870127

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México

18
24

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Desarrollo Analítico para un Producto Farmacéutico de Administración Oral

TESIS PROFESIONAL

que para obtener el título de:

Químico Farmacéutico Biólogo

p r e s e n t a :

Modesto Ismael Miranda Nieto

Asesor: Q.F.B. Beatríz García Vázquez

Guadalajara, Jalisco 1986

UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

PAGINA

CAPITULO I
INTRODUCCION 1

CAPITULO II
GENERALIDADES 3

CAPITULO III
TRABAJO DESARROLLADO 16

CAPITULO IV
RESULTADOS EXPERIMENTALES 23

CAPITULO V
ANALISIS ESTADISTICO 25

CAPITULO VI
CONCLUSIONES 27

CAPITULO VII
BIBLIOGRAFIA 29

CAPITULO I

INTRODUCCION

INTRODUCCION

A través de los tiempos todas y cada una de las empresas que han logrado desarrollar tecnología con miras a un progreso inmediato y a futuro, han basado su forma de trabajo en un departamento escencial en su existencia ya que dicta las normas a seguir así como limita incluso la producción a obtener; es decir, el departamento de Control de Calidad.

En la actualidad no existe empresa que no destine parte de su presupuesto con fines a desarrollar métodos que mantengan la producción dentro de límites ya sea ordenados por organismos especializados o normados por la misma necesidad de -- producción.

La industria farmacéutica no escapa a esta necesidad de control y aún más, es-por su naturaleza en que la vida juega un importante papel- de las que más necesitan de un control - de calidad.

Por otro lado no es un secreto que la situación ecónomica de muchas de las empresas que se dedican a la producción - de fármacos no es precisamente de altas reservas; lo que hace necesaria una visualización muy a fondo de la metodología que se aplica en cada una de las fases de operación de la empresa y en especial del control de calidad. Debido a esta falta de capacidad económica, así como a la necesidad de mantener bajo estricto control la tarea de fabricar medicamentos, se requiere localizar, inventar, modificar y/o adaptar metodologías de control de calidad que cumplan con dos requisitos básicos: 1) que sean lo suficientemente confiables, seguros y precisos y 2) que su costo no sea excesivo en lo que se refiere a mano de obra, material de laboratorio, equipo y reactivos químicos.

El presente trabajo tiene la finalidad de obtener la se-

todología que nos permita desarrollar un análisis rutinario - de control de calidad que cumpliendo con los dos requisitos - anteriores, sea específico hacia el producto en cuestión, el cual, se presenta como una solución acuosa de vitaminas hidro solubles, un aminoácido y la presencia de una sal ferrosa; -- combinación que se encuentra en el mercado en una presenta--- ción oral y cuya dosificación es a base de gotas.

El trabajo experimental consistió en el desarrollo de - una serie de separaciones cromatográficas por capa fina para las vitaminas con sus posteriores valoraciones por medios espectrofotométricos; un método espectrofotométrico para la sal ferrosa; un método titrimétrico para el aminoácido y un análisis estadístico con el fin de enmarcar y probar las cualidades de repetibilidad y eficiencia de los métodos experimentales involucrados, así como la optimización de los mismos.

C A P I T U L O II

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

II.1. Cromatografía

II.2. Espectrofotometría

II.3. Titulaciones de Neutralización

II.4. Vitaminas

- 4.1. Clorhidrato de Tiamina
- 4.2. Clorhidrato de Piridoxina
- 4.3. Cianocobalamina

II.5. Monoclorhidrato de L-Lisina

II.6. Gluconato Ferroso

II.1. CROMATOGRAFIA

Grupo variado e importante de métodos de separación, que permiten separar, aislar e identificar componentes estrecha-- mente relacionados, presentes en una mezcla.

Se basan en que los componentes de una mezcla se trans-- portan a través de una fase estacionaria por medio de una fase móvil que fluye; las separaciones se efectúan por la diferencia de velocidad de migración entre los componentes de la muestra.

