

23.
2ej

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México
ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



FALLA DE ORIGEN

**DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA
LA DETERMINACION DE CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA,
CLORHIDRATO DE TIAMINA, NICOTINAMIDA Y RIBOFLAVINA 5' FOSFATO
DE SODIO EN UNA SOLUCION INYECTABLE POR
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.**

TESIS PROFESIONAL

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A

**MANUEL QUESADA GUTIERREZ
ASESOR: QFB.BEATRIZ GARCIA VAZQUEZ
GUADALAJARA, JAL. 1989.**



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.

I N D I C E

| | |
|---|-----|
| CAPITULO I | |
| INTRODUCCION | 1 |
| CAPITULO II | |
| GENERALIDADES | 3 |
| A) Vitaminas | 3 |
| B) Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución | 20 |
| C) Validación | 51 |
| D) Monografías | 60 |
| CAPITULO III | |
| PARTE EXPERIMENTAL | 87 |
| CAPITULO IV | |
| RESULTADOS | 107 |
| CAPITULO V | |
| CONCLUSIONES | 113 |
| CAPITULO VI | |
| BIBLIOGRAFIA | 115 |

CAPITULO I

INTRODUCCION

Las determinaciones analíticas de productos farmacéuticos, resultan muchas veces compleas y tardías, por las dificultades que representan las interacciones de los principios activos con las sustancias presentes en la formulación. El problema es mayor cuando son varios los principios activos y existe similitud entre ellos.

El poder contar con métodos de análisis rápidos, precisos y confiables es preocupación constante. Además si se obtiene una determinación simultánea de los activos presentes en una mezcla, proporciona grandes ahorros económicos y de tiempo.

En la actualidad gracias a la gran instrumentación de las técnicas de separación como la cromatografía de gases y la de líquidos de alta resolución así como el perfeccionamiento de métodos de detección y cuantificación, es posible la realización en corto tiempo, con escaso gasto de reactivos y disolventes, en forma efectiva y confiable de los análisis de principios activos en presentaciones farmacéuticas de todo tipo.

En la actualidad existe la conciencia de comprobar que los resultados obtenidos del análisis que se realice correspondan realmente a lo existente en la muestra analizada, o sea que se deben validar los métodos desarrollados.

En el trabajo que se presenta, los objetivos fueron desarrollar y validar un método para la determinación cuantitativa de Clorhidrato de Piridoxina, Clorhidrato de Tiamina, Ni-

cotinamida y Riboflavina 5' Fosfato de Sodio, presentes en un inyectable por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, de tal forma que fuese confiable, esto es preciso, exacto y reproducible. Además de poder realizarse en corto tiempo.

CAPITULO II

GENERALIDADES

A) VITAMINAS

Las vitaminas = son compuestos orgánicos, que requieren - los animales y el hombre para su crecimiento adecuado y el - mantenimiento de la vida .

El proceso metabólico de los animales no es capaz de sintetizar dichos compuestos.

Las vitaminas no son fuentes de energía, ni son utilizadas como componentes de estructuras por los organismos, sin embargo son esenciales en la transformación de energía y la regulación de las funciones metabólicas de las unidades estructurales, por lo que son necesarias en el mantenimiento de la salud, siendo efectivas en pequeñas cantidades, por lo que además de carbohidratos, lípidos, proteínas, sales minerales y agua, son necesarias pequeñas cantidades de vitaminas en la dieta del hombre y de los animales.

Las vitaminas o sus precursores se encuentran en las plantas en las cuales también tienen funciones metabólicas, siendo éstas las fuentes de vitaminas para el reino animal.

Las vitaminas forman el grupo prostético o coenzima de diversos sistemas enzimáticos que intervienen activamente en los metabolismos de carbohidratos, lípidos y proteínas, los que a su vez son interdependientes por lo que al existir la deficiencia de sólo una de las vitaminas produce un rompimiento en el equilibrio metabólico del organismo, originando

se así graves trastornos en el funcionamiento del mismo.

A la vez algunos compuestos con actividad vitamínica como metabolitos activos de vitamina D tienen actividad hormonal.

Todas las vitaminas son diferentes entre sí, tanto en su composición química como en su función, es por esto que la deficiencia de cada vitamina produce la aparición de un síndrome específico, el cual se puede curar y prevenir con la administración de la vitamina que lo está causando.

Como se mencionó, la interrelación hace que generalmente la deficiencia no sólo sea de una vitamina, sino que estén involucradas varias.

En nuestro medio se encuentran con relativa frecuencia carencias leves, difíciles de reconocer y que ceden rápidamente con la administración de las vitaminas.

Sin embargo (el abuso es un grave problema) se abusa de las vitaminas, ya que se quiere que éstas sean la panacea de cualquier proceso de etiología indeterminada. También se han usado grandes dosis de vitaminas con el propósito de tratar una amplia variedad de desórdenes como artritis, asma, nefritis, fiebre reumática, esquizofrenia, desórdenes vasculares, etcétera, pero no existe evidencia clara de su valor.

Las causas de avitaminosis son:

- Carencia primaria: debido a un aporte insuficiente, que puede ser por falta de alimentación o por una alimentación mal balanceada.
- Carencia condicional: se observa en pacientes sometidos a una alimentación normal pero que por trastornos de absorción o bien, por aumento de los requerimientos nece-

sitan mayor cantidad de vitaminas, como en periodos de crecimiento, en el embarazo y la lactancia, hipertiroidismo, fiebre, etc.

Antiguamente por desconocerse la composición química de las vitaminas se les designó con letras, al aislarse y conocerse su estructura se les dio nombres químicos y genéricos.

Una forma de clasificarlas basándose únicamente en el tipo de disolvente con el que son extraídas o en el que son solubles es:

- Vitaminas liposolubles: comprende las vitaminas A, D, E y K.
- Vitaminas hidrosolubles: comprende las vitaminas del complejo B y ácido ascórbico o vitamina C.

Actualmente todas las vitaminas son sintetizadas química o microbiológicamente, siendo, la fuente comercial para preparaciones farmacéuticas, suplementos dietéticos y alimentos fortificados.

Vitaminas del Complejo B

Las hidrosolubles B de McCollum, o las vitaminas antiberiberi de Funk, han sido separadas en cuando menos once distintas entidades químicas. Se ha esclarecido que ocho de éstas son requeridas en la nutrición humana, las cuales son: Tiamina, Riboflavina, Niacina, Folacina, Piridoxina, Biotina, Acido Pantoténico y Cianocobalamina. Sobre el Acido p-aminobenzóico, Colina e Inositol no existe evidencia de que sean requeridos en la dieta.

No existe fuente natural que contenga el grupo de vitaminas B completo, por lo que son necesarias varias fuentes para complementar el suministro.

Fuentes no naturales pueden contener todas las vitaminas Hidrosolubles y en las proporciones requeridas en la nutrición, sin embargo, el valor de la fuente no natural dependerá de las necesidades del individuo al comenzar la administración. Una de estas fuentes no naturales son las presentaciones farmacéuticas, las cuales pueden usarse profiláctica y terapéuticamente.

CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA

El término de Piridoxina no corresponde a una sola sustancia, sino que es el nombre colectivo de un grupo de piridinas que se encuentran presentes en la naturaleza y que tan to metabólica como funcionalmente están interrelacionadas, -- químicamente varían por el tipo de grupo en la posición cuatro, dichos compuestos son: Piridoxina con un grupo alcohol-primario, la cual se utiliza como clorhidrato; Piridoxal con un grupo aldehído y Piridoxamina con un grupo amina primario.

La Piridoxina fue aislada por varios grupos de investigadores en 1938 que son: Kireztesy e Stenens; György; Kuhn, -Wendt. La estructura fue definida un año después por dos investigadores por separado E.T. Stiller y R. Kuhn. La síntesis fue por primera vez hecha por Harris, Folkers en 1939, - posteriormente ha sido sintetizada de diferentes formas y -- por varias personas. Una de las formas es por una deshidratación al ciclizarse etilglicinato, etilphiruvato y 1,4-dietoxi-2-butanona, seguida de una saponificación y decarboxilación en posición dos y el rompimiento de tres grupos etoxi - mediante ácido iodhídrico u otros reactivos apropiados. La-reacción de la Piridoxina base con ácido clorhídrico produce el Clorhidrato de Piridoxina.

La Piridoxina en sus tres formas está ampliamente distribuida en las fuentes alimenticias, encontrándose en cantidades relevantes en la levadura e hígado, carne, vegetales - verdes y cereales; la nuez, huevos y leche son también buenas fuentes.

Es una de las vitaminas más estables, la forma que tiene el grupo alcohol soporta el calentamiento en soluciones - ácidas o alcalinas, así como las condiciones de los procesos

de preparación de alimentos o presentaciones farmacéuticas.

En el organismo los tres compuestos pueden ser interconvertidos, se considera que la forma que actúa es el Piridoxal en forma de fosfato de Piridoxal denominado también co-transaminasa o codecarboxilasa el cual tiene funciones en los metabolismos de carbohidratos, lípidos y proteínas, aunque su principal función está muy relacionada con el metabolismo de aminoácidos y proteínas. Forma parte de la configuración molecular de muchas enzimas como una co-enzima entre las que destacan las glicogenofosforilasas, transaminasas, decarboxilasas, deaminasas, las cuales son esenciales en el anabolismo y catabolismo de proteínas.

La isoniazida usada en el tratamiento de tuberculosis es similar químicamente a la Piridoxina y actúa como antagonista de ésta, por lo que se deben tomar precauciones al utilizar la isoniazida.

Debido a la amplia distribución de la Piridoxina se han observado pocos síntomas de la deficiencia, existiendo la duda de si es esencial en la nutrición humana, aunque está bien establecido que es esencial en el crecimiento de los infantes. Algunas manifestaciones de su deficiencia son probablemente un síndrome caracterizado por edema y pérdida de cabello, degeneración de nervios que produce cambios de conducta; en niños reacciones convulsivas. Lesiones en piel y boca parecidas a las producidas por deficiencia de Riboflavina y Nicotinamida se han observado en adultos privados de Piridoxina; una neuritis periférica también puede ocurrir y la neuritis asociada con la terapia de isoniazida puede deberse a deficiencia de Piridoxina por el antagonismo ya indicado.

La Piridoxina es bien absorbida por todas las vías, no se encuentra unida a proteínas, pero el fosfato de Piridoxal

si se une completamente a éstas. Se excreta por la orina como ácido 4-piridóxico.

Para adultos, los requerimientos de Piridoxina son alrededor de 2 mg. al día. Dicha cantidad se encuentra en cualquier dieta normal. Para adolescentes y condiciones como embarazo y lactancia el rango es de 2.3 a 2.6 mg. diarios.

La Piridoxina carece de efectos tóxicos. Un efecto que no puede considerarse tóxico pero se debe tener en cuenta, - es que reduce la acción de la levodopa.

CLORHIDRATO DE TIAMINA

La Tiamina es una molécula compleja, siendo un catión - el llamado propiamente Tiamina, el anión es generalmente un cloro aunque puede variar sin que signifiquen cambios sustanciales en las propiedades de la molécula. El catión consiste en un anillo de Pirimidina sustituido y unido por un puente de metileno al nitrógeno de un tiazol sustituido. El Clorhidrato de Cloruro de Tiamina es la sal de amonio formada por la reacción del Cloruro de Tiamina con ácido clorhídrico.

La Tiamina fue el primer compuesto purificado del grupo de vitaminas B, lográndose a partir de la cascarilla de arroz por Jansen y Donath en 1926; la estructura se determinó en 1936 por Williams a la vez que Grewe, después que había sido sintetizada en 1935 por el mismo Williams.

En gran cantidad de alimentos se puede encontrar a la Tiamina, se localiza en todas las plantas y algunos microorganismos la pueden sintetizar entre ellas la levadura en forma especial.

No se puede considerar ningún alimento como fuente principal de Tiamina, se puede mencionar a los cereales, leche, legumbres, nueces, huevos, carne de puerco, hígado como algunos de los alimentos que proporcionan a la Tiamina en la dieta.

Es sintetizada por bacterias intestinales pero se desconoce si es absorbida.

La Tiamina en forma seca y en soluciones ácidas es muy estable, aún a las temperaturas de cocción de los alimentos, sin embargo, en soluciones neutras o alcalinas es inestable-

siendo oxidada a tiocromo sustancia que posee gran fluorescencia pero carece de la actividad biológica de la Tiamina. La Tiamina es incompatible con sustancias oxidantes y reductoras como cloruro mercurico, carbonatos, acetatos, sulfato férrico, ácido tánico, ioduros, citrato de amonio férrico, - iodo, produciendo precipitados café. La destrucción del - - Clorhidrato de Tiamina en solución es acelerada con iones de cobre.

La Tiamina y Riboflavina en solución acuosa son incompatibles ocurriendo precipitaciones de tiocromo o cloroflavina, - dicha incompatibilidad se evita con la adición de ácido ascórbico.

La Tiamina está fundamentalmente asociada con el metabolismo de carbohidratos. Se combina con ácido pirofosfórico - en células nucleadas especialmente en el hígado, corazón y - glóbulos blancos formando el pirofosfato de Tiamina o cocarboxilasa, el cual actúa como una co-enzima en reacciones como la decarboxilación de α -ceto glutarato, por lo que al - - existir deficiencia de Tiamina el ácido pirúvico y el láctico se acumulan en los tejidos. El pirofosfato de Tiamina sólo actúa como co-enzima en la oxidación directa de la glucosa.

La polineuritis (disfunción del sistema nervioso) o Beriberi es una clara enfermedad asociada principalmente con - la deficiencia de Tiamina, aunque también con otros componentes del complejo B. La neuritis periférica es una condición - patológica de los nervios de las extremidades, los síntomas - incluyen pérdida de la sensibilidad, disminución en las fuerzas y parálisis, además va asociada con edema y variaciones electrocardiográficas. Otros síntomas que se han observado - en deficiencias de Tiamina son: fatiga, anorexia, disturbios gastrointestinales, taquicardia.

Las causas de la deficiencia de Tiamina pueden ser: por una dieta inadecuada; por problemas en la ingestión, absorción o utilización; o por incrementos en su destrucción o excreción. Estas causas se pueden presentar en personas con: - enfermedades gastrointestinales, quemaduras graves, diabetes disfunciones hepáticas o cardíacas, hipertiroidismo, enfermedades mentales, alcoholismo, adicción a drogas, o que han recibido antibióticos o sulfonamidas por períodos de tiempo -- prolongados.

La Tiamina se absorbe fácil y completamente por vía intramuscular o subcutánea, la absorción en el intestino es limitada ya que se pierde de un 20 a un 25 por ciento en las heces. Una vez absorbida pasa principalmente a hígado, riñón, cerebro y corazón donde se transforma en el pirofosfato de Tiamina, la capacidad de almacenamiento es reducida, la pequeña cantidad que se almacena es en forma de pirofosfato de Tiamina libre o combinado con manganeso y proteínas específicas formando las carboxilasas.

Las cantidades en exceso de los requerimientos del organismo son excretadas principalmente en la orina y algo en el sudor y la leche; la Tiamina se excreta sin cambios o metabolizada. El medir la excreción de Tiamina después de administrada en pequeñas dosis es una forma de determinar si existe deficiencia.

Los requerimientos de Tiamina están directamente relacionados con la cantidad de carbohidratos ingeridos y el grado de metabolismo. Una dosis diaria de 200 ug/1000 Kcal es normalmente la adecuada para satisfacer los requerimientos mínimos, la saturación de los tejidos se consigue con 330 -- ug/1000 Kcal, de cualquier forma se recomiendan 500 ug/1000 Kcal. Las necesidades de Tiamina aumentan con estados de crecimiento activo o embarazo, también cuando existe gran traba

jo físico o condiciones patológicas como fiebres o hipertiroidismo.

Cuando existen deficiencias se produce una rápida respuesta a la administración de Tiamina, mejorando sensiblemente las afecciones. En casos graves de deficiencia se administran de 50 a 100 mg diarios, y en casos leves de 10 a 25 mg al día.

Normalmente no ocurren efectos indeseables aún cuando la Tiamina se administre en grandes dosis y por largos períodos de tiempo.

Sin embargo, pueden producirse reacciones tóxicas por inyecciones de 50 mg o más, grandes dosis posiblemente interfieren con el metabolismo de otros miembros del grupo de vitaminas B por lo que precipitan los síntomas de otras deficiencias. Se han producido shocks anafilácticos por inyecciones repetidas de Clorhidrato de Tiamina.

NICOTINAMIDA

Es un derivado de la piridina, se aisló en 1939 por Euler y a la vez por Karrel y Keller. Se sintetizó por la acción del cloruro de tionil, sobre ácido nicotínico y tratando el cloruro ácido que resulta, con amoníaco, otra forma es con el paso de amoníaco gaseosos a través de ácido nicotínico.

La actual forma de sintetizarla comercialmente es usualmente por esterificación del ácido nicotínico con metanol seguida de una amonólisis.

Las fuentes naturales de nicotinamida más ricas son el pescado pollo y carne; siendo más abundante en los órganos como hígado y riñón que en el músculo; las papas, legumbres, vegetales con hojas verdes y levadura contienen moderadas cantidades; la leche y el maíz la contienen en menor proporción.

La nicotinamida puede ser parcialmente sintetizada en el organismo a partir del triptófano.

La nicotinamida es la más estable de las vitaminas, estermoestable resistiendo las temperaturas de cocción de los alimentos y de la preparación de productos farmacéuticos como puede ser la del autoclaveo, reteniendo su actividad biológica. Sin embargo, si el calentamiento es en presencia de ácido o alcalí es hidrolizada.

En el organismo la nicotinamida forma con intervención del adenosintrifosfato la nicotinamidadeninaducleótido - (NAD) o coenzima y la nicotinamidadeninaducleótidofosfato (NADH) o coenzima II, que interviene en una amplia variedad

de sistemas enzimáticos involucrados en la oxidación anaeróbica de carbohidratos. Las coenzimas actúan como aceptores - de hidrógeno en la oxidación del sustrato. Estas enzimas están presentes en todas las células vivas y toman parte en muchas reacciones de oxidación biológica.

La Pelagra llamada la enfermedad de las cuatro D (dermatitis, diarrea, demencia y deceso), aunque se debe a una carencia de varias vitaminas, la falta de suficiente nicotinamida en la dieta durante meses, es la causa primaria de la enfermedad. La condición involucra el tracto gastrointestinal, la piel y el sistema nervioso.

La respuesta a la Nicotinamida es rápida desapareciendo los trastornos mentales, vómitos, diarrea, colicos, se reduce el dolor y rubicundez de la lengua, dermatitis y prurito. La polineuritis y queilosis ceden sólo con la administración de Tiamina y Riboflavina. Se ha visto que son más efectivas - pequeñas dosis de Nicotinamida durante el día que una gran - dosis única. Además el tratamiento debe acompañarse de un -- cambio nutricional a una dieta adecuada.

La Nicotinamida se absorbe por todas las vías rápidamente, se distribuye en todos los órganos especialmente en hígado, riñón y músculos, aunque existe poco almacenamiento celular. La excreción se realiza en la orina parcialmente en forma de Nicotinamida, pero la mayor parte como metabolitos, especialmente la N'-metilnicotinamida y la 6-piridona-N'-metilnicotinamida, en menor proporción ácido nicotínico. Sólo - pequeñas cantidades de Nicotinamida pasan a la leche.

El requerimiento mínimo para prevenir la pelagra es el equivalente a 4.4 mg de Nicotinamida por 1000 Kcal/día. En dietas pobres en contenido de Nicotinamida se suministran 20 mg de ésta como medida profiláctica.

