

98
21



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**VALIDACION DEL METODO ANALITICO PARA
LA DETERMINACION DE TAMOXIFENO POR
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA
RESOLUCION EN TABLETAS**

T E S I S
Que para obtener el titulo de
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
p r e s e n t a
HUGO VALDEZ CORNEJO



México, D. F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	PROF.	ALFREDO GARZON SERRA
VOCAL	PROF.	JOSE LUIS IBARNEA AVILA
SECRETARIO	PROF.	MORA TOVAR Y CHAVEZ ROSA LORENIA
1ER. SUPLENTE	PROF.	PEDRO A. GORGONIO HERNANDEZ
2DO. SUPLENTE	PROF.	RICARDO RODRIGUEZ SAENZ

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA :
LABORATORIOS BEST S.A.

ASESOR DEL TEMA :


Q.F. ALFREDO GARZON SERRA

SUSTENTANTE :


HUGO VALDEZ CORNEJO

A G R A D E C I M I E N T O S

A:

**DIOS TODO PODEROSO
POR DARME LA CAPACIDAD Y PERMITIRME ALCANZAR UNA MAS DE MIS
METAS.**

**ALFREDO GARZON
POR APOYARME CON SU GRAN EXPERIENCIA Y CONOCIMIENTOS EN LA
REALIZACION DE ESTA TESIS.**

**ALICIA RODRIGUEZ
POR SU GRAN APOYO PROFESIONAL EN LOS MOMENTOS DIFICILES**

**MI PADRE
POR SU APOYO MORAL Y ECONOMICO**

**MI MADRE
POR SUS CONSEJOS Y POR CONFIAR EN MI**

**CON CARINO A:
LUISA, SHARON Y HUGO ANTONIO**

I N D I C E

1

CAPITULO I. INTRODUCCION..... 3

CAPITULO II. GENERALIDADES

A) MONOGRAFIA DE PRINCIPIO ACTIVO

- NOMBRE COMERCIAL.....	5
- NOMBRE QUIMICO.....	5
- FORMULA CONDENSADA.....	5
- FORMULA DESARROLLADA.....	5
- MASA MOLECULAR.....	5
- LIMITE DE ACEPTACION.....	5
- CONSERVACION.....	5
- DESCRIPCION.....	5
- SOLUBILIDAD.....	5
- IDENTIFICACION.....	6
- TEMPERATURA DE FUSION.....	7
- ENSAYOS DE PUREZA.....	7
- VALORACION.....	11
- FARMACOLOGIA.....	12
- FARMACODINAMIA.....	12
- MECANISMOS DE ACCION.....	14
- FARMACOCINETICA.....	14
- TOXICIDAD.....	15
- REACCIONES SECUNDARIAS.....	15
- INDICACIONES TERAPEUTICAS.....	16
- INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS.....	16
- FORMA FARMACEUTICA, VIA DE ADMINISTRACION Y DOSIS.....	16

B) CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION

- DEFINICION, PRINCIPIOS Y VENTAJAS DE CLAR.....	17
- EQUIPO DE CLAR.....	23
- INYECTORES.....	23
- DETECTORES.....	23
- COLUMNAS.....	29

- FASE MOVIL.....	32
- MECANISMOS DE SEPARACION.....	36
- CROMATOGRAFIA DE PARTICION.....	37
- CROMATOGRAFIA DE ADSORCION.....	41
- CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.....	41
- CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION.....	42
- VENTAJAS Y LIMITACIONES.....	43
- TERMINOLOGIA EN CLASE.....	45

C) VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

- DEFINICIONES.....	50
- DETERMINACIONES Y CRITERIOS.....	52

CAPITULO III. PARTE EXPERIMENTAL

VALIDACION DEL METODO ANALITICO

- EQUIPO E INSTRUMENTOS, MATERIAL Y REACTIVOS.....	59
- METODO IMSS, CONDICIONES CROMATOGRAFICAS.....	60
- ESPECIFICIDAD DEL METODO.....	62
- METODO USP XXII, CONDICIONES CROMATOGRAFICAS.....	65
- ESPECIFICIDAD DEL METODO.....	66
- LINEARIDAD DEL SISTEMA.....	69
- PRECISION DEL SISTEMA EVALUADA COMO REPETIBILIDAD.....	69
- LINEARIDAD DEL METODO.....	69
- EXACTITUD DEL METODO AL 100%.....	69
- REPRODUCIBILIDAD DEL METODO.....	69
- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA.....	70
- TOLERANCIA.....	70

CAPITULO IV. RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....71

CAPITULO V. BIBLIOGRAFIA.....86

CAPITULO I
INTRODUCCION

INTRODUCCION

La industria farmacéutica está especialmente interesada en la validación de métodos analíticos debido al gran incremento de nuevos productos que tienen que ver con la salud y que requieren de métodos de análisis apropiados.

La validación de métodos analíticos es parte fundamental del desarrollo de una nueva formulación y de la técnica de análisis de control de calidad de una forma farmacéutica, ya que es durante esta secuencia de pruebas y análisis, en donde el químico ve de cuenta si el estudio, el cual está siendo evaluado sistemáticamente, cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado.

El proceso de validación de un método en particular está basado en principios científicos adecuados que generalmente incluyen una evaluación de la precisión, linealidad, exactitud y especificidad y proporciona una medida del comportamiento del método para determinar su efectividad.

La validación del método puede definirse 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 capacidad se expresa, en este caso, en términos de parámetros analíticos.

En la aplicación de los criterios de evaluación de un método analítico debe prevalecer ante todo la experiencia y el criterio del analista que lleva a cabo la validación.

No se puede pasar por alto el hecho de que, el factor más importante durante la validación de cualquier método analítico sea el criterio del analista, el cual es necesario aplicar después de tomar en cuenta todos los factores relacionados con él, o los principios activos, concentraciones, formas farmacéuticas, tipo de muestra, método de análisis, propósito de la técnica analítica, instrumentación, etc., por lo que los requisitos para la validación de métodos analíticos constituyen únicamente una guía apropiada, para dar al analista un soporte técnico adecuado para resolver su problema particular.

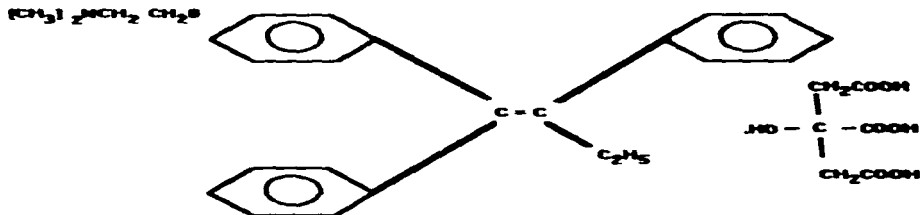
CAPITULO II
GENERALIDADES

GENERALIDADES

5

A) MONOGRAFIA DEL PRINCIPIO ACTIVO (3.4.11)

1. NOMBRE COMERCIAL: Citrato de tamoxifeno
2. NOMBRE QUIMICO: Citrato de (Z)-2-[p-(1,2-difenil-1 butenil)-fenoxi] -N,N-dimetiletilamina
3. FORMULA CONDENSADA: $C_{26}H_{28}NO.C_2H_5O_7$
4. FORMULA DESARROLLADA:



5. MASA MOLECULAR: 563.65
6. LIMITE DE ACEPTACION: Contiene no menos de 99.0 % y no mas del 101.0 % de $C_{26}H_{28}NO.C_2H_5O_7$ calculado con referencia a la sustancia seca.
7. CONSERVACION: En recipientes bien cerrados y resistentes a la luz.
8. DESCRIPCION: Polvo fino cristalino de color blanco.
9. SOLUBILIDAD: Ligeramente soluble en agua, acetona, cloroformo y alcohol, soluble en metanol.

10. IDENTIFICACION:

a) El espectro de absorción en la región ultravioleta de citrato de tamoxifeno de una solución al 0.002% p/v en metanol, exhibe 2 máximos a las longitudes de onda de 237 y 275 nm.

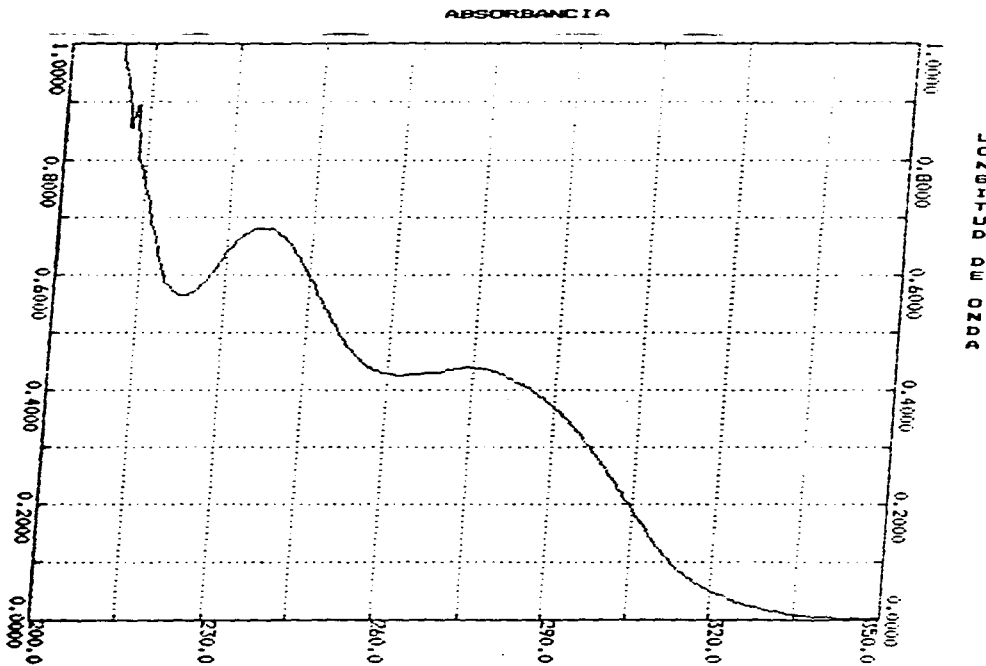


Figura 1 Espectro de absorción UV de citrato de tamoxifeno

b) El espectro de absorción en la región infrarroja de una dispersión de la muestra en bromuro de potasio exhibe máximos principales a: 705, 922, 1218, 1463, 1596 y 1732 cm^{-1} .

