

50



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO POR CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA PARA CUANTIFICAR CLORHIDRATO DE RANITIDINA

T E S I S

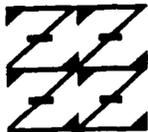
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

JUAN RAMIREZ FUENTES

UNAM FES ZARAGOZA



LO HUMANO ES JE DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

2002



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.

PAGINACION DISCONTINUA

*A la vida,
que día a día me brinda
la oportunidad
de aprender y descubrir,
de equivocarse y corregir,
de caer y levantar,
de luchar y defender
aquello en lo que creo.*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Amis padres y hermanos:

A tí "Don Luis", Papá, que me diste y me das tu soporte, tu tiempo y enseñanzas; a tí "Rosco", Mamá, que me diste vida, esperanza y una nueva oportunidad; a tí "Guicho", Luis, que me apoyas y enseñas el coraje y ambición para lograr y alcanzar lo que quiero; a tí "Ross", Rosana, que me enseñas a disfrutar y apoyar a los que necesitan y a tí Karina, que nunca estás lejos de mí cuando te necesito; Sin encontrar las palabras que expresen todo lo positivo y la gratitud que dan a mi vida...

¡ Gracias con todo mi corazón... !

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A Silvia Verónica Luna Zepeda:

"Vero": Gracias por el cariño, amor, apoyo y aliento que me ofreciste para no decaer y lograr terminar éste trabajo, por brindarme una esperanza para lograr alcanzar mis metas. Gracias por crecer día a día como profesionista, como persona y como ser humano, agradeciéndote el ser magnífica persona, mujer, madre y ser humano.

Detrás del trabajo de un hombre existe siempre la presencia de una mujer. Más que un pequeño homenaje, éste trabajo representa el resultado de tu presencia.

No sé como pueda pagar todas aquellas palabras de aliento y agradecerte el ser el medio para poder traer a nuestro "angel" a la Tierra y a nuestras vidas.

Y nunca terminando de resitarte las palabras de gratitud de las mil y una cosas que me has enseñado y compartido conmigo...

¡ Gracias Flaiss. !

TESIS CO
FALLA DE ORIGEN

A Stephanie S. Ramírez L:

"Nannis": tal vez no pueda entender y comprender lo que me dices, pero sé que aunque con pocos días y momentos de vida, me apoyas y ayudas a levantar cuando lo necesito.

Eres aún muy pequeña, con un gran espíritu, aliento e infancia, con grandes virtudes, sonrisas y suspiros que alientan mi ser...

Te amo Stephanie S.

Y sé que en cada sonrisa y gesto tuyo, demuestras tu gran corazón...

! Gracias Hija !.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Amis maestros:

Agradezco a los profesores que me dieron una educación, que comparten conmigo sus conocimientos y vivencias, y mas aún, a los que están conmigo más allá de un salón de clases.

Pero muchas gracias a mis profesoras, asesoras y amigas; gracias Q.F.B. Idalia Leticia Flores G. y Q.F.B. Nancy Rodríguez P., por brindarme su confianza, su paciencia, su soporte y su amistad sin interés alguno; gracias, por que desde un inicio siempre han estado dispuestas a escucharme sin importar el tema y lugar; gracias por el interés que depositan en mi trabajo y gracias por su disposición al dirigirme a alcanzar una solución y respuesta hacia mis deficiencias como persona y profesionista.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A mis amigas:

Doy gracias a Dios por haber convivido con ustedes tantas anécdotas, haber conocido juntos tantas cosas, haber compartido casi todo, habernos soportado mas allá de la paciencia de amigos y escuchado en las buenas y en las malas como hermanos.

Gracias a mis "amigos" por estar y saber permanecer en mi vida.

Gracias a ti "Vero's", Elizabeth Verónica Martínez F., por ser excelente compañera, amiga y hermana, que en las buenas y malas sabes e intentas todo para descender a mi estatura y nivel.

Gracias a ti "Martthuchis, Martha Monroy C., por ser una más de mis muy buenas compañeras y amigas, que sabes darme un puntapie y orientarme para el lado que es correcto.

...Y a todos los demás que faltan de mencionar, nunca pierdan esa Chispa e Inteligencia que los hace ser mejor que los demás, y esperando que algún día pueda regresar y devolver el aprecio y ayuda que me brindan....

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

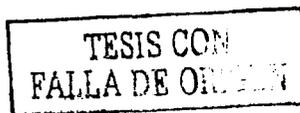
TABLA DE CONTENIDO

	Resumen.....	iv
	Introducción.....	v
I.	Fundamentación Teórica.....	1
1.	Desarrollo de un método analítico	1
2.	Cromatografía en capa fina.....	3
2.1	Antecedentes.....	3
2.2	Fundamento.....	4
2.3	Clasificación.....	4
a)	Adsorción.....	5
b)	Partición.....	5
c)	Intercambio iónico.....	7
d)	Par iónico.....	8
e)	Permeación o exclusión.....	9
2.4	Fase estacionaria.....	10
2.5	Fases estacionarias para cromatografía en capa fina.....	11
a)	Gel de sílice.....	11
b)	Kieselguhr.....	12
c)	Alúmina.....	12
d)	Celulosa.....	12
2.6	Relación al frente (R_f).....	13
2.7	Relación al frente relativo (R_{frel}).....	13
2.8	Fase móvil.....	13
2.9	Preparación de cromatoplacas.....	14
2.10	Revelado del cromatoplaca.....	15
2.11	Almacenaje de placas de cromatografía en capa fina.....	15
2.12	Placas comerciales cromatográficas para capa fina.....	16
3	Validación de métodos analíticos.....	16
3.1	Parámetros en la validación de métodos analíticos para control de calidad.....	17
4	Clorhidrato de ranitidina.....	20
4.1	Historia y categoría terapéutica.....	20
4.2	Antiácidos.....	20
4.3	Antagonistas de los receptores H_2	20
4.4	Descripción.....	21
a)	Nombre químico.....	21
b)	Nombre genérico.....	21
c)	Nombre tradicional.....	21
d)	Fórmula.....	21
e)	Peso molecular.....	22
f)	Apariencia, olor y color.....	22

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.5	Síntesis.....	22
4.6	Productos de Degradación.....	24
4.7	Propiedades espectroscópicas.....	24
a)	Espectroscopia infrarroja (IR).....	25
b)	Espectroscopia ultravioleta (UV).....	26
4.8	Propiedades del sólido.....	26
a)	Características de fusión.....	26
b)	Solubilidad.....	27
c)	Acidez (pka).....	27
d)	Método cromatográfico en capa fina.....	27
e)	Estabilidad.....	28
f)	Productos de degradación.....	28
II	Planteamiento de Problema.....	29
III	Objetivos.....	30
IV	Hipótesis de Trabajo.....	31
V	Material, Equipo e Instrumentos.....	32
VI	Metodología.....	34
I	Caracterización de clorhidrato de ranitidina.....	35
1.1	Sustancias de referencia.....	35
1.2	Descripción.....	35
1.3	Solubilidad.....	35
1.4	Aspecto y color de la solución.....	35
1.5	Ensayos de identidad.....	35
1.6	Temperatura de fusión.....	35
1.7	Perdida por secado.....	36
1.8	pH.....	36
1.9	Residuo de la ignición.....	36
1.10	Sustancias relacionadas.....	36
1.11	Valoración.....	37
1.12	Conservación.....	37
2	Desarrollo del sistema de elusión.....	37
2.1	Pruebas de solubilidad.....	37
3	Degradación del clorhidrato de ranitidina en condiciones extremas.....	39
3.1	Obtención de una mezcla de productos de degradación del clorhidrato de ranitidina.....	39
4	Desarrollo de un método analítico por cromatografía en capa fina para cuantificar clorhidrato de ranitidina.....	40
5	Validación del método analítico.....	43
5.1	Validación del sistema.....	43
a)	Linealidad del sistema.....	43
b)	Precisión del sistema.....	43

5.2	Validación del método.....	44
a)	Especificidad del método.....	44
b)	Linealidad del método.....	44
c)	Precisión del método.....	45
▪	Repetibilidad al 100%.....	45
▪	Reproducibilidad.....	45
d)	Exactitud.....	45
e)	Estabilidad de la muestra.....	46
VII	Resultados y Análisis.....	47
1	Caracterización de clorhidrato de ranitidina.....	47
2	Desarrollo del sistema de elusión.....	49
2.1	Pruebas de solubilidad.....	49
3	Degradación del clorhidrato de ranitidina en condiciones extremas.....	53
4	Obtención de una mezcla de productos de degradación del clorhidrato de ranitidina.....	53
5	Desarrollo de un método analítico por cromatografía en capa fina para cuantificar clorhidrato de ranitidina.....	54
6	Resultados de la Validación del método analítico.....	54
6.1	Resultados de la Validación del sistema.....	56
a)	Linealidad del sistema.....	56
b)	Precisión del sistema.....	60
6.2	Resultados de la Validación del método.....	60
a)	Especificidad del método.....	60
b)	Linealidad de método.....	62
c)	Precisión del método.....	66
▪	Repetibilidad al 100%.....	66
▪	Reproducibilidad.....	68
d)	Exactitud.....	70
e)	Estabilidad de la muestra.....	71
VIII	Conclusiones.....	76
IX	Sugerencias.....	77
X	Referencias.....	78
XI	Anexos.....	80



RESUMEN

El Clorhidrato de Ranitidina es un compuesto que posee una actividad antagonista de los receptores H_2 . Es utilizado para el tratamiento de las úlceras gástricas, duodenales y otras indicaciones que incluyen el tratamiento de síndromes de hipersecreción ácida.

En este estudio se realizó el desarrollo de un método analítico por Cromatografía en Capa Fina para la cuantificación de Clorhidrato de Ranitidina. La cuantificación del principio activo se logró a través del uso de sistemas de elusión y mezclas de disolventes para la extracción de las cromatoplasmas. En el análisis se usó como estándar interno Clorhidrato de Ranitidina USP. La separación se logró utilizando cromatoplasmas comerciales de Merck y la detección de este activo y los compuestos secundarios se hizo mediante un detector U.V. en un rango de longitud de onda de 200 a 400 nm. Se investigaron además, diferentes sistemas de elusión y extracción con el fin de lograr la separación del activo y productos de degradación, obteniéndose finalmente la resolución necesaria para cuantificar adecuadamente el compuesto de interés.

Luego del desarrollo del método se realizó la validación del mismo, siguiendo los parámetros requeridos en la USP 24 para métodos analíticos, en donde la cuantificación es del ingrediente activo. Los parámetros evaluados son especificidad, linealidad, precisión, exactitud y estabilidad de la muestra.

Los resultados obtenidos aplicando los parámetros de validación mencionados anteriormente cumplen satisfactoriamente, por lo cual la metodología analítica desarrollada puede emplearse en el análisis de Clorhidrato de Ranitidina como un método de rutina para control de calidad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN
DE UN MÉTODO ANALÍTICO
POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA
PARA CUANTIFICAR
CLORHIDRATO DE RANITIDINA**

INTRODUCCIÓN

Desde el advenimiento del desarrollo y validación para procesos de manufactura de diversas formas farmacéuticas, han surgido diferentes métodos y técnicas para tales procesos; no obstante, en formas farmacéuticas con activos sensibles y lábiles a la temperatura y humedad, ha sido difícil encontrar metodologías analíticas que permitan la cuantificación de la degradación y favorezcan otras propiedades del producto para su validación.

Se planteó el presente proyecto, utilizando el **Clorhidrato de Ranitidina**, para **desarrollar y validar** una metodología que permita cuantificar dicho activo por un método convencional, alternativo, sencillo y de bajo costo: la **Cromatografía en Capa Fina**.

El proyecto se inició con la determinación de las propiedades del Clorhidrato de Ranitidina y la separación de sus productos de degradación, desarrollando un sistema de elusión que permita separar, extraer y cuantificar la cantidad de activo presente. En dichos casos se mantuvo constante la cantidad de principio activo (10 mg/mL) y los rangos de lectura de espectroscopía Ultravioleta.

La validación del método analítico propuesto se llevó a cabo utilizando los parámetros descritos en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM, 7ª ed.) y en la United States Pharmacopeia (USP, NF 24); los resultados obtenidos se evaluaron por los controles establecidos oficialmente en la parte de materia prima y producto terminado, comparados con respecto a los resultados obtenidos al evaluar Clorhidrato de Ranitidina (U.S.P.) por los mismos controles establecidos.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

I. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

I. DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO

Actualmente en la industria farmacéutica es primordial el control de la calidad de la materia prima y producto terminado, asegurando que los métodos y procedimientos mediante los cuales son analizados cumplan con los requerimientos mínimos necesarios para su aplicación.

Dado que muchos de los métodos reconocidos consistían en series de pasos, y que en cada paso se podían producir errores, solo se conseguían resultados correctos si el analista se apegaba cuidadosamente a procedimientos bien establecidos. Los análisis químicos requieren una gran destreza manual, una paciencia extrema y una aplicación sistemática de los principios de la cuantificación.

Sin embargo, los adelantos tecnológicos han dado más importancia al control de calidad y los fabricantes empezaron a buscar métodos de análisis más rápidos y simples. Simultáneamente, se produjo una demanda creciente de análisis de trazas (determinación de componentes presentes en cantidades menores al 0.01%), encontrando que los instrumentos ocasionaban una respuesta y modificación en los resultados.

El resultado de ello ha sido una "Revolución Instrumental" y hoy, probablemente, se hacen más análisis basados en mediciones físicas que en reacciones químicas.

Dentro de la década de los noventa la mayoría de los análisis químicos de rutina se llevan a cabo mediante instrumentos automáticos o semiautomáticos. Indudablemente, la mayoría de los instrumentos se basan en la medición de fenómenos físicos, por ejemplo: emisión de rayos X o de otras radiaciones electromagnéticas [1].

La realización de una revisión bibliográfica exhaustiva constituye una labor que puede consumir mucho tiempo; no obstante muchos químicos han aprendido por experiencia que con frecuencia resulta que un día pasado en la biblioteca sirve para ahorrar el despilfarro de un mes de trabajo en el laboratorio.

Sean cuales sean los medios utilizados para obtener la información de todos los métodos posibles de análisis para un proyecto dado, la etapa final consiste siempre en la evaluación de los procedimientos hallados.

Varias de las posibilidades encontradas se pueden excluir fácilmente al comparar los métodos de la biblioteca con la definición inicial del problema analítico, las alternativas restantes se sospechan luego a la luz de cuestiones tales como las siguientes:

- ¿Qué otras sustancias interfieren con éste método particular, y qué medidas se recomiendan para solventar los problemas de interferencias?

- ¿Cuál es la exactitud máxima que se puede esperar del procedimiento publicado?.
- ¿Qué instrumento especial se necesita y cuál puede ser la duración total del análisis?.
- ¿Qué grado de habilidad técnica debe poseer el analista para obtener resultados confiables?.

En la mayoría de los casos la revisión bibliográfica sugiere un procedimiento experimental adecuado. Hay ocasiones, sin embargo en las que no parece que ningún método satisfaga las especificaciones deseadas; en éstas circunstancias hay que desarrollar un procedimiento nuevo que satisfaga los objetivos planteados [1].

Las propiedades químicas y físicas en las que se basan los métodos analíticos rara vez son completamente específicas. Por el contrario, estas propiedades suelen ser compartidas por numerosas especies químicas. En consecuencia, la eliminación de interferencias en el análisis cuantitativo es más a menudo una regla que una excepción.

El método más general para tratar una interferencia, consiste en la separación física del analito. Entre los métodos bien conocidos para llevar a cabo estas separaciones se incluyen la destilación, cristalización, extracción con disolventes y precipitación química o electrolítica [2].

No cabe duda que el método más utilizado para eliminar interferencias es la cromatografía, un procedimiento de separación que ha encontrado aplicación en todas las ramas de la ciencia [3].

Las aplicaciones de la cromatografía han crecido en forma explosiva en las últimas cuatro décadas, debido no sólo al desarrollo de varios tipos de técnicas cromatográficas, sino también a la necesidad creciente de los científicos de disponer de accesibles, mejores y alternativos métodos para separar mezclas complejas.

En la Cromatografía en Capa Fina, los componentes que se desean separar deben ser solubles en la fase móvil. Deben ser también capaces de interactuar con la fase estacionaria ya sea disolviéndose, adsorbiéndose o reaccionando con ella en forma química. Como consecuencia, durante la separación los componentes se distribuyen entre ambas fases, para que finalmente el analito de interés sea detectado y cuantificado [4,5].

2. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

La cromatografía es una técnica desarrollada a principios de siglo que permite la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla. El nombre cromatografía se debe a que las primeras separaciones se llevaron a cabo con pigmentos de plantas, los cuales se observan como bandas coloridas. En general, la cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil, gas ó líquido y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido [10].

2.1 Antecedentes.

Los comienzos de la cromatografía se sitúan a principios de siglo (1903) cuando Tswett, botánico ruso, mediante una forma primitiva de cromatografía líquido-sólido, aisló varios pigmentos de plantas ensayando unos 100 adsorbentes. No obstante, no existen datos sobre la utilización de esta técnica hasta 1930, cuando Kuhn y Lederer separaron también pigmentos de plantas usando como adsorbentes alúmina y carbonato cálcico. A partir de esta fecha se inició el verdadero desarrollo de la Cromatografía.

En la Tabla I, se resumen las fechas de inicio de algunas técnicas cromatográficas y los autores responsables de las mismas.

TIPO DE CROMATOGRAFÍA	AUTORES	FECHA
Columna (de Adsorción)	Tswett - Jun y Lederer	1903-1930
Capa Fina	Izmailov y Shraiber	1938
Columna (de Partición)	Martin y Synge	1941
Papel	Consgen	1944
Fase Invertida	Howaard y Martin	1950
Elusión con Gradiente	Tiselius	1952
Gases	James y Martin	1952
Geles	Determann	1964
Líquida de Alta Resolución.	Horvath	1964

Tabla I. Antecedentes de las Técnicas Cromatográficas [11].

2.2 Fundamento.

El fundamento se encuentra en alguna (s) de las propiedades físicas o fisico-químicas de los analitos: solubilidad, adsorción, tamaño de partícula, carga, reactividad química o bioquímica, etc.

Las propiedades de los componentes de una mezcla determinan su movilidad entre sí y con respecto a la fase móvil. Se eligen las condiciones experimentales y las fases cromatográficas para que los componentes de la mezcla se muevan a distinta velocidad. La base de la separación cromatográfica será, por tanto, la diferencia en la velocidad de migración de los mismos [12].

2.3 Clasificación.

Basándose en la naturaleza de la fase móvil, se divide en: si la fase móvil es un gas, se habla de cromatografía de gases; si la fase móvil es un líquido, la técnica se llama cromatografía de líquidos o cromatografía de fase líquida (Fig 1).

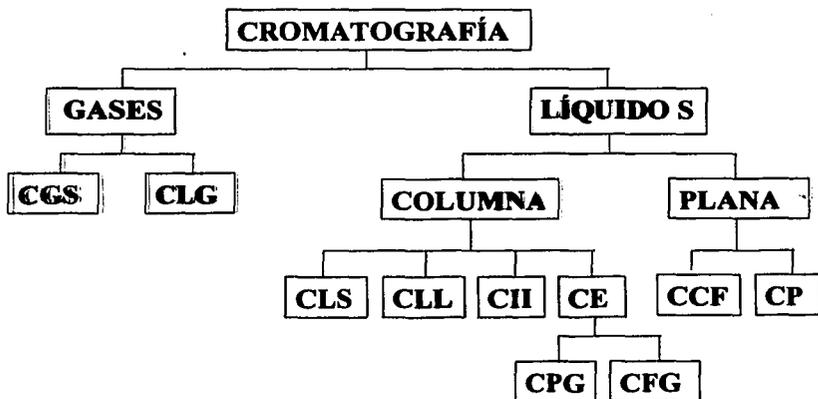


Fig. 1. Clasificación de los métodos cromatográficos: CGS: Cromatografía Gas-Sólido; CLG: Cromatografía Gas-Líquido; CLS: Cromatografía Líquido-Sólido; CLL: Cromatografía Líquido-Líquido; CII: Cromatografía de Intercambio Iónico; CE: Cromatografía de Exclusión; CCF: Cromatografía en Capa Fina; CP: Cromatografía en Papel; CPG: Cromatografía de Permeación en Gel; CFG: Cromatografía de Filtración en Gel [11].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Considerando los procesos de separación se divide en:

a) Adsorción.