Los componentes que se desa separar deben ser solubles - en la fase móvil y además capaces de interaccionar con la fase estacionaria ya sea disolviéndose o adsorbiéndose en ella; según se trate de cromatografía de partición o de adsorción.

En la cromatografía de adsorción se lleva a cabo la sepa ración de sustancias basándose en las propiedades polares de las mismas, o sea, la capacidad para formar enlaces con la superficie del sorbente. La fase estacionaria en este caso puede ser: papel, sílica gel, alúmina, sílica gel- yeso, resinas de intercambio iónico...

En la cromatografía de partición la fase estacionaria es un líquido y el mecanismo de distribución es una partición entre ambas fases (líquido- líquido).

CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA

Técnica de cromatografía de adsorción o de partición en la que la fase estacionaria se encuentra depositada sobre una placa de vidrio u otro material, en forma de una capa fina y homogénea.

El grosor y la homogeneidad de la capa son factores muy importantes en la reproductibilidad de la técnica, por lo -- que, para compensar las variaciones producidas por factores no controlados, es conveniente usar en la misma placa un estándar al lado de la muestra.

Para la identificación de la muestra se utiliza un factor conocido como Rf, que es la relación entre la distancia de desplazamiento del soluto y la distancia de desplazamiento del disolvente;

$$R_f = \frac{\text{distancia de desplazamiento del soluto}}{\text{distancia de desplazamiento del disolvente}}$$

Para localizar las manchas de los diferentes componen-- tes de la muestra se hace uso de:

1.- Sustancias llamadas reveladores, por ejemplo: ninhidrina, tricloruro de antimonio.

2.- Calor: en estufa a 100 °C ; por ejemplo.

3.- Radiación de luz ultravioleta.

Esta técnica de cromatografía tiene una serie de cualidades que la hacen de gran utilidad como medio de separación, entre las cuales se encuentran:

a) Una gran variedad de fases estacionarias a elegirse

b) Tiempo de desarrollo muy corto

c) Los componentes separados pueden ser recuperados con gran facilidad

d) Una sensibilidad muy apreciable

e) Variabilidad en el grosor de la capa fina de acuerdo a las circunstancias de trabajo

f) Permite la utilización de medios de detección de condiciones extremas como: calor fuerte o agentes muy - corrosivos.

II.2. ESPECTROFOTOMETRIA

La meta de un análisis químico es proporcionar informa-- ción sobre la composición de una muestra de materia, lo que - se logra midiendo cierta propiedad física que se relaciona ca racterísticamente con el componente o los componentes de in- terés. Los métodos de análisis se clasifican normalmente se- gún la propiedad que se observa en el proceso de medición fi- nal, siendo los más importantes entre otros, los que a conti- nuación se mencionan:

METODO	PROPIEDAD QUE MIDE
Gravimétrico	Masa
Volumétrico	Volumen
Espectrofotométrico	Absorción de radiación
Espectroscopía de Emisión	Emisión de radiación
Turbidimetría	Dispersión de radiación
Refractometría	Refracción de radiación
Polarimetría	Rotación de radiación
Potenciometría	Potencial eléctrico

Absorción de Radiación.

Cuando pasa radiación por una capa de un sólido, líquido o gas, pueden eliminarse selectivamente ciertas frecuencias - por el proceso de absorción. La energía electromagnética es transferida a los átomos o moléculas y como resultado de ello estas partículas ascienden de su estado de más baja energía - (estado fundamental) a estados de más alta energía (estados - excitados).

Los átomos o moléculas excitados son de vida relativamente -- corta y después vuelven a su estado fundamental al cabo de - aproximadamente 10^{-8} seg y la energía es liberada, puede --

ser como calor; en otros casos la especie experimenta un cambio químico y en otras ocasiones emite la radiación como -- fluorescencia o fosforescencia.

