

2ef



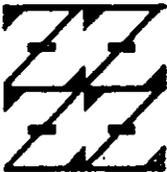
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO PARA
LA CUANTIFICACION DE VITAMINAS
HIDROSOLUBLES DE UN MEDICAMENTO
UTILIZANDO HPTLC Y DENSITOMETRIA.

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
DAGOBERTO GARCIA JAUREGUI

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO HICIMOS EJE
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

262020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

**ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE APLICACIONES, AREA
QUIMICA - DIVISION REACTIVOS DE LA COMPAÑIA MERCK MEXICO S.A.;
BAJO LA DIRECCION Y ASESORIA DEL Q.F.B. FILIBERTO HUERTA CAMACHO**

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, Por darme la vida, la fortaleza y sabiduría necesarias.

A MIS PADRES, Dagoberto y Graciela

Por enseñarme que la vida se construye con logros y experiencias, por mostrarme los principios y la ética de un profesional, por hacer de mí una persona ecuánime y darme el ejemplo de quien quiero ser, pero sobre todo por darme su apoyo incondicional en cualquier momento; a ustedes debo y dedico este trabajo como culminación de una de las etapas mas importantes de mi existir.

A MIS HERMANOS, Alfredo y Raciél

Por ayudarme cuando los he necesitado, por soportar mi mal genio y enseñarme que en la vida debemos compartir las alegrías y las desventuras. Espero que este trabajo les sirva de estímulo para continuar superándose en sus vidas, y que pronto puedan ver sus metas realizadas.

Porque han sido parte fundamental en mi vida y en mi desarrollo.

GRACIAS

A LUPITA,

Por ser la luz de mi vida, porque has sido tú quien me dió la energía al final. Gracias por todo tu apoyo y tu amor. Que este trabajo sea una muestra de lo importante que eres para mi...



Porque estas son carreras de resistencia y no de velocidad...

(Mi padre).

A MIS MAESTROS,

Por transmitirme su sabiduría y experiencias, por el apoyo y el tiempo brindado.

A MIS AMIGOS,

Abraham, Adrian, Carlos, Chucho, Eric, Fili, Gus, Juan, Miriam, Pedro, Ricardo y a todos aquellos que han estado cerca de mí en su momento, Por su amistad y comentarios a este trabajo.

Deseo externar mi mas sincero reconocimiento a Filiberto Huerta Camacho porque debo a su apoyo y amistad la realización de este trabajo.

A todos ustedes les brindo mi mas profundo agradecimiento

INDICE GENERAL

TEMA	PAGINA
1.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
2.- FUNDAMENTACION DEL TEMA	2
3.- GENERALIDADES.....	5
3.1.- Validación.....	6
3.2.- Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución.	8
3.2.1.- Fase estacionaria	9
3.2.2.- Fase móvil	11
3.2.3.- Mecanismos de retención.....	12
3.2.4.- Aplicación.	14
3.2.4.1.- Métodos de aplicación.	14
3.2.5.- Desarrollo	16
3.2.5.1.- Fase Móvil.	16
3.2.5.2.- Métodos de desarrollo.	16
3.3.- Densitometría.	20
3.3.1.- Densitómetro.	22
3.4.- Propiedades de los analitos.....	23
3.4.1.- Vitamina B12 : Cianocobalamina.	23
3.4.2.- Vitamina B6 : Piridoxina.	24
3.4.3.- Vitamina B1 : Tiamina.....	24
4. OBJETIVOS	26
5. HIPOTESIS	27
6. METODOLOGIA.....	28
6.1.- Material.....	28
6.1.1.- Material de Laboratorio.	28
6.1.2.- Instrumental.	28
6.1.3.- Reactivos.	28
6.2.- Preparación de soluciones.	28
6.3.- Aplicación y desarrollo.	29
6.4.- Lectura.	30

7. RESULTADOS	31
7.1.- Exactitud.....	31
7.2.- Precisión. (Repetibilidad)	31
7.3.- Precisión. (Reproducibilidad)	31
7.4.- Especificidad.....	32
7.5.- Gráficas de linealidad.....	32
8. DISCUSION DE RESULTADOS	35
9. CONCLUSIONES.....	40
10. GLOSARIO.....	41
11. BIBLIOGRAFIA	42

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El conocimiento de la distribución y abundancia de las vitaminas en todo tipo de productos para consumo, ha sido uno de los principales objetivos en la investigación general. Actualmente su uso se ha visto incrementado como consecuencia de los avances en la tecnología alimentaria y farmacéutica aunado a las investigaciones realizadas sobre el papel que juegan las vitaminas en el organismo y su metabolismo.

Desde los primeros estudios que se realizaron para determinar vitaminas en productos naturales hasta los controles que se llevan a cabo actualmente en la fabricación de medicamentos, uno de los factores en los que se ha puesto mayor énfasis es el método de análisis para la identificación y cuantificación de dichos compuestos.

Particularmente la fabricación de vitaminas en inyectables requiere de un método analítico que cumpla con los requisitos indispensables para asegurarnos la calidad y confiabilidad de este medicamento, además de cumplir con otras características como son: economía, rapidez y sencillez. No obstante los métodos reportados poseen ciertas desventajas que hacen difícil y complicado su uso o no cumplen con alguna de las características antes mencionadas.

Una técnica que puede proporcionarnos todas estas características es la Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución en combinación con la Densitometría la cual puede cumplir con el control de calidad de los medicamentos.

II. FUNDAMENTACION DEL TEMA

El análisis de las sustancias que son vitales para los organismos, ha constituido una parte fundamental en el conocimiento de los mismos; su estudio ha permitido entender la función que desempeñan dentro de los ciclos biológicos, así como determinar la manera de controlar su fabricación, extracción, producción, etc. mediante el control de calidad de dichas sustancias.

Dentro de la gran variedad de elementos que existen para mantener la homeostasis/equilibrio bioquímico de los organismos, encontramos a las Vitaminas. Aunque estas sustancias se conocen desde hace ya mucho tiempo, el estudio sobre su dosificación es relativamente reciente así como el de su producción industrial; es por ello que los métodos analíticos para el control de calidad en la fabricación de medicamentos vitamínicos ha venido evolucionando rápidamente desde los años setentas⁽³⁶⁾

Los primeros análisis de vitaminas fueron realizados empleando métodos biológicos, en donde los efectos específicos producidos por las vitaminas en animales de experimentación servían de base para la valoración cuantitativa de las mismas. Sin embargo estos métodos son normalmente caros y con márgenes de error usualmente altos, por otro lado la experimentación con animales se ha visto limitada a ciertas áreas de la investigación⁽³⁶⁾

Otros sistemas de análisis reportados consisten en procedimientos químicos o fisicoquímicos produciendo generalmente reacciones coloridas. Estos métodos se emplean comúnmente en la Industria Farmacéutica; en general son rápidos, baratos y con márgenes de error pequeños por lo que su uso ha permanecido restringido a los ensayos de identidad.^(36,12,43,42,6)

Existen además métodos microbiológicos los cuales han sido ampliamente utilizados en la determinación de vitaminas del grupo B, se caracterizan por poseer una alta sensibilidad y especificidad; sin embargo presentan el problema de requerir tiempos de análisis largos, al menos 24 hrs, asimismo presentan altos márgenes de error ($\approx 10\%$) en la cuantificación, por lo que se utilizan en la determinación semicuantitativa de vitaminas^(12,36)

Actualmente los procedimientos oficiales para la evaluación de vitaminas en el control de calidad de medicamentos, específicamente Tiamina, Piridoxina y Cianocobalamina consisten en:

1) El empleo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en la cual se inyecta directamente al sistema la muestra problema y las soluciones de referencia, analizando los tiempos de retención y las áreas producidas.

2) Cromatografía de Gases para cianocobalamina, empleando alcohol cetílico o alcohol deshidratado como fase móvil.^(12,43)

3) Análisis por fluorescencia de la muestra y estándar al ser tratados con un reactivo oxidante (ferricianuro de potasio/NaOH 3.5N) para la tiamina.^(6,12)

Todos los casos anteriores presentan varias desventajas que se deben considerar al momento de elegir un método analítico. Una de ellas son los tiempos de análisis, sobre todo en HPLC que provoca el retraso en la entrega de resultados, consumo de horas hombre y por tanto gastos a la compañía, entre otras. Existe también el problema del consumo de solventes, el volumen de solvente por análisis es elevado y en ocasiones el estudio no justifica una inversión de esta naturaleza, además de generar altas cantidades de contaminantes sin mencionar que actualmente los intereses ecológicos están siendo de gran interés. Si consideramos el tema de calibraciones el manejo de estándares es de suma importancia debido a que deben prepararse varias soluciones implicando un gasto de reactivos y mucho tiempo de análisis principalmente.

Por otro lado nos ofrecen algunas ventajas importantes, la precisión y sensibilidad que se pueden alcanzar con estos sistemas son elevadas, sobre todo los equipos cromatográficos, sirven de manera excepcional para estudios con límites de aceptación muy cortos (generalmente medicamentos de alto riesgo). La versatilidad de estas metodologías es muy grande y se pueden emplear prácticamente para identificar cualquier compuesto. Actualmente el desarrollo fuerte se ha realizado en la Cromatografía de Líquidos con la introducción en el mercado de equipos muy sofisticados que aumentan las aplicaciones de estos sistemas, por ejemplo: las conexiones en red vía fax-modem, correo electrónico, satélite, internet, etc. Su campo de aplicación en investigación cada vez es mayor dada su alta especificidad y reproducibilidad, estando presentes en todos los institutos reconocidos.

Tomando en cuenta todos estos factores, se continua en la búsqueda de sistemas que nos permitan un análisis rápido, eficaz, confiable y económico. Una técnica que puede ofrecernos todas estas características es la Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución (HPTLC) ^(6,12,35).

La Cromatografía en Capa Fina (TLC), técnica muy antigua, ha existido desde la época de Aristóteles⁽¹⁾, aunque durante algún tiempo fue olvidada, actualmente se esta retomando gracias a los avances tecnológicos que han existido al respecto, encontrándose una serie de novedades y aplicaciones en distintos sectores: industrial, ambiental, docencia, investigación, etc.

El desarrollo principal que se ha realizado a esta técnica es la producción de sorbentes con un tamaño de partícula entre 5 - 50 μm y espesores de capa hasta de 250 μm ⁽¹⁾, así como una gran variedad de placas cromatograficas: NH₂, diol, CN, RP-2, RP-8, RP-18, etc. creándose de esta forma la Cromatografía En Capa Fina de Alta Resolución (HPTLC) ⁽³⁵⁾. Aunque este avance en general es reciente ha sido objeto de numerosos estudios desde hace aproximadamente 15 años. Los primeros reportes datan de 1969 por Stahal quien fuera uno de los pioneros en el uso de la Capa Fina, utilizando este método para determinar y valorar principios activos de *compuestos naturales incluyendo las vitaminas*. ^(8,35)

A partir de aquí se inicio una revolución constante tanto en instrumentos como en aplicaciones en torno a la HPTLC. Investigadores como Koleva, M. Ebel, S. Bidlo, S y otros ^(5,9,11,13,20,28,32) tienen reportados numerosos estudios en donde realizan severos análisis a la

técnica, ellos hacen especial énfasis en los posibles errores y fuentes de variación que pueden existir, dado las numerosas variables que intervienen en un proceso cromatográfico. Asimismo analizan las relaciones existentes entre la estructura química y los solventes hayando una interferencia directa sobre los valores de R_f, de esta manera se inicia el estudio de polaridades y ^(3,9,11,20,28,32.) Investigadores como Prosek, M. Kucan, E. Alert, D. y colaboradores emplearon HPTLC en el estudio de alcaloides encontrando una serie de ventajas y desventajas en el uso de esta técnica que sirvieron como guía para posteriores investigaciones. Jork, H y Wimmer ^(3,9,11,20,28,32.) reportaron en 1986 cuantiosos avances en la técnica incluyendo aplicación y lectura de muestras.