En este tipo de separación, los solutos son retenidos como resultado de la capacidad de la fase estacionaria para unirse a ellos temporalmente, a nivel de superficie activa. Los adsorbentes son sólidos porosos de alta superficie específica; en Cromatografía en Capa Fina se usa casi exclusivamente sílice. La sílice está constituida por una red tridimensional de enlaces siloxano (Si-O-Si) con grupos silanol (Si-OH) de superficie.

Los grupos silanol de superficie son los principales responsables de la adsorción de los solutos. Las interacciones serán más fuertes con los solutos más polares y en particular con los solutos que pueden formar puentes de hidrógeno. La fase estacionaria corresponde a la capa monomolecular en la superficie del adsorbente y las moléculas de soluto y de eluente van a competir para fijarse en esta capa.

Los solutos de mayor polaridad tendrán mayor retención de la misma manera que el aumento de polaridad del eluente producirá una disminución. Uno de los disolventes de mayor fuerza eluente es el agua debido a su habilidad para formar enlaces de hidrógeno con los silanoles de superficie. La cantidad de agua adsorbida en la superficie del adsorbente corresponde a una cantidad baja de agua adsorbida y corresponde a una retención mayor de los solutos.

Aunque la afinidad del agua por los silanoles sea muy grande, hay un equilibrio de reparto del agua entre las dos fases; es decir que el contenido de agua del eluente va a modificar la actividad del adsorbente hasta llegar a la concentración de equilibrio. Para eluentes polares, que contienen mayores cantidades de agua, el equilibrio se puede alcanzar rápidamente, pero para disolventes polares, puede ser necesario esperar varios días para alcanzarlo.

Aunque la sílice permita lograr excelente selectividad y eficiencia para moléculas orgánicas apolares y de polaridad intermedia, experimentalmente tiene la deficiencia del tiempo para alcanzar el equilibrio, por lo que en la actualidad los métodos desarrollados con esta fase son reemplazados por métodos utilizando fases modificadas [3,13].

b) Partición.

En este tipo de separación la mezcla de los solutos se separa de acuerdo con las tendencias relativas de sus componentes para unirse ya sea a la fase móvil o a la fase estacionaria que consta de una capa de líquido colocada sobre una superficie del soporte sólido. Para que la solubilidad mutua de las fases fuera lo más débil posible, se escogió una de las fases polar y la otra apolar. Es así como aparecieron dos formas distintas para la cromatografía de reparto:

- Cromatografía en fase "normal", en donde la fase estacionaria es polar y la fase móvil apolar.

- Cromatografía en fase “reversa”, en donde la fase estacionaria es apolar y la fase móvil polar.

Estas fases se obtienen por silanización de los grupos silanol de superficie por un cloro o un etoxi-silano conteniendo la función química deseada según la siguiente reacción:



En general R_1 , R_2 y R_3 es una cadena conteniendo la función química deseada.

Esta reacción de modificación permite un recubrimiento eficiente de la sílice. Cuando se usa un monoclorosilano, la superficie de la sílice está cubierta con una capa monomolecular y tiene un aspecto de cepillo; se dice entonces que la fase estacionaria es monomérica. Mientras se usa un di ó tri-clorosilano, se formará una capa multimolecular reticulada gracias a la reacción de todos los Si-Cl, se dice entonces que la fase es polimérica.

Cuando se modifica con un grupo apolar, se usa un cloro silano y se obtiene una fase estacionaria de tipo fase “inversa”.

Cuando se modifica con un grupo polar (NO_2 , NH_2 , CN , diol), se usa en general un metoxi ó etoxi silano y se obtiene una fase estacionaria tipo fase “normal”.

La capacidad de estas fases estará ligada a la cantidad de grupos funcionales modificados que se puede expresar en moles por gramo o en % de carbón en el caso de la fase inversa.

La sílice modificada presenta muchas ventajas:

- Buena estabilidad química.
- Desaparación del problema de la actividad de la sílice.
- Grandes posibilidades de polaridades compatibles con todos los disolventes.

En la fase “reversa” se utiliza generalmente como fase móvil una mezcla de agua con disolvente orgánico polar, por ejemplo: metanol, acetonitrilo, isopropanol, tetrahidrofurano, dioxano, etc. La retención del soluto no se puede explicar entonces por una mayor interacción con una fase estacionaria, por que las únicas interacciones posibles con grupos apolares son de tipo dispersión y son mucho menos fuertes que las interacciones de tipo dipolo-dipolo y enlaces de hidrógeno. La técnica está regida por el efecto hidrofóbico que se puede explicar de la siguiente manera:

- Una molécula apolar o poco polar tiene más repulsión que atracción por el agua.
- Las cadenas hidrocarbonadas de la fase estacionaria también tienen una repulsión con respecto a la fase móvil.

Resulta de estos estados de repulsión que si la molécula de soluto se fija en la superficie de las cadenas hidrocarbonadas, la superficie de contacto global cadena-soluto con respecto a al fase móvil acuosa va a disminuir, lo baja el estado de repulsión y conduce a un estado energético menor. La retención se explica entonces no por un estado de mayor interacción en la fase estacionaria sino por un estado de menor repulsión.

El mecanismo exacto de la retención en la fase inversa todavía no se conoce de manera precisa.

Para esos dos mecanismos, las reglas generales que rigen la retención son muy parecidas y se pueden resumir de la siguiente manera:

- La retención del soluto aumenta cuando la parte apolar de su molécula aumenta y disminuye cuando su polaridad aumenta.
- El aumento de concentración del disolvente orgánico en la fase móvil hace bajar la retención del soluto.

Para un mismo eluente, la retención es mayor cuando la fase estacionaria contiene más carbón, esto permite explicar, las diferencias entre las fases comerciales.

Una molécula ionizada tiene una retención menor que su forma neutra (mayor solubilidad de la forma ionizada en agua), por lo cual es importante la regulación del pH del eluente.

Con esto se le da la importancia a la fase "reversa" ya que:

- El orden de la fuerza de los eluentes es aproximadamente el inverso de orden observado en adsorción y fase normal, lo que explica también que el término de fase reversa haya sido conservado.
- La fase inversa permite separar homólogos funcionales que difieren por la longitud de cadena hidrocarbonada, lo que no se puede hacer en general en cromatografía de adsorción.
- La fase inversa no permite separar fácilmente familias funcionales.
- La selectividad de la fase inversa no es muy buena para la separación de isómeros de posición [3,13].

c) Intercambio iónico.

Los dominios principales de aplicación de esta técnica son en las áreas de los productos inorgánicos, aniones y cationes minerales y en bioquímica.

La técnica conocida como intercambio iónico ha sido ampliamente estudiada en el pasado bajo sus forma clásica es decir, utilizando resinas de intercambio iónico de granulometría

relativamente grande como fase estacionaria. En la actualidad, el intercambio iónico se ha adaptado a la cromatografía de líquidos moderna mediante el uso de resinas de granulometría fina entre 5 y 15 μm , una matriz de poliestireno/divinilbenceno y una estructura macroporosa a diferencia de las resinas clásicas microporosas con estructura de gel. Eso permite disminuir la tasa de hinchamiento de las resinas que es variable según el disolvente y la naturaleza del ión utilizado, y además permite obtener una estructura porosa con canales internos de mayor diámetro, lo que mejora la cinética de intercambio y entonces la eficiencia.

La matriz de poliestireno tiene grupos funcionales intercambiadores de cationes (sulfonatos, carboxilato o de aniones amonio cuaternario o aminas).

Para el equilibrio de cationes, el soluto compete con el catión del eluente por los sitios de intercambio iónico. El mismo mecanismo ocurre con el intercambio de aniones.

En todos los casos, la influencia del pH es grande cuando los solutos son ácidos o bases débiles.

Las resinas de intercambio iónico se usan en particular para la separación de los aniones y cationes minerales, los ácidos carboxílicos biológicos y de los aminoácidos. Las resinas de granulometría fina son más caras que las fases estacionarias tipo sílice.

d) Par iónico

La cromatografía de pares de iones surge a mediados de la década de los setenta como una alternativa de separación de los compuestos iónicos, dadas las limitaciones prácticas que presentaban las columnas de intercambio iónico y la ventaja que presenta en la posibilidad de extender el uso de las columnas de la fase inversa.

Para hacer cromatografía de pares de iones, se usa una columna de fase inversa clásica de tipo C_8 ó C_{18} .

La fase móvil está constituida por una mezcla agua/disolvente orgánico y contiene además un amortiguador que permita fijar el pH del medio de manera que los solutos y los contra-iones se encuentren ionizados en esta fase.

La fase móvil contiene también una sal de contra-ión que se pretende utilizar para la realización de pares de iones con los solutos. El contra-ión es en general un ión orgánico cuya molécula contiene una parte hidrocarbonada importante, como un ejemplo:

- contra-ión aniónico: alquilsulfonato.
- contra-ión catiónicos: tetralquilamonios o aminas terciarias.

Al agregar un contra-ión de signo opuesto, se observa en general un aumento de la retención del soluto ionizado. Este aumento de retención va a depender de la naturaleza del contra-ión y de su concentración, la composición del eluente y de la tasa de carbono de la

fase estacionaria según el siguiente mecanismo.

Gracias, a su parte hidrocarbonada importante, el contra-ión se va a adsorber en la fase estacionaria según las reglas del efecto hidrofóbico, es decir, al equilibrio existe una constante de reparto que fija las concentraciones relativas en las dos fases, también, la constante de reparto es más grande cuando la parte hidrocarbonada es más importante y por último la constante de reparto disminuye cuando la concentración del disolvente orgánico aumenta como el eluente.

Este efecto permite, realizar lo que se llama un intercambiador de iones dinámico que se obtiene por equilibrio de reparto reversible y que es posible cambiar la capacidad modificando la constante de reparto.

La amplitud del aumento de retención del soluto va a depender de la constante de equilibrio de formación del par de iones y de la concentración del contra-ión en la fase estacionaria.

Se ve entonces que la cromatografía de pares de iones, permite ampliar el uso de la fase inversa a moléculas que tendrían una retención demasiado limitada, lo que explica su éxito [5,13].

e) Permeación o exclusión.

Es aplicada particularmente para la separación de sustancias de 2,000 g/mol, se utiliza para estudios de distribución de pesos moleculares en polímeros sintéticos y también para la separación de mezclas donde los constituyentes son de pesos moleculares muy diferentes y finalmente en estudios iniciales de muestras desconocidas. Ya que la cromatografía de permeación indica en éste caso, si la muestra es simple o complicada y el rango de pesos moleculares en que se sitúan sus constituyentes.

La cromatografía de permeación, se basa en la retención selectiva de las moléculas de solutos en función de su tamaño, debido a la mayor o menor penetración, e incluso a la exclusión de dichas moléculas de los poros de una fase estacionaria apropiada. Las moléculas grandes migran rápidamente, pues son excluidas de su totalidad o de una parte de los poros de la fase estacionaria, mientras que las moléculas más pequeñas pueden entrar en todos los poros y viajan más lentamente. Es decir, que la separación no está basada en interacciones físico-químicas con la fase estacionaria sino solamente en la dimensión de las moléculas en solución.

Por otra parte, como las moléculas del disolvente son generalmente pequeñas y penetran en todos los poros, la fase móvil migra más lentamente que toda la muestra, es decir, que todos los compuestos son eluidos antes del tiempo t_0 que corresponde a la salida de los volúmenes intersticial y poroso, al contrario de lo que sucede en las demás técnicas cromatográficas de interacciones.

Esas características dan lugar a varias ventajas como:

- Se obtienen bandas estrechas de los solutos, lo que facilita la detección.
- La capacidad de la fase estacionaria es en general superior, lo que permite el uso del refractómetro para la mayoría de los polímeros sintéticos.
- Las separaciones son rápidas para cualquier tipo de soluto sin necesidad de efectuar gradiente de elusión.
- El tiempo de análisis es fácilmente predecible. Todos los compuestos son eluidos entre el tiempo que tardan en migrar las moléculas completamente excluidas y t_0 .
- Se facilita la identificación de los picos correspondientes a los diferentes compuestos de la muestra ya que la retención depende únicamente de la talla de la molécula.
- No hay pérdidas o alteraciones químicas de la muestra durante la separación.
- La columna acumula menos impurezas por lo que se degrada o se desactiva mas lentamente.

Por el contrario, las desventajas principales de la cromatografía de exclusión son:

- Es inaplicable para la separación de compuestos de tamaño similar. Se requiere al mínimo 10% de diferencia en los pesos moleculares de los solutos.
- La capacidad de picos es limitada. Esto quiere decir que solo algunos picos separados pueden ser acomodados en el cromatograma total por que éste es muy corto.
- Dependiendo de la solubilidad de las muestras, se requerirán fases móviles acuosas u orgánicas, lo cual a su vez, condiciona material de que está hecha la fase estacionaria. Esto ha dado origen a una división, un poco artificial, en la cromatografía de exclusión en:

- a) Cromatografía de permeación de gel para los disolventes orgánicos.
- b) Cromatografía de filtración en gel para los disolventes acuosos [5,13].

2.4 Fase estacionaria.

Consiste en un adsorbente sólido, alúmina o gel de sílice, distribuido uniformemente sobre una superficie plana, generalmente vidrio, polietileno o metal. Este adsorbente presenta cierta capilaridad, dada por las partículas finamente divididas y que permite que la fase móvil pase entre las partículas del adsorbente.

La separación ocurre cuando uno de los componentes de la mezcla es retenido en mayor grado por la fase estacionaria que los otros componentes. La fase estacionaria puede

modificarse de acuerdo a las necesidades de separación, aunque el factor más importante para que ésta se lleve en forma adecuada es la fase móvil elegida [13].

2.5 Fases estacionarias para cromatografía en capa fina.

Desde que la Cromatografía en Capa Fina fue experimentada por Stahl en 1956, el número de sustancias adsorbentes que se han usado como capa delgada ha aumentado considerablemente. Se describen aquí las de uso común [13].

a) Gel de sílice.

Es un adsorbente regenerado consistente en sílice amorfa. No tóxico, no combustible; Su obtención es generalmente a partir de silicato sódico y ácido sulfúrico. Puede encontrarse en diferentes calidades: se expenden calidades comerciales susceptibles de resistir temperaturas hasta 260/315°C, en los siguientes tamaños de malla: 3-8, 6-16, 14-20, 14-42, 28-211, y a través de la 325.

Éste se puede obtener con pequeñas mezclas de sulfato de calcio (aumenta su adhesividad a la placa) y también con indicador fluorescente. El gel de sílice (de Merck y Cía.) contiene sulfato de calcio como adhesivo; el gel de sílice CF₂₅₄ contiene adhesivo e indicador fluorescente. El tamaño de partículas de ambos es alrededor de 5 a 25 micrones. El gel de sílice de Woelm y Cía. también se puede obtener sin adhesivo y contiene menos impurezas de hierro que el producto de Merck.

La Cía Macherey y Nagel provee gel de sílice con o sin adhesivo y también con indicador fluorescente. Contiene la más baja cantidad de hierro como impureza, siendo preferible a los otros adsorbentes. Sin embargo, ahora Merck surte gel de sílice HR, que es extrapuro, no contiene adhesivo o impurezas orgánicas. Se recomienda para análisis cuantitativos y espectroscópicos de compuestos separados [13].

Sílica GF ₂₅₄	Este tipo de Sílica presenta y contiene adhesivo e indicador fluorescente, además contiene sulfato de calcio (CaSO ₄ H ₂ O); el tamaño de partícula es de 5-25µm
Sílica HR	Este tipo de Sílica se presenta en forma extrapura, y no contiene adhesivo, ni suele presentar impurezas orgánicas; es recomendable para análisis cuantitativos y espectroscopia de compuestos separados.
Sílica G	Este tipo de Sílica es designada tipo G, por que suele presentar yeso y sulfato de calcio, -los cuales al exponerse al agua y/o a la humedad, se convierte en una masa rígida y sólida de sulfato de calcio dihidratado (CaSO ₄ 2 H ₂ O).

Tabla II. Principales tipos y denominaciones de Sílica Gel que se utilizan en el desarrollo de técnicas de cromatografía [3].

b) Kieselguhr.

Es conocido también como Diatomita o Tierra de Diatomeas, es un material sólido, blando, pesado (88%) de sílice), compuesto de esqueletos de pequeñas plantas acuáticas, prehistóricas, relacionadas con las algas (diatomeas). Tienen formas geométricas intrincadas. Esta disponible en forma de bloques, ladrillos, polvo, etc., de color claro. Insoluble en ácidos excepto clorhídrico; soluble en álcalis fuertes. Es capaz de absorber 1.5-4.0 veces su peso en agua; tiene también gran capacidad de absorción de aceite.

A diferencia con el gel, que es un coloide en el que la fase dispersa está combinada con la fase continua formando una fase gelatinosa, se precisa únicamente un 2% de gelatina en agua para formar un gel firme y se puede obtener por enfriamiento de una solución en donde ciertos tipos de solutos forman grupos de partículas cristalinas microscópicas.

En consecuencia el Kieselguhr es menos polar que el gel de sílice y menos adsorbente. No se pueden hacer capas gruesas con facilidad y la cantidad de sustancia que se puede aplicar es menor que con el gel de sílice [13].

c) Alúmina.

Es también conocido como óxido de aluminio, comúnmente se encuentra en la naturaleza como un mineral: bauxita, bayerita, bohemitita, gibbsita, etc. Las características del óxido de aluminio nativo es polvo cristalino blanco, con un punto de fusión de aproximadamente 2000°C, es un sólido muy manejable, prácticamente insoluble en agua ligeramente soluble en soluciones acuosas alcalinas con formación de pequeñas cantidades de hidróxidos, prácticamente insoluble en solventes orgánicos no polares.

Ésta tiene las propiedades adsorbentes del gel de sílice, pero el grado de adsorción depende de su pH y de la magnitud de la activación. Generalmente la cantidad que se puede aplicar es menor que con el gel de sílice. Puede obtenerse con adhesivo (Serva, Merck, Wolem, Macherey y Nagel), sin adhesivo (Serva, Merck y Woelm) o con indicador fluorescente (Camag, Merck, Woelm, Macherey y Nagel). El pH de la alúmina varía dependiendo del fabricante, por ejemplo: el óxido de aluminio G de Merck es básico. Woelm surte tres tipos: básico (pH 9), neutro (pH 7.5) y ácido (pH 4) [13].

d) Celulosa.

Es un polisacárido con unidades de glucosa unidas, son azúcares no reductores y no presentan mutarrotación. La celulosa consta simplemente de unidades de D-Glucosa unidas por los enlaces 1,4'-B-glicosídicos ya considerados para la celobios. Varios millares de unidades de glucosa están ligados formando una molécula larga, y entonces pueden interactuar diferentes moléculas y formar un agregado estructural gigante que se mantiene unido por medio de puentes de hidrógeno. Es una sustancia blanca, prácticamente insoluble en agua u otros solventes, pero puede disolverse en soluciones alcalinas.

Aunque los principios cromatográficos involucrados con el uso de la celulosa en capas son principalmente los de la cromatografía en papel, las manchas son más definidas en Cromatografía en Capa Fina que en el papel y dan mejor separación. Se halla disponible con o sin adhesivo de Macherey y Nagel, sin adhesivo de Merck y con adhesivo fluorescente de Macherey y Nagel [13].

2.6 Relación al frente (R_f).

El movimiento de cada sustancia en un determinado sistema es característico y puede ser un dato valioso en la identificación de ella. Esta característica se conoce con el nombre de R_f (Relación al frente) y representa la distancia recorrida por el compuesto, en relación a la distancia recorrida por la fase móvil, por lo que sus valores siempre oscilan entre 0 y 1.

