

70  
25



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO  
ESPECIFICO PARA CUANTIFICAR  
DIFENILHIDANTOINA SODICA EN TABLETAS**

**T E S I S**  
Que para obtener el Título de  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
p r e s e n t a

**IRMA JOSE NUÑEZ**

México, D. F.

1993

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

<b>CAPITULO I .- INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>CAPITULO II .- GENERALIDADES</b>	<b>4</b>
a) Monografía del principio activo	5
- Propiedades físicas	6
- Sustancias relacionadas	10
- Métodos de análisis	12
- Síntesis	13
- Estabilidad y degradación	15
- Farmacología y Farmacodinamia	16
- Mecanismos de acción	17
- Absorción, distribución, biotransformación y excreción	18
- Toxicidad	19
- Preparados vías de administración y dosis, Interacciones medicamentosas	20
b) Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)	22
- Equipo	24
- Inyectores	26
- Columnas	27
- Mecanismos de separación	30
- Cromatografía líquido - líquido	30
- Cromatografía líquido - sólido	31
- Cromatografía de intercambio iónico	32

- Cromatografía de exclusión	33
- Detectores	33
- Detector de arreglo de fotodiodos	38
- Fase móvil	42
- Aditivos y modificadores orgánicos	43
- Fuerza iónica y pH	44
- Terminología en CLAR	46
c) Validación de métodos analíticos	52
- Definiciones de terminos relacionados	52
- Determinaciones y criterios	54
<b>CAPITULO III .- DESARROLLO Y VALIDACION DEL METODO</b>	<b>60</b>
- Desarrollo del método	61
- Selección de las condiciones cromatográficas	62
- Especificidad del sistema cromatográfico	65
- Selección de la sustancia patrón de referencia interna	76
- Método analítico	80
- Validación del método	82
- Linearidad del sistema	83
- Precisión del sistema	85
- Especificidad del método	85
- Linearidad del método	87
- Exactitud del método al 100 %	90

- Reproducibilidad	91
- Estabilidad de la solución de la muestra	92
- Tolerancia del sistema	94
<b>CAPITULO IV .- ANALISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES</b>	<b>98</b>
- Análisis de resultados	97
- Conclusiones	99
<b>CAPITULO V .- BIBLIOGRAFIA</b>	<b>100</b>

# C A P I T U L O I

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

## INTRODUCCION

Uno de los principales objetivos de la Industria Farmacéutica es proporcionar medicamentos que logren mantener su integridad y que cumplan con el fin terapéutico para el que fueron diseñados, para lo cual debe asegurar un adecuado control de calidad.

Debido a ésto, se requiere de métodos analíticos capaces de cuantificar en forma selectiva al fármaco, aún en presencia de sus productos de degradación, excipientes o impurezas.

Para conocer si el método es el adecuado es necesario validarlo. La validación es la comprobación documentada de una serie de estudios de laboratorio, que demuestran la reproducibilidad del método para proporcionar resultados analíticos confiables.

El objetivo de este trabajo es desarrollar un método analítico para cuantificar difenilhidantoína sódica en tabletas por cromatografía de líquidos de alta resolución, utilizando estándar interno. Una vez terminado se procederá a validarlo para lo cual se determinará: Linealidad, Exactitud, Precisión, Reproducibilidad, Especificidad, Tolerancia.

Para determinar su especificidad se someterán muestras de principio activo, placebo y producto terminado a diferentes condiciones de degradación y se analizarán bajo el método propuesto, éste debe ser capaz de cuantificar al principio activo sin interferencias de excipientes y/o productos de degradación.

El presente trabajo consta de los siguientes capítulos :

1. Introducción.
2. Generalidades.
  - a) Monografía del principio activo.
  - b) Cromatografía de líquidos de alta resolución.
  - c) Validación de métodos analíticos
- 3.- Desarrollo y validación del método analítico.
- 4.- Análisis de resultados y conclusiones.
- 5.- Bibliografía.

El método desarrollado presenta grandes ventajas sobre los métodos reportados en la bibliografía debido a que se cambió un método gravimétrico o por titulación por un método instrumental. Además hay gran disminución en el tiempo de análisis, menor complejidad en la preparación de las muestras y como es específico puede utilizarse tanto para control de calidad como para el seguimiento en la estabilidad de difenilhidantoína sódica en tabletas.

## **C A P I T U L O    I I**

### **G E N E R A L I D A D E S**

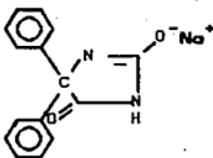
**A) MONOGRAFIA DEL PRINCIPIO ACTIVO**

**B) CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA  
RESOLUCION**

**C) VALIDACION DE METODOS ANALITICOS**

## MONOGRAFIA DE DIFENILHIDANTOINA SODICA

FORMULA QUIMICA DESARROLLADA : (7,20,8,4)



FORMULA CONDENSADA :  $C_{15}H_{11}N_2NaO_2$

PESO MOLECULAR : 274.25

NOMBRE QUIMICO :

5,5 - Difeníl - 2,4-imidazolidindiona, sal sódica.

5,5 - Difenílhidantoína sódica.

SINONIMOS : Fenitoína sódica, Dantoín, Difetin, Divulsan, Novodifenil, Dilantil, Fenantoin, Difidán, Pyoredol, Zentropil.

DESCRIPCION : Polvo blanco inodoro, sabor amargo, algo higroscópico, expuesto al aire absorbe gradualmente bióxido de carbono.

Contiene no menos del 95% y no más del 100.5% calculado con referencia a la sustancia seca.

**PROPIEDADES FISICAS :**

**SOLUBILIDAD :** Fácilmente soluble en agua, generalmente la solución acuosa es algo turbia, debido a una hidrólisis parcial y absorción de dióxido de carbono, soluble en alcohol, prácticamente insoluble en éter y cloroformo.

**CONSTANTE DE DISOCIACION :** El pka de la fenitoina determinado espectrofotométricamente es de 8.31 y por titulación potenciométrica es de 8.3, Schwartz reporta un valor de 8.0.

**ESPECTRO INFRARROJO :**

Disolver 0.1 g de difenilhidantoína sódica en 20 ml de agua, acidificar con solución 0.2 M de ácido clorhídrico, extraer tres veces con 30 ml de cloroformo, juntar los extractos clorofórmicos, lavarlos con agua, evaporar, secar el residuo de 100 a 105°C. El espectro de absorción en la región infrarroja de una dispersión de bromuro de potasio del residuo obtenido exhibe máximos principales a las siguientes longitudes de onda. Figura 1.

**Principales bandas de absorción:**

<u>Longitud de onda (cm<sup>-1</sup>)</u>	<u>Grupo funcional</u>
3275, 3205	Amina secundaria
3064	C-H aromático
1774, 1740, 1719	Grupo carbonilo
1719, 1599, 1496, 1450	Grupo fenilo
1403	Enlaces C-N

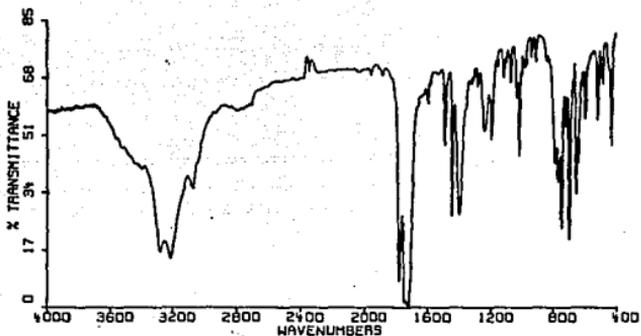


Figura 1 Espectro de absorción IR de difenilhidantoína.

**ESPECTRO ULTRAVIOLETA :**

El espectro de absorción ultravioleta de difenilhidantoína sódica en metanol exhibe máximos a 254 y 258 nm. Figura 2.

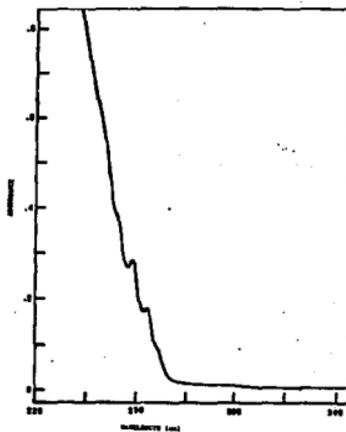


Figura 2 Espectro UV de difenilhidantoína.

### ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR :

El espectro de resonancia magnética nuclear en dimetilsulfóxido presenta las siguientes asignaciones:

Resonancia (ppm)	Multiplicidad	Integración	Asignación
7.3	Simple	10	Fenilos
9.2	Simple	1	Protones
10.9	Simple (muy ancho)	1	Amina protonada

El espectro de resonancia magnética se muestra en la figura 3.

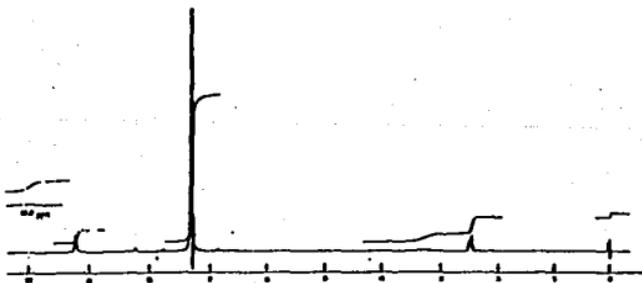


Figura 3 Espectro de RMN de difenilhidantoína.

### ESPECTRO DE MASAS :

El espectro de masas muestra los siguientes iones.

<u>m/c</u>	<u>Fragmentos</u>
253	M-CHO
209	M-HNCO
180	M-HNCO-CHO
175	M-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
165	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>
147	M-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -CO
104	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CN
77	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>

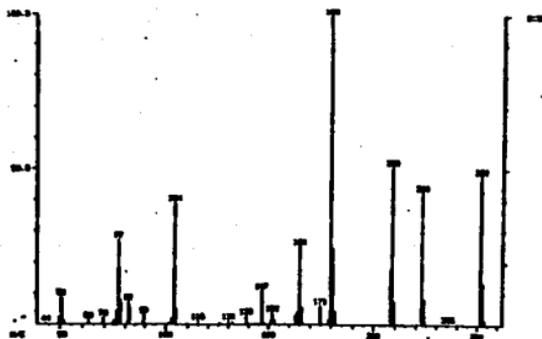


Figura 4 Espectro de masas de difenilhidantoína.

**PUNTO DE FUSION :**

En 10 ml de agua disolver cerca de 500 mg de difenilhidantoína sódica y agregar 5 ml de ácido clorhídrico diluido. Deberá formarse un precipitado de difenilhidantoína, separarlo en un filtro, lavar con agua fría y secar a 105°C durante 4 horas. La difenilhidantoína así obtenida deberá fundir entre 295°C y 298°C con descomposición parcial.

**IDENTIFICACION DE SODIO :**

El residuo obtenido de la incineración de 300 mg de la muestra de difenilhidantoína sódica, deberá producir efervescencia con los ácidos y dar positivas las reacciones para sodio.

**PERDIDA AL SECADO :**

Secar a 105°C por 4 horas. No pierde más de 2.5% de su peso.

**FENITOINA LIBRE :**

Disolver 0.3 g en 10 ml de una mezcla piridina - agua (50:50), adicionar 0.5 ml de solución diluida de fenolftaleína y 3 ml de reactivo de nitrato de plata en piridina. No más de 1.0 ml de solución 0.1 M de hidróxido de sodio se requiere para cambiar el color de la solución a rosa.

**SUSTANCIAS RELACIONADAS :**

Soporte: Sílica gel 60 activada a 120°C durante 30 minutos.

Fase móvil: Cloroformo, isopropanol, hidróxido de amonio 13.5 M (45:45:10).

Procedimiento: Aplicar en carriles separados 10 µl de las siguientes soluciones en metanol.

- a) 4 % p/v de difenilhidantoína sódica.
- b) 0.04 % p/v de difenilhidantoína sódica.
- c) 0.020 % p/v de benzofenona.
- d) 0.020 % p/v de benzilo.

Dejar correr la cromatoplaca, sacarla de la cámara, evaporar el disolvente y secar a 80°C por 5 minutos. Revelar bajo luz ultravioleta (254 nm).

En el cromatograma obtenido con la solución (a) ninguna mancha correspondiente a benzofenona debe ser más intensa que la mancha obtenida en el cromatograma con la solución (c). La mancha correspondiente al benzilo no es más intensa que la obtenida con la solución (d). Otra mancha obtenida en el cromatograma no debe ser más intensa que en el cromatograma con la solución (b).

#### **COLOR Y CLARIDAD DE LA SOLUCION :**

En 20 ml de agua libre de bióxido de carbono disolver 1 gramo de la muestra de difenilhidantoína sódica y agregar solución 0.1 N de hidróxido de sodio; para obtener una solución clara e incolora. No debe utilizarse más de 4 ml de la solución de hidróxido de sodio.

#### **METALES PESADOS :**

Método II. No más de 0.002 por ciento.

#### MÉTODOS DE ANÁLISIS :

I.- En un embudo de separación disolver en 50 ml de agua, cerca de 300 mg de la muestra, agregar 10 ml de ácido clorhídrico diluido y extraer con tres porciones sucesivas de 100 ml, 60 ml y 30 ml respectivamente de una mezcla 1 a 2 de éter y cloroformo. Evaporar los extractos combinados, secar el residuo a 105°C durante 4 horas y pesar. El peso del residuo de difenilhidantoína así obtenido, multiplicado por 1.087 corresponde al peso de la difenilhidantoína sódica.