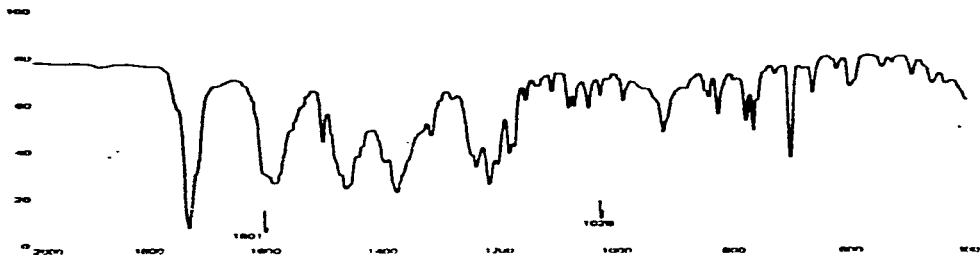


Figura 2 Espectro de absorción IR de citrato de tamoxifeno

11. TEMPERATURA DE FUSIÓN: Cerca de 142°C. con descomposición.

12. ENSAYOS DE PUREZA:

a) ISÓMERO E.

Fase Móvil: Preparar una solución en metanol conteniendo en cada litro, 320 ml de agua, 2 ml de ácido acético glacial y 1.06 g de 1-octansulfonato de sodio.

Preparación de la solución de la sustancia de referencia.
Disolver una cantidad adecuada, exactamente pesada de citrato de tamoxifeno sustancia de referencia en fase móvil para obtener una solución que contenga aproximadamente 500 ppm.

Preparación de la Solución Problema: Utilizando alrededor de 30 mg de citrato de tamoxifeno exactamente pesados, proceder igual a la preparación de la solución de la sustancia de referencia.

Sistema Cromatográfico. El cromatógrafo de líquidos debe estar equipado con un detector a 254 nm y una columna de sílice unida a grupo fenilo de 2 x 10³ cm de largo de 4 mm de diámetro interno y 50 μ m de longitud. La velocidad de flujo debe ser aproximadamente de 0.7 cm/min.

Hacer 5 inyecciones de la solución de la sustancia de referencia y registrar las respuestas del pico principal; el coeficiente de variación no debe ser mayor al 1% y el tiempo de retención relativo del pico del isómero E no es mayor a 0.95 del pico del isómero Z.

Procedimiento: Inyectar separadamente 20 μ l de la solución de la sustancia de referencia y de la solución del problema. Medir las respuestas de los picos del isómero E obtenidos de las dos soluciones. Calcular la cantidad en mg del isómero E en la muestra de citrato de tamoxifeno utilizando la fórmula:

$$\text{mg E (pp/6g)}$$

En donde:

C= Concentración en μ g/ml del isómero E en el citrato de tamoxifeno basada en su contenido declarado en la sustancia de referencia.

A₁= Respuesta del pico del isómero E en la preparación del problema.

A₂= Respuesta del pico del isómero E en la solución de la sustancia de referencia.

El contenido del isómero E no debe ser mayor al 1% del citrato de tamoxifeno.

b) SUSTANCIAS RELACIONADAS:

9

Solución de la Muestra A.

Dispersar cerca de 3 g de la muestra en 100 ml de agua en un embudo de separación. Adicionar, durante un periodo de 10 min, 50 ml de solución 0.5 N de hidróxido de sodio con agitación. Extraer con 2 porciones de éter etílico de 50 ml, y combinar los extractos étereos, lavarlos con 20 ml de agua, eliminar la capa acuosa y secar el éter pasándolo sobre sulfato de sodio anhidro. Evaporar el éter bajo atmósfera de nitrógeno y secar al vacío a temperatura ambiente durante 2 horas. Pesar exactamente 1.5 g del residuo y pasarlo a un matraz volumétrico de 10 ml, adicionar 5 ml de una mezcla de 5 volúmenes de anhídrido acético y 95 volúmenes de piridina y calentar a 60°C durante 10 a 15 min, enfriar, llevar a volumen con la misma solución y mezclar.

Solución de la Muestra B.

Utilizando la misma solución de anhídrido acético piridina, preparar una dilución 1:200 de la solución de la muestra A.

Sistema Cromatográfico.

El cromatógrafo debe estar equipado con un detector de ionización de flama y una columna de vidrio de 1 m X 4 mm de diámetro interno, empacada con una fase líquida al 5% de fenilpolisiloxano: metilpolisiloxano (75:25) en un soporte de tierra silicea tratada y lavada con ácido y base, acondicionada a 300°C por 24 hrs. La columna y la puerta de inyección se deben mantener a 260°C, y el detector a 300°C. Utilizar helio seco como gas acarreador a una velocidad de flujo de 60 ml/min. Inyectar la solución de la muestra B por quintuplicado. El coeficiente de variación deberá ser menor al 3%.

Procedimiento.

inyectar al cromatógrafo aproximadamente 2 μ l exactamente medidos de la solución de la muestra A y de la solución de la muestra B y obtener los cromatogramas en un intervalo de 0.1 a 3 en relación al tiempo de retención del pico principal. Medir las áreas individuales de cada uno de los picos obtenidos para la solución de la muestra A a excepción del correspondiente al solvente y al tamoxifeno y calcular su suma.

Ninguna área debe ser mayor que el área del pico de tamoxifeno, obtenida de la solución de la muestra B (0.5%) y la suma de las áreas no debe ser mayor que el doble del área obtenida de la solución de la muestra B (1%).

Pérdida al secado.

Secar a 105°C por 4 horas; pierde no más del 0.5% de su peso.

Residuo a la ignición.

No más del 0.2%

Metales pesados.

Utilizar el método II. El límite es 0.001%

Arsénico.

Utilizar el método II con 10 ml de ácido sulfúrico diluido (1 a 2), en lugar de 5 ml. El límite es 2 ppm.

Fierro:

11

Pesar exactamente 1 g de la muestra y colocarla en un crisol adecuado, adicionar suficiente ácido sulfúrico para mojar la muestra y calcinar con cuidado a baja temperatura. Adicionar a la masa carbonizada 2 ml de ácido nítrico y 3 gotas de ácido sulfúrico, calentar cuidadosamente hasta que no aparezcan humos blancos. Calcinar en una sufla a 500°C - 600°C. Enfriar, adicionar 10 ml de solución 0.1 N de ácido clorhídrico caliente y digerir durante 5 min. Pasar el contenido del crisol a un matraz volumétrico de 50 ml, con la ayuda de pequeñas porciones de agua, llevar a volumen con agua y mezclar, tomar 10 ml de la solución a un tubo para poder comparar el color, diluir con agua a 45 ml, adicionar 2 ml de ácido clorhídrico y mezclar. El límite es 0.005%.

13. VALORACION:

Pesar exactamente alrededor de 1 g de citrato de tamoxifeno y disolver en 150 ml de ácido acético glacial, titular con solución 0.1 N de ácido perclórico, determinando el punto final potenciométricamente utilizando un electrodo de vidrio como indicador y como referencia un electrodo de plata-cloruro de plata. Cada ml de solución 0.1 N de ácido perclórico equivale a 56.36 mg de $C_{26}H_{29}NO \cdot C_6H_8O_7$.

El tamoxifeno es un fármaco con acción antiestrogénica. Se denominan antiestrogénos los fármacos que bloquean los receptores estrogénicos impidiendo la acción de los estrógenos sobre los órganos sexuales secundarios.

Los antiestrogénos son sustancias de origen sintético, no esteroides, derivados del trifeniletileno y con estructura química similar al estrógeno clorotriancico y en cierto modo al dietilestilbestrol.

El tamoxifeno es un agente antiestrogénico no esteroideal con acción parcial combinada estrógenoagonista. Propiedades adicionales incluyen propiedades antioxidantes, actividades de modulador de membrana y modulación de sistemas de mensajero intracelular.

FARMACODINAMIA.

(2,15,16)

La acción fundamental de este fármaco es la de ser antiestrogénico, pero también es estrógeno débil, por lo que posee acción dual y recibe la denominación de estrógeno impedido.

En ratas inmaduras u ovariectomizadas, el tamoxifeno provoca cierto aumento de peso del útero lo que indica una cierta acción estrogénica, evidenciada también por una disminución en la secreción de gonadotropinas hipofisarias. Además es capaz de inhibir el crecimiento uterino causado por el estradiol, así como la cornificación vaginal provocada por el estrógeno, lo que revela una poderosa acción antiestrogénica, la cual también se evidencia por que el tamoxifeno es capaz de impedir la implantación uterina del huevo en la rata, dando fin así a la preñez. En la mujer el tamoxifeno posee también acción antiestrogénica revelada por cambios regresivos de la mucosa vaginal y prurito vulvar y por supresión de la hiperplasia

endometrial existentes en mujeres premenopáusicas, así como en antagonismo frente al etinilestradiol que inhibe la ovulación.

La inducción de la ovulación se debe al aumento de la secreción de las gonadotropinas hipofisiarias, foliculoestimulante y luteinizante, cuyo nivel plasmático y excreción urinaria aumentan como la de los estrógenos.

El aumento de la secreción de las gonadotropinas se debe a la falta de la acción inhibidora de los estrógenos endógenos sobre dicha secreción.

El tamoxifeno es capaz de producir mejorías evidentes en el cancer de mama avanzado con metástasis, demostrado en el carcinoma mamario de la rata inducido por el dimetilbenzantraceno. En la mujer afectada por el cancer mamario avanzado, es capaz de producir una remisión de los síntomas subjetivos y también objetivos, con retroceso de las metástasis óseas y de los ganglios linfáticos, piel, pulmones y mama. Dichas remisiones pueden llegar a ser completas. La acción benéfica se observa especialmente en las mujeres posmenopáusicas siendo dicha acción prominente cuando existen receptores estrogénicos tumorales o sea RE-POSITIVOS y muy pocos de los RE-NEGATIVOS.

Pero todos estos fenómenos benéficos son transitorios y después de un lapso, la enfermedad sigue su curso inexorablemente fatal.

Ya que muchos carcinomas mamarios son estrogendependientes y mejoran por la ooforectomia, no es de extrañar que el tamoxifeno, que bloquea dichos receptores, produzca una remisión tumoral, actuando sobre el tejido neoplásico mismo.