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por un compuesto desde el origen}}{\text{distancia recorrida por el frente de la fase móvil.}}$$

No todas las sustancias pueden observarse, por lo que en muchas ocasiones es necesario observar la placa de cromatografía después de someterla a procesos de revelado, dependiendo éstos de las características químicas del compuesto por analizar o bien observar dichas placas bajo una fuente de luz ultravioleta.

Éstas placas se pueden adquirir ya preparadas, es decir, recubiertas por la capa del adsorbente (gel de sílice o alúmina) que se vaya a emplear o pueden prepararse en el laboratorio [10,11].

2.7 Relación al frente relativo ($R_{f,rel}$).

La longitud recorrida por un compuesto desde el origen de la aplicación de la muestra hasta la altura máxima alcanzada por el mismo es considerada como la unidad o $R_f = 1.0$, siendo éste considerado como el compuesto primario o compuesto de interés. Las manchas de compuestos complementarios ó secundarios de mayor y menor longitud recorrida, son considerados con un R_f , pero relativo a la sustancia de interés o primaria. Este R_f relativo será de acuerdo al intervalo donde es visualizado el compuesto (tomando en cuenta el $R_f = 1.0$ y el punto de aplicación de la muestra de $R_f = 0$). Es decir, una serie de compuestos secundarios pueden tener un R_f relativo mayor y menor que 1 [11].

2.8 Fase móvil.

Se entenderá que la fase móvil, es aquella parte en solución y disolventes que interactuarán con las partículas de la fase estacionaria, logrando pasar a través de ellas y arrastrando consigo partículas de la muestra a separar. La elección del disolvente dependerá de la naturaleza del compuesto que se va a separar y del material en que la separación va a llevarse a cabo. Una regla general para la elección del disolvente es la comparación de la polaridad del mismo y la de la sustancia que se desea separar. Así para sustancias solubles

en agua se elegirán capas de celulosa o gel de sílice. Para sustancias menos polares se elegirán capas de alúmina o gel de sílice activadas, empleando un disolvente no acuoso apropiado.

Una técnica sencilla para la elección del disolvente a emplear en una determinada separación, consiste en colocar una serie de manchas de la muestra a intervalos en una placa. Los disolventes se prueban aplicándolos en los centros de las manchas mediante un capilar muy fino, lo que permite desarrollar las manchas radialmente [5,13].

2.9 Preparación de las cromatoplacas.

Se adquiere un dispositivo para extender sobre las placas una capa uniforme del material con el que se van a recubrir. Se prepara una suspensión del material de recubrimiento de acuerdo a las indicaciones del fabricante y utilizando el dispositivo indicado se distribuye esta suspensión sobre las placas, las cuales deben de estar limpias y secas. El grosor de la capa varía de 0.25 a 0.30 mm.

Antes de que se puedan usar las placas generalmente deben ser calentadas para retirar el agua que actúa como una impureza y evita una buena separación. Con frecuencia el agua está firmemente ligada al adsorbente por lo cual se debe calentar la placa.

La magnitud del calor depende del tipo de separación que se requiere. Para compuestos hidrofílicos o polares, el secado al aire o con un secador de pelo son generalmente adecuados; pero para los compuestos hidrofóbicos o no polares es necesario un calentamiento más intenso. Las placas de óxido de aluminio y de gel de sílice con adhesivo requieren ser secadas al aire durante aproximadamente 30 minutos y después ser activadas en un horno a 100°C (nunca arriba de 105°C) alrededor de 30 minutos.

Las placas de óxido de aluminio y de gel de sílice sin adhesivo requieren ser secadas al aire durante 1.5 a 2.0 horas y ser activadas en un horno a 120°C durante aproximadamente 60 minutos. Las placas de celulosa deberán secarse al aire durante 30 minutos y activarse al horno durante 10 minutos a 105°C.

La cámara para la cromatografía se emplea en condiciones de saturación para lo cual se forra internamente con papel filtro y se vacía dentro de éste suficiente fase móvil para humedecer el papel y que quede en el fondo una capa de disolvente de 0.5 a 1.0 cm. La cámara se cierra herméticamente para evitar la evaporación de la fase y se mantiene en estas condiciones de 45 min. a 1 hora antes de utilizarse.

La aplicación se hace con ayuda de micropipetas o microjeringas en forma de una mancha compacta no mayor de 6 mm de diámetro o en forma de banda de no más de 2 cm de largo y no más de 6 mm de ancho. La aplicación de cada solución deben de estar suficientemente separadas entre sí para evitar que se mezclen. La distancia que va a recorrer el frente del disolvente se determina de antemano en la placa considerando el punto de aplicación como el origen.

Las aplicaciones se dejan secar y la placa se introduce en la cámara conteniendo el sistema. Se tapa herméticamente y se deja a temperatura ambiente hasta que la fase móvil ascienda la distancia deseada. Se saca la placa y se deja evaporar el disolvente que la impregna.

En el revelado, la localización de las manchas de interés se hace por visualización directa bajo una lámpara de luz ultravioleta o bien, se emplea un reactivo de revelado, el cual se aplica por atomización o en forma de vapores.

La naturaleza de estas placas permite utilizar agentes reveladores, tan energéticos como el ácido sulfúrico ó el permanganato de potasio. Si las sustancias no son coloreadas, ni se pueden poner de manifiesto con luz ultravioleta, se puede recurrir a los vapores de yodo u otros reactivos especiales [10,14].

2.10 Revelado de la cromatoplaca.

Los procedimientos empleados para revelar las placas son análogos a los que se usan en la cromatografía sobre papel. Sin embargo, hay algunas diferencias. En principio, el método de bañado no es recomendable, ya que las placas se estropean fácilmente con éste método. Una de las ventajas de la cromatografía en capa fina sobre la de papel es la posibilidad del revelado con agentes corrosivos, tal como los ácidos concentrados y compuestos oxidantes, a altas temperaturas, debido a la naturaleza inorgánica de la capa.

Otro reactivo empleado son los vapores de Yodo. En una cubeta que contiene en el fondo cristales de yodo, se introduce la cromatoplaca y se deja durante unos minutos. El yodo tiende a concentrarse en los sitios donde está los compuestos, por lo que aparece una mancha de color marrón oscuro, sobre un fondo amarillo pálido. En tanto que no reaccione el yodo con las sustancias, el método es bueno como revelador no destructivo, aunque esto implique mayor tiempo.

Otros métodos que no afectan a los productos en el revelado, es la fluorescencia y la radiactividad. Muchas placas llevan sustancias fluorescentes como aditivos para el revelado de los compuestos, localizándose los mismos por la aparición de manchas no fluorescentes. Además muchas veces los compuestos a separar absorben en el ultravioleta, siendo ésta el método más sencillo para localizarlos [5,13].

2.11 Almacenaje de placas de cromatografía en capa fina.

En el comercio hay portaplacas con capacidad para placas de 5 x 20, 10 x 20 y 20 x 20 cm y éstas se pueden almacenar en un gabinete desecador que contenga un recipiente con gel de sílice para evitar desactivación. Es esencial el almacenaje en una atmósfera perfectamente seca una vez que se hayan activado las placas. Es preferible secar las placas al aire, guardándolas en un gabinete desecador y activarlas inmediatamente antes de usarlas. Si se han conservado las placas durante periodos prolongados antes de usarlas (semanas o más), deberán ser reactivadas mediante nuevo calentamiento en el horno durante el tiempo y a la temperatura necesarios.

2.12 Placas comerciales cromatográficas para capa fina.

Comienzan a expenderse en el comercio, pero son extremadamente caras. Actualmente Merck vende placas de gel de sílice, de alúmina y de celulosa con o sin adhesivo y con o sin indicador fluorescente. Éstas no solo son flexibles, si no que la capa delgada del adsorbente está tan firmemente adherida que se puede manejar con alguna brusquedad sin que se desplace la capa.

Puede resultar extremadamente útil una placa para Cromatografía en Capa Fina, con soporte de papel de aluminio. La expende Anderman & Co. Ltd., Londres, y tiene la ventaja de no romperse como las de vidrio y de que se puede cortar a cualquier tamaño que convenga. Las hay con un grosor de 100 a 250 micras [13].

3. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Debido al gran incremento de nuevos productos farmacéuticos y alimenticios y a la gran competitividad comercial, se requiere que el producto que salga a la venta sea de calidad, es por ello que el laboratorio de control de calidad debe de garantizar la calidad del producto y para ello se requiere de un laboratorio en óptimas condiciones de funcionamiento (instrumentos y equipos) [15].

Una parte complementaria del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir, el método debe probarse para determinar la efectividad, además por ser un requisito ante la secretaria de salud y porque debe de probar que funciona para las aplicaciones analíticas deseadas.

La validación de métodos analíticos tiene como objetivo el comprobar la validez de los métodos analíticos mediante análisis estadísticos de acuerdo a parámetros a evaluar (tabla III) y es la medición del sistema analítico total, en otras palabras, es la medición del efecto de los instrumentos, solventes, reactivos y todos los demás elementos que son utilizados durante el ensayo [16].

Es muy importante la acción de validar, puesto que toda acción que se repite dos o más veces, estará sujeta a un fenómeno conocido como variación, siendo que es muy difícil que en una acción un mismo resultado se reproduzca con la misma magnitud dos veces seguidas, ya que estará sujeta a un gran número de factores que provocan que se den diferencias en las condiciones de la primera vez [15].

La validación de métodos analíticos es una parte integral del desarrollo del mismo, y se define como el proceso de comprobar que una metodología determinada satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas; así mismo, se plantea que su principal objetivo, es ofrecer evidencia documental de que el método realiza lo que se pretende de forma fiable y reproducible [17].

Más que la simple medición de un proceso, la validación implica que se tenga la seguridad de que el método, instrumentos, disolventes, reactivos y todo lo demás utilizado durante el análisis es adecuado para el compuesto a analizar; así por ejemplo: en el caso de los métodos cromatográficos deben de considerarse todas las variables del método que incluyen el procedimiento de muestreo, preparación de la muestra, separación cromatográfica, detección y evaluación de datos [18].

Dentro de la Validación de Métodos Analíticos, es muy importante hacer hincapié en la aplicación del método, ya que dependiendo de ello se establecen los parámetros a evaluar dentro de la Validación (Tabla III).

Parámetro	Control de Calidad	Indicadores de estabilidad		Biodisponibilidad
		Bajas Concentraciones	Altas Concentraciones	
Linealidad y Precisión del sistema	x	x	x	x
Límite de Detección		x		x
Límite de Cuantificación		x		x
Exactitud y Repetibilidad al 100%	x			
Linealidad del Método	x	x	x	x
Precisión	x	x	x	x
Especificidad (Control de Calidad)	x			x
Especificidad (Estabilidad)		x	x	
Tolerancia del Sistema	x	x	x	x
Estabilidad de la Muestra	x	x	x	x

Tabla III. Parámetros a evaluar dependiendo de la aplicación del método [15].

3.1 Parámetros en la validación de métodos analíticos para control de calidad.

Dentro del desarrollo y la Validación de un método analítico, lo primero que se debe de evaluar es el Sistema de Medición con el que se está trabajando y corresponde a los siguientes parámetros:

- Linealidad.
- Precisión.

• Linealidad.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Es la variación de la respuesta del sistema de medición con respecto a la concentración del analito de interés, se realiza para asegurar la proporcionalidad directa sobre el intervalo de trabajo preestablecido [15,17].

- Precisión.

Es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales. Este parámetro considera sólo la contribución al error atribuible al sistema de operación o medición [15,17].

Una vez comprobado que el sistema cumple con los requisitos antes mencionados, debe iniciarse la validación del método.

Para verificar que el método cumpla con estos requisitos antes planteados, deben determinarse ciertos parámetros que indiquen el comportamiento del método:

- Linealidad.
- Exactitud.
- Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad).
- Especificidad.
- Estabilidad de la Muestra.

- Linealidad.

Se define como la habilidad del método para asegurar que los resultados analíticos (obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida), son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

- Exactitud.

Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia del 100%. Se expresa como el porciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de sustancia.

- Precisión.

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una porción 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 las mismas condiciones de operación:

-- 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.).

-- Reproducibilidad.

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, diferentes días, diferentes laboratorios, diferentes equipos, etc.).

• Especificidad.

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

• Estabilidad de la Muestra.

Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar sus integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés después de almacenarse durante el tiempo determinado bajo condiciones específicas [15,17].

Por otra parte, cualquier proceso de medición está sujeto a error. Es de esperarse que el error de un método analítico debe ser evaluado para determinar su precisión y su exactitud.

El error se divide en :

- error sistemático: error que da lugar a medidas incorrectas, éstas pueden ser en partes instrumentales, metódicas, operacionales personales, entre otros; y
- error aleatorio: error que permanece aún cuando se ha eliminado el error sistemático, o por lo tanto da lugar a medidas imprecisas.

Es indispensable antes de iniciar la validación de una metodología analítica, que el los instrumentos de trabajo (balanzas, cromatógrafos, espectrofotómetros, aparatos de disolución) se encuentre en condiciones óptimas de operación y en el programa de validación y/o verificación.

Si por necesidades de un proyecto en particular algún punto no se tiene considerado, será necesario discutirlo con el químico responsable del proyecto para establecer el protocolo de validación correspondiente [19].

4. CLORHIDRATO DE RANITIDINA

4.1 Historia y categoría terapéutica.

Las primeras síntesis de Ranitidina fueron descritos en 1973, se continuaron realizando estudios farmacológicos y clínicos en 1979 y 1980, y finalmente la ranitidina fue introducida en el mercado en 1981 [20].

En el pasado el tratamiento de la Enfermedad Ulcerosa Péptica (EUP) se limitaba a la neutralización del ácido por medio de preparados antiácidos y a la moderada inhibición de la producción de ácido por medio de sustancias anticolinérgicas. Con el advenimiento de los antagonistas de los receptores H_2 , como es el Clorhidrato de Ranitidina, resurgió el interés en el desarrollo de nuevos compuestos para el tratamiento de EUP [21].

4.2 Antiácidos.

Los antiácidos han sido base del tratamiento de la EUP durante muchas décadas, a pesar de la escasez de estudios controlados que documenten la eficacia. La mayoría de los preparados populares son mezclas de magnesio e hidróxido de aluminio. El mecanismo de acción de éstos compuestos involucra la neutralización.

Los antiácidos se utilizan principalmente para el tratamiento de enfermedades pépticas del tracto gastrointestinal (GI) superior, éstas incluyen la esofagitis por reflujo y las úlceras gástricas y duodenales.

La administración correcta de los antiácidos ha sido tema de controversia durante muchos años. Existe acuerdo en cuanto a que los antiácidos deben administrarse después de las comidas, idealmente de 1 a 3 horas después, de modo que el aumento de pH gástrico pueda mantenerse durante un lapso más prolongado. En el estómago vacío el aumento del pH gástrico es transitorio, por tanto, para neutralizar de forma efectiva el HCl serán necesarias dosis diarias.

Más recientemente se ha demostrado que las tabletas de antiácidos son efectivas para la curación de la úlcera duodenal.

El factor principal que limita el uso de altas dosis de antiácidos es la frecuente aparición de la diarrea, que reduce el cumplimiento por parte del paciente. Debido a la inconveniencia del uso de antiácidos líquidos y a los efectos colaterales asociados con el mal cumplimiento, en la actualidad rara vez se emplean antiácidos como el único tratamiento de la EUP [21].

4.3 Antagonistas de los receptores H_2 .

El desarrollo de los agentes que antagonizan de forma selectiva la histamina a niveles de receptores en la célula parietal (bloqueante H_2) destaca la importancia de la histamina

endógena en el control de la secreción ácida. Si bien se han descrito receptores H_2 en otros órganos y tejidos, su principal papel consiste en la modulación histamínica de la secreción ácida [22].

El Clorhidrato de Ranitidina comenzó a estar disponible en los Estados Unidos y desde entonces más de 10 millones de pacientes han sido tratados con este fármaco en todo el mundo, lo que lo convierte en uno de los fármacos más ampliamente prescritos a nivel mundial [23].

Numerosos estudios han demostrado la eficacia de los antagonistas H_2 en el tratamiento de las úlceras gástricas y duodenales. Aproximadamente el 80% de las úlceras se cura con 4 a 6 semanas de tratamiento. Otras indicaciones para el uso de los antagonistas H_2 incluyen el tratamiento de los síndromes de hipersecreción [22].

4.4 Descripción.

a) Nombre químico.

El nombre químico para la Ranitidina es N-2-[[[5-[(dimetilamino)metil]-2-furanil]metil]tio]etil]-N'-metil-2-nitro-1,1-eteno diamina. El número de registro es 66357-35-5. Otro nombre químico es 2-[[[5-(dimetilamino)-metil-2-furanil]-metil]tio]-etilamino—metilamino-1-nitroetano [14,20].

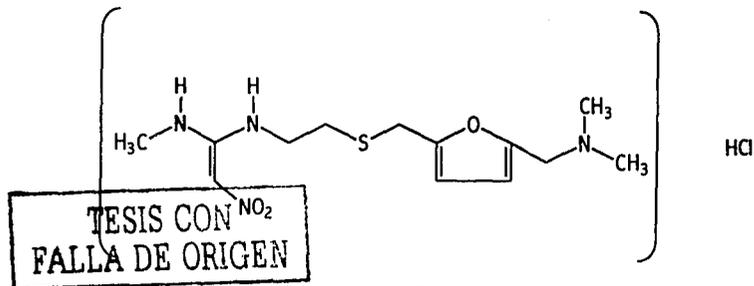
b) Nombre genérico

Ranitidina

c) Nombre tradicional

Zantac

d) Fórmula



e) Peso molecular

350.869

f) Apariencia, olor y color.

La Ranitidina es únicamente elaborada como: Clorhidrato de Ranitidina. Es un sólido blanco o ligeramente amarillo, inodoro o con un pequeño olor a sulfuro-mercaptano [10,14].

4.5 Síntesis

La primera síntesis de Ranitidina es mostrada en la fig. 2, comenzando con la reacción de 5-dimetilaminometil-2-furanil-metanol (I) con 2-mercaptoetilamina por métodos de acidificación con ácido clorhídrico acuoso, para dar 2-(((5-dimetil-aminometil-2-furanil)metil)tio)etanoamino (II). Este intermediario es un condensado con N-metil-1-metiltio-2-nitro etenoamino (IV) por calentamiento en agua a 50°C durante 4 horas.

El compuesto IV es obtenido en una reacción de 1,1-bis(metiltio)-2-nitroeteno (III) con metilamina en reflujo con etanol.

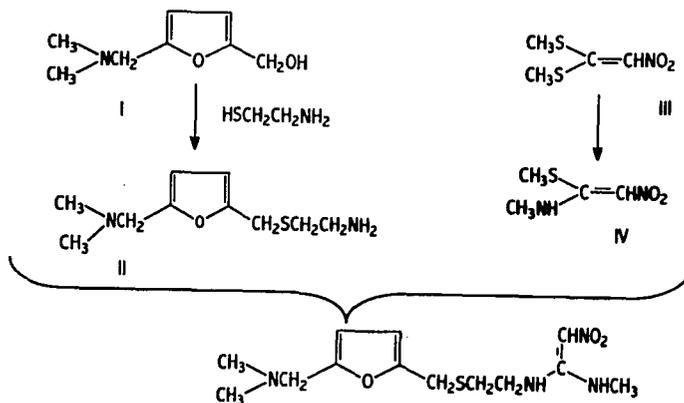


Fig. 2 Síntesis del Clorhidrato de Ranitidina [20].

Alternativamente, la Ranitidina (V) puede ser preparada por condensación de 5-dimetilaminometil-2-furanil metil mercaptano (VI) con un derivado de aziridina (VII) y por reacción de aminas II con 1-nitro-3-metil cetona imina (IX) mostrado en la fig. 3.