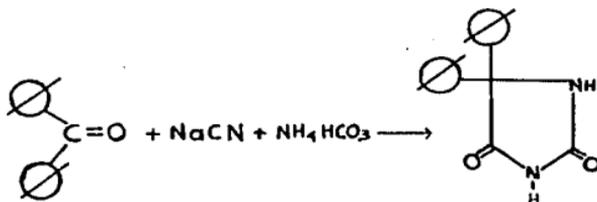
II.- Suspender 0.18 g en 2 ml de agua adicionar 8 ml de solución 5 N de ácido sulfúrico y calentar suavemente por 1 minuto. Adicionar 30 ml de metanol, enfriar y titular potenciométricamente con solución 0.1 M de hidróxido de sodio. Después del primer punto de inflexión, adicionar 5 ml de solución reactivo de nitrato de plata en piridina, mezclar y completar la titulación. Anotar el volumen de solución de hidróxido de sodio adicionado entre el primer y el segundo punto de inflexión. Cada mililitro de solución 0.1 M de hidróxido de sodio es equivalente a 0.02743 g de difenilhidantoína.

**CONSERVACION :** Preservar en contenedores cerrados.

## SINTEISIS :

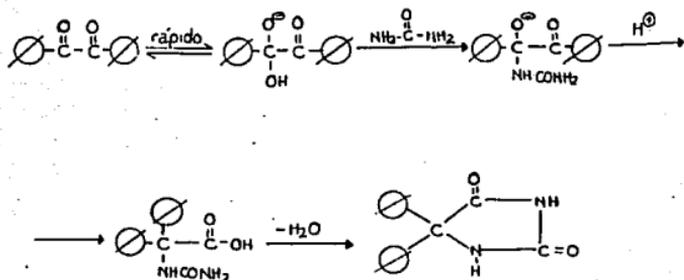
La difenilhidantoína puede ser sintetizada por varios caminos: H.R. Henze, Parke Davis y Co. la obtuvo a partir de benzofenona, cianuro de potasio y carbonato de amonio en etanol al 60 % .

También puede ser preparada por la reacción de benzofenona, cianuro de sodio y bicarbonato de amonio de acuerdo al esquema 1 :

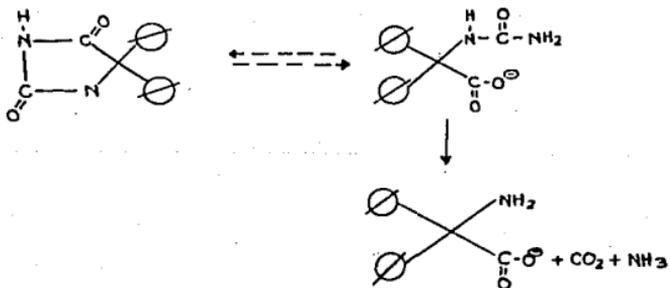


Esquema 1 : Síntesis de difenilhidantoína (Henze)

Biltz preparó difenilhidantoína calentando urea con una solución de bencilo en alcohol alcalino. Sikdar y Ghosh estudiaron la técnica de Biltz y han mostrado la reacción que tiene lugar como se muestra en el esquema 2 :



Esquema 2 : Síntesis de difenilhidantoína (Blitz)



Esquema 3 : Hidrólisis de difenilhidantoína.

#### ESTABILIDAD Y DEGRADACION :

- La difenilhidantoína es muy estable aún bajo condiciones extremas. Después de someterla a reflujo en solución 2.5 N de HCl durante 7 horas, se obtuvo un recobro prácticamente completo.
- Al someterla a 170 - 180 °C durante 24 horas en solución 5 N de NaOH se obtiene un 82 % de difenilglicina.
- Al someterla a reflujo a 105 °C en solución 2 N de NaOH por 5 días se obtiene un 75 % de difenilglicina.
- Al someterla a 105 °C en solución 0.2 N de hidróxido de sodio contenida en una ampolleta se encontró bencidrol a los 75 días.
- Al disolverla en tetraglicol - trimetilamina - agua, se produce ácido difenilhidantóico y difenilglicina.
- Con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH de 11 y 12 y a 70, 80 y 90 °C se presentó descomposición de pseudoprimer orden según la ley de Arrhenius a 25°C el 10 % del fármaco se descompondría en 61 años a pH de 11 y 35 años a pH de 12.
- Una degradación alcalina de difenilhidantoína produce vía hidrólisis reversible ácido difenilhidantóico, el que con una hidrólisis irreversible dá difenilglicina.
- En la oxidación con  $\text{KMnO}_4$  se obtiene benzofenona.

## FARMACOLOGIA

La difenilhidantoína sódica, (fenitoína) es un fármaco primario para todos los tipos de epilepsia excepto en las crisis de ausencia. El término epilepsia designa en conjunto a un grupo de trastornos crónicos del Sistema Nervioso Central (SNC) que tienen en común la existencia de episodios repentinos y transitorios, (crisis), de fenómenos anormales de origen motor, (convulsión), sensitivo, autonómico o psíquico.

Este fármaco es de origen sintético y deriva de la hidantoína, núcleo que adquiere propiedades anticonvulsivantes potentes por los dos grupos fenilo en la posición cinco. (19)

### FARMACODINAMIA

La fenitoína ejerce su actividad antiepiléptica sin causar depresión general del SNC, suprime las convulsiones tonicoclónicas por electroshock en forma mucho más potente que los barbitúricos antiepilépticos.

La fenitoína es capaz de impedir la epilepsia jacksoniana o crisis focales motoras especialmente, también actúa en la epilepsia psicomotora o automatismo aunque en menor grado. Existe un sinergismo con el fenobarbital y la primidona, lo que permite utilizar menor dosis de cada uno de los fármacos cuando se emplean juntos.

La fenitoína no ejerce acción sedante ni hipnótica; es un depresor central muy selectivo en la epilepsia; muy pocas veces las dosis elevadas provocan un estado de apatía y somnolencia; tampoco modifica el electroencefalograma normal en reposo. (13)

### MECANISMO DE ACCION

Un efecto estabilizador de la fenitoína es evidente en todas las membranas neuronales, incluso de los nervios periféricos y probablemente en todas las membranas excitables y no excitables. Hay pruebas de que este efecto, como los ejercidos sobre el PTP y transmisión sináptica, son el resultado directo o indirecto de los efectos sobre el movimiento de iones a través de las membranas celulares.

En diferentes sistemas se ha observado que la fenitoína disminuye el flujo en reposo de los iones sodio y de las corrientes de sodio que fluyen durante los potenciales de acción o la despolarización químicamente inducida. Además, la entrada del ión calcio durante la despolarización esta disminuida en forma independiente o a consecuencia de la menor concentración intracelular de sodio. La fenitoína también puede demorar la activación de la corriente hacia el exterior de potasio durante un potencial de acción aumentando así el período refractario y disminuyendo las descargas repetidas. (9)

## ABSORCION, DISTRIBUCION, BIOTRANSFORMACION Y EXCRECION

La fenitoína es un ácido débil cuyo pKa es aproximadamente 8.3; su hidrosolubilidad es limitada, incluso en el intestino. Por inyección intramuscular el principio activo precipita en el sitio de inyección y se absorbe lentamente.

La absorción de la fenitoína después de su ingestión oral es lenta, a veces variable y ocasionalmente incompleta. La concentración máxima después de una sola dosis se alcanza en el plasma entre las 2 y 6 horas.

La fenitoína se une en gran parte, (alrededor del 90%) a las proteínas plasmáticas, principalmente a la albúmina. El principio activo se distribuye ampliamente en todos los tejidos. La unión fraccionada en los tejidos, incluso en el encéfalo, es aproximadamente la misma que en el plasma. De este modo, su volumen aparente de distribución es del 64% del peso corporal. La concentración en el líquido cefalorraquídeo es igual a la fracción plasmática libre.

Aproximadamente el 2 % de la fenitoína se excreta sin cambios en la orina. El resto se metaboliza principalmente por acción de las enzimas microsomales hepáticas. El principal metabolito, es el derivado parahidroxifenílico, inactivo, el cual representa del 60 al 70 % de una única dosis del principio activo.

Se excreta inicialmente por la bilis y luego por la orina, en gran parte como glucurónido. Otros metabolitos aparentemente inactivos son el dihidroxicatecol y su derivado 3-metoxi, y el

dihidrodiol. La vida media plasmática es en promedio de unas 24 h pero varía por lo menos en cuatro veces. La vida media plasmática aumenta con la concentración, quizá porque la reacción de hidroxilación se aproxima a la saturación o es inhibida por los metabolitos. (9)

### TOXICIDAD

Los efectos tóxicos dependen de la vía de administración, exposición y duración de la dosis.

La fenitoína es capaz de producir mareos, excitación psíquica, insomnio, visión borrosa, disartria, diplopía a veces somnolencia, apatía, cefalea, y en raras ocasiones ilusiones y alucinaciones hasta llegar a una franca psicosis semejante a la esquizofrenia.

La alcalinidad de la fenitoína sódica provoca molestias epigástricas, náuseas, vómito y hematemesis.

También puede presentarse gingivitis hiperplásica. Los trastornos hemáticos consisten en anemia megaloblástica.

Acción teratogénica.- Se ha observado la aparición de malformaciones congénitas en niños de madres que recibieron fenitoína durante el embarazo. (13)

## PREPARADOS. VIAS DE ADMINISTRACION Y DOSIS

Difenilhidantoinato sódico 50 mg por tableta.

Dosis: Adultos - 1 a 4 tabletas repartidas en 24 hs.

NIÑOS - De 1/2 a 2 tabletas repartidos en 24 hs.

Difenilhidantoína suspensión 750 mg en 100 ml.

Dosis: En el primer año de vida, de 1/2 a una cucharadita.

De uno a tres años, 1 1/2 cucharaditas al día.

De tres a seis años, 2 cucharaditas al día.

Más de 6 años, 3 cucharaditas al día.

Difenilhidantoína sódica ampollita inyectable 250 mg por ampollita.

Dosis: Una dosis única (5 mg/Kg de peso corporal), puede administrarse intravenosamente.

Difenilhidantoína sódica 100 mg por tableta.

Dosis: De 1/2 a 1 tableta, dos o tres veces al día. (5)

## INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS

El alcohol por inducción enzimática a nivel de los microsomas hepáticos es capaz de acelerar el metabolismo de la fenitoína y disminuir su acción antiépiléptica.

Las benzotiazinas y las benzodiazepinas al inhibir la biotransformación de la fenitoína pueden elevar sus niveles sanguíneos.

El fenobarbital, por inducción enzimática es capaz de aumentar el metabolismo de la fenitoína, con disminución de sus niveles

sanguíneos y de su acción.

Hay una disminución de la acción de la levodopa por la fenitoína.

Los antidepresivos tricíclicos pueden provocar convulsiones epiléptiformes lo que obliga a aumentar la dosis de la fenitoína.

Por inducción enzimática la fenitoína puede acelerar el metabolismo de la digitoxina con disminución de su acción.

La fenitoína es capaz de inhibir la absorción gastrointestinal de la furosemida, con disminución de su acción diurética.

Se sabe que la anemia megaloblástica provocada por la fenitoína se debe a deficiencias de ácido fólico, pero éste aumenta el metabolismo de la fenitoína. (13)

## CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION

La cromatografía de líquidos se puede definir como un método físico de separación basado en la distribución de la muestra entre dos fases, una fase móvil líquida y una fase estacionaria cuya naturaleza puede variar.

La ventaja de la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) frente a otros métodos analíticos, es que se trata de una técnica de separación selectiva que permite la identificación y la cuantificación de varios compuestos a la vez. Tiene una alta especificidad así como un amplio intervalo de sensibilidad que hace ideal el análisis de muchos activos tanto en formas farmacéuticas como en fluidos biológicos. Con el avance tecnológico de equipo, materiales, técnicas y aplicación de la teoría es posible realizar separaciones difíciles con gran exactitud y velocidad en el análisis.

Para llevar a cabo una separación el primer paso es disolver la muestra en un disolvente, el cual idealmente debería ser el mismo que la fase móvil. A continuación la muestra se introduce por medio de un inyector y es transportada por la fase móvil hacia la columna en donde se lleva a cabo la separación, los componentes que tienen mayor afinidad por la fase estacionaria van a eluir más lentamente que los que tienen menor afinidad por esta. A la salida de la columna los compuestos pasan a un detector, que transmite señales a un integrador que las transforma en una gráfica llamada cromatograma el cual proporciona información tanto cualitativa como cuantitativa de los compuestos encontrados en la mezcla. (3,17)

Actualmente se cuenta con una amplia gama de equipo en cuanto a costo, complejidad y tipo de instrumental, pero deben cumplir con una serie de características esenciales de acuerdo a las necesidades y a la utilidad que puedan prestar. Dichas características son :

**VERSATILIDAD :** El instrumento debe ser adecuado para trabajar con muestras de diferente tipo, debe adaptarse a las diferentes técnicas cromatográficas y debe realizar el máximo de operaciones.

**REPRODUCIBILIDAD Y ESTABILIDAD :** El instrumento debe proveer un control adecuado sobre los parámetros de operación, tales como el flujo de la fase móvil, la temperatura, presión, composición de la fase móvil etc. para obtener un funcionamiento efectivo a largo plazo.

**SENSIBILIDAD :** Además de trabajar con pequeñas cantidades de muestra, debe generar señales de intensidad apreciables. La sensibilidad de todo cromatógrafo de líquidos depende del sistema de detección, con los detectores más recientes es posible cuantificar componentes de la muestra en el intervalo de nanogramos. (6)

Las partes fundamentales que forman un sistema para CLAR son:

- A. Reservorio (recipiente donde se coloca la fase móvil)
- B. Sistema de bombeo de alta presión.
- C. Inyector
- D. Columna
- E. Detector
- F. Registrador

Partes opcionales :

inyectores automáticos, programadores de gradiente, controles de temperatura para la columna y el detector, sistema para recolectar fracciones, etc.