La nicotinamida esencialmente no tiene efectos tóxicos, además no produce vasodilatación como lo hace el ácido nicotínico que tiene la misma actividad que ésta.

RIBOFLAVINA 5'FOSFATO DE SODIO

La Riboflavina es una sustancia coloreada del grupo de las flavinas, es un compuesto con: tres anillos (isoxaloxazina), una cadena lateral derivada de la D-ribosa (ribitol) localizada en la posición 9 y dos grupos metílicos en las posiciones 6 y 7, estos rasgos son todos necesarios para su actividad farmacológica. La Riboflavina 5'Fosfato de Sodio tiene una molécula de ácido fosfórico esterificada en la posición-5 de la cadena lateral.

Su descubrimiento se debió a sus características de -- fluorescencia y pigmentación en alimentos como la yema de -- huevo.

La Riboflavina 5'Fosfato de Sodio ha sido preparada por fosforilación de la Riboflavina por diversos caminos y personas:

- Con ácido clorofosfórico por Flexer, Farkas en 1951.
- Con ácido metafosfórico por Viscontini en 1956.
- Con ácido pirofosfórico por Breivogel, Rirge en 1960.
- Con fosfato de pirocatecol cíclico por Ukita en 1964.

La Riboflavina está ampliamente distribuida en la naturaleza tanto en plantas como animales, como un constituyente esencial de todas las células vivas y se encuentra en gran número de alimentos.

Algunos alimentos que hacen contribuciones importantes de Riboflavina son hígado y otros tejidos de órganos como co razón, leche, huevo, levadura; los vegetales verdes, frutas, cereales y legumbres en una menor proporción.

Las pérdidas de Riboflavina durante la cocción de los alimentos es generalmente pequeña, excepto cuando se exponen demasiado tiempo a la luz.

Muchas especies de microorganismos son capaces de sintetizarla en el tracto gastrointestinal, por lo que puede ser una fuente que supla a la de los alimentos en caso de una dieta deficiente, aunque es improbable que se absorba completamente de ese sitio.

Estando seca la Riboflavina no es afectada en forma apreciable por la luz, pero en solución especialmente en presencia de alcalis o sales de metales pesados se degrada rápidamente al exponerse a la luz.

La Riboflavina desempeña un papel como el grupo prostético de las flavoproteínas en forma de flavina que además es tan constituida de una apoenzima que es una proteína de la cual depende la especificidad. De estas flavoproteínas, dos son de mayor importancia que se encuentran una como mononucleótido conteniendo ácido fosfórico (FMN) y la otra como dinucleótido combinada a través de ácido fosfórico con adenina (FAD). Estas enzimas actúan como aceptores de hidrógeno que equivale a una oxidación, catalizan la liberación del hidrógeno oxidando a las coenzimas I y II reducidas, que son lasceptoras iniciales de hidrógeno de los sustratos celulares, a su vez las flavoproteínas pasan su hidrógeno a los citocromos, para terminar finalmente utilizando el oxígeno molecular para formar agua, lo que sucede en varias etapas del ciclo de Krebs.

El rol exacto de la Riboflavina en la nutrición humana se desconoce, pero es probable que tome parte en la nutrición de las membranas, la formación de glóbulos rojos y el metabolismo de proteínas.

Los síntomas de ariboflavinosi consisten en quelosis - (coloración roja de labios y la aparición de fisuras en la boca), cambios característicos en el color de la membrana mucosa, inflamación de la lengua y despellejamiento de labios. Se han observado lesiones de naturaleza y seborreica; manifestaciones oculares como vascularización corneal y comezón, sensación de quemadura, aspereza en los párpados, lagrimación, fotofobia y fatiga visual. Estos síntomas desaparecen en pocos días después de la administración de Riboflavina, - sobre todo los oculares.

La Riboflavina se absorbe bien en el intestino de donde pasa a la sangre y es fosforilada; la Riboflavina 5'Fosfato de Sodio se administra por vía parenteral de donde es bien absorbida. En forma fosforilada se distribuye en todos los órganos especialmente en el hígado, corazón y riñón, se produce poco almacenamiento en los tejidos; es metabolizada parcialmente en el organismo y el resto se excreta en la orina y leche, la excreción depende del aporte al organismo. En caso de deficiencia se encontrará poca o nada en la orina, - siendo una forma de diagnóstico.

Los requerimientos de Riboflavina 5'Fosfato de Sodio es tan relacionados con el tamaño del cuerpo, con el grado de metabolismo y crecimiento, aunque generalmente son referidos a la dosis energética. En general lo recomendado es de 0.4 a 0.6 mg en infantes; 0.8 a 1.2 mg en niños de más de 10 años y de 1.0 a 1.7 mg en adolescentes y adultos, las cantidades anteriores son los requerimientos diarios. En mujeres embarazadas o en período de lactancia requieren un poco más de suministro diario. Refiriéndonos a lo requerido por cada 1000 Kcal en infantes es de 0.8 mg y para adultos de 0.3 mg.

La Riboflavina es una sustancia inocua y dosis elevadas de ésta no producen ningún trastorno.

B) CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION

La preocupación y necesidad de ofrecer productos farmacéuticos cada vez más confiables ha llevado al desarrollo de nuevas drogas, sustancias coadyuvantes, técnicas de producción, métodos de análisis, así como al perfeccionamiento de lo existente.

La manera de comprobar que cada sustancia y cada paso - realizado hasta obtener el producto deseado terminado cumplen con los requerimientos para ofrecer un producto confiable, es mediante el control analítico.

El análisis farmacéutico cuenta con una gran variedad - de técnicas, que ofrecen una amplia gama de posibilidades para obtener el resultado más cercano a la realidad.

Podemos mencionar en principio una serie de pruebas organolépticas y físicas que nos garanticen una adecuada presentación.

Entre las técnicas de análisis se encuentran los diversos tipos de titulaciones como: acuosas ácido-base, no acuosas ácido-base, de precipitación, complejométricas, de óxido-reducción, potenciométricas, etc. Técnicas basadas en principios físicos como: medición de pH, polarografía, absorción-espectrofotométrica, fluorescencia, refractometría, polarimetría, solubilidades, densidades, medición del punto de fusión y ebullición, etc. Además se cuenta con técnicas de separación, para los casos en los cuales existe una mezcla de sustancias que interfieren entre sí en la aplicación del método analítico, de este tipo de técnicas se tienen a la extracción y principalmente a la Cromatografía. Existen también gran variedad de análisis basados grupos funcionales, o

en un elemento constituyente de la molécula en cuestión.

En capítulo aparte podemos colocar a dos tipos de análisis ambos amplios y complejos, los microbiológicos y los toxicológicos.

Es preocupación constante el que dichas técnicas sean cada vez más económicas y exactas. Un factor que influye en el enfoque de la investigación es la rapidez, la cual está íntimamente ligada con la economía.

Dentro de las técnicas de separación como mencionamos se encuentra la Cromatografía, sobre la cual existe gran controversia para su definición creada en gran parte por los amplios alcances que ha logrado en su desarrollo. Podemos referirnos a ella como el término que representa a un grupo de métodos por los cuales los componentes de una muestra son separados y donde el resultado o información que se obtiene puede ser usado para la identificación cualitativa y/o determinación cuantitativa de los componentes de la muestra.

Todo el grupo de métodos cromatográficos, nos facilita la aplicación de las técnicas de análisis al proporcionarnos los componentes de una muestra por separado, logrando esto con pequeñas cantidades de muestra, en general con un sencillo procedimiento y pequeñas cantidades de solventes. En la actualidad prácticamente es posible cualquier separación, aún de sustancias muy parecidas como pueden ser los mismos degradantes de una sustancia o mezclas isoméricas.

La utilización de los métodos cromatográficos es de carácter universal, son igualmente aplicables en Bioquímica, Química Orgánica e inorgánica; pudiendo utilizar micro o macro cantidades; su gran versatilidad hace posible que se lleve a cabo en una columna o sobre una placa; la muestra puede

ser sólida, líquida o gaseosa; hoy en día los instrumentos - usados pueden ser altamente sofisticados con controles automáticos o integradores precisos, o puede llevarse a cabo de forma muy simple con solamente el material básico de laboratorio.

Breve Reseña Histórica de la Cromatografía

El primer método cromatográfico fue originalmente desarrollado como una técnica para la separación de pigmentos vegetales, la cual de acuerdo a la actual terminología se puede decir que fue una cromatografía de adsorción líquido-sólido, siendo el doctor en Botánica Tswett quien en 1905 publicó dicho trabajo; al principio fue poco el interés que despertó y sólo fue utilizada por unos pocos. El gran uso de la Cromatografía comenzó en la década de los treinta donde vino a ser cada vez más una técnica importante de laboratorio, en este período surgieron nuevas variantes como la de capa delgada utilizada por primera vez por Izmailov y Shraiber -- quienes utilizaron alúmina sobre una placa de vidrio para separar unas tinturas farmacéuticas, la Cromatografía de intercambio iónico usada por primera vez por Taylor y Urey, pero desarrollada realmente por Samuelson quien usó resinas sintéticas de intercambio iónico.

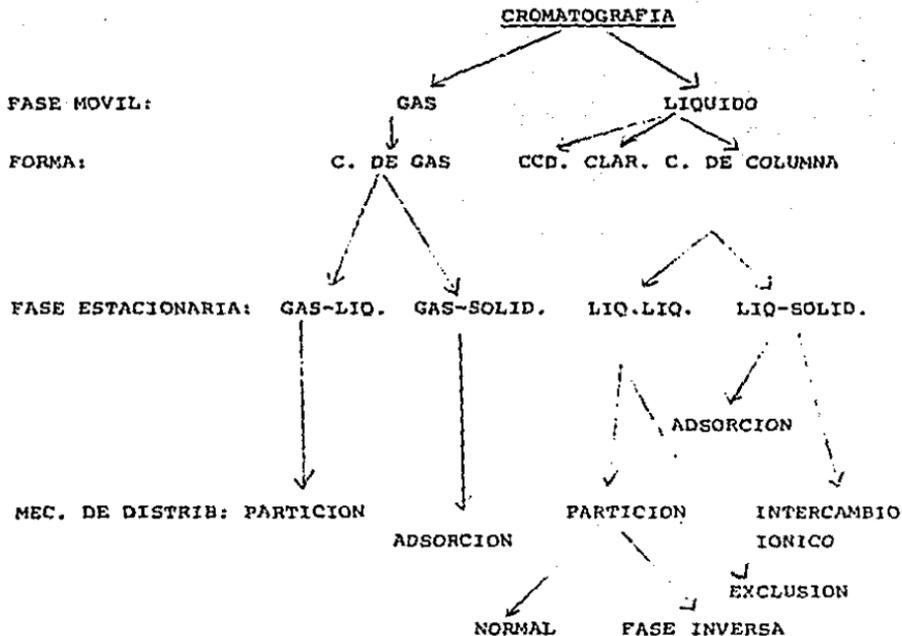
Tiselius en 1937 desarrolló la electroforesis que puede considerarse como una variación de la Cromatografía y en los cuarenta implementó dos métodos más el análisis frontal y el desplazamiento por desarrollo, además adaptó el primero para monitoreo continuo del efluente de la columna por medición del índice de refracción. En la misma década Martin y Synge inventaron la Cromatografía de partición.

Después de la Segunda Guerra Mundial continuó el rápido crecimiento y expansión de la Cromatografía en papel, de intercambio iónico, de capa delgada, apareciendo en la clásica Cromatografía de líquidos en columna dos modificaciones importantes la de fase inversa por Martín y Howard y el gradiente de elusión.

Posteriormente aparece la Cromatografía de gases primero en la forma gas-sólido y luego el desarrollo de la partición líquido-gas, la cual revolucionó las técnicas de laboratorio; por la misma época aparece la Cromatografía de gel de permeación, gracias a la producción del gel por la reacción de dextran soluble y epíclorhidrina por Flann y Porath, y se desarrolla la teoría de la Cromatografía como un proceso diferencial de migración.

Finalmente a mediados de los sesenta con los conocimientos acumulados en general sobre la teoría cromatográfica y en la práctica tanto de Cromatografía de líquidos como de gases, se inició la modernización de la Cromatografía de líquidos - concluyendo al final de la década con el extraordinario desarrollo de ésta, produciendo la Cromatografía de líquidos de alta resolución.

Clasificación de la Cromatografía



Tipos de Cromatografía y su Clasificación

Muchas formas de Cromatografía han sido desarrolladas, pero todas se basan en el mismo principio: la separación resulta de las diferentes proporciones en la zona de migración causada por diferencias en la afinidad relativa entre las dos fases.

La naturaleza física de las fases y el mecanismo por el que entran en contacto es lo que hace surgir los diversos tipos de Cromatografía. Cuando la fase estacionaria o delgada es la superficie de un sólido o mejor dicho cuando la interfase se forma entre un sólido y un líquido, el proceso se le llama Cromatografía de Adsorción y cuando la fase estacionaria o delgada es un líquido, al proceso se le llama Cromatografía de partición, muchas veces la distinción entre las dos no es clara pudiendo pasar de un mecanismo a otro con facilidad. La fase estacionaria en la Cromatografía de partición es una capa muy delgada de solvente retenido como una capa adsorbida sobre finas partículas del soporte en polvo o sobre papel, la única función del sólido en la Cromatografía de partición es retener la fase estacionaria.

Cromatografía de Partición

Cromatografía en Columna Líquido-Líquido.

La fase acuosa es inmovilizada sobre un soporte sólido que debe ser químicamente inerte, de una calidad y de un tamaño de partícula reproducibles, debe ser capaz de adsorber el solvente de la fase estacionaria, pero no debe interactuar con los componentes de la muestra. Con esto se rellena la columna que debe ser un tubo de vidrio de pocos milímetros a pocos centímetros de diámetro y el largo puede ser --

desde varios centímetros hasta metros.

La fase estacionaria puede ser: agua, solución amortiguadora o algún solvente orgánico muy polar.

La fase móvil o eluyente es un solvente orgánico o una mezcla de solventes inmiscibles con la fase estacionaria.

Si la fase estacionaria es un líquido no polar adsorbido a un soporte no polar y la fase móvil es polar se le llama Cromatografía de fase inversa.

En algunos casos para mejorar alguna separación, es necesario cambiar durante la elución la composición del eluyente a lo que se le llama gradiente de elución.

Una vez rellena la columna y con la fase estacionaria, se coloca la muestra en la parte superior, se añade la fase móvil, dejándola eluir, para la cuantificación se hace uso de los métodos analíticos, se pueden recolectar pequeñas fracciones, en intervalos cortos de tiempo, pudiendo formar un cromatograma.

Las aplicaciones de este tipo de Cromatografía es muy grande y variada pudiendo separar compuestos muy parecidos, tales como aminoácidos, alcaloides, esteroides, carbohidratos, glicósidos, barbituratos, vitaminas y antibióticos; aceptando un amplio rango de tamaño de muestra.

Cromatografía Gas-Líquido

Es necesario el uso de un aparato llamado Cromatógrafo de gases, en el cual los componentes esenciales son: una válvula de presión que controla la presión de la fase móvil o

gas acarreador que generalmente es nitrógeno o helio, luego una puerta de inyección donde se introduce la muestra a la corriente de gas, después pasa a través de la columna de donde sale al detector, el cual puede ser de varios tipos, la función del detector es comparar la composición de la muestra separada con el gas puro y emitir una señal eléctrica -- proporcional a la diferencia entre lo eluido y el eluyente, la cual un registrador la traduce en una gráfica donde el eje es el tiempo, el cual es proporcional al volumen de la fase móvil si el flujo es constante.

La puerta de inyección, el compartimento de la columna y el detector están encerrados de manera que se les puede controlar la temperatura de forma eficaz.

La columna puede ser de vidrio o metal, de 4 a 10 mm. de diámetro usualmente y de varios centímetros hasta varios metros de largo, el soporte sólido puede ser polvo de tierra de diatomáceas, la fase estacionaria es un líquido no volátil a las temperaturas que se realice la separación, además debe tener una adecuada selectividad por los componentes a separar.

La gran sensibilidad y especificidad son las principales características, logrando separar miembros de series homólogas y hasta sustancias isoméricas. Son necesarios sólo microgramos de muestra, se logran análisis cualitativos y cuantitativos. Es aplicable a sustancias como esteroides, barbitúricos y alcaloides.

Cromatografía de Papel

Aunque el arreglo físico en la Cromatografía de papel es diferente que en la Cromatografía en columna, el fundamen

to del proceso de separación es el mismo. Muchas variaciones en aparatos y detalles experimentales han sido desarrollados en este tipo de Cromatografía.

El papel filtro es el material de soporte más usual, -- aunque se pueden usar otros tipos de papel, del tipo de papel depende la velocidad de flujo. La fase estacionaria probablemente es un complejo de agua-celulosa, al tratar el papel con una atmósfera de un 20% de agua, el equilibrio de -- distribución puede no ser una simple partición líquido-líquido, sino que el papel puede ejercer efecto de adsorción, sin embargo se le considera Cromatografía de partición.

Usualmente el papel se acondiciona por exposición a la fase móvil donde el componente más polar puede actuar de fase estacionaria. La fase móvil es usualmente una mezcla de solventes que puede ser ácida o básica, algunas mezclas usuales son: isopropanol, amoníaco, agua; n-butanol, ácido acético, agua; fenol, agua.

Se aplican algunos microlitros de la solución de la -- muestra cerca de la orilla del papel por donde comenzará el desarrollo, dependiendo de la orientación éste, puede ser: ascendente, descendente o radial. La forma de medir la migración de un componente es en términos de R_f el cual resulta de dividir la distancia del punto inicial de aplicación de la muestra al centro de la zona del componente en cuestión -- entre la distancia del mismo punto inicial hasta el frente -- del solvente, hay que hacer notar que éste nunca debe salir del papel.

El R_f nos sirve como parámetro de identidad, si se quiere cuantificar se corta el trozo de papel donde quedó el componente de interés, se disuelve en un solvente adecuado y se cuantifica por el método analítico apropiado.

Tiene aplicaciones de gran valor, ya que se puede detectar o identificar componentes de mezclas complejas, siendo muy sensitivas y necesitando sólo microgramos de muestra en muchas separaciones.

Cromatografía de Adsorción

Cromatografía de Adsorción en Columna

El equipo usado es idéntico que en la cromatografía de partición en columna. Los adsorbentes más usuales son: el óxido de Aluminio o alúmina y la sílica gel cuya superficie es muy polar, con éstos se empaacan las columnas. La fase móvil puede ser muy variada pudiéndose utilizar gran cantidad de solventes desde no polares hasta muy polares, generalmente se utilizan mezclas. El procedimiento es igual que en la Cromatografía de partición en columna.

Su principal utilización es en la purificación y aislamiento de componentes desconocidos de mezclas complejas, así como en la purificación de solventes.

Cromatografía de Capa Delgada

En este tipo el adsorbente es esparcido sobre una placa de vidrio en una capa delgada y uniforme, la aplicación de la muestra y el desarrollo es similar a la Cromatografía de papel, sólo que en este tipo sólo podrá ser ascendente la dirección del solvente; se realiza en cámaras de saturación, herméticamente cerradas.

Es probable que muchos sistemas de solventes proporcio-

nen una combinación de efectos partición-adsorción durante la separación, sobre todo si el sistema contiene agua, metanol u otro solvente polar, estos posiblemente son adsorbidos adelante de la zona de migración de un compuesto convirtiendo el sistema en una Cromatografía de partición, por lo que la Cromatografía de capa delgada puede tener modificaciones por lo que se le podría cambiar de categoría.