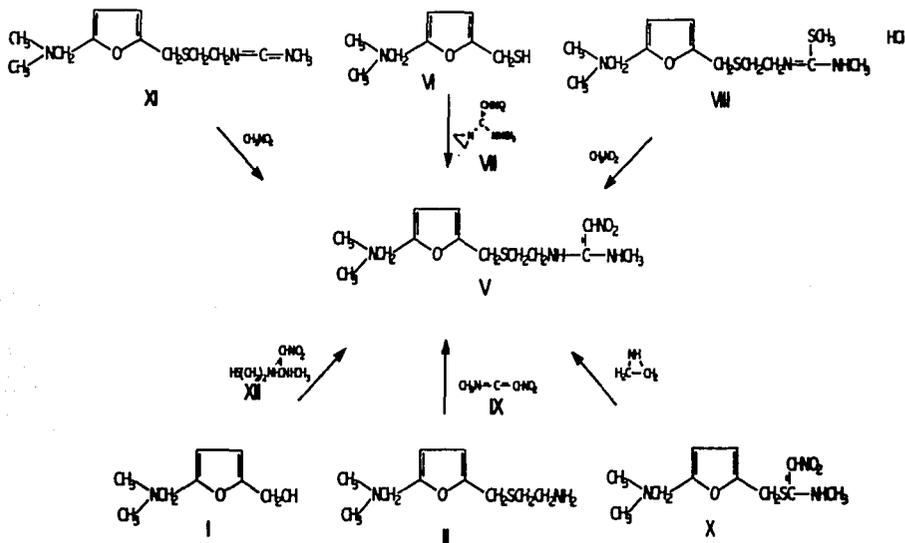


Fig. 3 Alternativa para síntesis del Clorhidrato de Ranitidina [20].

4.6 Productos de degradación.

Compuesto

Nombre Químico

- A [[5-[[[(2-aminoetil)tio]metil]2-furanil]metil]dimetilamina.
- B N,N'-bis[2-[[[5-[(dimetilamino)metil]2-furanil]metil]tio]etil]2-nitroeteno-1,1 diamina.
- C N-[2-[[[5-[(dimetilamino)metil]2-furanil]metil]sulfanil]etil]-N'-metil-2-nitroeteno-1,1-diamina.
- D N-[2-[[[5-[(dimetilamino)metil]2-furanil]metil]tio]etil]2-nitroacetamida.

- E N-[2-[[[5-[(dimetilamino)metil]2-furanyl]metil]tio]etil]-N'-metil-2-nitroeteno-1,1-diamina N-óxido.
F [5-[(dimetilamino)metil]2-furanyl]metanol.
G 3-(metilamino)-5,6-dihidro-2H-1,4-tiazina-2-oxima.
H N-metil-2-nitroacetamida.

[27].

4.7 Propiedades espectroscópicas.

a) Espectroscopía infrarrojo (I.R.)

El Clorhidrato de Ranitidina se puede presentar en estado sólido en forma de cristales en dos formas tautoméricas diferentes. En la Fig. 4, se observa el espectro en el Infrarrojo de una forma tautomérica A del Clorhidrato de Ranitidina. Mientras que en la Fig. 5 se observa el espectro de absorción Infrarrojo de la forma B complementaria.

En el espectro infrarrojo, las bandas características de los grupos nitro se adjuntan al átomo de carbono saturado, extendiéndose las frecuencias de las vibraciones a 1554 y 1382 cm^{-1} , siendo difícilmente visibles como bandas en un rango de 1505 a 1540 cm^{-1} , además las características de éstos grupos se pueden extender para sustituir grupos eteno. Esto es, gruesas bandas a 1620 cm^{-1} que corresponden a las vibraciones de los enlaces dobles de $\text{C}=\text{N}$. Las bandas gruesas que aparecen a 2640 y 2560 cm^{-1} , son características de los enlaces $\text{N}'\text{-H}$, los cuales existen en grupos de aminas terciarias protonadas.

Las propiedades de espectros infrarrojos sugieren que el clorhidrato de Ranitidina existe en más de una forma tautomérica, como se demuestra en la fig. 6 [14,20].

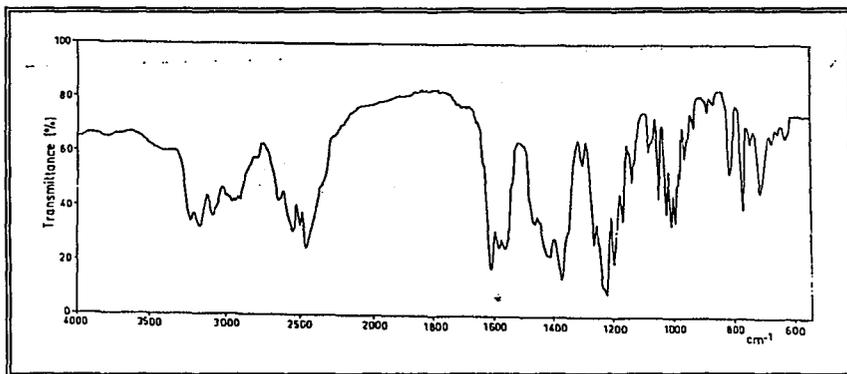


Fig. 4 Espectroscopía I.R. de la forma tautomérica "A" del Clorhidrato de Ranitidina [20].

GENESIS CON
FALLA DE ORIGEN

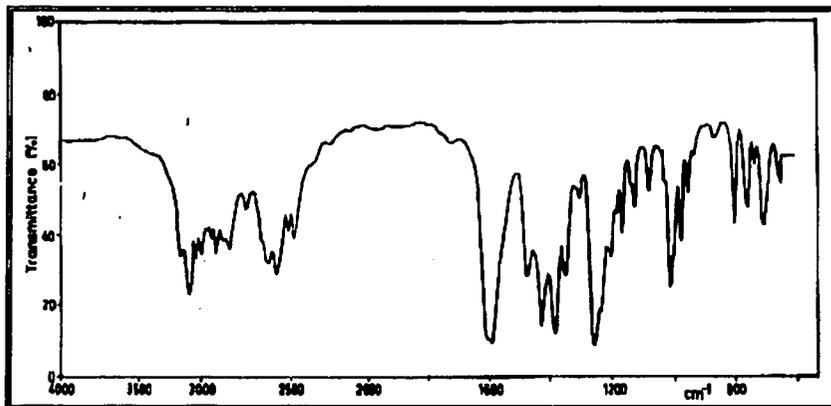


Fig. 5 Espectroscopía I.R. de la forma tautomérica "B" del Clorhidrato de Ranitidina [20].

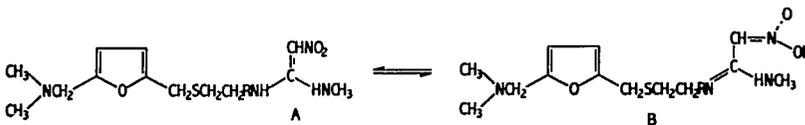


Fig. 6 Estructuras químicas correspondientes a las formas tautoméricas "A" y "B" del Clorhidrato de Ranitidina [20].

b) Espectroscopía ultravioleta (U.V.)

El espectro U.V. se realiza en solución acuosa, a concentraciones de 10^{-2} g/L, el espectro permite ver 2 absorciones máximas a 228 nm ($E_{MeOH}=23.485$) y a 313 nm ($E_{MeOH}=16.030$) [14].

La medición de la absorción a 313 nm es muy conveniente para la determinación cuantitativa del Clorhidrato de Ranitidina aún en la presencia de intermediarios en la síntesis de Ranitidina.

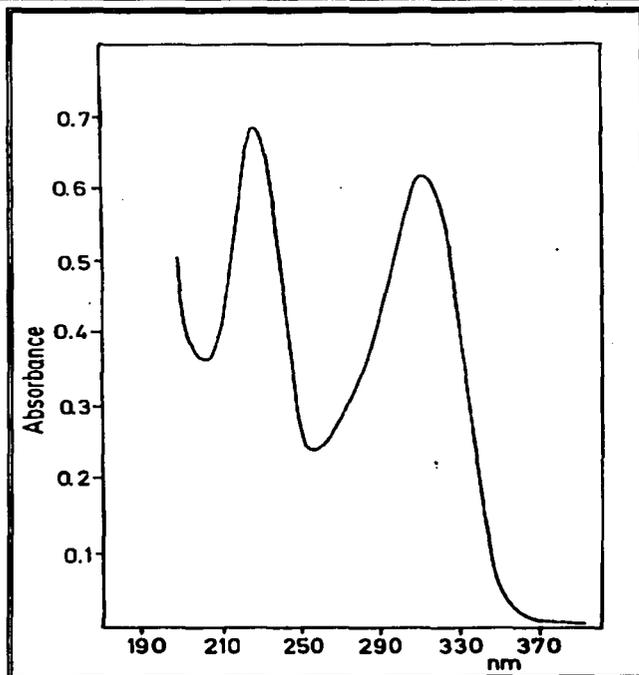


Fig. 7 Espectroscopia U.V del Clorhidrato de Ranitidina en MeOH [20].

4.8 Propiedades del sólido

a) Características de fusión.

La Ranitidina base es difícilmente cristalizada, pero como Clorhidrato puede ser cristalizada convencional y particularmente en disolvente isopropanol. El rango de fusión del Clorhidrato de Ranitidina depende de la forma polimórfica en la cual el compuesto haya sido cristalizado. Cuando se adiciona acetato de etilo a una solución etanólica con Clorhidrato de Ranitidina, se produce la forma I, la cual tiene un rango de fusión de 135-136°C ó 133-134°C. Y una forma II es cristalizada con isopropanol-HCl en solución, resultando un rango de fusión de 143-144°C ó 141-142°C [20].

b) Solubilidad

La solubilidad del Clorhidrato de Ranitidina en varios disolventes a temperatura ambiente está resumida en la tabla siguiente:

DISOLVENTE	SOLUBILIDAD
Acido acético	Fácilmente soluble
Agua	Muy fácilmente soluble
Metanol	Soluble
Etanol	Difícilmente soluble
Acetato de Etilo	Muy difícilmente soluble
Isopropanol	Muy difícilmente soluble
Dioxano	Insoluble
Cloroformo	Insoluble

Tabla IV. Solubilidad del Clorhidrato de Ranitidina [20].

c) Acidez (pka)

El valor de pka obtenido fue de 2.19 \pm 0.04 en metanol [20].

d) Método cromatográfico en capa fina.

La pureza del clorhidrato de Ranitidina puede ser rápidamente visualizada y cuantificada por Cromatografía en Capa Fina sobre sílica gel.- A continuación se muestran los valores de R_f con varios sistemas de disolventes.

Disolventes y sus valores de R_f

A	B	C	D	E	F
0.50	0.44	0.36	0.64	0.73	0.39

A=EtOAc/ MeOH/ Et₂NH (3:3:1),

B=CHCl₃/ n-PrOH/ Et₂NH (4:3:2)

C=Dioxano/ MeOH/ DMF (6:3:2)

D=MeCN/ MeOH/ 25%NH₄OH (5:2:1)

E=EtOAc/ MeOH/ 25%NH₄OH (1:5:1)

F=EtOAc/ n-PrOH/ 25%NH₄OH (4:3:1)

Los puntos (Clorhidrato de Ranitidina) fueron revelados bajo una lámpara Ultravioleta, o por exposición a vapores de yodo.

El procedimiento de identificación del Clorhidrato de Ranitidina por Cromatografía en Capa Fina, fue: aplicando 5, 15 y 30 μ L de la solución metanólica de 20 g/mL del

Clorhidrato de Ranitidina. Y se aplicó el volumen de metanol equivalente a la concentración anterior sobre la cromatoplaque de sílica gel [20].

e) Estabilidad.

De acuerdo con la bibliografía, la estabilidad del Clorhidrato de Ranitidina puede ser probada de dos maneras: una serie de 3 muestras es colocada a 40°C / 50-60 % HR por cinco días, y otra serie de 3 muestras a 60°C / 100% HR durante el mismo periodo. De acuerdo a la determinación espectrométrica, la degradación será alrededor de 5 % y 11.5 %, respectivamente. En ambos casos se observan 5 diferentes productos de degradación [24].

f) Productos de degradación.

La degradación del Clorhidrato de Ranitidina se efectúa a temperaturas superiores a 40°C y con una humedad relativa superior a 50 ó 60 % por quince días, de acuerdo con la determinación espectrofotométrica así se provoca un aumento y progresiva descomposición, alcanzando una degradación > 50%. No pudiendo alcanzar una completa degradación del analito: Clorhidrato de Ranitidina [20].

El análisis por Cromatografía en Capa Fina en sílica gel 60 F₂₅₄ muestra que existen un número mayor de cinco diferentes productos de degradación. Algunos de los cuales son obtenidos por diferentes vías o factores críticos, como se demuestra en la fig 8 [21].

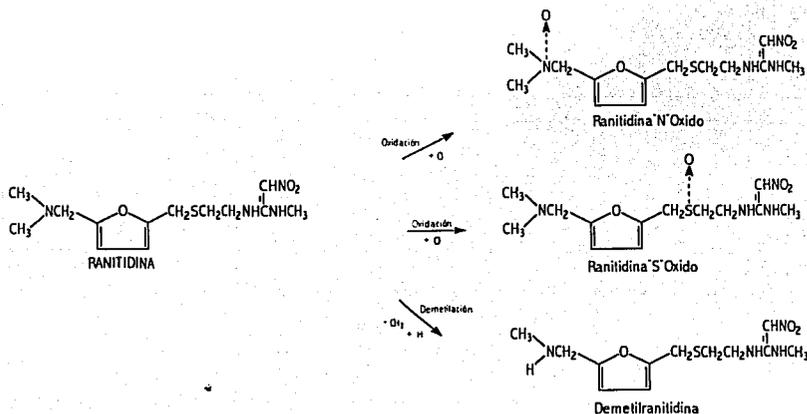


Fig. 8 Acción de la degradación del Clorhidrato de Ranitidina [21].

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los principios generales en los que se basa la industria farmacéutica es utilizar métodos de análisis seguros, proporcionando al paciente medicamentos que tengan la pureza, concentración, identidad y potencia requeridos para su uso. Una parte integral en el desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir, que el método debe de probarse para asegurar su efectividad y que se realice lo que se requiere para lo cual fue diseñado.

El método de análisis descrito en la FEUM 7ª ed. para Clorhidrato de Ranitidina es por la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC); debido a que algunos laboratorios al comenzar a crecer no cuentan con dichos sistemas e instrumentos para sus análisis de rutina, dan la pauta para desarrollar técnicas alternativas, sugiriéndose éstas a su vez con objetivos docentes y como apoyo dentro de Universidades que no tienen la tecnología para realizar éstas cuantificaciones. Por dicha necesidad, en este trabajo se propone realizar por Cromatografía en Capa Fina, un método eficaz para valorar un gran número de sustancias con exactitud, rapidez, bajo costo, accesibilidad y sencillez. Recurriendo a encontrar las condiciones idóneas en donde se aisle el compuesto de interés para poder identificarlo, extraerlo y cuantificarlo, traduciendo el problema en desarrollar y validar un método analítico para control de calidad para cuantificar Clorhidrato de Ranitidina.

III. OBJETIVOS

Objetivo General

- Desarrollar y validar un método analítico alternativo por Cromatografía en Capa Fina para cuantificar Clorhidrato de Ranitidina como un método de rutina en Control de Calidad.

Objetivos Particulares

- Desarrollar un sistema de elusión que permita separar los productos de degradación del Clorhidrato de Ranitidina, por medio de una técnica alternativa, sencilla, rápida y de bajo costo, como es la Cromatografía en Capa Fina.
- Validar el método analítico propuesto por Cromatografía en Capa Fina, para cumplir con los requerimientos mínimos y necesarios para evaluar al mismo.

IV. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Dado que el Clorhidrato de Ranitidina es una molécula con características que le confieren un carácter medianamente polar, es factible sugerir disolventes de mediana polaridad que permitan separar y posteriormente cuantificar por espectroscopía Ultravioleta (UV) dicho activo. Y se espera que la validación garantice y proporcione la evidencia, confiabilidad y efectividad del método y actividades sugeridas.

V. MATERIAL, EQUIPO E INSTRUMENTOS

1) EQUIPOS:

- Estufa, CAISA, OVEN SERIES 9000 Thermolyne
- Lámpara UV, CAMAG Gabinete
- Celdas para espectrofotómetro, 1 cm de cuarzo
- Placa de calentamiento, THERMOLYNE
- Centrífuga, SIGMA modelo 2-4
- Cámaras de elusión
- Canastilla de calentamiento
- Recirculador

2) INSTRUMENTOS:

- Balanza analítica OHAUS, Analytical Standar
- Espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS. Lambda 2
- Microjeringa, 50 μ L y 100 μ L

3) REACTIVOS:

- Propanol, HPLC, J.T. Baker, Lote: K25625
- Hidróxido de sodio, RA, J.T. Baker, Lote: J78925
- Agua, Lote: Varios
- Acido clorhídrico, RA, MERCK, Lote: K25486245245
- Acido Acético, RA, MERCK, Lote: G45789348215
- Etanol, RA, J.T. Baker, Lote: L12378
- Metanol, HPLC, J.T. Baker, Lote: L45693
- Oxido de silicio, J.T. Baker, Lote: M080248
- Acetato de etilo, HPLC, J.T. Baker, Lote: K14786
- Clorhidrato de Ranitidina, USP CAT. 59830 Lote F
- Compuesto A relativo a Clorhidrato de Ranitidina, USP CAT. 59850, Lote G
- Compuesto B relativo a Clorhidrato de Ranitidina, USP CAT. 59860, Lote F-3
- Compuesto C relativo a Clorhidrato de Ranitidina, USP CAT. 59870, Lote G
- Clorhidrato de Ranitidina, HELM, Lote: 186052000
- Dioxano, RA, J.T. Baker, Lote: F75391
- Cianuro de metilo RA, J.T. Baker, Lote: H25486

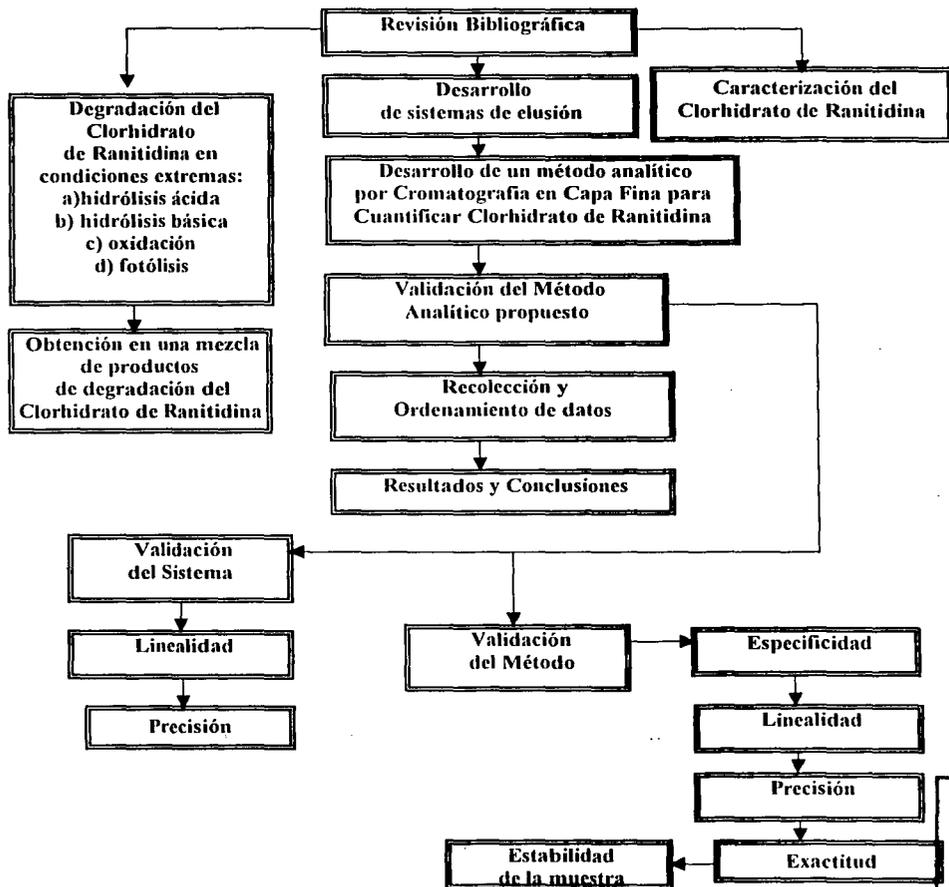
- Cloroformo RA, J.T. Baker, Lote: J12789
- DimetilFormamida (DMF), RA, J.T. Baker, Lote: H24865
- Hidróxido de amonio 25 %, RA, J.T. Baker, Lote: G48256
- Peróxido de hidrógeno, RA, J.T. Baker, Lote: L12396
- Óxido de silicio F₂₅₄, RA, J.T. Baker, Lote:SD45692

4) MATERIAL:

- Portaobjetos
- Matraces balón 50 mL (pyrex)
- Vasos de precipitado, 50, 100 y 250 mL (pyrex)
- Placas cromatográficas, 20x20 cm (MERCK, 25 DC-Alufolieno/kieselgel 60 F₂₅₄)
- Pipetas graduadas, 1, 5 y 10 mL (pyrex)
- Pipetas volumétricas, 5, 10 y 25 mL (pyrex)
- Soportes universal
- Tubos de ensayo 15 x 100 (pyrex)
- Gradilla metálica
- Pissetas
- Pinzas de tres dedos
- Perilla de seguridad
- Micropipetas 10, 20, 50 y 100 µL
- Refrigerante 24/40 (pyrex)
- Papel filtro (Whatman No. 1)
- Perlas de ebullición
- Papel glassine
- Pinzas metálicas
- Agitador magnético
- Papel seda
- Agitador de vidrio
- Espátula metálica.

