

38
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

"ZARAGOZA"

**DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO
ANALITICO PARA DETERMINAR CIANOCOBALAMINA
E HIDROXOCOBALAMINA EN UNA SOLUCION
INYECTABLE**

**TESIS CON
FALJA DE ORIGEN**

T E S I S

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

P R E S E N T A :

ADRIANA OROZCO TOLEDO

ASESOR : Q. F. B. MAURO ARRIETA SANCHEZ

MEXICO, D. F.

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE

	No. de pag.
INTRODUCCION.....	1
I. FUNDAMENTACION DEL TEMA.....	3
ANTECEDENTES.....	5
A. CIANOCOBALAMINA E HIDROXOCOBALAMINA.....	5
1. Propiedades fisicoquímicas.....	5
a. Cianocobalamina.....	5
b. Hidroxocobalamina.....	6
2. Estructura química.....	8
3. Funciones metabólicas.....	11
4. Absorción, distribución y eliminación de la vitamina B12.....	11
5. Cianocobalamina e hidroxocobalamina en solución inyectable.....	13
a. Fórmula.....	14
b. Acción terapéutica.....	14
c. Precauciones.....	14
d. Reacciones secundarias.....	14
e. Dosis.....	14
B. CROMATOGRAFIA.....	15
1. Historia.....	15

2. Generalidades.....	18
3. Teoría de la cromatografía.....	19
4. Técnicas cromatográficas.....	20
a. Cromatografía en papel.....	21
b. Cromatografía en capa fina.....	22
c. Cromatografía de gases.....	22
d. Cromatografía de filtración sobre gel.....	23
C. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS.....	25
1. Cromatografía de líquidos clásica.....	25
2. Cromatografía de líquidos de alta presión (CLAP).....	27
3. Definiciones.....	29
a. Tiempo de retención (t_r).....	29
b. Tiempo muerto (t_m).....	29
c. Tiempo de retención ajustado (t_a).....	29
d. Anchura de la base del pico (W_b).....	30
e. Número de platos teóricos (N).....	30
f. Altura equivalente a un plato teórico (AEPT)	30
g. Velocidad lineal promedio de la fase móvil (u).....	31
h. Coeficiente de reparto (K).....	31
i. Relación de fases (β).....	31
j. Factor de capacidad (K').....	32
k. Resolución (R).....	32

1. Selectividad (α).....	33
4. Mecanismos de separación.....	33
a. Partición.....	34
1) Cromatografía de partición por iónico (CPI).....	36
b. Adsorción.....	37
c. Intercambio iónico.....	39
d. Filtración sobre gel.....	42
e. Afinidad.....	46
5. Instrumental.....	46
a. Reservorio.....	47
1) Características de la fase móvil.....	48
b. Bomba.....	49
1) Bombas de presión constante.....	49
2) Bombas de flujo constante.....	50
c. Programadores de gradiente.....	51
d. Inyectores de muestra.....	52
e. Columna.....	54
f. Detectores.....	55
1) Detectores de absorción (UV/vis).....	57
2) Detectores de índice de refracción.....	59
3) Detectores de fluorescencia.....	59
g. Análisis cualitativo.....	60
h. Análisis cuantitativo.....	61

i. Métodos cuantitativos de la composición.....	62
1) Estándar externo.....	62
2) Estándar interno.....	63
D. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.....	65
1. Definiciones.....	65
a. Linealidad.....	65
b. Rango.....	65
c. Exactitud.....	66
d. Precisión.....	66
1) Repetibilidad.....	66
2) Reproducibilidad.....	64
e. Limite de detección.....	64
f. Limite de cuantificación.....	64
g. Especificidad.....	64
h. Tolerancia.....	68
i. Estabilidad de la muestra analítica.....	68
2. Parámetros mínimos para validar métodos analíticos.....	69
3. Diseño experimental para cada uno de los parámetros a validar.....	70
a. Linealidad del sistema.....	70
1) Criterio.....	71
b. Precisión del sistema.....	71
1) Criterio.....	71

c. Linealidad del método.....	71
1) Criterio.....	72
d. Exactitud del método.....	74
1) Criterio.....	74
e. Precisión del método (reproducibilidad).....	74
1) Criterio.....	75
f. Especificidad.....	76
1) Métodos de control de calidad.....	76
2) Métodos indicativos de estabilidad.....	77
3) Criterio.....	78
g. Estabilidad de la muestra analítica.....	79
1) Criterio.....	80
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	81
III. OBJETIVOS.....	83
A. OBJETIVO GENERAL.....	83
B. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	83
IV. HIPOTESIS.....	84
V. METODOLOGIA.....	85
A. METODO GENERAL.....	85
1. Material.....	85
2. Equipo.....	86
3. Reactivos y solventes.....	86
4. Método.....	88
VALORACION DE CIANOCOBALAMINA E	

HIDROXOCOBALAMINA ACETATO POR CLAP.....	88
a. Fase móvil.....	88
b. Condiciones cromatográficas.....	88
c. Solución estándar de cianocobalamina e hidroxocobalamina.....	88
d. Solución problema.....	89
e. Procedimiento.....	89
B. EVALUACION DEL SISTEMA.....	90
1. Linealidad del sistema.....	90
a. Procedimiento.....	90
2. Precisión del sistema.....	91
C. EVALUACION DEL METODO ANALITICO.....	91
1. Linealidad del método.....	91
a. Procedimiento.....	91
2. Exactitud del método.....	92
3. Precisión (reproducibilidad).....	93
4. Estabilidad de la muestra analítica.....	93
5. Especificidad.....	94
VI. RESULTADOS.....	95
A. LINEALIDAD DEL SISTEMA.....	95
1. Cianocobalamina.....	95
a. Criterio.....	96
2. Hidroxocobalamina.....	97
a. Criterio.....	98

B. PRECISION DEL SISTEMA.....	99
1. Cianocobalamina.....	99
a. Criterio.....	99
2. Hidroxocobalamina.....	100
a. Criterio.....	100
C. LINEalidad DEL METODO.....	101
1. Cianocobalamina.....	101
a. Evaluación de la ordenada.....	103
1) Criterio.....	103
b. Evaluación de la pendiente.....	104
1) Criterio.....	104
2. Hidroxocobalamina.....	105
a. Evaluación de la ordenada.....	107
1) Criterio.....	107
b. Evaluación de la pendiente.....	108
1) Criterio.....	108
D. EXACTITUD AL 100%.....	109
1. Cianocobalamina.....	109
a. Con el coeficiente de variación.....	109
b. Con el estadígrafo de contraste.....	109
1) Criterio.....	110
2. Hidroxocobalamina.....	110
a. Con el coeficiente de variación.....	111
b. Con el estadígrafo de contraste.....	111

1) Criterio.....	111
E. REPRODUCIBILIDAD.....	112
1. Cianocobalamina.....	112
a. Criterio.....	113
1) Analista.....	113
2) Día.....	114
3) Interacción analista-día.....	114
2. Hidroxocobalamina.....	115
a. Criterio.....	116
1) Analista.....	116
2) Día.....	117
3) Interacción analista-día.....	117
F. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA.....	118
1. Cianocobalamina.....	118
a. Intervalo de confianza para cada condición-tiempo.....	118
1) Criterio.....	119
b. Coeficiente de variación para el análisis de las muestras por condición-tiempo.....	119
1) Criterio.....	120
2. Hidroxocobalamina.....	120
a. Intervalo de confianza para cada condición-tiempo.....	120
1) Criterio.....	120

b. Coeficiente de variación para el análisis	
de las muestras por condición-tiempo.....	121
1) Criterio.....	123
G. ESPECIFICIDAD.....	123
VII. DISCUSION DE RESULTADOS.....	124
VIII. CONCLUSIONES.....	126
IX. SUGERENCIAS.....	127
X. ANEXOS.....	128
XI. BIBLIOGRAFIA.....	142

INTRODUCCION

La cianocobalamina (vitamina B12) e hidroxocobalamina (vitamina B12a) pertenecen al grupo de las cobalaminas, y su estructura química se diferencia en el grupo ciano (-CN) y el grupo hidroxilo (-OH) que tiene cada una de ellas respectivamente.

Dado que las características fisicoquímicas de estas moléculas son muy semejantes, se desarrolló un método por Cromatografía de Líquidos de Alta Presión para separar y cuantificar ambos compuestos contenidos en una solución inyectable. Una vez establecidas las condiciones del método, se realizó la validación de éste, evaluando los parámetros de linealidad y precisión del sistema: linealidad, exactitud, precisión y estabilidad de la muestra analítica para el método.

Los resultados obtenidos en la validación demuestran que el método es lineal, exacto, preciso y específico, y la muestra es estable por 24 horas. Por otra parte, el sistema también es lineal y preciso bajo las condiciones establecidas.

El método desarrollado puede ser empleado en control de calidad para determinar cianocobalamina e hidroxocobalamina en solución inyectable, con la

seguridad de obtener resultados confiables.

Si se desea emplear el método como indicativo de estabilidad, debe realizarse primero un amplio estudio de la especificidad del método con productos de degradación para comprobar si existe o no interferencia.

I. FUNDAMENTACION DEL TEMA

Para que una forma farmacéutica en reformulación salga al mercado con mejor calidad de diseño (propiedades físicas, químicas y biológicas), es conveniente desarrollar métodos analíticos alternativos a los ya existentes que permitan cuantificar los principios activos del producto terminado y que sean específicos para el fármaco.

Considerando que la validación de métodos analíticos es fundamental para la técnica de análisis de una forma farmacéutica, es necesario desarrollar un método analítico que cuantifique cianocobalamina e hidroxocobalamina en una solución inyectable y validar dicho método.

La cianocobalamina, en conjunto, es una molécula natural, el grupo ciano atacado por el átomo de cobalto puede ser reemplazado por otros iones o grupos con fuerte tendencia de coordinación para dar otras cobalaminas como son hidroxocobalamina, clorocobalamina, nitrocobalamina y tiocianocobalamina (1).

Dado que la cianocobalamina e hidroxocobalamina tienen estructuras básicas muy similares resulta difícil separarlas y cuantificarlas cuando se encuentran juntas

en solución. Para esto, la Cromatografía de Líquidos de Alta Presión es el método de elección, ya que permite separar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla en una forma farmacéutica, además de ser muy rápida y sensible.

En la cromatografía líquido-líquido o de partición intervienen la fase móvil y la fase estacionaria, la cual consta de un líquido disperso o químicamente unido a un soporte sólido inerte, la muestra a ser analizada se reparte entre la fase móvil y la fase estacionaria de acuerdo a su coeficiente de partición, esto interviene en las diferentes velocidades de migración y ocurre la separación (2).

Puesto que la cianocobalamina e hidroxocobalamina son moléculas polares es conveniente emplear el método de Cromatografía de Líquidos por Partición en fase reversa, pues aquí la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es polar, lo cual permitirá que eluyan con facilidad a diferentes velocidades y al separarse podrán ser cuantificadas por un medio de detección ultravioleta (U.V.).

ANTECEDENTES

A. CIANOCOBALAMINA E HIDROXOCOBALAMINA

1. Propiedades fisicoquímicas.

a. Cianocobalamina. 5,6-dimetilbencimidazolcianocobamida; Cobinamida ciano fosfato 3'éster - 5,6-dimetil-1- α -D-ribofuranosil bencimidazol (3).

La cianocobalamina ($C_{63}H_{88}O_{14}N_{14}PCo$), es también llamada vitamina B12. Se presenta en forma de cristales rojo intenso, ligeramente higroscópicos, al aire absorben hasta un 12% de humedad. Los cristales hidratados son estables al aire. Se oscurece a 210-220°C Es inodoro e insaboro. Su pH de máxima estabilidad en solución es de 4.5-5. Su peso molecular es de 1355.4.

Es soluble en agua, alcohol o fenol, insoluble en acetona, cloroformo y éter. Soluciones acuosas se deterioran en presencia de vitamina C, aldehídos, sulfato, y gluconato ferroso, se estabiliza con sulfato de amonio.

El espectro de absorción de la vitamina B12 cristalina en solución acuosa se caracteriza por tres máximos, a 278, 361 y 550 nm., con coeficientes de extinción ($A_{1cm}^{1\%}$) de 115, 207 y 64 respectivamente (fig.1)

El espectro de absorción ultravioleta de la solución no es alterado significativamente por cambios en el pH entre 2.0 y 13.0.

La vitamina B12 descompone lentamente por luz ultravioleta o visible fuerte. Por irradiación controlada con luz visible el grupo ciano puede ser selectivamente liberado de cianocobalamina, sin destruir la estructura de la cobalamina, pero una larga exposición a la luz resulta en la completa inactivación de la vitamina. La vitamina B12 es también inactivada por el tratamiento con ácidos y álcalis fuertes (1, 3, 4).

b. Hidroxocobalamina. Cobamida dihidroxo dihidrógeno fosfato (éster) mono (sal); 3-éster - 5,6-dimetil-1- α -D-ribofuranosil-1-H-bencimidazol; (5,6-dimetilbencimidazol) hidroxocobamida; vitamina B12a; hidroxocobamina (3). La hidroxocobalamina, también llamada vitamina B12a ($C_{62}H_{94}CoN_{13}O_{13}P$), con peso molecular de 1346.41, es un análogo de la vitamina B12 donde el grupo -CN es reemplazado por el grupo -OH. Aparentemente la hidroxocobalamina existe en soluciones acuosas como un equilibrio del isómero hidróxi y el isómero iónico acuoso (acuocobalamina).

Se presentan como agujas ortorrómbicas rojo oscuro, oscurecen a 200°C . Es moderadamente soluble en agua y alcoholes alifáticos de cadena corta, practicamente insoluble en acetona, éter, éter de petróleo, hidrocarburos halogenados y benceno.

La absorción máxima de acetato de hidroxocobalamina ($C_{44}H_{91}CoN_{12}O_{16}P$) en solución acuosa es a 274, 351 y 522 nm., con coeficientes de extinción ($A_{1cm}^{1\%}$) 145, 188 y 60 respectivamente (fig. 1).

Los correspondientes coeficientes de extinción para hidroxocobalamina (PM 1346.41) son menores que para acetato de hidroxocobalamina (PM 1406.44) por el peso molecular de ácido acético; pero los puntos de absorción máxima son a la misma longitud de onda.

Al igual que la cianocobalamina, la hidroxocobalamina descompone por una exposición prolongada a la luz ultravioleta y visible, así como en soluciones fuertemente ácidas y/o básicas (1, 3, 4).

--- HIDROXOCOBALAMINA
 — CIANOCOBALAMINA

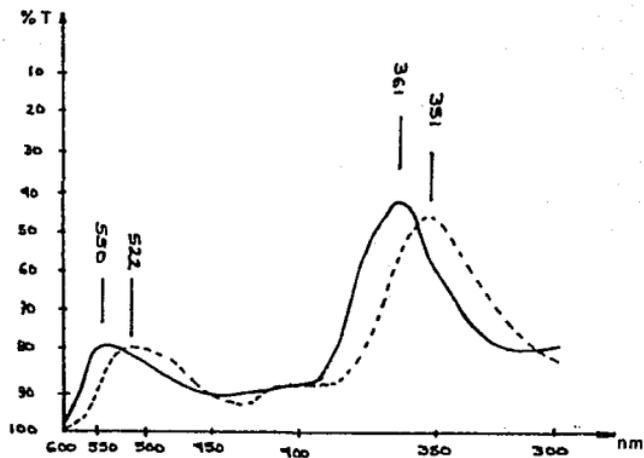


Figura 1. Espectros de absorción de cobalaminas (5).

2. Estructura química.

La fórmula estructural de la vitamina B12 se muestra en la figura 2.

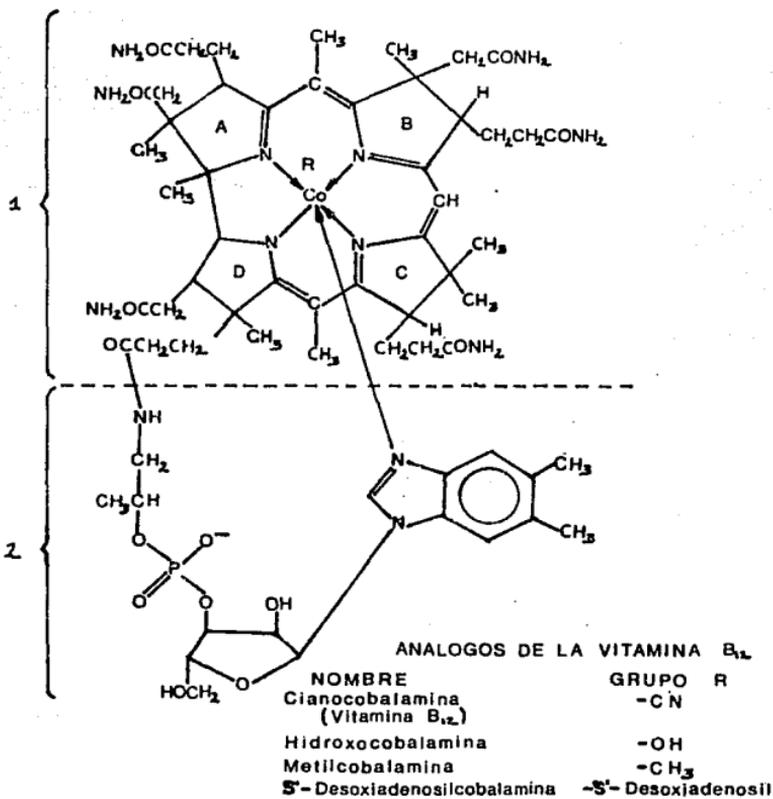


Figura 2. Representación esquemática de la estructura química de la vitamina B12 (6).