MECANISMOS DE ACCION.

(2,20,21)

El tamoxifeno es el trans-isómero de un derivado trifenil-etileno; el citrato de tamoxifeno es un agente no esteroideal con potente acción antagonista estrogénica y parcial acción agonista estrogénica.

En adición, el tamoxifeno ha demostrado acción anticancer, potencial anti-carcinogénico y acción anti-levadura/viral. La acción estrogénica y antiestrogénica del tamoxifeno se debe a la unión del fármaco con los receptores estrogénicos de los órganos blanco, tratándose de un proceso de competencia con los estrógenos endógenos del organismo, correspondiendo en realidad a una acción dual. La acción principal, desde luego, es la antiestrogénica, en la cual el fármaco ocupa los receptores del citosol e impiden la unión con los estrógenos a ese nivel.

Para la acción anticancerosa mamaria, se acepta un mecanismo de acción similar, competencia con los estrógenos endógenos frente a los receptores estrogénicos del tumor.

FARMACOCINETICA.

(1,2,19,20)

El tamoxifeno se absorbe fácilmente cuando se administra por vía oral. Pasa a la sangre y se distribuye por todo el organismo, sobre todo en los órganos blanco. El fármaco se enlaza fuertemente a las proteínas de la albúmina (alrededor del 99%). Es metabolizado en el hígado y sufre una intensa biotransformación. El Citocromo P 450 III A ha sido identificado como la familia de enzimas responsables durante la N - demetilación de tamoxifeno en estudios de microsomas de hígado humano in-vitro.

El tamoxifeno es metabolizado por hidroxilación a glucuronidos, otros conjugados y metabolitos polares. El metabolito monohidroxilado es considerado más activo que el tamoxifeno como antiestrógeno.

La excreción de la sustancia y sus metabolitos se realiza principalmente por la bilis hacia el intestino y también por el riñón en pequeñas cantidades. La vida media de distribución es de 7 a 14 horas; la vida media de eliminación es de alrededor de 7 días.

TOXICIDAD. (17)

Es muy poco tóxico. Se hace aparente la toxicidad cuando se administran más de 80 mg al día y en un periodo mayor a dos años.

REACCIONES SECUNDARIAS. (1,2,16,17)

Los efectos adversos más comunmente reportados con terapia de tamoxifeno son oleadas de calor, nauseas y/o vómito, seguido por hemorragia vaginal, irregularidades menstruales, plurito vulvar y dermatitis.

Es capaz de producir agrandamiento de ovario a veces con quistes. Menos comunes pero reacciones más potencialmente severas incluyen las siguientes: efectos oculares (queratopatía, cataratas y retinopatía).

Otros efectos desfavorables infrecuentes son hipercalcemia, edema periférico, anorexia, depresión, mareos, cefalea, retención de líquidos, insomnio, excitación, leucopenia y trombocitopenia reversibles.

En todos los casos no se trata de transtornos graves y ceden al interrumpirse el tratamiento o disminuir la dosis.

INDICACIONES TERAPEUTICAS.

(2,15,20)

El tamoxifeno se emplea para el tratamiento del cancer mamario avanzado, inoperable con recidivas, con metástasis, cuando la cirugía y la radioterapia han agotado sus recursos. Es un agente de primera línea para mujeres posmenopáusicas y una alternativa para mujeres premenopáusicas que se les ha practicado la ooforectomía o irradiación ovárica. Se emplea también en el cancer precoz operado, como adyuvante de la mastectomía. En la mastopatía fibroquistica disminuye el dolor de los nódulos mamarios, siendo desconocido el modo de acción. También está indicado en el cancer renal metastásico.

INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS.

(10)

Cuando se administra tamoxifeno en combinación con anticoagulantes del tipo cumarina, puede presentarse un efecto anticoagulante significativamente incrementado.

En combinación con agentes citotóxicos, existe un incremento en el riesgo de que ocurran eventos tromboembólicos.

FORMA FARMACEUTICA, VIA DE ADMINISTRACION Y DOSIS.

(2,10)

Se expende en tabletas. Cada tableta contiene citrato de tamoxifeno equivalente a 10 y 20 mg de tamoxifeno; en envase con 30 y 14 tabletas respectivamente, para administración oral.

Inicialmente en las mujeres posmenopáusicas la dosis es de 10 mg dos veces al día, y si al cabo de un mes no se produce una respuesta satisfactoria, se aumenta a 20 mg dos veces al día, pudiendo administrarse hasta 80 mg por día en casos resistentes, hasta por periodos de dos años. Como adyuvante en la mastectomía, 10 mg 2 veces al día durante dos años. En la mastopatía fibroquistica, 10 mg dos veces al día, durante tres a seis meses.

B) CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION

La cromatografía de líquidos se puede definir como un método físico de separación de los componentes de una muestra, 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 cuantificación de varias sustancias a la vez. Tiene una alta especificidad así como un amplio intervalo de sensibilidad que la hace ideal para 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, 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 ésta. 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 de la cual se puede obtener información tanto cualitativa como cuantitativa de las sustancias encontradas en la mezcla.

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



Figura No. 3. Separación cromatográfica de dos sustancias.

VERSATILIDAD:

El instrumento debe ser adecuado para trabajar con muestras de diferentes tipos, debe adaptarse a las distintas 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 flujo de la fase móvil, 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 apreciable. 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.

EQUIPO DE CLAR:

19

Los componentes básicos del equipo son: una bomba para impulsar la fase móvil; un mecanismo para la introducción de la muestra; una columna que contenga la fase estacionaria; un detector para determinar la separación que tiene lugar en la columna, y finalmente un registrador o un integrador que proporciona datos que permitan una evaluación cualitativa y cuantitativa de los resultados.

La columna está considerada como el corazón del sistema. Esta se encuentra rellena de fase estacionaria la cual está compuesta por partículas del tamaño de micras (10^{-6} m), y para poder transportar la fase móvil a través de la columna es necesario una bomba de alta presión. El proceso cromatográfico empieza por la inyección del soluto en la columna.

La separación ocurre al pasar la fase móvil y el soluto a través de la columna, cada compuesto que eluye de la columna es detectado ya sea por un detector universal o selectivo, dependiendo de las propiedades de los componentes a medir.

La respuesta del detector a la presencia de cada componente se manifiesta en una carta graficadora, como un cromatograma. Para coleccionar, guardar y analizar los datos cromatográficos, están siendo usados en conjunto con los graficadores, computadoras, integradores y otros equipos, para procesamiento de datos.

La señal producida por el detector se manifiesta en forma de picos gaussianos, representando la concentración de los componentes eluidos. La calidad de la separación cromatográfica puede ser determinada matemáticamente obteniendo los valores de la eficiencia, selectividad y resolución de los resultados cromatográficos.

PARTES FUNDAMENTALES QUE FORMAN UN SISTEMA CLAR:

20

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

EQUIPO:

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 está en un lugar prediseñado, optimizando la longitud de las tuberías, pero es difícil de manipular cada componente para darle servicio.

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, éstos tienen por objeto retener pequeñas partículas que puedan obstruir o dañar el sistema de bombeo o a la columna.

SISTEMA DE BOMBEO:

Las columnas utilizadas en CLAR están rellenas de materiales especiales de tamaño de partícula muy pequeño, 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 una velocidad razonable, pues de lo contrario los análisis serían excesivamente lentos.

Las características más importantes en todo sistema de bombeo son:

- Presión máxima de operación (usualmente 3,000 psi)
- Velocidad 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
- Resistencia 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 presentan 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

COMPONENTES DE UN SISTEMA HPLC

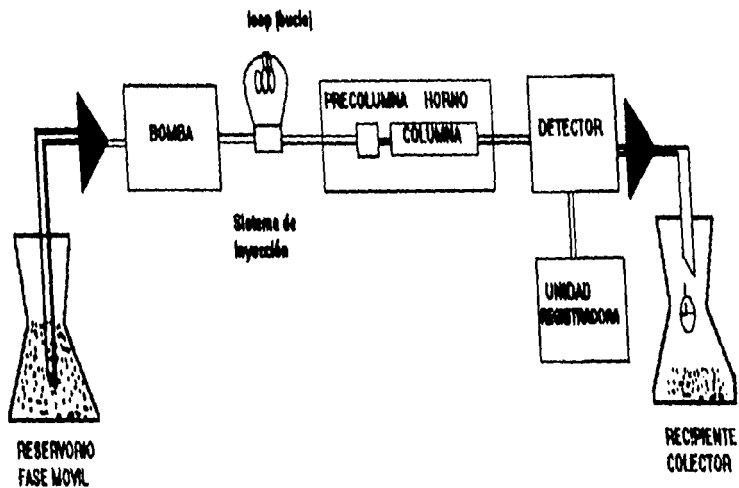


FIGURA No. 4. Componentes de un sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

INYECTORES:

23

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 un 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 se desvía manualmente el flujo de la fase móvil, se inyecta la muestra en la cámara de carga y posteriormente se reanuda el flujo, complementándose 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 y aumentando la reproducibilidad de las inyecciones. Además cuenta con un control electrónico que maneja funciones tales como: número de inyección, tiempos de corrida, velocidad de llenado, número de inyecciones por muestra, volumen de inyección, identificación de la muestra y lavados de válvulas y jeringas.

DETECTORES: (6,14)

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
- * Respuestas 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

DETECTORES ULTRAVIOLETA/VISIBLE.

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 estos 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 intensa y niveles de ruido muy bajos, aún 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 desde 190 a 600 nm, usa una lámpara de deuterio cuyas líneas de emisión están a 254, 280, 313, 334 y 365 nm. La luz se enfoca hacia 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. 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 la longitud 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.

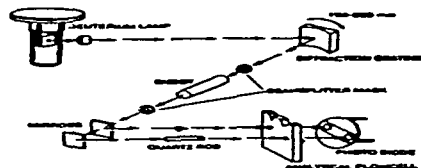


Figura No. 5. Partes fundamentales de un detector UV/VIS

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 mg o ppm y no destruye 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 esta 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, el detector se fija a esa longitud de onda y responde al grupo funcional.

Estos detectores resultan útiles cuando el compuesto no es detectado en uv/vis o por índice de refracción o bien, cuando el analista pretende determinar la distribución de los grupos funcionales.

DETECTOR DE ARREGLO DE FOTODIODOS.