VI. METODOLOGÍA

DIAGRAMA DE FLUJO



VI. METODOLOGÍA

1. CARACTERIZACIÓN DEL CLORHIDRATO DE RANITIDINA

Se realizó la caracterización del Clorhidrato de Ranitidina, de acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 7 ed., con las siguientes determinaciones:

1.1 Sustancias de referencia.

Clorhidrato de Ranitidina. Se secó durante 3 horas a 60°C, con vacío.

1.2 Descripción.

Polvo cristalino blanco o amarillo claro. El Clorhidrato de Ranitidina presenta el fenómeno de polimorfismo. Es sensible a la luz y a la humedad.

1.3 Solubilidad.

Fácilmente soluble en agua y metanol, muy soluble en etanol, poco soluble en cloruro de metileno.

1.4 Aspecto y color de la solución.

En un matraz volumétrico de 100 mL se disolvió 1.0 g de Clorhidrato de Ranitidina con agua libre de dióxido de carbono, se llevó a aforo con el mismo disolvente. La solución resultante es clara (MGA 0121, Método I) y no más colorida que la preparación de referencia BY 5 (MGA 0181) FEUM 7ª ed.

1.5 Ensayos de identidad.

A. MGA 0351. El espectro Infrarrojo de la dispersión de la muestra en bromuro de potasio exhibe máximos a las mismas longitudes de onda que los de una preparación similar de la Solución de Referencia del Clorhidrato de Ranitidina.

B. MGA 0361. El espectro Ultravioleta de una solución (1:100 000) exhibe dos máximos a las mismas longitudes de onda que una solución similar de la Solución de Referencia de Clorhidrato de Ranitidina y sus absorptividades a 229 nm y 315 nm calculados con referencia a la sustancia seca, no difieren en no más de 3.0 por ciento.

C. MGA 0511. Una solución de la muestra de Clorhidrato de Ranitidina da reacción positiva a las pruebas de identidad de cloruros.

1.6 Temperatura de fusión.

MGA 0471. Alrededor de 140°C con descomposición.

1.7 Pérdida por secado.

MGA 0671. No más de 0.75 por ciento. Se secó durante 3 horas a 60°C , con vacío.

1.8 pH.

MGA 0701. Entre 4.5 y 6.0. Se determinó en una solución 1:100.

1.9 Residuo de la ignición.

MGA 0751. No más de 0.1 por ciento.

1.10 Sustancias relacionadas.

MGA 0241. Capa Delgada.

Soporte: gel de sílice.

Preparación de la muestra: se preparó una solución en metanol que contenga 22.3 mg/mL.

Preparación de referencia: se disolvió una cantidad de la solución de referencia de Clorhidrato de Ranitidina en metanol para obtener una solución de 0.22 mg/mL.

Preparación de referencia diluidas. Se diluyó porciones de la preparación de referencia en metanol para obtener soluciones con concentraciones de 110 µg/mL (A), 66 µg/mL (B) y 11 µg/mL (C) respectivamente.

Preparación de Identificación: Se disolvió en metanol una cantidad de Clorhidrato de Ranitidina para obtener una solución con una concentración de 1 mg/mL

Procedimiento: Se aplicó por separado 10 µL de la preparación de la muestra, 10 µL de la preparación de referencia, 10 µL de las preparaciones de referencias diluidas A, B y C, y 10 µL de la preparación de identificación en la cromatoplaca. Además, se aplicó por separado 10 µL de la preparación de la muestra, y encima de esta mancha 10 µL de la preparación de solución de resolución. Se dejó secar las manchas y se eluyó las cromatoplasas en una mezcla de acetato de etilo-isopropanol-hidróxido de amonio-agua (26:15:15:1) hasta que el frente de la fase móvil avanzó 15 cm a partir del punto de aplicación, se marcó el frente del disolvente y se dejó secar al aire. En una cámara cerrada se expuso la placa con vapores de yodo, hasta que la cromatoplaca se reveló completamente. Se examinó la placa y se comparó las intensidades de cualquier mancha secundaria observada en la

cromatoplaça del carril de la preparación de la muestra, con las manchas principales de las cromatoplaças obtenidos con la preparación de referencia, preparación de referencia diluidas A, B y C y la preparación de identificación; los requisitos del sistema se cumplen si hay completa resolución entre las manchas obtenidas de la preparación de la muestra combinada con la preparación de resolución y si se observa una mancha en la cromatoplaça de la preparación de referencia diluida C. Si se observa una mancha en la cromatoplaça de la preparación de la muestra con un R_f correspondiente al de la mancha principal obtenida con la preparación de identificación, no debe ser mayor en tamaño o intensidad que la mancha principal obtenida con la preparación de referencia diluida A, y que corresponde a no más de 0.5 por ciento del compuesto relacionado B, y ninguna otra mancha en la cromatoplaça de la preparación de la muestra excede en tamaño o intensidad a la mancha principal producida por la preparación de referencia diluida B, 0.3 por ciento. La suma de las intensidades de todas las manchas secundarias obtenidas de la preparación de la muestra corresponde a no más de 1.0 por ciento.

1.11 Valoración.

MGA 0361. Precaución: proteger de la luz.

Se pesaron 50 mg de la muestra y se depositó en un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvió y llevó al aforo con agua desionizada. Se tomó una alícuota de 1 mL, se pasó a un matraz volumétrico de 50 mL y se llevó al volumen con agua desionizada. Se preparó de la misma forma la solución de referencia de Clorhidrato de Ranitidina. Estas soluciones contienen 10 µg/mL. Se determinó la absorbancia de las dos soluciones utilizando agua como blanco. Se calculó la cantidad en miligramos de Clorhidrato de Ranitidina, con la fórmula: $(A_m / A_{ref}) C$. En donde C. Es la concentración en miligramos por mililitro de Clorhidrato de Ranitidina en la preparación de referencia y A_m y A_{ref} son las absorbancias de la preparación de la muestra y de la preparación de referencia respectivamente.

1.12 Conservación.

En envases herméticos protegidos de la luz.

2. DESARROLLO DEL SISTEMA DE ELUSION

2.1 Pruebas de solubilidad.

Se colocaron 100 mg de Clorhidrato de Ranitidina o su equivalente y se adicionaron los siguientes disolventes, verificando su solubilidad teórica y experimental.

DISOLVENTES	$\epsilon_{(19)}$
Hexano	1.9
Benceno	2.3
Eter dietílico	4.3
Cloroformo	4.8
Acetato de Etilo	6.02
Ácido Acético	6.2
Propanol	18.3
Hidróxido de amonio	22.4
Etanol	24.3
Metanol	33.6
Dimetilformamida	38
Dimetilsulfóxido	48
Ácido Fórmico	58
Agua Destilada	80.4

Tabla V. Disolventes en los cuales se inició el desarrollo del sistema de elusión, de acuerdo a su solubilidad y polaridad.

De acuerdo a la solubilidad teórica reportada en las referencias, se probaron diferentes disolventes para buscar y desarrollar un sistema de elusión que separará cromatográficamente una muestra a analizar.

Se seleccionaron los mejores sistemas de elusión, obtenidos de la matriz de tratamientos anterior (mezclas de disolventes). Se evaluó preparando placas cromatográficas de 20 x 20, optimizando y ajustando el sistema elegido.

Se utilizaron los siguientes reveladores para seleccionar aquel que se considere más adecuado.

- Exposición a Luz Ultravioleta.
- Exposición a Vapores de Yodo
- Aspersión por Ácido Nítrico.

Se evaluaron los sistemas de elusión anteriores y el revelado de los cromatogramas correspondientes, pudiendo considerarse como los sistemas para las condiciones de elusión finales para la aplicación a nuestro método de análisis.

Una vez encontrado el sistema óptimo y el revelador más adecuado, se determinaron las condiciones finales, estandarizando y utilizando cromatoplasmas comerciales 20x20 cm (MERCK, 25 DC-Alufolieno/kieselgel 60 F₂₅₄). de sílica gel para el desarrollo del método de análisis.

3. DEGRADACIÓN DEL CLORHIDRATO DE RANITIDINA EN CONDICIONES EXTREMAS

Se realizaron una serie de reacciones en condiciones controladas, donde se sometió al Clorhidrato de Ranitidina a degradación por varias vías de reacción. Pudiendo obtener diferentes cantidades de productos de degradación:

i. Hidrólisis ácida.

Se pesaron 1500 mg aproximadamente de Clorhidrato de Ranitidina, se sometió y expuso a degradación por medio de una reacción con HCl 1 M. Esta reacción fue realizada bajo condiciones controladas, por medio de un reflujo durante 3 horas.

ii. Hidrólisis básica.

Se pesaron 1500 mg aproximadamente de Clorhidrato de Ranitidina, se sometió y expuso a degradación por medio de una reacción con NaOH 1 M. Esta reacción fue realizada bajo condiciones controladas, por medio de un reflujo durante 3 horas.

iii. Fotólisis.

Se pesaron 1500 mg aproximadamente de Clorhidrato de Ranitidina, se sometió y expuso a la luz artificial y solar, dicha reacción fue realizada bajo condiciones ambientales de laboratorio durante un periodo de tiempo de 15 días consecutivos

iv. Oxidación.

Se pesaron 1500 mg aproximadamente de Clorhidrato de Ranitidina, se sometió y expuso a una reacción con agua, aire y humedad (ó iones que fomentarán la autooxidación), dicha reacción fue realizada bajo condiciones ambientales durante un periodo de tiempo de 15 días consecutivos

3.1 OBTENCIÓN DE UNA MEZCLA DE PRODUCTOS DE DEGRADACION DEL CLORHIDRATO DE RANITIDINA

La estabilidad del Clorhidrato de Ranitidina pudo ser probada por cuatro maneras diferentes: una serie de muestras fue colocada a 40°C/60% HR por 2 días y otro a 60° C/100% HR durante el mismo periodo de tiempo; el par de muestras restantes fueron sometidas a luz, colocando muestras durante 2 días. Se intentó provocar mayor degradación y a una muestra, sometiéndola a 80° C durante 14 días. El resultado fue la descomposición

de sus apariencia, pero no de su constitución molecular completa; al verificar por Espectroscopía Infrarrojo (IR) se pudo observar y demostrar la existencia de su molécula principal y activa. Analizando que únicamente se desprendieron algunos grupos funcionales como productos de degradación y que éstos a su vez experimentaron una nueva modificación.

4. DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA PARA CUANTIFICAR CLORHIDRATO DE RANITIDINA

Preparación de soluciones.

- **Solución estándar de Clorhidrato de Ranitidina.**

Se pesaron aproximadamente 100 mg de la muestra en un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvieron y diluyeron a volumen en una mezcla de disolventes agua:metanol (1:1). Se transfirió una alícuota de 100 µL de ésta solución a un matraz aforado de 10 mL y se llevó a volumen con la misma mezcla anterior.

- **Solución Muestra.**

Se pesaron aproximadamente 100 mg o el equivalente de la muestra en un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvieron y diluyeron a volumen con una mezcla de disolventes agua:metanol (1:1). Se transfirió una alícuota de 100 µL de ésta solución a un matraz aforado de 10 mL y se llevó a volumen con la misma mezcla anterior. Se agitó la mezcla constantemente. Se permitió que el contenido sedimentara y se filtró a través de un papel filtro Whatman No 1. Se pesó las muestras por duplicado.

- **Solución de diamina: (compuesto secundario ó compuesto "A").**

Se pesaron 12.5 mg de el compuesto relacionado al Clorhidrato de Ranitidina, denominado diamina o compuesto "A" en un matraz volumétrico de 100 mL. Se disolvieron y llevaron a volumen con mezcla de disolventes agua:metanol (1:1). Se mezcló y agitó bien.

Condiciones cromatográficas finales.

- **Cromatoplaça.**

Silica gel 60F₂₅₄, de 20 x 20 cm, 0.25 mm de espesor.

- **Fase Móvil.**

Acido acético : Etanol : Dimetilformamida : agua en proporción 30:20:2:2 por volumen, ó
Acido acético : Etanol : Dimetilformamida : agua en proporción 28:22:3:1 por volumen.

- **Cámara cromatográfica.**

Se permitió la presaturación de la cámara con los vapores de la fase móvil antes de su uso (la fase móvil no debe ser utilizada después de cuatro horas y solo debe ser utilizada en una ocasión en éste periodo de tiempo.

Paralelamente a la determinación de sustancias relacionadas por Cromatografía en Capa Fina, se comparó el R_f de la muestra con el del estándar de la cromatoplaça.

Si aparece una mancha en una posición de R_f menor al obtenido experimentalmente en una de las muestras, entonces el análisis debe ser repetido y la placa desarrollada inmediatamente después de la aplicación de la muestra, para determinar si la mancha en ésta posición es una impureza relativa al principio activo o ajena a él.

Desarrollo del método de análisis

A) Cada cromatoplaça comercial de sílica gel se le realizó un rayado o elaboración de carriles longitudinales de 2.0 cm de ancho por medio de una punta de grafito o plástico (de tal forma que se desprendiera la sílica de la placa al realizar el rayado sobre la misma). Cada carril ó división en la cromatoplaça es simulando elusiones independientes para cada carril.

B) Se realizaron las aplicaciones necesarias de las Muestras (Ranitidina materia prima y degradada), el Estándar y los productos de degradación A, B y C en los carriles respectivos, a una distancia de 2 cm del extremo de la cromatoplaça. Las aplicaciones se realizaron por duplicado.

C) La cromatoplaça fue desarrollada dentro de los primeros 20 minutos, después de la primera aplicación, para evitar la formación de ranitidina-fomaldehído en la cromatoplaça. Esta reacción produce eluatos con un valor de R_f relativo a la Ranitidina con un valor de R_f menor

D) Se aplicaron 20 μ L de la solución de diamina (compuesto "A") en la cromatoplaça en uno de los carriles por debajo de una aplicación de la muestra de Ranitidina. Esta aplicación fué para verificar la resolución de la cromatoplaça.

NOTA 1: Todas las aplicaciones de estándar y muestra fueron hechas tan rápidamente como fué posible, sin realizar el intento para minimizar el tamaño del punto de aplicación.

E) Se abrió la cámara cromatográfica y rápidamente se introdujo la cromatoplaça, se cerró la cubierta de la misma. Se permitió que el solvente se desplazara verticalmente por lo menos 15 cm (aproximadamente 1 hora) desde la aplicación. Se retiró la cromatoplaça de la cámara y se dejó secar.

F) Se observó la cromatoplaça bajo lámpara de luz Ultravioleta y se estimó la intensidad de la impureza principal o compuesto secundario "A" (diamina) más abundante e impurezas totales de la muestra comparado con el estándar.

G) Las manchas debidas a la Ranitidina y diamina en la aplicación deben de estar completamente resueltas (la diamina tiene un valor de R_f relativo a la Ranitidina de aproximadamente 1.1)

NOTA 2: Si las manchas no fueron completamente resueltas y visibles a la luz Ultravioleta, debe de repetirse el procedimiento, preparando nuevamente el sistema de elusión.

H) La aplicación y elusión de la muestra de Ranitidina degradada comprobó la existencia y confirmación de los productos de degradación A, B y C (así como otros compuestos) del Clorhidrato de Ranitidina. Marcando la mancha característica del compuesto de interés o compuesto primario.

I) Se observó y fragmentó de la cromatoplaça revelada, la parte o sección en donde se encontró la molécula activa, compuesto primario (mancha de la Ranitidina). Separando del fragmento de cromatoplaça anterior, la sílica gel.

J) La sílica gel separada, se sumergió en 5 mL de mezcla de disolventes agua/metanol (1:1), para separar la parte soluble eluida y muestras a cuantificar. Una vez separada la parte soluble, se llevó ésta a aforo a 10 mL.

K) Se virtió en tubos de ensaye para una posterior separación de la parte sólida. Centrifugando las muestras para realizar una sedimentación y decantar el sobrenadante, dejando en el fondo de cada tubo, la parte sólida de sílica gel.

L) La solución débilmente colorida, se agitó constantemente (homogeneizándola). Esta es la parte a cuantificar del compuesto primario (de la mancha de la Ranitidina).

M) Se realizó un análisis espectrofotométrico. Realizando primeramente, un "barrido" para verificar el intervalo y sus máximos de absorción en el espectro Ultravioleta.

N) Se reportaron resultados

O) Se validó el método.

La Cuantificación de impurezas.

No se realizó la cuantificación de impurezas. Pero si se procediera a realizarse, debe de efectuarse inmediatamente después de remover la cromatoplaca de una cámara de yodo. Se estimará la intensidad de cualquier otra mancha distinta al Clorhidrato de Ranitidina en las aplicaciones de las muestras, por referencia visual al estándar o por el uso de un scanner u otro equipo que nos ayude en la cuantificación.

5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

5.1 VALIDACIÓN DEL SISTEMA

a) LINEALIDAD DEL SISTEMA

Se determinó construyendo una curva de calibración (concentración contra respuesta medida) utilizando cinco niveles de concentración (80%, 90%, 100%, 110% y 120%) preparadas a partir de una misma solución patrón (con estándar primario) y haciendo el análisis por triplicado para cada nivel.

Se recomendó incluir la concentración seleccionada como el 100%.

Criterio de Aceptación

$$r^2 \cdot 0.98$$

$$r \cdot 0.99$$

$$m \approx 1$$

$$b \approx 0$$

$$CV \cdot 1.5\% \text{ (en cada nivel)}$$

b) PRECISIÓN DEL SISTEMA

Se determinó por un número suficiente de ensayos de alcuotas de una muestra homogénea (solución estándar de Clorhidrato de Ranitidina correspondiente al 100%) capaz de medirse estadísticamente, se recomendó seis ensayos. Las pruebas son independientes.

Criterio de Aceptación

$$CV \leq 1.5\%$$

5.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

a) ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO

Se determinó mediante el análisis en el intervalo de 200 a 400 nm, por duplicado de muestras de materia prima, materia prima degradada y placebos adicionados al nivel del 100%. Tanto para la materia prima como para los placebos adicionados se registraron las respuestas producidas a la longitud de onda de sus máximos de absorción.

Criterio de Aceptación

	Interferencias del placebo	Interferencias de Prod. de Degradación
Cromatografía en Capa Fina	No detectable	No detectable

Tabla VI. Criterio de aceptación de la prueba de especificidad en estabilidad.

b) LINEALIDAD DEL MÉTODO

A. Se prepararon placebos adicionados con cantidades conocidas de Clorhidrato de Ranitidina que incluyeron la concentración teórica de la sustancia y que estén por debajo y por arriba de ésta (mínimo tres niveles).