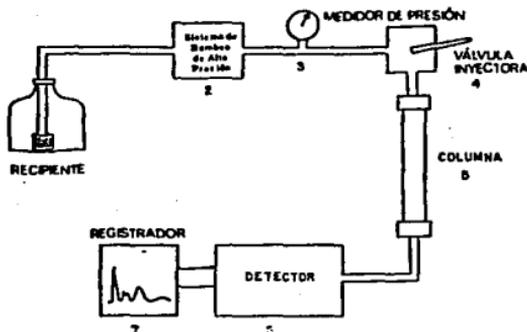


FIGURA 5 Partes fundamentales de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

EQUIPO : (4,6,8,10,14,19,20)

Dentro de los equipos cromatográficos de líquidos de alta resolución se han seguido dos tendencias. Una es el equipo por módulos que da gran versatilidad en el cambio de accesorios para mantenimiento preventivo o reparación, la desventaja de estos equipos es la

longitud de las tuberías e interfaces que se requieren. Por otro lado los equipos en gabinete, tienen la ventaja de que cada parte esta en un lugar prediseñado, optimizando la longitud de las tuberías pero es difícil de manipular cada componente para darle servicio.

#### A. RESERVORIO :

Se pueden utilizar recipientes de vidrio, acero inoxidable o plásticos inertes, de capacidad entre 1 y 3 litros, suficiente para todo un día de operación. La toma del disolvente se hace a través de un filtro, esto tiene por objeto retener pequeñas partículas que puedan obstruir o dañar al sistema de bombeo o a la columna.

#### B. SISTEMA DE BOMBEO :

Las columnas utilizadas en CLAR estan rellenas de materiales especiales de tamaño de partícula muy pequeña, lo cual hace que la resistencia al flujo de la fase móvil sea muy elevada. Por esta razón, se requiere un sistema de bombeo que haga fluir la fase móvil a un flujo razonable, pues de lo contrario los análisis serian excesivamente lentos.

Las características más importantes en todo sistema de bombeo son:

- Presión máxima de operación (usualmente 5000 psi)
- Intervalo de flujo entre 0.5 y 10 ml por minuto.
- Reproducibilidad y constancia de flujo (aproximadamente 1 %)
- Características de flujo continuo y libre de pulsaciones.
- Resistente a líquidos corrosivos.
- Facilidad para el cambio de fases móviles.
- Facilidad de limpieza del sistema.

Existen dos tipos de bombas:

1.- Bombas mecánicas

Bombas recíprocas

Bombas de desplazamiento continuo

2.- Bombas neumáticas

Las características de cada una se presenta en la siguiente tabla

TIPO DE BOMBA	PRESION MAXIMA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Recíproca	8820 PSI	Se cambia fácil y rápido de fase móvil Fácil mantenimiento	Flujo en pulsos en forma continua uniforme
Desplazamiento continuo	4998 PSI	Flujo uniforme y continuo, libre de pulsaciones	Costo elevado Dificultad para cambiar de fase móvil Tiempo de análisis limitado
Neumáticas	5880 PSI	Flujo libre de pulsaciones y de presión constante	Capacidad limitada del volumen que puede bombear

### C. INYECTORES :

La obtención de picos adecuadamente resueltos es reflejo entre otras cosas de una introducción adecuada de la muestra en el sistema. La mejor manera de introducirla es en forma de paquete pequeño ya que ayuda a obtener picos angostos y simétricos.

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

#### INYECTORES MANUALES.

La muestra se introduce con una jeringa. Por medio de un abrir y cerrar de válvulas manualmente se desvía el flujo mientras se aplica la muestra en la cámara de carga (loop) y luego se reanuda a través de él completándose la inyección.

#### INYECTOR AUTOMÁTICO.

Actualmente la inyección de la muestra se puede hacer en forma automática por medio de una válvula que inyecta por sí solo las muestras disminuyendo el error en la medición del volumen a inyectar, aumenta la reproducibilidad de las inyecciones y cuenta con un control electrónico que maneja funciones tales como: tiempos de inyección, tiempos de corrida, velocidad de llenado, número de inyecciones por muestra, volúmenes de inyección, identificación de la muestra, lavado de válvulas y jeringas así como programar gradientes.

#### D. COLUMNA :

En todo sistema cromatográfico la columna es el "corazón" del sistema. Es un tubo de material inerte, de diámetro uniforme y capaz de resistir altas presiones, el acero inoxidable es el material más utilizado. Contiene a la fase estacionaria en donde se llevan a cabo las separaciones de los componentes de la muestra.

La capacidad de la columna depende de la longitud, diámetro y material de empaque. La longitud de la columna es entre 10 y 50 cm,

con un diámetro entre 3 y 4 mm aunque en columnas de tipo preparativo pueden ser de más de 1 cm. El empaque de la columna es de tamaño de partícula pequeño (3 a 10  $\mu$ m).

El material de empaque consiste en partículas de tamaño muy reducido y de diámetro constante. En CLAR se dispone de gel de sílice en forma de partículas completamente porosas o de bolas de vidrio esféricas que están recubiertas por una delgada capa de gel de sílice distribuida irregularmente. La superficie de gel de sílice de cualquier tipo está recubierta por grupos Si-OH y Si-O-Si que pueden interactuar con las moléculas de la muestra. Los grupos hidroxilo son los más importantes, de los cuales, existen dos tipos: los libres y los reactivos; estos últimos constituyen agentes enlazantes muy fuertes que pueden adsorber permanentemente los compuestos polares de la muestra y que adsorben el agua en el gel. Esta actividad suele ser responsable del ensanchamiento de los picos, así como de la falta de reproducibilidad de los resultados. Los hidroxilos reactivos pueden desactivarse por adición de agua o de un alcohol o por medio de reacciones químicas.

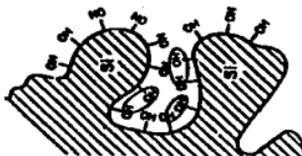
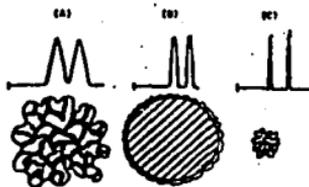


FIGURA 6 Grupos hidroxilo libres y reactivos sobre la superficie del gel de sílice.

El relleno idealmente debe producir la máxima resolución en el menor tiempo, debe tener la máxima capacidad de muestra, ser fácilmente empacable, producir pequeñas caídas de presión y ser barato. Las partículas son de materiales porosos que sirven propiamente como fases estacionarias, o bien de soportes para las mismas. La variedad y la naturaleza de fases estacionarias es amplia y su utilidad esta en función de la separación a la que se pretenda aplicar.

En general las columnas para CLAR tienen una gran duración y cabe esperar una larga vida de servicio útil, a menos que se utilicen en condiciones intrínsecamente destructivas, como por ejemplo, con eluyentes extremadamente ácidos o básicos o bien con inyecciones continuas de muestras crudas o biológicas "sucias".

Después de usar una columna durante periodos largos, puede aparecer una deriva de la línea base, cuya causa puede ser la gradual elución de compuestos retenidos fuertemente que procedan de inyecciones anteriores, estos pueden eliminarse de la columna pasando una fase móvil suficientemente fuerte para eliminar cualquier compuesto.



**FIGURA 7** Diversos tipos de empaque (A) cuerpo poroso, (B) pelicular, (C) micropartícula de cuerpo poroso. Los cromatogramas muestran las respectivas anchuras de los picos.

Cuando no se utilice una columna y estando desconectada, es prudente colocar tapones en los extremos para evitar que se seque. Las columnas deben guardarse alejadas de las fuentes de calor y de vibración. Si la columna se utiliza a temperaturas elevadas es aconsejable enfriarla hasta temperatura ambiente antes de desconectarla.

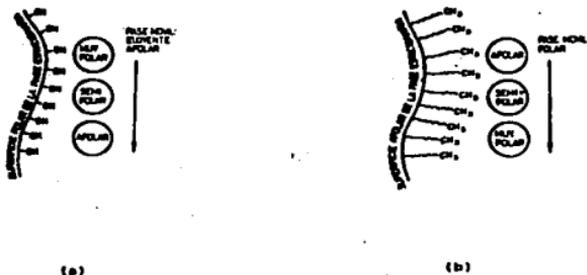
### MECANISMOS DE SEPARACION

En CLAR existen diferentes mecanismos de separación de acuerdo a la fase estacionaria estos son: (15, 12)

1. Cromatografía Líquido - Líquido (CLL)
2. Cromatografía Líquido - Sólido (CLS)
3. Cromatografía de Intercambio Iónico
4. Cromatografía de Exclusión Molecular

1. **CROMATOGRAFIA LIQUIDO - LIQUIDO** .- Llamada también cromatografía de partición, en la cual, se involucra una fase estacionaria líquida la cual recubre un soporte sólido inerte. Las moléculas de la muestra se distribuyen de acuerdo a sus afinidades entre la fase móvil y la fase estacionaria llevándose así la separación. La fase estacionaria puede ser polar o no polar, cuando la fase estacionaria es polar y la fase móvil es no polar es llamada cromatografía de partición en fase normal. Si se tiene el caso contrario se llama cromatografía de partición en fase inversa.

## CROMATOGRAFIA LIQUIDO - LIQUIDO



Fase normal

Fase reversa

FIGURA 8 Se muestra el mecanismo de separación por cromatografía Líquido - Líquido

2. CROMATOGRAFIA LIQUIDO - SOLIDO .- Es llamada también cromatografía de adsorción, como fase estacionaria se emplean partículas con una gran área superficial que adsorbe moléculas de soluto. La separación se basa en repetidas etapas de adsorción y desorción de la muestra, normalmente se utilizan sólidos polares como sílica gel, alúmina o vidrio poroso. La fase móvil es no polar, como cloroformo, heptano u octano.

## CROMATOGRAFIA LIQUIDO - SOLIDO

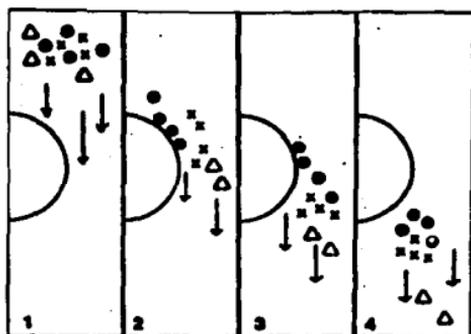


FIGURA 9 : En la figura se muestra el mecanismo de separación de cromatografía líquido - sólido. En donde ● representa un compuesto muy polar, x a un compuesto moderadamente polar y Δ a un compuesto poco polar.

3. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO .- Se usa una fase estacionaria que pueda intercambiar cationes o aniones con la fase móvil, esta fase debe tener una carga contraria a la de la muestra. Cuanto mayor sea la carga de la muestra, más fuertemente estará atraída hacia la superficie iónica y por lo tanto tardará mas tiempo en ser eluida, para controlar el tiempo de elución se ajusta el pH y la polaridad de la fase móvil. Generalmente son resinas poliméricas las cuales se clasifican en aniónicas y catiónicas.

Cada tipo de material puede subdividirse en intercambiadores fuertes o débiles. Los grupos ácidos sulfónicos ( $R-SO_3^-H^+$ ) y ácidos carboxílicos ( $R-COO^-H^+$ ) son usados como intercambiadores catiónicos

débiles. Las resinas de intercambio aniónico fuertes contienen como sitios activos grupos cuaternarios de amonio  $R-N^+(CH_3)_3Cl^-$ ,  $R-NH^+ Cl^-$ . Las resinas de intercambio aniónico débiles tienen como sitios activos aminas terciarias.

4. **CRONATOGRAFIA DE EXCLUSION** .- Las moléculas se separan de acuerdo a su tamaño, la fase estacionaria posee poros de diferentes dimensiones, en donde la muestra es retenida o filtrada. Las moléculas pequeñas son retenidas en los poros, mientras que las moléculas de mayor tamaño permanecen en la fase móvil y por lo tanto son eluidas primero.

#### E. DETECTORES : (6,12)

La función de un detector es evaluar la composición de la fase móvil al salir de la columna durante todo el tiempo de análisis.

El detector ideal sería aquel que reuniera los siguientes requisitos:

- \* Alta sensibilidad.
- \* Respuesta a todos los componentes de la muestra.
- \* Amplio intervalo de linealidad.
- \* Respuesta no modificada por cambios en la velocidad de flujo o de temperatura.
- \* Respuesta independiente a la fase móvil.
- \* Que no destruya la muestra.
- \* De respuesta rápida.
- \* Bajo nivel de ruido.
- \* De fácil operación y adquisición.

Para resolver un determinado problema la elección del detector dependerá de las características del soluto, la sensibilidad y la selectividad, además de la conveniencia económica y práctica de su uso.

Los detectores se pueden clasificar dentro de dos grandes grupos:

1) Detector de tipo universal, que mide el cambio que sufre la fase móvil y la muestra en alguna propiedad física, por ejemplo el detector de índice de refracción.

2) Detectores de tipo selectivo, sensibles únicamente a una propiedad específica del soluto, por ejemplo, el detector de absorción en U.V.

Los detectores más utilizados en CLAR son :

Espectrofotómetro U.V./Visible

Detector de índice de refracción.

Detector de fluorescencia.

Detector electroquímico.

Espectrofotómetro de infrarrojo.

Detector de arreglo de fotodiodos.

Detector conductimétrico.

Detector de radioactividad.

#### DETECTORES ULTRAVIOLETA.

Son los detectores de mayor uso en CLAR, debido a que muchos compuestos tienen uno o más enlaces dobles o con electrones no enlazados y no compartidos que absorben luz ultravioleta. Las

ventajas son su costo relativamente bajo, la alta sensibilidad (nivel de nanogramos), así como la insensibilidad a los cambios de temperatura, velocidad de flujo, y composición de la fase móvil.

Estos detectores operan sobre el principio de la ley de Lambert-Beer. Dentro de éstos existen tanto de longitud de onda fija como de longitud de onda variable.