Este detector ultravioleta-visible es el más sofisticado y costoso que proporciona espectros continuos de los efluentes de la cromatografía de líquidos.

Un detector de arreglo de fotodiodos es un mecanismo que contiene fotodiodos individuales que pueden simultáneamente medir diversas longitudes de onda. Este sistema usa ópticos inversos; esto es, la producción completa de la lámpara pasa a través del flujo celular previo al monocromador, el cual dispersa la luz en longitudes de onda individuales. Estos detectores producen diversos espectros en una corrida cromatográfica normal, por lo que se requieren sistemas computarizados para almacenar y procesar la cantidad de datos producidos.

Utilizando este detector se pueden realizar análisis de manera que se puede analizar el pico cromatográfico de cada sustancia en tres dimensiones: absorbancia, tiempo y longitud de onda. Con esto se puede asegurar que detrás del pico de interés no se encuentra oculto algún otro producto, lo cual no sería posible detectar a una sola longitud de onda.

Este detector acoplado a una computadora es capaz de obtener datos espectrales uv/vis de 190 a 600 nm. Así, de esta manera, pueden ser obtenidos datos de los cromatogramas y espectros simultáneamente.

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

COLUMNA: (6, 12)

La columna es la parte más importante dentro del sistema de CLAR; dentro de ésta se lleva a cabo la separación de las sustancias contenidas en una muestra determinada, por esta razón, es de suma importancia que la columna tenga un mantenimiento adecuado, para un buen funcionamiento.

Las columnas pueden estar empacadas con diferentes fases estacionarias y dependiendo de esto pueden ser usadas para los diferentes tipos de cromatografía: fase normal, fase reversa, fase unida polar, intercambio iónico, permeación en gel.

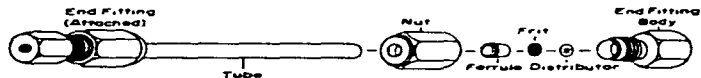


Figura No. 6. Columna utilizada en CLAR.

Están constituidas por un tubo de acero inoxidable con diámetro exterior de 1/4", 1/8", ó 3/8" y conexiones de tipo Swglock también de acero inoxidable.

Los filtros de entrada de la columna, pueden ser de acero inoxidable o de teflón poroso. Se puede mejorar la eficiencia utilizando discos rodeados de un material plástico no poroso (Kelf).

Las columnas de uso común en cromatografía líquida tiene una longitud de 15 a 50 cm y están rellenas de partículas con diámetro de 5 a 15 micras. El diámetro interno de la columna mide entre 2 y 5 mm. Cuando las paredes de la columna están muy lisas y pulidas se obtiene una mayor eficiencia.

El llenado de las columnas con partículas de diámetro muy pequeño requiere de habilidad y equipo especial.

Las columnas tienen una duración razonable y se espera una vida larga de servicio útil, a menos que se utilicen en condiciones intrínsecamente destructivas (con eluyentes extremadamente ácidos o básicos, o con inyecciones continuas de muestras crudas o biológicas "sucias").

Cuando no se utilice una columna y estando desconectada, es prudente colocar tapones en los extremos para evitar que se seque. Se deben guardar alejadas de fuentes de calor y de vibración. Si la columna se utiliza a temperatura elevada, se recomienda enfriarlas hasta temperatura ambiente antes de desconectarla.

Después de usar una columna durante largos periodos, puede aparecer una desviación de la línea base, cuya causa posible es la gradual elución de compuestos retenidos fuertemente y procedentes de inyecciones anteriores. Se pueden eliminar de la columna pasando una fase móvil suficientemente fuerte como para eliminar cualquier compuesto. En la cromatografía de adsorción y de fase inversa se suele purgar con metanol. En la cromatografía de intercambio iónico se recomienda el uso de una solución reguladora 10 veces más fuerte que la utilizada en la elución, así como también un lavado con metanol si existe la posibilidad de que los contaminantes no sean solubles en agua.

La columna se puede usar a temperatura ambiente o a una temperatura superior, para hacer más eficiente y poder controlar el proceso de separación.

En cromatografía de líquidos se utilizan temperaturas altas por las siguientes razones.

- Para disminuir la viscosidad de la fase móvil y lograr así presiones menores y aumento en la transferencia de masa.
- Para aumentar la solubilidad de la muestra en la fase enlazada y obtener así una mayor eficiencia global del equipo.
- Para aumentar la velocidad de migración iónica en los sistemas de intercambio iónico, con lo que se obtiene una mayor frecuencia de intercambio.
- Para aumentar la solubilidad de la muestra en la fase móvil, cuando es muy baja, lo que permite la introducción de una cantidad de muestra adecuada.

Para alcanzar estos objetivos son suficientes temperaturas de 50 a 70°C. Es conveniente el control de la temperatura ya que en algunas columnas la eficiencia puede variar con muy pequeños cambios de la temperatura.

TIPOS DE COLUMNAS:

Las columnas utilizadas en CLAR son clasificadas en base al tipo de material de empaque que contiene cada una de ellas.

Dos tipos básicos de material de empaque son utilizados: partículas pelliculares y porosas.

El primero consiste de esferas, no porosas, esferas de vidrio o polímeros con diámetros típicos de 30 a 40 micras. Una capa porosa delgada de sílica, alúmina o una resina de intercambio iónico se deposita sobre la superficie de esta esfera. Para algunas aplicaciones, se aplica una capa adicional, la cual consiste de una fase estacionaria líquida que es utilizada para

cromatografía de reparto. Para otras aplicaciones, las partículas pelliculares se reemplazan por micropartículas porosas teniendo un diámetro entre 3 a 10 micras. Estas partículas son de sílica, alúmina o una resina de intercambio iónico, siendo las de sílica las más comunes.

FASE MOVIL (6,9,12)

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 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
- Fácil disponibilidad a razonable costo
- Baja reactividad para evitar interacción química con solutos o polimeración en presencia del empaque de la columna
- Limitada inflamabilidad y toxicidad.

Los requisitos generales anteriores reducen mucho el número de candidatos como fase móvil para cromatografía líquida.

En la cromatografía líquida se puede usar un solvente único como fase móvil durante el análisis de una mezcla de dos o más sustancias, ajustando adecuadamente las características de la fase.

Se puede mantener constante la composición de la fase móvil (operación isocrática), o bien cambiaria (elución por gradiente). La elución por gradiente se utiliza con muestras

cuyos componentes posean polaridades muy diferentes, pues en estos casos es conveniente variar la polaridad de la fase móvil durante el análisis con el fin de mejorar la separación de los componentes.

TIPOS DE FASES MÓVILES.

Las fases móviles en cromatografía de partición, adsorción e intercambio iónico son interactivas en el sentido que interaccionan electrostáticamente con los componentes de la muestra. Como resultado, los tiempos de retención pueden ser fuertemente influenciados por el tipo de solvente. En contraste, fases móviles para cromatografía de exclusión no son interactivas. Consecuentemente, los tiempos de retención con estas técnicas son independientes de la composición de la fase móvil.

La selección de los líquidos usados como fase móvil depende de varios parámetros. En cromatografía de adsorción y partición, el papel más importante lo desempeña la polaridad, pero también son importantes la viscosidad y otras características que pueden influir en el funcionamiento del detector, (por ejemplo, absorción ultravioleta, índice de refracción). En cromatografía de intercambio iónico son importantes la fuerza iónica y el pH, mientras que en cromatografía de exclusión la consideración primordial es la solubilidad de la muestra en la fase móvil.

Fase móvil para cromatografía de adsorción líquido-sólido.

La cromatografía de adsorción líquido-sólido es normalmente la más conveniente para la separación de compuestos de diferente polaridad. Generalmente se utilizan como adsorbentes para este tipo de cromatografía el gel de sílice o la alúmina, quienes constituyen la fase estacionaria.

La selección de la fase móvil en cromatografía de adsorción se efectúa con la ayuda de la escala de Hildebrand, que clasifica los diferentes líquidos utilizados como fase móvil de acuerdo con un parámetro, que indica su fuerza como disolvente. Otro dato útil incluido en la tabla es la viscosidad, puesto que la presión necesaria es una función lineal de la viscosidad, a mayor viscosidad corresponde mayor presión. Además contiene información que resulta útil en la elección de las fases móviles, para que sean compatibles con el detector de que se dispone.

Los líquidos normalmente utilizados son: hexano, isoocetano, cloruro de butilo, cloroformo, cloruro de metileno, tetrahidrofurano, acetonitrilo, isopropanol, n-propanol, metanol y agua. Una mezcla adecuada de los disolventes mencionados puede proporcionar fases móviles de cualquier polaridad.

Fase móvil para cromatografía de partición.

La clásica cromatografía de partición líquido-líquido implica el reparto de los componentes de la mezcla entre una fase estacionaria líquida y una fase móvil también líquida. La fase estacionaria líquida, como el polietilenglicol o bien oxidipropionitrilo (ODPN), se encuentra recubriendo las partículas de un soporte sólido.

Los líquidos empleados como fase móvil deben ser casi totalmente inmiscibles con el de la fase estacionaria y cada uno de ellos debe estar saturado con respecto al otro. Normalmente se utiliza como fase móvil un líquido no polar como n-hexano y una fase estacionaria como el ODPN.

Este tipo de cromatografía presenta inconvenientes y requiere bastante tiempo. La presencia de la fase estacionaria en el eluyente puede interferir en la detección y puede contaminar las fracciones recogidas. Por lo tanto en la actualidad la mayoría de los experimentos se realizan con fases enlazadas.

En la cromatografía de fase inversa con fases enlazadas, la fase móvil más habitual es una mezcla de agua con un disolvente miscible y menos polar, como el metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano. El agua es el disolvente que origina los mayores tiempos de retención. Al aumentar la concentración del disolvente menos polar disminuyen los tiempos de retención.

La elección del componente menos polar de la fase móvil depende de diversos factores, principalmente la solubilidad de la muestra, compatibilidad fase móvil-muestra-detector, viscosidad y eficacia del equipo utilizado.

Entre los líquidos de uso general, el acetonitrilo y las mezclas de acetonitrilo-agua, presentan la menor viscosidad y por tanto serán las fases móviles de elección en instrumentos equipados con bombas de baja presión. A causa de su baja viscosidad, el acetonitrilo suele proporcionar la mayor eficacia.