B. Se analizó cada nivel (o cada concentración), al menos por triplicado con el método propuesto.

Criterio de Aceptación

Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada

$$m \approx 1$$

$$b \approx 0$$

$$r^2 \geq 0.98$$

El Coeficiente de Variación cumplió con:

Método	Promedio de Recobro	C.V.
Cromatográfico	98 - 102 %	$\leq 2\%$

Tabla VII. Valor para el criterio de aceptación del método analítico.

c) PRECISION DEL MÉTODO

▪ REPETIBILIDAD AL 100%

Se determinó analizando repetidamente (por sextuplicado) una muestra homogénea del producto con la concentración al 100%, bajo las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

Criterio de Aceptación

El Coeficiente de Variación cumplió con:

Método	Promedio de Recobro	C.V.
Cromatográfico	98 - 102 %	≤ 2%

Tabla VIII. Valor para el criterio de aceptación del método analítico.

▪ REPRODUCIBILIDAD

Se analizó repetidamente (por triplicado) una muestra homogénea del producto, cercana al 100% de dos analistas en dos días diferentes.

Criterio de Aceptación

El Coeficiente de Variación cumplió con:

Método	Promedio de Recobro	C.V.
Cromatográfico	98 - 102 %	≤ 2%

Tabla IX. Valor para el criterio de aceptación del método analítico.

d) EXACTITUD

Se determinó de seis placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100% utilizando el método propuesto.

Criterio de Aceptación

El Coeficiente de Variación cumplió con:

Método	Promedio de Recobro	C.V.
Cromatográfico	98 - 102 %	≤ 2%

Tabla X. Valor para el criterio de aceptación del método analítico.

e) ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Se determinó mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de tres muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer durante un tiempo determinado de diferentes condiciones. Se almacenó las muestras analizadas bajo distintas condiciones (por ejemplo: temperatura, luz, etc.) durante un tiempo pre-establecido, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia. Se reanalizó bajo las mismas condiciones de operación, utilizando una solución de referencia recientemente preparada, para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido en el método analítico. La determinación fue efectuada por el mismo analista.

Criterio de Aceptación

La muestra es estable si el intervalo de confianza para la referencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto no exceda los siguientes porcentajes:

Método	C.V.
Cromatográfico	+/- 2%

Tabla XI. Criterio de aceptación para la estabilidad de la muestra analítica.

VII. RESULTADOS Y ANÁLISIS

1 CARACTERIZACIÓN DEL CLORHIDRATO DE RANITIDINA

Se consideró las pruebas aplicadas como control de calidad (FEUM 7ª ed.) mencionadas en el punto número VI.A para realizar la caracterización, conformando el siguiente certificado de análisis.

DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
Descripción	Polvo cristalino blanco o amarillo claro	conforme
Solubilidad	Fácilmente soluble en agua y metanol, muy soluble en etanol, poco soluble en cloruro de metileno.	conforme
Aspecto y color de la solución	La solución muestra resultante fue clara y no más colorida que la preparación de referencia.	conforme
Ensayos de Identidad	El espectro Infrarrojo de la muestra exhibe máximos a las mismas longitudes de onda que los de una preparación similar de la Solución de Referencia del Clorhidrato de Ranitidina.	Conforme (ver Fig. 9)
	El espectro Ultravioleta de una solución (1:100 000) exhibe dos máximos a las mismas longitudes de onda que una solución similar de la Solución de Referencia de Clorhidrato de Ranitidina y sus absorvidades a 229 nm y 315 nm calculados con referencia a la sustancia seca, no difieren en no más de 3.0 por ciento.	Conforme (ver Fig. 10)
	Una solución de la muestra de Clorhidrato de Ranitidina da reacción positiva a las pruebas de identidad de cloruros.	conforme
Temperatura de Fusión	Alrededor de 140° C, con descomposición	136 -138° C

Perdida por secado	No más de 0.75 por ciento.	0.22
pH	Entre 4.5 y 6.0. Se determinó en una solución 1:100.	5.7
Residuo de la Ignición	No más de 0.1 por ciento.	0.050
Sustancias Relacionadas	La suma de las intensidades de todas las manchas secundarias obtenidas de la preparación de la muestra corresponde a no más de 1.0 por ciento.	0.55
Valoración	Contiene no menos de 98.5% y no mas de 101 %	99.48

Tabla XII. Datos complementarios del punto VI.A Caracterización del Clorhidrato de Ranitidina.

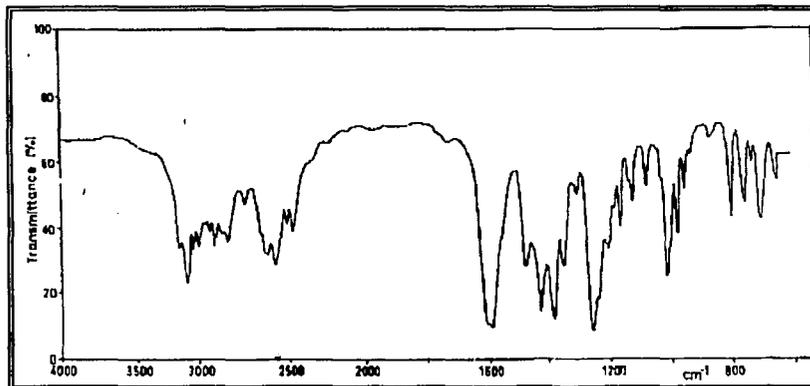


Fig. 9. Espectroscopia Infrarrojo (IR) del Clorhidrato de Ranitidina

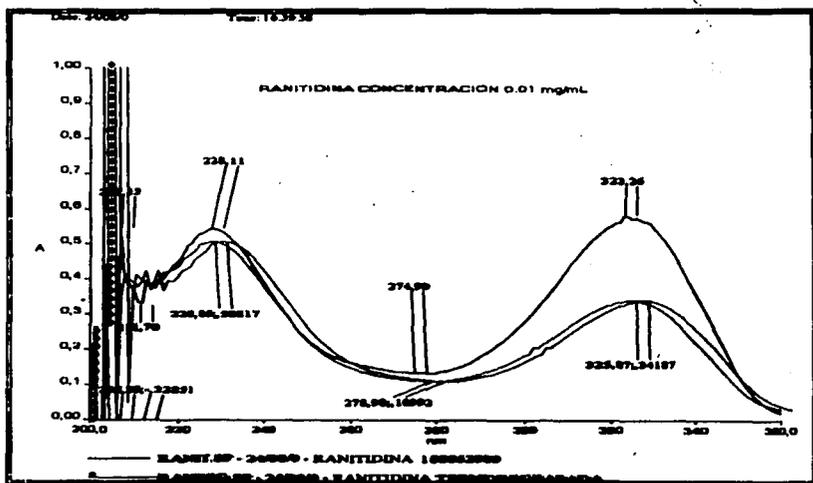


Fig. 10. Espectroscopía Ultravioleta (UV) del Clorhidrato de Ranitidina en MetOH/H₂O

2. DESARROLLO DEL SISTEMA DE ELUSIÓN

2.1 Pruebas de solubilidad.

Los resultados obtenidos de las pruebas de solubilidad del Clorhidrato de Ranitidina en los distintos disolventes y el grado de polaridad de éstos, apoyó en la selección del sistema de elusión.

Cantidad (mL)

DISOLVENTES	ϵ (39)	1	5	10
Hexano	1.9	-	-	-
Benceno	2.3	-	-	-
Eter dietílico	4.3	-	-	-
Cloroformo	4.8	-	-	-
Acetato de Etilo	6.02	-	-	-
Acido Acético	6.2	+++	++++	+++
Propanol	18.3	-	-	++
Hidróxido de amonio	22.4	-	-	-

TERCERA
 FALLA DE ORIGEN

Etolol	24.3	+	++	+++
Metanol	33.6	++	+++	+++
Dimetilformamida	38	-	-	-
Dimetilsulfóxido	48	-	-	-
Ácido Fórmico	58	+++	++++	++++
Agua Destilada	80.4	++++	++++	++++

Tabla XIII. Datos complementarios de la tabla V, disolventes en los cuales se inició el desarrollo del sistema de elusión, de acuerdo a su solubilidad y polaridad.

Donde:

- ++++ Muy Soluble
- +++ Fácilmente Soluble
- ++ Soluble
- + Difícilmente Soluble
- Insoluble

De acuerdo a la solubilidad experimental y lo descrito en la literatura, se probaron los disolventes con mejor respuesta, probando posteriormente éstos en posibles sistemas de elusión. Se buscó sistemas con diversos y numerosos disolventes, que aunque mostraron insolubilidad individualmente, ayudaron en la separación de las muestras a analizar.

Sistemas de disolventes teóricos (mL)

Sist.					R _f
[20]	EtOAc	MeOH	Et ₂ NH		0.50
	3	3	1		
[20]	CHCl ₃	n-PrOH	Et ₂ NH		0.44
	4	3	2		
[20]	Dioxano	MeOH	DMF		0.36
	6	3	2		
[20]	MeCN	MeOH	NH ₄ OH , 25%		0.64
	5	2	1		
[20]	EtOAc	MeOH	NH ₄ OH , 25%		0.73
	1	5	1		
[20]	EtOAc	n-PrOH	NH ₄ OH , 25%		0.39
	4	3	1		
[27]	EtOAc	n-PrOH	NH ₄ OH , 25%	H ₂ O	0.53
	25	15	4	2	
[14]	EtOAc	n-PrOH	NH ₄ OH , 25%	H ₂ O	0.51

[10]	25 EtOAc	15 n-PrOH	5 NH ₄ OH .25%	1 H ₂ O	0.44
	25	15	15	1	

Sistemas de disolventes experimentales (mL.)

Sist.	DMF	CH ₃ OOH	EtOH	CH ₃ OH	n-PrOH	AcOEt	NH ₃ OH	H ₂ O	R _f
A	2	30	20					2	0.53
B	3	20	30			5		1	
C	1	25	10				2	1	
D	3	25	20			10		1	
E	2		20		30		2	1	
F	1	30	10	2		10		2	
G	2	30	20					2	
H	0	28	22					4	
I	4	25	25					0	
J	3	20	30					1	
K		1		2	30	20	2		
L		2		1	5	20		1	
N		2		2	25	20	3		
N		2		3	25	20	3	1	
O		2		2	20	25		2	
P		3		2	20	25		2	
Q		4		2	20	25		2	
R	1	2	1	2	20	25	1	1	
S	1		2	2	20	25		1	
T	2	4			15	25	5	1	
U		4	2		15	25	3	3	
V	2	4	4		15	25		1	
W	1	3	1	1	15	25	4	2	
X	1	3	3	1	15	25		1	
Y		4	4		10	30	2	2	
Z	2		4		10	30	2	1	
AA		4	4		10	30		2	
AB	1	4	3	1	10	30	2	1	
AC			3	1	10	30		2	
AD	1	4	3	1	10	30	4	1	

Tabla XIV. Datos complementarios de la tabla VI de los sistemas de elusión experimentales

NOTA: Todas las mezclas de disolventes, se realizaron partiendo, modificando y alterando las proporciones o polaridades de algunos de ellos, reportadas en las referencias, tomando como criterio los R_f's resultantes.

Se seleccionaron los mejores sistemas de elusión, de acuerdo a la matriz de tratamiento anterior (mezclas de disolventes). Se evaluó preparando placas cromatográficas de 20 x 20, optimizando y ajustando el sistema elegido.

Disolventes (mL)			
CH ₃ COOH	CH ₃ CH ₂ OH	H ₂ O	DMF
30	20	2	2
28	22	3	1
25	25	0	4
20	30	1	3

Tabla XV. Datos complementarios de la tabla VII, sistemas de elusión con mejores resultados de separación.

Las placas se revelaron con luz Ultravioleta. La cromatoplaça eluida y posteriormente revelada presentó las siguientes características de separación y R_f.

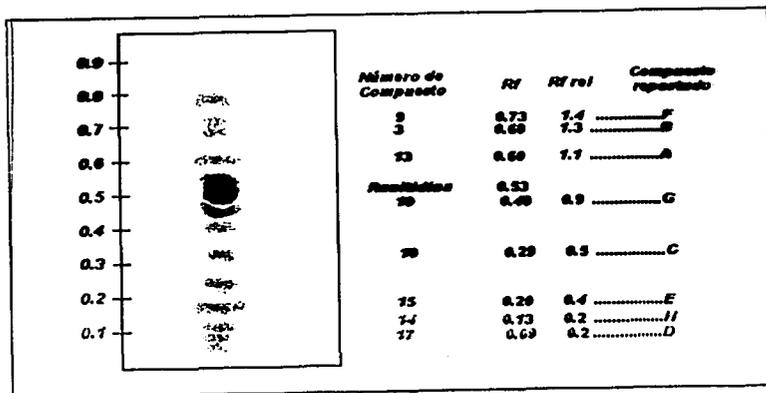


Fig. 11. Representación esquemática de la cromatoplaça en capa fina, donde se observan los productos de degradación, así como su valor de R_f característico de cada uno.

3. DEGRADACIÓN DEL CLORHIDRATO DE RANITIDINA EN CONDICIONES EXTREMAS.

Condición	Tiempo de exposición	Degradación	Apariencia	Núm de Prod. de degradación obtenidos
Hidrólisis ácida	3 horas	Cumple	Viscoso-pegajoso de color café oscuro o cenizo, cristales amorfos, fácilmente solubles en agua y metanol.	Más de 8
Hidrólisis básica	3 horas	Cumple	Sólido cristalino de color amarillo pálido con blancos, cristales amorfos, fácilmente soluble en agua y metanol.	Más de 8
Luz	15 días	No cumple	Sólido cristalino, de color amarillo pálido, con tonos marrón, polvos y aglomerados, gránulos amorfos, fácilmente soluble en agua y metanol.	Menos de 8
Humedad	15 días	No cumple	Sólido cristalino, de color amarillo pálido, con tonos marrón, polvos y aglomerados, gránulos amorfos, fácilmente soluble en agua y metanol.	Menos de 8

Tabla XVI. Datos complementarios de la tabla VIII. Condiciones de degradación aplicadas al Clorhidrato de Ranitidina.

4. OBTENCIÓN DE UNA MEZCLA DE PRODUCTOS DE DEGRADACION DEL CLORHIDRATO DE RANITIDINA

Muestras	Análisis inicial 1 ^{er} día	Análisis 1 3 ^{er} día	Análisis 2 8 ^{avo} día	Análisis 3 12 ^{avo} día	Análisis 4 15 ^{avo} día
Condición					
40°C/60%HR	+	+	++	+++	+++
60°C/100%HR	+	+	++	+++	+++
Luz	+	+	+	+	+
Ambiente	+	+	+	+	+
80°C	+	++	++	+++	++++

Tabla XVII. Cédula de estabilidad del Clorhidrato de Ranitidina

Donde: + + + + Muy Buena Degradación
 + + + Buena Degradación
 + + Suficiente Degradación
 + Deficiente Degradación

5. DESARROLLO DE UN METODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA PARA LA CUANTIFICAR CLORHIDRATO DE RANITIDINA.

Se pudo desarrollar y validar la metodología analítica deseada para la cuantificación de Clorhidrato de Ranitidina como control de calidad por Cromatografía en Capa Fina, mediante las condiciones y especificaciones del método de análisis.

6. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Evaluación del Sistema

LINEALIDAD

EXPERIMENTAL	TEORICA
CV = 0.068%	CV ≤ 1.5% en cada nivel
r = 0.989	r ≥ 0.99
r ² = 0.978	r ² ≥ 0.98
m = 0.0292139	m ≈ 1

$b=0.13733$ $I.C.= -1.89 \leq 0.1375 \leq 2.16$ Ecuación ajustada $A= 0.02921398C + 0.773993$	$b \approx 0$
--	---------------

PRECISIÓN

EXPERIMENTAL	TEORICA
CV = 0.379%	CV ≤ 1.5%

Evaluación del Método

ESPECIFICIDAD

EXPERIMENTAL	TEORICA
CUMPLE	ESPECÍFICO

LINEALIDAD

EXPERIMENTAL	TEORICA
$m=1.0006$ $I.C. \text{ para } m=0.75 \leq 1.006 \leq 1.245$ $b=-0.081$ $I.C. \text{ para } b=-1.83 \leq 0.08 \leq 1.75$ Ecuación ajustada $A= 1.0006647C + 0.0819662$ $r^2=0.999$ CV = 0.4793%	$m \approx 1$ $b = 0$ $r^2 \geq 0.98$ CV ≤ 2%

EXACTITUD

EXPERIMENTAL	TEORICA
CV = 0.8003% $I.C.=98.5039 \leq 99.1350 \leq 99.767$	CV ≤ 2%

REPETIBILIDAD AL 100%

EXPERIMENTAL	TEORICA
CV = 0.8003% $I.C.=0.497130 \leq 0.5285 \leq 1.95351$	CV ≤ 2%

REPRODUCIBILIDAD

EXPERIMENTAL	TEORICA
CV = 0.4466% $F_{\text{ente.}} \leq F_{\text{inhl. } 1-\alpha/2}$	CV ≤ 2%

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

EXPERIMENTAL	TEORICA
Intervalo de confianza	Intervalo de confianza
TA /24 hrs -0.2473<IC<0.0273	Debe de incluir el valor de cero para cualquier condición
TA /48 hrs -0.2685<IC<0.0145	
LUZ /24 hrs -30561<IC<0.24561	
LUZ /48 hrs -0.3096<IC<0.1896	
Factor I	Factor I
TA / 24hrs I=99.88% TA / 48hrs I=99.88% LUZ /24hrs I=99.97% LUZ /48hrs I=99.94%	98<I<102%%

6.1 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL SISTEMA

a) LINEALIDAD DEL SISTEMA

Nivel de Conc. (%)	Muestra (No.)	Conc. Agregada (µg/mL)	ABS (nm)	ŷ (mx+b)	yi-ŷ	(xi- \bar{x}) ²
80	1	11.976	0.487	0.4872	-2.00e ⁻⁰⁴	8.964
80	2	11.976	0.488	0.4872	8.00e ⁻⁰⁴	8.964
80	3	11.976	0.487	0.4872	-2.00e ⁻⁰⁴	8.964
90	4	13.473	0.530	0.5309	-9.00e ⁻⁰⁴	2.241
90	5	13.473	0.531	0.5309	1.00e ⁻⁰⁴	2.241
90	6	13.473	0.530	0.5309	-9.00e ⁻⁰⁴	2.241
100	7	14.970	0.573	0.5746	-1.60e ⁻⁰³	0
100	8	14.970	0.569	0.5746	-5.60e ⁻⁰³	0
100	9	14.970	0.569	0.5746	-5.60e ⁻⁰³	0
110	10	16.467	0.637	0.6184	0.0186	2.241
110	11	16.467	0.639	0.6184	0.0206	2.241
110	12	16.467	0.639	0.6184	0.0206	2.241

120	13	17.964	0.649	0.6621	-0.0131	8.964
120	14	17.964	0.653	0.6621	-9.10e ⁻⁰³	8.964
120	15	17.964	0.654	0.6621	-8.10e ⁻⁰³	8.964
blanco	16	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco

$$\begin{aligned}
 r &= 0.989825467 & \Sigma y &= 10.344 \\
 r^{2m} &= 0.978851851 & \Sigma y^2 &= 106.998336 \\
 b &= 0.137333333 & \Sigma xy &= 2787.29424 \\
 m &= 0.029213983 & S_y &= 0.05831665 \\
 \Sigma x &= 269.46 & S_y^2 &= 3.47e^{-03} \\
 \Sigma x^2 &= 72608.6916 & r_x &= 1.93261869 \\
 S_x &= 1.988648225 & r_y &= 3.735015 \\
 S_x^2 &= 3.954721765 & \underline{n} &= 15 \\
 \hat{y} &= 0.574666667 & x &= 14.97
 \end{aligned}$$

b Cálculo de ξ_i

$$\begin{aligned}
 & n \\
 \Sigma \xi_i &= \Sigma (y_i - \hat{y}_i) = 0.636659884 \\
 & i=1
 \end{aligned}$$

c Ecuación Ajustada

$$\begin{aligned}
 \hat{y} &= mx + b + \xi_i \\
 \hat{y} &= 0.0292113983x + 0.137333333 + 0.636659884 \\
 \bar{A} &= 0.02921398c + 0.773993214
 \end{aligned}$$

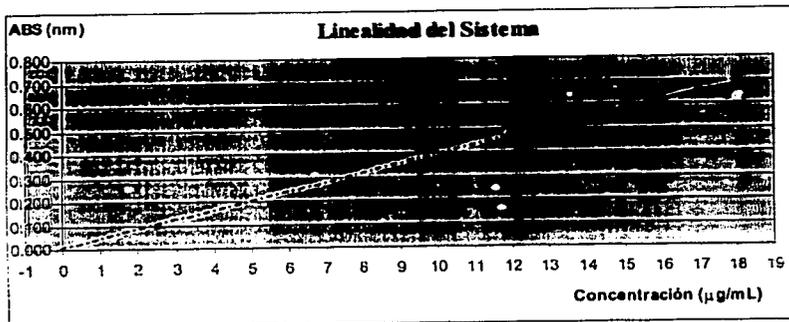


Fig. 12 Representación esquemática de la correlación entre Concentración-Absorbancia

d Evaluando la ordenada al origen

$$H_0: B_0 = 0$$

$$H_a: B_0 \neq 0$$

Estadígrafo de contraste "t" de student

$$t_{\text{calc.}} = \frac{b - B_0}{\hat{S}_{y/x} \sqrt{(1/n + \bar{x}^2 / ((n-1)(S^2_x))}}$$

$$t_{\text{calc.}} = \frac{0.1373333333}{\hat{S}_{y/x} \sqrt{(1/15 + 14.97^2 / ((14)(3.9547216))}}$$

$$t_{\text{calc.}} = \frac{0.1373333333}{2.028370213}$$

$$t_{\text{calc.}} = 0.067706082$$

Error típico

$$\hat{S}_{y/x} = \sqrt{\frac{n-1 (S_y^2 - m^2 S_x^2)}{n-2}}$$

$$\hat{S}_{y/x} = \sqrt{\frac{(15-1) (3.472941176 \text{ e}^{-3}) (0.029213983^2 \times 3.954721765)}{15-2}}$$

$$\hat{S}_{y/x} = 0.010260445$$

$$t_{\text{calc.}} = 0.067706082$$

$$t_{\text{tabl, } 0.975, 10} = 2.2281$$

$$t_{\text{calc.}} < t_{\text{tabl}} \quad 1 - \alpha/2 \quad \alpha = 0.05$$

$$0.067706082 < 2.2281$$

Por consiguiente, se acepta H_0 , comprobándose que la ordenada al origen es igual a cero, con un nivel de significancia de 0.05.