Los detectores de onda fija tienen como fuente de luz una lámpara de mercurio, de zinc o de cadmio, y se pueden obtener las siguientes longitudes de onda: 254, 280, 313 nm entre otras. Tienen la ventaja de una fuente de luz muy intensa y niveles de ruido muy bajos, aun cuando las longitudes de onda no coincidan con el máximo de absorción de los solutos.

Los espectrofotómetros de longitud de onda variable son los más utilizados, permiten la selección de una longitud de onda de 190 a 600 nm, usa una lámpara de deuterio cuyas líneas de emisión están a 254 nm, 280 nm, 313 nm, 334 nm, y 365 nm. La luz de origen se enfoca en la entrada de la abertura de un monocromador, por lentes apropiados esta luz blanca incide en la rejilla en donde se dispersa en varias longitudes de onda. Por la posición de esta rejilla se elige la longitud que pasa a través de las celdas de la muestra y referencia por medio de un haz de luz dividido. Con esto se producen dos haces separados de igual intensidad, que se enfocan sobre las celdas de flujo duales por medio de un lente de cuarzo. La ventaja de estos espectrofotómetros es un amplio intervalo de valores de longitud de onda. la capacidad de variar tales longitudes sin cambiar los filtros de las lámparas y la posibilidad de operar a

longitudes de onda inferiores a 254 nm. Aunque los niveles de ruido son mayores que en los de longitud de onda fija.

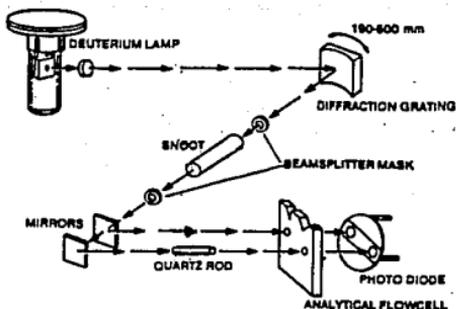


FIGURA 10 : Partes fundamentales de un detector de UV - VIS.

#### DETECTOR DE INDICE DE REFRACCION.

Es un detector de respuesta universal, mide la diferencia entre los índices de refracción del disolvente puro y de la solución de la muestra, es moderadamente sensible en el orden de  $\mu\text{g}$  o ppm y no destruye a la muestra. Su estabilidad es buena, es sensible a los cambios de temperatura y de flujo y la señal que genera puede ser positiva o negativa dependiendo de si el índice de refracción de la solución que contiene la muestra es mayor o menor que el índice de refracción del disolvente.

#### DETECTOR DE FLUORESCENCIA.

Es uno de los detectores más sensibles ya que es posible detectar cantidades del orden de picogramos. Existen dos diseños: los fluorómetros de filtros que emplean filtros para seleccionar la radiación de excitación y la de emisión, y los espectrofluorómetros que emplean monocromadores. Su mayor ventaja es su alta selectividad de respuesta y su sensibilidad.

En algunos casos cuando la muestra no tiene propiedades fluorescentes se pueden formar derivados que si tengan ésta propiedad.

#### DETECTOR ELECTROQUIMICO.

La detección electroquímica se basa en que muchas moléculas orgánicas e inorgánicas incluyendo muchos fármacos pueden ser electroquímicamente oxidados o reducidos por un electrodo adecuado. Si las condiciones cromatográficas se controlan cuidadosamente, la detección electroquímica es muy precisa y sensible hasta el orden de picomoles.

#### DETECTOR DE INFRAROJO.

Los compuestos orgánicos absorben energía a diversas longitudes de onda del espectro infrarrojo debido a la presencia de grupos funcionales específicos, éste detector se fija a esa longitud de onda y responde a ese grupo funcional. Estos detectores resultan útiles cuando el compuesto no es detectado en uv/vis o por los detectores de índice de refracción o bien, cuando el analista desea determinar la distribución de los grupos funcionales.

## DETECTOR DE ARREGLO DE FOTODIODOS. (DAF) (1,22)

El DAF es un sistema fotométrico uv/vis, que se basa en un arreglo lineal de fotodiodos, en el cual se transmite luz blanca de una lámpara de deuterio, ésta luz pasa a través de un lente y un obturador hacia la celda de flujo. La luz transmitida se enfoca a una rejilla de difracción donde se separa en el espectro de 190 a 800 nm e incide en el arreglo de fotodiodos, La relación entre la cantidad de energía a una longitud de onda particular que llega al fotodiodo, y la concentración de la muestra, esta descrita por la ley de Lambert - Beer.

Este instrumento permite ver los espectros rápidamente y además almacenarlos. Los beneficios que aporta son: determinar la pureza del pico y ver los espectros a diferentes tiempos de elución así como leer de una sola vez a seis longitudes de onda.

### COMPONENTES DEL DAF

- Fuente de luz: Lámpara de deuterio con un filtro de banda de paso que reduce las líneas de emisión de deuterio, y un filtro de segundo orden que atenúa los efectos de la rejilla.

- Celda de muestra: Tiene un longitud de recorrido de 10 mm, un volumen de 5  $\mu$ l y resiste una presión máxima de 1000 psi.

- Obturador: Permite el paso de la luz durante la adquisición de datos, y cierra para provocar la obscuridad en la prueba de corrección de la señal de recarga por efecto del propio sistema. Abre y cierra en un tiempo específico.

- Rejilla de difracción: Separa el haz de luz en longitudes de

onda que van de 190 a 800 nm. La rejilla concava holográfica empleada, minimiza la generación de luz extraviada.

- Arreglo de fotodiodos: 512 fotodiodos reciben la señal proveniente de la rejilla de difracción. Cada fotodiodo produce una señal analoga proporcional a la cantidad de energía recibida. Durante el tiempo de análisis, los canales se abren en secuencia permitiendo que las señales del DAF sean recibidas, para posterior procesamiento de datos. El último canal se cierra al final del tiempo de análisis, terminando el barrido espectral.

- Circuito amplificador: La descarga de cada fotodiodo se convierte en una señal diferencial de potencial, a través de un amplificador. Un circuito mantiene los datos hasta que estos son enviados a través de un convertidor analógico-digital, a la memoria de la computadora como una señal digital.

Computadora: Recibe la señal de salida por recarga de los fotodiodos y calcula la absorbancia a cada longitud de onda de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$A = - \log (P/P_0) = - \log (S_n - D_n)/(R_n - D_n)$$

Donde:

P = Luz transmitida

P<sub>0</sub> = Luz incidente

S = Señal obtenida durante el análisis

D = Señal obtenida durante la prueba de recarga por efecto del sistema

R = Señal obtenida durante la prueba con la fase móvil

n = Canal o número de fotodiodo (1,2,3.....512)

$P/P_0 = T$ , (transmitancia)

$S - D = P$  (D, señal obtenida en la oscuridad)

$R - D = P_0$  (R, luz transmitida por el disolvente)

Los datos cromatográficos y espectrales se adquieren y colocan en la memoria de la computadora.

PROCESADOR: Los datos se envían a la computadora para ser procesados y colocados en la pantalla. El resultado de " la prueba en la oscuridad " (señal medida en la oscuridad), y la prueba de referencia (luz transmitida por el disolvente en la celda de muestra), son almacenados en la memoria de la computadora. Después de la inyección de la muestra las señales del DAF son empleadas para calcular la absorbancia a cada longitud de onda.

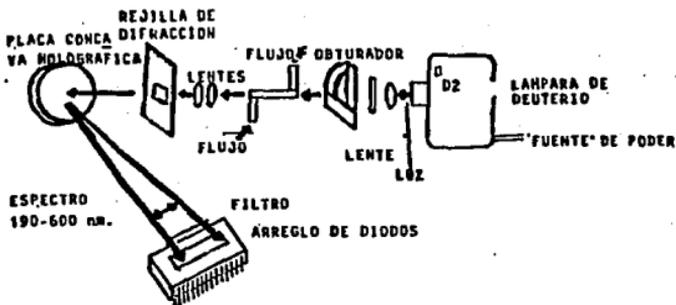


FIGURA 11 : Representación esquemática de los componentes ópticos del DAF.

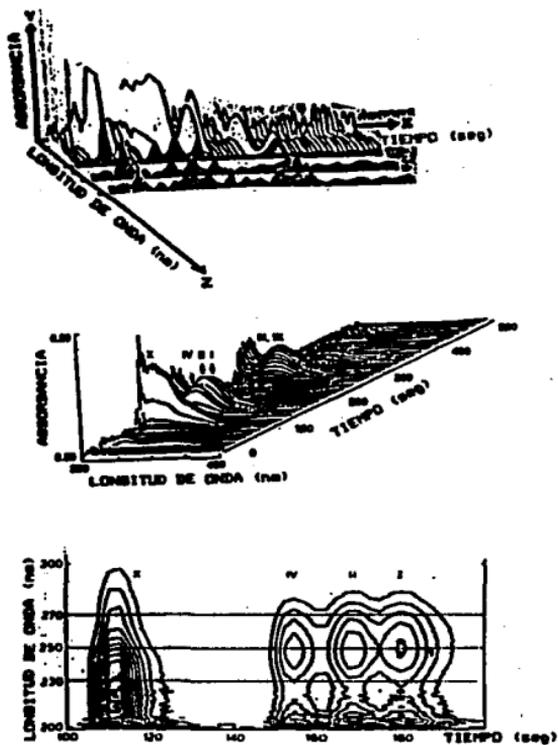


FIGURA 12 : Espectros UV con detector de fotodiodos.

#### F. Registradores.

La señal que es transmitida por el detector es recibida por un registrador y/o integrador el cual transforma ésta en picos cromatográficos y calcula las áreas o las alturas de éstos. Dependiendo de la marca y modelo ofrecen diversas perspectivas.

#### FASE MOVIL (6,18,19)

Aunque la fase móvil no es parte del instrumental propiamente dicho, el control de la presión, el flujo y la composición de la misma son muy importantes.

Las características que debe presentar toda fase móvil son :

- Disolver a la muestra
- No degradar o disolver la fase estacionaria
- Tener baja viscosidad
- Ser compatible con el tipo de detector utilizado
- Tener la polaridad adecuada para permitir una retención conveniente de la muestra en la columna
- Exenta de partículas extrañas y de burbujas de aire

Es esencial que la muestra sea compatible con la fase móvil para que pueda ser transportada a través de la columna evitando que se precipite dentro de la cámara de inyección o dentro de la columna, ya que puede tapar al sistema, dañar la columna y en algunos casos se puede propiciar la pérdida de resolución en la separación.

Es indispensable filtrar la fase móvil a través de una membrana de por los menos 2  $\mu$ m de porosidad y además hay que eliminar los

gases disueltos que provocan la formación de burbujas. Esto se hace mediante sonicación, aplicación de vacío con ligero calentamiento o por desplazamiento de los gases con nitrógeno o algún otro gas inerte. La baja viscosidad de la fase móvil es muy importante en la eficiencia de la separación, puesto que la viscosidad influye en el efecto de transferencia de masa entre la fase móvil y la fase estacionaria. Los disolventes más comúnmente empleados son: agua, metanol, acetonitrilo, isopropanol, tetrahidrofurano, cloruro de metileno, cloroformo, cloruro de butilo, hexano. Dichos disolventes deben ser de alta pureza, usualmente grado espectroscópico o bien grado cromatográfico lo cual es muy importante cuando se desea realizar análisis de alta sensibilidad.

#### ADITIVOS Y MODIFICADORES ORGANICOS

La composición de la fase móvil juega un papel importante en la retención y la selectividad tanto para los grupos hidrofóbicos como para los grupos polares de los compuestos a separar. Con las fases móviles se trata de minimizar la acción de los grupos Si-OH residuales, cuya interacción con las moléculas de la muestra afectan la resolución de los picos. (19)

Las soluciones reguladoras son los aditivos más utilizados en sistemas de fase inversa, actúan controlando la fuerza iónica y el pH del sistema de acuerdo a las propiedades de los compuestos a separar.

Las sales más utilizadas son las de fosfato, acetato, formiato y trifluoroacetato, de sodio o de potasio. De las anteriores las de

fosfatos son la más comunes, ya que sus soluciones son muy estables a temperatura ambiente y presentan un amplio intervalo de control de pH.

Los modificadores amino son utilizados en fase inversa con el propósito de mejorar la simetría de los picos cromatográficos, la trietilamina se utiliza en concentraciones cercanas a 5 mM. El carbonato de amonio al 0.1% se usa para obtener el mismo efecto, así como las sales de tetraalquilamonio y varios aniones orgánicos como el formiato de amonio. Las aminas y otros compuestos de carácter básico adicionados a la fase móvil, se asocian con los grupos silanoles (Si-OH) libres de la fase estacionaria, disminuyendo la interacción de estos con los compuestos de la muestra.

#### FUERZA IÓNICA Y pH

Hasta la fecha no ha sido posible predecir cuantitativamente la influencia de los cambios en la fuerza iónica sobre los procesos de separación cromatográfica, ni en parámetros como el factor de capacidad. Esto se debe en parte a la diversidad de las interacciones entre las especies iónicas a concentración elevada de las sales en la fase móvil. Probablemente el factor más importante a considerar es la constante de ionización del soluto, ya que, en el caso de un ácido débil, al aumentar la fuerza iónica la disociación es mayor, siendo más pronunciado el efecto cuando el pH de la fase móvil está cercano al pKa del ácido débil. (10,11)

Al aumentar la fuerza iónica, la solubilidad de los compuestos se ve afectada por el fenómeno de competencia de la sal por la fase

acuosa, se da también una disminución de la repulsión electrostática entre las moléculas ionizadas y un aumento en la tensión superficial de la fase acuosa. Así, se esperaría que al aumentar sustancialmente la fuerza iónica en CLAR fase inversa, la retención de los compuestos sería mayor, sin embargo este efecto no siempre ocurre.