Los adsorbentes más comunes y versátiles son la alúmina y la sílica gel, se requiere que tengan un tamaño de partícula bastante pequeño.

El procedimiento es similar al de la Cromatografía en papel, aquí se tiene mayor ventaja o facilidad de producir reacciones de color con agentes corrosivos, además de poder identificar las manchas con luz ultravioleta ya sea que el compuesto sea fluorescente o añadiendo al adsorbente una sustancia fluorescente.

Para la identificación se hace uso del R_f y para cuantificar se raspa la zona de migración identificada, se transfiere el polvo raspado a un solvente donde el componente sea soluble, separándolo así del adsorbente y se determina por el método analítico adecuado.

Es una poderosa técnica para detección de impurezas, teniendo un adecuado conjunto de condiciones es posible separar casi todo tipo de mezclas complejas, pudiendo así identificar y cuantificar los componentes.

Cromatografía de Gases por Adsorción

Es similar a la Cromatografía gas-líquido, se utiliza el mismo aparato y la técnica es idéntica, únicamente varía el empaque de la columna en la cual se utiliza un adsorbente que al igual que en los otros tipos de Cromatografía por adsorción, los más utilizadas son sílica gel y alúmina. Esta Cromatografía está limitada a sustancias de peso molecular bajo.

Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

Después de la Segunda Guerra Mundial y gracias al desarrollo de la teoría cromatográfica y otras ciencias se produjo la instrumentación, siendo la Cromatografía de gases una de las primeras técnicas donde se aplicó.

El surgimiento de CLAR involucró estudios en muchos aspectos como el control de porosidad y partículas de pequeño diámetro, nuevos tipos de fases estacionarias, columnas resistentes a presiones elevadas, sistemas de bombeo, detectores para volúmenes pequeños, etc. Gracias al desarrollo de todos estos factores aún en proceso de perfeccionamiento y de nuevos implementos tenemos a lo que conocemos como CLAR.

La CLAR puede llegarnos a proporcionar la separación de los componentes de una mezcla compleja pudiendo obtener análisis cuantitativos satisfactorios a costo razonable y los tiempos de análisis pueden ser llevados a cabo en pocos minutos.

La Cromatografía nos proporciona una gran variedad de -

recursos, por los cuales se puede optimizar la separación de mezclas sobre todo si se conocen los componentes y están bien identificados.

- Principales parámetros en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.
- Tiempo de Retención T: es el tiempo transcurrido entre la introducción de la muestra y la elución del pico en cuestión.
- Volumen de Retención V_R : si la velocidad de flujo es constante (F), entonces el volumen está dado por:

$$V_R = F \cdot T_R$$

- Tiempo de Retención ajustado o corregido T_R' : es la diferencia entre el tiempo de retención T_R y el tiempo -- muerto T_0 que es el tiempo requerido para la elución de un componente que no es retenido.
- Volumen de Retención ajustado o corregido V_R' : es igual al flujo si es constante por el T_R' .

$$V_R' = F \cdot T_R'$$

- Amplitud de la Banda W: las tangentes de las pendientes del pico a partir del punto de inflexión cruzan con la línea base, la distancia entre la intersección con la línea base de las tangentes es la Amplitud de la Banda W.
- Amplitud Media de la Banda $W_{0.5}$: es la distancia entre las pendientes del pico a la altura media de éste.
- Selectividad α : es la relación de los volúmenes de retención ajustados V_R' de los compuestos que están en un sistema cromatográfico.

$$\alpha_{1,2} = \frac{V_R'1}{V_R'2} \quad (V_R'1 > V_R'2)$$

- Eficiencia N: la eficiencia de un sistema cromatográfico se expresa como el número de platos teóricos N, puede ser calculada con la amplitud de la banda y el volumen de retención del compuesto.

$$N = 16 (V_R/W)^2$$

El número de platos teóricos incluye la contribución -- del volumen muerto del sistema.

El número de platos teóricos efectivos N' se calcula con V_R' .

$$N' = 16 (V_R'/W)^2$$

Resolución R: la resolución entre dos componentes en un cromatograma es la relación de su separación a su promedio - de amplitud de la banda.

$$R_{1,2} = (V_{R2} - V_{R1}) / (1/2 [W_1 + W_2])$$

Factor de distribución k': también llamado relación o - capacidad de distribución, se define como la relación de la cantidad de muestra en la fase estacionaria y la cantidad de muestra en la fase móvil, puede calcularse del volumen de retención y el volumen muerto por:

$$k' = V_O / (V_R - V_O)$$

La resolución, eficiencia, selectividad y factor de distribución se pueden relacionar en:

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} ((\alpha - 1)/\alpha) (k' / [1 + k'])$$

El área bajo la curva A, puede cuantificarse por:

$$A = h \cdot W_{0.5}$$

donde h es la altura del pico.

Cuantificación por estándar interno: un estándar interno es un compuesto conocido que preferentemente no se encuentra originalmente en la muestra. La respuesta relativa RR de los componentes de una muestra se puede comparar con el estándar interno y ser determinados.

Se añade a la muestra una cantidad conocida de estándar interno y se hace la corrida cromatográfica, las áreas de los picos de cada componente x y del estándar S son medidas, éstas se dividen entre su concentración y se obtiene el factor de respuesta f_r .

$$f_{rx} = A_x / C_x. \text{ Para los componentes de la muestra}$$

$$f_{rs} = A_s / C_s. \text{ Para el estándar interno.}$$

La respuesta relativa de cada componente está dado por la relación de su factor respuesta y la del estándar interno.

$$RR_x = f_{rx} / f_{rs}$$

Como se conoce la concentración del estándar interno -- que se añadió y el área de los picos de los componentes y -- del estándar interno son medidos, la concentración de los -- componentes está dada por:

$$C_x = (A_x / A_s) (C_s / RR_x).$$

La mayor ventaja de la cuantificación por medio de estándar interno es que es independiente de variaciones en el volumen de la muestra introducida.

En la cromatografía de Líquidos de Alta Resolución pueden existir los siguientes mecanismos de retención o separación:

Adsorción: es el principio de separación más antiguo -- aplicado en cromatografía de columna.

El proceso se basa en las interacciones que existan entre adsorbente, solutos y moléculas de solvente. Cualquier sólido insoluble en solventes comunes puede usarse como adsorbente o sea, como fase estacionaria, los más utilizados son:

- **Sílica gel:** es el adsorbente más usado en CLAR, es amorfo, es un sólido poroso que puede prepararse en un amplio rango de área superficial (200 a 800 m²/gr); diámetro de poro de 50 a 250 Å^o y gran volumen de poro 0.7 - 1.2 ml/gr. Químicamente la sílica gel está compuesta de grupos polisiloxanos y diversos tipos de silanoles los cuales son importantes en la adsorción de moléculas orgánicas. Es insoluble en solventes como hexano, éter isopropanol, etc.; pero es ligeramente soluble en soluciones acuosas, aumentando la solubilidad en pH básicos.
- **Alúmina:** se prepara a partir de cristales de bayerita - por deshidratación y activación a 200-500°C, tiene un área superficial de 100 a 200 m²/gr. un volumen de poro de 0.2 a 0.3 ml/gr y el promedio del diámetro de poro es de 100 a 200 Å^o. Tiene propiedades semejantes a la sílica gel en cuanto a separaciones aunque el mecanismo

de adsorción es más complejo.

El otro factor que puede manejarse es el eluyente, debido al cual se debe en gran parte la retención. Entre más fuertemente es adsorbido un eluyente en la fase estacionaria es mayor su fuerza de elución, esto es si el eluyente está en mayor proporción que la muestra y si éste ocupa fácilmente los sitios activos del adsorbente desplazará a las otras sustancias haciéndolas eluir rápidamente.

Algunos requerimientos de los eluentes son:

- No debe interferir con la detección de la muestra.
- Los componentes de la muestra deben ser solubles en el eluyente.
- De preferencia debe tener baja viscosidad.
- No debe tener reactividad con la muestra o los adsorbentes.

Generalmente se utilizan mezclas de eluentes logrando mejores separaciones y teniendo una infinita gama de posibilidades de lograr la separación. La utilización de pequeñas cantidades de agua hace que pueda actuar como modulador de la retención en el sistema cromatográfico, además puede llegar a formarse algo de partición.

La principal aplicación es en la separación de compuestos orgánicos no polares y moderadamente polares, como ejemplo tenemos separaciones de mezclas de esteroides, glicósidos cardíacos, alcaloides y aflatoxinas.

- Intercambio iónico: por este mecanismo son generalmente separados compuestos iónicos, la separación se produce entre una fase móvil polar usualmente es una solución amortiguada.

guadora o una solución de electrolitos y una fase estacionaria que es una resina intercambiadora de iones.

Las resinas intercambiadoras de iones son compuestos orgánicos sintéticos en forma de polímeros insolubles con grupos funcionales ionizables. Un gran número de resinas están formadas del mismo esqueleto diferenciándose en la parte intercambiadora, ese esqueleto es un co-polímero de estireno y divinilbenzato (DVB).

Existen dos tipos de resinas intercambiadoras de iones:

- Intercambiadoras de cationes: poseen cationes intercambiables y la parte aniónica de la molécula es la resina.
- Intercambiadoras de aniones: cambian aniones con la solución.

Dentro de las intercambiadoras de cationes existen resinas fuertemente intercambiadoras de cationes como la resina de ácido sulfónico y débilmente intercambiadoras de cationes como las de ácidos carboxílicos. De igual forma hay resinas fuertemente intercambiadoras de aniones en las cuales el grupo es un anión cuaternario y resinas intercambiadoras de anión débiles donde el grupo intercambiador puede ser una variedad de aminas.

Una resina intercambiadora de iones se puede considerar como un ácido o base insoluble ya que lo que ocurre son reacciones ácido-base, pero las especies que forman parte del polímero no pueden ir en la solución. A los iones que tienen la carga del ión que intercambia la resina se les denomina contra-ión y a los que tienen la carga del ión que forma parte del cuerpo de la resina se les llama co-iones.

Dos propiedades de este mecanismo son la capacidad de intercambio que es el número de miliequivalentes de iones intercambiados por gramo de resina seca, y el tamaño efectivo de poro en la malla del polímero, un aumento en el grado de entrecruzamiento debido a un aumento en el porcentaje de DVB hace disminuir el tamaño de poro.

La forma como ocurre la separación es por el diferente desplazamiento de los iones de la muestra por el contra ión del eluyente a través de la columna, por lo que la velocidad de migración de cada ión está determinada por su coeficiente de selectividad con respecto al contra ión del eluyente.

Sus aplicaciones son sobre compuestos que tengan grupos funcionales carboxílicos, fenoles, amínicos, aminoácidos como alcaloides, sulfonamidas, etc.

-Exclusión Molecular: También se conoce como filtración o permeación. La separación se basa en las diferencias de tamaño molecular de las sustancias a separar, ya que se utilizan como fase estacionaria geles con un esqueleto o estructura de dimensiones moleculares lo que hace que exista una cierta porosidad, donde el tamaño efectivo de poro puede ser controlado por el entrecruzamiento del gel, al existir esa porosidad dentro del mismo esqueleto del gel permite la entrada a los poros de moléculas pequeñas y las de mayor tamaño quedan fuera, siendo eluidas con mayor celeridad que las que penetran en los poros.

Los geles utilizados son moléculas orgánicas no iónicas los más utilizados están compuestos por entrecruzamiento de dextran y epiclorohidrina o de poliacrilamida, entre los cuales existe diferenciación por el grado de entrecruzamiento que afecta la extensión y el tamaño efectivo de poro.

La fase móvil no necesita características especiales, - sólo que fluya a través del gel y sea compatible con el método de detección.

Esta técnica es aplicable a sustancias de peso molecular mayor de 2000 daltons, como macromoléculas biológicas, - polímeros sintéticos, oligosacáridos, polisacáridos, prostraglandinas, proteínas, etc.

- Partición: este mecanismo se basa en las diferentes - solubilidades de las sustancias entre el líquido de la fase-móvil y el líquido unido al soporte formando la fase estacionaria. El soporte consiste en un material poroso, el cual es revestido de una delgada capa de líquido inmiscible con la fase móvil formando la fase estacionaria. El grado de equilibrio de partición de los componentes entre la fase móvil y - la fase estacionaria determina el grado de separación.

Es similar a la extracción con solventes y es aplicable a moléculas de todo tipo de polaridad con peso molecular inferior a 2000 daltons.

Existen dos formas de llevar a cabo el mecanismo de partición, la división se basa en las polaridades relativas de la fase móvil y la fase estacionaria, aunque tal división no es muy objetiva ya que con condiciones cromatográficas apropiadas una forma puede ser transformada en la otra. Además - tal división no dice nada acerca de cómo interactúa el soluto con las fases. La polaridad relativa de las fases puede - ser más ampliamente explicada sobre las interacciones intermoleculares que pueden ocurrir entre el soluto, fase móvil y fase estacionaria, como dispersión, orientación del dipolo y puentes de hidrógeno.

La llamada partición normal en la cual la fase estacionaria es más polar que la fase móvil, utilizándose para separaciones de compuestos orgánicos polares. Esta a su vez puede ser de dos formas dependiendo de la fase estacionaria: la primera en la que el soporte será similar a la Cromatografía de adsorción pero aquí la fase estacionaria será el líquido que estará adsorbido al soporte. La segunda es en la que la fase estacionaria líquida está ligada químicamente y en forma estable al soporte, las superficies de estos empaques dan origen a menor adsorción química, menor barrido y menos problemas de activación catalítica, la razón de una menor superficie activa es debido a que los grupos hidroxilo que producen la fuerza de adsorción se eliminan al reaccionar con los organosilanos durante la síntesis. Las separaciones en este tipo de fases son generalmente similares a las obtenidas sobre adsorbentes pero el grado de retención es usualmente menor.

En la partición normal se utilizan fases móviles no polares por ejemplo, hidrocarburos mezclados con solventes moderadamente polares como hidrocarburos clorados, éteres, acetato de etilo, alcoholes, etc.

Las fases estacionarias ligadas son en la actualidad -- las más utilizadas en este tipo de Cromatografía de partición y de las cuales existen varios tipos que se clasifican en base a la polaridad de los grupos funcionales predominantes, de esta forma tenemos:

- Móviles: contienen grupos ester, dimetilamino, diol, fluoróeter.
- Médias: con otros nitro, alquilnitrilo, nitrilo y poli-hidroxietil metacrilato.
- Elevadas: alquilamina, amino, aminopropil.

En la Cromatografía de fase normal la retención de los solutos se ve disminuida con un incremento en la polaridad de la fase móvil, pudiendo regular los tiempos de retención con un adecuado manejo de los incrementos en la polaridad.

La otra forma del mecanismo de partición es llamado Cromatografía de fase inversa o contraria. El nombre de este tipo es en oposición a la Cromatografía de partición llamada normal, en la que se utiliza una fase estacionaria polar y un eluente no polar y que fue la que se utilizó primero, actualmente la Cromatografía de fase contraria se estima que es utilizada en un 80% del total de la utilización de CLAR.

En la Cromatografía de fase inversa se trabaja con fase estacionaria no polar y eluentes polares, sin embargo comprende un amplio rango de sistemas cromatográficos por lo que no puede ser precisa su definición sobre términos de polaridad o no polaridad. A pesar de esto, el método se asocia completamente con el uso de fases estacionarias ligadas hidrocarbonáceas, siendo las más usuales de octadecilsilano y octilsilano, el soporte se utiliza en forma de micropartículas de sílica con un diámetro medio de 5 a 10 μm , en cuya superficie se unen covalentemente los grupos n-octadecil o n-octil. Con este material son empacadas las columnas que pueden ser de diferentes magnitudes, generalmente de un diámetro de 5 mm y el largo varía de 5 a 30 cm, el rango de velocidad de flujo usual es de 0.5 a 3.0 ml/min.

Además existe gran variedad en las propiedades del empaque como tamaño de partícula, distribución de tamaño de partícula, la naturaleza de lo ligado, la morfología de la superficie cubierta, las cuales proporcionan diferencias en la selectividad y eficiencia de la columna. Otro factor importante en poder llevar a cabo la técnica es que se ha podido

empacar uniformemente en tubos de acero inoxidable dicho material de empaque, el tubo tiene que soportar presiones arriba de 800 ATM, durante el proceso de empaque, debe estar completamente limpio y las paredes interiores ser completamente lisas.

Los eluentes usados en la Cromatografía de fase inversa, con fases estacionarias ligadas no polares son solventes polares o mezclas de estos como metanol acetonitrilo y agua. Algunas propiedades importantes de estos son su tensión superficial, constante dieléctrica, viscosidad y valor eluotrópico, dichas propiedades pueden variar al mezclarlos en forma proporcional.

La retención dependerá del grado de tensión superficial y de la constante dieléctrica. La velocidad de flujo es inversamente proporcional a la viscosidad y la eficiencia de la columna disminuirá con un incremento de viscosidad.

Existen varios modos de aplicación de la Cromatografía de fase inversa:

- Fase regular o común: teniendo simplemente la fase estacionaria ligada no polar y la fase móvil polar, la retención se basará en la hidrofobicidad de los solutos, eluyendo los solutos polares rápidamente al preferir la fase móvil -- sin conseguirse tal vez una buena separación y los compuestos no polares son forzados por la fase móvil a interactuar con la fase estacionaria por lo que eluirán posteriormente, con mayor posibilidad de haber sido separados.

- Supresión de ión: los compuestos polares, especialmente si son ionizables eluyen rápidamente dando una pobre separación y definición de picos, cuando la retención no puede ser ajustada por manipulación de la composición de la fase -

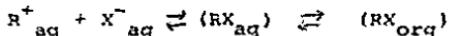
móvil, lo que se puede hacer es ajustar el pH de modo que se evite la ionización, entonces el compuesto quedará en su forma no ionizada por lo que será menos polar y podrá interactuar más con la fase estacionaria, de esta manera será mayor su retención y mejor la definición del pico.

Esto da resultado para ácidos y bases débiles en un rango de pH de 2-8, para un ácido débil un pH de 2-3 es suficiente para suprimir su ionización.

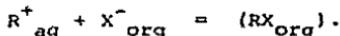
-Par iónico: la fase inversa ión par por partición es la técnica más popular donde se utiliza la misma fase móvil y fase estacionaria que en la fase inversa común, con la única modificación que se añade un contra-ión a la fase móvil, este contra-ión será de carga contraria a la del o los solutos a separar. Las muestras en las que se aplica la Cromatografía de par iónico, son compuestos iónicos y capaces de formar el par-ión con el contra ión.

Existen dos mecanismos propuestos para la formación del ión y su partición:

- El soluto R^+ forma el par-ión con el contra ión X^- en la fase móvil y ya formado pasa a interactuar con la fase estacionaria u orgánica.



-El otro postulado es que el contra ión permanece en la fase estacionaria con la parte iónica orientada hacia la fase móvil, entonces R^+ es atraído por fuerzas electrostáticas uniéndose al contra ión, permaneciendo en la fase estacionaria u orgánica.



Actualmente se cree que lo que realmente sucede es una combinación de ambos postulados.

Algunas veces mezclas de contra iones pueden lograr mejores separaciones que el usarlos solos.

Alquil cuaternarios de amonio como sales de halógenos - son usados como contra ión de especies amónicas, algunos - - ejemplos son: tetrametil o tetrabutilmamonio como cloruros, - di, tri u octilaminas, etc.