La medición de absorción de radiación ultravioleta y visible proporciona un medio cómodo para el análisis de numerosas especies inorgánicas y orgánicas.

La radiación en estas regiones es de suficiente energía para causar transiciones electromagnéticas de los electrones de valencias externas.

Si la muestra se compone de átomos o moléculas simples en estado gaseoso, su espectro de absorción generalmente -- consta de una serie de líneas claras y bien definidas que corresponden al número limitado de transiciones electrónicas - permitidas. En contraste, los espectros de iones o moléculas en solución, ordinariamente contienen anchas bandas que surgen en parte por la superposición de cambios de energía - vibracional y a veces rotacional sobre las transiciones electrónicas.

Las bandas anchas son idealmente apropiadas para medi-- ciones cuantitativas precisas.

Aspectos cuantitativos de las mediciones de Absorción. En sus estudios muy tempranos Beer postuló que la reducción de energía radiante de un haz de radiación monocromática era proporcional a la intensidad o potencia del haz y a la cantidad de substancia absorbente situada en su trayectoria.

Estas hipótesis condujeron a la formulación de la Ley - de Beer que es la ley fundamental que rige la absorción de - todos los tipos de radiación electromagnética; se aplica no solo a soluciones, sino a gases y sólidos también, se conoce además como la Ley de Lambert-Beer o Ley Bouguer-Beer

$$\log P_0/P = \quad b\ c = A$$

El término logarítmico del lado izquierdo se llama Absorbancia (A), la constante se llama Absortividad molar - cuando la concentración c se expresa en moles de absorbente - por litro y b es la longitud de la trayectoria que se dá en centímetros. Cuando la concentración se expresa en otras unidades a la absortibidad se le dá el símbolo (a).

La ecuación nos indica que la absorbancia de una solu--- ción es directamente proporcional a la concentración de especies absorbentes cuando la longitud de la trayectoria luminosa (b) es fija y directamente proporcional a la trayectoria luminosa cuando la concentración es fija. La Ley de Beer, según la ecuación, no es directamente aplicable al análisis químico pues ni P, ni Pq pueden medirse fácilmente en el laboratorio porque la solución debe mantenerse en algún recipiente y es inevitable la acción entre la radiación y las paredes - produciendo una pérdida de potencia como consecuencia de re-- flexión o posiblemente de absorción, además el haz puede disminuir como resultado de dispersión por moléculas grandes o - falta de homogeneidad de la solución. Para corregir estos - efectos se compara la potencia del haz transmitido por la solución que nos interesa con la potencia de un haz que atraviesa un recipiente idéntico que contiene el disolvente de la - muestra, de esta manera la absorbancia experimental se aproxima mucho a la verdadera absorbancia.

La diferencia entre la absorción de radiación entre las regiones ultravioletas y visibles se encuentra en las longitudes de onda de radiación y en que en las mediciones en la región ultravioleta las soluciones pueden o no tener color y en la región visible las soluciones se colorean por medio de --- reactivos que forman con la muestra, la especie absorbente.

II.3. TITULACIONES DE NEUTRALIZACION

Las titulaciones de neutralización o ácido-básico, se clasifican generalmente como aquellas en la que el H_3O^+ en solución, se titula con OH^- o viceversa y esta clasificación se mantiene aunque en la reacción estén involucrados ácidos fuertes, bases fuertes, bases débiles, ácidos débiles, sales de ácidos débiles o sales de bases débiles.

Estas titulaciones pueden efectuarse en condiciones ordinarias de titulación volumétrica, empleando un indicador interno para localizar el punto de equivalencia de la titulación; también pueden efectuarse en condiciones potenciométricas.

Relación entre el volumen y la normalidad de soluciones reaccionantes; como un miliequivalente-gramo de un ácido se neutraliza exactamente con un miliequivalente-gramo de una base y viceversa; y dado que el número de miliequivalentes en cada caso se halla multiplicado el número de mililitros de solución por su normalidad, se puede dar una relación sensible entre las dos soluciones reaccionantes de la siguiente manera; (Na) (Va) = (Nb) (Vb).