El pH es un factor importante para establecer el equilibrio de ionización de los compuestos iónicos. Por las ecuaciones que representan la disociación de ácidos y bases se han determinado valores de pH, estos valores han sido referidos a soluciones acuosas, mientras que en cromatografía líquida, y en particular de fase inversa, la mezcla de disolventes es lo más común, estas mezclas de disolventes orgánicos con agua no proveen un valor de pH que sea evaluado con exactitud, sin embargo se hace una aproximación al valor deseado. La dependencia del tiempo de retención con el valor de pH se hace más evidente cuando la fase móvil es una mezcla de disolventes orgánicos y acuoso, ya que cambios en la proporción de disolvente orgánico influyen en el grado de ionización del compuesto. Cuando el pH de la fase móvil es cercano al pKa de la sustancia a analizar, los cambios en la retención y la selectividad por efecto del pH son más drásticos.

Como la forma ionizada es menos retenida en CLAR en fase inversa que la forma neutra, el efecto del equilibrio de protonación en el proceso de retención puede controlarse mejor manteniendo el pH de la fase móvil en cierto valor, utilizando solución reguladora, por efecto de supresión de la ionización del compuesto.

## TERMINOLOGÍA EN CLAR

Tiempo de retención ( $t_r$ ) : (9,20,21)

Es el tiempo que la muestra permanece dentro de la columna, se mide desde el momento en que la muestra se introduce en el sistema hasta que se obtiene el punto máximo de la señal o pico. El tiempo de retención es característico de la fase móvil de la columna y la temperatura.

Volumen de retención ( $V_r$ ) :

Es el volumen total de fase móvil requerida para que el compuesto se eluya al máximo.

Cuando el flujo ( $F_c$ ) de la fase móvil es constante se tiene lo siguiente:

$$t_r = \frac{V_r}{F_c}$$

EL  $V_r$  y el  $t_r$  se tienen que corregir para conocer exactamente el volumen o el tiempo que se ocupa para la elución del compuesto:

$$t'R = t_r - t_0$$

$$V'R = V_r - V_M$$

Donde:  $t'R$  y  $V'R$  son el tiempo y el volumen de retención corregidos,  $t_0$  es el tiempo muerto, que es el tiempo requerido para eluir un compuesto no retenido en la columna y  $V_M$  es el volumen de fase móvil que se requiere para llenar la columna, volumen muerto.

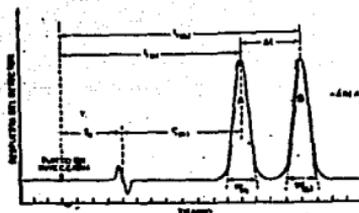


FIGURA 13 : Cromatograma

Factor de capacidad (K) :

El factor de capacidad indica el tiempo que el compuesto es retenido por la columna y depende de la naturaleza química y temperatura de las fases líquidas que conforman al sistema, se define como:

$$K = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t'R}{t_0}$$

Normalmente se debe tener K en un intervalo de 1 a 10 para asegurar la separación del compuesto con las posibles impurezas del disolvente, si K es mayor de 10 se tienen problemas con el tiempo de análisis.

Número de platos teóricos (N)

El número de platos teóricos indica la eficiencia de la columna

cromatográfica. Un plato teórico es el equilibrio de distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria .

N se puede definir matemáticamente como:

$$N = a(tr/W)^2$$

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

Donde :

a = una constante que depende del método utilizado para determinar N.

tr = el tiempo de retención del soluto.

W = el ancho del pico cromatográfico extrapolando los lados del pico a la línea base.

N = el número de platos teóricos y depende de la longitud de la columna y del tamaño de partícula.

Existen varios métodos para determinar el número de platos teóricos, el método más utilizado es el 5  $\sigma$ , debido a que tiene mayor sensibilidad, ya que toma en cuenta la asimetría de los picos cromatográficos, por lo tanto, da mayor información sobre la eficiencia de la columna. Esto se muestra en la siguiente figura:

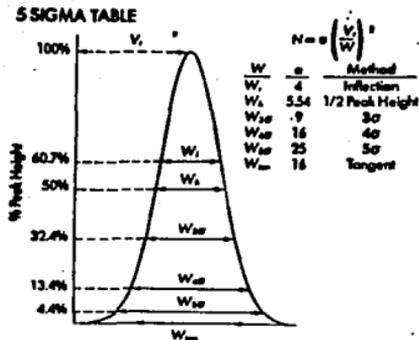


FIGURA 14 : Alternativas para el cálculo del número de platos teóricos.

Selectividad ( $\alpha$ ) :

El factor de selectividad proporciona información sobre la posición relativa de dos picos adyacentes y se define como:

$$\alpha = \frac{t'R (B)}{t'R (A)} \quad \text{Si } \alpha = 1 \text{ no hay separación}$$

Resolución ( $R_s$ ) :

El factor de resolución es una medida cuantitativa del grado de separación obtenido entre dos compuestos. Se define la resolución como el cociente entre la distancia de los máximos de dos picos y el valor medio de la anchura del pico en la base:

$$R_s = \frac{tR (B) - tR (A)}{1/2 (W_A + W_B)}$$

Si  $R_s$  es igual a 1,5 se tiene una resolución ideal, es decir una resolución hasta línea base.

La ecuación general para la resolución es :

$$R = \sqrt{N \left[ (\alpha - 1) / \alpha \right] \left[ K / (K + 1) \right] / 4}$$

En esta ecuación se observa que la resolución es función de la eficiencia de la columna, que depende de la selectividad y de la capacidad del sistema cromatográfico.

Altura equivalente a un plato teórico (AEPT):

Es la longitud de la columna requerida para obtener un equilibrio de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria.

Se calcula como:

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

Donde: L = longitud de la columna.

N = número de platos teóricos.

Coefficiente de distribución o reparto (K) :

Es la relación de la cantidad de masa del soluto en la fase móvil y la fase estacionaria. Se representa por:

$$K = \frac{\text{Cantidad de muestra / mililitros de fase estacionaria}}{\text{Cantidad de muestra / mililitros de fase móvil}}$$

Es una propiedad física característica de cada muestra y del sistema cromatográfico.

Factor de simetría (T) :

Es la medida de la simetría del pico cromatográfico, y se define como:

$$T = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

Donde  $W_{0.05}$  es el ancho del pico al 5 % de su altura, medida desde la base y  $f$  es el ancho del pico medido desde la línea que divide el pico pasando por el vértice y la línea tangente. Para que la forma del pico sea considerada aceptable, el valor de  $T$  no deberá exceder a 1.4 .

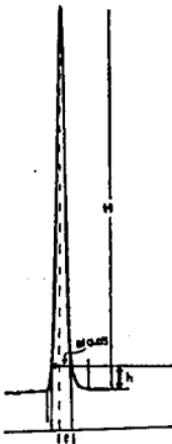


FIGURA 15 : Parámetros par el cálculo de T.

## CRITERIOS DE VALIDACION

La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

La validación incluye dos partes :

1) Sistema

- Linealidad
- Precisión

2) Método

- Linealidad
- Exáctitud
- Especificidad
- Estabilidad de la muestra
- Tolerancia del sistema

### DEFINICIONES :

**LINEARIDAD DEL SISTEMA.** 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 intervalo bien determinado.

**INTERVALO.** El intervalo de un método analítico son las concentraciones comprendidas entre los niveles de concentración superior e inferior de la sustancia (incluyendo estos niveles), en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exácto y lineal.

**EXACTITUD.** La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porciento de recobro obtenido del analisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

**PRECISION.** La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estandar o del coeficiente de variación. La precisión es una medida del grado de repetibilidad y/o reproducibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

a) **REPETIBILIDAD** .- Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones, (analista, tiempo, equipo, laboratorio, etc.).

b) **REPRODUCIBILIDAD** .- Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes, (diferentes analistas, en diferentes días, y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferente equipo, etc.).

**ESPECIFICIDAD.** Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

**TOLERANCIA.** La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el

análisis de la muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivo, columnas, sistemas de elución, tipos de empaque, condiciones ambientales, etc.

**ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.** Es la propiedad de la muestra, preparada para su cuantificación, de mantener su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de mantenerse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

**DETERMINACIONES :**

**LINEARIDAD DEL SISTEMA.**- Se determina construyendo una curva de calibración entre la concentración y la respuesta obtenida, con 5 diferentes concentraciones partiendo de una misma solución patrón. Los análisis se hacen por triplicado de muestras independientes incluyendo la concentración seleccionada como el 100 % . Se considera al 100 % como la concentración de la muestra en la solución final a analizar que proporciona una respuesta adecuada dependiendo del método de cuantificación.

**CRITERIO DE ACEPTACION**

$$r \geq 0.99 \qquad r^2 \geq 0.98 \qquad \text{C.V.} \leq 1.5 \%$$

Métodos microbiológicos  $r^2 \geq 0.98$

**PRECISION DEL SISTEMA.**- Se determina del análisis por sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100 % establecido en la linealidad del sistema.

#### CRITERIO DE ACEPTACION

C.V.  $\leq$  1.5 %

Métodos microbiológicos C.V.  $<$  3 %

**ESPECIFICIDAD.** - Especificidad para métodos de control de calidad.

Con el método propuesto :

- 1.- Analizar placebos del producto.
- 2.- Identificar las respuestas del (los) activo(s), y si procede de los excipientes y/o de otras sustancias presentes.

#### CRITERIO DE ACEPTACION

Confirmar que el método desarrollado es capaz de cuantificar las sustancias de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes.

**ESPECIFICIDAD PARA METODOS INDICADORES DE ESTABILIDAD.** - En caso de contar con los posibles productos de degradación, preparar muestras de placebo "adicionado" de estos y la sustancia de interés y analizar con el método propuesto. Si no se cuenta con los productos de degradación, es necesario degradar la muestra bajo diferentes condiciones. La degradación debe ser tal que la concentración de la sustancia en estudio esté disminuida de ser posible en un 25 % con respecto a la original.

Se sugieren los siguientes métodos para degradar la sustancia; la persona que realice el estudio deberá escoger aquel que de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas del compuesto, sea el más adecuado:

1. Colocar la sustancia de interés, el placebo y muestras del lote

del producto, en un horno a 70 - 120 °C o a 20 °C por debajo del punto de fusión de la sustancia de interés durante un apropiado número de días (2 a 4 semanas).

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

3. Si es necesario, hacer soluciones de la sustancia de interés ajustando el pH a 1-2 y/o 10-14 y colocarlas a 60 - 80 °C durante 2 a 4 semanas.

4. Las muestras pueden degradarse por oxidación, (con peróxido de hidrógeno) y permanecer de 2 a 4 semanas a temperatura ambiente.

#### CRITERIO DE ACEPTACION

Verificar que los productos de degradación o sustancias relacionadas no interfieren con la cuantificación de la sustancia de interés utilizando el método desarrollado.

**LINEARIDAD DEL METODO.**- Se determina a partir de placebos adicionados de 5 diferentes cantidades del principio activo, (placebos cargados), cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado. Las concentraciones de los placebos cargados deben ser las adecuadas para que utilizando el método propuesto, las concentraciones de la soluciones finales a analizar, esten dentro del intervalo de la linealidad del sistema, incluyendo siempre la correspondiente al 100 % .

### CRITERIO DE ACEPTACION

1.- Con respecto a la cantidad adicionada contra la cantidad recuperada :

$$m = 1 \quad b = 0 \quad r^2 \geq 0.98$$

2 - Con respecto al por ciento recuperado :

Promedio = 100 %

Los coeficientes de variación a cada nivel y el global de todo el intervalo deben estar de acuerdo a la siguiente tabla.

METODOS	PROMEDIO DE RECOBRO	C.V.
Cromatográficos	98 - 102 %	< 2%
Titrimétricos	98 - 102 %	< 2%
Químicos y espectro- fotométricos	97 - 103 %	< 3 %
Microbiológicos	95 - 105 %	< 5 %

NOTA : Para suspensiones y semisólidos se acepta un incremento de 1 % en el intervalo para los recobros y un C.V. de < 3% .

**EXACTITUD AL 100 %** .- Se determina de cuando menos 6 placebos cargados con la cantidad del principio activo considerado como 100 % en la linealidad del método, haciendo los análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

#### CRITERIO DE ACEPTACION

Promedio = 100 %

El C.V. y el % recuperado deberá cumplir con los criterios de la tabla anterior.

**REPRODUCIBILIDAD.** - Se determina de una muestra homogénea del producto final cercana al 100 % de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas en dos días diferentes y por triplicado.

#### CRITERIO DE ACEPTACION :

El C.V. total debe cumplir con los siguientes criterios :

	Cromatográfico	< 2 %
METODO	Químico y espectrofotométrico	< 3 %
	Microbiológico	< 5 %

**ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA.** - Se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de 3 muestras con los obtenidos de las muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones.

Almacenar las muestras a diferentes condiciones (ejemplo: Temperatura ambiente, refrigeración, protegidos de la luz, etc.), durante un tiempo preestablecido por el analista, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia. Reanalizar bajo las mismas condiciones, utilizando un estándar recién preparado para cada tiempo. La determinación debe ser efectuada por un mismo analista.

#### CRITERIO DE ACEPTACION :

Las muestra es estable si el I.C. para la diferencia de la media de

la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero, y/o la magnitud del efecto no debe exceder los siguientes porcentajes.