Alquil sulfonatos o alquil sulfatos de sodio son usados como contra iones de especies catiónicas como ejemplos: butan, pentan, hexan, heptan, octan sulfonatos de sodio. También con cadenas aromáticas como el ácido benzansulfónico. - Otros como octil, lauril sulfato de sodio.

Entre mayor sea la cadena lipofílica del contra ión tendrá mayor efecto en la retención; en la separación de sustancias muy parecidas, es mejor la utilización de contra iones de cadena corta de manera de evidenciar un poco más la diferencia; el aumento en concentración del contra ión aumentará la retención sólo hasta el punto de la concentración efectiva.

El uso de fases ligadas no polares se ha visto incrementado explosivamente desde su introducción en CLAR y se ha destacado como la técnica cromatográfica más versátil usada con instrumentación, esto se debe en parte a la gran eficiencia de las micropartículas con fase ligada y a la utilización de un equilibrio químico secundario con detergentes o contra iones pudiendo así separar moléculas altamente polares.

La aplicación de esta forma de Cromatografía abarca - - prácticamente todos los campos de la química, desde el análisis de muestras ambientales o inorgánicas hasta muestras fisiológicas y bioquímicas, así como las de productos naturales, alimenticios, farmacéuticos o industriales.

Efecto de la Temperatura en CLAR

Un incremento en la temperatura produce cambios como un decremento en el tiempo de retención, incremento en la eficiencia de la columna, también se mejora la capacidad de la muestra y se incrementa la permeabilidad de la columna, lo cual se refleja en una disminución en la presión.

El aumento en la eficiencia resulta de un aumento en el coeficiente de difusión del soluto al disminuir la viscosidad de la fase móvil. Sin embargo, en muchos casos la selectividad no es afectada fuertemente por cambios en la temperatura.

Las desventajas del uso de temperaturas elevadas es que disminuye la vida media de la columna sobre todo a pH elevados o en presencia de soluciones amortiguadoras o reactivos-par iónicos, además de que puede gasificarse algún solvente y aumenta el ruido en el detector.

Gradiente de Elución

En el gradiente de elución en contraste con la elución-normal o isocrática, la composición de la fase móvil se varía a través de la separación, proviendo un cambio continuo en la fuerza del solvente de la fase móvil que pasa a la columna haciendo que disminuyan los valores de k' , por lo que

eluyen más rápidamente compuestos que tardarían mucho tiempo en condiciones isocráticas; así se pueden lograr mejores separaciones, en menor tiempo, más económicas que en condiciones isocráticas; aunque la problemática del manejo de las condiciones de la fase móvil aumenta considerablemente con respecto a las isocráticas.

Componentes Básicos de un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución. Esencialmente consiste de:

- Sistema de bombeo de fase móvil (bomba y recipientes de solventes).
- Sistema de inyección
- Columna
- Detector
- Graficador

Pudiendo existir gran cantidad de accesorios como:

- Bombas extra, pudiendo utilizar un gradiente de elución
- Medidor de flujo
- Automuestreador con inyector automático
- Compartimento de columna con control de temperatura
- Precolumna
- Recolector de fracciones
- Detectores extra
- Integrador

Sistema de bombeo

En el sistema de bombeo, la bomba es el principal componente y el más complejo, existen varios tipos de éstas sin que ninguna cumpla con las características ideales que son en general:

- Alimentar a la columna con un flujo de solvente sin pulsaciones y en forma reproducible.
- Compatibilidad con todo tipo de solventes.
- Que pueda sostener grandes presiones y mantener un flujo en un rango de 0 a 10 ml/min.
- Que no contribuya mucho en el volumen muerto.
- Que ofrezca seguridad si se utilizan solventes inflamables.

La presión debida a la resistencia que ofrece la columna al flujo depende de:

$$P = \frac{n VL}{K d^2}$$

donde:

- n = viscosidad de la fase móvil
- V = velocidad lineal del flujo
- L = longitud de la columna
- K = constante del empaque de la columna alrededor de 600 generalmente
- d = diámetro de partícula del soporte.

Las bombas utilizadas en CLAR se clasifican en:

- Bombas de desplazamiento continuo:
 - Desplazamiento continuo
 - Amplificador de gas
 - Jeringa
- Bombas de desplazamiento intermitente:
 - Peristálticas
 - Diafragmáticas
 - De pistón recíproco

Las bombas de desplazamiento continuo tienen la ventaja de proporcionar un flujo continuo, suave y sin pulsaciones; sus desventajas son que tienen un reservorio de solvente limitado de modo que se debe interrumpir el flujo para recargarlo y que la composición del solvente no puede irse cambiando durante la corrida de tal forma que no se puede usar el gradiente de elución.

Las bombas de desplazamiento intermitente por el contrario operan con reservorios de solvente abiertos a presión ambiente por lo que recargarlos no es problema, además pueden ser de gran volumen por lo que se coloca desde el inicio la cantidad que se calcula utilizar; sus desventajas son que proporcionan flujo con pulsaciones que contribuye significativamente en el ruido del detector.

Sistema de Inyección

La introducción de la muestra en la columna es una operación muy importante para obtener una buena separación, la forma de introducir la muestra, el volumen de la misma son factores que influyen en el análisis.

Existen básicamente dos técnicas, que cada constructor las adapta en forma diferente que son:

- La técnica de detención del flujo, la cual consiste en detener el flujo hacia la columna por medio de una válvula, al mismo tiempo se remueve la muestra que se encuentra en una cavidad hacia la cabeza de la columna y se reinicia el flujo, la difusión de la muestra durante el tiempo de aplicación es insignificante.

- La otra técnica consiste en introducir la muestra directamente al flujo de la fase móvil por medio de una jeringa y a través de un tapón de hule que impide fugas de la fase móvil, pero que puede ser penetrado por agujas. Tal sistema es más adecuado para cuando la presión es baja. El tapón de hule puede deteriorarse con el solvente y producir problemas.

Columna

Ya se ha hablado de los diferentes tipos de empaques de las columnas que existen para cada tipo de Cromatografía. -- Tal vez sólo sería conveniente mencionar algunos cuidados generales que deben tenerse con las columnas y tener presente que cada tipo de columna requiere de cuidados especiales dependiendo de su empaque.

Algunos de los cuidados que se deben tener son:

- Evitarle golpes y movimientos bruscos
- Respetar su rango de pH
- Lavarla adecuadamente después de utilizarla y dejarla en el disolvente o mezcla de disolventes apropiados.
- No llevar a cabo cambios bruscos en el flujo que se reflejan en cambios de presión.
- Tener el cuidado de no pasar un líquido que no esté bien filtrado pues partículas extrañas actuarían como tapón.
- Desgasificar perfectamente los líquidos que se pasen a través de la columna, ya que la presencia de burbujas afectarían la presión y cambiaría el arreglo del empaque.

Los anteriores cuidados son para evitar cambios químicos y físicos en el empaque que modificarían la eficiencia de la columna.

Detectores

La función de un detector en CLAR es indicar la presencia de un componente, separado en la columna, presente en el flujo de la fase móvil cuando pasa a través de una microcelda.

No existe ningún detector que cumpla con todas las cualidades deseables que son:

- Estabilidad: es la capacidad de laborar continuamente y ser insensible a cambios en el ambiente externo.
- Sensibilidad: es el aumento de señal del detector por aumento de concentración del soluto, debe tomarse en cuenta el ruido del detector.
- Linealidad: se refiere a que la señal del detector sea directamente proporcional a la cantidad del soluto.
- Versatilidad: es la capacidad de trabajar en diferentes formas y condiciones.
- Selectividad: es que la respuesta sea diferente de uno a otro componente en la muestra.

Los detectores más usados en CLAR son:

- Absorbancia de luz ultravioleta.
- Absorbancia de longitud de onda variable.
- Fluorescencia.
- Índice de refracción.

C) VALIDACION

La posibilidad de utilización de nuevas técnicas de análisis, además de una gran variedad de métodos analíticos ya existentes, hace que la elección sobre cual método es el más apropiado sea difícil, por lo que es necesario recurrir a técnicas estadísticas para conocer la confiabilidad de los resultados de cada método analítico.

Un método analítico lo que hace es una medición o sea, una estimación comparativa de una cantidad, sin embargo toda medición tendrá un error por más bien realizada que ésta sea, los errores pueden ser de dos tipos:

- Error controlable o error determinado: es todo aquel error debido a una falta de control de calidad de la técnica analítica como puede ser el uso de reactivos mal estandarizados o impuros, blancos inapropiados, interferencias, errores instrumentales o de operación, etc.

- Error incontrolable: es aquel error que permanece después de haberse hecho todos los esfuerzos para eliminar el error determinado.

La validación de un método analítico se refiere entonces a la evaluación cuantitativa del error indeterminado. Se puede definir validación como la determinación del grado de veracidad de un proceso de medición. Esto implica una evaluación de un método desarrollado.

Un significado alternativo de validación es "hacer válido" en el sentido de producir el resultado deseado, refiriéndose a evaluar el proceso a la vez que éste se desarrolla.

Dichas evaluaciones requieren de cierta metodología que puede ser adoptada dependiendo, de la técnica analítica y lo que se requiere de ésta, además de la aplicación que se le quiera dar.

Una guía general para la Validación de Métodos analíticos puede ser la siguiente:

1. Linearidad
 - Sensitividad
 - Rango analítico
 - Rango de trabajo
2. Límite inferior de detección
3. Exactitud
4. Precisión
 - Repetibilidad
 - Reproductibilidad
 - Efecto placebo
5. Especificidad
6. Especificidad en estudios de estabilidad

1. Linearidad

La linearidad es una medida del grado al cual la curva de calibración analítica se aproxima a una línea recta que forme un ángulo de 45° con respecto a las abscisas, o el grado al cual la sensitividad es constante, expresada la sensitividad como la relación entre el error estándar de regresión y la pendiente de la recta. Esto es la relación del cambio de señal al cambio de la cantidad de sustancia a analizar.

Existen dos variables, la sustancia analizada y la señal o el resultado que se obtiene, si los valores de estas -

dos variables tienden a alinearse a lo largo de una línea -- recta se dice que están correlacionados linealmente, si es así significa que cambios en una de las variables provocará un cambio proporcional en la otra.

Si los puntos definidos por parejas de valores de las variables se representan gráficamente, tendremos una gráfica de correlación, si los puntos en dicha gráfica se alinean en línea recta se dice que existe regresión lineal. Una recta -- que se ajusta a los puntos se llama recta de regresión.

Existen medidas numéricas que indican el grado de correlación o dispersión entre las que se encuentra el coeficiente de correlación, el cual mide el grado de asociación lineal entre las variables, es una cantidad sin unidades. Cuanto más cercano a 1.0 sea el valor del coeficiente de correlación obtenido más lineal será el método.

El coeficiente de correlación se define por:

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

Al determinar la linealidad es conveniente que se determine el rango analítico que se requiere, esto es, la concentración más alta y la más baja que se necesita que nos determine el método con validez y el rango de trabajo que nos indica las concentraciones de las muestras que pueden ser analizadas por el método con validez y sin realizar cambios en la preparación de las muestras y bajo las mismas condiciones de operación.

2. Límite inferior de detección

Es la menor cantidad o mínima concentración detectable del compuesto en análisis, con un grado de confianza especificado, que puede medirse con respecto a la señal producida por el ruido del aparato (en caso de que exista) y utilizando las mismas condiciones de operación establecidas. Si existe ruido, se considera conveniente que el límite inferior de detección se fije en el valor en que la señal sea cuatro veces el valor del ruido.

3. Exactitud

Una técnica analítica es más exacta a mayor concordancia entre un valor determinado experimentalmente y un valor aceptado de referencia.

La estimación de la exactitud de un método está asociada con la suma del error determinado y el error indeterminado.

La exactitud de un método analítico queda definido con la media de las observaciones realizadas y el intervalo de confianza al 95% de probabilidad.

$$I.C. 95\% = \pm 1.96 \text{ Es}$$

Esto significa que tenemos el 95% de probabilidad que un resultado tenga una desviación estándar entre ± 1.96 con respecto a la media.

La mejor aproximación es medir cantidades conocidas adicionadas a placebos del producto y como cada método es apli-

cable a un rango específico de concentraciones, ya que la exactitud del método puede variar dependiendo de las concentraciones, es conveniente evaluarlo a varias concentraciones.

Cuando la exactitud del método no es muy buena pero es preciso, se puede corregir corriendo la sustancia de referencia junto con el producto.

4. Precisión

La precisión de un conjunto de resultados analíticos o de mediciones repetidas de una misma propiedad es el grado de concordancia mutua entre los resultados individuales.

Las formas de expresarla son con la desviación estándar y con la desviación estándar relativa o coeficiente de variación.

La desviación estándar es una medida de la variabilidad o dispersión de las observaciones es una distribución normal de frecuencias.

$$s = \frac{(x_i - \bar{x})^2}{N - 1}$$

El coeficiente de variación expresa el porcentaje de desviación del método y permite comparar diversas muestras entre sí a pesar de que tengan medias diferentes.

$$CV\% = s/\bar{x} (100)$$

Nos podemos referir a la precisión de dos diferentes maneras como repetibilidad y como reproducibilidad.

- Repetibilidad: está relacionada con la dispersión de los resultados cuando se ha reducido al mínimo el error determinado, o sea, que la precisión en este caso se determina a partir de resultados obtenidos por un solo analista, usando los mismos aparatos, condiciones técnicas y bajo un estricto control de calidad.

- Reproducibilidad: se refiere a la precisión de un método cuando se consideran los resultados obtenidos por diferentes analistas, en diferentes aparatos y en distintos días, aún más entre diferentes laboratorios, por lo que se hablará de reproducibilidad inter-analistas o inter-equipo, etc.

- Efecto Placebo: es necesario dislucidar el posible efecto que pueden tener las sustancias auxiliares de la formulación (en caso de que varíe la cantidad de éstas), sobre la precisión del método analítico.

En este caso la precisión será la concordancia entre las determinaciones hechas manteniendo constante la cantidad de sustancia a determinar y variando las concentraciones de placebo en las muestras. Es importante que se realicen reduciendo al máximo el error controlable para que los posibles cambios o variaciones sean sólo debido al placebo.

5. Especificidad

Especificidad o selectividad son términos que indican que la respuesta obtenida después de un ensayo se debe exclusivamente a la sustancia que se desea determinar y no a otra u otras sustancias que estén o pudieran estar presentes en la muestra a analizar, esto es que dichas sustancias no interfieren entre sí.

Para demostrar dicha propiedad se realizan análisis de placebo de la sustancia en cuestión, identificando que la respuesta correspondiente a esa sustancia no tiene ningún valor en el placebo.

En algunas ocasiones es necesario usar no sólo al placebo, sino además sustancias ajenas que pudieran en un momento dado estar presentes.

6. Especificidad en Estudios de Estabilidad

Para el establecimiento de que un método analítico es específico en estabilidad para una sustancia dada es necesario demostrar que ningún producto de degradación va a interferir en el análisis.

Los productos de degradación pueden provenir de la misma sustancia, de los demás ingredientes de la formulación o de interacciones entre ellos.

Para determinar lo anterior se someten tanto el producto como placebos de cada componente de la formulación a condiciones extremas de temperatura, oxidación, hidrólisis, exposición a luz, etc. con el objeto de producir degradaciones, se analizan posteriormente para determinar si se producen interferencias.

FORMULARIO

I. Medidas descriptivas.

1.- Media muestral. (\bar{x})

$$\bar{x} = \frac{\sum x_1}{n}$$

x_1 = sumatoria de todos los valores de las n = observaciones de x .

n = número de observaciones

2.- Desviación estándar muestral (S).

$$S = \frac{(x_1 - \bar{x})^2}{n - 1}$$

$n - 1$ = grados de libertad

3.- Error estándar E_s

$$E_s = \frac{S}{n}$$

4.- Intervalo de confianza de la media al 95% de probabilidad.

(I.C. 95%).

$$I.C. 95\% = E_s \times t_{0.95}$$

t = valor crítico de t de Student.

5. Coeficiente de variación. (CV%).

$$CV\% = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

II. Correlación y regresión lineal.

- 1.- Ecuación de la recta de regresión y/x.

$$\bar{y} = mx + b$$

- 2.- Pendiente de la recta de regresión. (m)

$$m = \frac{n \sum XY - (\sum X)(\sum Y)}{n \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

- 3.- Intercepto de la recta en la ordenada al origen. (b).

$$b = \bar{y} - mx$$

- 4.- 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.- Sensitividad.

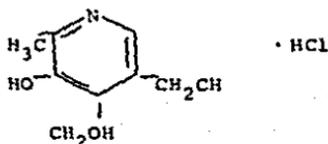
$$y = \frac{m}{s_{y/x}}$$

D) MONOGRAFÍAS

CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA

Nombres Químicos y Sinónimos: 5-hidroxi-6-metil-3,4, piridinmetanol clorhidrato; 3-hidroxi-6-metil-3,4-piridincarbino clorhidrato; 2-metil-3-hidroxi-4,5-di(hidroximetil) piridina clorhidrato; 3-hidroxi-4,5-dimetil-ol- picolino clorhidrato; piridoxal clorhidrato; Vitamina B₆ clorhidrato; Adermina clorhidrato; clorhidrato de hexabion.

Fórmula desarrollada:



Fórmula Condensada: C₈H₁₁NO₃·HCl.

Peso Molecular: 205.64.

Porcentaje de composición: C:46.72%, H:5.88%, Cl:17.24%,
N: 6.81%, O:23.34%.

Descripción: cristales blancos o incoloros, o polvo -- cristalino blanco, estable al aire, cuando se expone a la -- luz se altera ligeramente, inoloro, con ligero sabor salino amargo.

Solubilidad: 1.0 gr. se disuelve en alrededor de 4.5 ml de agua, 90 ml de etanol al 96%; es soluble en propilenglicol, escasamente soluble en acetona, prácticamente insoluble en éter y cloroformo.

Acidez o Alcalinidad. pH: una solución al 10% p/v en -- agua produce un pH de 3.2, una solución 5% p/v en agua tiene un pH de 2.3 a 3.5.

Ensayos de Identidad:

- Temperatura de fusión: funde entre 202° y 206° C con una ligera descomposición.

- Espectro infrarrojo: el espectro de absorción infrarrojo de una dispersión de la muestra en aceite mineral exhibe máximos sólo a la misma longitud de onda que una preparación similar de un estándar de Clorhidrato de Piridoxina.

- Espectro ultravioleta: la absorción de luz en el rango de 230 a 350 nm, de una solución de 0.001% p/v en ácido clorhídrico 0.1 M exhibe máximos sólo a 290 nm; $\lambda(1\%, 1\text{cm})$ a 290 nm es alrededor de 430. La absorción de luz en el rango de 230 a 350 nm, de una solución preparada por dilución de 1 ml de una solución 0.1% p/v en ácido clorhídrico 0.1M a 100-ml con 0.025 M de una solución amortiguadora de fosfatos, exhibe dos máximos a 254 nm y a 324 nm; $\lambda(1\%, 1\text{cm})$ a 254 nm es alrededor de 180 y a 324 es alrededor de 350.

- En cada uno de dos tubos marcados como A y B se deposita 1 ml de una solución acuosa que contenga 100 ug de la muestra por ml, a cada tubo se agregan 2 ml de solución 1:5 de acetato de sodio, al tubo A se agrega 1 ml de agua destilada y al tubo B 1 ml de solución 1:25 de ácido bórico y se mezcla. Los dos tubos se enfrían aproximadamente a 20° y con rapidez se le agregan 1 ml de una solución alcohólica 1:200 de 2,6-dicloroquinona clorimida: en el tubo A se produce una coloración azul que rápidamente se desvanece y cambia a rojo

café en pocos minutos, la coloración azul no aparece en el tubo B.