Donde Na = Normalidad del ácido

Va = Volumen del ácido

Nb = Normalidad de la base

Vb = Volumen de la base

II.4. VITAMINAS

Son compuestos orgánicos necesarios en pequeñas cantidades para el metabolismo corporal, que no pueden ser fabricadas por las células del cuerpo.

Se almacenan en pequeñas cantidades en las células sobre todo en el hígado y su carencia puede causar enfermedades que en algunos casos son de gravedad.

Se dividen de acuerdo a sus propiedades de solubilidad - en Liposolubles (solubles en grasas) y las Hidrosolubles - (solubles en agua). Las vitaminas llamadas liposolubles - son: A, D, E, K; las hidrosolubles son: las del grupo B y la C.

Se mencionan algunas características de aquellas vitaminas que se encuentran presentes en nuestro problema.

II.4.1. VITAMINAS B_1 .

Conocida también bajo el nombre de Tiamina, en la formulación analizada se encuentra como Clorhidrato de Tiamina. - Su fórmula condensada es:

$C_{12} H_{18} Cl_2 N_4 O_5$

Propiedades. Se presenta como pequeños cristales blancos o polvo cristalino con leve olor a tiazol, de sabor amargo. Se descompone a una temperatura de 248 °C. Si se encuentra expuesta al aire absorbe rápidamente cerca de un 4% de - agua; comercialmente contiene un 11% de agua, la cual, es removible por secado a 100 °C o en vacío con ácido sulfúrico.

En forma seca la vitamina es estable y calentando a 100 °C por 24 horas no disminuye su potencia; en solución acuosa puede ser esterilizada a 110 °C pero si el pH de la solución está cercá de 5.5 se destruye rápidamente.

Solubilidad. Un gramo de vitamina se disuelve en cerca de un mililitro de agua, en 18 mls. de glicerol, 100 mls. de alcohol de 95%, 315 mls. de alcohol absoluto, es soluble en - metanol y prácticamente insoluble en éter, benceno, hexano y cloroformo.

Un gramo de vitamina B_1 cristalina es equivalente a --- 333,000 unidades internacionales (U. I.).

Incompatibilidad. Es destruída por álcalis y drogas alcalinas como el fenobarbital sódico y por agentes oxidantes y reductores; se precipita por taninos y por agentes que precipitan alcaloides como el reactivo de Mayer o el cloruro de - mercurio.

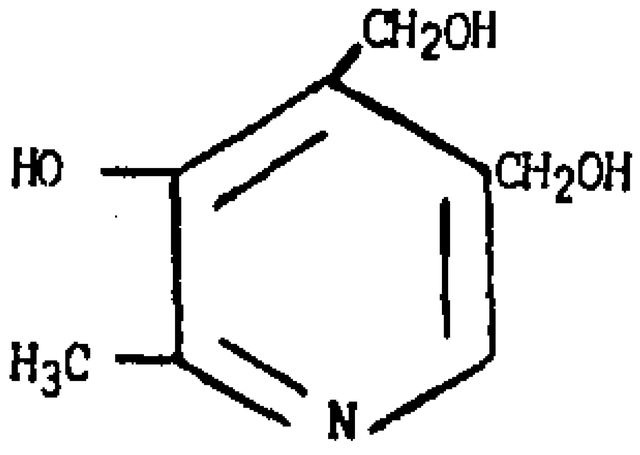
La deficiencia de esta vitamina en el organismo origina una menor utilización del ácido pirúvico y de algunos aminoácidos por los tejidos y una utilización mayor de las grasas. La utilización de glucosa por el sistema nervioso central puede estar disminuída hasta en 50% o 60% si esta vitamina es insuficiente causando serios perjuicios en el mismo. Otros síntomas que se manifiestan son: debilidad del corazón, músculos, estreñimiento intenso, indigestión, anorexia, atonía gástrica e hipocloridia; el cuadro global es conocido como "beri-beri" sobre todo cuando predomina los síntomas cardiovasculares.