Intervalo de confianza

$$b \pm t_{1-\alpha/2} \left[S_{y/x} \sqrt{1/n + \bar{x}^2 / ((n-1)(S^2_x))} \right]$$

$$0.13733 \pm \left[\sqrt{1/15 + 14.97^2 / ((15-1)(3.954721765))} \right] =$$

$$0.1373333333 + 2.028370211$$

$$0.1373333333 - 2.028370211$$

$$-1.891037211 < 0.137333333 < 2.165703511$$

e Análisis de Varianza de la Regresión Lineal

Ho: la Absorbancia no depende de la Concentración.

Ha: la Absorbancia si depende de la Concentración.

Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F _{calc.}
Regresión	1	75.71532	75.71532	40.75808
Error de Regresión	13	24.149792	1.857676308	

Criterio de aceptación

$$F_{\text{tabl } 1-\alpha/2} = 6.41$$

$$F_{\text{calc}} < F_{\text{tabl } 1-\alpha/2} \quad \alpha = 0.05$$

$$40.75 > 6.41$$

Se rechaza Ho. Por consiguiente la Absorbancia depende linealmente de la concentración, con un nivel de significancia de 0.05

f Coeficiente de Variación

$$CV = (S_{y/x} / \bar{x}) \times 100$$

$$CV = (0.010260445 / 14.97) \times 100$$

$$CV = 0.068540046\%$$

b) 7.6.1.2 PRECISIÓN DEL SISTEMA

Muestra (No.)	Conc. Agregada ($\mu\text{g/ml}$)	ABS (nm)
1	15.01	0.567
2	15.01	0.571
3	15.01	0.573
4	15.01	0.568
5	15.01	0.569
6	15.01	0.570
7	blanco	blanco

a Coeficiente de Variación

$$S_y = 2.16024693e^{-03}$$
$$\bar{y} = 0.569666666$$

$$CV = (S_y / \bar{y}) 100$$

$$CV = (2.16025e^{-03} / 0.569666666) 100$$

$$CV = 0.379212451\%$$

De acuerdo al Coeficiente de Variación obtenido, se cumple con el criterio de precisión del sistema

6.2 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO

a) ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO

Se efectuó la elusión de las placas Cromatográficas en Capa Fina de las siguientes muestras:

- Estándar del Clorhidrato de Ranitidina (USP)
- Muestra de Clorhidrato de Ranitidina (MP)
- Muestra del Clorhidrato de Ranitidina y Excipientes (PLACEBO CARGADO)
- Muestra del Clorhidrato de Ranitidina en descomposición (TERMODEGRADADA)

Se evaluó que no hubiese respuesta del placebo y la muestra de Ranitidina termodegradada, en el rango de longitud de onda de 220 – 315 nm y que la Materia Prima de Clorhidrato de Ranitidina presentará la misma respuesta que la estándar.

NOTA 3: se consideran dos picos máximos de absorción en el espectro Ultravioleta (UV) para el Clorhidrato de Ranitidina (229 y 315 nm), siendo el pico máximo de 315 nm el más representativo de la existencia de su molécula activa y al no presentarse en muestras en calidad de descomposición.

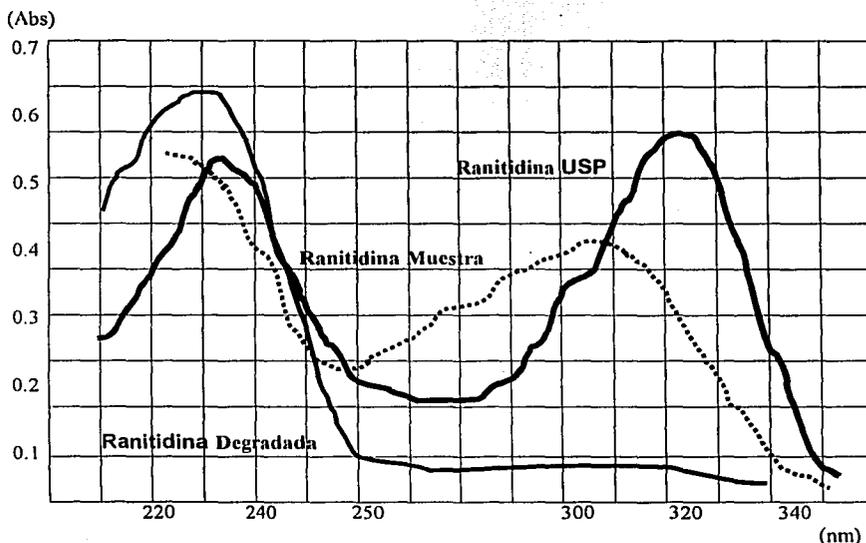


Fig. 12. Espectroscopia Ultra-Violeta (UV) del Clorhidrato de Ranitidina en MetOH/H₂O, donde se puede observar la comparación de las muestras de Clorhidrato de Ranitidina Muestra, estándar (USP) y Termodegradada

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

b) LINEALIDAD DEL MÉTODO

a

Nivel de Concentración (%)	Conc. Agregada (µg/mL)	Conc. Recuperada (µg/mL)	Porcentaje de Recobro (%)
80	11.95	11.83	99.04
80	11.97	11.88	99.29
80	12.02	11.95	99.49
90	13.44	13.43	99.94
90	13.50	13.45	99.69
90	13.48	13.40	99.46
100	15.01	14.98	99.82
100	15.03	14.98	99.69
100	14.98	14.82	98.96
110	16.45	16.43	99.90
110	16.51	16.45	99.69
110	16.57	16.48	99.48
120	17.95	17.84	99.42
120	18.01	17.95	99.70
120	18.03	17.95	99.59
blanco	blanco	blanco	blanco

Muestra (No.)	\bar{y}	$y_i - \bar{y}_i$	$(x_i - \bar{x})^2$
1	11.8759	-0.0459	9.2618
2	11.8959	-0.0159	9.1405
3	11.9460	4 E-03	8.8407
4	13.3669	0.0631	2.4128
5	13.4270	0.0230	2.2300
6	13.4069	-6.9 e ⁻⁰³	2.2901
7	14.9380	0.0420	2.777 e ⁻⁰⁴
8	14.9580	0.0220	1.344 e ⁻⁰³
9	14.9079	-0.0879	1.777 e ⁻⁰³
10	16.3789	0.0511	2.1218
11	16.4390	0.0110	2.3002
12	16.4990	-0.0190	2.4858
13	17.8799	-0.0399	8.7418
14	17.9400	0.0100	9.1002
15	17.9600	-0.0100	9.2213
16	blanco	blanco	blanco

$$r = 0.99940235$$

$$r^2 = 0.999680497$$

$$\Sigma y = 223.82$$

$$\Sigma y^2 = 5095.3924$$

$b = -0.08196628$	$\Sigma xy = 50337.118$
$m = 1.000664715$	$S_y = 2.208133881$
$\Sigma x = 224.9$	$S_y^2 = 4.87585523$
$\Sigma x^2 = 50580.01$	$\hat{y}^2 = 1.93261869$
$S_x = 2.206314531$	$\bar{x}^2 = 224.800044$
$S_x^2 = 4.86782381$	$n = 15$
$\hat{y} = 14.92133333$	$\bar{x} = 14.993333$

b Cálculo de ξ_i

$$\sum_{i=1}^n \xi_i = \Sigma (y_i - \hat{y}_i) = 7 e^{-4}$$

c Ecuación Ajustada

$$\hat{y} = mx + b + \xi_i$$

$$\hat{y} = 1.0006647x + (-0.0819662) + 7 e^{-4}$$

$$\bar{A} = 1.0006647c + -0.0819662$$

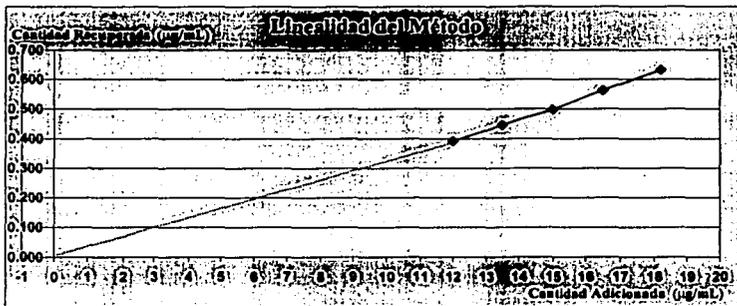


Fig. 13 Representación esquemática de la correlación este concentración-absorbancia

d) Prueba de hipótesis para la ordenada al origen

$$H_0: B_0 = 0$$

$$H_a: B_0 \neq 0$$

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Criterio de aceptación

$$|t_{\text{calc.}}| \leq t_{\text{tabl}} \quad 1 - \alpha/2 \quad \alpha = 0.05$$

$$t_{\text{calc.}} = 0.044680971$$

$$t_{\text{tabl } 0.975, 10} = 2.1604$$

Por consiguiente, se acepta H_0 , comprobándose que la ordenada al origen es igual a cero, con un nivel de significancia del 0.05

Intervalo de confianza

$$b \pm t_{1-\alpha/2} \left[\hat{S}_{y/x} \sqrt{1/n + \bar{x}^2 / ((n-1)(S^2_x))} \right] =$$

$$-0.0819668 \pm \left[\sqrt{1/15 + 224.800044 / ((15-1)(4.867823))} \right] =$$

$$-1.83447438 < -0.08196628 < 1.752507638$$

Estadígrafo de contraste "t" de student

$$t_{\text{calc.}} = \frac{b - b_0}{\hat{S}_{y/x} \sqrt{(1/n + \bar{x}^2 / ((n-1)(S^2_x))}}$$

$$g.l. = n-2$$

$$t_{\text{calc.}} = \frac{-0.81966289}{\hat{S}_{y/x} \sqrt{(1/15 + 224.800044 / ((14)(4.86678))}}$$

$$t_{\text{calc.}} = \frac{-0.081966289}{1.834478686}$$

$$t_{\text{calc.}} = -0.044680971$$

Error típico

$$\hat{S}_{y/x} = \sqrt{\frac{n-1 (S_y^2 - m^2 S_x^2)}{n-2}}$$

$$\hat{S}_{y/x} = \sqrt{\frac{(15-1) (4.87585523) - (1.000664715 \times 4.8678238)}{15-2}}$$

$$\hat{S}_{y/x} = 0.07186526$$

e Prueba de hipótesis para la pendiente

$$H_0: M_0 = 1$$

$$H_a: M_0 \neq 1$$

Criterio de aceptación

$$|t_{\text{calc.}}| \leq t_{\text{tabl.}, 1-\alpha/2} \quad \alpha = 0.05$$

Estadígrafo de contraste

$$t_{\text{calc.}} = m_0 - m_1 / \text{error típico} / \sqrt{n-1} (S_x)$$

$$t_{\text{calc.}} = 1.000664715 / 0.07186526 / \sqrt{13} (2.20631453)$$

$$t_{\text{calc.}} = 110.7665$$

$$t_{\text{tab.}, 0.975} = 2.160401$$

$$2.160401 \leq 110.7665$$

Se acepta H_0 , por lo tanto la pendiente es significativamente igual a uno, con un nivel de significancia de 0.05.

Intervalo de confianza

$$m \pm t_{\text{tab}} [(n-2)((\text{error típico}) / \sqrt{n-1}(S_x))]$$

$$m \pm 2.1604 [(13)((0.07186652) / \sqrt{14} (2.20631453))]$$

$$m \pm 0.244492035$$

$$0.75617267 \leq 1.000664 \leq 1.24515675$$

f Análisis de Varianza para la Regresión Lineal

H_0 : la cantidad recuperada no depende de la cantidad adicionada.

H_a : la cantidad recuperada si depende de la cantidad adicionada.

Fuente de Variación	g.L	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F _{calc.}
Regresión	1	47012.5393	47012.5393	40675.22
Error de Regresión	13	-256.83972	-19.756902	

Criterio de aceptación

$$F_{\text{calc}} \leq F_{\text{tabl } 1-\alpha/2} \quad \alpha = 0.05$$

$$40675.22 > 6.41$$

Se rechaza Ho, por consiguiente la cantidad recuperada depende linealmente de la cantidad adicionada, con un nivel de significancia de 0.05

g Coeficiente de Variación

$$CV = (S_{y/x} / \bar{x}) \times 100$$

$$CV = (0.07186526 / 14.9933) \times 100$$

$$CV = 0.479314868\%$$

Ya que el coeficiente de variación obtenido es menor del 1.5%, el método cumple con el criterio para linealidad.

c) PRECISIÓN DEL MÉTODO

• REPETIBILIDAD AL 100%

Muestra (No)	Porcentaje de Recobro (%)
1	98.77
2	99.64
3	100.35
4	100.53
5	98.77
6	98.95
7	blanco

$$\begin{aligned}\bar{x} &= 99.501666 \\ S_x &= 0.7964023 \\ n &= 6 \\ \tau_x &= 0.727012533 \\ \tau_x^2 &= 0.528547223 \\ S_x^2 &= 0.634256668\end{aligned}$$

a Coeficiente de Variación

$$\begin{aligned}S_x &= 0.7964023 \\ \bar{x} &= 99.501666\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}CV &= (S_x / \bar{x}) 100 \\ CV &= (0.7964023 / 99.501666) 100\end{aligned}$$

$$CV = 0.8003909 \%$$

b Prueba de hipótesis para repetibilidad

$$\begin{aligned}H_0 : \tau_0 &= 2.0 \% \\ H_a : \tau_0 &\neq 2.0 \%\end{aligned}$$

Criterio de Aceptación

$$\chi^2_{\text{calc.}} < \chi^2_{\text{tabl. } 0.975, 5} \quad \alpha = 0.05$$

Estadígrafo de contraste

$$\chi^2_{\text{calc.}} = (n-1)(S^2_x) / \tau^2_0$$

$$\chi^2_{\text{calc.}} = (6-1) 0.634256668 / (2)^2$$

$$g.l. = n-1$$

$$\chi^2_{\text{calc.}} = 0.792820835$$

$$\chi^2_{\text{tabl. } 0.975} = 12.832$$

$$0.792820835 < 12.832$$

Se acepta H_0 , por lo tanto la varianza no es significativamente diferente del 2%, con un nivel de significancia de 0.05

Intervalo de Confianza

$$\sqrt{\frac{(n-1) S^2_x}{\chi^2_{i \text{ tabl. } 1-\alpha/2}}} < \tau^2_i < \sqrt{\frac{(n-1) S^2_x}{\chi^2_{i \text{ calc. } 1-\alpha/2}}}$$

$$\sqrt{\frac{(6-1) 0.634256}{12.832}} < 0.52854 < \sqrt{\frac{(6-1) 0.634256}{0.831}}$$

$$0.497130168 < 0.5285 < 1.953515145$$

g.l. = *n*-1

• REPRODUCIBILIDAD

Datos	Porcentaje de Recobro	
	Días	
	1	2
analista 1	99.25	99.82
	100.31	99.83
	99.07	98.60
analista 2	99.41	100.7
	99.23	100.35
	99.58	99.47

Prueba de hipótesis

- a) Ho : no hay efecto del analista
Ha : si hay efecto del analista
- b) Ho : no hay efecto del día
Ha : si hay efecto del día
- c) Ho : no hay efecto del analista/día
Ha : si hay efecto del analista/día

Análisis de Varianza

ANDEVA				
Fuente de error	<i>g.l.</i>	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F _{calculada}
Analista	1	0.2914	0.2914	0.8462
Día	1	0.3040	0.3040	0.8828

Analista/Día	1	0.6030	0.6030	1.7511
Error Experimental	8	2.7547	0.34433	

Criterio de aceptación

$$F_{calc.} \leq F_{tbl. 1-\alpha/2}$$

Para :

Analista

$$F_{tbl.} = 647.8 \quad 0.9585 < 647.8 \quad \sim \text{Ho se acepta : no hay efecto del analista}$$

Día

$$0.5041 < 647.8 \quad \sim \text{Ho se acepta : no hay efecto del día}$$

$$F_{tbl.} = 647.8$$

Interacción

$$1.7511 < 6.72 \quad \sim \text{Ho se acepta : no hay efecto del analista/día}$$

$$F_{tbl.} = 6.72$$

Se observa que el método es reproducible, ya que no se presenta efecto del analista, de el día, ni de la interacción analista / día.

$$SC_A = \Sigma y^2_{i...}/dc - \Sigma y^2_{...}/adc \\ = 119123.8974 - 119123.606 = 0.2914$$

$$SC_D = \Sigma y^2_{.j}/dc - \Sigma y^2_{...}/adc = \\ = 119123.91 - 119123.606 = 0.304$$

$$SC_{AD} = \Sigma y^2_{ij}/c - \Sigma y^2_{i...}/dc - \Sigma y^2_{.j}/dc + \Sigma y^2_{...}/adc = \\ = 119124.8049 - 119123.8974 - 119123.91 + 119123.606 = 0.603$$

$$SC_E = \Sigma y^2_{ijk} - \Sigma y^2_{ij.} = \\ = 119127.5591 - 119124.8044 = 2.7547$$

donde :

j= día 1 ó 2

i=analista 1 ó 2

k=repeticiones 1 ó 3

$$\Sigma y_i^2 \dots / dc = 119123.8974$$

$$\Sigma y^2_{.j} / dc = 119123.91$$

$$\Sigma y^2 \dots / adc = 119123.606$$

$$\Sigma y^2_{ijk} = 119127.5591$$

$$\Sigma y^2_{ij} / c = 119124.8044$$

a Coeficiente de Variación

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

$$CV = (0.4443 / 99.475) 100$$

$$CV = 0.44667\%$$

d) EXACTITUD

Muestra (No.)	Porcentaje de Recobro (%)
1	99.84
2	99.60
3	98.46
4	99.30
5	99.60
6	100.17
7	97.66
8	98.29
9	99.30
10	blanco

$$\bar{x} = 99.1355$$

$$S_x = 0.821615955$$

a Coeficiente de Variación

$$CV = (S_x / \bar{x}) 100 \quad \text{en porcentaje de Recobro}$$

$$CV = (0.8216159550 / 99.1355) 100$$

$$CV = 0.8003\%$$

b Prueba de hipótesis para la exactitud

$$H_0 : \mu = 100$$

$$H_a : \mu \neq 100$$

Criterio de aceptación

$$|t_{\text{calc.}}| \leq t_{\text{tabl. } 1-\alpha/2}$$

$$t_{\text{calc.}} = (\bar{x} - 100) / S_x / \sqrt{n}$$

$$g.l. = n-1$$

$$t_{\text{calc.}} = (99.1355 - 100) / 0.821615955 / \sqrt{9}$$

$$t_{\text{calc.}} = -3.156584268$$

$$t_{\text{tabl. } 0.975, 8} = 2.306$$

$$-3.1565842 < 2.306$$

Se acepta H_0 , por consiguiente la media no es significativamente diferente del 100% con un nivel de significancia de 0.05

Intervalo de Confianza

$$\bar{x} \pm t_{\text{tabl.}} (\sqrt{S_x} / n) =$$

$$99.1355 \pm 2.306 (0.821615955 / \sqrt{9}) =$$

$$98.5039512 < 99.1350 < 99.7670$$

e) ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Temperatura Ambiente

INICIAL	TA/24hrs	TA/48hrs
100.11	99.97	99.95
99.98	99.89	99.87
100.12	100.02	100.01

El porcentaje de recobro del Clorhidrato de Ranitidina en mezcla de disolventes metanol:agua (1:1) de cantidades adicionadas, a temperatura ambiente en diferentes días.