- A una solución 1:200 de Clorhidrato de Piridoxina se agregan 0.5 ml de solución reactivo de ácido fosfotungstico: se forma un precipitado blanco.

- Da positivas las pruebas de cloruros.

- Claridad y color de la solución: una solución de un 5% p/v es limpia o muy ligeramente opalescente.

Ensayos de Pureza:

- Pérdida al secado: cuando se seca al vacío sobre sílica gel durante cuatro horas a 100-105°C hasta peso constante, la pérdida no debe ser mayor de 0.5% de lo pesado.

- Contenido de cloruros: en un recipiente provisto de tapón de vidrio se disuelven cerca de 500 mg en 50 ml de metanol, se agregan 5 ml de ácido acético glacial y dos a tres gotas de solución indicadora de eosina amarillenta y se valora con solución 0.1N de nitrato de plata. Cada ml de la solución 0.1 N de nitrato de plata equivale a 3.545 mg de Cl^- . - el contenido de cloruros es entre 16.9 y 17.6% calculado sobre la base anhidra.

- Residuos de Ignición: no más de 0.1%.

- Metales pesados: una solución 5% p/v de la muestra, se neutraliza con solución 1:3 de amoníaco utilizando papel tornasol; se agregan 2 ml de ácido acético diluido y se diluye con agua destilada hasta 25 ml, el límite de metales pesados es no más de 30 ppm. Preparar el estándar usando solu---

ción de estándar de plomo (1 ppm de Pb).

Potencia Requerida: debe contener no menos de un 98% y no más que el equivalente de un 100.5% de $C_8H_{11}NO_3HCl$ calculado sobre la base anhidra.

Valoración: en una mezcla de 10 ml de ácido acético -- glacial y 10 ml de solución reactivo de acetato mercúrico se disuelven aproximadamente 400 mg de la muestra de Clorhidrato de Piridoxina calentando ligeramente hasta disolución. La solución se enfría a temperatura ambiente, se agregan dos gotas de solución indicadora de violeta de cristal y se valora con solución 0.1 N de ácido perclórico. Se efectúa una prueba en blanco y se hacen las correcciones necesarias. Cada ml de solución 0.1 N de ácido perclórico equivale a 20.56 mg de $C_8H_{11}NO_3HCl$.

Conservación y almacenaje: presérvase en recipientes -- herméticamente cerrados y protegidos de la luz.

Toxicología: no se ha descrito síndrome de hipervitaminosis. La administración de clorhidrato de piridoxina aún en dosis de formulaciones vitamínicas normales, es equivalente a una reducción en la dosis de levodopa, el antagonismo se debe presumiblemente a un incremento de la actividad de las descarboxilasas fuera del Sistema Nervioso Central de las -- cuales la piridoxina es cofactor.

Farmacodinamia: el clorhidrato de piridoxina es absorbido del tracto gastrointestinal y es convertido a la forma activa de fosfato de piridoxal. Es excretado en la orina como ácido 4-piridoxínico. La piridoxina no se encuentra ligada a proteínas, pero sus metabolitos fosfato de piridoxal y piridoxal, se encuentran total y parcialmente ligados a proteínas.

Usos: es un cofactor enzimático vitamínico usado profilácticamente para evitar deficiencias, terapéuticamente en convulsiones en infantes por deficiencia de piridoxina, en anemia inducida por la deficiencia en adultos, en algunos tipos de anemia megaloblástica posiblemente causada por deficiencia de piridoxina, en el tratamiento de distrofia muscular, alcoholismo agudo y cistinuria, es utilizada como profilaxis contra polineuritis en pacientes con terapia de isoniazida.

Contraindicaciones: no existen contraindicaciones, sólo se deben tener precauciones por la reducción del efecto de la leodopa que produce la piridoxina.

Dosis y rango de dosis:

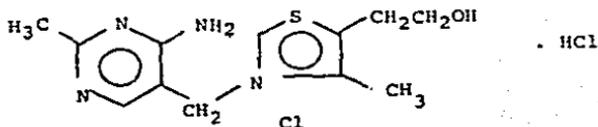
- Profiláctica oral y parenteral 2.0 mg una vez al día.
- Terapéutica oral y parenteral 5.0 a 300.0 mg diarios divididos en dosis.

El rango de dosis es de 2.0 a 600.0 mg diarios.

CLORHIDRATO DE TIAMINA

Nombres Químicos y Sinónimos: 3-([4-amino-2-metil-5-pirimidil] metil)-5-(2-hidroxi-etil)-4-metil-cloruro, monoclorhidrato; clorhidrato de vitamina B₁; cloruro clorhidrato de-Tiamina; clotiamida; tiaminol; clorhidrato de aneurina.

Fórmula desarrollada:



Fórmula condensada: $C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$.

Peso Molecular: 337.27

Porcentaje de composición: C:42.73%, H:5.38%, Cl:21.03%,
N:16.61%, O:4.74%, S:9.51%.

Descripción: pequeños cristales blancos incoloros o un polvo cristalino, forman láminas monoclinicas agrupadas en rozetas, tiene un ligero olor a tiazol o a carne, con sabor amargo, expuesta al aire con humedad promedio la vitamina ab sorbe una cantidad de agua correspondiente a casi un mol, -- formando un hidrato, en forma seca la vitamina es estable y calentándola a 100°C por 24 horas no disminuye su potencia, - la forma comercial contiene alrededor de 4% de agua.

Solubilidad: 1.0 gr se disuelve en alrededor de 1 ml de agua, 18 ml de glicerol, 100 ml de alcohol 95%, 315 ml de alcohol absoluto, soluble en alcohol metílico y propilenglicol, prácticamente insoluble en éter, benceno, hexano y cloroformo.

Acidez o Alcalinidad. pH: una solución en agua destilada 0.1% p/v da un pH de 3.58, soluciones en agua destilada - de 1% a 2.5% p/v dan un pH entre 2.7 y 3.4.

Ensayos de Identidad:

- Temperatura de fusión: es alrededor de 248°C con descomposición parcial.

- Espectro infrarrojo: el espectro de absorción infrarrojo de una dispersión de Tiamina en bromuro de potasio, -- previamente secado a 105°C por dos horas, exhibe máximos sólo a la misma longitud de onda que una preparación similar - de un estándar de referencia de Clorhidrato de Tiamina, si - aparece alguna diferencia, disolver porciones de la muestra y del estándar de referencia en agua, evaporar las soluciones y secar, repetir la prueba con los residuos.

- Disolver 20 mg en 10 ml de agua. Añadir 1 ml de ácido acético 2 M y 1.6 ml de hidróxido de sodio 1 M, calentar sobre un baño de agua por 30 minutos y enfriar, añadir 5 ml de hidróxido de sodio 2 M, 10 ml de una solución 5% p/v de hexaciano ferrato de potasio (III) y 10 ml de 1-butanol, agitar vigorosamente por dos minutos, la capa alcohólica exhibe una intensa luz azul fluorescente, particularmente sobre la luz ultravioleta a 365 nm. Repetir la prueba usando 0.9 ml de hidróxido de sodio 1.M y 0.2 gr de sulfito de sodio, en lugar de 1.6 ml de hidróxido de sodio 1 M; no se produce fluorescencia.

- Una solución 1 en 50 responde a las pruebas de cloruros.

- Absorbancia de la solución: la absorbancia de una so-

lución de Clorhidrato de Tiamina 1 en 10 en agua destilada y después de haber sido filtrada a través de una porosidad fina no excede de 0.025, haciendo la lectura a 400 m.μ, con un espectrofotómetro adecuado, usando celdas de 1 cm y agua como blanco.

- Claridad y color de la solución: se disuelve un gramo de Clorhidrato de Tiamina en agua destilada y se diluye hasta 10 ml; el color de la solución es cuanto más como el de una dilución de 1.5 ml de solución 0.1 N de dicromato de potasio en agua destilada, a 1.0 lt.

Ensayos de Pureza:

- Pérdida al secado: se desecan 500 mg a 105°C, durante dos horas; pierde cuanto más 5% de su peso.

- Nitratos: a 2 ml de una solución 1 en 50 se añaden 2 ml de ácido sulfúrico frío y sobreponer 2 ml de sulfato ferroso S.R.: no se produce una tinción café en la unión de las dos capas.

- Residuos de ignición: no más de 0.2%.

Potencia Requerida: debe contener no menos de 98% y no más de 102% de $C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$, calculado sobre base seca. No menos de 20.6% y no más de 21.2% de Cl total y no menos de 10.4% y no más de 10.0% de Cl presente como clorhidrato, calculado sobre base seca.

Valoración:

- Solución concentrada de Clorhidrato de Tiamina. En una matraz volumétrico de 1000 ml se depositan aproximadamente

25 mg de Clorhidrato de Tiamina, estándar de referencia, previamente desecado a 105°C durante dos horas y teniendo la -- precaución, durante la pesada, de evitar la absorción de humedad, se disuelven en 300 ml de solución diluida 1:5 de alcohol, el pH se ajusta a 4.0 con ácido clorhídrico diluido y se diluye hasta el aforo con el alcohol diluido acidificado. Se conserva bajo refrigeración y protegida de la luz. Esta - solución se prepara cada mes.

- Solución estándar: un volumen adecuado de la solución concentrada tipo de Clorhidrato de Tiamina se diluye cuantitativamente con ácido clorhídrico diluido 1:50 hasta obtener una solución estándar que contenga 0.2 ug de Clorhidrato de Tiamina, por ml.

- Solución por valorar: disolver 25 mg de Clorhidrato - de Tiamina en una solución 0.2 N de ácido clorhídrico, di---luir con esta misma solución hasta 500 ml y mezclar. Diluir esta solución con ácido clorhídrico 0.2 N, hasta obtener una solución cuyo contenido estimado sea aproximadamente 0.2 ug/ml.

- Procedimiento: en cada uno de tres o más tubos de ensayo u otros recipientes adecuados con capacidad aproximada de 40 ml, transferir cuantitativamente 5 ml de solución estándar, a cada uno de dos de los tres tubos de ensayo se - - agregan rápidamente empleando uno o dos segundos y agitando, 3 ml del reactivo oxidante y empleando cuando más 30 segundos se agregan 20 ml de alcohol isobutílico, la solución se mezcla fuertemente durante 90 segundos, agitando manualmente los tubos o en un vortex, en el tubo de ensayo que contiene sólo solución estándar, se prepara un blanco, sustituyendo - el reactivo oxidante por un volumen igual de solución 1:70 - de hidróxido de sodio y procediendo de la misma manera.

En cada uno de tres o más tubos de ensaye iguales a los anteriores, se depositan cuantitativamente 5 ml de la solución por valorar, el contenido de estos tubos se trata de la misma manera que se indica para los que contienen la solución estándar. A cada uno de los seis tubos o del total utilizados, se agregan medidos con pipeta volumétrica 2 ml de alcohol etílico deshidratado, se agitan y se dejan separar las fases, se decantan aproximadamente 10 ml de la solución clara sobrenadante, de alcohol isobutílico, se depositan en celdillas apropiadas y se mide la fluorescencia en un fluorómetro adecuado.

- Cálculos: la cantidad de $C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$ en ug, en cada 5 ml de la solución por valorar, se calcula por medio de la siguiente fórmula: $(A-b)/(S-d)$, en donde A y S son los promedios de las lecturas de fluorescencia de las porciones de la solución por valorar y de la solución estándar, respectivamente. Se calcula la cantidad en mg de $C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$, en la muestra tomando en cuenta las alicuotas tomadas.

- Soluciones empleadas:

- Solución de ferricianuro de potasio: disolver en agua destilada 1.0 gr de ferricianuro de potasio y diluir a 100 ml, se prepara el día que se va a emplear.

- Reactivo oxidante: mezclar 4 ml de la solución de ferricianuro de potasio con suficiente solución 1:70 de hidróxido de sodio hasta 100 ml, debe emplearse sólo dentro de las siguientes cuatro horas después de su preparación.

Cloro total: disolver 0.2 gr de Clorhidrato de Tiamina en 20 ml de agua destilada y añadir 1 ml de ácido nítrico 2M y 15 ml de solución valorada de nitrato de plata 0.1 M, filtrar, y lavar el residuo con agua destilada y titular el fil

trado y lavados con solución valorada de tiocianato de amonio 0.1 M usando como indicador una solución al 10% p/v de sulfato de amonio férrico (III). Cada ml de nitrato de plata 0.1-M equivale a 3.545 mg de cloro.

Cloro presente como clorhidrato: disolver 0.2 gr en 20-ml de agua destilada de Clorhidrato de Tiamina y titular con hidróxido de sodio 0.1 M solución valorada, usando solución-de azul de bromotimol como indicador hasta que aparezca un -color azul-verde indicativo de un pH de 7. Cada ml de hidróxido de sodio 0.1 M equivale a 3.545 mg de cloro presente como clorhidrato.

Conservación y almacenaje: consérvese en recipientes no metálicos, herméticamente cerrados y resistentes a la luz.

Toxicología: efectos indeseables se presentan cuando la tiamina es administrada varias veces en dosis mayores a la dosis terapéutica, las reacciones tóxicas se producen con inyecciones de 50 mg y una muerte rápida fue reportada después de una inyección intravenosa de 100 mg. Grandes dosis posiblemente interfieren con el metabolismo de otros miembros -- del grupo vitamínico B y posiblemente precipitan los síntomas de otros estados de deficiencia en pacientes desnutridos.

Farmacodinamia: el clorhidrato de Tiamina es absorbido del tracto gastrointestinal y es distribuido ampliamente a la mayoría de los tejidos del cuerpo. No es almacenada en grandes cantidades en el cuerpo y las cantidades en exceso de tiamina a los requerimientos del organismo son excretados en la orina como tal o como su metabolito pirimidina.

Usos: es cofactor enzimático vitamínico, utilizado en el tratamiento de Beriveri, en deficiencias de vitamina B₁, en mal nutriciones, en la encefalopatía de Wernickes, en las

neuritis originadas por alcoholismo, embarazos y la de la pe lagra.

Contraindicaciones: el riesgo de un shock anafiláctico-se incrementa con la administración repetida de clorhidrato-de Tiamina por vía parenteral. Se debe tener la precaución -de no administrar grandes dosis de clorhidrato de Tiamina en pacientes desnutridos.

Dosis y rango de dosis:

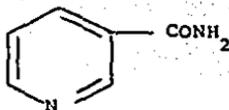
- Oral profiláctica: 5 a 10 mg diarios
- Oral terapéutica: 10 a 35 mg tres veces al día
- Parenteral profiláctica: 5 a 10 mg diarios
- Parenteral terapéutica: 10 a 20 mg tres veces al día.

El rango usual de dosis es de 5 a 200 mg diarios.

NICOTINAMIDA

Nombres Químicos y Sinónimos: ácido Amida nicotínico, - niacinamida, ácido amida-3-piridincarboxílico, nicotilamida, piridina-3-carboxamida.

Fórmula Desarrollada:



Fórmula Condensada: $C_6H_6N_2O$

Peso Molecular: 122.13

Porcentaje de Composición: C:59.01%, H:4.95%, N:22.94%
O:13.10%.

Descripción: polvo cristalino blanco o cristales incoloros, con un olor débil característico y un sabor salado y amargo, sus soluciones 10% p/v en agua son neutras al papel litmus, absorbe insignificantes cantidades de humedad a humedades relativas superiores al 90% y a 25°C, forma sales cristalinas con ácidos, destila a 150-160°C a 5×10^{-4} mm Hg.

Solubilidad: 1.0 gr de nicotinamida se disuelve en alrededor de 1.0 ml de agua, en 1.5 ml de etanol al 96%, en 10.0 ml de glicerol, y es ligeramente soluble en éter y cloroformo.

Acidez o Alcalinidad. pH: una solución al 5% p/v produce un pH de 6 a 8.

Ensayos de Identidad:

- Temperatura de fusión: funde entre 128° y 131°C.
- Espectro ultravioleta: en una matraz volumétrico de 1000 ml se disuelven 20 mg de la muestra, la solución se diluye con agua destilada hasta el aforo y se mezcla, obteniéndose una solución 1 en 50,000, se determina la absorbancia en celdillas de 1.0 cm a 245 y 262 nm, en un espectrofotómetro adecuado, usando agua destilada como blanco, una solución similar de un estándar de referencia tendrá máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda e igualmente medidas, la relación A_{254}/A_{262} es entre 0.63 y 0.67.
- Espectro infrarrojo: el espectro de absorción infrarrojo de una dispersión en bromuro de potasio de nicotinamida sólo debe exhibir máximos a la misma longitud de onda que una preparación similar de un estándar de referencia.
- En un tubo de ensayo se depositan 20 mg de nicotinamida y se agrega una lenteja de hidróxido de sodio, se calienta suavemente sobre una flama, se percibe olor a amoníaco, si la mezcla se calienta a mayor temperatura se percibe olor a piridina; también puede realizarse con 0.1 gr de nicotinamida y 1.0 ml de hidróxido de sodio 2.0 M.
- A 2.0 ml de una solución 0.1% p/v, añadir 2.0 ml de una solución de bromuro de cianógeno, posteriormente 3.0 ml de solución 2.5% p/v de anilina y agitar, se produce una coloración amarilla.
- Claridad y color de la solución: una solución de 0.25% p/v es limpia y no más intensamente coloreada que la solución de referencia.

Ensayos de Pureza:

- Pérdida al secado: secando sobre sílica gel durante - cuatro horas, la pérdida no debe ser mayor que un 0.5% de lo pesado; o secado sobre pentóxido de fósforo por ocho horas a una presión que no exceda de alrededor de 20 mm Hg, la pérdida no debe ser mayor de un 0.5% de lo pesado.

- Contenido de cloruros: disolver 2.5 gr de nicotinamida en 50 ml de agua destilada, 15 ml de la solución deben -- cumplir con la prueba de límites para cloruros.

- Compuestos nitrogenados: a 2 ml de una solución al -- 5.0% p/v, añadir 0.2 ml de hidróxido de sodio 10.0 M y dejar la por cinco minutos; la solución no debe colorear más que - el estándar de referencia.

- Sustancias fácilmente carbonizables: en 5.0 ml de ácido sulfúrico S.R., se disuelven 200 mg de nicotinamida, la - coloración de la solución no es más intensa que la de la solución de referencia tipo I o un fluido de Matchin A.

- Residuos de ignición: cuando más el 0.1%.

- Metales pesados: en 10 ml de agua destilada se disuelve 1.0 gr de la muestra, se agregan 7.5 ml de solución 1.0 N de ácido clorhídrico y se diluye con agua destilada a 25.0 - ml; el límite es de 30 ppm. Preparar el estándar usando una solución estándar de plomo (1 ppm de Pb.).

- Sustancias relacionadas: llevar a cabo el método por cromatografía en capa delgada, usando sílica gel GF₂₅₄ como sustancia de soporte, dejar ascender el solvente 10 cm cerca de la línea de aplicación. Use como fase móvil una mezcla de 48 volúmenes de cloroformo, volúmenes de agua y 45 volúmenes de etanol absoluto. Aplicar separadamente al cromatoplaca --

5 ml de cada una de las dos soluciones en una mezcla de volúmenes iguales de etanol (96%) y agua conteniendo en (1) 8% p/v de la nicotinamida y en (2) 0.02% p/v de nicotinamida. Después remover del cromatoplaca, dejando secar al aire y -- examinar sobre una lámpara de UV., teniendo un máximo de absorción alrededor de 254 nm. Cualquier mancha en el cromatograma obtenido con la solución (1), aparte de la mancha principal no debe ser más intensa que la mancha en el cromatograma obtenido con la solución (2).