Las tres partes principales de la molécula son:

1) un grupo planar o núcleo de corrina, estructura tipo anillo de porfirina con cuatro anillos reducidos de pirrol (A-D) unidos a un átomo central de cobalto y sustituido ampliamente por residuos de metilo, acetamida y propionamida.

2) Un nucleótido de 5,6-dimetilbencimidazolio que se une casi en ángulo recto al núcleo de corrina con uniones al átomo de cobalto y a la cadena lateral de propionato del anillo D.

3) Un grupo R variable, el más importante de los cuales se encuentra en los compuestos estables cianocobalamina e hidroxocobalamina, en las coenzimas activas metilcobalamina y 5-desoximetilcobalamina.

Los términos vitamina B12 y cianocobalamina se usan indistintamente como nombres genéricos de todas las cobamidas activas en el hombre. Los preparados de vitamina B12 para uso terapéutico contienen cianocobalamina e hidroxocobalamina, pues sólo estos derivados son estables al almacenarse.

3. Funciones metabólicas. La vitamina B12 intracelular se mantiene en forma de dos coenzimas activas, metilcobalamina y desoxiadenosilcobalamina, éstas son esenciales para el crecimiento y replicación celular, así como para el mantenimiento de la mielina normal en todo el sistema nervioso.

Una deficiencia de vitamina B12 en el ser humano, repercute en la presencia de trastornos neurológicos y anomalías hematológicas.

La única fuente original de vitamina B12 se encuentra en algunos microorganismos que crecen en el suelo, el agua de lumen intestinal y que sintetizan la vitamina. En el hombre, la vitamina B12 sintetizada en el intestino no está disponible para la absorción, y el requerimiento nutricional diario (3 a 5 mcg) debe obtenerse de subproductos animales en la dieta.

4. Absorción, distribución y eliminación de la vitamina B12. La vitamina B12 dietética en presencia de jugo gástrico, se libera de las proteínas a las que está ligado y vuelve a unirse rápidamente al factor intrínseco, una glucoproteína. El complejo vitamina B12 factor intrínseco llega entonces al ileón donde interactúa con un receptor específico sobre las células

de la mucosa ileal y es transportado a la circulación. Una vez absorbida, la vitamina B12 se une a la transcobalamina II, una betaglobulina plasmática para su transporte, hasta los tejidos.

La vitamina B12 unida a la transcobalamina II es rápidamente depurada del plasma y se distribuye preferencialmente en el parénquima hepático.

La desoxiadenosilcobalamina (coenzima intracelular) es la coenzima para la isomerización de la L-metilmalonil coenzima A (CoA) a succinil CoA, una reacción importante en el metabolismo de los hidratos de carbono y los lípidos. La metil cobalamina actúa como dador del grupo metilo para la conversión de homocisteína en metionina.

Por otra parte, la vitamina B12 tiene una estrecha relación con el ácido fólico. El metiltetrahidrofolato es el principal análogo del folato suministrado a las células y la fuente primaria de grupos metilo para la formación de metilcobalamina, el producto de esta reacción, tetrahidrofolato, es sustrato en muchas vías metabólicas importantes. La acción simultánea de vitamina B12 y folato, producen los sustratos para la síntesis del DNA. Una deficiencia en la síntesis de DNA

y la consiguiente megaloblastosis son frecuentes en pacientes deficientes de vitamina B12 o ácido fólico.

En lo que respecta a las lesiones neurológicas por deficiencia de vitamina B12, los daños en la vaina de mielina son las lesiones más evidentes. Probablemente la anomalía tenga relación con el papel de la desoxiadenosilcobalamina con la isomerización del L-metilmalonil CoA a succinil CoA.

En los adultos, hasta el 90% de las reservas de vitamina B12 (1 a 10 mg) se almacenan como la coenzima activa. El requerimiento mínimo por día se estima en sólo 1 mcg.

Aproximadamente de 3 a 8 mcg de vitamina B12 se excretan al día por la bilis, y se reabsorben normalmente en el ileón (5, 6, 7).

5. Cianocobalamina e hidroxocobalamina en solución inyectable.

La cianocobalamina e hidroxocobalamina se encuentran comercialmente como solución inyectable bajo los siguientes nombres: BYLADOCE D.P , BYLADOCE 5000, BYLADOCE 25000 y BYLADOCE 50000 (8)

A continuación se describen las características de

la presentación farmacéutica BYLADOCE 50000, para la cual se desarrolló el método analítico.

BYLADOCE 50000

a. Fórmula: Cada ml. contiene:

Hidroxocobalamina acetato (Vitamina B12a).....0.522 mg.
Cianocobalamina (vitamina B12).....0.500 mg.
Excipiente c.b.p.....1 ml.

b. Acción terapéutica: Neuromielizante, antineurótico y hematopoyético. Se administra en el tratamiento de neuritis y polineuritis, así como en anemias macrocíticas.

c. Precauciones: No se administre por vía intravenosa.

d. Reacciones secundarias: En personas hipersensibles a los compuestos de la familia, puede provocar náuseas, vómito, erupción cutánea, policitemia vera. Esta solución puede provocar choque anafiláctico.

e. Dosis: De 1 a 2 ml. diariamente por vía intramuscular precisamente.

B. CROMATOGRAFIA

1. Historia. La palabra cromatografía de las palabras griegas khromatos (color) y graphos (escrito); fue empleada originalmente con sustancias coloreadas (9).

En 1850, Runge descubrió la formación de zonas coloreadas cuando se goteaban sustancias colorantes sobre papel secante, pero el desarrollo más importante fue realizado en 1906 con los experimentos de Michel Tswett. Este investigador utilizó una columna larga de vidrio rellena de sulfato cálcico finamente dividido y observó que cuando una mezcla de pigmentos verdes de plantas se ponen en lo alto de una columna y a continuación se agrega éter de petróleo, aparece una serie de bandas horizontales de distintos colores, que corresponden a cada uno de los pigmentos de la mezcla y que indican que ha habido una separación a lo largo de una columna (10).

Sin embargo, a pesar de que Tswett publicó su trabajo completo, en el cual explicó claramente la naturaleza de los procesos y la apreciación de su potencial, no se adoptó esta técnica hasta muchos años después de ser publicada.

En 1930 la cromatografía de adsorción fue utilizada como un método preparativo.

En 1941 Martin y Synge introducen la cromatografía de reparto que se basa en el reparto entre dos líquidos más que la adsorción de un líquido en un sólido. El trabajo de estos investigadores fue reconocido por la concesión del premio nobel en 1952.

En 1944 Condsen, Gordon y Martin describieron un nuevo método para aplicar la técnica de reparto, con hojas de papel filtro. Este método fue llamado cromatografía de reparto sobre papel. Al poco tiempo en 1947 en Estados Unidos de Norte América la comisión de energía atómica dio a conocer información sobre el uso de la cromatografía de intercambio iónico para la separación de productos de fisión nuclear.

En 1952 James y Martin publicaron un trabajo sobre cromatografía de reparto en fase gaseosa, que implica un reparto entre un gas inerte portador y un líquido sobre un soporte no adsorbente, dentro de una columna. Simultáneamente se desarrolló la cromatografía de adsorción en fase gaseosa.

EN 1956 Sthal presentó una técnica práctica mediante la cual una capa delgada de sílica gel, celulosa o

alúmina era diseminada sobre una placa de vidrio. Esta técnica fue llamada cromatografía en capa fina. Este fue un avance creciente principalmente para la cromatografía de adsorción.

En 1959 Porath y Flodin introdujeron la cromatografía de filtración en gel, la cual es una poderosa herramienta para la separación de sustancias de alto peso molecular (11).

A principios de 1969, se apreciaron por primera vez las ventajas potenciales de Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (CLAP), cuando se organizó una sesión especial sobre cromatografía de líquidos como parte del V Simposium Internacional sobre Avances en Cromatografía. Sin embargo, la CLAP tuvo sus comienzos a finales de los años 50's, con la introducción del análisis automatizado de aminoácidos por Spackman, Stein y Moore, esto fue seguido por el trabajo pionero de Hamilton y Giddings, sobre la teoría fundamental de CLAP. En la década de los 60's C.D Scott con Oak Ridge presentaron un trabajo sobre cromatografía de intercambio iónico de alta presión. En esta misma década J.C Moore y Watters Associates introdujeron la cromatografía en gel (12).

2. Generalidades. La cromatografía comprende un grupo de métodos para separar mezclas moléculares que dependen de las diferentes afinidades de los solutos entre dos fases inmiscibles. Una de las fases es un lecho fijo de gran área superficial (fase estacionaria) mientras que otra puede ser líquida o gaseosa (fase móvil) y se mueve a través de la superficie de la fase fija o sobre ella. La afinidad relativa de los solutos para cada una de las fases, debe ser reversible para asegurar que haya transferencia de masa durante la separación cromatográfica (12).

La fase estacionaria puede ser un sólido poroso o finamente dividido, o un líquido que puede ser puesto en capa delgada sobre un soporte inerte. La fase estacionaria debe estar formada por partículas finamente divididas para que exista una superficie tan grande que permita que el fenómeno de adsorción-desorción de los solutos sea frecuente. La fase móvil puede ser un líquido puro o una mezcla de ellos, o en su defecto, una mezcla de soluciones (amortiguadoras) o puede ser un gas (puro o una mezcla homogénea) (2,12).

Los métodos cromatográficos se clasifican de acuerdo a la naturaleza de la fase estacionaria y la fase móvil. Cuando la fase estacionaria es un líquido el proceso se

llama cromatografía de partición, mientras que cuando la fase estacionaria es un sólido el proceso se llama cromatografía de adsorción. En la cromatografía de partición la fase estacionaria es un líquido, frecuentemente agua, mantenida en un soporte inerte tal como gel de sílice o tierra de diatomeas, la fase móvil puede ser un gas (cromatografía gas-líquido: CGL) o bien un líquido (cromatografía líquido-líquido: CLL). En la cromatografía de adsorción la fase móvil que contiene al soluto pasa sobre la superficie de la fase estacionaria, la separación tiene lugar cuando algunos de los componentes de la mezcla son más fuertemente adsorbidos por el sólido que otros. Dado que la adsorción es esencialmente un fenómeno de superficie, el grado de separación alcanzado depende de la superficie adsorbente de que se disponga.

3. Teoría de la cromatografía. Se han desarrollado dos enfoques teóricos para describir el paso de los solutos a través de un sistema cromatográfico, éstos se basan en un proceso de reparto múltiple o en uno continuo de adsorción-desorción.

El primero de estos, la teoría de los platos, basada en el trabajo de A. P. Martin y R. L. M. Singe

considera el sistema cromatográfico como una serie discreta de platos teóricos, siendo cada uno de ellos una unidad dentro del sistema en la que hay un equilibrio del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria. El movimiento del soluto se considera como una serie de transferencias paso a paso entre plato y plato. La segunda teoría o de la velocidad, considera la dinámica de la partícula del soluto a medida que pasa a través de los espacios ubicados en la fase estacionaria del sistema, al igual que la cinética de estas partículas a medida que son transferidas hacia la fase estacionaria y desde ella (9).

4. Técnicas cromatográficas. Es posible aplicar las cuatro formas básicas de cromatografía (adsorción, partición, intercambio iónico y exclusión de tamaño) al análisis de sistemas farmacéuticos, utilizando una serie de técnicas que difieren una de otra de acuerdo a la naturaleza de la fase móvil y estacionaria que utilicen, así como del aparato para realizar dicha cromatografía. La elección de la técnica depende de varios factores, entre estos figuran la complejidad de la muestra que se va a analizar, las propiedades fisicoquímicas de cada uno de sus componentes, la resolución requerida, el

tiempo de análisis, así como la facilidad de la técnica.

Si se desea separar compuestos ionizados en solución tal como aminoácidos, el método de elección es la cromatografía de intercambio iónico. Para separar sustancias de alto peso molecular como son proteínas, glicéridos o polímeros es necesario emplear el método de cromatografía líquida por exclusión de tamaño. Los compuestos hidrofílicos de peso molecular intermedio pueden separarse por cromatografía de partición ya sea de papel o en columna. Las sustancias que no son ionizables, hidrofílicas pueden separarse mediante métodos de adsorción líquida. Si las sustancias son volátiles y estables en fase gaseosa, la cromatografía de gases es el método de elección por su facilidad y alta resolución. Si se desea aislar compuestos en cantidad la elección es la técnica de cromatografía líquida en columna o cromatografía en capa fina.

a. **Cromatografía en papel (CP).** En este tipo de cromatografía la separación se lleva a cabo sobre tiras u hojas de papel filtro. Puesto que el papel está formado por celulosa, la cual está integrada por 2000 o más unidades de hidro-glucosa unidas en cadena mediante átomos de oxígeno, los componentes polares

(principalmente el agua) tienen gran afinidad por los grupos hidróxilo de cada unidad de glucosa. Por lo tanto, el agua fuertemente unida a la red cristalina de la celulosa es la fase estacionaria y a medida que la fase móvil se desplaza sobre ésta, los solutos se reparten entre la fase unida de agua y la fase móvil. Por lo tanto el mecanismo principal que interviene en la separación es el de partición (9, 11).

b. **Cromatografía en capa fina (CCF).** En la CCF la separación ocurre sobre una capa delgada de adsorbente que está adherida a un soporte inerte, generalmente vidrio; aquí la fase móvil líquida migra por capilaridad a través de la superficie de la fase estacionaria y se efectúa la separación de los solutos por su diferente afinidad a cada una de las fases.

Las ventajas principales sobre la cromatografía en papel son que la separación ocurre más rápido, las manchas son más discretas y compactas, además de que se pueden usar detectores corrosivos sin dañar el substrato o el adsorbente.

c. **Cromatografía de gases (CG).** La cromatografía de gases es particularmente apropiada para la separación de

gases y líquidos volátiles o sólidos en estado gaseoso. El proceso de la CG se divide en dos clases de acuerdo a la naturaleza de la fase estacionaria. Estas clases son: cromatografía gas-sólido (CGS), en la que la fase estacionaria es un sólido adsorbente y las partículas de soluto son extraídas de la fase móvil mediante fuerzas electrostáticas, y la cromatografía de gas-líquido (CGL), en la cual la fase estacionaria es una capa delgada de líquido, que generalmente se encuentra recubriendo la superficie de un material inerte. La separación en este método depende de la retención de las moléculas de soluto en la fase líquida basadas en su coeficiente de partición entre ella y la fase móvil.

d. Cromatografía de filtración sobre gel. La cromatografía de filtración sobre gel es un tipo particular de cromatografía líquido-líquido, que se utiliza en la separación de sustancias que poseen volúmenes moleculares diferentes.

La propiedad característica que diferencia este método de otros tipos de cromatografía de partición, es que los granos que forman la fase estacionaria en el medio cromatográfico consisten en un gel sin cargas, éste se hincha con el disolvente que está pasando a

través del medio. Los geles están formados de macromoléculas con gran afinidad al disolvente que se está usando. Estas moléculas se someten a un proceso de entrecruzamiento para dar una mayor o menor uniformidad tridimensional, que las hace insolubles. En lugar de disolverse en el líquido, se hinchan tomando gran cantidad de disolvente (2, 10).

La cromatografía de filtración sobre gel separa las sustancias de acuerdo con su tamaño molecular; las sustancias cuyo tamaño molecular es superior al de los mayores poros de gel hinchado, no pueden penetrar en el interior del gel, por lo que pasan en el líquido a través del lecho, siendo los primeros en emerger.

Sin embargo las moléculas más pequeñas pueden penetrar. En el líquido exterior e interior de las partículas de gel hay un reparto de moléculas, siendo mayor el porcentaje de las mismas en el exterior.

Las moléculas que emergen de la columna siguen un orden decreciente respecto a los tamaños moleculares.

C. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS.