A la par de la tecnología de la HPTLC han existido muchos avances tanto en aplicación, desarrollo de cromatogramas y lecturas "in situ" de las muestras mediante el uso de la Densitometría, considerándose aplicaciones detalladas y cuantitativas de las muestras sobre placas de HPTLC. Fenimore, D. Xu, G. Kolarovi, L. y otros ^(5,10,13,17,18,21,37) desde 1980 se han encargado de desarrollar y emplear estas nuevas tecnologías llevando a cabo estudios que van desde cromatografía monodimensional, hasta estudios mas avanzados como son desarrollos bidimensionales, de gradiente e incluso el empleo de sistemas computarizados para su manejo y lecturas tanto en espectroscopias visibles, ultravioleta, infrarrojo o fluorescencia. Fue precisamente en el año de 1980 cuando se realizo el 1^{er} Simposium Internacional de HPTLC, en donde investigadores como Howarth, P. Butler, H. Ebel, S ^(5,10,13,17,18,21,37.) expusieron los avances hasta entonces logrados.

Aunque en 1969 Stahal publica un escrito sobre algunas aplicaciones de TLC en la industria ⁽³⁵⁾, no fue sino hasta 1985 que Klaus, R. ⁽²⁴⁾ y Langhorst, M.L. ⁽²⁵⁾ esclarecieron las áreas en que la HPTLC se ha estado empleando presentando algunos resultados de estos trabajos los cuales incluían parámetros de validación de métodos como linealidad, precisión y exactitud. Esto dio la pauta para introducir la HPTLC en controles industriales, tal es el caso en 1987 de Bidlo-Igloy ⁽²⁾ y Renger, B. ⁽³⁰⁾ quienes reportaron el uso de esta técnica para determinar cuantitativamente compuestos de interés farmacéutico, dando especial énfasis en el estudio de mezclas multivitamínicas.

El análisis de vitaminas, como se mencionó anteriormente ha sido realizado desde hace ya mucho tiempo y de una manera muy completa, no obstante el empleo de la TLC y HPTLC en esta rama no hace mucho que fueron iniciados. Los primeros reportes publicados registran desde 1969 con Stahal ⁽³⁸⁾ quien empleo la TLC para valorar vitaminas en mezclas complejas y productos naturales, analizó también vitamina A y vitamina C en presencia de glúcidos y alfa-tocoferol; aunque lejos de plantear la TLC como método de control de calidad, Stahl sentó las bases para cumplir con este objetivo. Fue Nutall, R. ⁽²⁷⁾ en 1971 quien empleo la TLC en el análisis de multivitamínicos, considerando este método como técnica secundaria para la cuantificación de vitaminas.

Posteriormente en 1973 Koleva, M y Joneidi, M ⁽²³⁾ estudiaron las vitaminas D2 y D3 en inyectables, así como sus productos de degradación bajo el empleo de TLC y Densitometría. Wintersteiger, R. ⁽⁴⁶⁾ en 1981 continuo con el estudio analizando alcoholes

por TLC incluyendo vitaminas D2 y D3 planteando las bases para la validación del método y dando así un paso importante en el desarrollo de HPTLC.

La etapa de 1982-1987 resultó muy fructífera para esta área puesto que investigadores como Kofman, I., Linetsky, M., Krehula, M., Chu, X., Watskins, T.R. y colaboradores ^(22,26,34,41,45) emplearon HPTLC y densitometría por análisis computacional para determinar cuantitativamente compuestos multivitámicos, principalmente en los grupos B y D, planteando una nueva alternativa como control de calidad de estos compuestos; sus estudios generaron una gran cantidad de información que aun ahora sigue vigente. Fue Raushkolob, E.W. ⁽²⁹⁾ quien en 1990 completo una revisión bibliográfica estableciendo los principales factores que afectan al análisis de vitaminas por HPTLC.

Estudios mas específicos también se han realizado como es el caso de Tiamina, Piridoxina y Cianocobalamina, aunque no han sido muy abundantes. Stahl ⁽³⁵⁾ investigó el comportamiento de estas vitaminas empleando TLC, sin embargo los procedimientos de detección consistían en raspado de la placa o uso de reveladores. En 1979 Gūbitz, G. ⁽¹⁵⁾ desarrollo un método por TLC y Densitometría para determinar Cianocobalamina, este fue el primer reporte de cuantificación "in situ" para estas vitaminas. Tiehelman ^(39,40,41) desde 1974 comenzó sus estudios del grupo B por TLC y fue en 1981 cuando acopló la espectro-densitometría al análisis de compuestos multivitámicos; así en 1985 Ebel, S. ⁽¹⁰⁾ y Ni, Q. ⁽²⁶⁾ comenzaron sus estudios en base a la estabilidad de las vitaminas específicamente Tiamina identificando sus compuestos de degradación. Fue Fank, W. ⁽¹⁴⁾ en 1990 quien analizó un producto farmacéutico del grupo B por HPTLC y Densitometría, concluyendo de esta manera la labor para la introducción de dicha técnica al control de calidad de medicamentos.

Aun falta un aspecto importante a tratar de HPTLC y es la validación de la técnica, los estudios al respecto son realmente escasos, se tienen datos de Renyer, B. Shutter, J y Ebel, S. ^(9,30,31) en el control de calidad de medicamentos por HPTLC, manejando algunos parámetros de validación, sin embargo lejos de ser procedimientos estandarizados u oficiales carecen de datos suficientes para tal efecto.

Dadas las condiciones de la actual industria farmacéutica en México, se requieren de estudios que certifiquen la validación de los métodos de control por HPTLC y siendo tan escasos estos trabajos se ve la necesidad de trabajar en ello para poder emprender el camino al uso de un método rápido, económico, sencillo, confiable y tan versátil como lo es la Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución.

III. GENERALIDADES

3.1.- VALIDACION

Todo método analítico tiene como propósito el determinar al analito en una muestra siendo un procedimiento que involucra un proceso de medición el cual dará como resultado una respuesta analítica, siendo la validación la evaluación del grado de confiabilidad.

La definición oficial de validación aceptada por las empresas es la siguiente: "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"⁽¹⁶⁾ las características del método son expresadas en términos de parámetros analíticos ^(16,42) que a continuación se describen.

- a).- **Precisión:** La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento es aplicado repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea del producto. Es usualmente expresada como el porcentaje de desviación estándar o desviación estándar relativa (coeficiente de variación). La precisión en una medición es indicativo del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo circunstancias normales de operación.
- b).- **Repetibilidad:** es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones de trabajo.
- c).- **Reproducibilidad:** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes de trabajo.
- d).- **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 han adicionado cantidades conocidas de la sustancia.
- e).- **Linealidad:** Es la capacidad que tiene un método analítico para elucidar que los resultados son directamente,(o por una transformación matemática), proporcionales a la concentración del analito en muestras dentro de un intervalo determinado. La linealidad es usualmente expresada en términos de varianza alrededor de la regresión lineal calculada en base a una relación matemática establecida de los resultados obtenidos por el análisis de muestras con concentraciones variables del analito.

El cálculo de linealidad se realiza en base a un análisis estadístico por el método de mínimos cuadrados aunque en algunos casos se obtiene la proporcionalidad entre los ensayos y las muestras por medio de transformaciones matemáticas

previas al análisis (exponenciales, potenciales, logarítmicas, polinomiales, cinéticas, etc.)

- f).- Limite de detección: Se define como la mínima concentración del analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada, bajo condiciones experimentales establecidas.
- g).- Limite de cuantificación: Es la mínima concentración de analito en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo condiciones experimentales establecidas. Es UN parámetro necesario para la evaluación de compuestos en niveles muy bajos, como impurezas y compuestos de degradación.
- h).- Especificidad: Es la capacidad que tiene el método para determinar exactamente y específicamente el analito en presencia de otros componentes presentes en la matriz o muestra.
- i).- Estabilidad: Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Los ensayos analíticos pueden variar desde evaluaciones subjetivas hasta mediciones altamente cuantitativas; considerando esto, es entendible que existan diferentes esquemas de validación (ver tabla-I) desglosado en diferentes categorías dependiendo de la naturaleza del ensayo, de donde:

CATEGORIA I: Métodos analíticos para cuantificación de los componentes mayoritarios en una mezcla de sustancias o los principios activos en productos farmacéuticos terminales.

CATEGORIA II: Métodos analíticos para determinación de impurezas o componentes de degradación en productos farmacéuticos terminados. Ellos incluyen ensayos cuantitativos y pruebas de límites.

CATEGORIA III: Métodos analíticos para evaluación de características de mejoramiento (disolución, sustancias relacionadas) y/o biodisponibilidad.

CATEGORIA IV: Métodos analíticos validados que serán reevaluados, involucrando una modificación en las condiciones de operación y sin cambio alguno.

Tabla-I
Evaluación de parámetros dependiendo de la naturaleza del ensayo

Parámetro analítico	Ensayo Categoría I	Ensayo	Categoría II	Ensayo Categoría III	Ensayo	Categoría IV
		De Prueba	Cuantitativo		Sin cambio en condiciones	Con cambio en condiciones
Precisión	X	X		X		X
Exactitud 100%	X	X	X	X	X	X
Linearidad del sistema	X	X	X	X	X	X
Linearidad del método	X	X	X	X	X	X
Límite de cuantificación		X		X		
Límite de detección		X		X		X
Especificidad	X	X	X	X	X	
Tolerancia		X	X	X		
Estabilidad	X	X	X			

3.2. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE ALTA RESOLUCION (HPTLC)

Todos los procesos cromatográficos tienen aspectos en común y parten de la separación de una mezcla de sustancias a sus componentes individuales en base a su distribución entre dos fases; una de ellas se encuentra fija (fase estacionaria) y la otra fase se mueve en una dirección (fase móvil)

Existen compendios que nos presentan las clasificaciones cromatográfica y sus descripciones, aquí nos enfocaremos a la Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución (HPTLC).