Potencia requerida: debe contener entre 98.5 y 101% de $C_6H_6N_2O$ calculado con referencia a la sustancia seca.

Valoración: pesar exactamente alrededor de 300 mg. de nicotinamida y disolverla en 20 ml. de ácido acético glacial anhidro, se calienta ligeramente si es necesario para disolverla totalmente, se agregan 100 ml de benceno y dos gotas de solución indicadora de violeta de cristal. Titular con solución 0.1 N de ácido perclórico hasta el cambio de color a azul-verde, hacer una prueba en blanco para las correcciones necesarias, cada ml de solución 0.1 N de ácido perclórico -- equivale a 12.21 mg de $C_6H_6N_2O$.

- Pesar exactamente alrededor de 200 mg de nicotinamida, transferirla a un matraz volumétrico de 500 ml, disolver en agua destilada y diluir con la misma a volumen, mezclar esta solución, tomar 5 ml con pipeta volumétrica y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml diluir con agua destilada a volumen y mezclar. Disolver exactamente la cantidad pesada de estándar de referencia de nicotinamida en agua destilada y diluir cuantitativamente hasta obtener una solución con -- una concentración conocida de alrededor de 20 mcg/ml.

Determinar de la misma manera las absorvancias de ambas soluciones en celdas de 1 cm a la longitud de onda de máxima absorvancia alrededor de 262 nm, con un espectrofotómetro adecuado, usando agua destilada como blanco. Calcular la cantidad en mg de $C_6H_6N_2$ en la muestra de nicotinamida tomando la fórmula $10C (A_m/A_s)$ en la cual C es la concentración en mcg/ml de estándar de referencia de nicotinamida en la solución-estándar, A_m y A_s son las absorvancias de la solución de nicotinamida y de la solución estándar respectivamente.

Conservación y almacenaje: la nicotinamida debe guardarse en un recipiente herméticamente cerrado.

Toxicología: la nicotinamida no produce los efectos negativos del ácido nicotínico y no produce vasodilatación. Dosis elevadas pueden producir un anormal funcionamiento del hígado.

Farmacodinamia: es absorbida del tracto gastrointestinal rápidamente y es distribuida ampliamente en los tejidos del organismo. Los metabolitos metilados y oxidados son excretados en la orina.

Usos: es componente del complejo de vitaminas B, es factor enzimático, utilizada principalmente en la prevención y tratamiento de la pelagra hipercolesterolemia.

Contraindicaciones: como resultados de algunos estudios se sugiere que la administración durante el embarazo se evite ya que una no completamente probada teratogenicidad se evidenció en dichos estudios.

Dosis y rango de dosis:

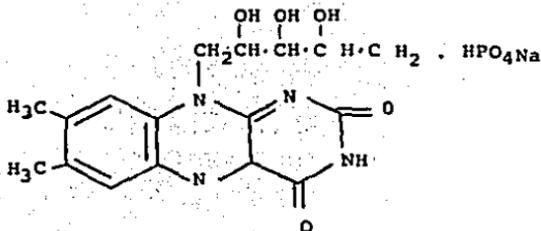
- **Profiláctica:** oral o parenteral de 10 a 30 mg diarios.
- **Terapéutica:** oral o parenteral de 50 a 500 mg diarios en dosis divididas.

El rango de dosis es de 10 a 500 mg diarios.

RIBOFLAVINA-5- FOSFATO DE SODIO DIHIDRATADA

Nombres Químicos y Sinónimos: 7,8-dimetil-10-(D-ribitil y L) isoalloxazin 5'-fosfato de sodio dihidratado; Vitamina-B₂ fosfato de sodio; Riboflavina fosfato de sodio; mononucleótido de flavina; Riboflavina-5-fosfato sal ester monosódica de sodio; mononucleótico de alloxazin; citoflavina; co-flavinasa.

Fórmula Desarrollada:



Fórmula Condensada: C₁₇H₂₀N₄NaO₉P·H₂O

Peso Molecular: 514.4

Porcentaje de Composición: C:40.44%, H:4.67%, N:10.89%, Na:4.47%, O:34.21%, P:6.03%.

Descripción: polvo cristalino amarillo o amarillo naranja, o cristales amarillos, inoloro o casi inoloro, higroscópico, con gran sensibilidad del ester fosfato a la destrucción por luz UV.

Solubilidad: soluble en agua: a pH-6.9 112 mg/ml, a pH 5.68 mg/ml a pH 3.8 43 mg/ml, en general es soluble en 20 --

partes de agua, muy escasamente soluble en etanol al 96%, -- prácticamente insoluble en cloroformo y éter.

Acidez o Alcalinidad. pH: el pH teórico de una solución acuosa de un milimol/150 ml de agua destilada es 4.5, el pH de una solución 1 en 100 es entre 5.0 y 6.5; el pH de una solución 2 en 100 es entre 4.0 y 6.3.

Ensayos de Identidad:

- Espectro ultravioleta: la absorción de luz en el rango de 230 a 350 nm, de una capa de 2 cm de una solución --- 0.0005% en una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0 exhibe máximos sólo a 266 nm; la absorvancia a 266 nm, es alrededor de 0.61.

- A una solución de 1 mg en 100 de agua destilada es de coloración amarillo verdosa y pálida, por transmisión de luz tiene una intensa fluorescencia verde amarilla, la cual desaparece con la adición de ácidos minerales o álcali.

- A un ml de una solución 0.10% se añade 1 ml de hidróxido de sodio 1M, se expone a radiación de luz UV., por 5 minutos, añadir suficiente ácido acético 6M para hacer la solución ácida al papel azul de litmus y agitar la mezcla con 2-ml de cloroformo; la capa de cloroformo exhibe una fluorescencia amarilla.

- Disolver con ayuda de calor 0.1 gr en 1.0 ml de ácido clorhídrico 5M, añadir 10 ml de etanol al 96%, enfriar en un baño de hielo, inducir la cristalización y filtrar a través de un crisol de Gooch (Bs porosidad No.4) el residuo después de lavar con éter y secar tiene una temperatura de fusión de alrededor de 200°C.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- A 0.5 gr añadir 10 ml de ácido nítrico, evaporar la mezcla sobre un baño de agua caliente hasta sequedad, quemar el residuo hasta que el carbón sea removido, disolver el residuo en 5 ml de agua destilada y filtrar, el filtrado obtenido responde a las pruebas para sodio y fosfatos.

- Rotación óptica específica: entre $+37^{\circ}$ y $+42^{\circ}$, calculada sobre la base seca determinada a una solución en ácido clorhídrico 5N, conteniendo 150 mg en cada 10 ml y dentro de los 15 minutos después de preparada.

Ensayos de Pureza:

- Pérdida al secado: secar al vacío sobre pentóxido de fósforo a 100°C por cinco horas, la pérdida no debe ser mayor de 7.5% de su peso.

- Residuos de ignición: no más de 0.25%.

- Fosfatos libres:

a) Solución de ácido molibídico: diluir 25 ml de solución de molibdato de amonio (7 en 100) con agua destilada a 200 ml, a esta dilución añadir lentamente 25 ml de ácido sulfúrico 7.5 N y mezclar.

Solución de sulfato ferroso: prepararla justo antes de usarla, hacer una solución 1 en 10 de sulfato ferroso en ácido sulfúrico 0.15 N.

Preparación del estándar: preparar una solución en agua destilada conteniendo 44.0 mg de fosfato de potasio monobásico en cada ml.

Preparación de la solución de la muestra: transferir -- 300.0 mg de riboflavina 5'-fosfato de sodio a un matraz volú metrico de 100 ml, disolver y diluir con agua destilada a vo lumen y mezclar.

Procedimiento: transferir 10 ml de cada una de las solu ciones, del estándar y de la solución de la muestra a matra ces cónicos de 50 ml separadamente, añadir 10 ml de solución de ácido molibídico y 5 ml de la solución de sulfato ferroso a cada matraz y mezclar, determinar la absorvancia de las so luciones en celdas de 1.0 cm, a la longitud de onda de máxi ma absorvancia alrededor de 700 nm, con un adecuado espectro fotómetro, usando como blanco una mezcla de 10 ml de agua -- destilada, 10 ml de ácido molibídico y 5 ml de solución de -- sulfato ferroso: la absorvancia de la solución a probar no - debe ser mayor que la de la solución del estándar (1% como - fosfato).

b) Disolver 100.0 mg de riboflavina 5'-fosfato de sodio en suficiente agua destilada, en un matraz volumétrico de -- 100 ml, llevar a la marca con agua destilada, tomar 5 ml de esta solución y diluirlos con 5 ml de agua destilada, añadir les 5 ml de una solución amortiguadora de sulfato de cobre - pH=4.0, 2 ml de una solución 3% p/v de molibdato de amonio, - 1 ml de una solución recientemente preparada que contenga 2% p/v de sulfato 4-metilaminofenol y 5% p/v de metabisulfito - de sodio y 1 ml de una solución recientemente preparada que - sostenga 3% p/v de ácido perclórico. Añadir suficiente agua - destilada, llevar a 25 ml y mezclar, medir la absorvancia a - 860 nm, dentro de los siguientes 15 minutos de la prepara - ción de la solución, usar como blanco una solución preparada de manera similar pero sin la sustancia examinada. La absor - vancia no debe ser más grande que la producida al repetir la operación usando una solución preparada en forma similar con 7.5 ml de una solución estándar de fosfatos con una concen -

tración de 10 ppm, comenzando a partir de donde dice: añadir-
5 ml de una solución amortiguadora de sulfato de cobre pH=4.0
riboflavina libre y riboflavina difosfato:

Nota: hacer la prueba con todas las soluciones protegidas de la luz en todo momento, de ser posible usando matraces rojos.

Solución amortiguadora de fosfatos pH=7.0: disolver - - 13.8 gr de fosfato monobásico de sodio monohidratado en alrededor de 100 ml de agua destilada, añadir 59.3 ml de hidróxido de sodio 1.0 N, diluir con agua destilada a 2000 ml y mezclar si es necesario ajustar a 7.0.

Preparación del estándar: transferir 35.0 mg de estándar de riboflavina a un matraz cónico de 250 ml, añadir 20 ml de piridina y 75 ml de agua destilada, disolver la riboflavina con agitación frecuente, transferir la solución a un matraz de 1000 ml, diluir con agua destilada a volumen y mezclar, transferir 20 ml de esta solución a un segundo matraz volumétrico de 1000 ml, ajustar la solución a pH=6.0 con la adición de ácido sulfúrico 0.1 N (alrededor de 8 ml), diluir con una mezcla de agua destilada-dioxano, 3:1, a volumen y mezclar; esta solución contiene 0.175 mg de riboflavina por cada ml.

Preparación de la solución de la muestra: disolver 100 mg de riboflavina 5'-fosfato de sodio en 10 ml de la solución amortiguadora pH= 7.0; preparar una tira de papel cromatográfico de velocidad de flujo promedio u otro papel adecuado para electroforesis y saturar el papel con la solución amortiguadora pH=7.0; usando una micropipeta, aplicar 0.01 ml de la solución muestra a lo largo de la línea estrecha sobre el sitio del cátodo de la tira de papel contenido en una cámara adecuada de electroforesis, aplicar un potencial de -

aproximadamente 250 volts, permitir la electroforesis y continuar por seis horas, remover el papel de la cámara. Detectar cualquier riboflavina libre y riboflavina difosfato observando la tira de papel con la luz del día o sobre luz ultravioleta si es necesario. La riboflavina libre si está presente aparece como una banda cercana a la línea base y la riboflavina difosfato aparece más lejos de la línea inicial.

Precaución: la riboflavina es destruida si se expone a la luz ultravioleta por más de cinco segundos.

Cortar las respectivas bandas y colocarlas en matraces-cónicos de 250 ml por separado, cada matraz contiene 35 ml. de una mezcla de agua destilada y dioxano 3:1, dejarlas hasta que las manchas sean completamente eluidas de las tiras.

Procedimiento: con un fluorómetro adecuado determinar la máxima intensidad de fluorescencia de la solución de la muestra y de la preparación del estándar, usando una longitud de onda de excitación de alrededor de 440 nm y una longitud de onda de emisión de alrededor de 530 nm. La fluorescencia de la solución de la muestra no debe ser más grande que la de la preparación del estándar (6% de cada uno como riboflavina).

- Lumiflavina:

Preparar cloroformo libre de etanol justo antes de usar, como sigue: agitar 20 ml de cloroformo suavemente pero completamente con 20 ml de agua durante tres minutos, separar la capa de cloroformo y lavar dos veces más con porciones de 20 ml de agua destilada. Finalmente filtrar el cloroformo a través de un papel filtro seco, agitar vigorosamente por cinco minutos con 5 gr de sulfato de sodio anhidro en polvo, dejar reposar la mezcla por dos horas y decantar o filtrar el

cloroformo limpio. Agitar 35 mg de riboflavina 5'-fosfato de sodio con 10 ml de cloroformo libre de etanol por cinco minutos y filtrar. La absorbancia del filtrado que se obtiene, - se determina en celdas de 1 cm a una longitud de onda de 440 nm, con un espectrofotómetro adecuado, el cloroformo libre - de alcohol se usa como blanco, no debe exceder de 0.025.

A 35 mg de riboflavina 5'-fosfato de sodio añadir 10 ml de cloroformo libre de etanol, agitar por cinco minutos y -- filtrar; el filtrado no debe ser más intensamente coloreado - que una solución preparada por dilución de 3 ml de 0.0167 M de dicromato de potasio a 1000 ml con agua destilada.

- Potencia requerida: debe contener no menos que el - - equivalente al 73% y no más que el equivalente al 79% de riboflavina $C_{17}H_{20}N_4O$.

Calculado sobre la base seca.

- Valoración:

Nota: hacer la valoración protegiendo todas las soluciones de la luz, usar en todos los pasos material rojo.

a) Preparación del estándar: transferir alrededor de 35 mg de estándar de referencia de riboflavina, pesada exactamente, a un matraz cónico de 250 ml añadir 20 ml de piridina y 75 ml de agua destilada, disolver la riboflavina con agitación frecuente, transferir la solución a un matraz volumétrico de 1000 ml, diluir con agua destilada a volumen y mezclar, transferir 10 ml de esta solución a un segundo matraz volumétrico de 1000 ml, añadir suficiente ácido sulfúrico 0.1 N - (alrededor de 4 ml) para que el pH final de la solución sea entre 5.9 y 6.1, diluir con agua destilada y mezclar. La solución del estándar contiene alrededor de 0.35 mg de ribofla

vina por ml.

Preparación de la solución de la muestra: Transferir alrededor de 50 mg de riboflavina 5'-fosfato de sodio, exactamente pesados a un matraz cónico de 250 ml, añadir 20 ml de piridina y 75 ml de agua destilada y disolver con una agitación frecuente, transferir la solución a un matraz volumétrico de 1000 ml, diluir con agua destilada a volumen y mezclar, transferir 10 ml de esta solución a un segundo matraz volumétrico de 1000 ml, añadir suficiente ácido sulfúrico 0.1 N para llegar a un pH de la solución entre 5.9 y 6.1, diluir con agua destilada a volumen y mezclar.

Procedimiento: con un fluorómetro adecuado, determinar la máxima intensidad de fluorescencia, I_s y I_u , de la solución estándar y de la solución de la muestra respectivamente alrededor de 530 nm es la longitud de onda que se usa como excitante y la longitud de onda emitida es alrededor de 440-nm. Calcular el contenido en mg de $C_{17}H_{20}N_4O_6$ en la porción de riboflavina 5'-fosfato de sodio, usando la fórmula $100C(I_u/I_s)$ en la cual C es la concentración en mg/ml del estándar de referencia de riboflavina.

b) Hacer la valoración protegiendo de la luz todas las soluciones. Disolver 0.1 gr en 150 ml de agua destilada, añadir 2 ml de ácido acético glacial y diluir a 1000 con agua destilada; a 10 ml añadir 3.5 ml de acetato de sodio 0.1 N, diluir a 50 ml con agua destilada y medir la absorbancia de la solución resultante al máximo alrededor de 444 nm, calcular el contenido de $C_{17}H_{20}N_4O_6$, tomando 323 como el valor de A (1%, 1 cm) como el máximo alrededor de 444 nm.

- Conservación y almacenaje: debe guardarse en recipientes herméticamente cerrados y protegida de la luz.

Toxicología: la riboflavina es una sustancia inocua y - las dosis altas no producen ningún trastorno.

Farmacodinamia: la riboflavina se absorbe bien tanto -- por vía oral como parenteral, en la circulación se encuentra ligada a proteínas y una pequeña cantidad es almacenada en - los órganos tales como hígado y riñón, el exceso de la canti- dad administrada de los requerimientos del organismo es ex- cretada en la orina y leche.

Usos: es cofactor enzimático vitamínico, muy activo bio- lógicamente, microbiológicamente y enzimáticamente, componen- te de enzimas flavoprotéicas. Su principal utilización es en el tratamiento de ariboflavinosis (deficiencia de riboflavi- na), además se utiliza junto con las demás vitaminas del com- plejo B en el tratamiento de la pelagra, Beriveri y con cier- ta particularidad en manifestaciones oculares por deficien- cia del complejo B, como: conjuntivitis angular, estomatitis, vascularización corneal, queratitis epitelial entre otras.

Contraindicaciones: no existe ninguna contraindicación para la administración de riboflavina 5'-fosfato de sodio.

Dosis y rango de dosis: 1.37 mg de riboflavina 5'-fosfa- to de sodio equivale a 1.0 mg de riboflavina.

- Dosis profiláctica: 1 a 4 mg diarios
- Dosis terapéutica: 5 a 10 mg diarios

El rango de dosis es de 1 a 80 mg diarios.

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

El trabajo experimental consistió en el desarrollo y -- validación de una técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para la determinación de Clorhidrato de piridoxina, clorhidrato de tiamina, nicotinamida y riboflavina - - 5'-fosfato de sodio que se encuentran en la formulación de - un inyectable cuya presentación es un frasco vial.

El método desarrollado por CLAR se basa en el fenómeno de partición de fase inversa o contraria, dentro de éste se utilizan dos mecanismos el de supresión de ión que se consigue ajustando el pH de la fase móvil a 2.30 y el de par iónico donde se utiliza como contra ión hexasulfonato de sodio y heptansulfonato de sodio disueltos en la fase móvil.

Con dicho método se realizó la cuantificación de las -- cuatro vitaminas comparando las áreas obtenidas en un integrador entre las soluciones problema y las de referencia, -- además de tener como estándar interno a la dipirona sódica.- Se utiliza en la separación una columna empacada con sílica-gel recubierta de octadecilsilano.

Determinación de clorhidrato de piridoxina, clorhidrato de tiamina, nicotinamida y riboflavina 5'-fosfato de sodio.