La cromatografía de líquidos es una de las técnicas cromatográficas más versátiles con las que cuenta el analista, ya que por medio de ésta es posible realizar separaciones de mezclas basándose en diversas características, tales como polaridad de los solutos, coeficiente de partición, peso molecular, naturaleza iónica, o su capacidad para formar complejos de afinidad.

En la cromatografía de líquidos la separación tiene lugar en una columna empacada. La fase estacionaria puede ser un sólido con capacidad adsorptiva o un soporte inerte revestido de una capa líquida, mientras que la fase móvil es un líquido (2, 12).

El proceso de la cromatografía de líquidos puede ser realizado usando uno de los dos métodos siguientes.

1. Cromatografía de Líquidos Clásica (CLC). La cromatografía de líquidos clásica (CLC) empleada durante mucho tiempo consiste básicamente en una columna de vidrio de diámetro entre 2 y 10 cm, rellena de algún material como gel de sílice, alúmina, azúcar, etc., cuyas partículas son por lo general de un tamaño cercano

a 200 micras. La muestra se disuelve en fase móvil y se coloca en la parte superior de la columna con ayuda de un cuentagotas o una pipeta, posteriormente se agrega disolvente con el cual se eluye la muestra a través de la columna. El flujo del solvente se alcanza por gravedad en la columna y las fracciones de una muestra individual se colectan manualmente. La aplicación de la muestra requiere algunas habilidades y tiempo por parte del operador para que se lleve a cabo correctamente.

En la CLC regularmente se usa la columna una sola vez y después se descarta, por lo tanto el relleno de la columna tiene que ser repetido para cada separación y esto representa un significativo gasto de material y esfuerzo.

Debido a que las separaciones requieren de varias horas en CLC es una operación tediosa que consume mucho tiempo. La detección y cuantificación se lleva a cabo por análisis manual de las fracciones individuales; generalmente se usa una técnica auxiliar, por ejemplo, espectrofotometría, análisis químico, o un registro gravimétrico, para evaluar el contenido de cada uno de los componentes de la mezcla en las fracciones colectadas.

2. Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (CLAP).

En este método se utilizan columnas de diámetro muy reducido rellenas de materiales especiales pulverizados con tamaño de partícula de 30-40 micras y de 3-10 micras.

Este tipo de columna es muy eficaz pero ofrece una gran resistencia al flujo de la fase móvil, es decir, una gran caída de presión, por lo que es necesario emplear sistemas de bombeo de alta presión. La cantidad de la fase estacionaria es pequeña pero se requiere que la muestra también sea pequeña (0.1-10 mcg).

Las columnas empleadas en CLAP son reutilizables por lo que se pueden llevar a cabo muchas separaciones individuales en una columna dada.

La inyección precisa de la muestra se lleva a cabo fácil y rápidamente en CLAP usando una jeringa de inyección o una válvula de muestra. Puesto que se emplean bombas de alta presión, se obtiene un flujo controlado y rápido del solvente a través de la columna relativamente impermeable. El flujo controlado da por resultado una operación más reproducible lo cual significa gran precisión y exactitud en análisis por elución.

La detección y cuantificación por CLAP se lleva a

cabo con detectores continuos de varios tipos, esto rinde un cromatograma final sin la intervenci3n del operador.

La CLAP ofrece grandes ventajas al analista pero tambien tiene sus limitaciones como se muestra en la tabla I.

Ventajas	Desventajas
-Velocidad de analisis	-Equipo costoso
-Alta resoluci3n	-No existe detector universal
-Buena sensibilidad y automatizaci3n	
-Resultados cuantitativos y reproducibles	-experiencia indispensable
-Amplio espectro de aplicaciones	-Elevado costo de operaci3n

TABLA I. Ventajas y desventajas que presenta la Cromatografia de Liquidos de Alta Presi3n.

Con CLAP generalmente se obtiene un informe exacto de la separaci3n en corto tiempo y con un minimo esfuerzo.

3. Definiciones: En Cromatografía de líquidos se emplea un lenguaje común que utiliza términos y símbolos característicos, a continuación se indican los más usuales así como su importancia y la forma en que son evaluados (2, 12).

a. **Tiempo de retención (t_r).** Es el tiempo en que la muestra permanece dentro de la columna. Se mide desde que la muestra se introduce en el sistema hasta el momento que se obtiene el máximo de la señal o pico. Por lo general se emplea como medida cualitativa y se expresa en unidades de tiempo. Este parámetro es característico de la muestra, columna, fase móvil y temperatura.

b. **Tiempo muerto (t_o o t_m).** Es el tiempo requerido para eluir una muestra no retenida en la columna y se determina midiendo el tiempo de retención de la fase móvil o de una muestra similar.

c. **Tiempo de retención ajustado (t_a).** Es la medida del tiempo que la muestra permanece retenida en el material de relleno de la columna y se determina por la diferencia entre t_r y t_o .

$$t_a = t_r - t_o$$

d. Anchura de la base del pico (W_b). Es la porción de la línea basal interceptada por tangentes trazadas a ambos lados de un pico, asumiendo que la forma del pico es gaussiana.

e. Número de platos teóricos (N). Un plato teórico es el equilibrio de la distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria.

$$N = 16(t_r / W_b)^2$$

El número de platos teóricos es una medida de la eficiencia de la columna y sistemas asociados. Cuanto mayor sea N, más eficiente será la columna.

f. Altura equivalente a un plato teórico (AEPT). AEPT es la longitud de la columna requerida para obtener un equilibrio de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria.

Este parámetro se determina con la siguiente fórmula:

$$AEPT = L / N$$

Donde, L es la longitud de la columna expresada generalmente en milímetros.

Si el valor de AEPT es pequeño, es mayor el número de platos teóricos por unidad de longitud.

g. Velocidad lineal promedio de la fase móvil (U).

$$U = L / t_0$$

Este parámetro de operación se usa para representar esquemáticamente AEPT en función de U (gráficas de Van Deemeter).

h. Coeficiente de reparto (K). Es una propiedad física fundamental de cada sustancia, es característica de cada muestra y del sistema de fase móvil y fase estacionaria en consideración, así como de la temperatura de operación. Este parámetro se determina como:

$$K = \frac{\text{cantidad de muestra/ml de fase estacionaria}}{\text{cantidad de muestra/ml de fase móvil}}$$

i. Relación de fases (β). Se representa por:

$$\beta = \text{ml de fase móvil} / \text{ml de fase estacionaria}$$

Expresado de otra forma, se puede decir que, cada sección de columna equivale a la porción del volumen de dicha sección ocupado por la fase móvil y la fase estacionaria.

j. Factor de capacidad (K'). Este factor es definido por la ecuación:

$$K' = t_R / t_0$$

Este factor es importante en CLAP porque severos estudios han demostrado que la eficiencia de la columna es grande para compuestos con valores de K' entre 2 y 6, pero en la práctica son usados valores de 1 a 15.

k. Resolución (R). Es una medida cuantitativa del grado de separación entre dos picos y se expresa como:

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{1/2 (W_a + W_b)}$$

$$R = 2 (tr_2 - tr_1) / Wa + Wb$$

Todos los miembros de esta ecuación deben ser expresados en las mismas unidades. Un valor de $R = 1.5$ significa una separación completa, por lo tanto, valores por debajo significan una mala separación.

1. **Selectividad (α)**. Valores elevados de α significan mejores separaciones.

$$\alpha = ta_2 / ta_1$$

Se puede decir que alfa es una medida de la solubilidad diferencial de dos compuestos en la fase estacionaria.

4. **Mecanismos de separación**. Existen cinco métodos para separar mezclas por CLAP, cada uno de estos se basa en diferentes mecanismos de separación. Dependiendo de la naturaleza de la muestra a separar, es posible emplear cualquiera de estos métodos cambiando la columna del equipo. El mecanismo de separación va a depender principalmente del tipo de fase estacionaria que se emplee. Estos métodos son los siguientes:

a. **Partición.** La cromatografía de partición involucra una fase estacionaria líquida la cual está dispersa sobre un soporte inerte finamente dividido o químicamente unido al material de soporte, y una fase móvil líquida. La muestra a ser analizada se dispersa en la fase móvil y es dividida entre la fase móvil y la fase estacionaria de acuerdo a su coeficiente de partición. Esta división conduce a una velocidad diferencial de migración y ocurre la separación (2).

Hasta hace algunos años se empleaba la fase estacionaria dispersa sobre el soporte inerte, pero debido a la gran dificultad para obtener fases estacionarias que fueran reproducibles y estables, además de no ser lentamente removidas de la columna, cambiando de esta manera las características de la separación, fue necesario desarrollar la cromatografía de fase unida (CFU) en la cual la fase líquida se halla unida químicamente a la superficie del sólido (2).

El gel de sílice por su gran cantidad de grupos hidróxilo en la superficie es un medio excelente sobre el cual se pueden unir varias sustancias usando agentes similares sustituidos adecuadamente. Por ejemplo el cloruro de octadecildimetilsililo reacciona con el gel de sílice para dar una fase estacionaria estable no

polar, llamada octadecilsililo u octadecilsilano (ODS). Debido a los efectos estéricos no todos los grupos hidróxilo del gel de sílice se eliminan por el reactivo ODS, por lo que se hacen reaccionar con el cloruro de trimetilsilano en un proceso llamado de cobertura, para reducir los efectos de adsorción. Una de las ventajas de las columnas fase unida es que son reproducibles y la fase no cambia durante la cromatografía, poseen la desventaja de ser caras y eficaces en un intervalo de pH en el cual la sílica gel es estable, usualmente de 2 a 7. No obstante estas desventajas no son muy restrictivas.

La cromatografía de partición puede efectuarse de dos maneras, en fase normal o en fase reversa. En la fase normal la fase estacionaria es un líquido polar, por ejemplo, agua, glicol, o β - β' -oxidipropionitrilo, mientras que la fase móvil es relativamente no polar, por ejemplo, hexano, benceno o cloroformo. Este modo de operación es usado para separar compuestos polares los cuales se distribuirán preferencialmente en la fase estacionaria polar (2, 12).

Si la fase estacionaria es no polar, por ejemplo ODS y la fase móvil polar, usualmente una mezcla de agua-metanol y/o acetonitrilo la técnica es llamada

cromatografía líquido-líquido (CLL) en fase reversa. Los compuestos no polares se retienen más frecuentemente por este sistema, mientras que los solutos polares eluyen primero. Las separaciones en fase reversa son los métodos más frecuentemente usados en CLAP.

Normalmente los compuestos iónicos no son retenidos en un empaquetamiento de fase reversa, dado que son demasiado polares para separarse apreciablemente sobre la fase estacionaria. A continuación se describe un procedimiento para separar compuestos iónicos empleando estas fases estacionarias.

1) Cromatografía de partición por iónico (CPI).

Es una forma especial de CLL usada para la separación de compuestos iónicos o ionizables, por ejemplo, sales cuaternarias de amonio, sulfonatos, aminoácidos y aminofenoles. Las moléculas de muestra iónica o ionizable forman un par de iones por asociación con un ión contrario orgánico conveniente en medio acuoso. El par de iones es entonces dividido en una fase acuosa ión-orgánica con buena capacidad de solvatar (por ejemplo agua-metanol) para dar un alto grado de selectividad. CPI es una alternativa para la cromatografía de intercambio de iones, puesto que

permite la determinación simultánea de compuestos ácidos básicos y neutros.

Los compuestos débilmente iónicos (ácidos y bases) pueden separarse usando CLL fase reversa unida permanentemente, si la disociación se suprime por amortiguación en el pH de 2 a 8, por lo tanto el equilibrio no iónico \rightleftharpoons iónico se desplaza hacia la izquierda.

Ácidos y bases fuertes están ionizados en este rango de pH y la forma más polar es pobremente retenida. La adición de un ión contrario apropiado a la fase móvil incrementa la retención de estos compuestos iónicos. Este incremento depende de la naturaleza y concentración del ión contrario utilizado. El pH de la fase móvil se ajusta para dar un máximo de ionización en la muestra y el ión contrario; para muestras ácidas, aminas cuaternarias son regularmente usadas como ión contrario y el pH de la fase móvil deberá ser relativamente alto (pH de 7-8) y para muestras básicas usando alquilsulfonato como ión contrario, el pH de la fase móvil deberá ser bajo (pH de 3-4) (2).

b. Adsorción. En este método la separación es llevada a cabo con una fase móvil líquida y una fase

estacionaria sólida la cual adsorbe reversiblemente las moléculas del soluto. Si se emplea una fase estacionaria sólida polar (por ejemplo, sílica gel, cuentas de vidrio poroso o alúmina) cuando la fase móvil es relativamente no polar (por ejemplo, hexano o cloroformo); o fase estacionaria no polar (por ejemplo, cuentas de polímeros) cuando se utiliza una fase móvil polar (por ejemplo agua o metanol). Los solutos son retenidos como resultado de la capacidad de la fase estacionaria para unirse a ellas temporalmente, a nivel de superficie activa. Las fuerzas implicadas suelen ser relativamente débiles y son eficaces sólo sobre distancias cortas. Estas incluyen fuerzas de London y de Van der Waals, interacciones dipolo y dipolo inducido con grupos polares ubicados sobre la superficie activa, fuerzas de transferencia de carga y puentes de hidrógeno. El proceso puede estar basado en la competencia existente entre la disolución del soluto en la fase móvil y la fijación a la superficie de la fase estacionaria.

Cuando se forman uniones químicas más fuertes entre los solutos y el adsorbente (quimioadsorción), no se llega al equilibrio entre ambas fases y los solutos son irreversiblemente adsorbidos dando picos de elución no

satisfactorios o con colas.

En ocasiones debido a una fuerte adsorción de compuestos de la muestra en el sólido activo, es necesario aumentar la polaridad de la fase móvil en forma constante (gradiente).

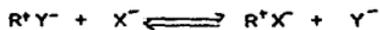
Algunas sustancias que se usan más frecuentemente como adsorbentes son: gel de sílice, almidón, talco, sacarosa, insulina, magnesio, carbonato de calcio, silicato de magnesio, alúmina y carbón. Además de la adsorptividad poseen una función muy importante, la superficie, el tamaño de partícula y la actividad superficial para determinar la actividad de un adsorbente potencial (2,12).

c. Intercambio iónico. Este método posee mayor selectividad que la cromatografía de par iónico, debido al mayor número de combinaciones de fases móviles y estacionarias que pueden usarse. Es un método útil para cationes inorgánicos, aminoácidos y grupos similares de compuestos relacionados.

Es una forma de cromatografía de adsorción. El intercambio iónico involucra la sustitución de una especie iónica por otra. La fase estacionaria consiste en una matriz rígida, la superficie de la cual tiene

una carga neta positiva para dar un sitio de intercambio de iones (R^+).

Si se utiliza una fase móvil que contiene aniones, el sitio de intercambio atraerá y retendrá un ión contrario negativo (Y^-). Muestras de aniones pueden entonces intercambiarse con los iones contrarios (X^-), el proceso puede ser representado en términos del equilibrio:



Debido a que el proceso involucra un intercambio de aniones se le conoce como intercambio de aniones. El proceso complementario, intercambio de cationes ocurre cuando la superficie tiene una carga neta negativa, para dar un sitio de intercambio (R^-). Los iones contrarios (Y^+) y los iones muestra (X^+) son ambos cationes y su intercambio puede representarse por:



Así la separación está basada en la fuerza de las interacciones entre los iones de la muestra y el sitio de intercambio. Los iones que interactúan sólo débilmente con el sitio de intercambio serán pobremente

retenidos, mientras que los iones que tengan interacciones fuertes serán fuertemente retenidos.

La presencia de iones complejantes puede tener un marcado efecto sobre el proceso. El intercambio de ligandos involucra la separación del ligando por virtud de su fuerza de complejación por un ión metálico adsorbido sobre la resina de intercambio, desplazando otra vez el ión contrario. Los intercambiadores iónicos pueden ser divididos en intercambiadores débiles o fuertes, aniónicos o catiónicos de acuerdo con la naturaleza de los grupos funcionales en la resina.

Los intercambiadores catiónicos fuertes contienen grupos ácidos sulfónicos ($-SO_3H$) para un intercambiador hipoácido, o grupos tetralquilamonio ($-NMe_2 \cdot CH_2Cl$) para un intercambiador tipo básico fuerte. Grupos funcionales ácido carboxílico ($-COOH$) y grupos aminas terciarias ($-CH_2 NMe_2 OH$) son usados para intercambiadores ácidos y básicos débiles respectivamente (12).

Los materiales de la fase estacionaria se llaman intercambiadores iónicos y comprenden un grupo de polímeros naturales o sintéticos, orgánicos o inorgánicos que son capaces de extraer iones de modo reversible de una solución mientras que al mismo tiempo los reemplaza con iones de carga equivalente.

Durante el proceso de intercambio debe obedecer el principio de electroneutralidad, tanto en el intercambiador como en la solución.