Se ha demostrado experimentalmente que cuando se utiliza acetonitrilo en lugar de metanol puede lograrse un aumento en la eficiencia de casi un 30%.

Fase móvil para cromatografía de exclusión.

En la cromatografía de exclusión los componentes de la muestra se separan de acuerdo con el tamaño de las moléculas.

En cromatografía de exclusión, el líquido que eluye debe arrastrar la muestra simplemente, sin interaccionar con ella ni con el relleno de la columna. Idealmente la muestra debe ser muy soluble en la fase móvil, ya que si solo es ligeramente soluble pueden tener lugar otros efectos, como adsorción o reparto, que falseen los valores de peso molecular.

Muchos líquidos pueden usarse como fase móvil en cromatografía de exclusión. En los rellenos de fase orgánica se suele emplear cloruro de metileno, cloroformo, tolueno y tetrahidrofurano, mientras que en los de fase acuosa se utiliza agua y, ocasionalmente, alcoholes. Estos últimos no pueden usarse con rellenos de fase orgánica, pues provocan la contracción de las partículas del relleno.

Fase móvil para cromatografía de intercambio iónico.

Los compuestos iónicos se suelen separar por medio de la cromatografía de intercambio iónico, en las que se utilizan resinas intercambiadoras de iones como fase estacionaria.

Existen tres variables de la fase móvil que afecta a la retención de un soluto iónico en una columna de intercambio iónico: la fuerza iónica, el pH y la presencia de modificadores orgánicos. La más importante es el control de la fuerza iónica que se efectúa con sales tampón.

Puesto que casi todas las muestras separadas por intercambio iónico son solubles en agua y casi todas las sales tampón son insolubles en disolventes orgánicos, la mayoría de los sistemas utilizados como fase móvil son fundamentalmente acuosos.

MECANISMOS DE SEPARACION. (6,7,12)

En CLAR existen diferentes mecanismos de separación según el tipo de interacción existente entre los solutos a separar y el lecho cromatográfico. Basándose en la naturaleza de la fase estacionaria y en los procesos de separación, se pueden clasificar en:

- CROMATOGRAFIA DE PARTICION
- CROMATOGRAFIA DE ADSORCION
- CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO
- CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION

CROMATOGRAFIA DE PARTICION.

Llamada tambien cromatografia liquido-liquido en la cual, se involucra una fase estacionaria liquida la cual recubre un soporte solido inerte. Las moleculas de la muestra se distribuyen de acuerdo a sus afinidades entre la fase móvil y la fase estacionaria llevándose a cabo asi la separación. Este proceso se basa en una verdadera partición entre la fase móvil y la fase estacionaria.

Se puede clasificar de acuerdo a la polaridad relativa de las dos fases, en cromatografia en fase normal y cromatografia en fase inversa.

A) Cromatografia en fase normal.

En ella el lecho estacionario es de naturaleza fuertemente polar (silice) y la fase móvil es apolar (n-hexano o tetrahydrofurano). Las muestras polares quedan retenidas en la columna durante tiempos mayores que los materiales menos polares o apolares es decir, que el orden de elución de los solutos será directamente proporcional a su polaridad: donde los primeros en eluirse serán los menos polares y los más polares serán los retenidos.

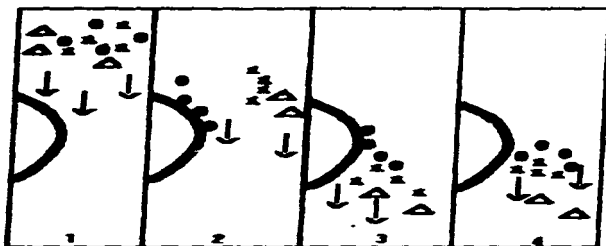


FIGURA No. 7. En la figura se muestra el mecanismo de Separación de Cromatografía de Fase Normal. En donde ● representa un compuesto muy polar, X a un compuesto moderadamente polar y ▲ a un compuesto poco polar.

Mecanismo:

Retardo por interacción de la superficie polar de la fase estacionaria con partes polares de las moléculas de la muestra.

Fase estacionaria:

SiO_2 , Al_2O_3 - NH_2 - CN . -DIOL, - NO_2

Fase móvil:

Heptano, hexano, ciclohexano, cloroformo, cloruro de metilo, dioxano, metanol.

Uso:

Separación de sustancias no iónicas apolares hasta semipolares (hidrocarburos $C_{10}-C_{20}$, ácidos carbónicos).

B) Cromatografía en fase inversa.

El lecho estacionario es de naturaleza apolar (hidrocarburo), mientras que la fase móvil es un líquido polar, normalmente agua o metanol. Cuanto más polar sea la muestra, menor será la retención.

Mecanismo:

Retardo por interacción de la cadena apolar hidrocarbonada de la fase estacionaria con partes apolares de las moléculas de la muestra.

Fase estacionaria:

n-octadecilo (RP-18), n-octilo (RP-8), etilo (RP-2), fenilo, $(CH_2)_nCN$, $(CH_2)_n-DIDU$, polímeros hidrófobos.

Fase móvil:

Metanol o acetonitrilo/agua o solución tampón (si es necesario con adición de tetrahidroturano o dioxano).

Uso:

Separación de sustancias no iónicas apolares hasta semipolares (ácidos carbónicos $C_{10}-C_{20}$, hidrocarburos).

Es necesario, para la separación de sustancias ionizables (por ejemplo ácidos carbónicos), ajustar el pH de la fase móvil mediante el uso de soluciones reguladoras.

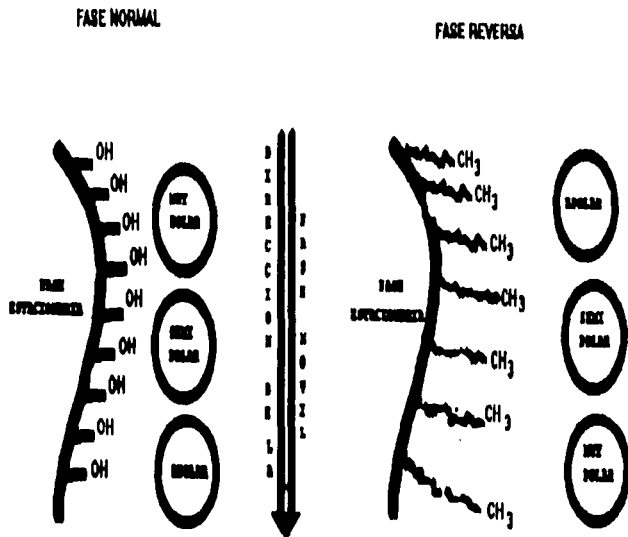


FIGURA 9. Se muestra el mecanismo de separación por cromatografía en fase inversa.

CROMATOGRAFIA DE ADSORCION.

Es también llamada cromatografía líquido-sólido, 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 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 más 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 iónico fuerte contienen como sitios activos grupos cuaternarios de amonio $R-N^+(CH_3)_3Cl$ $R_2NH^+Cl^-$.

Las resinas de intercambio aniónico débiles tienen como sitios activos aminas terciarias.

Mecanismo:

Retención por unión iónica reversible a grupos cargados de la fase estacionaria.

Fase Estacionaria:

Intercambiador catiónico - fuerte - SO_3^- - débil - COO^+

Intercambiador aniónico - fuerte - NR_3^+ - débil - NHR_2^+

Fase móvil:

Soluciones amortiguadoras.

Uso:

- Iones inorgánicos
- Ac. orgánicos, bases orgánicas
- Proteínas
- Ac. nucleicos

CROMATOGRAFIA DE EXCLUSIÓN.

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.

Mecanismo:

Retardo de moléculas pequeñas al pasar a los poros, exclusión estérica de moléculas mayores.

Fase estacionaria:

Materiales con diámetro de poro estrecho (silicagel, sílica geles modificados, polímeros orgánicos, hidratos de carbono poliméricos).

Fase móvil:

Eluentes orgánicos o acuosos, dependiendo de la solubilidad de las moléculas de la prueba (generalmente polímeros orgánicos o biológicos) y de las propiedades de la fase estacionaria.

Uso:

Separación de moléculas con alto peso molecular (generalmente polímeros).

Determinación de distribución de pesos moleculares y del peso molecular medio de polímeros orgánicos.

Separación y determinación del peso molecular de biopolímeros.

VENTAJAS Y LIMITACIONES DE CLAR.

La cromatografía de líquidos de alta resolución puede ser considerada como complementaria a la cromatografía de gases. En muchos casos ambas técnicas pueden ser usadas para efectos de la misma separación.

Para aquellos materiales que son termolábiles o no volátiles, CLAR es la selección lógica.

CLAR ofrece amplias ventajas sobre la tradicional cromatografía de líquidos.

- Rapidez
- Resolución
- Sensibilidad
- Columnas reutilizables
- Ideal para moléculas grandes y especies iónicas
- Muestras fáciles de recuperar

LIMITACIONES.

Instrumentación costosa. difícil análisis cualitativo. no existe detector universal y sensible. elevado costo de operación. experiencia indispensable.

Tiempo de retención (t_r):

Es el tiempo transcurrido desde que la muestra se introduce en la columna hasta que se obtiene el punto máximo de la señal o pico. El tiempo de retención es característico de la sustancia en esa fase móvil, columna y temperatura.

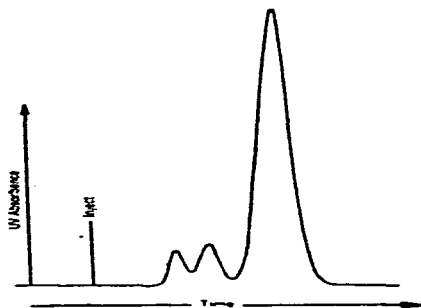


Figura No. 9. Cromatograma.

Volumen de retención (V_r):

Es el volumen total de la 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 t_r se tienen que corregir para conocer exactamente el volumen o el tiempo que se ocupa para la elución del compuesto:

$$\begin{aligned} t'R &= t_r - t_0 \\ V'R &= V_r - V_M \end{aligned}$$

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.

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):

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

N se puede definir matemáticamente como:

$$\begin{aligned} N &= 5.54 \left(\frac{t_r}{W} \right)^2 \\ N &= 16 \left(\frac{t_r}{W} \right)^2 \end{aligned}$$

Donde:

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

t_R = tiempo de retención del soluto

W = 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.

Selectividad (α) :

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 del ancho del pico en la base:

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

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:

$$R = \sqrt{N \left[\frac{a-1}{a} \right] \left[\frac{k}{k+1} \right] / 4}$$

En estas ecuaciones 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 muestra 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.

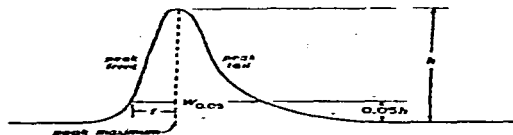


Figura No. 10. Parámetros para cálculo de T

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.- Las pruebas se realizan con la sustancia que se analiza.

- Linealidad
- Precisión

2. Método.- Las pruebas se realizan con placebos cargados con la sustancia que se analiza.

- Linealidad
- Exactitud
- Especificidad
- Estabilidad de la muestra analítica
- Tolerancia del sistema

DEFINICIONES.

LINEARIDAD.

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 determinado.

INTERVALO.

El intervalo de un método analítico determina las concentraciones comprendidas entre los niveles de concentración superior e inferior de la sustancia (incluyendo estos niveles), en los cuales se ha demostrado que el método es preciso, exacto 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 porcentaje de recobro obtenido del análisis 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 muestras de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de Desviación Estándar o del Coeficiente de Variación. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo condiciones normales de operación.

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

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

ESPECIFICIDAD.

Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida unicamente a la sustancia de interes 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 misma muestra, bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, sistemas de elución, tipos de empaque, (soporte, fase estacionaria, etc.), condiciones ambientales.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA.

Es la propiedad de una muestra, lista para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y concentración de la sustancia de interés, después de mantenerse durante un tiempo determinando bajo condiciones específicas.

DETERMINACIONES.**LINEARIDAD DEL SISTEMA.**

Se determina construyendo una curva de calibración entre la concentración de la sustancia y la respuesta obtenida, utilizando 4 o 5 diferentes concentraciones, partiendo de una misma solución patrón. Los análisis se hacen por triplicado de muestras independientes incluyendo la concentración seleccionada como 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:

$$r^2 \geq 0.98$$
$$C.V. \leq 1.5 \%$$

Métodos microbiológicos $r^2 \geq 0.96$

PRECISION DEL SISTEMA (evaluado como repetibilidad).

Se determina del análisis por sextuplicado de una misma solución de la sustancia de referencia correspondiente al 100%, establecido en la linealidad del sistema.

CRITERIO DE ACEPTACION.

C.V. \leq 1.5 %

Métodos microbiológicos C.V. \leq 3 %

ESPECIFICIDAD.

Especificidad para Método 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 "añadido" de éstos y la sustancia de interés y analizarlas 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 por lo menos 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°C - 120°C o a 20°C por debajo del punto de fusión de la sustancia de interés durante un apropiado número de días (1 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.
3. Hacer soluciones de la muestra de interés, ajustar el pH a 1 - 2 y/o a 10 - 12 y someterlas a reflujo por máximo de 8 horas.
4. Las muestras pueden degradarse por oxidación, (con peróxido de hidrógeno) colocando a reflujo algunas horas.
5. Analizar las muestras con el método propuesto.
6. Para análisis por CLAR cuantificar a tres longitudes de onda, a la longitud de onda a la cual se lee el método y a ± 25 nm de dicha longitud.

CRITERIO DE ACEPTACION.

Verificar que los productos de degradación y/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 4 o 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 las soluciones finales a analizar, estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema, incluyendo siempre la correspondiente al 100%.

CRITERIO DE ACEPTACION.

1. Cantidad adicionada contra cantidad recuperada:

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

2. Porcentaje recuperado: Promedio 98 % - 102 %

Los C.V. a cada nivel y el global de todo el intervalo deben estar de acuerdo a la tabla que se presenta en Exactitud al 100%.

EXACTITUD AL 100%

Se analizan por lo menos 6 placebos cargados con la cantidad de principio activo considerada como 100% en la linealidad del método, haciendo los análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

CRITERIO DE ACEPTACION.

El C.V. y el % recuperado deberá cumplir con los siguientes criterios:

MÉTODOS	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 suspensión y semisólidos se acepta un incremento de 1% en el intervalo para recobros y un C.V. ≤ 3 %

REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO.

Se determina de una muestra homogénea del producto final cercana al 100% de la concentración teórica, analizada por dos analistas, en dos corridas diferentes y por triplicado.

CRITERIO DE ACEPTACION.

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

MÉTODO:

Cromatográfico	≤ 2 %
Químicos y Espectrofotométricos	≤ 3 %
Microbiológicos	≤ 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 mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones.

Se almacenan las muestras en 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. Se realizan los análisis bajo las mismas condiciones, utilizando un estándar recién preparado para cada tiempo. La determinación debe ser efectuada por un mismo analista.

Determinar el promedio de las 3 muestras para cada condición y obtener la magnitud del efecto (I).

CRITERIO DE ACEPTACION.

La muestra es estable si el I.C. para la diferencia de las medias del análisis inicial y final incluye el valor de cero, y/o la magnitud del efecto no debe exceder los siguientes porcentajes, o el valor de I cumple con los siguientes criterios:

	PORCENTAJE	VALOR I
Cromatográficos	$\pm 2 \%$	98 - 102 %
Titrimétricos	$\pm 2 \%$	98 - 102 %
Químico y Espectrofotométricos.	$\pm 3 \%$	97 - 103 %
Microbiológicos	$\pm 5 \%$	95 - 105 %

El factor I se determina de la siguiente manera:

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

TOLERANCIA DEL METODO.

Se determina del analisis por duplicado de la misma muestra homogénea utilizada para la reproducibilidad cambiando alguna de las condiciones bajo las cuales se validó el método. (temperatura, reactivos, solventes, fase móvil, columnas, etc.)

CRITERIO DE ACEPTACION.

El método es tolerante a las modificaciones probadas, si los resultados de estas no difieren de los obtenidos en la reproducibilidad en los mismos porcentajes de la tabla utilizada para determinar la estabilidad de la muestra.

CAPITULO III
PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL**VALIDACION DEL METODO ANALITICO.****EQUIPOS E INSTRUMENTOS, MATERIAL Y REACTIVOS.****EQUIPOS E INSTRUMENTOS:**

- Balanza analitica Mettler AJ104
- Baño de ultrasonido Fischer Scientific
- Bomba Waters 600 PF
- Columna fenilo 10 micras 4 mm x 200 mm
- Columna microBondapak C₁₈ 5 micras, 5 mm x 200 mm
- Detector de longitud de onda variable Waters 484
- Integrador y registrador Waters 745 B
- Inyector automatico WISP Modelo 712
- Inyector manual Waters U6A
- Sistema controlador Waters 600 E

MATERIAL:

- Equipo de filtración Millipore
- Membrana de filtración Millipore tipo GVWP de 0.22 μ
- Microjeringa Hamilton de 25 μ l

REACTIVOS:

- Agua destilada
- Metanol HPLC
- Metanol RA
- Sustancia patrón de referencia de citrato de tamoxifeno
- Materia prima de citrato de tamoxifeno
- Acido acético glacial RA
- 1-octansulfonato de sodio RA
- Acetonitrilo HPLC
- Tetrahidrofurano HPLC
- Hidróxido de amonio RA

La validación del método analítico para la determinación de tamoxifeno en tabletas por cromatografía de líquidos de alta resolución, incluye una evaluación de los siguientes parámetros:

- LINEARIDAD DEL SISTEMA
- PRECISION DEL SISTEMA
- LINEARIDAD DEL METODO
- EXACTITUD DEL METODO AL 100%
- ESPECIFICIDAD DEL METODO
- REPRODUCIBILIDAD DEL METODO
- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA
- TOLERANCIA

El método analítico propuesto, emitido por la Jefatura de Control de Calidad del IMSS se describe a continuación:

PREPARACION DE LA SOLUCION PATRON DE REFERENCIA.

Pesar con precisión alrededor de 100 mg de citrato de tamoxifeno patrón de referencia, transferir a un matraz volumétrico de 100 ml, disolver y llevar a volumen con una mezcla de 12 volúmenes de acetonitrilo, 5 volúmenes de agua y 3 volúmenes de tetrahidrofurano, mezclar.

Esta solución contiene 1 mg/ml aproximadamente de citrato de tamoxifeno.

PREPARACION DE LA SOLUCION DE LA MUESTRA PROBLEMA.

Pesar no menos de 10 tabletas y calcular su peso promedio, triturar hasta polvo fino y pesar con precisión una cantidad del polvo equivalente a 100 mg de citrato de tamoxifeno, transferir a un matraz volumétrico de 100 ml, agregar 60 ml de una mezcla de 12 volúmenes de acetonitrilo, 5 volúmenes de agua y 3 volúmenes de tetrahidrofurano, someter a la acción del

61
ultrasonido durante 5 minutos. llevar a volumen con la misma
mezcla. filtrar en papel filtro whatman No. 1 o equivalente.
desechar los primeros mililitros del filtrado.

Esta solución contiene 1 mg/ml aproximadamente de citrato de
tamoxifeno.

CONDICIONES CROMATOGRAFICAS.

FASE MOVIL. Acetonitrilo: agua: tetrahidrofurano: hidróxido de
amonio (300:125:75:2). filtrada y desgasificada.

DETECTOR. Ultravioleta. a 276 nm.

COLUMNA. Columna microBondapak C₁₈ 5 micras. 5 mm X 200 mm

FLUJO. 1.5 ml/min.

VELOCIDAD DE CARTA. 0.25 cm/min.

VOLUMEN DE INYECCION. 10 µl

ATENUACION. 52

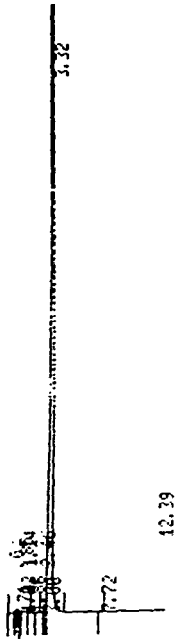
La validación se inició evaluando la especificidad del método.

Para determinar la especificidad del método se sometieron a degradación muestras de materia prima, placebo y formulación en las siguientes condiciones:

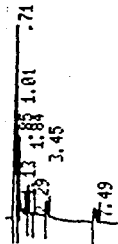
- Solución 1N de Acido clorhídrico, en reflujo 15 min.
- Solución 1N de hidróxido de sodio, en reflujo 15 min.
- Solución al 20% de peróxido de hidrógeno, en reflujo 5 min.
- Luz solar, 3 meses
- Temperatura de 80°C. 2 meses
- Luz ultravioleta, 3 meses

Se prepararon muestras, y se analizaron mediante el método propuesto para cuantificar el principio activo; sin embargo se determinó que éste no cumple con dicho parámetro, ya que se presenta una clara interferencia por parte de los productos de degradación y excipientes degradados; razón por la cual no es adecuado para ser utilizado en la cuantificación de tamoxifeno, como método indicativo de estabilidad.

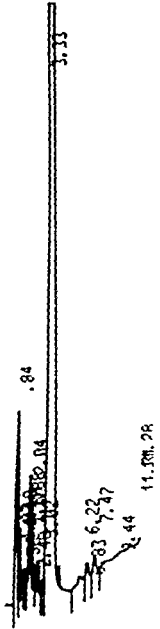
CRONOTRAMA No. 1. Estándar de Citrato de tamoxifeno.



CRONOTRAMA No. 2. Placebo



CRONATODRAMA No. 3. Materia prima.



CRONATODRAMA No. 4. Formulacion



Este método se sustituye por el descrito en la U.S.P. XXII, que se menciona a continuación:

PREPARACION DE LA SOLUCION DEL ESTANDAR DE REFERENCIA.

Pesar con exactitud alrededor de 25 mg de citrato de tamoxifeno (cantidad de referencia), transferirlos a un matraz volumétrico de 25 ml, adicionar 15 ml de metanol y someterlo al ultrasonido durante 5 min; llevar a volumen con metanol y mezclar. Tomar una alícuota de 5 ml de esta solución y transferirla a un matraz volumétrico de 25 ml, llevar a volumen con metanol y mezclar. Concentración: 200 µg/ml de citrato de tamoxifeno.

PREPARACION DE LA SOLUCION DE LA MUESTRA PROBLEMA.

Pesar no menos de 20 tabletas, determinar su peso promedio y pulverizarlas; pesar una muestra de polvo equivalente a 20 mg de citrato de tamoxifeno, transferirla a un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar 60 ml de metanol, y someter al ultrasonido durante 5 min, llevar a volumen con metanol, mezclar y filtrar. Concentración: 200 µg/ml de citrato de tamoxifeno.

CONDICIONES CROMATOGRAFICAS.

FASE MOVIL: Metanol: agua: octansulfonato de sodio: ácido acético. (680:320:1.00:2).

COLUMNA: Columna fenilo 10 micras 4 mm x 30 mm

VOLUMEN DE INYECCION: 25 µl

FLUJO: 1.5 ml/min

ATENUACION: 512

LONGITUD DE ONDA: 254 nm

VELOCIDAD DE CARTA: 0.25 cm/min

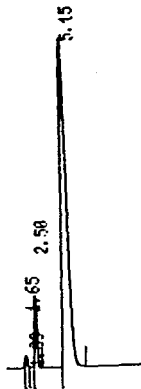
La validación de este método se llevó a cabo evaluando los parámetros mencionados anteriormente.

ESPECIFICIDAD.

Para determinar la especificidad del método se sometieron a degradación muestras de materia prima, placebo y formulación en las siguientes condiciones:

- Solución 1N de ácido clorhídrico, en reflujo 15 min.
- Solución 1N de hidróxido de sodio, en reflujo 15 min.
- Solución al 20% de peróxido de hidrógeno, en reflujo 5 min.
- Luz solar, 3 meses.
- Temperatura de 80°C, 2 meses.
- Luz ultravioleta, 3 meses.

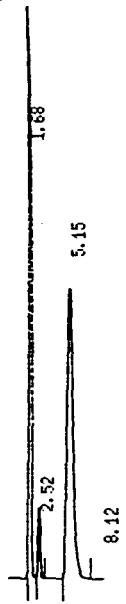
Las muestras degradadas se analizan utilizando el método propuesto para cuantificar el principio activo, a 2 longitudes de onda, a la longitud de onda de 254 nm y a 274 nm para evaluar la capacidad del método de cuantificar a la molécula de interés exclusivamente sin que exista interferencia por parte de los productos de degradación y excipientes.



CROMATOGRAMA No. 5. Estándar de citrato de lasozifeno



CROMATOGRAMA No. 6. Placebo



CHROMATOGRAM No. 7. Materia prima.



CHROMATOGRAM No. 8. Farmacolo

1

LINEARIDAD DEL SISTEMA.

Se realizó preparando una solución patrón de citrato de tamoxifeno en metanol, de la cual se tomaron alícuotas para obtener soluciones de 80, 120, 160, 200 y 240 $\mu\text{g/ml}$ que corresponden al 40, 60, 80, 100 y 120 por ciento de la concentración elegida como 100% (200 $\mu\text{g/ml}$).

Cada solución se preparó por triplicado. Se analizaron las muestras utilizando el método propuesto y se determinó la linealidad del sistema graficando concentración de las muestras contra área.

PRECISION DEL SISTEMA (Evaluada como repetibilidad).

Se determinó de la respuesta obtenida de 6 muestras preparadas a partir de la solución con la sustancia de referencia correspondiente al 100%, establecido en la linealidad del sistema.

LINEARIDAD DEL METODO.

Se determinó analizando mediante el método propuesto placebos adicionados a 5 diferentes niveles (40, 60, 80, 100, 120 %), independientemente y por triplicado utilizando las siguientes concentraciones: 80, 120, 160, 200, 240 $\mu\text{g/ml}$.

EXACTITUD DEL METODO.

Se determinó del porcentaje recuperado, analizando por sextuplicado placebos adicionados independientemente con cantidades correspondientes al 100%.

REPRODUCIBILIDAD DEL METODO.- Lote No. 951117

Se llevó a cabo por 2 analistas en 2 días diferentes, analizando por triplicado una misma muestra homogénea de producto terminado de tamoxifeno tabletas.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA.

Se determinó realizando el análisis inicial de 3 muestras, listas para inyectar, que posteriormente se analizaron a las 24 horas después de haberse sometido a las siguientes condiciones:

- Temperatura ambiente con luz natural
- Temperatura ambiente y obscuridad
- Refrigeración

TOLERANCIA.

Se realizó comparando los resultados iniciales de 2 muestras con los obtenidos, después de variar la proporción de los componentes de la fase móvil.

CAPITULO IV
RESULTADOS Y CONCLUSIONES

RESULTADOS.

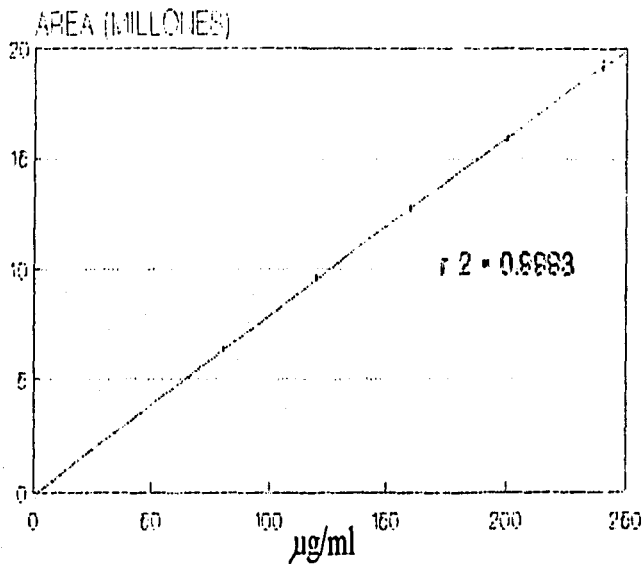
LINEARIDAD DEL SISTEMA.- (Los resultados se presentan en gráfica No. 1)

TABLA No. 1

CONCENTRACION DE CITRATO DE TAMOXIFENO ($\mu\text{g/ml}$)	RESPUESTA OBTENIDA (AREA DE TAMOXIFENO)	FACTOR AREA/CONC. ($\mu\text{g/ml}$)
80	6286317	78578.96
80	6248866	78110.82
80	6360535	79506.69
120	9554061	79617.17
120	9677965	80649.70
120	9444805	78706.71
160	12760079	79750.49
160	12520781	78254.88
160	12535180	78344.87
200	15933167	79665.83
200	15966927	79834.63
200	15798829	78994.14
240	19355439	80647.66
240	19156240	79817.67
240	18961358	79005.66

	OBTENIDO	CRITERIO DE ACEPTACION
% CV GLOBAL	1.02	< 1.50
r^2	0.9993	\geq 0.98

LINEARIDAD DEL SISTEMA CITRATO DE TAMOXIFENO



GRAFICA No. 1

VALIDACION DEL METODO

PRECISION DEL SISTEMA.

73

CONCENTRACION: 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$

TABLA No. 2

AREA DE CITRATO DE TAMOXIFENO	FACTOR AREA / CONCENTRACION
----------------------------------	--------------------------------

15933167	79665.83
15966927	79834.63
15798829	78994.14
16085497	80427.48
16019879	80099.39
15708211	78541.05

% CV = 0.88

Criterio de Aceptación: % CV \leq 1.50

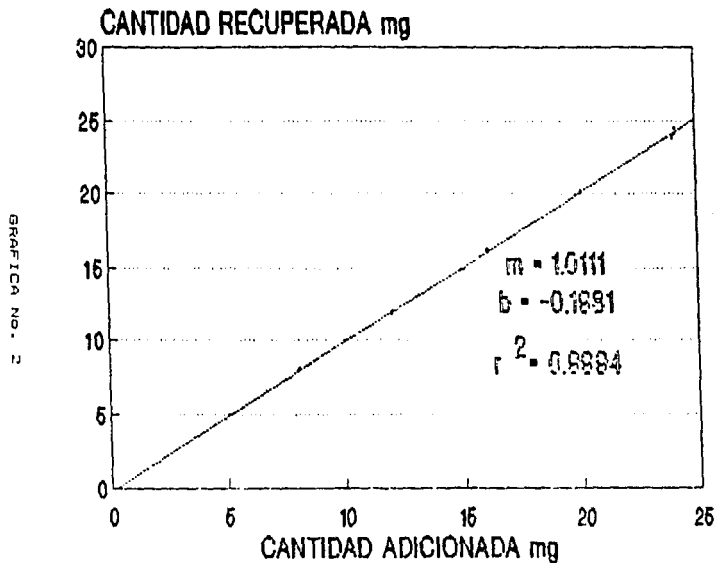
LINEARIDAD DEL METODO: (Los resultados se presentan en la gráfica No. 2)

TABLA No. 3

NIVEL %	CONCENTRACION FINAL ($\mu\text{g/ml}$)	CANT. ADIC. (mg)	CANT. RECUP. (mg)	POR CIENTO DE RECOBRO	COEFICIENTE DE VARIACION POR NIVEL %
40	80.40	8.04	7.9	98	
40	80.40	8.04	7.96	99	0.58
40	81.10	8.11	8.02	99	
60	120.00	12.00	11.98	100	
60	120.00	12.00	11.81	98	1.01
60	120.00	12.00	11.85	99	
80	160.20	16.02	16.14	101	
80	160.80	16.08	16.15	100	0.58
80	160.20	16.02	16.00	100	
100	200.40	20.04	20.04	100	
100	200.40	20.04	20.11	100	0.00
100	200.40	20.04	20.10	100	
120	240.60	24.06	24.06	100	
120	240.60	24.06	24.43	102	1.52
120	239.90	23.99	23.72	99	

	OBTENIDO	CRITERIO DE ACEPTACION
PENDIENTE (m)	1.0111	1.00
INTERCEPTO (b)	-0.1981	0.00
COEFICIENTE DE DETERMINACION r^2	0.9994	≥ 0.98
PORCIENTO DE RECOBRO PROMEDIO	100	98% - 102%
% CV GLOBAL	1.05	$\leq 2.00\%$

LINEARIDAD DEL METODO TAMOXIFENO TABLETAS



VALIDACION DEL METODO

TABLA No. 4

CONCENTRACION FINAL ($\mu\text{g/ml}$)	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	POR CIENTO DE RECUBRO
200.40	20.04	20.35	102
200.40	20.04	19.97	100
200.40	20.04	20.04	100
200.40	20.04	20.05	100
200.40	20.04	20.28	101
200.40	20.04	20.19	101

	OBTENIDO	CRITERIO DE ACEPTACION
Porcentaje de recobro promedio.	101	98% - 102%
% C.V.	0.81	$\leq 2.00\%$

REPRODUCIBILIDAD DEL METODO.

TABLA No. 5

ANALISTA

		1	2
D		99	100
	1	100	101
		98	100
I		98	98
	2	97	102
A		98	102

	OBTENIDO	CRITERIO DE ACEPTACION
% C.V.	1.68	≤ 2.00%

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA.

TABLA No. 6

MUESTRA	% INICIAL	TEMPERATURA	TEMPERATURA	REFRIGERACION
		AMBIENTE CON LUZ NATURAL 24 H.	AMBIENTE Y OBSCURIDAD 24 H.	
R1	99	104	101	100
R2	100	107	102	101
R3	98	102	100	99
PROMEDIO	99	104	101	100
I 1 (%)	-	104	102	100
I 2 (%)	-	108	102	101
I 3 (%)	-	104	102	101
\bar{I} (%)	-	105	102	101

CRITERIO DE ACEPTACION:

La media del factor I (I) para cada condición debe encontrarse entre 98% - 102%.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

RESULTADO:

La media del factor I (I) para la condición de temperatura ambiente y obscuridad a 24 h y refrigeración a 24 h se encuentra entre 98% - 102%. La media del factor I (I) para la condición de temperatura ambiente con luz a 24 h no se encuentra entre 98% - 102% por lo tanto la solución de la muestra no es estable bajo esta condición.

ESPECIFICIDAD DEL METODO.**Criterio:**

Los excipientes de la fórmula no deben interferir en la cuantificación del principio activo.

Resultado:

Los excipientes no interfieren en la cuantificación del principio activo (ver Cromatograma No. 6)

En las siguientes tablas se reportan los porcentajes de recobro de materia prima y formulación degradadas a reflujo con ácido clorhídrico 1N, hidróxido de sodio 1N, peróxido de hidrógeno al 20%, sometidos a la luz ultravioleta, luz solar y 80°C. Se analizaron a 254nm y 274 nm.

TABLA No. 7

CONDICIONES DE LA MUESTRA		TIEMPO DE EXPOSICION	PORCENTAJES OBTENIDOS	
			254 nm	274 nm
M	HCL IN REFLUJO	15 MIN.	91	90
A P	NaOH IN REFLUJO	15 MIN.	89	90
T R				
E I	H ₂ O ₂ 20% REFLUJO	5 MIN.	92	94
R M	LUZ SOLAR	3 MESES	97	95
I A	80°C	2 MESES	95	96
A	LUZ ULTRA VIOLETA.	3 MESES	94	93

TABLA No. 8

	CONDICIONES	TIEMPO DE	PORCENTAJES	OBTENIDOS
	DE LA MUESTRA	EXPOSICION	254 nm	274
F O R M U L A C I O N	HCL IN REFLUJO	15 MIN	88	88
	NaOH IN REFLUJO	15 MIN	91	91
	H ₂ O ₂ 20% REFLUJO	5 MIN	90	93
	LUZ SOLAR	3 MESES	103	100
	80°C	2 MESES	60	63
	LUZ ULTRA- VIOLETA.	3 MESES	93	95

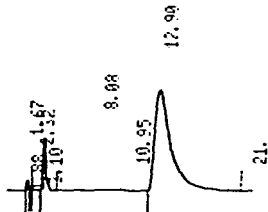
El placebo también fue sometido a las mismas condiciones de degradación y en ningún caso presenta degradantes que puedan interferir en la cuantificación del principio activo.

TOLERANCIA.

Se prepararon dos soluciones de muestra problema y dos soluciones patrón de referencia, se analizaron modificando la proporción de metanol y agua en la fase móvil.

Primero disminuyendo en un 10% la cantidad de metanol e incrementándolo de agua, segundo aumentando en un 10% la cantidad de metanol y disminuyéndolo de agua, tercero aumentando en un 5% la cantidad de metanol y disminuyéndolo de agua.

En los tres casos no hay una buena resolución de los picos, existe interferencia por parte de los excipientes.



CRONITODRAMA No. 9. ESTANDAR DE CITRATO DE TANIXIFENO
FASE MOVIL METANOL: AGUA (60:40)



CONSTRUCCION No. 10 ESTANDB DE CITRATO
DE TAMBIFENO
FASE NOVIIL METANIL: ANIA (80:20)



CONSTRUCCION No. 11 ESTANDB DE CITRATO
DE TAMBIFENO
FASE NOVIIL METANIL: ANIA (75:25)

CONCLUSIONES.

El método propuesto es lineal en el intervalo analizado, es reproducible y exacto al 100%.

Las muestras listas para inyectar son estables hasta 24 h en la obscuridad a temperatura ambiente y en refrigeración.

El método analítico puede emplearse para análisis en Control de Calidad y para seguimiento de estabildades, debido a que el placebo y los productos de degradación no interfieren en la cuantificación del principio activo.

Al emplear este método se debe tener cuidado de no modificar la proporción de los solventes en la fase móvil ya que dicho método no es tolerante a estos cambios.

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es una técnica que ofrece grandes ventajas por su alta sensibilidad y su versatilidad en los análisis. Sin embargo el alto costo en la adquisición y mantenimiento del equipo requiere de una gran inversión.

CAPITULO V

BIBLIOGRAFIA

CAPITULO V

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

86

1. Goodman Gilman Alfred. Gilman Alfred. Goodman Gilman Alfred. Séptima edición 1990: Editorial Médica Panamericana: p 1231, 1232.
2. Litter Manuel. Compendio de Farmacología. Cuarta Edición 1988; Editorial el Ateneo. p 554-555
3. The Index Merck; eleventh edition; Ref. 9019. p 1430
4. British Pharmacopoeia. London Her Majesty's Stationery Office. 1988. Vol. 1. p 553-554
5. Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos. Validación de Métodos Analíticos.
6. Merck-México S.A. Principios de Cromatografía Líquida de Alta Resolución. 1992
7. Perkin-Elmer. Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica. Primera edición. 1981
8. Norma IMSS: Tamoxifeno tabletas. Jefatura de Control de Calidad. 1981
9. Snyder, L.R. Journal of Chromatography Science. Vol. 16. 1978. pp. 223
10. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas PLM. Editorial Ediciones PLM S.A. de C.V. 1990 p. 1375 - 1376.
11. USP XXI (Pharmacopoeia. National Formulary) pp 1310-1311
12. Chromatography Division Waters Sourcebook for Chromatography Columns and Supplies 1985.

13. Esquivel B. Harol M. McNair. Cromatografía Líquida de Alta Presión. Segunda Edición, Secretaría General de la DEA, 1980.

14. Kissinger, P.T. Vickres, T.M. (editor) Marcel Dekker. Electrochemical Detector in Liquid Chromatography. Inc. New York U.S.A. 1983. pp. 125-164.

15. Manni, A. Trujillo, J. Marshall, J.S. and Pearson, D.H. Antiestrogen-induced Remissions in Stage IV Breast Cancer. Cancer Treat Rep. 60: 1445-50, 1976

16. Moseson, D.L. Sasaki, G.H. and Leung B.S. The Use of Antiestrogens Tamoxifen and Nafoxidine in the Treatment of Human Breast Cancer in Correlation With Estrogen Receptor Values. Cancer 41: 797-800, 1978.

17. Lerner, H.J. Band, P.R. Israel, L. and Leung, B.S. Phase II Study of Tamoxifen: Report of 74 patients with stage IV breast disease. Cancer Treat. Rep. 60: 1431-1435, 1976.

18. Jacolot, Francois; Simon, Isabelle; Dreano, Yvonne; Identification of the Cytochrome P450IIA of Tamoxifen in Human Liver Microsomes. Biochem Pharmacol. 1991, 41 (12), 1911-19.

19. Heel, R.C. Brogden, R.N.; Speigt, T.M.; Tamoxifen: A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Use in the Treatment of Breast Cancer. Drugs 1978, 16 (1), 1-24.

20. Wiseman, Helen. Tamoxifen: New Membrane Mediated Mechanisms of Action and Therapeutic Advances. Trends Pharmacol. Sci. 1994, 15 (3), 83-9.