Localización. Se encuentra en tejidos animales y vegetales, en granos de cereales, levadura, hígado, huevo, leche, - hojas verdes, raíces y tubérculos.

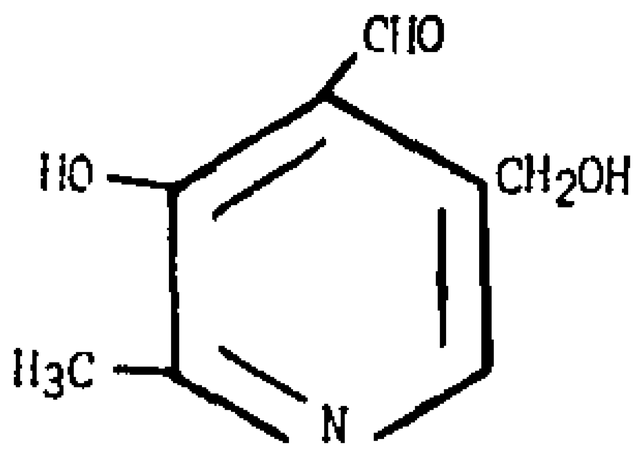
Requerimiento diario aproximado es de 1 a 2 miligramos.

11.4.2. Vitamina B_6

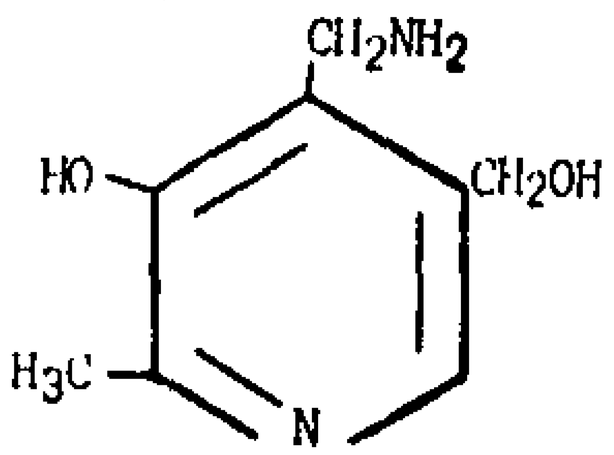
Tres son los grupos de piridoxina que tienen actividad - como vitamina, éstos son:



PIRIDOXINA



PIRIDOXAL



PIRIDOXAMINA

En nuestra formulación se encuentra como Clorhidrato de - Piridoxina, debido a que en farmacia sólo puede ser usado en - esta forma ya que es la más estable de las tres.

Propiedades. Se encuentra como cristales blancos o como polvo cristalino; es razonablemente estable a la luz y al aire; su temperatura de descomposición es entre 205 y 212 °C, mien-- tras que su punto de fusión es de 160 °C; soluciones acuosas - aciduladas son estables a temperatura ambiente y pueden ser ca lentadas por 30 minutos a 120 °C sin descomponerse.

Solubilidad. Un gramo de esta vitamina se disuelve en - cerca de 4.5 mls. de agua, en 90 mls. de alcohol, es soluble - en propilenglicol, algo soluble en acetona y es insoluble en - éter y cloroformo.

Un miligramo equivale a una U. I.

Incompatibilidad. Es destruída con soluciones alcalinas y luz ultravioleta.

Se considera escencial para la dehidratación y desulfi-- dración de aminoácidos y para el metabolismo normal del triptó fano, siendo requerida en la nutrición de todos los animales. Su carencia produce convulsiones, dermatitis y alteraciones -- tractogastrointestinales como náuseas y vómitos en los niños; sin embargo se considera que su deficiencia no es habitual.