Las fases móviles que se usan en la cromatografía de intercambio iónico son generalmente soluciones salinas acuosas que pueden mantenerse a un pH deseado con una solución amortiguadora. La elección de la fase móvil depende de la selectividad de la fase estacionaria por los solutos y de la influencia de los equilibrios de la solución debidos al pH o a complejaciones. Los solventes mixtos acuosos-orgánicos o los solventes orgánicos pueden emplearse si la fase estacionaria no se altera. Para separaciones difíciles debe emplearse una elución por gradiente.

d. **Filtración sobre gel.** La Cromatografía de Filtración sobre Gel (CFG) también es conocida como cromatografía de exclusión, cromatografía de gel o como de penetración. Se utiliza para separar grupos de solutos basados en su tamaño efectivo en solución. Las fases estacionarias usadas son polímeros que han sido estructurados para dar una red abierta con numerosos poros de tamaño uniforme. Las moléculas más grandes eluyen primero, y las más pequeñas son retenidas por más

tiempo.

Las fases móviles utilizadas para esta forma de cromatografía son de dos tipos. El primero de ellos, los geles blandos, se hacen generalmente de hidratos de carbono entrecruzados tales como el dextrano (shepadex), agarosa (sepharosa), o poli(acrilamida) (biogel). Estos geles son muy hidrófilos y antes de que se empaque la columna deben de ser mezclados con la fase móvil hasta que se haya embebido suficiente líquido para que se hinche por completo. Una vez empacada la columna, no debe alterarse la composición de la fase móvil, puesto que esto ocasionaría un cambio en la cantidad de solvente embebido y por consiguiente el encogimiento del lecho cromatográfico. Debido a la baja fuerza estructural de los geles blandos no deben usarse condiciones de alta presión. Se han desarrollado medios hechos por gel de sílice con tamaño de poro controlados para CLAP, que no se deforman bajo presiones y pueden ser usados con fases móviles acuosas y no acuosas.

El segundo tipo de fase estacionaria son los geles rígidos o semirígidos, los cuales constan de materiales tales como poliestireno entrecruzado, perlas de vidrio de porosidad controlada y dextrano alquilado. Estos

pueden usarse para la separación de compuestos orgánico-solubles usando fases móviles no acuosas, tales como cloroformo, piridina, tetrahidrofurano.

La CFG separa sustancias de acuerdo a su tamaño molecular y forma. Las pequeñas moléculas que pueden entrar libremente a los poros de la fase estacionaria tienen un coeficiente de distribución $K=1$ y las grandes moléculas que son completamente excluidas de todos los poros tienen un coeficiente de distribución $K=0$, mientras que las moléculas de tamaño intermedio tendrán coeficientes de distribución entre cero y uno. Así las moléculas grandes se moverán más rápido que las moléculas pequeñas a través de la columna y serán eluidas primero. Las moléculas son entonces eluidas en orden de su tamaño molecular decreciente. Debido a que las moléculas del solvente son usualmente de tamaño mucho menor a las moléculas que se quieren separar por este método, son generalmente eluidas al final (a t_m). Contrario a otras formas de cromatografía la muestra es eluida antes que t_m .

El principal mecanismo de separación en CFG puede ser la exclusión estérica, la difusión puede tomar también alguna parte así como la adsorción sobre gel, pero en sistemas diseñados propiamente el efecto de esto

sería mínimo.

La CFG posee grandes ventajas en su aplicación. Debido a que toda la muestra es eluida en un tiempo relativamente corto (antes que t_m) no se requieren gradientes de elución. Los tiempos cortos de elución dan bandas de soluto delgadas las cuales son fáciles de detectar y no elevan los problemas del límite de detección frecuentemente encontrados en otras formas de cromatografía de líquidos donde las bandas de soluto pueden llegar a ser más difusas.

Debido a que las fuerzas intermoleculares están ausentes en el proceso de separación la muestra pierde la interacción química o es mínima y la columna no acumula moléculas retenidas fuertemente, esto resulta en una vida de la columna más larga que lo usual. La principal desventaja en CFG es la dificultad que presenta para separar compuestos con distribuciones de tamaño molecular similares.

La CFG se usa más a menudo para compuestos de alto peso molecular (mayor de 2000) incluyendo polímeros orgánicos (por ejemplo, poliolefinas, poliestireno, polivinilos y poliaminas) silicónes y biopolímeros (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, oligosacáridos, péptidos, azúcares y glicoles). La CFG también encuentra

gran aplicación en la caracterización de polímeros altos por la determinación de su distribución de pesos moleculares.

e. **Afinidad.** Esta técnica se emplea para obtener separaciones muy específicas, es una forma altamente especializada de cromatografía de adsorción. Esta técnica usa un ligando específico, el cual ha sido inmovilizado mediante la unión química a una matriz insoluble para poder adsorber reversiblemente una sola especie molecular contenida en una mezcla de solutos. Más que intentar separar esta mezcla de solutos para realizar análisis cualitativo o cuantitativo, sólo tiene que ver con la extracción de una especie única en la mezcla. Logra su mayor utilidad como una técnica altamente específica de purificación para moléculas biológicas (2, 12).

5. Instrumental. Puesto que la cromatografía de líquidos es una técnica analítica de gran precisión se requiere de un equipo de operación más elaborado que para cromatografía de líquidos clásica.

En la figura 3 se muestra un diagrama en el que se indica el instrumental básico con el que debe contar un

sistema de CLAP.

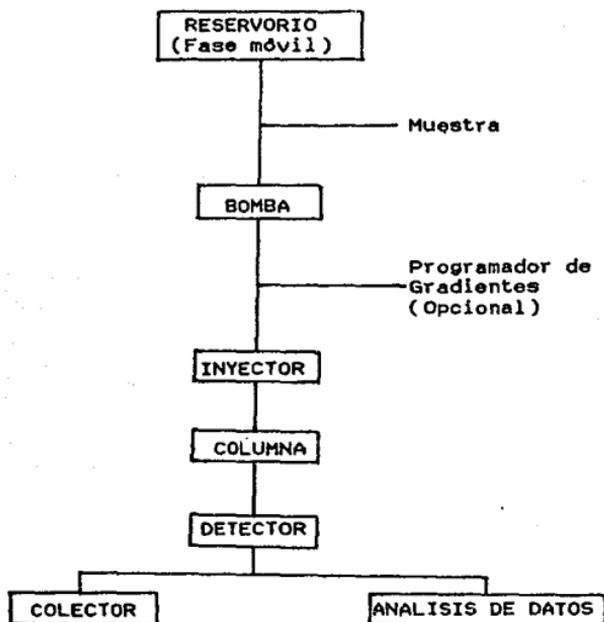


Figura 3. Representación esquemática del cromatógrafo de líquidos para CLAP.

a. **Reservorios.** Los reservorios de la fase móvil pueden ser de acero inoxidable o vidrio con capacidad hasta de 11. La fase a emplear puede ser

orgánica o inorgánica (soluciones acuosas de sales o buffers). Los constituyentes de esta mezcla deben tener una alta pureza (grado HPLC o CLAP) ya que pequeñas trazas de contaminantes interfieren en el estudio. Es importante que la fase móvil sea degasificada por ultrasonido o por vacío y agitación, además de ser filtrada por partículas extrañas que puedan obturar el sistema.

1) Características de la fase móvil. Puesto que la fase móvil es un factor fundamental para la separación de una muestra, es importante mencionar las características que debe cumplir para obtener resultados confiables.

- Debe tener un alto grado de pureza (HPLC o CLAP).
- Disolver la muestra.
- No reaccionar con la muestra.
- Debe tener una absorción mínima.
- No debe degradar la fase estacionaria ni disolverla.
- De baja viscosidad.
- Ser compatible con el tipo de detector utilizado.

- Polaridad adecuada para permitir la separación.
- Con un valor de K' de 1 a 10.

b. Bomba. Dado que las columnas que se emplean en CLAP tiene un tamaño de partícula muy pequeño, es necesario emplear un sistema de bombeo de solventes, para que el flujo de la fase móvil no se haga muy lento.

Las características más importantes con las cuales debe cumplir un sistema de bombeo son:

- Reproducibilidad.
- Velocidad de flujo.
- Características del flujo (continuo o pausado).
- Componentes resistentes a solventes.

En general los sistemas de bombeo se pueden dividir en dos grupos: de presión constante y de flujo constante (o desplazamiento continuo).

1. Bombas de presión constante. La forma más sencilla de una bomba de presión constante consiste en un tubo de acero inoxidable forma de espiral con fase móvil en su interior, el cual en un extremo se conecta a una columna y en el otro a una fuente de gas. Cuando el

suministro de gas se acciona, el gas desplaza a la fase móvil, forzándola por el sistema.

Existen otras bombas de presión constante en donde el pistón se encuentra entre el gas y la fase móvil. En general, las bombas de volumen constante tienen una cámara de fase móvil de volumen limitado. Por otra parte para una presión constante de la bomba, se pueden presentar variaciones en la velocidad de flujo debidas a cambios en la composición de la fase móvil, en la temperatura, viscosidad, resistencia generada por la columna (filtros obstruidos), entre otros factores.

2. Bombas de flujo constante. De acuerdo al tipo de cámara éstas se pueden subdividir en dos: de cámara reducida (tipo jeringa) y con cámara de volumen infinito (tipo recíproco).

Estas bombas actúan mediante el movimiento de un pistón o émbolo que es desplazado en forma continua por un motor de precisión, comprimiendo el líquido contenido en una cámara de cierto volumen, el líquido fluye a través de una abertura en la misma cámara obteniéndose un flujo de volumen constante, que puede variar con la velocidad de desplazamiento del émbolo.

Los tipos de bomba mencionados hasta el momento dan

flujos sin pulsaciones debido a su acción tipo jeringa. Por otra parte, las cámaras de volumen infinito o recíproco están diseñadas para trabajar con uno o más pistones (13).

c. **Programadores de gradientes.** Los programadores de gradiente pueden o no ser utilizados, dependiendo de las características de la muestra a separar. Cuando la muestra en estudio es muy compleja, la elución con gradiente o programación con gradientes puede ser ventajosa y en ocasiones esencial. Algunas de las ventajas de la elución con gradiente son los tiempos menores de análisis, mejor formación del pico, mejor limpieza de la columna y mejor reconocimiento de las condiciones isocráticas. Los aparatos programadores de gradientes se dividen en dos grandes grupos: baja presión y alta presión.

Los aparatos de baja presión constan normalmente de una bomba y el mezclado se realiza en la entrada de la misma. En general, válvulas de intercambio se usan para medir los diferentes porcentajes de las fases móviles que entran a la bomba con cada golpe.

Los sistemas de gradiente de alta presión son sistemas de bombas binarios o ternarios, donde cada

bomba impulsa una fase móvil diferente. A su vez cada bomba aporta una fracción de la velocidad lineal del flujo, dependiendo de la composición deseada.

Los sistemas de alta presión son más flexibles, más reproducibles y permiten un mayor rango en la composición y selección de la forma del gradiente. Con cualquier forma de gradiente que se use es necesario siempre asegurar una mezcla adecuada de los solventes. Esto lleva a usar algún tipo de cámara de mezclado (14).

d. Inyectores de la muestra. Los métodos principales por los que se introduce la muestra en una cámara de CLAP son dos: éstos pueden ser por medio de una válvula de inyección o por métodos de detención del flujo. Los métodos de detención del flujo requieren que se interrumpa el flujo de la fase móvil hacia la columna mientras se introduce la muestra a la columna. Luego se reinicia el flujo y el proceso de separación comienza. Generalmente el método más usado para la introducción de la muestra en la columna es por medio de una válvula de inyección.

El "loop" de la muestra se saca del flujo cambiando la válvula a la posición de carga. En esta posición el

flujo de la fase móvil pasa a través de la válvula directamente a la columna. Ahora es cuando se introduce la muestra al "loop" de la válvula con ayuda de una jeringa. Cuando se cambia la válvula con la muestra a la posición de inyección, la fase móvil viaja por el "loop" y lleva la muestra hacia la entrada de la columna (13).

Actualmente la inyección de la muestra puede hacerse en forma automática. Los inyectoros automáticos consisten principalmente, de una válvula de inyección automática, un sistema de llenado de la válvula y un control electrónico que sirve para controlar funciones tales como tiempos de inyección, tiempos de elución, velocidades de llenado, número de inyecciones por muestra, volumen de inyección, identificación de la muestra, lavado de válvula y jeringa, inicio de inyección para el registro así como la operación de programadores de gradientes o controladores de sistema.

Existen principalmente tres métodos por medio de los cuales los inyectoros automáticos llenan la válvula de inyección, estos métodos son: desplazamiento positivo, por succión y con jeringa.

Los inyectoros automáticos permiten una inyección sin atención, además de que eliminan algunos errores que se presentan en el análisis cuantitativo, ocasionado por

técnicas de inyección manual.

e. **Columna.** La columna es la parte esencial del sistema de CLAP, puesto que en ella se lleva a cabo la separación de los componentes de la mezcla de interés. Básicamente las columnas están hechas de un tubo largo de material inerte de diámetro pequeño capaz de resistir altas presiones. El acero inoxidable es el material más usado en su fabricación, y en algunos casos se ha usado vidrio de paredes gruesas, pero presenta el inconveniente de no permitir conexiones metal-vidrio a altas presiones.

Por otra parte se prefieren las columnas rectas a las de cualquier otra forma, sobre todo porque hay cierta pérdida de eficiencia cuando se doblan las columnas. Las columnas en forma de "8" son por lo general empleadas cuando se requiere control de temperatura.

Las dimensiones tradicionales de las columnas son: 10 a 30 cm de longitud y de 2 a 5 mm de diámetro interno, generalmente de acero inoxidable o vidrio. Recientemente se han introducido al mercado columnas de 10 cm de longitud de 5 a 10 mm de diámetro interno, con las cuales se obtiene menor caída de presión y tiempos

de análisis más cortos. Una característica importante de estas columnas es que están fabricadas de un material flexible (polietileno de alta densidad), lo que elimina o reduce el efecto de pared, y por estar empacadas por compresión radial se obtienen empaques más homogéneos. Además tienen en sus extremos un sistema de distribución de la muestra de acero inoxidable, lo que le permite el reparto homogéneo de la misma a todo lo ancho de la columna y por lo tanto se obtiene alta reproducibilidad en los resultados analíticos. A estas columnas se les ha dado el nombre de cartuchos de compresión radial (15).

f. **Detectores.** El fin de un detector de CLAP es el de monitorear la composición del líquido que eluye de una columna de cromatografía y por lo tanto hacer posible un registro de cómo la composición varía con el tiempo. El detector ideal sería aquel que satisficiera los siguientes requisitos: altamente sensible, estable, de lectura continua y de respuesta universal. En la actualidad no existe un detector ideal para CLAP y los que hay disponibles sólo son adecuados para ciertas aplicaciones en particular.

Antes de mencionar el funcionamiento de los detectores es necesario explicar algunos términos que se

usan para describir y comparar a los mismos. Estos términos son: el ruido, la deriva y la linealidad. El ruido se refiere a la inestabilidad de la línea basal y normalmente se mide en desviaciones porcentuales de una escala establecida, también se puede medir en unidades absolutas considerando las oscilaciones del registro de un pico a otro. Causas múltiples como impurezas en la fase móvil, tierras mal establecidas, solventes inmiscibles o fallas electrónicas entre otras, pueden ocasionar el ruido.

Por otro lado, la deriva se puede describir como el movimiento lento hacia arriba o hacia abajo de la línea basal en un periodo de tiempo considerable. Estos generalmente se miden en unidades de cambio por hora y generalmente se asocian con cambios de temperatura de la fase móvil. Finalmente, se dice que un detector es lineal, si la respuesta eléctrica producida por el mismo es directamente proporcional a la masa o concentración de los componentes que pasan por el detector.

La linealidad se expresa como una desviación porcentual y se define como un rango establecido de detección. El rango dinámico de linealidad es otro número sin unidades que proporciona información acerca del rango de masa en el cual el detector es lineal.

Los detectores pueden ser clasificados en dos grupos: Los detectores de propiedades generales, los cuales miden alguna propiedad física general del eluente de la columna, por ejemplo la constante dieléctrica o el índice de refracción. Estos pueden utilizarse para una amplia gama de sustancias casi con la misma sensibilidad por lo que se les llama detectores universales o no específicos.

El segundo grupo de detectores son aquellos que son selectivos en su respuesta. Estos son detectores de propiedades del soluto y funcionan midiendo una propiedad física o química del mismo soluto, como la absorción ultravioleta.

A continuación se dan las características más importantes de los detectores comúnmente utilizados en CLAP (14).

1) Detectores de absorción (UV/Vis). Estos detectores son los de más uso en CLAP y responden a aquellas sustancias que absorben luz visible o ultravioleta. La muestra no resulta alterada por el proceso de detección y el intervalo lineal es muy amplio.