$\hat{y}_0=100.07$	$\hat{y}_1=99.96$	$\hat{y}_2=99.94$
$S^2_0=6.1E^{-03}$	$S^2_1=4.3e^{-03}$	$S^2_2=4.93e^{-03}$

Varianzas Ponderadas

$$S_p^2_1 = \frac{2S^2_0 + 2S^2_1}{2(c+1)}$$

$$S_p^2_2 = \frac{2S^2_0 + 2S^2_2}{2(c+1)}$$

$$S_p^2_1 = \frac{2(6.1e^{-03}) + 2(4.3e^{-03})}{2(2+1)} = 3.466e^{-03}$$

$$S_p^2_2 = \frac{2(6.1e^{-03}) + 2(4.93e^{-03})}{2(2+1)} = 3.676e^{-03}$$

Intervalo de Confianza

Para Temp. Ambiente / 24 horas

$$(\hat{y}_1 - \hat{y}_0) \pm t_{\alpha} \sqrt{S_p^2_1 (2/3)}$$

$$(99.96 - 100.07) \pm 1.286 \sqrt{(3.46e^{-03})(2/3)}$$

$$-0.11 + 0.1373 = 0.273$$

$$-0.11 - 0.1373 = -0.2473$$

Por lo tanto la muestra es estable a condiciones ambientales de temperatura durante 24 horas, ya que el intervalo de confianza incluye el valor cero.

Para Temp. Ambiente / 48 horas

$$(\hat{y}_1 - \hat{y}_0) \pm t_{\alpha} \sqrt{S_p^2_1 (2/3)}$$

$$(99.94 - 100.07) \pm 1.286 \sqrt{(3.67e^{-03})(2/3)}$$

$$-0.127 + 0.1415 = 0.0145$$

$$-0.127 - 0.1415 = -0.2685$$

Por lo tanto la muestra es estable a condiciones ambientales de temperatura durante 48 horas, ya que el intervalo de confianza incluye el valor cero.

Luz

INICIAL	TA/24hrs	TA/48hrs
100.11	100.08	100.02
100.01	99.98	99.95
99.82	99.80	99.81

El porcentaje de recobro del Clorhidrato de Ranitidina en mezcla de disolventes metanol:agua (1:1) de cantidades adicionadas, a temperatura ambiente en diferentes días.

$\bar{y}_0=99.98$	$\bar{y}_1=99.95$	$\bar{y}_2=99.92$
$S^2_0=0.0217$	$S^2_1=0.0201$	$S^2_2=0.0126$

Varianzas Ponderadas

$$S_{p1}^2 = \frac{2S_0^2 + 2S_1^2}{2(c+1)}$$

$$S_{p2}^2 = \frac{2S_0^2 + 2S_2^2}{2(c+1)}$$

$$S_{p1}^2 = \frac{2(0.0217) + 2(0.0201)}{2(2+1)} = 0.01393$$

$$S_{p2}^2 = \frac{2(0.0217) + 2(0.0126)}{2(2+1)} = 0.011433$$

Intervalo de Confianza

Para Luz / 24 horas

$$(\bar{y}_1 - \bar{y}_0) \pm t_{\alpha} \sqrt{S_{p1}^2 (2/3)}$$

$$(99.95 - 99.98) \pm 1.286 \sqrt{(0.01393)(2/3)}$$

$$-0.03 + 0.27561 = 0.24561$$

$$-0.03 - 0.27561 = -0.30561$$

Por lo tanto la muestra es estable a condiciones ambientales de luz durante 24 horas, ya que el intervalo de confianza incluye el valor cero.

Para Luz / 48 horas

$$(\bar{y}_1 - \bar{y}_0) \pm t_{\alpha} \sqrt{S_p^2 \cdot 1 (2/3)}$$
$$(99.92 - 99.98) \pm 2.86 \sqrt{(0.01143)(2/3)}$$
$$-0.06 + 0.2496 = 0.1896$$
$$-0.06 - 0.2496 = -0.3096$$

Por lo tanto la muestra es estable a condiciones ambientales de luz durante 48 horas, ya que el intervalo de confianza incluye el valor cero.

Factor I.

Para Temperatura Ambiente / 24 horas

$$I_1 = y_4 / y_1 \times 100 = 99.97 / 100.11 \times 100 = 99.86$$
$$I_2 = y_5 / y_2 \times 100 = 99.89 / 99.98 \times 100 = 99.90$$
$$I_3 = y_6 / y_3 \times 100 = 100.02 / 100.12 \times 100 = 99.90$$
$$\bar{I} = \sum I / N \quad \bar{I} = \frac{99.86 + 99.90 + 99.90}{3} = 99.88\%$$

La media del Factor I debe de tener un valor entre 97-103% para que la muestra sea estable. Por lo tanto la muestra es estable en condiciones ambientales durante 24 horas, ya que el valor de la media para el factor I se encuentra entre 97-103% que es el criterio establecido para métodos cromatográficos.

Para Temperatura Ambiente / 48 horas

$$I_4 = y_4 / y_1 \times 100 = 99.98 / 100.11 \times 100 = 99.87$$
$$I_5 = y_5 / y_2 \times 100 = 99.87 / 99.98 \times 100 = 99.88$$
$$I_6 = y_6 / y_3 \times 100 = 100.01 / 100.12 \times 100 = 99.89$$
$$\bar{I} = \sum I / N \quad \bar{I} = \frac{99.87 + 99.88 + 99.89}{3} = 99.88\%$$

La media del Factor I debe de tener un valor entre 97-103% para que la muestra sea estable. Por lo tanto la muestra es estable en condiciones ambientales durante 48 horas, ya que el valor de la media para el factor I se encuentra entre 97-103% que es el criterio establecido para métodos cromatográficos.

Para Luz / 24 horas

$$I_7 = y_4 / y_1 \times 100 = 100.08 / 100.11 \times 100 = 99.97$$

$$I_8 = y_5 / y_2 \times 100 = 99.98 / 100.01 \times 100 = 99.97$$

$$I_9 = y_6 / y_3 \times 100 = 99.80 / 99.82 \times 100 = 99.97$$

$$I = \sum I / N \quad \bar{I} = \frac{99.97 + 99.97 + 99.97}{3} = 99.97\%$$

La media del Factor I debe de tener un valor entre 97–103% para que la muestra sea estable. Por lo tanto la muestra es estable en condiciones ambientales de luz durante 24 horas, ya que el valor de la media para el factor I se encuentra entre 97-103% que es el criterio establecido para métodos cromatográficos.

Para Luz / 48 horas

$$I_{10} = y_4 / y_1 \times 100 = 100.02 / 100.11 \times 100 = 99.91$$

$$I_{11} = y_5 / y_2 \times 100 = 99.95 / 100.01 \times 100 = 99.94$$

$$I_{12} = y_6 / y_3 \times 100 = 99.80 / 99.82 \times 100 = 99.97$$

$$I = \sum I / N \quad \bar{I} = \frac{99.97 + 99.91 + 99.94}{3} = 99.94\%$$

La media del Factor I debe de tener un valor entre 97–103% para que la muestra sea estable. Por lo tanto la muestra es estable en condiciones ambientales de luz durante 24 horas, ya que el valor de la media para el factor I se encuentra entre 97-103% que es el criterio establecido para métodos cromatográficos.

VIII. CONCLUSIONES

Se desarrolló y validó un método analítico alternativo y convencional para cuantificar Clorhidrato de Ranitidina por Cromatografía en Capa Fina para control de Calidad durante sus etapas de manejo y fabricación.

Mediante las condiciones establecidas se logró la satisfactoria separación de los compuestos de interés y de degradación, que demostraron ser extraídos con agua: metanol (1:1) y ser útil para obtener mejores resultados; considerando como condiciones finales, las establecidas en la metodología, con un sistema de elusión compuesto por Ácido acético : Etanol : Dimetilformamida : Agua en proporción 30:20:2:2 por volumen. Estas condiciones fueron las más adecuadas para llevar a cabo la cuantificación del principio activo en el sistema, por lo que el método es específico a productos de degradación.

El método analítico desarrollado cumplió satisfactoriamente con los parámetros de validación evaluados, es decir, es lineal, exacto, preciso y específico, por lo tanto, puede ser utilizado para el análisis de materia prima, producto a granel, producto terminado y para posteriores estudios de estabilidad, proporcionando un alto grado de confiabilidad en los resultados obtenidos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IX. SUGERENCIAS

- Aplicar todas las condiciones y factores que afecten el Clorhidrato de Ranitidina y verificar la diferencia entre muestras del mismo activo de la existencia de productos de degradación.
- Continuar con estudios e información referente a éste proyecto, para aplicar el siguiente como un método analítico indicativo de estabilidad para éste y otros activos de características semejantes.
- Buscar nuevos sistemas de elusión con características de polaridad semejantes.
- Someter por mayor tiempo y condiciones extremas al Clorhidrato de Ranitidina para alcanzar una degradación mayor, buscando un mayor número de compuestos de degradación ó los reportados teóricamente.
- Verificar que los compuestos de degradación están presentes únicamente en las condiciones críticas en proceso

X. REFERENCIAS

1. Casassas, E. et. al. Modern analytical chemistry. Ed. Reverté, S.A., Espana, 1980.
2. Skoog, D. Análisis Instrumental. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V., México, D.F., 1986.
3. Dolan W.J. "Gradient Elution Separation Problems", Liquid Chromatography-Gas Chromatography 5 /5/ (1987) 387-88.
4. Gaxiola, V.; Soto, A., Cromatografía, Principios y Técnicas. Ed. El Manual Moderno S.A., México 1975. Pp 40-48.
5. Pavia, D., Lampman, G.M., Kriz G.S., Engel, R.G. Introduction to Organic Laboratory Techniques. A Microscale Approach. Sanders College Publishing, 2nd Ed. U.S.A. 1995. Pp. 754-768.
6. Kumar V.; Sunder N.; Potdar A. "Critical Factors in Developing Pharmaceutical Formulations An Overview, Part I" Pharmaceutical Technology 16 (3):94-102 (1992).
7. Kumar V.; Sunder N.; Potdar A. "Critical Factors in Developing Pharmaceutical Formulations An Overview, Part I" Pharmaceutical Technology 16 (4):86-92 (1992)
8. Valadés M.M.; Oliviera G.H. "Estabilidad de Medicamentos" Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas 1 (4): 19-26 (1969).
9. Ahlneck C.; Lundgren P. "Methods for the evaluation of solid state stability and compatability between drug and excipient" Acta Pharmaceutica Suecica 22 (6): 305-313. (1985).
10. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 7^a ed. México, 1999. Pp. 1586-1591
11. Gordon, G., J. Chromatogr. 47, 269-271. U.S.A. (1970).
12. Murray, J, Gordon, G.; J. Chromatogr. 107, 67-72. U.S.A. (1975).
13. Abbott, D.; Andrews, R.S., Introducción a la Cromatografía. 3ra ed. Ed. Alhambra, S.A., Espana, 1977. Pp. 51-60.
14. United States Pharmacopeia 24th Revision, United States Pharmacopeia Convention, Rockville, 1999. Pag. 1710 - 1712.
15. Guía Oficial de Validación de Métodos Analíticos de la Dirección General de Control De Insumos para la Salud, S.S.A.
16. Guerra J. "Validation of Analytical Methods by FDA laboratories. Part I" Pharmaceutical Technology 10 (3): 74,76,77 (1986).
17. Current Concepts For The Validation of Compendial Assays. Pharmacopeia Forum. Mar - Apr. 1986.
18. Joy R. Miksic. Validation Procedures that test for Matrix Effects. J.C-GC. T0,4 (1992) 516-519.
19. Validación de Métodos Analíticos; S.S.A., A.F.M.; México, 1991.
20. Florey K. Analytical profiles of drug substances, Ed. Academic Press Inc., Vol. 15. EUA, 1986. Pp.535-560.
21. Smith, C.M.; Reynard, A.M.D. Farmacología. Ed. Panamericana. Argentina. pp 733-737 (1993).

22. Goodman and Gilmans. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Ed. Médica Panamericana. 8ª ed. México. 1991. Pp. 875-877.
23. Reiko, Makoto, et al. Effects of Temperature and Relative Humidity on the Solid-State Chemical Stability of Ranitidine Hydrochloride. Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol 82(6), 601-604, (1993).
24. Cartensen, J. Drug Stability, Principles and Practices. Marcel Dekker. New York, U.S.A.Inc. (1990) Pp. 140 - 156.
25. Litter, M.. Farmacología Experimental y Clínica 7a. El Ateneo. Argentina, 1424-25. (1988).
26. Remington J. Farmacia. 17 edición. Ed. Médica Panamericana S.A., Argentina. (1990). Pp 2001 - 2013.
27. European Pharmacopoeia. 3ª ed. Council of Europe Strasbourg. 1997 Pp. 1434-1435.
28. Clarke's. Isolation and Identification of Drugs. 2 edition Moffar. A., Editor. The Pharmaceutical Press. London. 635 (1986).
29. Valadez, P., Soberón, E., Validación de Métodos analíticos Químicos, Biológicos y Microbiológicos; Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C., Mayo, 1994.
30. Traisnel M. And Gayot A.T. Practice of validation, Drug Develop. Ind. Pharm. 21 (1) 1995: 79 - 91.
31. Huber L.; Buenas Prácticas de Laboratorio y Buenas Prácticas de Fabricación actuales. Conceptos Básicos de Cromatografía, electroforésis capilar y espectroscopía UV-Visible Hewlett-Packard Holanda, 1994 pp 54-64.
32. Lual. Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos. Pharma News. 4 , 7 (1993) 32-44.
33. Lual. Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos. Pharma News. 4 , 9 (1993) 24-25.
34. Lual. Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos. Pharma News. 4 , 10 (1993) 16-19.
35. Lual. Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos. Pharma News. 4 , 11 (1993) 26-28.
36. Budavari S., The Merck Index. 1 edition, Editor. Merck & Co., Inc. New Jersey, U.S.A.; 4210 (1989).
37. Wolters. Drug facts and comparisons. Ed. Sue Sewester Publisher. U.S.A. 1993. Pp. 1609-1610.
38. Lachman L. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy. 3rd edition. Lea & Febige. 1986. Philadelphia, U.S.A. (1986) Pp. 293 - 346
39. J. McMurry. Química Orgánica. Grupo editorial Iberoamericana S.A. de C.V. México D.F. 1994. Pp. 364 - 365

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

XI. ANEXOS

Descripción de enfermedades que se tratan con Ranitidina.

- **Úlcera duodenal.**

Pequeña lesión debido a la secreción nocturna de ácido y de la secreción estimulada por comidas y otros factores. Las úlceras duodenales suelen curar en 4 a 6 semanas de tratamiento, aunque a veces se necesitan 8 semanas. Alrededor del 10 % de los pacientes responden en este periodo y entonces la prolongación del tratamiento con antagonistas de H_2 es cuestionable. Aunque pueden obtenerse tasas similares de curación mediante la administración intensiva de antiácidos, los antagonistas de H_2 se administran en forma más conveniente y carecen de acciones pronunciadas sobre la motilidad intestinal. Después del tratamiento exitoso, las úlceras recurren en un año en alrededor del 50% de los pacientes, proporción que puede reducirse al 20% mediante la administración de dosis de mantenimiento de un antagonista de H_2 una vez por día, a la hora de acostarse [22].

- **Úlcera gástrica benigna.**

Pequeña lesión debido a la secreción nocturna de ácido y de la secreción estimulada por comidas y otros factores como medicamentos agresivos a la mucosa gastroduodenal. Los antagonistas de H_2 también aceleran la curación de las úlceras gástricas benignas; un tratamiento durante 9 semanas es suficiente para un 50 a 75% de los pacientes. La droga también reduce en forma acentuada la frecuencia de excedentes cuando se administra en dosis de mantenimiento a la hora de acostarse [22].

- **Síndrome de Zollinger-Ellison.**

Esta enfermedad es rápidamente mortal, debido a una hipersecreción de ácido y gastrina de un tumor secretante de células \square de los islotes pancreáticos; puede producir gastrina en cantidad suficiente como para estimular la secreción gástrica ácida, en niveles que comprometen la vida; los antagonistas de H_2 constituyen un tratamiento valioso. No obstante, se necesitan dosis muy elevadas de estos agentes, pudiendo no alcanzarse una supresión adecuada de la secreción ácida. Los inhibidores de la H^+ , K^+ -ATPasa de desarrollo más reciente parecen tener un valor particular en esta condición [22].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Glosario

\hat{y}	y ajustada
m	Pendiente
b	Ordenada al origen
ξ_i	Error experimental
y_i	Valor experimental de la y
n	Número de datos
t	"t" de student
Bo	Ordenada de la hipótesis (Bo = 0)
$\hat{S}_{y/x}$	Error típico de la estimación o desviación estándar de la regresión
\bar{x}	Media de x
S^2_x	Desviación estándar al cuadrado o varianza experimental
S^2_y	Desviación estándar al cuadrado o varianza de la y
g.l.	Grados de libertad
SC	Suma de cuadrados
MC	Media de cuadrados
S^2	Varianza experimental
τ_0	Varianza de hipótesis ($\tau_0 = 2$)
Mo.	Pendiente de hipótesis (Mo = 1)
μ	Media de hipótesis
Y_{ijk}	Variable de respuesta
$\bar{\mu}$	Media poblacional de la variable de respuesta
α_i	Efecto del analista en la variable de respuesta
$a_j(i)$	Efecto del día en la variable de respuesta
$\epsilon_{k(ij)}$	Error del método
α_{a_ji}	Efecto de la interacción día/analista en la variable de respuesta.
$n_i = \sum_{j=1}^J n_{ij}$	Número de observaciones por fila
$n_j = \sum_{i=1}^I n_{ij}$	Número de observaciones por columna
$N = \sum_{i=1}^I n_i = \sum_{j=1}^J n_j$	Número total de observaciones
$y_{ij.} = \sum_{k=1}^{n_{ijk}} y_{ijk}$	Suma de las observaciones de la casilla
$y_{i..} = \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^{n_{ijk}} y_{ijk}$	Suma de las observaciones de la fila
$y_{.j.} = \sum_{i=1}^I \sum_{k=1}^{n_{ijk}} y_{ijk}$	Suma de las observaciones de la columna

$y_{ijk} = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K y_{ijk}$	Suma de todas las observaciones.
i	Índice de fila
j	Índice de columna
k	Índice de la observación individual de una casilla
J	Número de columnas
I	Número de filas
\bar{y}	Media de y

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN