75% H.R. - 60°C) durante 14 días sin

estándar interno.

FIGURA 4.- PRODUCTO COMPLETO:

4.1.- Temperatura ambiente durante 14 días sin estándar interno

* 4.2.- 35°C/75% HR durante 14 días sin estándar interno

* 4.3.- 60°C durante 14 días sin estándar interno

* 4.4.- Ciclo: (35°C/75% H.R. - 60°C) durante 14 días sin estándar interno

FIGURA 5.- MEZCLA DE EXCIPIENTES. (GLICINA + GLUCOSA)

5.1.- Temperatura ambiente durante 14 días sin estándar interno

* 5.2.- 35°C/75% H.R. durante 14 días sin estándar interno

* 5.3.- 60°C durante 14 días sin estándar interno

* 5.4.- Ciclo (35°C/75% H.R. - 60°C) durante 14 días sin estándar interno

FIGURA 6.- PRODUCTO TERMINADO (en material de empaque)

6.1.- SABOR NARANJA

6.2.- SABOR MELON

6.3.- SABOR DURAZNO

6.1.1.- Temperatura ambiente sin estándar interno

6.1.2.- Temperatura ambiente con estándar interno

6.1.3.- 35°C/75% H.R. durante 3 meses sin estándar interno

6.1.4.- 45°C durante 3 meses sin estándar interno

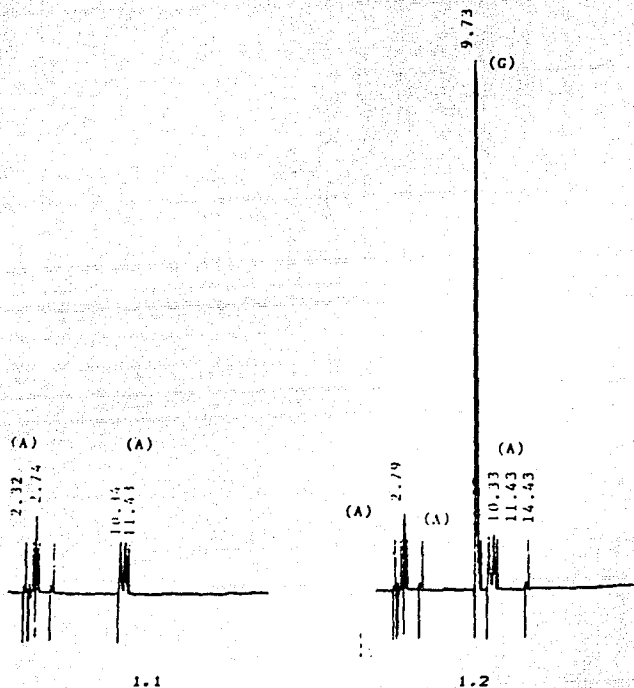
* Se observa cambio físico.

NOTA: Las muestras obtenidas para especificidad se inyectan

sin estándar interno, para evitar que algún posible producto de degradación interfiera con el estándar interno. Sin embargo es recomendable inyectar también la solución factor respuesta para comparar tiempos de retención.

ESPECIFICIDAD.

FIGURA N. 1.- ESTANDARES:



1.1.- Reactivo OPA

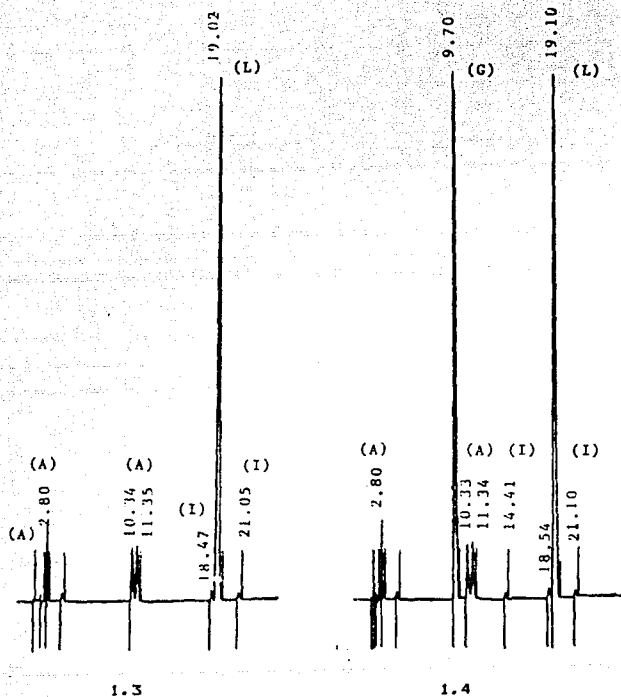
1.2.- Acido aminoacético (G)