A la salida de la columna el haz de luz es enfocado

a través de la celda de flujo hacia el sistema de foto-detección. Cuando los solutos que absorben luz se encuentran en la fase móvil, la intensidad de luz que llega a la fotocelda se reduce al ser absorbida por éstos, ocasionando un cambio en la señal eléctrica, la cual puede ser amplificada e introducida a un registro o sistema de datos.

Hay dos tipos de detectores de luz ultravioleta: el de longitud de onda variable y el de longitud de onda fija o fotómetro que utiliza filtros para fijar la longitud de onda a 250 nm.

El fotómetro de luz ultravioleta es relativamente insensible a cambios de flujo y temperatura, y siempre y cuando el disolvente no absorba en grado apreciable en la longitud de onda que opera el fotómetro, es muy fácil efectuar programaciones de fase móvil.

Los detectores de longitud de onda variable permiten una gran flexibilidad para optimizar la longitud de onda. Utilizan un monocromador para seleccionar la longitud de onda como en un espectrofotómetro. Algunos detectores de longitud de onda variable permiten obtener los espectros de absorción para seleccionar la longitud de onda óptima.

2) **Detectores de índice de refracción.** Este detector también es conocido como refractómetro diferencial. Mide la diferencia entre los índices de refracción del disolvente puro y de la solución de la muestra que sale de la columna. El detector de índice de refracción puede considerarse como universal, pero es poco utilizado en CLAP por las siguientes razones:

- Es menos sensible que los detectores de fluorescencia o ultravioleta.
- Es sensible a variaciones de temperatura, debido a que el índice de refracción cambia con la temperatura.
- Tendencia a romperse y sensible a la presión. También la celda de flujo del detector es muy frágil.
- No puede usarse normalmente para gradientes. Si la composición de la fase móvil cambia, el índice de refracción también cambia.

3) **Detectores de fluorescencia.** Estos detectores se basan en que cuando una molécula absorbe energía, los electrones ocupan un estado de energía excitado. Esta energía debe disiparse cuando la molécula

regresa a su estado normal o basal. Si la molécula cae instantáneamente a su nivel basal con la emisión de energía en forma de luz se dice que fluoresce. La luz emitida es generalmente de baja energía (mayor longitud de onda) que la radiación de excitación.

La cantidad de fluorescencia o eficiencia (F) se puede definir como la relación entre el número de fotones emitidos con el número de fotones absorbidos. De tal manera que la eficiencia F tiene un valor máximo de 1.

Las ventajas más grandes de la fluorescencia son la sensibilidad y la selectividad. Se trata de una técnica muy poderosa cuando se realizan análisis de sustancias que existen en muy pequeña cantidad (trazas).

En la actualidad, el detector más sensible de que se dispone es el de fluorescencia. Existen dos diseños básicos de éstos, los llamados fluorómetros de filtros, que emplean filtros para seleccionar la radiación de excitación y la de emisión, y los espectrofluorómetros que emplean monocromadores. Ambos equipos rinden buenos resultados.

g. Análisis cualitativo. La cromatografía de líquidos es una técnica de separación y no de

identificación, generalmente para la identificación de algún compuesto se requiere el uso de otras técnicas más certeras, ya que esta técnica puede efectuar una identificación comparando los tiempos de retención de la sustancias por identificar, con los tiempos de retención de sustancias patrones, pero esto no es suficiente para identificar sustancias desconocidas, para ello se requiere el uso de técnicas más acertadas como lo es la espectrometría de absorción de masas, infrarrojo, resonancia magnética nuclear, etc.

h. Análisis cuantitativo. CLAP es una técnica muy eficaz para realizar un análisis cuantitativo confiable y reproducible de la sustancia de interés.

Existen diversos métodos manuales para determinar el área, la altura y anchura de los picos obtenidos en los cromatogramas, pero los integradores electrónicos proporcionan resultados con una mayor precisión, además de que ahorran tiempo al analista.

También se emplean sistemas de computación, muchos de estos instrumentos son capaces de presentar directamente resultados y datos completos del análisis tales como, tiempos de retención, altura y ancho del pico, áreas, concentración, porcentaje de composición,

etc.

i. **Métodos cuantitativos de la composición.** Una vez que se ha comprobado que existe una respuesta lineal del pico para el analito deseado se puede usar un estándar interno o un estándar externo para su cuantificación (16).

1) **Estándar externo.** En el método de estándar externo se inyectan por separado el estándar y la muestra, haciendo una comparación de la respuesta del pico entre la muestra y el estándar. Cuando se usa este método se requiere un control preciso en el volumen de inyección las principales ventajas de este método son:

- a) Simplicidad en la preparación de las muestras.
- b) Evita la búsqueda de un estándar interno estable.
- c) Elimina los problemas ocasionados por el uso de un estándar interno y productos de degradación desconocidos.

El estándar externo debe tener una concentración similar o ligeramente mayor que la solución problema, esto puede asegurar que la respuesta del pico sea comparable, además de que elimina errores en la

medición.

Una vez que se obtiene la respuesta de la solución estándar y la muestra, la cantidad de analito contenido en la muestra se puede calcular como:

$$W_x \text{ mues} = \frac{R_x \text{ mues}}{R_x \text{ est.}} \times W_x \text{ est.} \times \frac{D \text{ mues}}{D \text{ est.}}$$

Donde:

W_x = Peso molecular del analito x

R_x = Respuesta del pico del analito

D_{mues} = Dilución de la muestra (ml)

$D_{\text{est.}}$ = Dilución del estándar (ml)

2) Estándar interno. El analito interno es una sustancia adicionada (en cantidad conocida) a la muestra que se desea analizar. Consiste en comprobar la relación obtenida entre las áreas del compuesto problema y del estándar interno. Se efectúa así la lectura de la composición de la muestra en la gráfica de calibración que se obtiene en las diversas concentraciones. El uso del estándar interno puede tener desventajas en el estudio de estabilidad, por ejemplo, el desarrollo de productos de degradación que co-eluyan con el estándar

interno.

El estándar interno debe ser similar al compuesto analizado, estar presente en concentraciones similares, tener un tiempo de retención cercano al compuesto problema, pero no interferir con él.

Este método tiene la ventaja de eliminar errores debidos al volumen de inyección y variaciones del equipo, puesto que el estándar interno y la muestra problema se analizan bajo las mismas condiciones de operación.

D. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

1. Definiciones.

La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio que la capacidad de un método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas (17, 18, 19, 20)

En la aplicación de los criterios de evaluación de un método analítico prevalecerá ante todo la experiencia y el criterio de la persona que lleva a cabo la validación.

a. **Linealidad:** La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un rango determinado.

b. **Rango:** El rango de un método analítico es el intervalo entre los niveles inferior y superior de la

sustancia (incluyendo estos niveles), el cual se ha demostrado que es preciso, exacto y lineal utilizando el método descrito.

c. **Exactitud:** La exactitud de un método analítico es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

Se expresa como el porciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

d. **Precisión:** La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestras de una mezcla homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o de coeficiente de variación.

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

1) **Repetibilidad:** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo

analista usando los mismos aparatos y técnicas.

2) Reproducibilidad: Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes, realizadas por diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios utilizando el mismo y/o diferente equipo.

e. Límite de detección: Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

f. Límite de cuantificación: Es la menor concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.

g. Especificidad: Es la medida del grado de interferencia (o ausencia de), en el análisis de mezclas complejas.

Es la habilidad de un método analítico para obtener

una respuesta debida unicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

h. Tolerancia: La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, sistemas de elución, tipos de empaque, condiciones ambientales, etc.

i. Estabilidad de la muestra analítica: Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

2. Parámetros mínimos para validar métodos analíticos

PARAMETRO	METODO					
	I	II		III	IV	
		A	B		C	D
LINEALIDAD Y PRECISION DEL SISTEMA	*	*	*	*	*	*
LIMITE DE DETECCION		*		*		
LIMITE DE CUANTIFICAC.		*		*		
EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%	*	*	*	*	*	*
LINEALIDAD DEL METODO	*	*	*	*	*	*
PRECISION DEL METODO	*	*	*	*		*
ESPECIFICIDAD (C.CALIDAD)	*	*	*	*	*	*
ESPECIFICIDAD ESTABILIDAD		*	*			
TOLERANCIA DEL SISTEMA		*	*	*		*
ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	*	*	*	*		

TABLA II. Parámetros mínimos para validar métodos analíticos (17,19).

Donde:

I: Control de calidad

II: Indicadores de estabilidad

III: Biodisponibilidad

IV: Revalidación del método

A: Bajas concentraciones

B: Altas concentraciones

C: Sin cambio en condiciones de operación

D: Con cambio en condiciones de operación

3. Diseño experimental para cada uno de los parámetros a validar

a. **Linealidad del sistema.** La linealidad del sistema se determina construyendo una curva de calibración (concentración Vs. respuesta medida) de una misma solución estándar utilizando cuando menos cinco niveles de concentración y haciendo análisis por triplicado para cada uno de los niveles establecidos; el nivel central debe corresponder al 100% de la concentración esperada.

Con los resultados obtenidos se deberá elaborar una curva y calcular los siguientes parámetros:

Media (\bar{X}) desviación estándar (DE), coeficiente de

variación (CV), coeficiente de correlación lineal (r) y error estándar de correlación (r^2).

1) Criterio

CV \leq 1.5%

$r \geq$ 0.99%

$r^2 \geq$ 0.98%

NOTA: Para métodos microbiológicos $r \geq$ 0.98%

b. **Precisión del sistema.** Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema.

Con los datos obtenidos calcular media, desviación estándar y coeficiente de variación.

1) Criterio:

CV \leq 1.5%

Nota: Para métodos microbiológicos CV \leq 3%

c. **Linealidad del método.** Se determina con placebos adicionados al principio activo (placebos

cargados), cada uno de manera independiente, se realiza con cinco niveles de concentración haciendo análisis por triplicado para cada uno de los niveles establecidos.

Las concentraciones de los placebos cargados deben ser las adecuadas para que utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema, incluyendo siempre el nivel central correspondiente al 100%.

La amplitud del estudio dependerá del uso y aplicaciones del método (control de calidad y/o indicativo de estabilidad, etc.) y deberá llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

Con los datos obtenidos calcular:

Media, desviación estándar, coeficiente de variación, pendiente (m), ordenada al origen (b), coeficiente de correlación lineal, error experimental de regresión y sensibilidad. También construir la curva (cantidad adicionada Vs cantidad recuperada) y calcular la ecuación de la recta que indique un modelo lineal.

1) Criterio

$$B = 0.0$$

$$m = 1.0$$

$$r \gg 0.99\%$$

$$r^2 \gg 0.98\%$$

El coeficiente de variación y el porciento recuperado depende del tipo de método, forma farmacéutica y concentración del activo en la muestra, como se observa en la tabla III.

METODO	PROMEDIO DE RECOBRO	CV
Cromatográficos	98 - 102%	$\ll 2\%$
Tritrimétricos	98 - 102%	$\ll 2\%$
Químicos y Espectrofotométricos	97 - 103%	$\ll 3\%$
Microbiológicos	95 - 105%	$\ll 5\%$

TABLA III. Valores de CV y por ciento de recobro a considerar para la linealidad del método (17,18).

Notas: - En métodos de cuantificación de fármacos en fluidos biológicos, la amplitud del estudio dependerá de las cantidades mínima y máxima esperadas.

- Para suspensiones y semisólidos se acepta una ampliación del 1%.

d. **Exactitud del método.** Se debe cuando menos analizar seis placebos adicionados con el 100% del principio activo, de manera independiente, por el mismo analista y en las mismas condiciones de operación.

Otro diseño experimental es por medio de la determinación de placebos cargados, evaluando cinco niveles, esto se puede evaluar directamente de los resultados de la linealidad del método cuando se hace un análisis por quintuplicado para cada nivel.

Con los resultados obtenidos calcular:

Media, desviación estándar, coeficiente de variación e intervalo de confianza (IC).

1) Criterio

El IC para la media debe incluir el 100%.

El porcentaje recuperado y el CV deberán cumplir con los criterios establecidos en la linealidad del método (tab. III).

e. **Precisión del método (reproducibilidad).** Este estudio se debe llevar a cabo cuando menos por dos analistas los cuales deben realizar en un día el análisis por triplicado al 100% de la concentración y en otro día repetir el análisis de la muestra por

triplicado. Se deberá trabajar de manera independiente partiendo de una mezcla homogénea del producto cercano al 100% de la concentración teórica.

La evaluación de la reproducibilidad se hace con respecto a una tabla de análisis de varianza (ANADEVA), la cual nos indica la fuente de variación que influye en la obtención de los resultados.

1) Criterio

El coeficiente de variación total debe cumplir con los fines para los cuales el método será utilizado. Los valores para CV se muestran en la tabla IV.

METODO	C V
Cromatográficos	≤ 2 %
Químicos y Espectrofotométricos	≤ 3 %
Trítrimétricos	≤ 3 %
Microbiológicos	≤ 5 %

TABLA IV. Valores de CV para evaluar la precisión del método (12, 18).

Criterio para F calculada (Fcal)

El modelo para el análisis de varianza es:

$$Y_{klj} = M + A_k + B_l + (AB)_{kl} + E_j(kl)$$

El criterio de aceptación se muestra en la tabla V.

F.V	g.l	SC	M.C	Fcal	Fteórica
A _k	a-1	SCA	SCA/g _{1A}	CMA/CME	F de tablas para $\alpha=0.05$
B _{kl}	b-1	SCB	SCB/g _{1B}	CMB/CME	g.l = 1, 8
AB _{kl}	ab-a-b+1	SCAB	SCAB/g _{1AB}	CMAB/CME	
E _{j(kl)}	abr-ab	SCE	SCE/g _{1E}		

TABLA V. Tabla de análisis de varianza

Este es el modelo para un análisis de varianza con dos variables (analista y día), empleando un sistema completamente al azar con factores independientes o cruzados.

f. **Especificidad.** El parámetro de especificidad se realiza dependiendo del tipo de método (control de calidad o indicativo de estabilidad).

1) **Métodos de control de calidad.** Con el método propuesto:

- Analizar placebos del producto.

- Identificar la respuesta del(los) activo(s), excipientes en caso de tenerla, y de otras sustancias auxiliares

- Confirmar que el método desarrollado sea capaz de separar la sustancia de interés de cualquier interferencia presente.

2) **Métodos indicativos de estabilidad.** Se sugieren los siguientes métodos para degradar la sustancia. El analista que realice el estudio deberá escoger aquel que de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas del compuesto sea el más adecuado u otro si así lo considera pertinente.

- Colocar la sustancia de interés, el placebo y muestras del lote del producto en un horno a 70°C, 120°C o a 20°C menos que el punto de fusión de la sustancia de interés durante un apropiado número de días (2 a 4 semanas).

- Exponer la sustancia de interés, el placebo y muestras del lote del producto a la luz UV o a la luz fluorescente y/o humedad.

- Si es necesario hacer soluciones de la sustancia de interés ajustando el pH a 1-2 y/o a 10-12 y colocarlas a 60°C-80°C durante 2-4 semanas.

- Si se trata de formas farmacéuticas líquidas o semisólidas pueden degradarse por oxidación (con peróxido de hidrógeno) y permanecer de 2-4 semanas a temperatura ambiente y/o por hidrólisis (pH 1-2 y 10-12), colocando las muestras a 60°C-80°C durante 2-4 semanas (18, 21).

- Checar la aparición de sustancias relacionadas (productos de degradación) utilizando cuando menos cualquiera de las técnicas cromatográficas siguientes: Cromatografía de líquidos de alta presión, cromatografía de gases y/o cromatografía en capa fina.

Notas:* Se sugiere que la degradación sea tal que la concentración de la sustancia en estudio sea disminuida de 10 a 25% con respecto a la original.

* Cuando el pH de las muestras es cambiado, éste debe ser ajustado siempre al pH normal de la muestra antes del análisis o al menos que se demuestre que el análisis no es dependiente del pH.

3)Criterio

-Verificar que los productos de degradación puedan ser separados de la sustancia de interés utilizando el método desarrollado (interferencia no mayor del 2%).

-Ajustar las condiciones de operación para obtener la máxima resolución.

-De no ser así optimizar el método o desarrollarse otro.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

9. Estabilidad de la muestra analítica. Se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de tres muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer en un tiempo determinado en diferentes condiciones.

Almacenar las muestras analizadas bajo diferentes condiciones (temperatura ambiente, refrigeración, luz, etc.) durante un tiempo preestablecido por el analista, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia. Reanalizarlas bajo las mismas condiciones de operación utilizando una solución de referencia recientemente preparada, para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido para cada método analítico. La determinación debe ser efectuada por un mismo analista.

1) Criterio

La muestra es estable si el intervalo de confianza para la diferencia de la media con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o la

magnitud del efecto no excede los porcentajes establecidos en la tabla VI.