La Cromatografía en Capa Fina (TLC o CCF) es una de las técnicas de separación más antiguas y utilizadas a nivel mundial, siendo además de las más versátiles y económicas por su facilidad, aplicación y análisis de varias muestras simultáneamente, es rápida y no requiere procesos complicados de preparación, esto lo hace una técnica adecuada para:

- Pruebas preliminares cualitativas.
- Desarrollo de métodos cromatográficos (TLC es un método piloto para HPLC)
- Seguimiento de estudios de síntesis orgánica, estabilidad, biodisponibilidad, etc.
- Determinaciones analíticas semicuantitativas.
- Series de investigación preliminares

Actualmente los avances alcanzados en su metodología han permitido que TLC funcione de manera cuantitativa en el control de calidad de productos, a continuación se mencionan los principales avances al respecto:

3.2.1.- FASE ESTACIONARIA

En TLC la fase estacionaria consiste de una capa delgada (0.1 a 0.5 mm capa fina analítica y 0.5 a 2.0 mm capa preparativa) de un sólido en partículas que se encuentran fijas a una base o soporte siendo generalmente vidrio y folios de aluminio o plástico; sin embargo no hay una adecuada distribución de partículas por lo que no se obtiene una adecuada reproducibilidad, es por esto que TLC siempre fue considerada una técnica semicuantitativa o de comparación; sin embargo últimamente los desarrollos en materia de fase estacionaria se han enfocado a 3 aspectos fundamentales:

A) Composición Química y Estructura: Actualmente se pueden encontrar en el mercado una variedad muy grande de fases estacionarias, tantas como en HPLC ofreciendo una versatilidad muy elevada a esta técnica. La siguiente tabla nos muestra algunas nomenclaturas empleadas para designar propiedades específicas:

Tabla-II
Fases Estacionarias Disponibles en HPTLC

FASE ESTACIONARIA	DESCRIPCION
H	Sin aditivos aglomerantes extraños
R	Purificación especial
P	Para fines preparativos
W	Capa resistente al agua, humectable con agua
F	Adición de un indicador de fluorescencia
F254,366	Indicador fluorescente a longitud de onda respectivo
F254s	Indicador de fluorescencia longitud de onda corta y resistente a ácidos
40,60,etc	Diámetro medio de poro en amnstrongs
C	Acanalada, capa dividida en bandas
silanizado RP-2	Fase invertida con modificación de dimetilsilicio
RP	Fase invertida (reversed phase)
RP-8,RP-18	Fase invertida con cadena de hidrocarburos C-8 o C-18
NH2	Capa hidrófila con modificación amino
CHIR	Capa quiral para separar enantiómeros
CN	Capa hidrófila con modificación ciano
DIOL	Capa hidrófila con modificación diol

B) Características de grano y poro: La eficiencia de un sistema cromatográfico la determinan los siguientes factores:

- * **Tamaño de partícula:** En TLC se emplean diámetros de partícula entre 20 y 40 micras, para HPTLC este valor se ha reducido a 5 micras lo que permite una mayor interacción en el sistema y por ende una separación cromatográfica mas definida.
- * **Area superficial especifica:** Se mide en m^2/g . Comprende el área total de interacción química incluyendo superficie externa (área superficial de los granos) e interna (área superficial de los poros). Mientras mayor sea el área total mayor será la interacción.
- * **Volumen y diámetro de poro especifico:** A la cantidad de fase móvil requerida para llenar los poros de las partículas de la fase estacionaria se le denomina volumen de poro específico y se expresa en mg/g mientras que el diámetro de poro se expresa en nm y oscila alrededor de 6 nm .

C) **Parámetros de capa:** El espesor de las capas cromatográficas también ha sido modificado de 100 y 250 micras para TLC a 20 micras en HPTLC aumentando de esta manera la eficiencia en la separación y requiriendo una menor cantidad de muestra en la aplicación. Así mismo se han desarrollado cromatoplacas con zonas de concentración en donde la muestra puede concentrarse en una sola banda para el análisis de trazas.

Con el desarrollo de estos factores se han conseguido una serie de avances en el uso de HPTLC como son:

- * Empleo de sorbentes con diámetros de partícula semejantes a HPLC
- * Mayor densidad de empaçado.
- * Obtención de zonas mas compactas, con mayor resolución y eficiencia de separación.
- * Separación de un máximo de componentes empleando distancias de desarrollo muy pequeñas (30 - 60 mm)
 - * Reducción del tiempo de análisis (hasta 10 veces menos que TLC convencional) debido a que se tienen menores distancias de desarrollo.
 - * Reducción significativa de costos analíticos ya que se emplean cantidades mínimas de solvente y un máximo aprovechamiento de las cromatoplacas.
 - * Alta reproducibilidad en los desarrollos cromatográficos.
 - * Seguimiento de problemas gracias al control por lote de cromatoplacas.

3.2.2.- FASE MOVIL

Actúa como medio de transporte y solvente para la muestra problema. Puede estar compuesta de uno o varios solventes y es parte importante del proceso cromatográfico: cuanto mas eluyente se adsorbe sobre el sorbente, mayor es el poder de Elución de éste, aunque también influye la naturaleza de la muestra problema.

Existe una clasificación de solventes llamada "serie eluotrópica" que los organiza en base a su polaridad o su constante dialéctica. Estrictamente se puede decir que una "serie" es valida para un sorbente determinado, de aquí la mas común es aquella específica del gel de sílice y óxido de aluminio según Wöhlliben:

Tabla-III
Serie Eluotrópica según Wohlleben

SOLVENTE	E - 20°C
n-pentano	--
éter de petróleo	--
n-hexano	1.89
n-heptano	1.92
ciclohexano	2.02
tetracloruro de carbono	2.24
tricloroetileno	2.26
benceno	2.28
diclorometano	3.15
cloroformo	4.34
éter dietílico	4.80
acetato de etilo	6.02
piridina	12.03
n-butanol	19.20
acetona	20.70
n-propanol	22.30
etanol	24.30
metanol	33.62
agua	80.37
ácidos orgánicos	--
mezclas ácido/base	--
alcoholes	--
piridinas	--

En HPTLC se deben emplear solventes grado cromatográfico debido a la alta pureza que nos ofrecen.

3.2.3.- MECANISMOS DE RETENCION:

En todo proceso cromatográfico siempre existe una interacción entre fase móvil-analito-fase estacionaria, y se genera una afinidad entre ellos. En base a las características de esta interacción se pueden establecer los siguientes sistemas de separación.:

a).- Adsorción: Existe una interacción de la muestra con la fase móvil líquida y una fase estacionaria sólida mediante un proceso de fijación superficial.

b).- Partición: En este sistema las sustancias disueltas en la fase móvil se distribuyen entre esta fase y una segunda fluida, adherida a un soporte fijo.

c).- Par iónico: Se emplea un soporte de características hidrófobas no polar y un reactivo par iónico para lograr la separación de sales orgánicas, formadas de moléculas cargadas.

d).- Intercambio iónico: Hay una interacción de la muestra cargada (iones) con centros de superficie también iónicos de la fase estacionaria.

e).- Formación de complejos: Se genera una interacción de la muestra con una sal de metal unida a la superficie del sorbente.

f).- Intercambio de ligando: Interacción de la muestra con un complejo metálico unido a la superficie del sorbente.

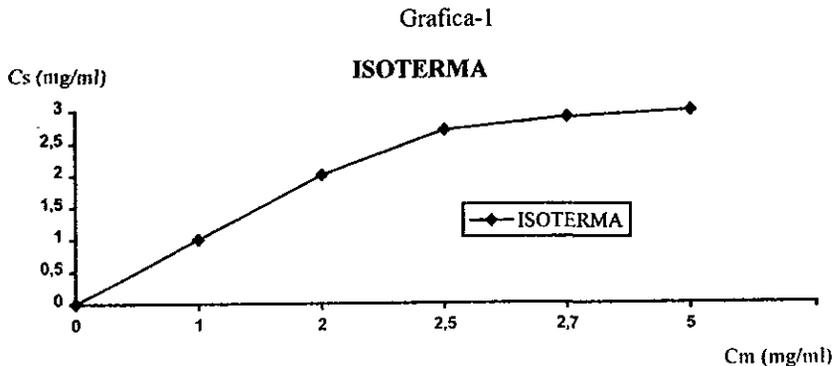
Al generarse cualquiera de las interacciones anteriores se forma un equilibrio a bajas concentraciones que esta representado por la siguiente ecuación:

$$C_s/C_m = K$$

C_s = concentración de muestra en fase estacionaria

C_m = concentración de muestra en fase móvil.

· Cuando la concentración de la sustancia en la fase móvil es elevada deja de ser valida esta relación y la curva llamada isoterma sufre una inflexión



Gráfica 1 Relación entre las concentraciones de equilibrio de una sustancia en la fase móvil o en la fase estacionaria. La curva representada se llama isoterma de sorción.

Los factores analizados hasta ahora junto con la cantidad de muestra influyen directamente en la "eficiencia de separación", la cual se manifiesta en el ensanchamiento de la muestra durante el corrimiento cromatográfico.

3.2.4.- APLICACION

La manera en que se aplica la muestra en la cromatoplaça es de vital importancia puesto que de otra forma la cuantificación de los cromatogramas no será confiable, existen algunos puntos que deben considerarse al momento de desarrollar el método analítico:

* La aplicación puede realizarse en punto o en banda; una aplicación en banda nos permite adicionar una alta cantidad de muestra de manera homogénea, evita la sobrecarga de muestra y por ende los efectos de coleo (tailing), permite una mejor separación por existir una mayor superficie de contacto y se aumenta la exactitud de las mediciones.

* La muestra y las sustancias patrón deben disolverse con el mismo disolvente o mezcla de estos para homogeneizar los tiempos de secado. La muestra puede secarse con aire caliente siempre y cuando las sustancias de interés no sufran degradación o exista una evaporación asimétrica del disolvente.

* En el momento de la aplicación es importante permitir que el solvente se evapore totalmente para evitar la difusión de las manchas. En TLC el diámetro de la aplicación no debe ser mayor a 5 mm mientras que en HPTLC los diámetros oscilan de 1 - 2 mm.

* El volumen de aplicación es importante para conseguir la obtención de zonas compactas, con alta resolución y eficiencia de separación. En aplicaciones puntuales el volumen de muestra es de 1 a 5 µl en TLC y de 100 a 500 µl para HPTLC.

3.2.4.1.- Métodos de aplicación:

Básicamente existen 3 maneras de aplicar las muestras en una cromatoplaça:

- Empleando capilares o microcapilares calibrados
- Utilizando microjeringas para dosificación
- Mediante el uso de equipos automatizados.

En TLC pueden utilizarse capilares o jeringas debido a que la evaluación no es exacta, sin embargo en HPTLC es importante tener bien controladas las condiciones de aplicación (distancias, posiciones, volumen, etc.) Dentro de los sistemas automatizados encontramos 3 equipos específicos para distintos desarrollos:

- Aplicador para *Cromatografía circular*

- Aplicador para Cromatografía unidireccional por contact-spotting
- Aplicador para Cromatografía unidireccional por aspersion.

Este último es el que se emplea comúnmente junto con un sistema de automuestreo para disminuir los errores provocados durante el proceso. La fig.1 nos muestra el sistema completo de aplicación. Este equipo sigue un esquema de aplicación como el que se muestra en la fig.2.

Figura. 1
Sistema de aplicación para HPTLC

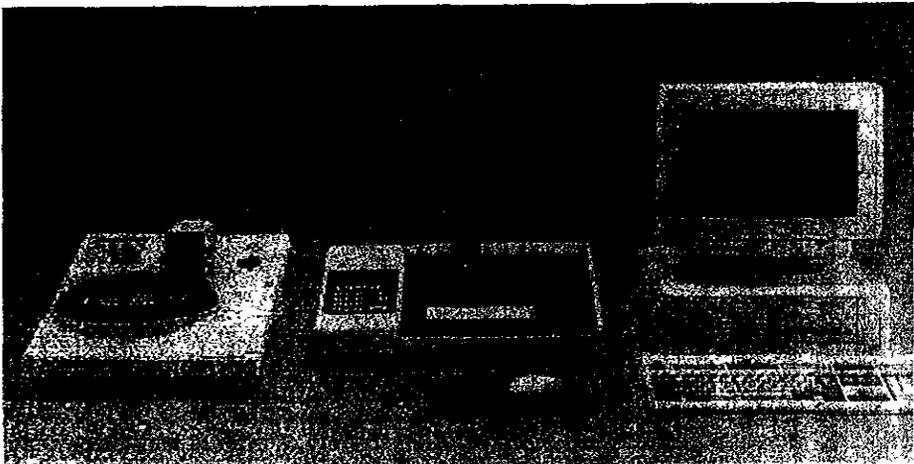
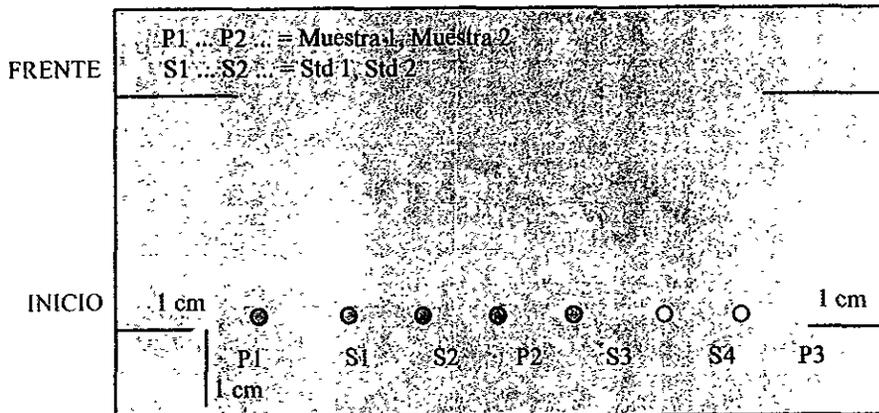


Figura. 2
ESQUEMA DE APLICACION EN HPTLC



3.2.5.- DESARROLLO

3.2.5.1.- Fase Móvil: (Eluyente)

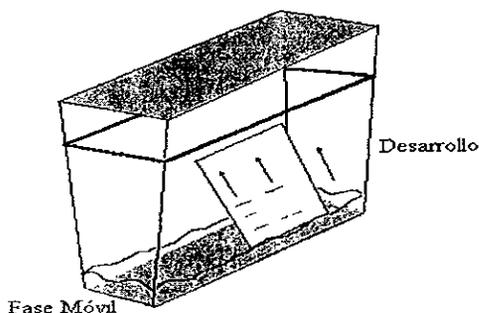
Como ya se indicó las características de los solventes deben ser de alta pureza, considerando que algunos reactivos contienen estabilizantes y contaminantes que pueden favorecer o perjudicar la separación, algunas observaciones que deben tomarse en cuenta durante el desarrollo son las siguientes:

- * Pueden existir contracción o expansión de volumen durante la mezcla de solventes.
- * No emplear repetidas veces la misma cámara de separación porque existe una evaporación importante de solventes y por ende cambios en la fase móvil, al emplear varias veces la fase móvil (sin renovarla) algunos solventes se adsorben mas que otros modificándose las proporciones, además cada vez que se trabaja con las cámaras abiertas se incrementa el riesgo de intoxicación por inhalación.

2.5.2.- Métodos de desarrollo:

- Ascendente: (lineal) Es la técnica empleada en TLC. Es un desarrollo vertical en el que el solvente asciende por capilaridad hasta una altura deseada, requiere un tiempo alto de saturación. Las manchas se hacen mayores al recorrer mas distancia. Las aplicaciones pueden deformarse por la Elución.

Figura. 3
Esquema de una Elución Vertical



- Horizontal (lineal): El principio es el mismo que el caso anterior pero el desarrollo no se realiza de manera vertical, la placa se encuentra en posición horizontal transmitiendo la fase por un material absorbente. No requiere tiempos elevados de saturación, no existe deformación de manchas, pueden eluirse ambos lados hacia el centro de la placa, no pueden emplearse cromatofolios de aluminio.

Figura 4.
Corte transversal de una cámara
de elución horizontal.

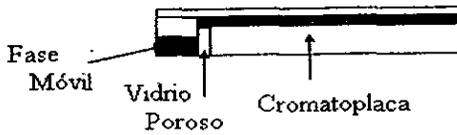
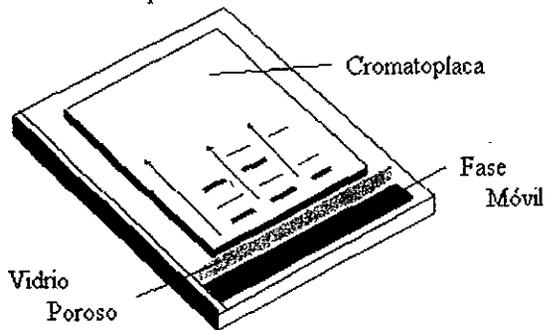
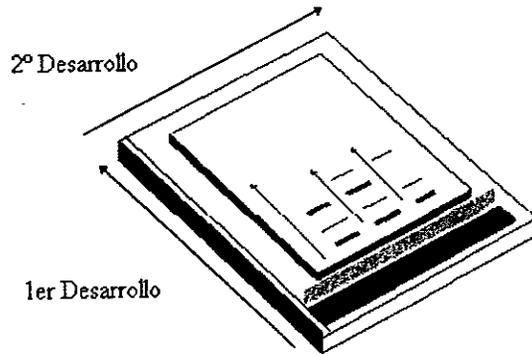


Figura. 5
Esquema de una Elución Horizontal



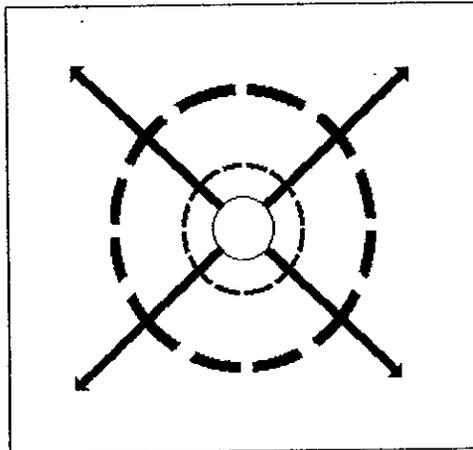
- Bidimensional: Después de un desarrollo lineal (horizontal o vertical), la cromatoplaquea se seca y se gira 90° realizando un 2° desarrollo lineal con otra fase móvil.

Figura. 6
Esquema de una Elución Bidimensional



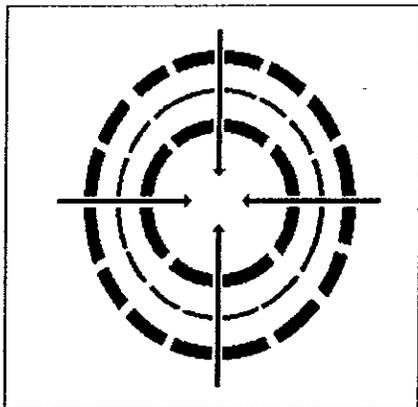
- Circular: La muestra se aplica al centro de la placa y el solvente fluye de manera circular hacia la periferia. Sirve para la separación de sustancias con R_f pequeños y se pueden aplicar gran número de muestras.

Figura. 7
Elución circular



- Anticircular: La fase móvil se añade a lo largo de la circunferencia y avanza hacia el centro. Funciona para sustancias con R_f elevados.

Figura. 8
Elución anticircular



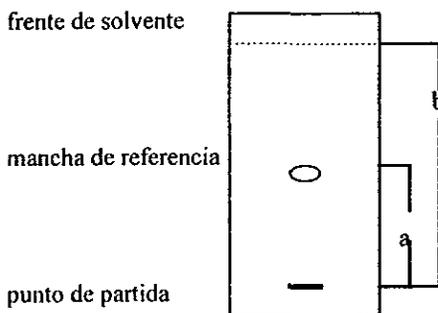
- Desarrollo de flujo: Se utiliza una cubeta convencional con una abertura en la tapa. El disolvente se evapora continuamente de la cubeta, de esta manera se resuelven mejor las sustancias que avanzan mas lentamente, aunque requiere elevados tiempos de análisis.
- Elución múltiple: La cromatoplaqa se desarrolla varias veces tras el correspondiente secado. El frente recorre varias veces las zonas cromatografiadas. concentrando las muestras. Se generan bandas concentradas de la muestras que tienen R_f menores que 0.5.
- Desarrollo múltiple automatizado (AMD): Es un desarrollo de tipo lineal con un sistema de gradiente, a medida que va eluyendo la fase móvil se varia la proporción de solventes de una fase polar a una no polar o viceversa. Requiere de cámaras especiales y solventes para gradiente. Genera excelentes separaciones con elevada precisión y reproducibilidad.

3.3. DENSITOMETRIA

La evaluación de cromatoplasas de una manera cuantitativa puede realizarse por medio de la densitometría, anteriormente el comportamiento de Elución de las sustancias separadas era evaluado mediante el parámetro R_f (relate to front) definido como:

$$R_f = \frac{\text{Distancia entre el punto de partida y centro de la mancha de interés (a)}}{\text{Distancia entre el punto de partida y el frente del solvente (b)}}$$

Figura. 9
Relación al frente del solvente



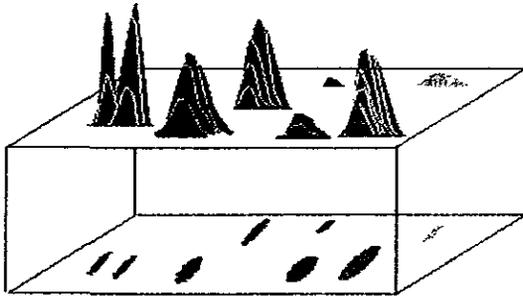
El valor de R_f se ve influenciado por 2 parámetros principales:

- 1) Eficiencia de separación del sistema que se manifiesta por el ensanchamiento de las bandas aplicadas.
- 2) Selectividad que expresa la separación entre las manchas.

Por lo mismo es necesario mantener perfectamente estandarizadas las condiciones de Elución (fase móvil, saturación de la cámara, tiempo y distancia de Elución, cromatoplasas, etc.) para poder establecer una reproducibilidad en resultados y por ello la TLC solamente se consideraba como semicuantitativa.

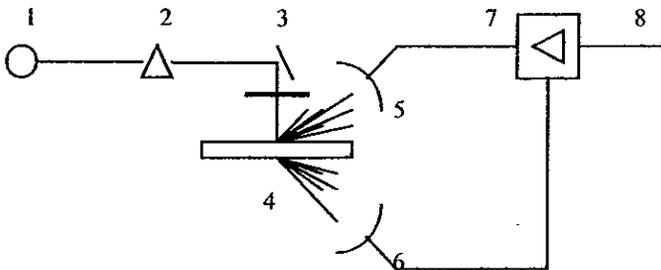
En Densitometría los cromatogramas se registran pista por pista y se evalúan por comparación de las alturas de los picos o de las áreas bajo la curva entre patrones y muestras. La longitud de onda de absorción máxima es generalmente seleccionada como longitud de onda de medición.

Figura. 10
Evaluación de Cromatoplasmas por escaneo en Densitometría



La Densitometría consiste en hacer incidir un haz de luz monocromado hacia la cromatoplasca de manera perpendicular, evaluando la placa por pistas bien definidas, cuando el haz llega a un soluto, parte se absorbe, parte se refleja y en algunos casos se transmite. La reflectancia difusa o la transmitancia son captadas por un fotomultiplicador, enviadas a un amplificador y finalmente evaluada por un procesador. La atenuación de la intensidad de la radiación se relaciona con la concentración de soluto, utilizando una serie de estándares para preparar una curva de calibración.

Figura. 11
Esquema de lectura de un densitómetro de simple haz



- 1) fuente luminosa. 2) monocromador. 3) espejo. 4) cromatoplaca. 5) fotomultiplicador reflectancia.
- 6) fotomultiplicador transmitancia. 7) amplificador. 8) procesador matemático.

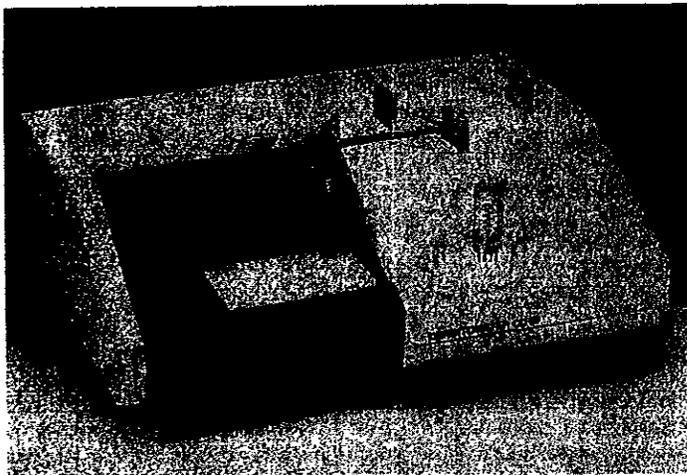
Las fuentes luminosas son distintas en cada tipo de detección; se emplean lamparas de tungsteno para medidas de luz visible, lamparas de deuterio para determinaciones en el intervalo ultravioleta y lamparas de mercurio cuando la detección es por fluorescencia.

El equipo utilizado para estas mediciones es el densitómetro que cuenta con todos los sistemas incluidos (fig.12), el procesamiento de datos se realiza mediante una computadora que generalmente requiere un coprocesador matemático.

3.3.1.- DENSITOMETRO

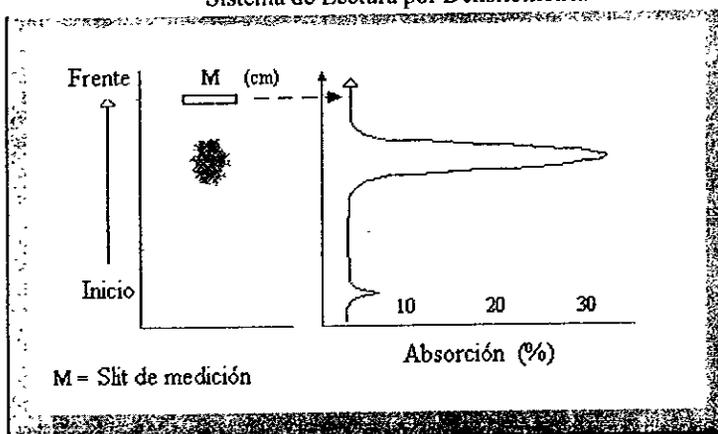
Las características de estos equipos son varias. Un total de 400 mediciones pueden realizarse por segundo (20 mm/sec con un paso de 50 micras). La intensidad de las lamparas es generada de manera constante y tienen un tiempo de precalentamiento máximo a 15 min. El sistema de lectura es de simple haz con regulador y eliminador de ruido provocado por corriente eléctrica o irregularidades de las placas.

Figura. 12
Densitómetro CD60



El sistema evalúa las áreas o alturas producidas por las manchas comparándolas contra estándares como se muestra en el siguiente esquema:

Figura.13
Sistema de Lectura por Densitometría



El escaneo puede realizarse de manera lineal o aleatoria en base a las necesidades del estudio.

3.4. PROPIEDADES DE LOS ANALITOS.

3.4.1.- VITAMINA B12: CIANOCOBALAMINA

General: La vitamina B12 llega a convertirse en cobalamina, un grupo de principios activos ampliamente presentes en la naturaleza. Las diferentes cobalaminas presentan una estructura básica uniforme y difiere solamente por diferencias mínimas en su estructura. La actividad biológica o terapéutica varía según la estructura pero todas presentan una actividad preponderantemente antiperniciosa principalmente la cianocobalamina.

Fórmula condensada: $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$

Peso molecular: 1355.38 g/mol

Descripción: Cristales rojo oscuros o amorfos. muy higroscópico. inoloro e insípido.

Propiedades Físicas y Químicas: Las soluciones de cianocobalamina presentan una reacción neutra o ácida en algunos casos. Las soluciones se tornan oscuras con calentamiento a 210° y 220°C. El espectro de absorción de una solución acuosa es caracterizada por 3 máximos:

$$\lambda = 278 \text{ m}\mu \quad E \text{ 1\%/1 cm}$$

$$\lambda = 361 \text{ m}\mu$$

$$\lambda = 548 \text{ m}\mu$$

Estabilidad: La estabilidad de esta vitamina se encuentra determinada principalmente por su pureza, la más estudiada ha sido la cianocobalamina cristalina. ver tabla-IV. Las preparaciones secas son más estables que las formulaciones líquidas.

Almacenamiento: ver tabla-V.

3.4.2.- VITAMINA B6: PIRIDOXINA

General: El efecto de la vitamina B6 es atribuido a tres compuestos que son: Piridoxol, Piridoxal, Piridoxamina. El clorhidrato de piridoxina es el que se emplea terapéuticamente.

Fórmula Condensada: $C_{12}H_{17}N_5O_4S$

Peso molecular: 327.36 g/mol

Descripción: Polvo o cristales blancos sin olor.

Propiedades Físicas y Químicas: Una solución al 10% de piridoxina clorhidrato presenta un pH aproximado de 3. El punto de fusión es a 206°-212°C (descomposición)

Estabilidad: Las soluciones acuosas son suficientemente estables a un pH de 3.3 y hasta un pH neutro. La luz ultravioleta y luz de día producen una pérdida en la actividad terapéutica. El calentamiento moderado no destruye las soluciones. Puede ser esterilizada a 120°C/20 min/1 atm.. La presencia de metales puede causar formación de complejos coloridos. Es muy estable frente a otros compuestos vitamínicos

Potencia: 1g = 343,000 UI

3.4.3.- VITAMINA B1: TIAMINA

General: La actividad terapéutica de la tiamina se atribuye a dos compuestos clorhidrato de tiamina y mononitrato de tiamina. El primero puede provocar reacciones secundarias más violentas que el segundo aunque su potencia terapéutica es mayor.

Descripción: Polvo o cristales blancos delicuescentes con olor característico.

Solubilidad: la solubilidad de esta vitamina aumenta por un ajuste de pH a 4 con ácido clorhídrico.

Propiedades Físicas y Químicas: pH de una solución al 2% en agua: 6.0 - 7.5. Punto de fusión 196° - 200°C. El espectro de absorción de una solución acuosa presenta 3 máximos:

$$\lambda = 253 \text{ m}\mu \quad E \text{ 1\%/1 cm}$$

$$\lambda = 278 \text{ m}\mu$$

$$\lambda = 325 \text{ m}\mu$$

Estabilidad: Presenta una estabilidad elevada en forma seca. Es estable bajo condiciones normales y presenta mayor estabilidad el mononitrato que el clorhidrato. El pH de máxima estabilidad es de 2.5 - 4.5.

Potencia: 1g mononitrato = 1.03 g de clorhidrato.

TABLA-IV
ESTABILIDAD DE VITAMINAS

VITAMINA	ACIDOS	ALCALIS	REDUCTORES	OXIDANTES	OXIGENO	METALES	LUZ VISIBLE	LUZ UV	TEMP
1	Estable	Inestable	Inestable	Inestable	Inestable	Inestable	--	Inestable	Estable
6	Estable	Estable	--	Inestable	Estable	Inestable	Inestable	Inestable	Estable
12	Estable	Inestable	Inestable	Inestable	Estable	Inestable	Inestable	Inestable	Estable

TABLA-V
ALMACENAMIENTO DE LAS VITAMINAS

VITAMINA	PROTEGIDA DE LA LUZ	ENFRIAR (MENOR A 25°)	AMBIENTE SECO	VACIO O GAS INHERTE
B1	+++	+++	+++	---
B6	+++	++	++	---
B12	+++	+++	+++	---

IV. OBJETIVOS.

GENERAL:

DESARROLLAR Y VALIDAR UN METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR VITAMINA B1, B6 Y B12 EN UN INYECTABLE UTILIZANDO HPTLC Y DENSITOMETRIA.

ESPECIFICOS:

- 1. Establecer las condiciones de Elución (como son: fase móvil y concentración de muestras, tipo y tamaño de cromatoplaques y tamaño de aplicación) para cuantificar las vitaminas B1, B6 y B12 por HPTLC.**
- 2. Establecer las condiciones de lectura al densitómetro para poder cuantificar las vitaminas B1, B6 y B12 de un inyectable.**
- 3. Validar el método analítico desarrollado en base a la guía de validación del Sector Salud.**

V. HIPOTESIS

Por medio de la separación cromatográfica de alta resolución en capa fina y la cuantificación por densitometría se espera determinar las vitaminas hidrosolubles B1, B6 y B12 de una solución inyectable, cumpliendo con los requisitos de validación necesarios para ser utilizado como método de control de calidad.

VI METODOLOGIA.

6.1.- MATERIAL

6.1.1.- Material de laboratorio.

- Matraces erlenmeyer 25 ml
- Matraz aforado 10 y 100 ml clase A certificado.
- Pipetas volumétricas 1,2,5 y 10 ml clase A certificada
- Perilla de seguridad- macropipeteador
- Tubos de ensaye 13 x 100
- gradilla plástica para tubos 13 x 100
- viales para inyección 1.5 ml color ámbar, tapón de silicón blanco inerte.
- Cámaras de desarrollo horizontal 5x5 cm Desaga

6.1.2.- Instrumental:

- Balanza analítica Sartorius Analytic Modelo A-210P
- Ultrasonido Cole-Parmer Modelo 8853
- Densitómetro Desaga Modelo Cd-60 c/software CD-60
- Aplicador de muestras Desaga Modelo AS-30
- Lámpara de luz ultravioleta Desaga Modelo HP-UVIS

6.1.3.- Reactivos

- Cromatoplasas Silicagel HF254 5x5 cm
- Vitamina B1 std
- Vitamina B6 std
- Vitamina B12 std
- Cloruro de sodio p.a.
- Metanol seco HPLC
- Etanol seco HPLC
- Agua HPLC

6.2. PREPARACION DE SOLUCIONES:

Las muestras problema se tratan de la siguiente manera: Romper y vaciar el contenido de 5 ampollitas del inyectable en un matraz erlenmeyer de 50 ml, agitar durante 20 segundos. Tomar una alícuota de 4 ml de esta solución y llevarlo a un volumen de 10 ml con metanol en matraz aforado. Proteger las soluciones de la luz y taparlas perfectamente. La concentración final de los analitos es la siguiente:

Vitamina B1 y B6 :20 mg/ml

Vitamina B12: 0.2 mg/ml

Para la validación del método se realiza el siguiente procedimiento: En todos los casos se prepara una mezcla de estándares de vitaminas B1, B6 y B12 al porcentaje indicado en la tabla-I pesando la cantidad correspondiente y aforándola con agua destilada al volumen indicado. Tratar en un baño de ultrasonido por 5 minutos. De cada solución tomar una alícuota de 4 ml y llevarla a un volumen de 10 ml con metanol en matraz aforado. Proteger de la luz y tapar perfectamente.

TABLA-VI
Cantidades requeridas para la validación del método

ANALISIS	REPETICIONES	%CONCENTRACION	CANT. B1 Y B6	CANT. B12	VOLUMEN FINAL
EXACTITUD ¹	6	100	0.5 g	5	100
PRECISION ²	6	100	5 g	0.05 g	100 ml
(REPETIBILIDAD)					
PRECISION ¹	12	100	0.5 g	5 mg	10 ml
(REPRODUCIBILIDAD)					
ESPECIFICIDAD ³	3	100	0.5 g	5 mg	10 ml
LINEARIDAD ¹	3 p/nivel	60, 80, 100,	0.3, 0.4,	1 mg	10 ml
METODO		120, 140	0.5, 0.6,		
			0.7 g		
LINEARIDAD ²	3 p/nivel	20	0.1 g	1 mg	10 ml
SISTEMA					

1. ESTOS ANALISIS SE REALIZAN PREPARANDO CADA MUESTRA POR SEPARADO
2. ESTOS ANALISIS SE REALIZAN A PARTIR DE UNA MISMA SOLUCION
3. SE PREPARA LA MUESTRA PLACEBO DE CADA VITAMINA

6.3.- APLICACION Y DESARROLLO

Las muestras se aplican por sextuplicado en bandas de 4 mm con 1 microlitro de volumen sobre cromatoplasmas de 5x5 cm de silicagel HPTLC 60 F254 según la tabla-VI, empleando un aplicador Desaga AS30 y según las especificaciones de la tabla VII. Para la evaluación de la linealidad del sistema se prepara una solución correspondiente al 20 % de la concentración esperada y se aplica repetidas veces sobre la cromatoplasma para obtener las concentraciones correspondientes al 60, 80, 100, 120 y 140 %.

Una vez aplicadas las soluciones se desarrollan de manera unidimensional horizontal empleando como fase móvil: metanol, agua, etanol, cloruro de sodio (7%) (80:15:5:1) y cámaras de

desarrollo horizontal de 5 x 5 cm protegiendo el corrimiento de la luz; al término del desarrollo se secan con una corriente de aire y se observan bajo luz ultravioleta (254 nm) para especificar las distancias del recorrido.

6.4.- LECTURA.

La lectura de las muestras se realizó en un Densitómetro marca Desaga modelo CD-60 , introduciendo las condiciones especificadas en la tabla VIII.

Tabla - VII
Condiciones de Aplicación

Tabla - VIII
Condiciones de Lectura

ESPECIFICACION	PARAMETRO	ESPECIFICACION	PARAMETRO
Jeringa	10 µl	Inicio x:	7 mm
Cromatoplaca	5 x 5 cm	Inicio y:	7 mm
Posiciones	6	Fin y:	45 mm
Longitud	4 mm	Distancia entre líneas	7 mm
Distancia	7	Ancho slit:	1
Inicio	7	Longitud slit:	4
Volumen	1 µl	Longitud. de onda	265 (B1), 275 (B12), 285 (B6)
Tiempo	2 s/µl	Modo de lectura	Remisión
Ciclos	1		Extinción
Tiempo de Corte	3 seg.		Señal positiva
			Lampara D y T
		Resolución:	0.025 mm
		No.Mediciones:	16
		Factor de ruido:	7
		Cero automático:	Si
		No.Componentes:	3
		Tipo de cal.	Línea recta
			a(x) + b
		Calibración por:	área

VII. RESULTADOS

7.1.- EXACTITUD

TABLA-IX
Resultados de la exactitud del método

Vitamina	X %	C.V. %	t cal	t tab	LC %	CONCLUSIÓN
B1	99.985	0.9504	-0.0386	2.57	98.9608 - 100.9821	EXACTO
B6	101.555	0.9364	1.443	2.57	99.566 - 101.543	EXACTO
B12	99.728	1.043	-0.639	2.57	98.636 - 100.2801	EXACTO

7.2.- PRECISION (REPETIBILIDAD)

TABLA-X
Resultados de la repetibilidad del método

Vitamina	X %	C.V. %	t cal	t tab	LC %	CONCLUSIÓN
B1	99.99	0.683	1.26X10-4	2.57	99.28 - 100.71	PRECISO
B6	101.28	1.038	3.72X10-5	2.57	99.55 - 103.44	PRECISO
B12	99.99	1.043	0.699	2.57	98.79 - 101.19	PRECISO

7.3.- PRECISION (REPRODUCIBILIDAD)

TABLA-XI
Resultados de la reproducibilidad del método

Vitamina	X %	C.V. %	F cal (analista)	F tab (analista)	F cal (día)	F tab (día)	CONCLUSIÓN
B1	107.47	1.46	2.88<	18.51	0.0765	4.46<	REPRODUCIBLE
B6	100.51	2.39	1.355<	18.51	0.9701	4.46<	REPRODUCIBLE
B12	100.00	1.256	2.893<	18.51	1.0255	4.46<	REPRODUCIBLE

7.4.- ESPECIFICIDAD

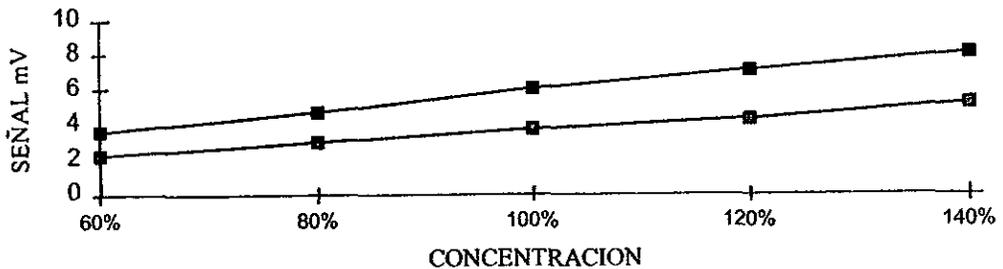
TABLA-XII
Resultados de la especificidad del método

SEÑAL/VITAMINA	B1	B6	B12
PLACEBO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
CARGADO			
EXCIPIENTE	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
ESTANDAR	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
MUESTRA	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
OTRAS	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

7.5.- GRAFICAS DE LINEARIDAD

GRAFICA-1
Resultados de la linealidad del sistema

LINEARIDAD DEL SISTEMA



VITAMINA B1

C.V. = 2.038%

$r = 0.99$

$r^2 = 0.99$

$b = 107.2$

$m = 5.871$

VITAMINA B6

C.V. = 2.77%

$r = 0.99$

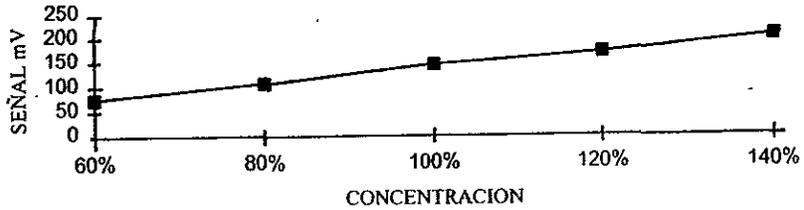
$r^2 = 0.98$

$b = 228.7$

$m = 3.434$

GRAFICA-2
Resultados de la linealidad del sistema

LINEARIDAD DEL SISTEMA



VITAMINA B12

C.V. = 3.18%

$r = 0.99$

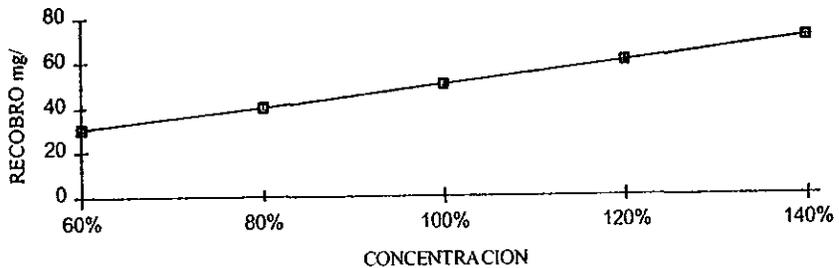
$r^2 = 0.99$

$b = -1.046$

$m = 1.44$

GRAFICA-3
Resultados de la linealidad del método

LINEARIDAD DEL METODO



VITAMINA B1

C.V = 0.7766%

$r = 0.99$
 $r^2 = 0.99$
 $b = 0.60$
 $m = 0.98$

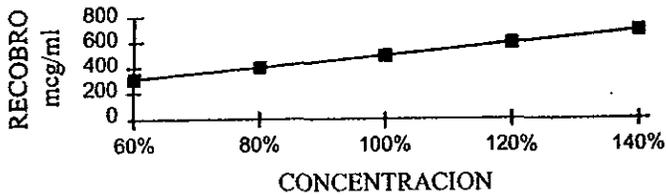
VITAMINA
B6

C.V. =
1.480%

$r = 0.99$
 $r^2 = 0.99$
 $b = 0.1552$
 $m = 0.9946$

GRAFICA-4
Resultados de la linealidad del método

LINEARIDAD DEL METODO



VITAMINA B12

C.V. = 1.912%

$r = 0.99$
 $r^2 = 0.99$
 $b = 5.8937$
 $m = 0.9776$

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

El desarrollo del método analítico propuesto fue terminado cumpliendo con las expectativas que se plantearon principalmente en la validación del método. La realización de este estudio siempre fue encaminado al desarrollo de una metodología que pudiera ser empleada en el análisis del producto terminado, que en este caso consistía en una solución inyectable, para lo cual fueron evaluados los siguientes parámetros.

- a) **EXACTITUD:** La exactitud se realizó estableciendo el porcentaje de recobro posterior a la evaluación de soluciones preparadas a partir de estándares. De la tabla IX se observó que para las 3 vitaminas la media reportada oscila alrededor de un 100 % presentando un C.V. que va desde 0.93 a 1.04 % para los tres compuestos. Al establecer el estadígrafo de contraste se encontró que en cada una de las vitaminas el valor real fue menor que el reportado en tablas estableciendo que el método es exacto para todos los compuestos, además de presentar un $CV < 2\%$; asimismo fueron establecidos los límites de confianza para aceptar un resultado y en ellos se observa que son muy cerrados debido por supuesto, a la misma exactitud del método analítico.
- b) **PRECISION.** En el caso de la precisión se realizó por un lado la repetibilidad del método evaluando el porcentaje de recobro en diferentes lecturas de una solución preparada al 100 % de la concentración. En la tabla-X se logró observar claramente que la variación presentada en este estudio fue mínima siendo mayor en la vitamina B12 (1.043%) debido probablemente a la elevada inestabilidad de este compuesto y a la concentración tan baja que se trabajo (0.2 mcg/ml) no obstante se establecieron lo límites de confianza quedando ligeramente mas amplios en comparación a la exactitud asimismo el estadígrafo de contraste presentó valores menores que los reportados en todos los casos esto aunado a un $CV < 2\%$ indicó sin duda alguna que el método es preciso en un rango del 99.28 al 103.44 %.

Por otra parte se evaluó la reproducibilidad del método frente a dos analistas diferentes y en dos días distintos. En la tabla XI se logró observar que aunque la media de las muestras se encuentra sumamente cercana al 100 % (vitamina B6 y B12) y 107 % (Vitamina B1) , la variación existente entre las lecturas se incrementó considerablemente en todos los casos llegando a ser hasta de un 2.39 %de C.V.; estas desviaciones seguramente se debieron al proceso previo a la aplicación y lectura de las muestras, durante la preparación de soluciones; recordemos que este paso representa el 40 % del éxito del método analítico, sin embargo y a pesar de estas consideraciones el estadígrafo de contraste indicó que tales desviaciones no son significativas y se estableció un valor por debajo del reportado en tablas por lo que la conclusión es que el método si es reproducible.

Cabe aclarar que aunque el sistema es totalmente automatizado, se debe realizar una capacitación completa del personal ya que existen algunas consideraciones que deben tomarse en cuenta antes de instalar y trabajar un equipo de estas características, dichas observaciones serán discutidas mas adelante pero pudieron ser factores que afectaran la reproducibilidad del método sin llegar a influir de manera determinante.

- c) **ESPECIFICIDAD:** En cuanto a este punto se parte de la primicia que el procedimiento y la técnica serán empleados en el control de calidad del producto terminado así que fueron evaluadas aquellas soluciones que pudieran intervenir con cada una de las vitaminas.

En el caso de la Vitamina B1 se contrastó contra un placebo cargado con las otras dos vitaminas, claramente se observó que dichos compuestos no interfirieron la tiamina. El mismo comportamiento se notó al establecer la especificidad de la Piridoxina y Cianocobalamina, gracias a que la fase móvil es lo suficientemente eficiente para separar cada uno de los componentes entre si. Dicha separación se vio favorecida por el empleo de placas de alta resolución las cuales al poseer tamaños de partículas muy pequeños (5μ) ofrecen una mayor superficie de contacto y por ende una separación mas definida entre los compuestos, siendo esta una diferencia contundente en comparación con la cromatografía en capa fina convencional.

Por otra parte dado que el medicamento evaluado es una solución inyectable; el excipiente lo constituye exclusivamente agua, misma que es evaporada durante el secado de la placa antes de la elución, eventualmente pudieran presentarse interferencias debido a contaminaciones en el solvente, situación muy difícil al ser agua para inyectable, y por ello se evaluó la especificidad frente a la misma. En la tabla-XII se estableció un resumen de las señales y no se presentó interferencia alguna.

Asimismo se estableció que la señal de una muestra frente a los estándares correspondientes a cada una de las vitaminas es igual en distancia de aparición e intensidad siendo este método específico para cada uno de los compuestos.

En algunas ocasiones se detectan señales procedentes de la cromatoplaqueta misma, sobre todo cuando las capas son irregulares; como en esta técnica se emplearon cromatoplacas de espesor homogéneo, se apreció que no existen señales procedentes de la fase estacionaria que pudieran interferir en el estudio.

- d) **LINEARIDAD DEL SISTEMA:** La evaluación de este parámetro realmente fue un punto importante para esclarecer muchas de las ventajas que esta técnica nos ofrece; debido a que la concentración de la Cianocobalamina (200 mcg/ml) es mucho menor que las vitaminas B1 y B6 (20 mg/ml), estas ultimas se presentaron por separado en la gráfica-1.

El primer aspecto importante a considerar es la preparación de soluciones, en todos los casos solamente se utilizó una solución al 20 % de la concentración teórica debido a que el aplicador tiene la función de concentrar la muestras "in situ", esto es la aplicación repetida de soluciones en un mismo punto, de esta manera se lograron aplicar muestras al 60, 80, 100, 120 y 140 % de la concentración teórica empleando únicamente una solución con lo que se cumple el criterio de linealidad del sistema, así de las gráficas 1 y 2 se observó que en todos los casos $r=0.99$ y $r^2 = 0.98$ considerándose la concentración porcentual de la muestra evaluada contra la señal que proporciona el Densitómetro (en este caso milivoltios o mV); es también por esta razón que la pendiente no siempre es cercana a 1, recordemos que la señal presentada estará siempre en función de la absorción de la muestra a una longitud de onda específica; por otro lado no se consideró el punto cero porque en HPTLC siempre existe una inflexión de la recta en valores cercanos a este punto (linearización de Kubelka-Münk)

En HPTLC se han logrado estandarizar muchos parámetros, entre ellos el tamaño de partícula de la sílica, sin embargo aun existen evidencias de que los valores en señal generados difieren entre cromatoplasas influenciado principalmente por factores externos como lo es la humedad relativa por ejemplo., debido a esto las pruebas de linealidad se realizaron aplicando las diferentes concentraciones en una misma placa y repitiendo este proceso cinco veces por vitamina, de ello se observó que en todas las placas se presentó una linealidad excelente cumpliendo con los valores esperados, pero la señal difería de una placa a otra encontrándose coeficientes de variación hasta de 3.18 %. Este comportamiento se explica porque en cada cromatoplasca existen condiciones específicas como ya se explicó y por tanto debe aplicarse las muestras y los estándares juntos, solamente así se respetará la linealidad del sistema y se obtendrán datos confiables.

- e) **LINEARIDAD DEL METODO:** Contrario a la linealidad del sistema, en este parámetro se evalúa el porcentaje de recobro y esto provoca que exista reproducibilidad entre placas cromatográficas presentándose coeficiente de variación hasta del 0.77 % (Vitamina B1) excelentes para una cromatografía abierta. Las variaciones mayores como es el caso de la cianocobalamina (1.91 %) se deben primordialmente a la inestabilidad del compuesto y a la preparación de soluciones ya que en este parámetro deben prepararse cada solución por separado, aquí radica la importancia de emplear materiales volumétricos debidamente calibrados que nos aseguren un volumen confiable y balanzas debidamente calibradas.

De esta manera se lograron obtener coeficiente de variación que quedaran dentro de los límites establecidos por la Farmacopea Nacional (FEUM) para métodos cromatográficos. Asimismo la correlación existente entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada fue excelente para las tres vitaminas registrándose valores de $r = 0.99$ y $r^2 = 0.99$, al no existir un proceso de extracción que pudiera provocar pérdida del producto se lograron valores de $m \approx 1$ y $b \approx 0$ estableciéndose una linealidad del método conforme a parámetros.

h) **ASPECTOS IMPORTANTES:**

Dentro de un proceso de control de calidad de medicamentos es relevante establecer el tiempo y dinero que implicará el implementar una nueva técnica de cuantificación, sobre todo si esta no esta establecida en alguna farmacopea, pero por otra parte se debe considerar el mutuo beneficio que nos ofrecerá para realizar los análisis y el ahorro que implicara en un determinado plazo. La Densitometría en combinación con la Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución (HPTLC) se presentan como una técnica rápida, confiable y versátil que seguramente redituará en una agilización de los tiempos de análisis y disminución de costos de operación. Hasta aquí se ha demostrado que el método desarrollado es confiable para los análisis y a continuación se mencionarán algunas consideraciones importantes que se observaron durante el desarrollo de la técnica y que demuestran la versitilidad y rapidez del mismo.

l.- **PREPARACION DE MUESTRAS:** El hecho de haber trabajado con materiales clase A certificados estableció una confiabilidad en los resultados muy grande al grado que cualquier desviación en los resultados puede ser monitoreada desde la pesada incluyendo el material de vidrio empleado y esto es cumplir con un adecuado sistema de Buenas Practicas de Laboratorio.

2.- **APLICACIÓN:** Con la aplicación automatizada de las muestras se ahorró un tiempo significativo de análisis y consumo de horas-hombre, inclusive el sistema permitió dejar aplicando las muestras mientras era realizada la evaluación de placas previamente preparadas. Cabe aclarar que para muestras sumamente lábiles al oxígeno el sistema de automuestreo puede ser muy lento llegando a ser inclusive determinante en la implementación de nuevas técnicas situación que puede solventarse introduciendo el sistema dentro de una cámara con atmósfera de nitrógeno o incorporando una corriente de nitrógeno al sistema de aspersión en lugar de aire.

Asimismo durante la aplicación fue importante revisar que no se introdujeran burbujas de aire en el sistema debido a que se podrían modificar los volúmenes aplicados y variar los porcentajes recuperados, para ello fue necesario emplear solventes grado HPLC y/o degasificarlos en un equipo de ultrasonido al igual que las muestras.

Al emplear un aplicador automatizado fue importante establecer una velocidad de aplicación lo suficientemente grande que permitiera la evaporación de solventes sin generar una difusión muy grande de la muestra ya que esto repercute en coleos de los densitogramas, pero por otra parte esta velocidad de aplicación no debió ser tan grande que facilitara la descomposición de la muestra.

3.- **DESARROLLO:** En el desarrollo de las muestras existen 4 factores que se deben mencionar. El primero de ellos fue la fase móvil empleada, para prepararla se utilizaron solventes grado HPLC puesto que el nivel de impurezas es despreciable lo que previene una posible fijación de las muestras a la cromatoplaaca y presentan una mejor adsorción a la silicagel favoreciendo los platos teóricos generados en cada evaluación. Asimismo el uso de cloruro de sodio al 7% permitió una separación de la tiamina respecto al punto de aplicación y además favoreció la separación entre compuestos.

El segundo factor fueron las cromatoplaacas empleadas que al ser de alta resolución permitieron una mejor separación de las vitaminas debido a la elevada superficie de contacto que ofrecen, también previenen el coleo ("tailing") de las aplicaciones lo que repercute en picos mas definidos, sin embargo es fundamental mantenerlas en lugares secos y lavarlas previamente a la aplicación (si han permanecido mucho tiempo almacenadas)

El tercer factor fue el desarrollo en cámaras de elución horizontales las cuales se saturaron rápidamente y requirieron un promedio de 2 ml de fase móvil Para funcionar, esto indudablemente redujo el costo de los análisis de manera significativa. Por otro lado la elución horizontal no presenta resistencia a la fuerza de gravedad lo que permitió desarrollo muy rápidos con un promedio de 5 min. por cromatoplaaca. Aquí es importante recalcar que el desarrollo se realizó en un lugar oscuro para prevenir degradación de la cianocobalamina y piridoxina.