(A) Reactivo OPA

(G) Acido aminoacético

ESPECIFICIDAD

FIGURA N. 1.- ESTANDARES



1.3.- Leucina

1.4.- Factor Respuesta

(A) Reactivo DPA

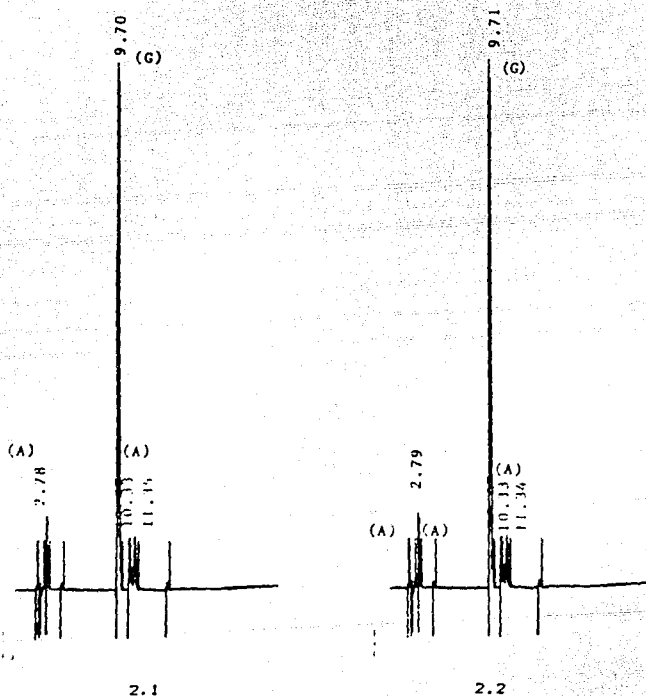
(L) Estándar interno (leucina)

(G) Acido aminoacético

(I) Impureza debida a la leucina

ESPECIFICIDAD EN ESTABILIDAD.

FIGURA N. 2.- GLICINA (MATERIA PRIMA)



2.1.- Temperatura ambiente durante 14 días sin leucina

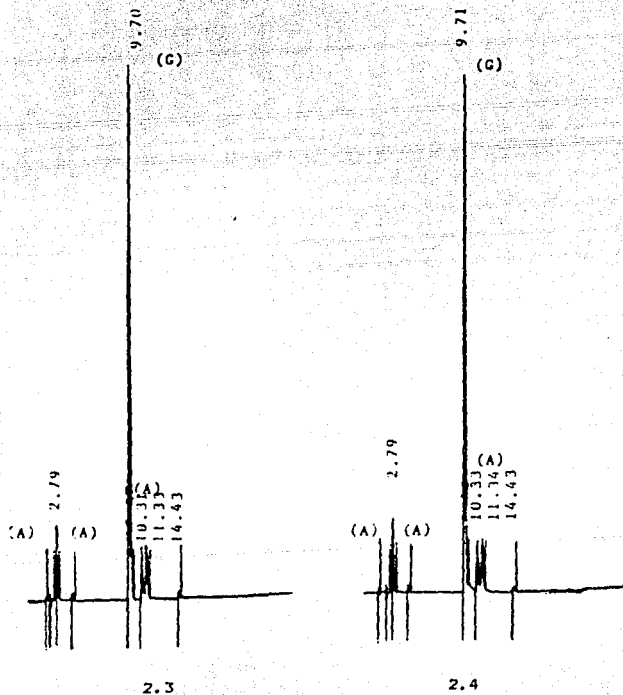
2.2.- 35°C durante 14 días sin estándar interno (leucina)

(A) Reactivo DPA

(G) Glicina

ESPECIFICIDAD

FIGURA N. 2.- GLICINA



2.3.- 60°C durante 14 días sin estándar interno

2.4.- Ciclo durante 14 días sin estándar interno.

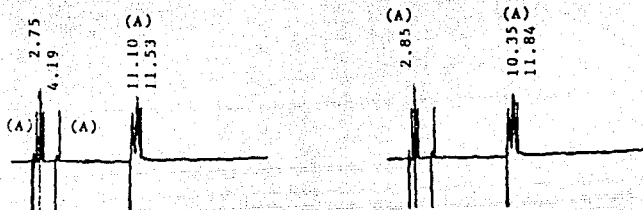
(A) Reactivo OPA

(G) Acido Aminoacético

ESPECIFICIDAD EN ESTABILIDAD.

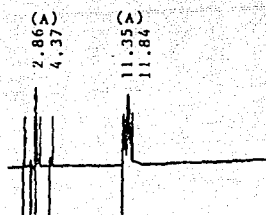
FIGURA N. 3.- PLACEBO DE GLICINA

3.1.- SABOR NARANJA.

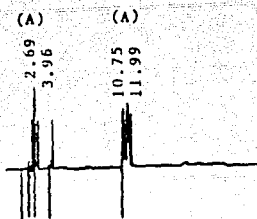


3.1.1

3.1.2



3.1.3



3.1.4

3.1.1.- Temperatura ambiente durante 14 dias sin leucina

3.1.2.- 35°C/75% H.R. durante 14 dias sin estándar interno

3.1.3.- 60°C durante 14 dias sin estándar interno

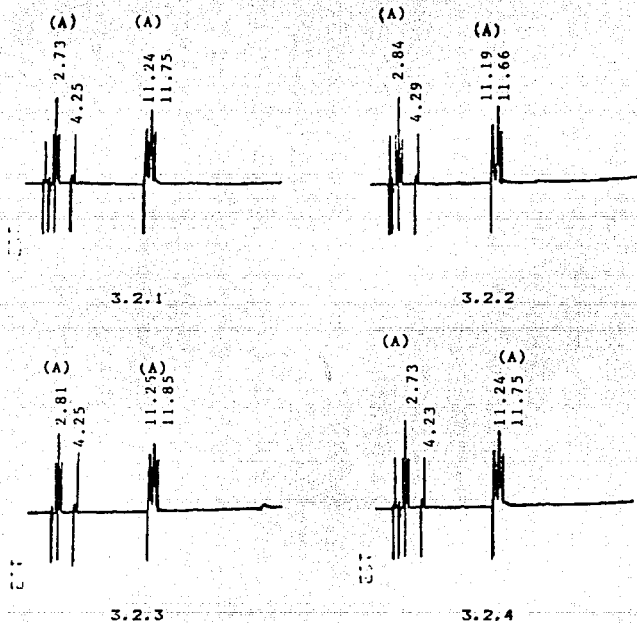
3.1.4.- Ciclo durante 14 dias sin estándar interno

(A) Reactivo DPA

ESPECIFICIDAD

FIGURA N. 3.- PLACEBO DE GLICINA

3.2.- SABOR MELON.



3.2.1.- Temperatura ambiente sin leucina durante 14 días

3.2.2.-35°C/75% H.R. durante 14 días sin estándar interno.

3.2.3.-60°C durante 14 días sin estándar interno.

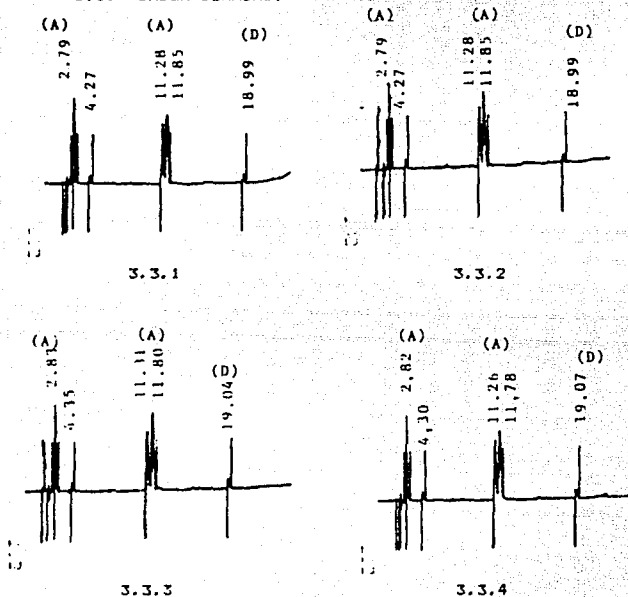
3.2.4.-Ciclo durante 14 días sin estándar interno.

(A) Reactivo OPA

ESPECIFICIDAD

FIGURA N. 3.- PLACEBO DE GLICINA.

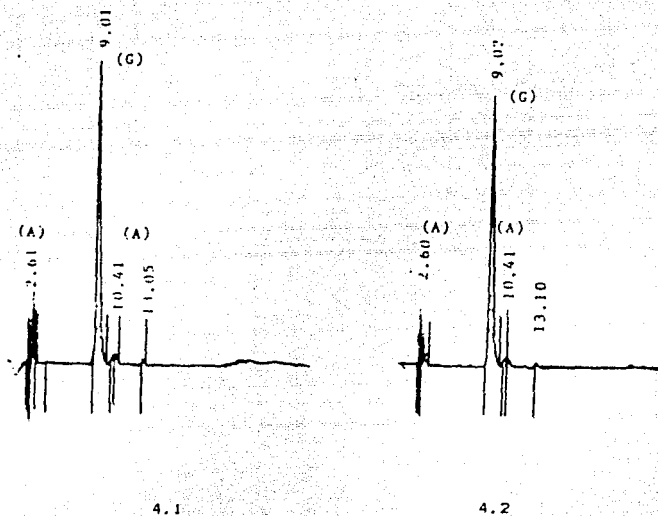
3.3.- SABOR DURAZNO.



- 3.3.1.- Temperatura ambiente sin leucina durante 14 días
 3.3.2.- 35°C/75% H.R. durante 14 días sin estándar interno.
 3.3.3.- 60°C durante 14 días sin estándar interno.
 3.3.4.- Ciclo durante 14 días sin estándar interno.
- (A) Reactivo OPA
 (D) Impureza debida al placebo de sabor durazno

ESPECIFICIDAD

FIGURA N. 4.- PRODUCTO COMPLETO.



4.1.- Temperatura ambiente durante 14 días sin leucina

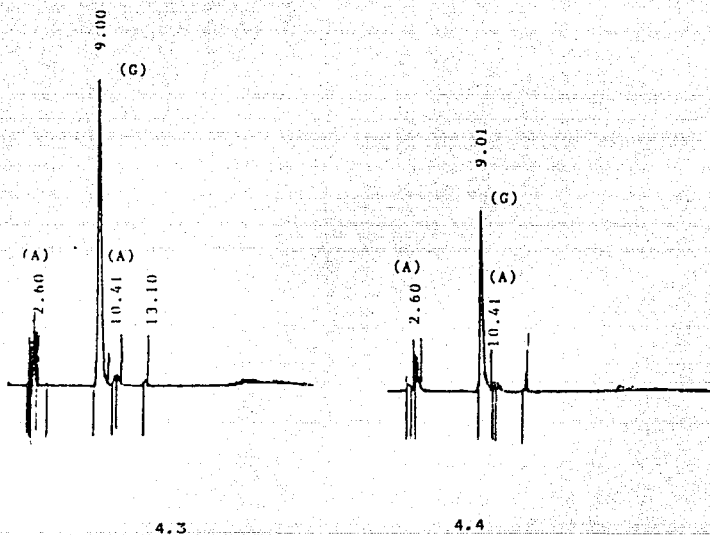
4.2.- 35 °C/75% H.R. durante 14 días sin estándar interno.

(A) Reactivo DPA

(G) Acido aminoacético

ESPECIFICIDAD

FIGURA N. 4.- PRODUCTO COMPLETO.



4.3.- 60°C durante 14 días sin estándar interno.

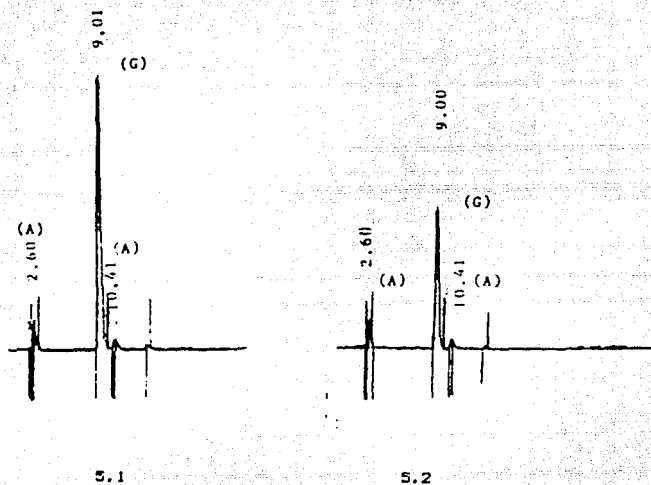
4.4.- Ciclo durante 14 días sin estándar interno.

(A) Reactivo OPA

(G) Acido aminoacético

ESPECIFICIDAD

FIGURA N. 5.- MEZCLA DE EXCIPIENTES. (GLICINA + GLUCOSA)



5.1.- Temperatura ambiente durante 14 días sin estándar interno

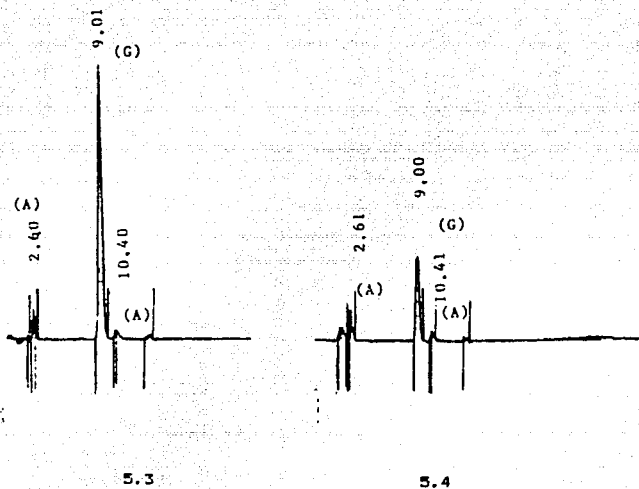
5.2.- 35°C/75% H.R. durante 14 días sin estándar interno.

(A) Reactivo OPA

(G) Acido aminoacético

ESPECIFICIDAD

FIGURA N.5.- MEZCLA DE EXCIPIENTES.



5.3.- 60°C durante 14 días sin estándar interno.

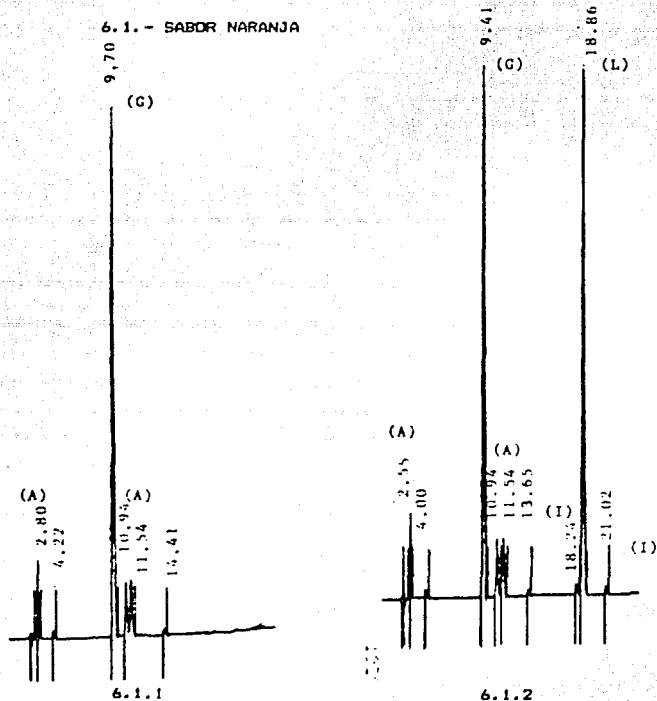
5.4.- Ciclo durante 14 días sin estándar interno.

(A) Reactivo OPA

(G) Acido aminoacético

ESPECIFICIDAD

FIGURA N. 6.- PRODUCTO TERMINADO.



6.1.1.- Temperatura ambiente durante 3 meses sin leucina

6.1.2.- Temperatura ambiente durante 3 meses con leucina

(A) Reactivo DPA

(I) Impureza debida a la leucina

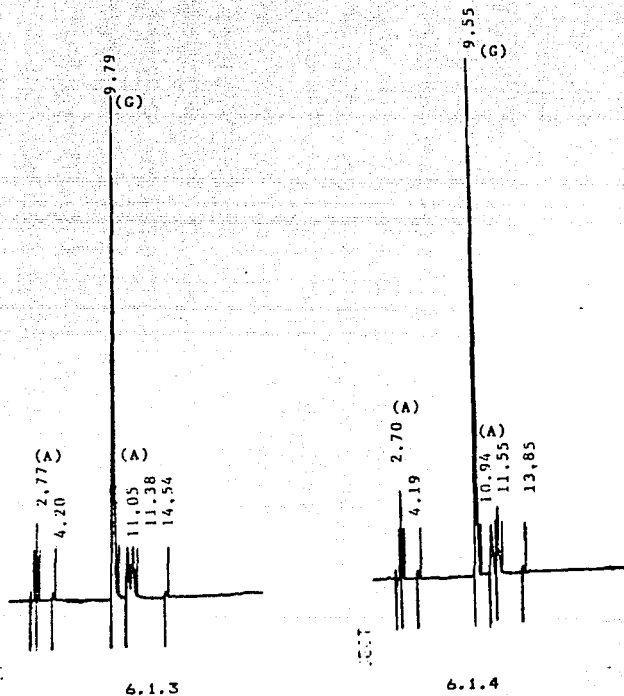
(G) Acido aminoacético

(L) Estándar interno (leucina)

ESPECIFICIDAD

FIGURA N. 6.- PRODUCTO TERMINADO

6.1.- SABOR NARANJA



6.1.3.- 35°C/75% H.R. durante 3 meses sin estándar interno

6.1.4.- 45°C durante tres meses sin estándar interno

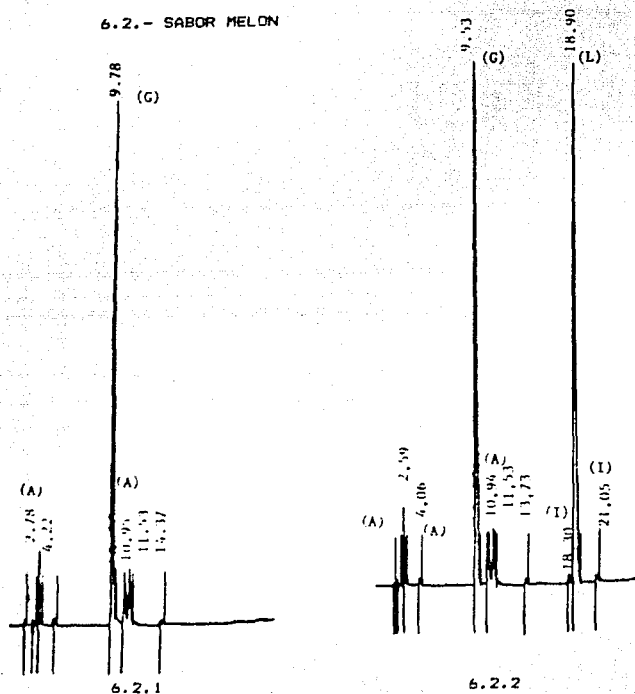
(A) Reactivo OPA

(G) Acido aminopáctico

ESPECIFICIDAD

FIGURA N. 6.- PRODUCTO TERMINADO

6.2.- SABOR MELON



6.2.1.- Temperatura ambiente durante 3 meses sin leucina

6.2.2.- Temperatura ambiente durante 3 meses con leucina

(A) Reactivo OPA

(I) Impureza debida a la leucina

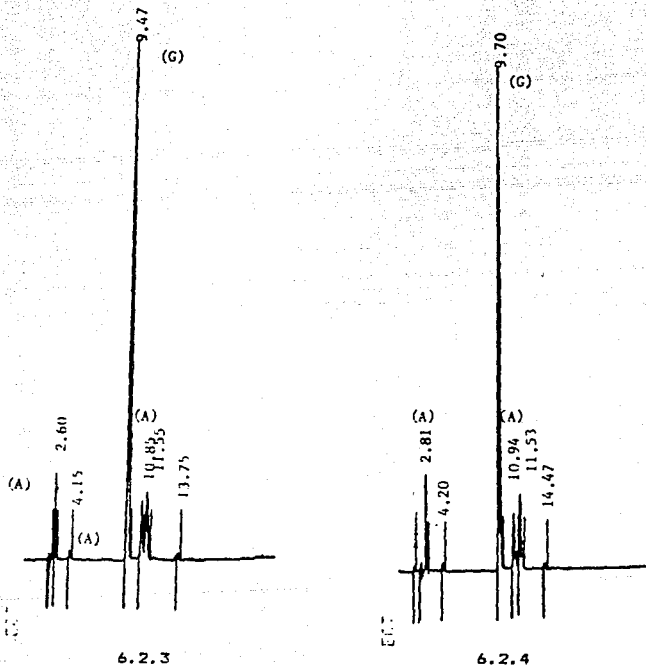
(G) Acido aminoacético

(L) Estándar interno (leucina)

ESPECIFICIDAD

FIGURA N. 6.- PRODUCTO TERMINADO

6.2.- SABOR MELON



6.2.3.- 35°C/75% H.R. durante tres meses sin estándar interno

6.2.4.- 45°C durante 3 meses sin estándar interno.

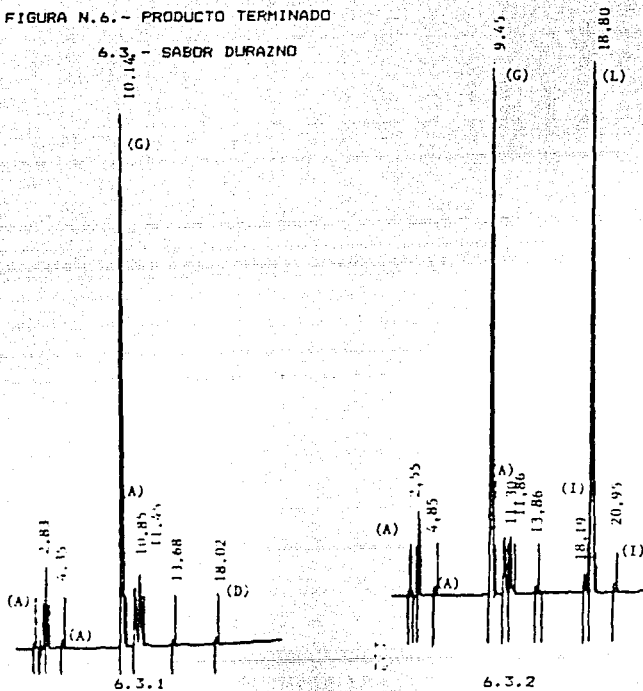
(A) Reactivo OPA

(G) Acido aminoacético

ESPECIFICIDAD

FIGURA N.6.- PRODUCTO TERMINADO

6.3 - SABOR DURAZNO



6.3.1.- Temperatura ambiente durante 3 meses sin leucina

6.3.2.- Temperatura ambiente durante 3 meses con leucina

(A) Reactivo DPA

(I) Impureza debida a la leucina

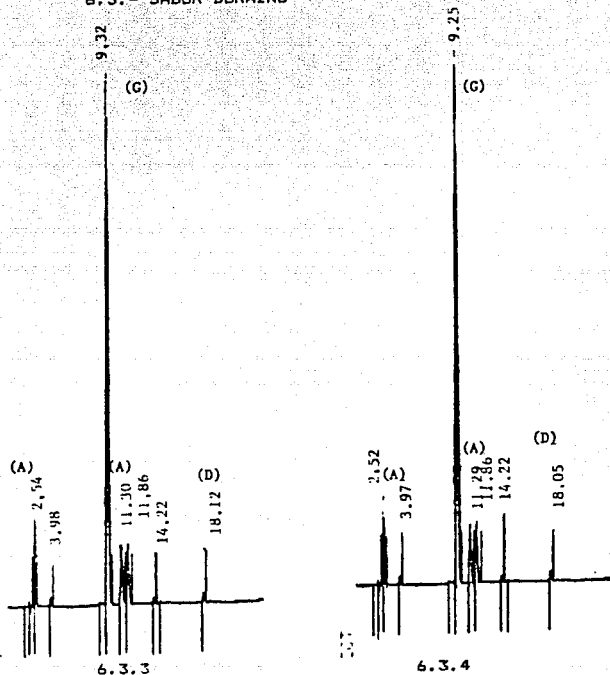
(G) Acido Aminoacetico (L) Estándar interno (leucina)

(D) Impureza debida a la formulación sabor durazno.

ESPECIFICIDAD

FIGURA N. 6.- PRODUCTO TERMINADO

6.3.- SABOR DURAZNO



6.3.3.- 35°C/75% HR durante 3 meses sin estándar interno

6.3.4.- 45°C durante 3 meses sin estándar interno.

(A) Reactivo OPA

(G) Acido aminoacético

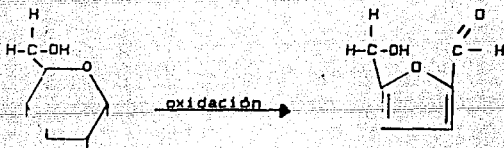
(D) Impureza debida a la formulación sabor durazno

RESULTADOS DE ESPECIFICIDAD

- Cuando el producto completo y la mezcla de excipientes (glicina + glucosa) es expuesta a diferentes condiciones extremas de temperatura y humedad, se observa un oscurecimiento del polvo oral de color blanco a color café, en los cromatogramas de las figuras 4 y 5, se observa una disminución en el tamaño del pico de la glicina. Esto se debe a que la concentración de glicina disminuye, debido a que el polvo oral en estudio contiene un azúcar (glucosa), el cual en presencia de aminas primarias o secundarias sufre un oscurecimiento que es acelerado por condiciones extremas de humedad y temperatura.

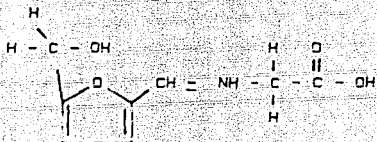
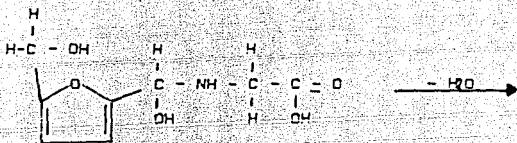
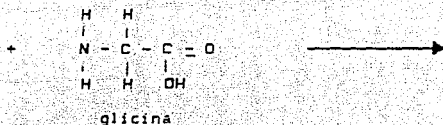
La reacción que se lleva a cabo entre la glucosa y el grupo amino de la glicina es llamada carbonil amina o Reacción de Maillard.

A continuación se describe la reacción que se lleva a cabo:



glucosa

5 (HMF)



Por lo tanto al reaccionar el grupo amino de la glicina, este ya no se encuentra libre para reaccionar con el reactivo CPA y por lo tanto disminuye su respuesta.

- Con los cromatogramas obtenidos de las pruebas de especificidad (Figuras números 1,2,3 y 6) se demostró la capacidad del método para separar la glicina intacta de los excipientes e impurezas, por lo tanto el método es específico para cuantificar glicina.

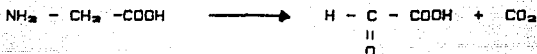
- A su vez la glicina puede sufrir una reacción de

descarboxilación cuando es expuesta a altas temperaturas en estado sólido ó bien cuando se encuentra en solución a temperatura de ebullición del disolvente. La reacción da como resultado la formación de metilamina y bioxido de carbono:(17)



Tanto la metilamina como el bioxido de carbono son volátiles y por lo tanto no reaccionan con el reactivo OPA.