METODO	PORCENTAJE
Cromatográficos	$\pm 2 \%$
Tritrimétricos Químicos y Espectrofotométricos	$\pm 2 \%$
	$\pm 3 \%$
Microbiológicos	$\pm 5 \%$

TABLA VI. Valores del coeficiente de variación para evaluar la estabilidad de la muestra analítica (17).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tanto la cianocobalamina (vitamina B12) como la hidroxocobalamina (vitamina B12a) pertenecen a las cobalaminas, un grupo de principios activos ampliamente encontrados en la naturaleza. Las diferentes cobalaminas muestran relativamente una estructura básica uniforme y difieren sólo por ligeras modificaciones en la molécula.

Los espectros de absorción de todas las cobalaminas son muy similares con respecto a la posición de los máximos. En apariencia todas son rojo oscuro, el máximo de la hidroxocobalamina es de 351 nm. éste difiere del máximo de cianocobalamina (361 nm.) por 10 nm. (5).

Debido a estas características y a sus propiedades de solubilidad entre otras, resulta difícil separar y cuantificar ambas vitaminas por métodos sencillos.

A veces la necesidad de reformular formas farmacéuticas para mejorar su calidad, es necesario desarrollar métodos analíticos alternativos, que sean más confiables y ahorren tiempo a la industria.

Actualmente la cianocobalamina e hidroxocobalamina contenidas en una solución inyectable en reformulación se cuantifican por Cromatografía de Líquidos en Columna, lo cual requiere de un tiempo largo de análisis, por lo

que la Cromatografía de Líquidos de Alta Presión es una alternativa para separar ambas vitaminas en el menor tiempo posible y con gran confiabilidad en los resultados; la validación de este método nos permitirá comprobar si cumple con los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

III. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de cianocobalamina e hidroxocobalamina en solución inyectable.

B. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Diseñar un método analítico para control de calidad por Cromatografía de Líquidos de Alta Presión para cuantificar cianocobalamina e hidroxocobalamina en una solución inyectable.

2. Validar el método desarrollado mediante los siguientes parámetros:

- a) Especificidad.
- b) Linealidad.
- c) Exactitud.
- d) Repetibilidad.
- e) Reproducibilidad.
- f) Estabilidad de la muestra analítica.

V. METODOLOGIA

A. METODO GENERAL

1. Material

-Matraz volumétrico	50 ml	Blau Brand y Pyrex
-Matraz volumétrico	25 ml	Blau Brand y Pyrex
-Matraz Erlenmeyer	50 ml	Pyrex
-Matraz Erlenmeyer	500 ml	Pyrex
-Pipeta volumétrica	1 ml	Pyrex
-Pipeta graduada	10 ml	Pyrex
-Vasos de precipitados	100 ml	Pyrex
-Vasos de precipitados	1000 ml	Pyrex
-Probeta graduada	100 ml	Pyrex
-Probeta graduada	250 ml	Pyrex
-Microjeringa	25 mcl	Hamilton
-Jeringa hipodérmica	10 ml	Kloehn
-Navecilla s para pesar		
-Filtros Milex		
-Espátulas		

2. Equipo

-Balanza analítica	Mettler AM180
-Parrilla de agitación y calentamiento	Lindberg
-Equipo de clarificación de solventes	Millipore
-Cromatógrafo de líquidos	Millipore (waters)
-Bomba	Millipore (Waters 510)
-Inyector	Millipore (Waters)
-Columna Novapak C18 3.9x150 mm	Millipore (Waters)
-Detector	Millipore Lamda Max481
-Módulo de interface	Millipore
-Fuente de poder	Topaz micro UPS
-Computadora (P.C)	Nec
-Impresora	Nec

3. Reactivos y solventes

-Vitamina B12 (cianocobalamina) Estándar de referencia.	
-Vitamina B12 (cianocobalamina) Materia prima.	
-Hidroxocobalamina Estándar de referencia.	
-Hidroxocobalamina Materia prima.	
-Acido clorhídrico G.R.	Baker
-Hidróxido de sodio G.R.	Baker
-Peróxido de hidrógeno G.R.	Baker

-Reactivo pic B6

Waters

-Metanol HPLC

Baxter

-Agua HPLC

-Placebo

-Placebo cargado

4. Método

VALORACION DE CIANOCOBALAMINA E HIDROXOCOBALAMINA ACETATO POR CLAP

NOTA:

Proteger de la luz la solución estándar de cianocobalamina e hidroxocobalamina acetato y la solución problema.

a. **Fase móvil:** Preparar una mezcla de metanol:agua grado CLAP (25:75), adicionar reactivo Pic B6, mezclar y degasificar.

b. **Condiciones cromatográficas:**

Columna: Novapack C18 de 3.9 mm de diámetro por 15 cm de longitud.

Detector: 280 nm.

Flujo: 1 ml/min.

Volumen de inyección: 20 µl.

c. **Solución estándar de cianocobalamina e hidroxocobalamina acetato:** Transferir alrededor de 25 mg. de cianocobalamina estándar de referencia y 26.1 mg.

de hidroxocobalamina acetato estándar de referencia a un matraz aforado de 50 ml., agregar aproximadamente 25 ml. de agua y agitar hasta disolver, diluir y aforar con agua. Transferir 1 ml. a un matraz aforado de 25 ml, diluir y aforar con fase móvil. Filtrar a través de filtro millex o equivalente.

d. Solución problema: Transferir 1 ml de solución inyectable de cianocobalamina e hidroxocobalamina acetato a un matraz aforado de 25 ml diluir y aforar con fase móvil. Filtrar a través de filtro millex o equivalente.

e. Procedimiento: Inyectar en el cromatógrafo de líquidos seis veces la solución estándar y calcular el coeficiente de variación de la respuesta obtenida para uno de los picos, si el coeficiente de variación es menor de 1.5%, inyectar la solución problema por duplicado, en caso contrario, dejar equilibrar el sistema 15 minutos más y repetir las seis inyecciones de la solución estándar y el cálculo del coeficiente de variación. Si se cumple el criterio para el coeficiente de variación inyectar la solución problema.

8. EVALUACION DEL SISTEMA

1. **Linealidad del sistema:** Para evaluar este parámetro se preparó por separado una solución patrón de cianocobalamina a una concentración de 6.250 mg/ml y una solución de hidroxocobalamina acetato a una concentración de 6.525 mg/ml.

De estas soluciones se realizaron diluciones para obtener cinco niveles de concentración de cada una, los cuales van del 50 al 150%.

a. **Procedimiento:** En matraces volumétricos de 50 ml. se adicionaron las siguientes alícuotas: 2, 3, 4, y 5 ml y en un matraz volumétrico de 25 ml se adicionó también una alícuota de 3ml de las soluciones preparadas, posteriormente se diluyeron hasta el aforo con agua destilada. De cada una de estas soluciones se tomó una alícuota de 1 ml, se adicionó por separado en un matraz volumétrico de 25 ml. y se aforó al volumen con fase móvil para obtener los niveles de concentración del 50, 75, 100, 125 y 150% respectivamente, se filtró y se inyectaron 20 mcl al cromatógrafo de líquidos con ayuda de la microjeringa.

Nota: - Las alícuotas se toman con pipetas volumétricas.
- Todas las soluciones se efectúan al abrigo de la luz.

2. **Precisión del sistema:** Para evaluar este parámetro se prepararon seis muestras de cianocobalamina y seis muestras de hidroxocobalamina acetato de la misma forma que se hizo para el nivel del 100% de la linealidad del sistema.

C. **EVALUACION DEL METODO ANALITICO**

1. **Linealidad del método:** Para la determinación de este parámetro se prepararon por triplicado cinco niveles de concentración (del 50 al 150%) de placebo cargado con el principio activo a determinar (cianocobalamina o hidroxocobalamina acetato).

a. **Procedimiento:** Para evaluar la linealidad del método en cada uno de los principios activos, se prepararon por separado las soluciones patrón de cianocobalamina e hidroxocobalamina a la misma concentración que en la linealidad del sistema.

Por otra parte se prepararon 50 ml. de placebo al

100% para cada principio activo (el placebo para cianocobalamina incluye hidroxocobalamina al 100% y viceversa).

En matraces volumétricos de 50 ml. se adicionaron las siguientes alícuotas: 2, 3, 4 y 5 ml y en un matraz de 25 ml se adicionó una alícuota de 3 ml de la solución patrón. posteriormente se aforó al volumen con agua y se adicionó 1 ml de cada solución a matraces volumétricos de 25 ml, adicionando a cada uno 1 ml de placebo para después aforar con fase móvil obteniendo los niveles de concentración de 50, 75, 100, 125 y 150% respectivamente.

Por último, estas soluciones fueron filtradas y se inyectaron 20 µl al cromatógrafo de líquidos con ayuda de la microjeringa.

Nota: -Todas las soluciones se efectuaron al abrigo de la luz.

-Las alícuotas son tomadas con pipetas volumétricas.

2. Exactitud del método: Para evaluar la exactitud al 100% de cada uno de los principios activos, se prepararon placebos cargados a un solo nivel de

concentración por sextuplicado.

Las seis muestras se prepararon como se hizo en el 100% de la linealidad del método.

3. Precisión (reproducibilidad): Para determinar la reproducibilidad, el método se desarrolló por dos analistas en dos días diferentes de la siguiente manera:

a. En el primer día cada analista prepara tres muestras de la solución inyectable de cianocobalamina e hidroxocobalamina acetato como producto terminado y las analiza con el método propuesto.

b. En el segundo día se preparan otras tres muestras de la solución inyectable y se analizan con el método propuesto.

4. Estabilidad de la muestra analítica: Para determinar la estabilidad de la muestra se prepararon seis placebos cargados al 100%, estas muestras se prepararon de la misma manera que para exactitud.

Una vez que fueron analizadas las muestras, se registraron los resultados y fueron almacenadas a temperatura ambiente y refrigeración para ser reanalizadas después de 24 y 72 horas. (las muestras fueron preparadas y almacenadas al abrigo de la luz).

5. **Especificidad:** Para determinar la especificidad del método para cianocobalamina e hidroxocobalamina acetato se compararon resultados de muestras al 100% de placebo, estándar y placebo cargado.

VI. RESULTADOS

A. LINEALIDAD DEL SISTEMA

1. Cianocobalamina

Cantidad adicionada mcg/ml	Respuesta ABC
10.00	103351.08
10.00	105058.08
10.00	103770.76
15.00	155467.88
15.00	158022.88
15.00	157436.87
20.00	208967.83
20.00	210878.01
20.00	211900.92
25.00	263309.00
25.00	263106.76
25.00	261092.69
30.00	313933.36
30.00	318892.59
30.00	314845.15

TABLA VII. Resultados de linealidad del sistema para cianocobalamina.

$$r = 0.9998$$

$$r^2$$

$$r = 0.9996$$

$$DE = 8.8914 \times 10^{-7}$$

$$cv = 0.15 \%$$

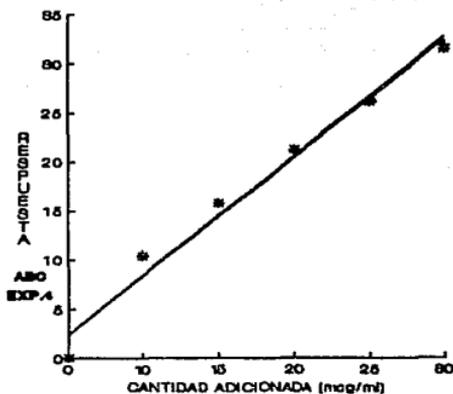


Figura 4. Gráfica de linealidad del sistema para cianocobalamina.

a. Criterio:

$r > 0.99$, $r^2 > 0.98$ y $CV < 1.5\%$, por lo tanto se cumple con los requisitos para la linealidad del sistema, es decir, existe una relación lineal entre la

cantidad de fármaco adicionada y la respuesta obtenida.

2. Hidroxocobalamina

Cantidad adicionada mcg/ml	Respuesta ABC
10.44	125034.51
10.44	127448.46
10.44	125268.36
15.66	189674.60
15.66	186452.98
15.66	189504.22
20.88	250938.72
20.88	252185.60
20.88	252830.66
26.10	314981.67
26.10	315991.87
26.10	312061.47
31.32	375248.70
31.32	380551.96
31.32	377253.93

TABLA VIII. Resultados de linealidad del sistema para hidroxocobalamina.

$$r = 0.9997$$

$$r^2 = 0.9996$$

$$DE = 5.4920 \times 10^{-7}$$

$$CV = 0.51 \%$$

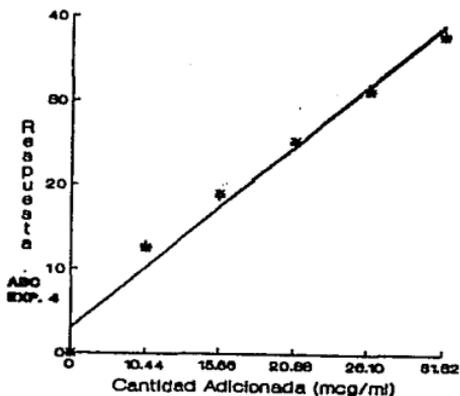


Figura 5. Gráfica de linealidad del sistema para hidroxocobalamina.

a. Criterio:

$r > 0.99$, $r^2 > 0.98$ y $CV < 1.5\%$, por lo tanto se cumple con los requisitos para la linealidad del sistema.

B. PRECISION DEL SISTEMA

1. Cianocobalamina

Cantidad adicionada mcg/ml	Respuesta ABC
20.00	208467.83
20.00	210878.01
20.00	211900.92
20.00	208855.50
20.00	213745.64
20.00	212561.40

TABLA IX. Resultados de precisión del sistema para la cianocobalamina.

$$\bar{Y} = 211151.55 \quad 11$$
$$SY = 2.6759 \times 10$$
$$CV = 0.9327 \%$$

a. Criterio

Puesto que $CV < 1.5\%$, el sistema se considera preciso.

2. Hidroxocobalamina

Cantidad adicionada mcg/ml	Respuesta ABC
20.88	250938.72
20.88	252185.60
20.88	252830.66
20.88	249849.28
20.88	255884.51
20.88	254280.02

TABLA X. Resultados de precisión del sistema para hidroxocobalamina.

$$\bar{Y} = 252661.465$$

$$SY = 38305 \times 10^{11}$$

$$CV = 0.86 \%$$

a. Criterio

Puesto que $CV < 1.5\%$, el sistema se considera preciso.

C. LINEALIDAD DEL METODO

1. Cianocobalamina

Cantidad adicionada mcg/ml	Cantidad recuperada mcg/ml
10.00	10.45
10.00	9.98
10.00	10.01
15.00	15.02
15.00	15.15
15.00	15.26
20.00	20.13
20.00	20.13
20.00	20.11
25.00	25.39
25.00	25.17
25.00	25.45
30.00	30.21
30.00	30.18
30.00	30.46

TABLA XI. Resultados de linealidad del método para cianocobalamina.

ECUACION DE LA RECTA

$$Y = 1.0093X + 0.02$$

$$b = 0.02$$

$$m = 1.0093$$

$$r = 0.9998$$

$$r^2 = 0.9996$$

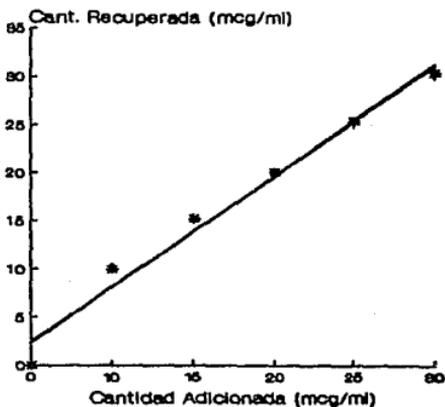


Figura 6. Gráfica de linealidad del método para cianocobalamina.

a. Evaluación de la ordenada.

Hipótesis planteada

$$H_0 : b = 0$$

$$H_a : b \neq 0$$

$$S_{y/x} = 0.1425$$

$$S(X_i - \bar{X})^2 = 750$$

$$t_{\text{calc}} = 0.1811$$

$$t_{\text{tab}} = 2.16$$

$$IC (-0.2344 < b < 0.2774)$$

1) Criterio

$$t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$$

$$0.1811 < 2.16$$

Por lo tanto se acepta la hipótesis nula y se considera que el método posee una ordenada al origen igual a cero.

b. Evaluación de la pendiente.

Hipótesis planteada

$$H_0: m = 1$$

$$H_a: m \neq 1$$

$$S_{y/x} = 0.1530$$

$$S_x = 7.071$$

$$t_{\text{calc}} = 1.60$$

$$t_{\text{tab.}} = 2.16$$

1) Criterio:

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

$$1.60 < 2.16$$

Por lo tanto se acepta la hipótesis y se considera que el método posee una pendiente igual a "uno".

2. Hidroxocobalamina

Cantidad adicionada mcg/ml	Cantidad recuperada mcg/ml
10.44	10.44
10.44	10.53
10.44	10.44
15.66	15.71
15.66	15.71
15.66	15.85
20.88	20.81
20.88	20.85
20.88	20.92
26.10	25.93
26.10	26.26
26.10	26.07
31.32	31.67
31.32	31.13
31.32	31.56

TABLA XII. Resultados de linealidad del método para hidroxocobalamina.

ECUACION DE LA RECTA:

$$Y = 1,0031X - 0,033$$

$$b = -0,033$$

$$m = 1,0031$$

$$r = 0,9998$$

$$r^2 = 0,9996$$

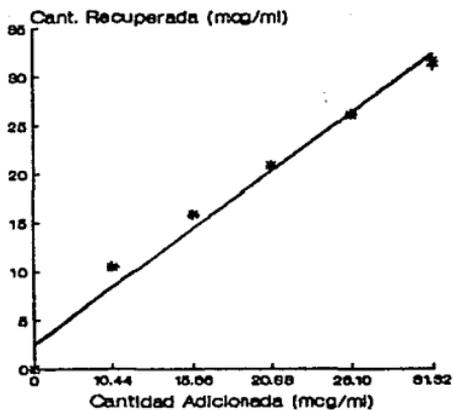


Figura 7. Gráfica de linealidad del método para hidroxocobalamina.

a. Evaluación de la ordenada.

Hipótesis planteada:

$$H_0: m = 1$$

$$H_a: m \neq 1$$

$$S_{x/y} = 0.1338$$

$$S(X_i - \bar{X})^2 = 817.462$$

$$t_{\text{calc}} = 0.32$$

$$t_{\text{tab.}} = 2.16$$

1) Criterio:

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

$$0.32 < 2.16$$

Por lo tanto se considera que el método posee una ordenada al origen igual a "cero".

b. Evaluación de la pendiente.

Hipótesis planteada:

$$H_0: m = 1$$

$$H_a: m \neq 1$$

$$S_{y/x} = 0.1438$$

$$S_x = 7.382$$

$$t_{\text{calc}} = 0.5954$$

$$t_{\text{tab.}} = 2.16$$

1) Criterio:

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

$$0.5954 < 2.16$$

Por lo tanto se considera que el método posee una pendiente igual a "uno".

D. EXACTITUD AL 100 %

1. Cianocobalamina.

X % Adicionado	Y % Recuperado
100.00	100.12
100.00	100.36
100.00	100.18
100.00	99.40
100.00	99.90
100.00	100.89

TABLA XIII. Resultados de exactitud del método al 100% para cianocobalamina.

a. Con el coeficiente de variación CV

$$C V = 0.4928\%$$

b. Con el estadígrafo de contraste t de student.

$$t \text{ calc} = 0.7028$$

$$t \text{ tab.} = 2.571$$

1) Criterio:

a. $CV < 1.5 \%$

b. $t_{calc} < t_{tab.}$

$0.7028 < 2.571$

Por lo tanto el método es exacto.

2. Hidroxocobalamina

X % Adicionado	Y % Recuperado
100.00	101.07
100.00	100.91
100.00	100.52
100.00	99.32
100.00	99.88
100.00	99.81

TABLA XIV. Resultados de exactitud del método al 100% para hidroxocobalamina.

a. Con el coeficiente de variación CV:

$$C V = 0.6875 \%$$

b. Con el estadígrafo de contraste t de student:

$$t \text{ calc} = 0.9795$$

$$t \text{ tab.} = 2.571$$

1) Criterio:

$$a. \quad C V < 1.5 \%$$

$$b. \quad t \text{ calc} < t \text{ tab.}$$

$$0.9795 < 2.571$$

Por lo tanto el método es exacto.

E. REPRODUCIBILIDAD.

1. Cianocobalamina.

Modelo estadístico:

$$Y_{klj} = \mu + A_k + B_l + (AB)_{kl} + E_j(kl)$$

Hipótesis planteada:

Analista
 $H_0: \mu = \mu$
 $H_a: \mu \neq \mu$

Día
 $H_0: \mu = \mu$
 $H_a: \mu \neq \mu$

		ANALISTA	
		1	2
D I A	1	99.48	100.25
		99.16	99.79
		100.44	97.62
	2	101.72	101.20
		101.27	97.16
		101.12	100.96

TABLA XV. Resultados de reproducibilidad del método para cianocobalamina.

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA

FV	gl	SC	MC	Fcal	Ftab
A	1	3.2760	3.2760	1.7286	5.32
B	1	3.6631	3.6631	1.9328	5.32
AB	1	7.9195	7.9195	4.1788	5.32
E	8	15.1613	1.8951		

TABLA XVI. Analisis de varianza para la reproducibilidad del método de cianocobalamina.

a. Criterio:

1) Analista.

$$F_a < F_{tab}$$

$$1.7286 < 5.32$$

$$\text{con g.l} = 1, 8 \text{ y } \alpha = 0.05$$

Por lo tanto no existe una diferencia significativa entre los analistas.

2) Día.

$$F_d < F_{tab}$$

$$1.9328 < 5.32$$

$$\text{con g.l} = 1, 8 \quad \text{y} \quad \alpha = 0.05$$

Por lo tanto no existe una diferencia significativa entre los días de análisis.

3) Interacción analista-día.

$$F_{ad} < F_{tab}$$

$$4.1787 < 5.32$$

$$\text{con g.l} = 1, 8 \quad \text{y} \quad \alpha = 0.05$$

Por lo tanto no existe diferencia significativa por la interacción día-analista.

Por los resultados obtenidos se considera que el método es reproducible.

2. Hidroxicobalamina.

Modelo estadístico:

$$Y_{klj} = \mu + A_k + B_l + (AB)_{kl} + E_{j(kl)}$$

Hipótesis planteada

Analista

H₀: $\mu = \mu$

H_a: $\mu \neq \mu$

Día

H₀: $\mu = \mu$

H_a: $\mu \neq \mu$

		ANALISTA	
		1	2
D I A	1	101.81	102.31
		102.99	105.58
		100.96	102.05
	2	100.94	101.47
		101.99	102.00
		102.34	102.08

TABLA XVII. Resultados de reproducibilidad del método para Hidroxocobalamina.

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA

FV	gl	SC	MC	Fcal	Ftab
A	1	1.6950	1.6950	0.6368	5.32
B	1	12.5103	12.5103	4.7005	5.32
AB	1	4.9393	4.9393	1.8558	5.32
E	8	21.2917	2.6614		

TABLA XVIII. Análisis de varianza para la reproducibilidad del método de hidroxocobalamina.

a. Criterio:

1) Analista.

$F_a < F_{tab}$

$1.6950 < 5.32$

con g.l = 1, 8 y $\alpha = 0.05$

Por lo tanto no existe diferencia significativa entre analistas.

2) Día.

$$F_d < F_{tab}$$

$$4.7005 < 5.32$$

$$\text{con g.l} = 1, 8 \quad \text{y} \quad \alpha = 0.05$$

Por lo tanto no existe diferencia significativa entre los días de análisis.

3) Interacción analista-día.

$$F_{ad} < F_{tab}$$

$$1.8558 < 5.32$$

$$\text{con g.l} = 1, 8 \quad \text{y} \quad \alpha = .05$$

Por lo tanto no existe diferencia significativa por la interacción día-analista.

Por los resultados obtenidos se considera que el método es reproducible.

F. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA.

1. Cianocobalamina.

CONDICION - TIEMPO

Inicial	T.A/24hrs	T.A/72hrs	Ref/24hrs	Ref/72hrs
100.81	100.93	98.40	100.91	98.70
100.32	100.55	97.30	100.13	98.60
100.38	99.29	97.22	100.00	98.25

TABLA XIX. Resultados de la estabilidad de la muestra analítica para cianocobalamina a temperatura ambiente y refrigeración por 24 y 72 horas.

a. Intervalo de confianza para cada condición por tiempo.

Condición/Tiempo	I C
T.A/24 hrs	de -1.46 a 0.96
T.A/72 hrs	de -4.39 a -1/32
Ref/24 hrs	de -1.30 a 0.98
Ref/72 hrs	de -4.26 a -1.51

TABLA XX. Intervalo de confianza para cianocobalamina por cada condición/ tiempo.

1) Criterio:

- Las muestras son estables a temperatura ambiente y refrigeración por 24 horas, ya que el intervalo de confianza incluye el valor "cero".

- La muestras no es estable a temperatura ambiente ni refrigeración por 72 horas ya que el intervalo de confianza no incluye el valor de "cero".

b. Coeficiente de variación para el análisis de las muestras por Condición/Tiempo (I).

Condición/tiempo	I(%)
T.A/24 hrs	99.74
T.A/72 hrs	99.14
Ref/24 hrs	99.84
Ref/24 hrs	97.68

TABLA XXI. Valores de coeficiente de variación de cianocobalamina para el análisis de las muestras por condición/tiempo.

1) Criterio:

- La muestra es estable a temperatura ambiente y refrigeración por 24 horas, ya que I se encuentra entre los valores de 98 y 102%.

- La muestra no es estable a temperatura ambiente ni refrigeración por 48 horas, ya que I es menor que 98%.

2. Hidroxocobalamina.

CONDICION - TIEMPO

Inicio	T.A/24hrs	T.A/72hrs	Ref/24hrs	Ref/72hrs
100.35	100.42	97.54	100.51	97.86
100.99	100.74	98.46	100.89	98.87
99.33	99.16	96.94	99.16	97.54

TABLA XXII. Resultados de la estabilidad de la muestra analítica para hidroxocobalamina a temperatura ambiente y refrigeración por 24 y 72 horas.

a. Intervalo de confianza para cada condición por tiempo.

Condición/Tiempo	I C
T.A/24 hrs	de -1.71 a 1.47
T.A/72 hrs	de -4.10 a -1.05
Ref/24 hrs	de -1.70 a 1.62
Ref/72 hrs	de -3.59 a -0.66

TABLA XXIII. Intervalo de confianza para hidroxocotiamina por cada condición/tiempo.

1) Criterio:

- La muestra es estable a temperatura ambiente y refrigeración por 24 horas, ya que el IC incluye el valor "cero".

- La muestra no es estable a temperatura ambiente ni refrigeración por 72 horas ya que el IC no incluye el valor "cero".

b. Coeficiente de variación para cada análisis de la muestra por condición/tiempo (I).

Condición/Tiempo	I(%)
T.A/24 hrs	99.87
T.A/72 hrs	97.42
Ref/24 hrs	99.95
Ref/72 hrs	97.86

- TABLA XXIV. Valores del coeficiente de variación de hidroxocobalamina para el análisis de las muestras por condición tiempo.

1) Criterio:

- La muestra es estable a temperatura ambiente y refrigeración por 24 horas ya que I se encuentra entre los valores de 98 y 102%.

- La muestra no es estable a temperatura ambiente ni refrigeración ya que I es menor que 98%.

6. ESPECIFICIDAD.

Los resultados obtenidos por la especificidad demuestran que no hay interferencia para la determinación de cianocobalamina e hidroxocobalamina en solución inyectable (ver cromatogramas anexos: 2, 3, 4, 5, 6 y 7).

VII. DISCUSION DE RESULTADOS

Tomando en cuenta las características fisicoquímicas de las moléculas de cianocobalamina e hidroxocobalamina, se desarrolló un método por CLAP de partición en fase reversa bajo las condiciones específicas establecidas. Este método permite separar y cuantificar ambos compuestos en un tiempo corto de análisis y con gran confiabilidad en los resultados.

Para comprobar que el método de control de calidad desarrollado para la cuantificación de cianocobalamina e hidroxocobalamina en solución inyectable, cumple con los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas, se validó el método en base a los parámetros mínimos establecidos por el laboratorio (17).

Como se observa en los resultados de la evaluación del sistema, se encuentra una relación lineal entre la cantidad adicionada y la respuesta obtenida, con un coeficiente de correlación lineal mayor que 0.99, por lo que se considera que el sistema es lineal para ambos compuestos. En la evaluación de la precisión del sistema obtiene un coeficiente de variación menor que 1.5% por lo que se considera que el sistema es preciso para ambos compuestos.

En los resultados obtenidos en la linealidad del método para cianocobalamina e hidroxocobalamina, se observa una relación lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada, obteniendo una ordenada al origen, pendiente y coeficiente de correlación satisfactorios (17) para decir que el método es lineal en el intervalo de concentración establecido.

Por otra parte, también se observó en la exactitud al 100% que el método es exacto para ambos compuestos.

Como se puede observar en los resultados de la reproducibilidad del método, no existe una variación significativa entre analista, entre día, ni entre la interacción día-analista para ambos compuestos, por lo que el método puede ser aplicado por diferentes analistas, en diferentes días.

Los resultados de la estabilidad de la muestra analítica demuestran que la muestra es estable por 24 horas bajo condiciones de refrigeración y temperatura ambiente, pero a las 72 horas no es estable para ambos compuestos.

Por último, en los cromatogramas se puede apreciar que no existe interferencia para cianocobalamina e hidroxocobalamina con los excipientes, por lo que el método es específico para estos compuestos.

VIII. CONCLUSIONES.

1. Con el método desarrollado por CLAP es posible cuantificar cianocobalamina e hidroxocobalamina en una sola inyección.

2. La respuesta obtenida por el sistema es lineal y precisa.

3. El método desarrollado es lineal, exacto, reproducible y específico para análisis de control de calidad bajo las condiciones específicas establecidas.

4. La muestra analítica permanece estable bajo condiciones de temperatura ambiente y refrigeración por 24 horas.

IX. SUGERENCIAS.

1. Realizar un estudio completo de especificidad con productos de degradación para ambos compuestos, para determinar si es posible emplear el método como indicativo de estabilidad.

2. Realizar un estudio de estabilidad de la muestra analítica a 36 y 48 horas para verificar la seguridad de los resultados después de 24 horas.

ANEXOS

ANEXO 1.

1. Fórmulas para linealidad

a. Ordenada al origen

$$b = \frac{S_y \cdot S_x^2 - S_x \cdot S_y \cdot y}{nS_x^2 - (S_x)^2}$$

b. Pendiente

$$m = \frac{nS_{xy} - S_x \cdot S_y}{nS_x^2 - (S_x)^2}$$

c. Coeficiente de correlación

$$r = \frac{nS_{xy} - S_x S_y}{\sqrt{[nS_x^2 - (S_x)^2] [nS_y^2 - (S_y)^2]}}$$

d. Error típico de estimación

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{S_y^2 - bS_y - mS_{xy}}{n}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{n - 2}{n} \cdot S_{y/x}}$$

Donde:

- S_x y S_y son sumatorias de x y de y respectivamente

- S_x y S_y son las sumatorias de cada uno de los valores al cuadrado para x y para y , respectivamente

- n es el número de datos
- b es la ordenada al origen
- m es la pendiente

2. Evaluación de la ordenada al origen.

Hipótesis planeada:

$$H_0: b = 0$$

$$H_a: b \neq 0$$

Estadígrafo de contraste: t de Student

fórmula de cálculo

$$t_{\text{calc}} = \frac{b-B}{S_y/x} \sqrt{\frac{S_x^2}{nS(\bar{x}_i - \bar{x})^2}}$$

Donde:

- B es el valor teórico de la pendiente "cero"
- x_i es el valor i de cada muestra
- \bar{x} es la media de la muestra

Criterio de aceptación.

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

3. Evaluación de la pendiente.

Hipótesis planeada:

$$H_0: m = 1$$

$$H_a: m \neq 1$$

Estadístico de contraste: t de Student

fórmula de cálculo

$$t_{\text{calc}} = (m - M) s_x \sqrt{n-1} / \hat{S}_{y/x}$$

Criterio de aceptación.

$$t_{\text{calc}} < t$$

tablas

4. Precisión.

$$C.V. = (s/x) \times 100$$

Donde:

s es la desviación estándar de la muestra

x es la media de la muestra

5. Exactitud.

$$t_{\text{calc}} = (x\% - M) / s \sqrt{n}$$

Criterio de aceptación.