El cuarto factor lo constituyen las aplicaciones que fueron realizadas en banda para prevenir coleos de las muestras y una elevada difusión de las manchas, así también las separaciones son mejor realizadas cuando se aplica en banda y no en punto. La aplicación en banda fueron lo suficientemente larga para aceptar el volumen aplicado sin provocar disminución de la concentración, y lo suficientemente pequeñas para lograr aplicar todas las muestras en una cromatoplaaca.

4.- *DETECCION*: Debido a que con esta técnica no se requiere un raspado de la sílica, las placas pudieron ser evaluadas varias veces a diferentes longitudes de onda y esto permitió aplicar una mezcla de la vitaminas para cada análisis evaluando cada parámetro con una sola cromatoplaça, obviamente esto representó ahorro en tiempo y costos de análisis y aún después de la evaluación puede quedar la evidencia física o fotográfica de la separación. Aquí es importante aclarar que cada vitamina se evluó tan solo en el rango de aparición, esto es, la cromatoplaça no fue sometida por completo a la tres longitudes de onda utilizadas.

Para el empleo del densitómetro se debió revisar previamente que el equipo se encontrara debidamente verificado y calibrado ya que cualquier variación en la señal podía ocasionar graves desviaciones en los resultados, por ello también es importante que la corriente eléctrica se encuentre perfectamente regulada y estabilizada además de contar con un supresor de picos que proteja el equipo.

El manejo del densitómetro no representó mayor problema y además posee una gran variedad de funciones que facilitaron el manejo de datos, la única recomendación pertinente es no trabajar con lámpara sumamente calientes ya que esto disminuye su vida media y provoca variaciones de señal sumamente grande que pueden influir en la emisión de datos visuales.

IX. CONCLUSIONES

El método desarrollado es específico, reproducible, sencillo, sensible, rápido y confiable facilitando el análisis de un medicamento inyectable conteniendo Tiamina, Piridoxina y Cianocobalamina, además resultó exacto, repetible y lineal en el intervalo de 80 - 120 % cumpliendo con los requisitos necesarios para ser empleado en el análisis de control de calidad de este medicamento.

El método permite un ahorro significativo tanto en costos como en tiempo dado que las tres vitaminas son analizadas en una placa de 5 x 5 cm, gastando alrededor de 2 ml de fase móvil y empleando un promedio de 8 minutos por cromatoplaca.

El sistema de Densitometría presenta una serie de ventajas que pueden permitir el desarrollo de técnicas analíticas de forma sencilla, confiable y muy versátil.

X.GLOSARIO

b= intersección al eje Y.

X = Media aritmética.

CCF = Cromatografía en Capa Fina.

μ = micras.

cm = centímetros.

μ l = microlitro.

C.V. = Coeficiente de Variación.

FEUM = Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

Fig. = Figura.

HPTLC = Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución. (High Performance Thin Layer Chromatography)..

HPLC = Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (High Performance Liquid Chromatography)..

L.C.= Límites de Confianza.

m= pendiente de la recta.

mcg = microgramos.

mcl = microlitros.

mg= miligramos.

ml = mililitros.

mm= milímetros.

mV= milivoltios.

r = coeficiente de correlación.

r^2 = coeficiente de correlación cuadrático.

Rf = Relación al Fente del Solvente (Relate to Front).

Seg. = segundos

TLC = Cromatografía en Capa Fina (Thin Layer Chromatography)..

XI. BIBLIOGRAFIA

1. Bauer, K., Gros, L., Sauer, W. *Cromatografía de Capa Fina*. Hüftig Buch Verlag GmbH, Heidelberg, 1992p.p. 32, 41-58.
2. Bidlo-Igloy, M. *Simultaneous determination of some chemically related compounds of pharmaceutical interest by quantitative TLC*. Int.Symp.Instrum.HPTLC.memory. 1987:61-69.
3. Bidlo-Igloy, M. *Studies of Correlation Between Chemical Structure and R_f-value in HPTLC*. J.High.Resolut.Chromatogr. (3)1:161-163. 1978.
4. Boerner, K. *Separation of phenylquinones, phenylvitamins, and phenols on thin layer plates impregnated with silver nitrate*. J.chromatogr. No.1 Vol.242: 196-201 (1982).
5. Butler, H.; Poole, C. *Two-point calibration method applied to fluorescence scanning densitometry and HPTLC*. J.Chromatogr.Sci. vol.21 No.1:285-288. 1983.
6. Cases, V.; Gómez, A. *Técnicas Analíticas de Separación*. De. Reverté, S.A. España 1988. p.p. 422-435.
7. Chu, X.; Pang, Y. *Separation of vitamin D₂ isomers and Quantitative determination of vitamin D₂ by HPTLC*. Int.Symp.Chromatogr. 1985. Vol.13:676-679.
8. Clarke, E. *Isolation and identification of drugs*. The Pharmaceutical Press. London 1969. p.p. 45,53,92.
9. Ebel, S.; Alert, D. *Calibración in TLC/HPTLC using the Michelis-Menten Function*. Chromatographia vol.18 No.2 p.p. 23-27. 1984.
10. Ebel, S. *Fully Automated. Computer Controlled Evaluation in TLC and HPTLC*. Int. Symp. Instrumental HPTLC memory. 1980: 55-60.
11. Ebel, S., Hocke, J. *Systematic and Statical Errors in Quantitative Evaluation in TLC y HPTLC*. J.High.Resolut.Chromatogr. (11)1:156-160. 1978.
12. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. 5ª ed. Ed. Gpo Papelero Continental. p.p. 579-580, 925-926, 820-821.
13. Fenimore, D.C. *Sample Application in instrumentalized HPTLC*. Int.Symp.Instrum.HPTLC memory 1980: 55-60.
14. Frank, W. *Characterization and Quantitative HPTLC Determination of Vitamin B (Thiamine hydrochloride) in a pharmaceutical product*. J.Planar.Chromatogr. Vol.3 No.6 p.p. 149-152. (1990).
15. Gùbitz, G. *Fluorodensitometric Determination of Compounds Containing Primary Amino Groups with o-phthalaldehyde after Separation by HPTLC*. Chromatographia (2)12:779-781. 1979.

16. *Guía de Prácticas adecuadas de Manufactura del CIPAM, Edición No.3 1989.*
17. Horvarth, P. Szpesi,G. *Thin Layer Chromatography.* J.Chromatography vol.I No.11 281-311. (1985).
18. Jänchen, D.E. *Direct Coupling of HPTLC and TLC in Instrumental HPTLC.* Int.Symp.Instrum.HPTLC memory 1980: 55-60.
19. Jork,H. *Quantitative HPTLC in the field of pharmaceutical applications.* Int. Symp. Instrum. HPTLC. memory. 1987: 193-239.
20. Jork H.,Wimmer H. *TLC Report. A Collection of Quantitative Papers.* Ed Git Verlay. Darmstadt Alemania 1986 p.p. 56-132.
21. Kaiser,R. ; Reider,R. *Advantages of Computerization in TLC/HPTLC.* Int.Symp.Instrum.HPTLC memory. 1985:475-488.
22. Kofman,I. *Identification of multicomponent mixtures by spectrodensitometric TLC.* Int. Symp. Instrum. HPTLC memory. 1987:277-284.
23. Koleva, M., Jodi,M. *Quantitative Determination of Drugs by means of Densitometry of TLC.* Pharmazie 28:317 (1973)
24. Klaus,R. *Quantitative HPTLC. Analysis Industrial Applications.* Chromatographia 20:235-238 (1985).
25. Langhordt,M. *HPTLC A versátil technique for industrial applications.* J.Planar.Chromatogr. Vol.2 No.5:346-354. 1989.
26. Ni,Q.; Song,X. *The determination of vitamins A, B2, C and niacinamide in a multivitamin preparation.* J.Anal.Chem Vol.16 No.5:27-32 (1985)
27. Nutall,R. *The Detection of ten Components of a multi-vitamin Preparation by Chromatographic Methods.* J.Chromatogr. No.1 Vol.96:875-878 (1971).
28. Prosek,M., Kucan,E. *Principles of Quantitative Evaluation in HPTLC.* Int.Symp.Instrum.HPTLC. memory p.p.281-314 (1980).
29. Rauschkilob,E.;Davis,H. *Advantages and Problems in HPTLC.* J.Pharm.Sci. Vol.25. No.7: 242-273 (1990)
30. Renyer,B.; Wenz,K. *Instrumental TLC as routine in pharmaceutical quality control.* Int. Symp. Instrum. HPTLC memory. 1987: 331-339.
31. Shutter,J. *Influence of some chromatographic and Instrumental parameters on the*

reproducibility and specificity of the quantitative determination of papaverine hydrochloride in tablets by HPTLC. Int.Symp.Instrum.HPTLC memory. 1984:24-25.

32. Schutter, J.A., Weken, G. *On the problem of the Purity of Solvents HPTLC*. Chromatographia 1986.vol 20: 739-742.

33. Selvino/Borgonio. *Instrumental High Performance Thin-Layer Chromatography*. Institute for Chromatography. Bad Durkheim Alemania.1987 p.p. 25-28, 65-67.

34. Sherma, J. *Quantification of Niacin and Niacinamide in vitamin preparations by densitometric thin layer Chromatography*. J.liq.Chromatogr. Vol.9. No.1:3423-3431. (1986).

35. Stahl, E. *Thin-Layer Chromatography 2^a ed.* Ed.Springer-Verlag. New York 1969. p.p. 45-87.

36. Strohecker R, Henning H. *Análisis de Vitaminas*. Editorial Paz Montalvo. Madrid, España. 1967 p.p.65-82.

37. Sun, Zh; Xu, G. *Investigation on the Plate Efficiency and Some Characteristics of Pre-coated HPTLC Silicagel Plate of Different Sources*. J.Chromatogr. (1)354:132. 1986.

38. *The Merck Index*. 11^a ed. Merck & Co.Inc. USA 1990. p.p. 1464,1269,1270,1577.

39. Thielemann, H. *Densitometric and Chromatographic evaluation of multivitaminic preperates*. J.Anal.Chem. 271(1):356-366.1985.

40. Thielemann, H. *Densitometry and Chromatography for Multivitaminic Complex Identification*. Pharmazie Vol.36 No.2:574 (1981).

41. Thielemann, H. *Densitometry and Chromatography of vitamin B-complex. A test of activity 254 U.V.* J.Anal.Chem. Vol.4 No.1:94-96 (1974).

42. USP Co. & In. *Validation of Compendial assays-Guidlines*. Farmacopeial Forum. No.1 july-Aug.: 4129-4131 (1988).

43. *USP No. 23 NF 18 United States Pharmacopoeia Convention LAC 1995*.

44. *Vitaminas Merck and their Processing*. Published by E. Merck A.G. Darmstadt Alemania. p.p. 27-33, 39-44, 82-108.

45. Watkins, T.R. *Quantitative Thin-Layer Chromatography of Vitamins*. Int.Symp.Instrum.HPTLC memory. 1987:195-216.

46. Weinterteger, R. *New Sensitive Procedure for TLC Analysis of Substances with Alcoholic Hidroxyl Groups*. Anal.Chem. 309:201 (1981).