Aparatos y materiales

- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución, Du-Pont, - equipado con un espectrofotómetro ultravioleta de longitud de onda variable, compartimento de columna, módulo de bombeo modelo 870 y recipientes para solventes.
- Integrador, Hewlett-Packard, modelo 3390A
- Potenciómetro, Corning, modelo pHmeter 125.
- Balanza analítica, Mettler, modelo H35AR.
- Baño ultrasónico, Melter Electronics Corp.
- Bomba de vacío, Gast MFG Corporation, modelo 0210.
- Parrilla de agitación magnética, Thermolyne, Stir Plate Type 1000.
- Campana de extracción, Veco.
- Embudo de filtración, Millipore de 250 ml.
- Matraz Kitazato, Pyrex de 1000 ml.
- Jeringa, Becton-Dickinson de México de 5 ml.
- Jeringa, Insulin-Hypo, Italy de 1 ml.
- Membranas de filtración, Millipore, tipo HA de un tamaño de poro de 0.45 μ y de 47 y 13 mm de diámetro.
- Swinny de acero inoxidable de 13 mm de diámetro, Millipore.
- Matraces volumétricos de 1000, 500, 500 y 250 ml. Pyrex
- Matraces volumétricos de bajo contenido Actínico de 250, 100, 550 y 25 ml, Pyrex.
- Vasos de precipitado de 2000, 250 y 50 ml, Pyrex.
- Pipetas volumétricas de 50, 20, 15, 10, 5, 3, 2, y 1 ml Pyrex.
- Pizetas
- Perillas de succión.
- Agitador magnético.
- Pipeta Pasteur.

Reactivos:

- Agua destilada. USP
- Metanol. GE.
- Acido Acético Glacial. RA.
- Acido Clorhídrico concentrado. RA.
- 1-n-hexansulfonato de sodio.
- 1-n-heptansulfonato de sodio.

Preparación de la Fase Móvil:

Para preparar 1000 ml de la fase móvil:

- Medir con pipeta volumétrica 170 ml de metanol GE. y transferirlos a un matraz volumétrico de 1000 ml, añadir agua destilada y agitar, al mezclarse se produce un desprendimiento de calor, calentándose la solución, se deja enfriar hasta temperatura ambiente, llevar a volumen con agua destilada.

- Pesar exactamente alrededor de 816.0 mg de hexansulfonato de sodio y 196.2 mg de heptansulfonato de sodio, para obtener una concentración de 0.004 M y 0.0009 M respectivamente al transferirlos a un matraz volumétrico de 1000 ml, disolver con la mezcla de metanol: agua destilada 17:83 sin llevar a volumen, adicionar 10 ml de ácido acético glacial - medidos con pipeta volumétrica, llevar a volumen con la mezcla de metanol: agua destilada 17:83.

- Transferir la solución a un vaso de precipitado de -- 2000 ml y determinar el pH de dicha solución con un potenciómetro adecuado, previamente homogenizada la solución mediante la agitación en una parrilla de agitación magnética, sin dejar de agitar la solución y de determinar el pH se ajusta con ácido clorhídrico concentrado el pH de la solución a --

2.30 ± 0.01.

- Filtrar la solución a través de una membrana de filtración con un tamaño de poro de 0.45 µ. Pasar la solución a un recipiente de disolventes del cromatógrafo y desgasificar sometiéndolo a agitación ultrasónica durante 15 minutos.

Preparación de la Solución del Estándar Interno

Pesar exactamente alrededor de 120 mg de dipirona sódica, transferirlos a un matraz volumétrico de bajo contenido actínico de 100 ml, disolver y llevar a la marca con agua -- destilada, agitar vigorosamente para obtener una solución homogénea.

Preparación del Estándar de Referencia

- Solución patrón:

Pesar exactamente y transferir a diferentes matraces de bajo contenido actínico de 25 ml de capacidad:

- 110.0 mg de clorhidrato de piridoxina. Estándar de referencia.
- 90.0 mg de clorhidrato de tiamina. Estándar de referencia.
- 550.0 mg de nicotinamida. Estándar de referencia.
- 113.1 mg de riboflavina 5'-fosfato de sodio. Estándar de referencia.

Disolver y llevar a volumen con agua destilada, agitar fuertemente.

A un matraz volumétrico de bajo contenido actínico de 100 ml de capacidad, añadir cuantitativamente:

- 1.0 ml de cada solución patrón de las vitaminas.
- 10.0 ml de la solución del estándar interno.

- 17.0 ml de metanol GE.

Diluir y llevar a volumen con agua destilada, agitar -- vigorosamente.

Preparación de la Muestra

Tomar con una pipeta volumétrica 1.0 ml de la solución inyectable y transferirlo a un matraz volumétrico de bajo -- contenido actínico de 100 ml, al que se añaden cuantitativamente 10.0 ml de la solución del estándar interno y 17.0 ml. de metanol GE., llevar a volumen con agua destilada y agitar vigorosamente.

Procedimiento

Injectar en el Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución 50 ml tanto de la solución del estándar de referencia -- como de la muestra, bajo las siguientes condiciones de:

- Fase móvil: Metanol: Agua destilada, 17:83
1.0% de ácido acético
pH = 2.30 ± 0.01 ajustado con ácido clorhídrico concentrado.
0.004 M de hexansulfonato de sodio.
0.0009 M de heptansulfonato de sodio.
- Operación: Velocidad de flujo = 1.3 ml/min.
Presión 100 BARS.
Temperatura ambiente.
- Detector: Longitud de onda 280 nm.
Sensibilidad 0.02 UAET (unidades de absorbancia en escala total).
- Integrador: Atenuación: 4 al inicio

3 después de que eluye la riboflavina
5'-fosfato de sodio, aproximadamente a
los 11 minutos.

Velocidad de la carta 0.5 cm/min.

Amplitud del pico 0.16

Umbral de integración 4.

Area de rechazo 0 (cero)

Cero 0, 0.2-0.8.

Cálculos

Los cálculos para cada una de las vitaminas se realizan por separado, la forma general de realizarlos es:

Calcular el área relativa de los picos de la siguiente manera:

Área relativa del pico de la vitamina en la solución -- del estándar de referencia (ArEr).

$$ArEr = B/C$$

donde:

B es el área del pico de la vitamina en la solución del estándar de referencia.

C es el área del pico del estándar interno (dipirona só dica) en la solución del estándar de referencia.

Área relativa del pico de la vitamina en la solución -- muestra (ArM).

$$ArM = D/E$$

donde:

D es el área del pico de la vitamina en la solución - - muestra.

E es el área del pico del estándar interno (dipirona só dica) en la solución muestra.

Calcular la cantidad de la vitamina en cada mililitro - de la muestra usando la siguiente fórmula:

$$\text{mg de vitamina/ml} = \frac{ArM}{ArEr} \times \frac{PR \times FD \times P}{1.0 \text{ ml.}}$$

donde:

ArM: es el área relativa del pico de la vitamina en la solución muestra.

ArEr es el área relativa del pico de la vitamina en la solución del estándar de referencia.

PR es la cantidad en miligramos de la vitamina en la solución del estándar de referencia.

FD es el factor de dilución.

P es la potencia de la vitamina utilizada en la prepara ción de la solución del estándar de referencia.

Especificidad

Con el objeto de demostrar que la respuesta de cada vitamina se debe única y exclusivamente a la vitamina en cuestión, esto es que no existen interferencias de los disolventes, estándar interno, sustancias presentes en la formulación, ni de otras vitaminas.

Se inyectaron diferentes soluciones preparadas de manera similar que las muestras, las soluciones inyectadas fueron de las siguientes sustancias:

- Blanco, únicamente metanol: agua destilada 17:83
- Estándar interno. (dipirona sódica)
- Placebo de cada una de las vitaminas determinadas
- Cada vitamina por separado
- Estándar de referencia
- Muestra

Se obtuvieron cromatogramas en los cuales se observó -- que la respuesta a cada vitamina corresponde sólo a ella, no existiendo ninguna interferencia, de otras sustancias con -- las vitaminas a determinar.

Se observó que la riboflavina 5'-fosfato de sodio muestra tres picos, correspondiendo los menores a productos secundarios de la síntesis, sólo el pico mayor que es propiamente la riboflavina 5'-fosfato de sodio se determina.

Las demás vitaminas presentan como señal un solo pico.

CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA

LINEARIDAD

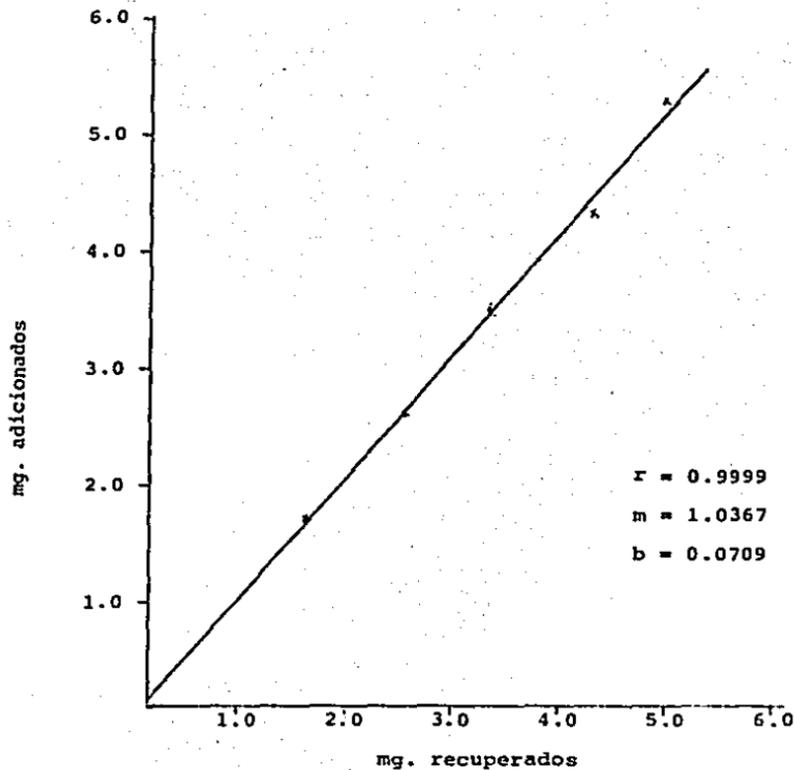
Con el fin de determinar si la señal emitida por el detector, y registrada y cuantificada por el integrador es proporcional a cambios en la concentración de clorhidrato de piridoxina en un amplio rango de concentración, se determinaron diferentes cantidades conocidas adicionadas al placebo. Los resultados se muestran a continuación en la tabla No. 1- y la gráfica No. 1.

| Mg adicionados | Mg recuperados |
|----------------|----------------|
| 1.736 | 1.718 |
| 2.598 | 2.594 |
| 3.472 | 3.432 |
| 4.341 | 4.272 |
| 5.196 | 5.056 |

Tabla No. 1

Linealidad del método para la determinación de clorhidrato de piridoxina por CLAR.

CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA



GRAFICA No. 1

CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA

ANALISIS ESTADISTICO DEL METODO

Con objeto de conocer la precisión y exactitud del método para la determinación de clorhidrato de piridoxina se evaluó estadísticamente.

Se presenta los resultados obtenidos al hacer recobros de cantidades adicionadas conocidas de clorhidrato de piridoxina a su placebo que corresponden a un 80, 100 y 120% de la cantidad etiquetada como 100%.

| Mg. adicionados | mg. recuperados | % recuperado |
|-----------------|-----------------|--------------|
| 3.476 | 3.433 | 98.76 |
| 3.476 | 3.425 | 98.53 |
| 3.476 | 3.418 | 98.33 |
| 3.476 | 3.278 | 94.30 |
| 3.476 | 3.342 | 96.14 |
| 4.330 | 4.217 | 97.39 |
| 4.330 | 4.300 | 99.31 |
| 4.330 | 4.336 | 100.14 |
| 4.330 | 4.151 | 95.87 |
| 4.330 | 4.336 | 100.14 |
| 5.213 | 4.846 | 92.96 |
| 5.213 | 5.066 | 97.18 |
| 5.213 | 4.943 | 94.82 |
| 5.213 | 5.052 | 96.91 |
| 5.213 | 4.893 | 93.86 |

$$\bar{x} = 96.77\%$$

$$\text{Error (Es)} = 0.588$$

$$S = 2.278$$

$$CV \% = 2.349$$

$$\text{Intervalo de confianza } 95\% = 1.26$$

$$\text{Límites de confianza } 95\% = 96.97 \pm 1.26 \text{ (98.24 a 95.72).}$$

CLORHIDRATO DE TIAMIDA

LINEARIDAD

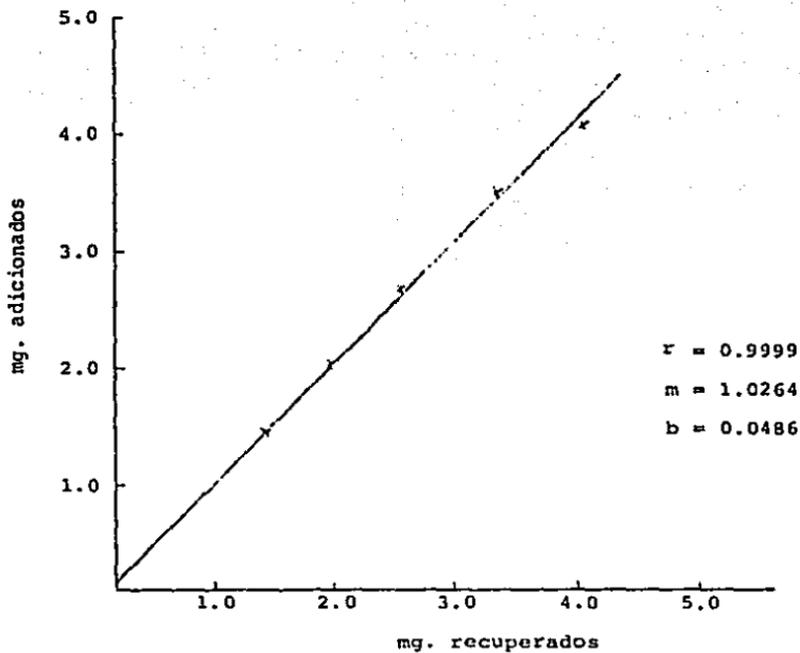
Con el fin de determinar si la señal emitida por el detector, registrada y cuantificada por el integrador es proporcional a cambios en la concentración de clorhidrato de tiamina en un amplio rango de concentración, se determinaron diferentes cantidades conocidas adicionadas al placebo. Los resultados se muestran a continuación en la tabla No. 3 y gráfica No. 2.

| Mg. adicionados | Mg. recuperados |
|-----------------|-----------------|
| 1.391 | 1.405 |
| 2.081 | 2.090 |
| 2.782 | 2.739 |
| 3.468 | 3.409 |
| 4.161 | 4.119 |

Tabla No. 3

Linealidad del método para la determinación de clorhidrato de tiamina por CLAR.

CLORHIDRATO DE TIAMINA



GRAFICA No. 2

CLORHIDRATO DE TIAMINA

ANALISIS ESTADISTICO DEL METODO

Con objeto de conocer la precisión y exactitud del método para la determinación de clorhidrato de tiamina se evaluó estadísticamente.

Se presentan los resultados obtenidos al hacer recobros de cantidades adicionadas conocidas de clorhidrato de tiamina a su placebo que corresponden a un 80, 100 y 120% de la cantidad etiquetada como 100%.

| mg. adicionados | mg. recuperados | % recuperado |
|-----------------|-----------------|--------------|
| 1.791 | 2.786 | 99.82 |
| 2.791 | 2.843 | 101.86 |
| 2.791 | 2.717 | 97.35 |
| 2.791 | 2.679 | 95.99 |
| 2.791 | 2.725 | 97.64 |
| 3.465 | 3.461 | 99.88 |
| 3.465 | 3.555 | 102.60 |
| 3.465 | 3.581 | 103.35 |
| 3.465 | 3.378 | 97.49 |
| 3.465 | 3.540 | 102.17 |
| 4.186 | 4.141 | 98.92 |
| 4.186 | 4.278 | 102.20 |
| 4.186 | 4.193 | 100.17 |
| 4.186 | 4.218 | 100.76 |
| 4.186 | 4.076 | 97.37 |

$$\bar{x} = 99.84$$

$$\text{Error (Es)} = 0.595$$

$$S = 2.303$$

$$CV \% = 2.307$$

$$\text{Intervalo de Confianza } 95\% = 1.256$$

$$\text{Límites de Confianza } 95\% = 99.84 \pm 1.256 \text{ (101.096 a } 98.584).$$

NICOTINAMIDA

LINEARIDAD

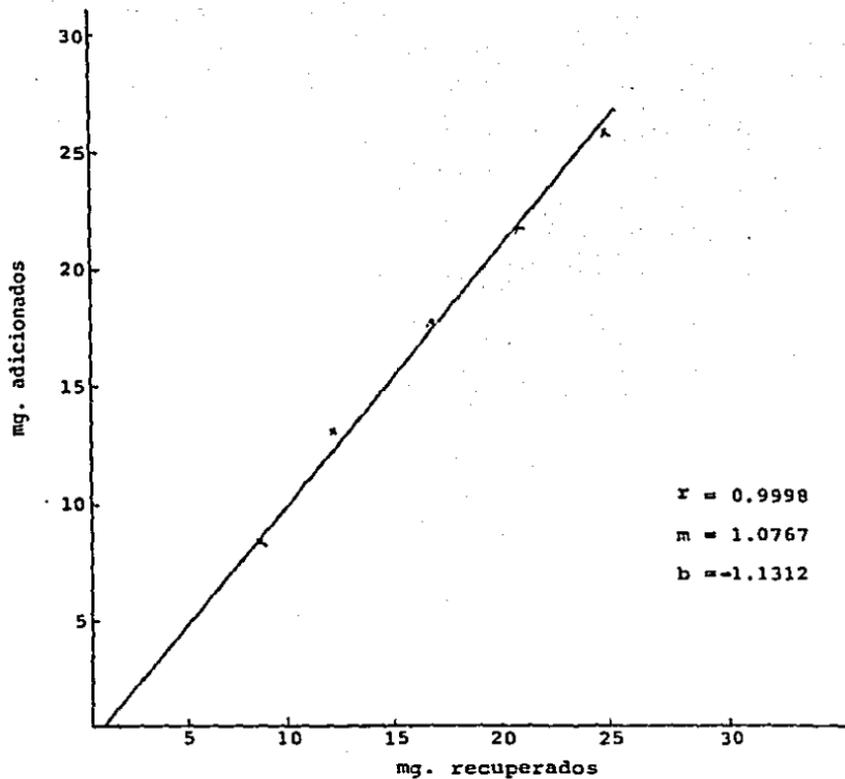
Con el fin de determinar si la señal emitida por el detector y registrada y cuantificada por el integrador es proporcional a cambios en la concentración de nicotinamida en un amplio rango de concentración, se determinaron diferentes cantidades conocidas adicionadas al placebo. Los resultados se muestran a continuación en la tabla No. 5 y gráfica No. 3.

| mg adicionados | mg recuperados |
|----------------|----------------|
| 8.665 | 8.989 |
| 12.991 | 13.196 |
| 17.330 | 17.172 |
| 21.652 | 21.318 |
| 25.983 | 25.025 |

Tabla No. 5.

Linearidad del método para la determinación de nicotina midá por CLAR.

NICOTINAMIDA



GRAFICA No. 3

NICOTINAMIDA

ANALISIS ESTADISTICO DEL METODO

Con objeto de conocer la precisión y exactitud del método para la determinación de nicotina a su valor estadísticamente.

Se presentan los resultados obtenidos al hacer recobros de cantidades adicionadas conocidas de nicotina a su placebo que corresponden a un 80, 100 y 120% de la cantidad etiquetada como 100%.

| mg. adicionados | mg. recuperados | % recuperado |
|-----------------|-----------------|--------------|
| 17.334 | 17.226 | 99.38 |
| 17.334 | 17.488 | 100.89 |
| 17.334 | 17.356 | 100.13 |
| 17.334 | 17.053 | 98.38 |
| 17.334 | 17.272 | 99.64 |
| 21.664 | 20.934 | 96.63 |
| 21.664 | 21.409 | 98.82 |
| 21.664 | 21.202 | 97.87 |
| 21.664 | 20.903 | 96.49 |
| 21.664 | 21.661 | 99.76 |
| 26.001 | 24.315 | 93.52 |
| 26.001 | 24.869 | 95.65 |
| 26.001 | 24.625 | 94.71 |
| 26.001 | 24.939 | 95.92 |
| 26.001 | 24.211 | 93.12 |

$$\bar{x} = 97.39$$

$$\text{Error (Es)} = 0.611$$

$$S = 2.459$$

$$CV\% = 2.521$$

$$\text{Intervalo de Confianza } 95\% = 1.361$$

$$\text{Límites de Confianza } 95\% = 97.39 \pm 1.361 \quad (96.029 \text{ a } 98.751)$$

RIBOFLAVINA 5'-FOSFATO DE SODIO

LINEARIDAD

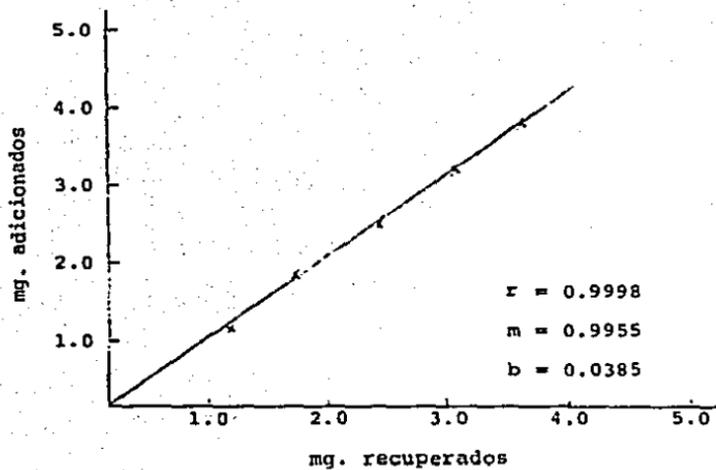
Con el fin de determinar si la señal emitida por el detector, registrada y cuantificada por el integrador es proporcional a cambios en la concentración de riboflavina 5'-fosfato de sodio en un amplio rango de concentración, se determinaron diferentes cantidades conocidas adicionadas al placebo. Los resultados se muestran a continuación en la tabla No. 7 y gráfica No. 4.

| mg. adicionados | mg. recuperados |
|-----------------|-----------------|
| 1.264 | 1.222 |
| 1.886 | 1.882 |
| 2.527 | 2.494 |
| 3.147 | 3.095 |
| 3.772 | 3.767 |

Tabla No. 7

Linealidad del método para la determinación de riboflavina 5'-fosfato de sodio por CLAR.

RIBOFLAVINA 5'- FOSFATO DE SODIO



GRAFICA No. 4

RIBOFLAVINA 5'- FOSFATO DE SODIO

ANALISIS ESTADISTICO DEL METODO

Con objeto de conocer la precisión y exactitud del método para la determinación de riboflavina 5'-fosfato de sodio se evaluó estadísticamente.

Se presentan los resultados obtenidos al hacer recobros de cantidades adicionadas conocidas de riboflavina 5'-fosfato de sodio a su placebo que corresponden a un 80, 100 y 120% de la cantidad etiquetada como 100%.

| Mg. adicionados | mg. recuperados | % recuperado |
|-----------------|-----------------|--------------|
| 2.521 | 2.434 | 96.55 |
| 2.521 | 2.491 | 98.81 |
| 2.921 | 2.453 | 97.30 |
| 2.521 | 2.381 | 94.45 |
| 2.521 | 2.536 | 96.63 |
| 3.147 | 3.037 | 96.51 |
| 3.147 | 3.110 | 98.82 |
| 3.147 | 3.011 | 98.86 |
| 3.147 | 3.062 | 97.30 |
| 3.147 | 3.130 | 99.46 |
| 3.782 | 3.665 | 96.91 |
| 3.782 | 3.794 | 100.32 |
| 3.782 | 3.723 | 98.44 |
| 3.782 | 3.783 | 100.03 |
| 3.782 | 3.693 | 97.65 |

$$\bar{x} = 97.87$$

$$\text{Error (Es)} = 0.407$$

$$S = 1.575$$

$$CV\% = 1.609$$

$$\text{Intervalo de Confianza } 95\% = 0.872$$

$$\text{Límites de Confianza } 95\% = 97.87 \pm 0.872 \quad (98.742 \text{ a } 96.998).$$

CAPITULO IV

RESULTADOS

El método desarrollado por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para la determinación cuantitativa y simultánea de clorhidrato de piridoxina, clorhidrato de tiamina, nicotinamida y riboflavina 5'-fosfato de sodio en una formulación parenteral, se validó y se determinó su precisión, exactitud y linealidad para cada vitamina empleando las siguientes fórmulas:

Media

$$\bar{x} = \sum x/N.$$

Desviación Estándar

$$S = \frac{(x_i - \bar{x})^2}{N-1}$$

Error Estándar

$$E_s = \frac{S}{N}$$

Porcentaje del Coeficiente de Variación

$$CV\% = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$

Intervalo de Confianza para el 95% de probabilidad.

$$IC = E_s \times t_{0.95}$$

Límites de Confianza - para el 95% de probabilidad.

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

Coeficiente de Correlación

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

Pendiente

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

Ecuación de la línea recta

$$y = mx + b$$

Los resultados se muestran a continuación en la tabla No. 9

| Parámetro Estadístico | Clorhidrato de Piridoxina | Clorhidrato de Tiamina | Nicotinamida | Riboflavina 5'-fosfato de sodio |
|-----------------------|---------------------------|------------------------|--------------|---------------------------------|
| N | 15 | 15 | 15 | 15 |
| \bar{x} | 96.98 | 99.84 | 97.39 | 97.87 |
| S | 2.278 | 2.303 | 2.459 | 1.575 |
| E | 0.588 | 0.595 | 0.635 | 0.407 |
| IC _{95%} | 1.260 | 1.256 | 1.361 | 0.872 |
| LC _{95%} | 98.240 a | 101.096 a | 98.751 a | 98.742 a |
| | 95.720 | 98.584 | 96.029 | 96.998 |
| CV% | 2.349 | 2.307 | 2.524 | 1.609 |
| r | 0.9999 | 0.9999 | 0.9998 | 0.9998 |
| m | 1.0367 | 1.0264 | 1.0767 | 0.9955 |
| b | -0.0709 | -0.0486 | -1.1312 | 0.0385 |

Tabla No. 9

Resultados de Validación Estadística.

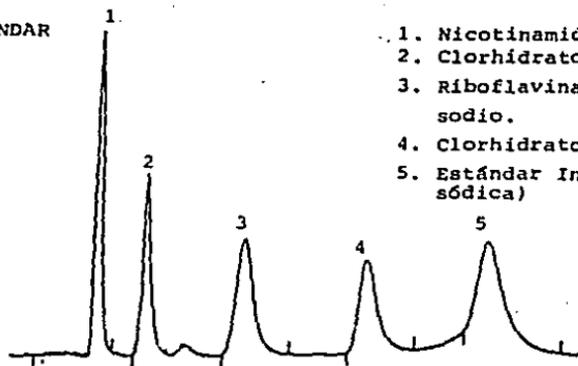
En las siguientes páginas se muestran los cromatogramas de las muestras con un 40, 60, 80, 100 y 120% de la cantidad etiquetada de cada vitamina y el de un estándar de referencia.

CROMATOGRAMAS

- 1.- ESTANDAR
- 2.- 40% DE LA FORMULACION
- 3.- 60% DE LA FORMULACION
- 4.- 80% DE LA FORMULACION
- 5.- 100% DE LA FORMULACION
- 6.- 120% DE LA FORMULACION

CROMATOGRAMA No. 1

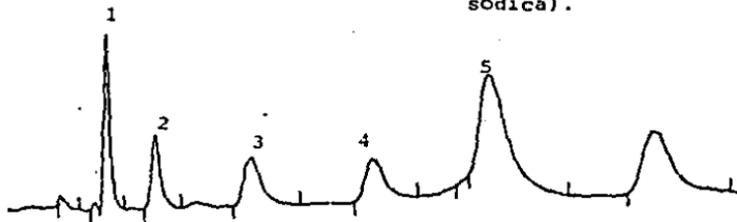
ESTANDAR



1. Nicotinamida
2. Clorhidrato de Piridoxina
3. Riboflavina-5-fosfato de sodio.
4. Clorhidrato de Tiamina
5. Estándar Interno (dipirona sódica)

CROMATOGRAMA No. 2

40% de la formulación

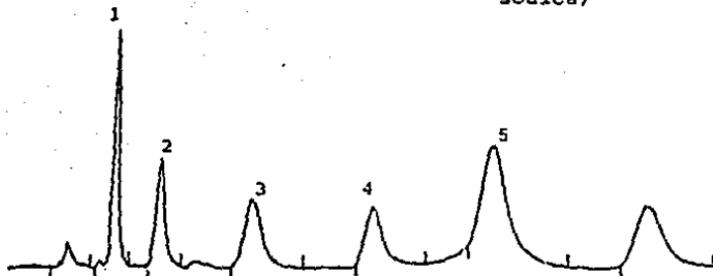


1. Nicotinamida
2. Clorhidrato de Piridoxina
3. Riboflavina-5-fosfato de sodio
4. Clorhidrato de tiamina
5. Estandar interno (dipirona-sódica).

CROMATOGRAMA No. 3

60% de la formulación

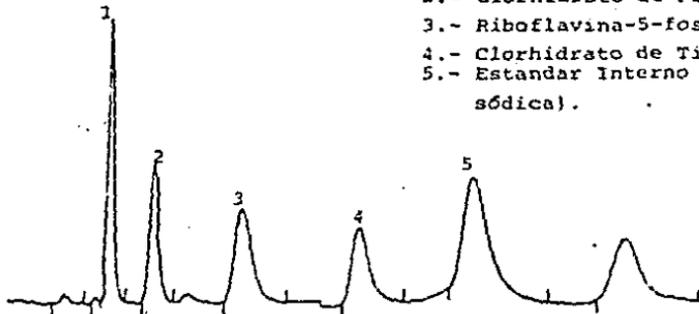
- 1.- Nicotinamida
- 2.- Clorhidrato de Piridoxina
- 3.- Riboflavina-5-fosfato de sodi
- 4.- Clorhidrato de Tiamina
- 5.- Estandar Interno (dipirona-sódica)



CROMATOGRAMA No. 4

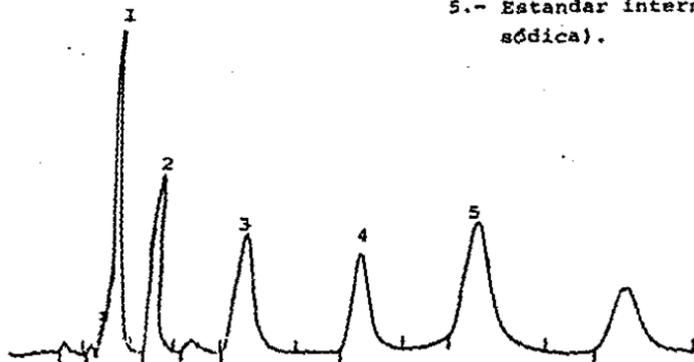
80% de la formulación

- 1.- Nicotinamida
- 2.- Clorhidrato de Piridoxina
- 3.- Riboflavina-5-fosfato de sodi
- 4.- Clorhidrato de Tiamina
- 5.- Estandar Interno (dipirona-sódica).



CROMATOGRAMA No. 5

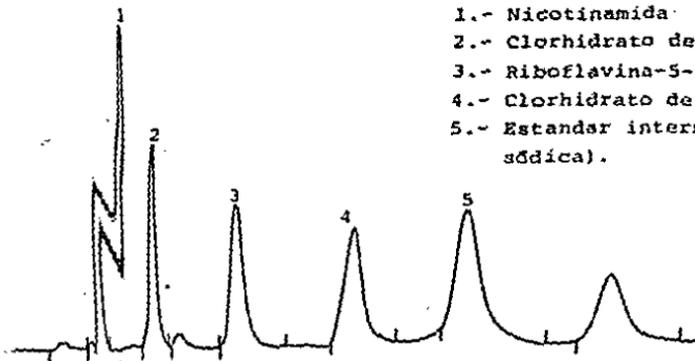
100% de la formulación



- 1.- Nicotinamida
- 2.- Clorhidrato de Piridoxina
- 3.- Riboflavina-5-fosfato de sodi
- 4.- Clorhidrato de Tiamina
- 5.- Estandar interno (dipirona-sódica).

CROMATOGRAMA No. 5

120% de la formulación



- 1.- Nicotinamida
- 2.- Clorhidrato de Piridoxina
- 3.- Riboflavina-5-fosfato de sodi
- 4.- Clorhidrato de Tiamina
- 5.- Estandar interno (dipirona-sódica).

CAPITULO V

CONCLUSIONES

- Se logró el desarrollo de un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para determinar cuantitativamente en una solución inyectable las cuatro vitaminas del Complejo B, presentes en la formulación, Clorhidrato de Piridoxina, Clorhidrato de Tiamina, Nicotinamida y Riboflavina-5-fosfato de sodio.
- El método desarrollado es específico no existiendo interferencia para la cuantificación, sin embargo no es específico para estudios de estabilidad.
- Se logró la separación de Riboflavina 5'-fosfato de sodio de las otras vitaminas, no se encontró bibliografía que reportara esta separación y cuantificación sólo se encontraron reportes de no poderse realizar. Se logró mediante una combinación de contra iones de Heptansulfonato de sodio y Hexanfulfonato de sodio, además de un ajuste fino de pH.
- En todos los casos, la linealidad del método es muy buena, no sólo comparada el coeficiente de correlación sino también viendo las gráficas obtenidas.
- La exactitud del método es buena, teniendo rangos en los límites de confianza de 2 a 3%.
- La precisión del método no es muy buena, pero puede considerarse aceptable, ya que se considera que una

desviación estándar menor de 2.0 es muy buena. Se obtuvieron en 3 casos desviaciones estándar entre 2.3 y 2.5 las cuales pueden considerarse aceptables.

- El método quedó listo para su utilización, obteniéndose un considerable ahorro en tiempo de análisis.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

1. Litter, M.: COMPENDIO DE FARMACOLOGIA. Segunda Edición, Editorial El Ateneo, Buenos Aires, 1981.
2. Martindale, THE EXTRA PHARMACOPOEIA, 28th Edition edited by James E.F. Reynolds, The Pharmaceutical Press, London, 1982.
3. REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENSES, 16th Edition, Mack Publishing Co., Easton Pennsylvania, 1980.
4. FARMACOPEA NACIONAL DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS, -- Cuarta Edición, Secretaría de Salubridad y Asistencia, México, 1974.
5. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA-NATIONAL FORMULARY, U.S.P. XX-N.F.XV.
6. ADDENDUM A TO SUPPLEMENT 3, U.S.P. XX-N.F.XV.
7. BRITISH PHARMACOPOEIA 1980, Her Majesty's Stationery office., Vol. I and II, London, 1980.
8. THE MERCK INDEX, 10th Edition, published by Merck & Co., Inc. Rahway, N.J., 1983.
9. Clarke, E.G.C.: ISOLATION AND IDENTIFICATION OF DRUGS, The Pharmaceutical Press, London, 1974.
10. Strabecker, R., Henning, H.M.: ANALISIS DE VITAMINAS, Editorial Paz Montalvo, Madrid, 1967.
11. Hashmi, M.V.H.: ASSAY OF VITAMINS IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS, John Wiley & Sons, U.S.P., 1973.
12. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST, 20th Edition edited by William Horwitz, Washington, 1975.
13. THE INTERNATIONAL PHARMACOPOEIA, General Methods of, 3th Edition, Volumen I, World Health Organization, Genova 1979.

14. Higuchi, Brochmann-Hanssen: PHARMACEUTICAL ANALYSIS, Intercience Publishers, U.S.A., 1961.
15. Connors, K.A.: A TEXTBOOK OF PHARMACEUTICAL ANALYSIS, John & Sons, U.S.A., 1967.
16. THIN LAYER CHROMATOGRAPHY, A Laboratory Handbook, edited by Egon Stahl, Saarbrücken, 1969.
17. HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, ADVANCES AND PERSPECTIVES, Volume 1 and 2, edited by Csaba Novath, Academic Press, U.S.A., 1980.
18. Savoia F.: CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESSIONE, Orga Nizzazione Editoriale Medico Farmaceutica, Milano, 1980.
19. Regis Chemical Co.: A USER'S GUIDE TO CHROMATOGRAPHY GAS, LIQUID, TLC., Morton Grove Illinois, 1976.
20. Wessely, K.: HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY IN PHARMACEUTICAL ANALYSIS, Hewlett-Packard, Gmb H Böblingen Western Germany, 1979.
21. Willard, H.H., Merritt, L.L., Dean, A.J.: METODOS INSTRUMENTALES DE ANALISIS, Compañía Editorial Continental, México, 1980.
22. Waters Associates.: PAIRED-ION CHROMATOGRAPHY, U.S.A. 1976.
23. Walker, M.C., Carpenter, B.C. and Cooper, E.L.: SIMULTANEOUS DETERMINATION OF NIACINAMIDE, PYRIDOXINE, RIBOFLAVIN, AND THIAMINE IN MULTIVITAMIN PRODUCTS BY HIGH-PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY, J. Pharm. Sci., 70, 99-101 1981.
24. Jenkins, C.: AN H.P.L.C. METHOD FOR THE SEPARATION AND QUANTITATION OF WATER - SOLUBLE VITAMINS IN VITAMIN MINERAL FORMULATIONS, Pharmaceutical Technology, 53-65, March, 1982.
25. Kirchmeier, R.L. and Upton, R.P.: SIMULTANEOUS DETERMINATION OF NIACINAMIDE, PYRIDOXINE, RIBOFLAVIN IN MULTIVITAMIN BLENDS BY ION-PAIRS HIGH-PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY, J. Pharm. Sci., 67, 1444-1446, 1978.

26. Kwok, R.P., Rose, W.P., Tabor, R. and Pattison, R.S.: SIMULTANEOUS DETERMINATION OF VITAMINS B₁, B₂, B₆ AND NIACINAMIDE IN MULTIVITAMIN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS BY PAIRED-ION REVERSED-PHASE HIGH-PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY, J. Pharm. Sci., 70, 1014-1017, 1981.
27. Calgagno, C., Lanteri, S.: STUDIO PER LA OTTIMIZZAZIONE DELLA SEPARAZIONE DI VITAMINE SOLUBILI IN ACQUA MEDIANTE H.P. L.C. A FASE LEGATA AMMINICA, Noticias Técnicas, 37, 152-159, 1982.
28. Asociación Farmacéutica Mexicana: ESPECTROSCOPIA Y VALIDACION DE TECNICAS ANALITICAS, CURSO TEORICO-PRACTICO, México, 1981.
29. Roman, D.F.: VALIDACION DE TECNICAS ANALITICAS. (EL PUNTO DE VISTA ESTADISTICO).