Cromatográficos	$\pm 2 \%$
Titrimétricos	$\pm 2 \%$
Químicos y espectrofotométricos	$\pm 3 \%$
Microbiológicos	$\pm 5 \%$

C A P I T U L O    I I I

D E S A R R O L L O

Y

U A L I D A C I O N

D E L

M E T O D O

## DESARROLLO DEL METODO

### EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS.

#### EQUIPO:

- Balanza analitica metlier AJ150
- Baño ultrasonido Fisher Scientific
- Bomba Waters 600 PF
- Columna HPLC  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> 125 A 10  $\mu$ m 3.9 mm x 300 mm
- Detector de longitud de onda variable Waters 484
- Detector Waters 990 de arreglo de fotodiodos
- Integrador y registrador Waters 745 B
- Inyector automático WISP modelo 712
- Inyector manual Waters U6K
- Sistema controlador Waters 600 E

#### MATERIAL :

- Equipo de filtración Millipore
- Membranas de filtración Millipore tipo GVWP de 0.22  $\mu$ m
- Microjeringa Hamilton de 25  $\mu$ l

#### REACTIVOS :

- Agua destilada
- Metanol HPLC
- Metanol RA

- Solución 0.05 M de ácido fosfórico.
- Sustancia patrón de referencia Sigma de difenilhidantoína sódica
- Materias primas de difenilhidantoína sódica

## SELECCION DE LAS CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

Las etapas importantes que se consideraron para desarrollar el método analítico descrito en este trabajo fueron las siguientes: Revisión bibliográfica, Desarrollo del método y Validación de la técnica desarrollada.

Se hizo una revisión bibliográfica exhaustiva, con la finalidad de conocer las propiedades fisicoquímicas, estabilidad, interacciones del principio activo, así como métodos para la cuantificación de difenilhidantoína sódica principalmente por HPLC.

Para contar con un patrón de referencia plenamente identificado y de pureza conocida fué necesario certificar una materia prima. Esto se llevó a cabo realizando las pruebas para difenilhidantoína sódica como materia prima de acuerdo a las referencias 7, 2 y 20.

En el desarrollo del método analítico por CLAR se consideraron las propiedades fisicoquímicas de este fármaco como su solubilidad, pka, polaridad, etc. Además de que se revisaron los métodos cromatográficos reportados en la literatura 8 y 20.

Por ser la difenilhidantoína sódica un ácido débil, poco polar y muy soluble en alcoholes, ha sido analizada por cromatografía líquida en fase inversa.

De los métodos reportados se probó el siguiente:

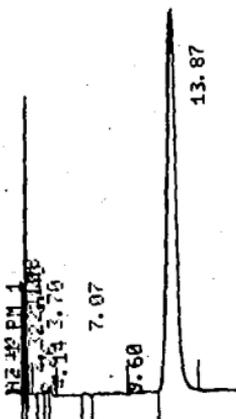
Fase móvil: Metanol - Agua - Acido acético (40:59.5:0.5)

Columna :  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> 10 micras 300 mm x 3.9 mm.

Longitud de onda : 254 nm.

Bajo estas condiciones se inyectaron 20  $\mu$ l de una solución de 20 mcg/ml de difenilhidantoina sódica. Se obtuvo un pico simétrico, bien integrado aunque el tiempo de retención fué largo de aproximadamente 14 minutos.

CROMATOGRAMA 1



Con el fin de saber si el Área era directamente proporcional a la concentración se determinó la linealidad del sistema de 100 a 500 mcg/ml. El coeficiente de determinación fué de 0.998 y el coeficiente de variación de 1.91 %. muy alto, por lo que fué necesario optimizar

las condiciones cromatográficas. Con esta linealidad se observó que a mayor concentración el coeficiente de variación disminuía.

Se siguieron haciendo pruebas modificando las proporciones de agua y metanol y aumentando la concentración del principio activo hasta que finalmente la linealidad quedó de 300 a 700 mcg/ml. Además se cambió el ácido acético por ácido fosfórico 0.05 M, porque se obtuvo un pico con forma muy aceptable y con un tiempo de retención de 5 minutos aproximadamente.

CROMATOGRAMA 2



El sistema cromatográfico finalmente quedó :

Fase móvil : Metanol - Agua - Acido fosfórico 0.05 M ( 55:45:0.6)

Columna :  $\mu$ Bondapak C18 10 micras 300 mm x 3.9 mm.

Longitud de onda: 254 nm.

Volumen de inyección: 20  $\mu$ l.

Flujo : 1.5 ml/min.

Velocidad de carta : 0.25 cm/min.

Las muestras al 100 % quedaron con una concentración de 500 mcg/ml en metanol.

Bajo estas condiciones se determinó otra vez la linealidad del sistema obteniéndose un coeficiente de determinación de 0.998 y un coeficiente de variación de 1 %, los cuales están dentro de los límites establecidos.

#### ESPECIFICIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Para evaluar la especificidad del sistema propuesto, se sometieron a degradación muestras de placebo, materia prima y producto terminado en condiciones extremas, verificando la aparición de productos de degradación en los cromatogramas obtenidos.

Se prepararon soluciones acuosas a pH 10 - 12 con hidróxido de sodio y soluciones a pH 1 - 2 con ácido clorhídrico disolviendo las muestras previamente en la mínima cantidad de metanol. También se prepararon otras soluciones adicionadas con peróxido de hidrógeno al 40 % y se colocaron muestras en polvo bajo luz ultravioleta y a una temperatura de 80 °C.

Las muestras se sometieron a degradar de acuerdo a las condiciones y tiempos indicados en la tabla 1.

TABLA 1

CONDICION DE DEGRADACION	TIEMPO DE EXPOSICIÓN
Luz UV	Aprox. 336 h
Temperatura 80 °C	Aprox. 336 h
Acida en reflujo	Aprox. 18 h
Básica en reflujo	Aprox. 18 h
Oxidación en reflujo	Aprox. 6 h

Se analizaron los resultados bajo el sistema propuesto y se encontró en el producto terminado y en la materia prima en condiciones oxidativas dos pequeños picos que eluyen antes del pico de interés, éstos podrían ser posibles productos de degradación.

Una vez que han sido fijadas las condiciones de degradación se procedió a repetirlas, para cuantificarlas y poder decir que el porcentaje obtenido corresponde a la molécula de interés exclusivamente y no a compuestos de degradación, además para verificar que los resultados no son obra de la casualidad o del azar.

Las muestras nuevamente se degradaron de acuerdo a la siguientes condiciones :

TABLA 2

MUESTRAS	TIPO DE DEGRADACION	TIEMPO
Placebo	Acidas pH $\approx$ 1 en reflujo	15 h
	Básicas pH $\approx$ 14 en reflujo	15 h
	Oxidativas (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) en reflujo	6 h
	Luz ultravioleta	336 h
	Temperatura 80° C	336 h
Materia Prima	Acidas pH $\approx$ 1 en reflujo	15 h
	Básicas pH $\approx$ 14 en reflujo	15 h
	Oxidativas (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) en reflujo	6 h
	Luz ultravioleta	336 h
	Temperatura 80° C	336 h
Producto Terminado	Acidas pH $\approx$ 1 en reflujo	15 h
	Básicas pH $\approx$ 14 en reflujo	15 h
	Oxidativas (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) en reflujo	6 h
	Luz ultravioleta	336 h
	Temperatura 80° C	336 h

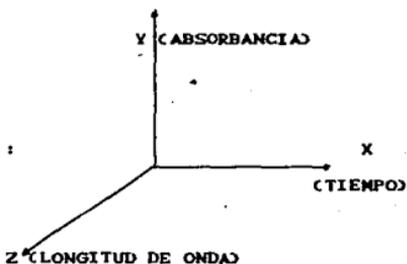
Se analizaron las muestras utilizando un detector de arreglo de fotodiodos, haciéndose un análisis espectral de 220 a 320 nm, de tal forma que se pudiera analizar el pico cromatográfico de cada muestra en tres dimensiones : absorbancia, tiempo, longitud de onda. Con esto se podrá asegurar que detrás del pico de interés no se encuentra oculto algún producto de degradación, lo cual no sería posible detectar a una sola longitud de onda, ya que la absorbancia de algún producto de degradación a la longitud de onda de trabajo sería aditiva al compuesto que se cuantifica, grave problema para estudios de estabilidad.

El detector de arreglo de fotodiodos acoplado a una computadora es capaz de obtener datos espectrales UV - VIS de 190 - 800 nm. Así, de esta manera, pueden ser adquiridos datos de los cromatogramas y espectros simultáneamente.

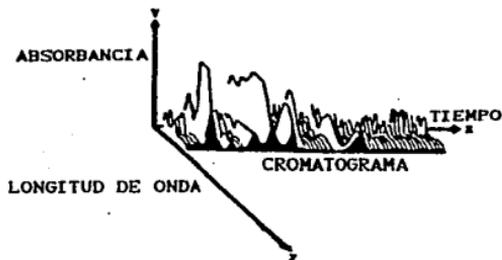
Se puede obtener en pantalla casi instantáneamente toda la información (areas, tiempos de retención, porcentos de recobro) y ver desde varios ángulos espectros y cromatogramas (perfiles topográficos) de cada corrida cromatográfica.

Los topogramas que se pueden ver se muestran en las siguientes figuras.

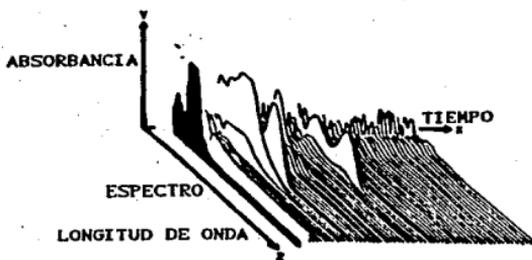
Los ejes en los que se trabaja son :



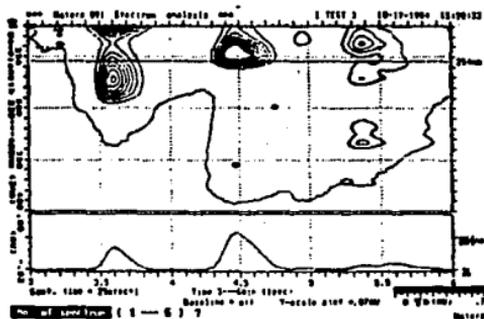
**Cromatograma :** El cromatograma es una gráfica de absorbancia en el eje Y contra tiempo en el eje X a una longitud de onda específica.



**Espectro :** El espectro es una gráfica de absorbancia en el eje Y contra longitud de onda en el eje Z a un tiempo específico.



Se pueden obtener de otra forma los topogramas como se muestra en la figura 16.



**FIGURA 16** Este topograma se divide en dos partes, en la parte superior se observan los picos cromatográficos vistos desde arriba. En el eje Z se grafica la longitud de onda, en el eje X el tiempo y en el eje Y la absorbancia (hacia arriba), de tal forma que en la parte donde el color es más oscuro la absorbancia es mayor, en la parte inferior se muestran los picos que eluyen en esa corrida.

Para comprobar la pureza del pico se hizo un análisis espectral de 220 a 320 nm, se realizaron cortes al pico cromatográfico de interés en el intervalo de tiempo en el cual el pico comienza y termina de eluir como se muestra en el siguiente perfil topográfico, figura 17.

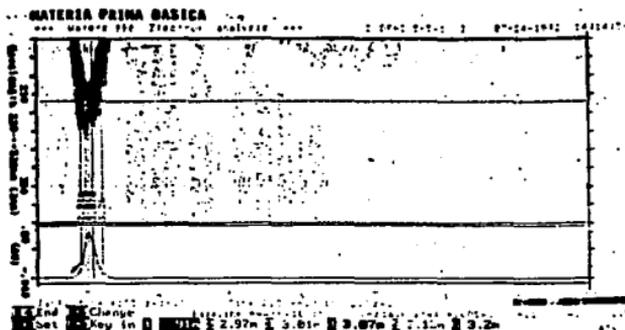


FIGURA 17 Se muestra el topograma de difenilhidantoína materia prima degradada en medio básico.

Luego, se obtuvieron los espectros para cada corte que se realizó en el intervalo de longitudes de onda al cual se hace el barrido. Por medio del software implantado en la computadora se igualan las concentraciones, a la longitud de onda de máxima absorbancia, en este caso 254 nm.

Si el pico corresponde a un compuesto puro la sobreposición de los espectros es completa, (figura 18), si esta acompañado de otro compuesto, su espectro UV es aditivo al del compuesto de interés y la sobreposición de los espectros no es completa debido a que los espectros no son iguales ya que corresponden a compuestos diferentes (figura 24).

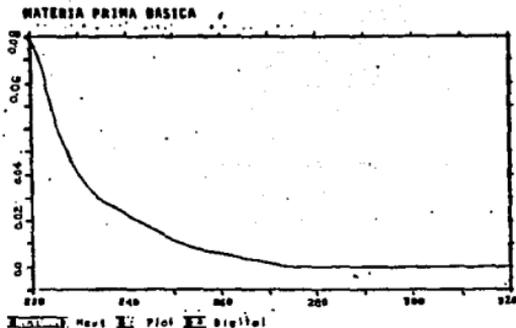


FIGURA 18 Espectros sobrepuestos de la materia prima degradada en medio básico.

Posteriormente se comparó el espectro del pico de interés contra el espectro del patrón de referencia para definir la identidad del pico. Figura 19.

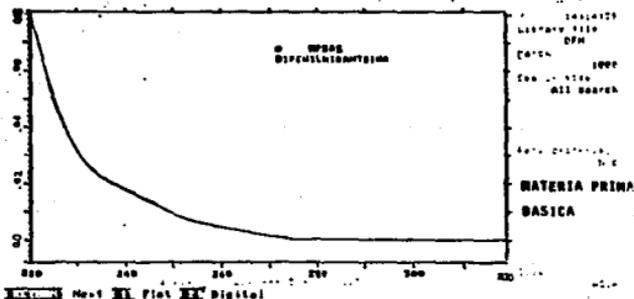


FIGURA 19 Espectros sobrepuestos de difenilhidantoína, materia prima, degradada en medio básico y de difenilhidantoína sustancia de referencia.

Se analizaron de esta forma todas las muestras degradadas indicadas en la tabla 4, para determinar la pureza del pico y para ver en donde aparecen otros picos correspondientes a productos de degradación. Además se calcularon los porcentajes de recobro, los resultados se reportan en la tabla 5 en la parte de validación en la página 86.