- También se tienen que otros posibles productos de degradación de la glicina son:



Los cuales tampoco reaccionan con el reactivo OPA.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos de los diferentes parámetros de validación, se puede establecer que el método desarrollado para determinar la concentración de glicina en un polvo oral es:

1.- LINEAL: Porque cumple con los requisitos establecidos, como son, coeficiente de correlación mayor a 0.999, tanto para el sistema como para el método.

2.- PRECISO Y EXACTO: Puesto que se obtuvieron coeficientes de variación menores al 1.5% para el sistema y menores al 2.0% para el método a tres diferentes concentraciones (80, 100 y 120 % de la concentración normal de análisis).

3.- REPRODUCIBLE: Ya que se obtuvo un coeficiente de variación menor al 2.0% cuando se realizó el análisis de un mismo lote, por dos analistas diferentes en dos días diferentes. Demostrándose que las medias y las varianzas obtenidas por los dos analistas son significativamente iguales.

4.-ESPECIFICO: Se demostró la capacidad del método para separar la glicina de los excipientes y los diferentes productos de degradación; por lo tanto el método es específico para cuantificar glicina.

Con los resultados obtenidos se concluye que el método propuesto es confiable, pues cumple los requisitos de

precisión, exactitud, linealidad y especificidad para poder ser utilizado como un método de control de calidad para la determinación de Glicina en el polvo oral en estudio, siendo además un método que puede ser utilizado para monitoriar la estabilidad del producto.

BIBLIOGRAFIA.

- (1) "THE UNITED STATES PHARMACOPEIA"
Twenty-second Revision.
Ed. Marck Printing Co, USA 1990
pp 612, 1722, 1747.
- (2) "THE MERCK INDEX" An Encyclopaedia of Chemical
and Drugs
Ninth Edition.
Merck and Co., Inc., USA, 1976.
pp 582.
- (3) "THE UNITED STATES DISPENSATORY"
27 th Edition.
J.B. Lippincott Company
pp 54-55.
- (4) Mc. Nair, Harold
"CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS"
Primera Edición.
Ed. Secretaria General de la Organización de los
Estados Americanos. Washington, D.C., USA, 1981.
pp 1-67
- (5) Snyder, L.R; Kirkland, J.L;
"INTRODUCTION TO MODERN LIQUID CHROMATOGRAPHY"
2a. Edición.
John Willey and Sons. Inc., USA 1979.
- (6) Yost, R.W.; Ettre, L.S.; Canton, R.D.
"INTRODUCCION A LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA PRACTICA"

Ed. Perkin Elmer, México, 1985.

- (7) Millipore Div. Waters Associates Inv.

Escuela de Cromatografía Líquida

Impresores Aires al Instante.

México 1986

- (8) Robert F. Pfeifer and Dennis W. Hill.

"HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF AMINO ACIDS"

Ion-exchange and Reverse-phase Strategies.

Advances in Chromatography. 22:37-70 (1985)

- (9) Guerra, Johnny.

"VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS BY FDA LABORATORIES"

Pharmaceutical Technology.

Marzo, 1986. Volume 10 N.3.

pp 74-84

- (10) Inman, Eugene L; Frischman, Joseph K.

"GENERAL METHOD VALIDATION GUIDELINES FOR

PHARMACEUTICAL SAMPLES"

Journal of Chromatographic Science

Vol 25, June 1987.

pp 252-256

- (11) "AUTOMATION OF PHARMACEUTICAL OPERATIONS"

Edited by David J. Fraade.

Pharmaceutical Technology Publications.

Springfield, Oregon.

Copyright 1983.

Submitting HPLC methods to the Compendia and

Regulatory agencies.

pp 317-323

- (12) Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México A.C.

Guía para validación de métodos analíticos.

México, 1990.

- (13) Miller, Irwin y Freund John.

"PROBABILIDAD Y ESTADISTICA PARA INGENIEROS"

1a. Edición.

Ed. Reverte. México, D.F. 1967

pp 150-159, 167-168, 215-220.

- (14) Steel R. and Torrie J.

"PRINCIPLES AND PROCEDURES OF STATICS"

Mc. Graw Hill 1980.

pp 162-183.

- (15) Erwin Kreyszig.

"INTRODUCCION A LA ESTADISTICA MATEMATICA"

Limusa 1987, pp 314-354.

- (16) Barret, g.c.

"CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF THE AMINO ACIDS"

Chapman and Hall, 1985.

New York.

pp 375-585

- (17) Charles C. Thomas

"THE CHEMISTRY OF THE AMINO ACIDS AND PROTEINS"

Editado por Carl L.A. Schmidt, M.S., P.I.D.

Segunda edición, 1944

pp 22-27