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

Intervalo de confianza.

$$\bar{X} \pm t_{1-\alpha/2} (s \sqrt{n})$$

6. Tabla de ANADEVIA para reproducibilidad.

Suma de cuadrados del analista

$$SCA = \sum Y_{k..}^2 / br - Y_{...}^2 / abr$$

Suma de cuadrados del día

$$SCB = \sum Y_{.l.}^2 / ar - Y_{...}^2 / abr$$

Suma de cuadrados de la interacción analista-día

$$SCAD = \frac{SSY_{kl.}}{r} - \frac{SY_{k..}}{br} - \frac{SY_{.l.}}{ar} + \frac{Y_{...}}{abr}$$

Suma de cuadrados del error

$$SCE = SSSY_{klj} - SSY_{kl.} / r$$

Donde: $j = 1$ $a = 2$

$k = 1$ $b = 2$

$l = 1$ $r = 3$

Media de cuadrados de analista

$$MCA = SCA/g1A$$

Media de cuadrados del día

$$MCB = SCB/g1B$$

Media de cuadrados de la interacción analista-día

$$MCAB = SCAB/g1AB$$

Media de cuadrados del error

$$MCE = SCE/gle$$

Donde:

a es el número de analistas

d son los días

r el número de réplicas

Modelo estadístico.

$$Y_{ijk} = M + A_i + DJ(i) + E_{k(ij)}$$

Hipótesis planteada.

Analista

Día

Ho: $M_i = M_c$

Ho: $M_i = M_c$

Ha: $M_i \neq M_c$

Ha: $M_i \neq M_c$

6. Estabilidad de la muestra analítica.

Cálculos preliminares para el intervalo de confianza:

Media: $Y_0 \dots Y_n$, Varianza: $S_0 \dots S_n$

Varianzas ponderadas:

$$S_{pn} = \frac{2S_o + 2S_n}{2(C+1)}$$

donde C es el número de condiciones.

Cálculos finales para el intervalo de confianza:

$$IC = (Y_i - Y_o) + t^* S_{pi} \frac{2}{3}$$

Donde:

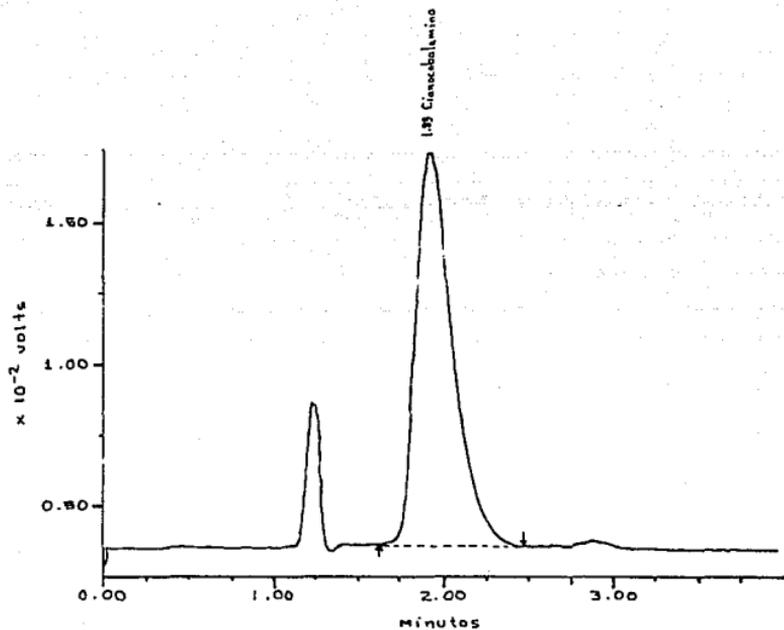
t^* es el valor de la t de student con C comparaciones y $2(C+1)$ grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975.

Cálculos preliminares para el coeficiente de variación: Para cada muestra/condición/tiempo calcular el factor I con la siguiente fórmula:

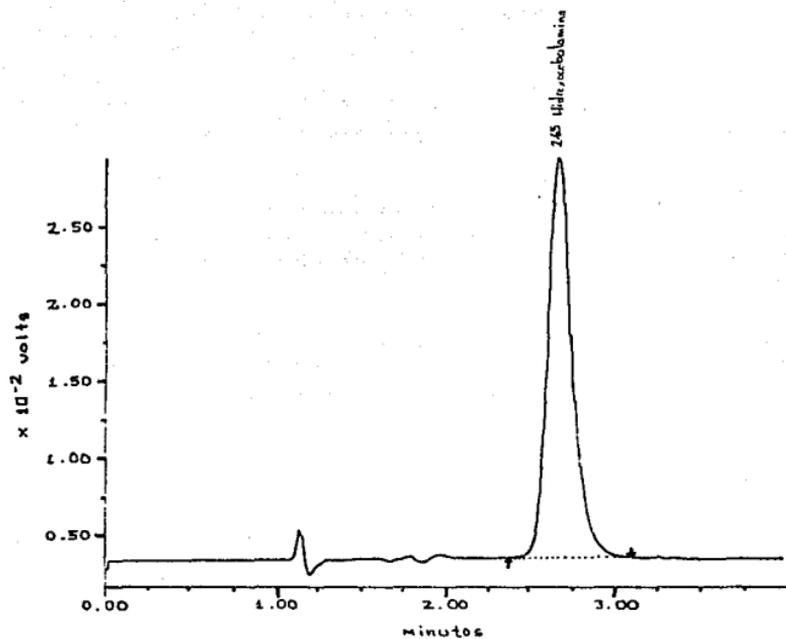
$$I = \frac{(\text{Análisis muestra/condición tiempo})_i}{\text{Análisis inicial}} \times 100$$

Cálculos finales para el coeficiente de variación*

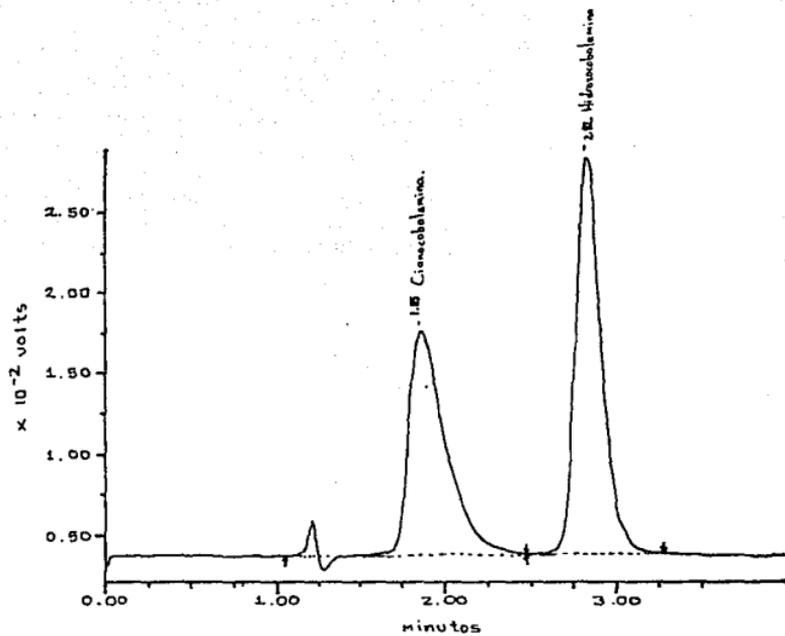
$$I = \frac{\text{Suma de I para cada análisis/condición tiempo}}{3} \times 100$$



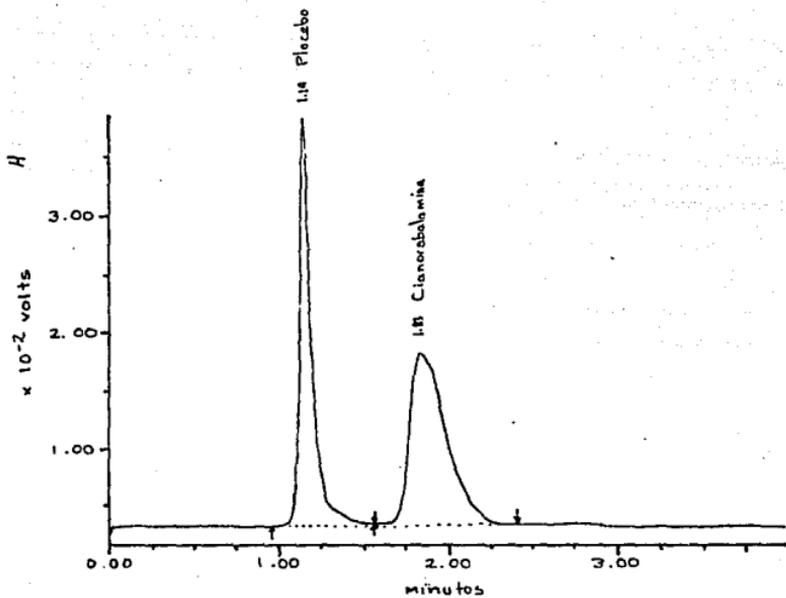
ANEXO 2. Cromatograma de cianocobalamina.



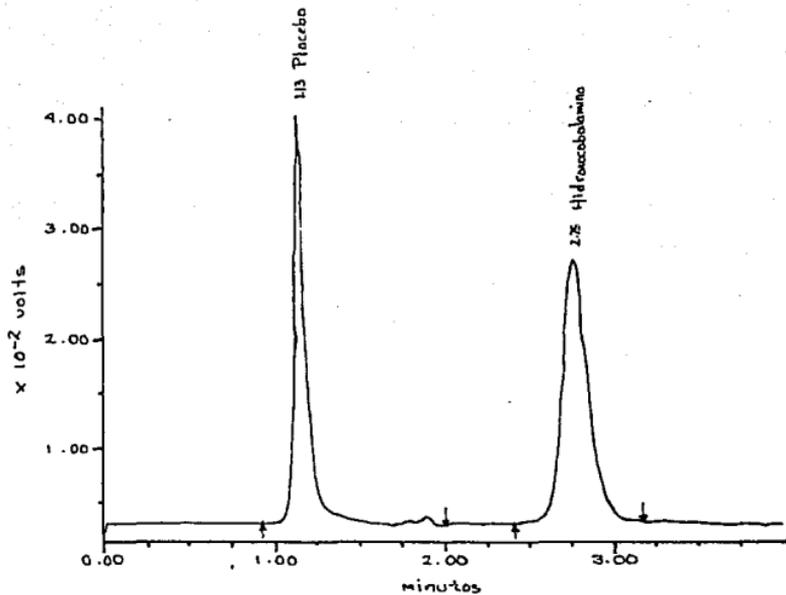
ANEXO 3. Cromatograma de hidroxocobalmina



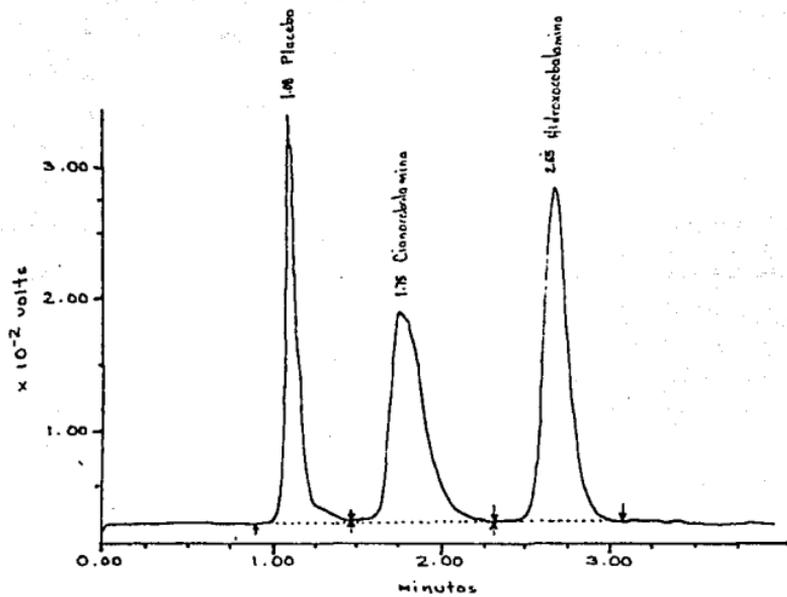
ANEXO 4. Cromatograma de cianocobalamina e hidroxocobalamina.



ANEXO 5. Cromatograma de placebo con cianocobalamina.



ANEXO 6. Cromatograma de placebo con hidroxocobalamina.



ANEXO 7. Cromatograma de producto terminado.

"XII. BIBLIOGRAFIA"

1. VITAMIN B12, Merck Sharp and Dohme International. Division of Merck and Co., Inc. New York 1958.
2. R. J. Hamilton and P. A. Sewell. INTRODUCTION TO HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. J. Willey and Sons Inc. U.S.A. 1977.
3. THE MERCK INDEX OF CHEMICALS AND DRUGS. Published by Merck and Co., Inc. Rahway. N.J., U.S.A. 1988
4. METHODS OF VITAMIN ASSAY Second Edition. Ed. the Association of Vitamins or Vitamins Chemists, Inc.
5. Rolf. Strobecker, Heinz M. Henning, VITAMIN ASSAY TESTED METHODS. Ed. Verlag. Chemie, GMBH, Weinheim/Bergstr; Darmstad 1965.
6. Goodman y Guilman, LAS BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA. sexta edición, Ed. Panamericana,; Mé. 1982.
7. CYANOCOBALAMIN. VITAMIN B12; 14A. VIIE. Uclaf, Paris. Sol. 93-98.

8. DICCIONARIO DE ESPECIALIDADES FARMACEUTICAS: Ed. P.L.M. S.A. de C.V.; 34a. ed. Méx. 1988.
9. D.R. Browning.; CROMATOGRAFIA, Ed. Toray Masson, S.A.; Barcelona España, 1971.
10. P. Boulanger and G. Biserte, CROMATOGRAPHIE ET CHIMIE ORGANIQUE BIOLOGIQUE; E. Laderer, Ed. Masson et Cie., Paris 1959.
11. Dr. Vinicio Gaxiola, CROMATOGRAFIA PRINCIPIOS Y TECNICAS, Ed. El Manual Moderno S.A.; Méx. 1975.
12. Snyder, L.R. and Kirkland. INTRODUCTION TO MODERN LIQUID CROMATOGRAPHY. Second edition, Jhon Wiley and Sons. Inc. New York
13. Bello Geromino. "La Cromatografía Líquida de Alta Resolución", Segunda parte. PHARMA NEWS 2(1), 19-26 (1991).
14. Bello geromino. "La cromatografía Líquida de Alta Resolución", Conclusión. PHARMA NEWS 2(2), 18-29 (1991).

15. G. Aguilar y Cools., "Evaluación De Cartuchos de Compresión Radial en Nuevos Métodos Analíticos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución". REVISTA MEXICANA DE CIENCIAS FARMACEUTICAS 15(2), 19-26 (1984).

16. Stimuli to the Revision Process. REPORT OF THE P.M.A. QUALITY CONTROL SECTION COMITE ON PRESURIZED LIQUID CHROMATOGRAPHY.

17. MÉTODOS ANALÍTICOS DE VALIDACION. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud SSA.

18. REQUISITOS MINIMOS PARA LA VALIDACION DE METODOS ANALITICOS. Comité de Elaboración de Guías Oficiales.

19. Alcántara Alejandro; Material: Validación de Metodología analítica.

20. Susan M. Ficarro and Kirit A. Shah. Validation of High Performance Liquid Chromatography and Gas Chromatography. BECKMAN. PHARMACEUTICAL MANUFACTURING. Sep. 1984.

21. Juárez Ayala José . "Resumen del tema: Diseño, Desarrollo y Validación de Métodos Analíticos". CENTRO AF DE ESTUDIOS TECNOLOGICOS (CAFET); Méx. D.F. 1990.
22. Cavenaghi, L., Gallo, G.G., and Leaf, G.M., Statistical Evaluation of the Results Obtained With the Analytical Methods Used for the Quality Control of the Medicines. DRUG DEVELOPMENT AND INDUSTRIAL PHARMACY. 13 (14), 2571-2615 (1987).
23. Ostle, B; ESTADISTICA APLICADA. TECNICAS DE LA ESTADISTICA MODERNA. CUANDO Y DONDE APLICARLAS. Primera edición (1965) sexta reimpresión (1979). Ed. Limusa. México 1979.
24. G. Szepesi, J. Moiror. Improved Quantitative Thin Layer Chromatographic Method for Separation of Cobalamine Derivates. CHROMATOGRAPHIA. 14(12), 709-711 (1981).
25. Harold M. Mc Nair. La Cromatografía de Líquidos no Reemplaza a la Cromatografía de Gases., REVISTA MEXICANA DE CIENCIAS FARMACEUTICAS 5(5), 70-71 (1974).

26. M. Avila , V. Troncoso y cols., Estudio de La Estabilidad de Acido Acetil Salicilico, Acido Ascórbico y Cianocobalamina Sustancias de Referencia. REVISTA MEXICANA DE CIENCIAS FARMACEUTICAS 15(1), 25-34 (1984).

27. Vera A.I.L.E.; García C., M.P. Metodología para la Determinación de Cianocobalamina en Polivitaminicos Por Cromatografía Líquida. REVISTA MEXICANA DE CIENCIAS FARMACEUTICAS 22(5), 19-27 (1992).

28. Morck-México S.A.; The HPLC Manager Software, the Latest Version. PHARMA NEWS 2(9), 14-24 (1991).