Al llevar a cabo este estudio se encontró que solamente en la materia prima y en el producto terminado degradados en condiciones oxidativas, aparecieron dos picos de degradación. Los perfiles topográficos se muestran en las figuras 20 y 21.

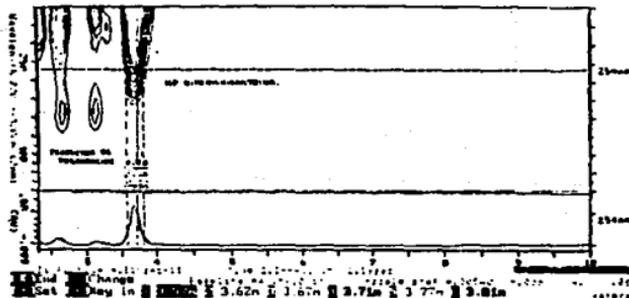


FIGURA 20 Materia prima degradada en condiciones oxidativas

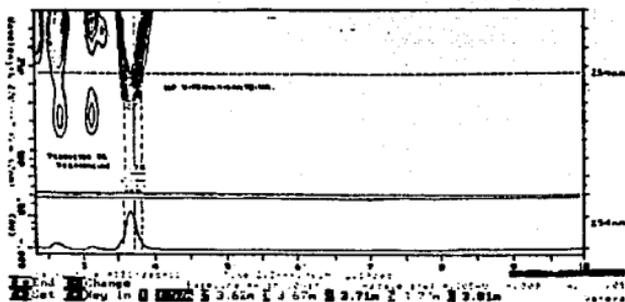


FIGURA 21 Producto terminado degradado en condiciones oxidativas.

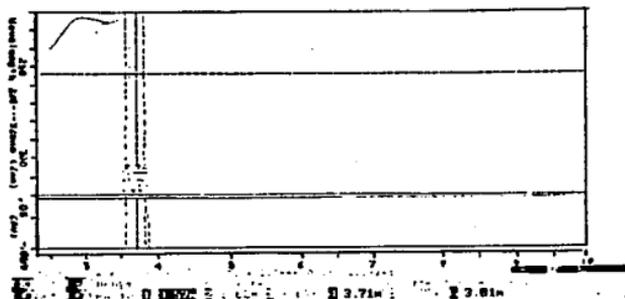


FIGURA 22 Placebo degradado en condiciones oxidativas.

Como se observa en el topograma del placebo (figura 22) no hay ningun pico por lo que se deduce que los dos picos presentes en los otros dos topogramas (figura 20 y 21) corresponden a productos de degradacion de la difenilhidantoína.



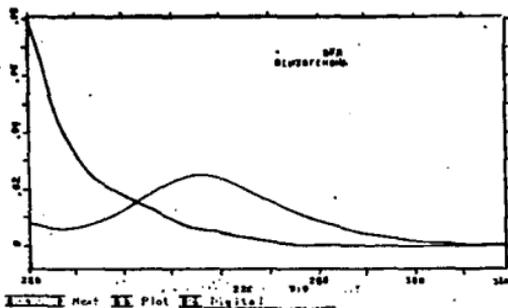


FIGURA 24 se muestran los espectros de difenilhidantoína y de benzofenona, y se observa que no hay sobreposición debido a que son compuestos diferentes.

#### SELECCION DE LA SUSTANCIA PATRON DE REFERENCIA INTERNA (SPRI)

Después de haber determinado el sistema cromatográfico y que se ha demostrado su especificidad se buscó una SPRI que tuviera un tiempo de retención mayor que la difenilhidantoína sódica y menor que la benzofenona, debido a que en condiciones oxidativas, antes del pico de interés, se obtuvieron picos de degradación. Además de que las muestras se prepararon en metanol y en los primeros minutos salen pequeños picos correspondiente a este disolvente.

Para elegir la SPRI se debe probar compuestos que no reaccionen con el compuesto de interés, que no interfiera ni se presente en tiempos de retención correspondientes a productos de degradación. Dado que existe una gran variedad de compuestos que se pueden probar de acuerdo a las características anteriores se consideraron los siguientes criterios :

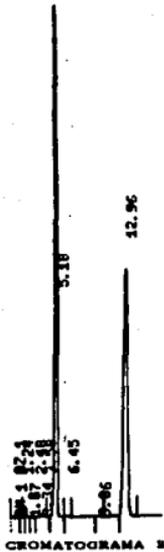
- a) Sustancias similares en estructura al compuesto de interés.
- b) Sustancias que absorban significativamente a 254 nm.
- c) Sustancias que se tenga la referencia de que se analizan bajo condiciones cromatográficas similares.

Las sustancias que se probaron fueron : Azatioprina, fenilbutazona, ibuprofen, metilparabeno, naproxeno, piroxicam.

El cromatograma en donde se obtuvo mejor resolución y un tiempo de retención adecuado fue el de difenilhidantoína y naproxen, además el naproxen cumple con las características mencionadas anteriormente por lo que esta sustancia se eligió como SPRI. Cromatograma 3.

Con objeto de disminuir el tiempo de análisis, se modificó la polaridad de la fase móvil variando la proporción de metanol y agua. Al aumentar la proporción de metanol disminuye la polaridad de la fase móvil, entonces la difenilhidantoína y el naproxen que son moléculas poco polares son más afines a la fase móvil por lo que eluyen más rápidamente.

A continuación se presentan los cromatogramas obtenidos.



FASE MOVIL A

Metanol : Agua : Solución 0.05 M de  $H_3PO_4$

(55 : 45 : 0.6)

Resolución : 19

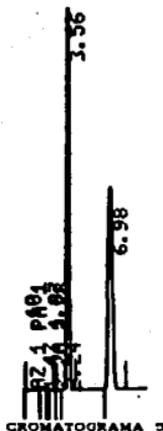
FASE MOVIL B

Metanol : Agua : Solución 0.05 M de  $H_3PO_4$

(70 : 30 : 0.6)

Resolución : 6





FASE MOVIL C

Metanol : Agua : Solución 0.05 M de  $\text{H}_2\text{PO}_4$

(64 : 36 : 0.6)

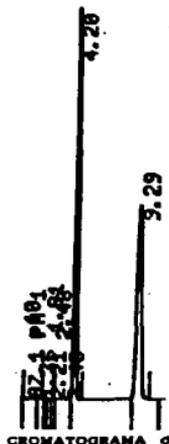
Resolución : 8

FASE MOVIL D

Metanol : Agua : Solución 0.05 M de  $\text{H}_2\text{PO}_4$

(58 : 42 : 0.6)

Resolución : 14



Se decidió que la mejor fase móvil para control de calidad es la fase móvil B, porque se obtuvo una buena resolución y el tiempo en que eluyen los componentes es corto. Para estudios de estabilidad se propone utilizar la fase móvil D porque el tiempo no es muy largo y se pueden apreciar con mayor facilidad picos correspondientes a productos de degradación además hay buena resolución.

## METODO ANALITICO

El método analítico que se validó, para cuantificar difenilhidantoína sódica en tabletas quedó de la siguiente forma :

CONDICIONES CROMATOGRAFICAS :

FASE MOVIL : Metanol : Agua :  $H_3PO_4$  0.05 M (58 : 42 : 0.6)

COLUMNA :  $\mu$ Bondapak  $C_{18}$  3.9 mm x 300 mm.

VOLUMEN DE INYECCION : 15  $\mu$ l.

FLUJO : 1.5 ml/min.

ATENUACION : 256

LONGITUD DE ONDA : 254 nm.

VELOCIDAD DE CARTA : 0.25 cm/min.

### SOLUCION PATRON DE REFERENCIA INTERNA

Pesar aproximadamente con exactitud 30.0 mg de naproxen transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar 50 ml de metanol, sonicar durante 5 minutos, llevar a volumen con metanol y mezclar.

### SOLUCION PATRON DE REFERENCIA

Pesar aproximadamente con exactitud 62.5 mg de sustancia de referencia de difenilhidantoína sódica, transferirlos a un matraz volumétrico de 25 ml, adicionar 15 ml de metanol R.A. sonicar durante 5 minutos, llevar a volumen con metanol R.A. y mezclar. Tomar una alícuota de 5 ml y transferir a un matraz volumétrico de 25 ml, adicionar 5 ml de la solución patrón de referencia interna, llevar a volumen con metanol RA y mezclar.

#### SOLUCION PROBLEMA

Moler no menos de 20 tabletas, pesar el equivalente a 62.5 mg de difenilhidantoína sódica y transferirlos a un matraz volumétrico de 25 ml, adicionar 15 ml de metanol RA, sonicar durante 5 minutos y agitar mecánicamente durante 15 minutos, llevar a volumen con metanol RA y mezclar. Filtrar desechando los primeros mililitros, tomar una alícuota de 5 ml del filtrado, transferirla a un matraz volumétrico de 25 ml, adicionar 5 ml de solución patrón de referencia interna, llevar a volumen con metanol RA y mezclar.

Una vez desarrollado el método se continuó con la validación.

## VALIDACION DEL METODO ANALITICO

Para validar el método se evaluarón los siguientes parámetros :

- Linealidad del sistema
- Precisión del sistema
- Especificidad
- Linealidad del método
- Exactitud del método al 100 %
- Reproducibilidad
- Estabilidad de la solución de la muestra
- Tolerancia del sistema.

### LINEARIDAD DEL SISTEMA (Tabla No. 3)

Se llevó a cabo preparando una solución de difenilhidantoína sódica en metanol y se tomaron alícuotas para obtener soluciones de 300, 400, 500, 600, 700 mcg/ml que corresponden al 60, 80, 100, 120, 140 por ciento de la concentración elegida como 100 % (500 mcg/ml). Cada solución se preparó por triplicado. Se analizaron las muestras bajo el método propuesto y se determinó la linealidad del sistema graficando concentración de las muestras vs área de difenilhidantoína. (Gráfica No. 1).

## LINEARIDAD DEL SISTEMA

(TABLA No. 9)

CONCENTRACION (C) mcg/ml	AREA (A) #D H S	FACTOR A/C
300	2025084	6750.280000
300	2012398	6707.993333
300	2012575	6708.583333
400	2697907	6744.767500
400	2657867	6644.667500
400	2793467	6758.667500
500	3340046	6688.992000
500	3395773	6791.546000
500	3336938	6673.876000
600	4016042	6693.403333
600	4006147	6676.911667
600	4016264	6693.773333
700	4656859	6652.655714
700	4628767	6612.524286
700	4556406	6509.151429

### RESULTADOS

COEFICIENTE DE  
DETERMINACION ( $r^2$ ) = 0.9988

COEFICIENTE DE  
VARIACION (C.V.) = 1.00 %

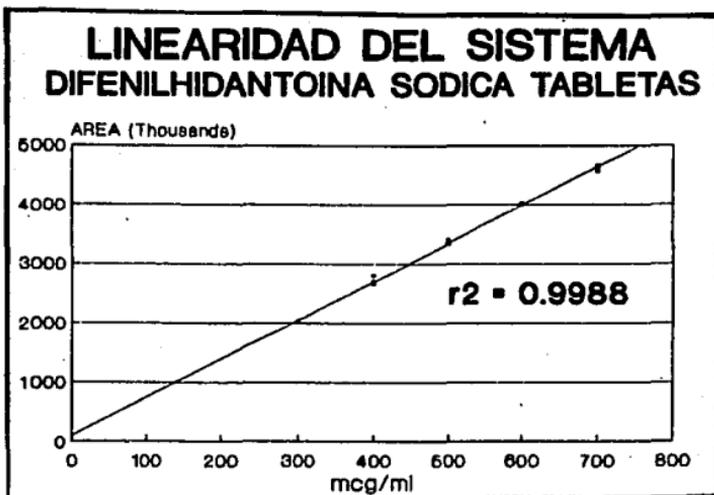
\* DHS = Difenilhidantoína Sódica

### CRITERIO

$r^2 \geq 0.98$

C.V.  $\leq 1.5$  %

GRAFICA 1



#### PRECISION DEL SISTEMA (Tabla No. 4)

Se determinó de la respuesta obtenida de seis muestras preparadas de una solución concentrada y haciendo una dilución para obtener la concentración correspondiente al 100 % .

#### PRECISION DEL SISTEMA

(TABLA No. 4)

AREA $\mu$ D H S
3689720
3738625
3684122
3652079
3672770
3647774

#### RESULTADOS

COEFICIENTE DE  
VARIACION (C.V.) = 0.89 %

#### CRITERIO

C.V.  $\leq$  1.5 %

#### ESPECIFICIDAD DEL METODO (Tabla No. 5)

Para demostrar que el método es indicador de estabilidad fué necesario poner a degradar al placebo, materia prima, y producto terminado de difenilhidantoína sódica en condiciones :

- 1.- Ácidas
- 2.- Básicas
- 3.- Oxidativas
- 4.- Luz ultravioleta

En la siguiente tabla se muestran los porcentajes obtenidos a la longitud de onda de interés 254 nm por medio del detector de arreglo de fotodiodos.

(TABLA No. 5)

MUESTRA	CONDICION	% OBTENIDO	% DEGRADADO
PLACEBO	Acida	—	—
	Básica	—	—
	Oxidación	—	—
	Luz UV	—	—
	Temperatura	—	—
MATERIA PRIMA	Acida	98.0	—
	Básica	96.0	—
	Oxidación	68.0	30.0
	Luz UV	98.0	—
	Temperatura	95.0	—
PRODUCTO TERMINADO	Acida	99.0	—
	Básica	95.0	—
	Oxidación	72.0	20.0
	Luz UV	96.0	—
	Temperatura	100.0	—

NOTA : LOS TIEMPOS Y CONDICIONES DE DEGRADACION SE ENCUENTRAN EN LA PARTE DE DESARROLLO DEL METODO EN LA PAGINA 67.

**LINEARIDAD DEL METODO (Tabla No. 6)**

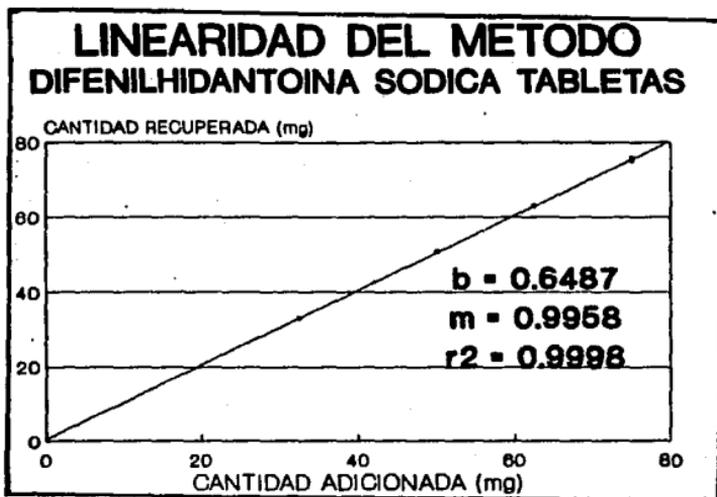
Dado que ya se contaba con un sistema cromatográfico adecuado, se utilizó el método propuesto con estándar interno para evaluar su linealidad se analizaron placebos cargados independientemente a cuatro niveles correspondientes al 52, 80, 100 y 120 %, cada nivel se analizó por triplicado. (Gráfica No. 2).

**LINEARIDAD DEL METODO**

(TABLA No. 6)

%	CONC. (mcg/ml)	CANTIDAD ADICIONADA ( mg )	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	POR CIENTO RECUPERADO
52	260	32.5	33.07	101.76
	260	32.5	32.85	101.07
	260	32.5	32.91	101.26
80	400	50.0	50.56	101.13
	400	50.0	50.62	101.24
	400	50.1	50.57	100.94
100	500	62.5	62.67	100.30
	500	62.5	63.08	100.93
	500	62.5	62.99	100.78
120	600	75.0	74.94	99.92
	600	75.0	75.14	100.19
	600	75.0	75.75	101.01

GRAFICA 2



RESULTADOCRITERIO

A) Cant. adicional VS Cant. recuperada.

Pendiente (m) = 0.9958

Intercepto (b) = 0.6487

Coef. de deter. ( $r^2$ ) = 0.9998 $m \approx 1$  $b \approx 0$  $r^2 \geq 0.98$ 

B) Con respecto al porcentaje recuperado.

RESULTADOCRITERIOPromedio %  
recuperado ( $\bar{x}$ ) = 100.88 % $\bar{x} = 98 - 102 \%$ Coeficiente de  
variación global C.V.) = 0.50 %El C.V. para cada  
nivel y el global < 2 %

NIVEL	C. V.
52 %	0.35 %
80 %	0.15 %
100 %	0.33 %
120 %	0.56 %

(TABLA No. 7)

**EXACTITUD DEL METODO AL 100 % (Tabla No. 8)**

Se determinó del por ciento recuperado analizando por sextuplicado placebos cargados independientemente con cantidades correspondientes al 100 % .

**EXACTITUD DEL METODO AL 100 %****(TABLA No. 8)**

<b>CONC. (mcg/ml)</b>	<b>CANTIDAD ADICIONADA ( mg )</b>	<b>CANTIDAD RECUPERADA (mg)</b>	<b>POR CIENTO RECUPERADO</b>
500	62.5	63.32	101.31
500	62.5	62.62	100.51
500	62.5	62.74	100.38
500	62.5	63.49	101.58
500	62.5	63.69	101.90
500	62.5	63.66	102.18

**RESULTADO****Promedio ( $\bar{x}$ ) = 101.31 %****Coef. de variación (C.V) = 0.72 %****CRITERIO****X = 98 - 102 %****C.V. < 2 %**

**REPRODUCIBILIDAD (Tabla 9)**

Se llevó a cabo por dos analistas en dos días diferentes analizando una misma muestra homogénea de producto terminado de difenilhidantoína sódica tabletas.

**REPRODUCIBILIDAD DEL METODO**

LOTE: 92015

**ANALISTA**

		1	2
D	1	99.07	98.42
		99.07	98.43
		100.09	98.40
A	2	99.85	99.09
		100.83	99.04
		100.57	99.26

**Resultado:**Media ( $\bar{x}$ ) = 99.34 %Coeficiente de  
variación (C.V.) = 0.83 %**Criterio:**

C.V. &lt; 2 %

(TABLA NO. 9)

### ESTABILIDAD DE LA SOLUCION DE LA MUESTRA (Tablas No. 10 y 11)

Se determinó haciendo el análisis inicial de tres muestras, listas para inyectar y se volvieron a analizar a las 24 y a las 48 h sometiénolas a las siguientes condiciones :

- 1.- Temperatura ambiente
- 2.- Temperatura ambiente protegidas de la luz
- 3.- Refrigeración

### ESTABILIDAD DE LA MUESTRA A LAS 24 h

(TABLA No. 10)

ANALISIS INICIAL	TA/24 h	OBSC./24 h	REFRIG./24 h
98.06	99.09	98.72	98.91
98.13	98.16	98.00	98.36
98.61	98.80	98.94	101.19
I.C	(-34 a 1.17)	(-0.49 a 1.06)	(-0.84 a 3.28)
I	100.42	100.29	101.24

### RESULTADO

Las muestras son estables en condiciones ambientales, en la oscuridad en condiciones ambientales y en refrigeración por 24 h ya que el intervalo de confianza (I.C.) incluye el valor de cero y la media para el factor I se encuentra entre 98 - 102 % .

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA A LAS 48 h

(TABLA NO. 11)

ANALISIS INICIAL	TA/48 h	OBSC. /48 h	REFRIG. /48 h
98.06	99.00	99.54	101.04
98.13	99.12	95.62	98.05
98.61	98.95	100.08	100.41
I.C.	(0.34 a 1.18)	(-3.16 a 3.45)	(-0.59 a 3.73)
$\bar{I}$	100.77	100.15	101.59

RESULTADO

Las muestras son estables en condiciones ambientales, en la obscuridad en condiciones ambientales y en refrigeración durante 48 h. ya que el intervalo de confianza incluye el valor de cero y la media para el factor I esta entre el 98 a 102 % .

### CRITERIO

La muestra es estable si el I.C. para la diferencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto (I) se encuentra entre el 88 a 102 %.

### TOLERANCIA DEL SISTEMA (Tablas No. 12 y 13)

Se realizó comparando los resultados iniciales de dos muestras, con los obtenidos después de variar :

- a) el pH de la fase móvil ( $\pm 1$  U de pH)
- b) la proporción de fase móvil ( $\pm 17$  %)

COMPONENTE	F. M. ORIGINAL	-17 % F. M.	+17 % F. M.
AGUA	35.6	29.4	41.8
METANOL	63.5	70.0	57.5
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (0.05 M)	0.7	0.6	0.7

VARIANDO EL pH

(TABLA No. 12)

ANALISIS INICIAL pH = 3.38	1 UNIDAD DE pH ABAJO pH = 2.38	1 UNIDAD DE pH ARRIBA pH = 4.38
98.40 98.57	98.48 100.52	98.49 98.39
$\bar{x} = 98.48 \%$	$\bar{x} = 99.5 \%$	$\bar{x} = 98.44 \%$

RESULTADO

Coef. de variación (C.V) = 0.85 %

CRITERIO

C.V. < 2 %

VARIANDO LAS PROPORCIONES DE FASE MOVIL

(TABLA No. 13)

ANALISIS INICIAL	EN + 17 %	EN - 17 %
98.32 98.58	97.12 97.26	97.90 97.48
$\bar{x} = 98.45 \%$	$\bar{x} = 97.69 \%$	$\bar{x} = 97.69 \%$

RESULTADO

Coef. de variación (C.V) = 0.60 %

CRITERIO

C.V. < 2 %

**C A P I T U L O   I V**

**A N A L I S I S  
D E R E S U L T A D O S**

**Y**

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

## ANALISIS DE RESULTADOS

- El método analítico desarrollado en este trabajo presenta grandes ventajas sobre los reportados ya que es un método instrumental, además con el uso de una SPRI para la cuantificación del principio activo permite obtener mayor precisión y disminuir al máximo los errores de manipulación que pudieran cometerse durante el análisis.

- Al llevar a cabo la técnica analítica se obtienen picos cromatográficos de difenilhidantoína y naproxen, bien definidos simétricos y con buena resolución.

- El método puede ser empleado en el seguimiento de la estabilidad del producto ya que se obtiene una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés. Este estudio de especificidad se llevó a cabo a través de un análisis espectral con un detector de arreglo de fotodiodos, que proporciona un alto grado de confiabilidad por la facilidad y rapidez con que se determina si un método es selectivo o no hacia el compuesto que interesa cuantificar.

- La difenilhidantoína sódica es una molécula muy estable ya que de todas las condiciones experimentales para degradarla únicamente en condiciones oxidativas se encontraron productos de degradación.

- La técnica analítica es muy sencilla de realizar, no presenta problemas en cuanto a manejo excesivo de muestras, es económica puesto que se utilizan pocos reactivos, además el tiempo de análisis es muy corto.

- Se determinó que las muestras listas para inyectar son estables hasta las 48 horas en condiciones ambientales, en la obscuridad y en refrigeración y que al cambiar el pH de la fase móvil entre 2 y 4 el sistema cromatográfico no se ve afectado, además al modificar las proporciones de agua y metanol se alteran los tiempos de retención pero los porcentajes de recobro no varían por lo tanto el sistema es tolerante a estos cambios.

## CONCLUSIONES

- Se desarrolló un método por CLAR para cuantificar difenilhidantoína sódica en tabletas utilizando naproxen como estándar interno.
- El método desarrollado en el intervalo analizado es lineal exacto, preciso y reproducible por lo que se considera validado, ya que los resultados están dentro de los límites establecidos.
- La técnica analítica puede ser utilizada tanto para control de calidad por ser sencilla, rápida y económica, como para el seguimiento de la estabilidad ya que es específica.
- Las muestras listas para inyectar son estables hasta 48 horas en condiciones ambientales en la oscuridad y en refrigeración.
- El método es tolerante a ciertos cambios de pH y polaridad de la fase móvil.
- Cabe mencionar que la cromatografía de líquidos de alta resolución tiene grandes ventajas entre ellas versatilidad y sensibilidad. Sin embargo se considera una gran desventaja el elevado costo para la adquisición y mantenimiento de los equipos.

**C A P I T U L O . U**

**B I B L I O G R A F I A**

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Array, Optical LC Detection. Recent Development in Multichannel Photodiode.  
Alfredson, Tom y Sheenan, Terry.  
Journal of Chromatography Science; Vol.11, (1986); p.p.473 - 482 .
- 2.- British Pharmacopoeia 1988.  
Vol. I y II, London Her Majesty's Stationery Office, pp.439, 986.
- 3.- Curso Beckman: Diseño, Desarrollo, y Validación de métodos analíticos.  
Ponente: M. en C. José Juárez Ayala.
- 4.- Curso Millipore S.A. de C.V: Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.  
Ponentes : Octavio Arrellín R., Santiago Santini, Miguel.
- 5.- Diccionario de especialidades Farmacéuticas PLM.  
Editorial Ediciones PLM S.A.de C.V. p. 27.
- 6.- Cromatografía Líquida de alta Presión.  
Esquivel B; Harol M. McNair.  
Segunda Edición ; Secretaría General de la DEA, 1980.
- 7.- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.  
Editorial Grupo Papelero Continental, 5a. edición. p.p. 887,1482.  
1483.

- 8.- Analytical Profiles of Drug Substances  
Florey Klaus.  
Academic Press; Vol. II pp. 417 a 445.
- 9.- Las bases Farmacológicas de la Terapéutica  
Goodman Gilman Alfred, Gilman Alfred.  
Sexta edición; Editorial Médica Panamericana; 1984. pp. 452 -  
456.
- 10.- Chromatography Library. Instrumental Liquid.  
Hearn, Milton T.W.  
Chromatography Science Series. Vol. 27, 1984 pp.6 - 21 y 244 - 249.
- 11.- HPLC Advances and Perspectives.  
Hórvath, Csaba.  
New York, N.Y. Vol. 2, 1980, p.p. 141 - 206.
- 12.- Electrochemical Detector in Liquid Chromatography.  
Kissinger, P.T. Vickres, T.M. (Editor) Marcel Dekker, Inc. New York  
U.S.A. 1983 pp. 125 - 164.
- 13.- Farmacología  
Litter Manuel  
Editorial El Ateneo. pp. 139 - 141.
- 14.- Validación de Métodos Analíticos.  
Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos.
- 15.- Pharmaceutical Analysis, Modern Methods. Parte B.  
Vol. II ; firth. edition, 1984.
- 16.- Instrumental Liquid Chromatography.  
Parris N.A. pp. 6 - 21, 244 - 249.  
Journal of Chromatography Library. Vol. 27, 1984.

- 17.- **Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica.**  
Perkin - Elmer; Primera edición; 1981.
- 18.- **Journal of Chromatography Science.**  
Vol. 16, Snyder, L.R. pp. 223.
- 19.- **Introduction to Modern Liquid Chromatography.**  
Snyder, L.R. and Kirkland, J.J.  
Segunda edición, John, Wiley and Sons: Inc. New York U.S.A. 1979.
- 20.- **USP XXII (Pharmacopeia National Formulary) pp.1073 - 1077. 1836.**
- 21.- **Chromatography División Waters Sourcebook for Chromatography  
Columns and Supplies 1985.**
- 22.- **Waters 990. Photodiode Array Detector operator's Manual.**