Localización. Normalmente se presenta en las plantas, - en concentraciones bajas o medias en frutas y vegetales, en - concentraciones altas se localiza en granos como arroz, café y gérmen de trigo; así como en el salmón y el hígado. Requerimiento diario es aproximado a 3 miligramos.

II.4.3. VITAMINA B_{12}

Se conoce elementalmente por el nombre de Cianocobalamina y en esa presentación se encuentra en la formulación.

Propiedades. Se encuentra como unos cristales de color rojo oscuro o como polvo; es de carácter higroscópico muy alto; no tiene sabor y es inodoro; es muy inestable a la luz visible; oscurece a 210 - 220 °C.

Sus principales funciones son: a) estimulación del crecimiento y b) incremento de la vida media del glóbulo rojo.

. Solubilidad. Es ligeramente soluble en agua, 1 gramo en 80 mililitros, soluble en alcohol y es insoluble en acetona, cloroformo y éter.

Incompatibilidad. Se descompone en presencia de acacia, aldehídos, ácido ascórbico, sulfato y gluconato ferroso.

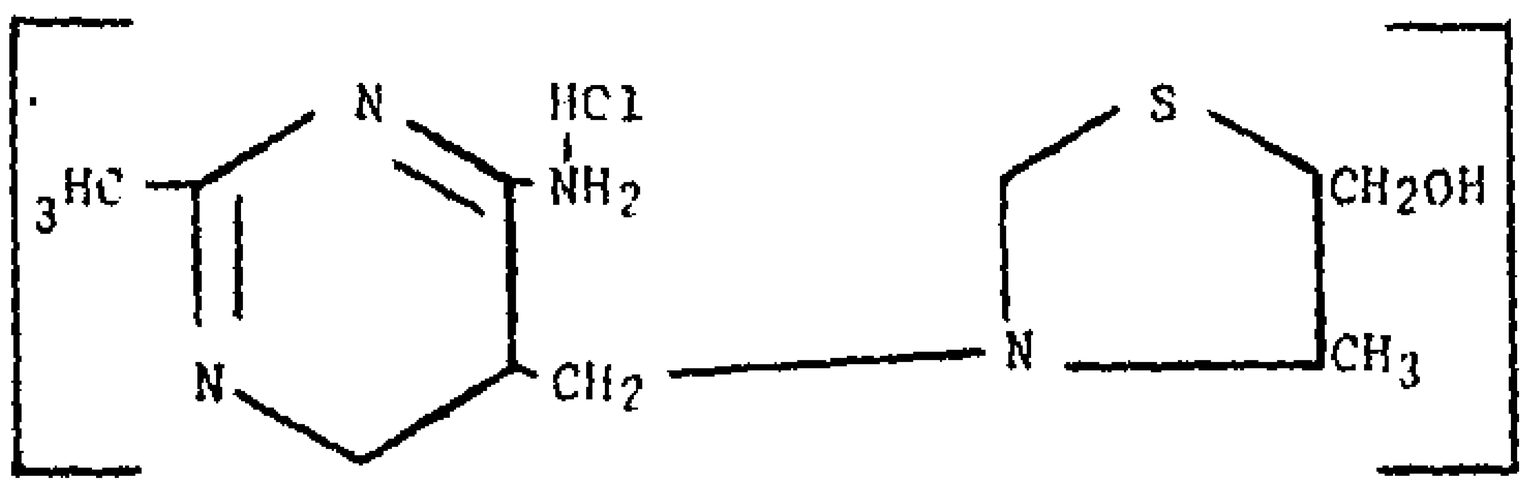
Su deficiencia puede producir desmielinización de las fibras nerviosas de gran calibre de la médula espinal, anemia - perniciosa; los casos de deficiencia son por lo general de absorción.

Localización. Se encuentra poco o muy poco en animales (localizándose en los órganos como hígado, riñón, corazón, - bazo, cerebro,...) también en huevo y leche.

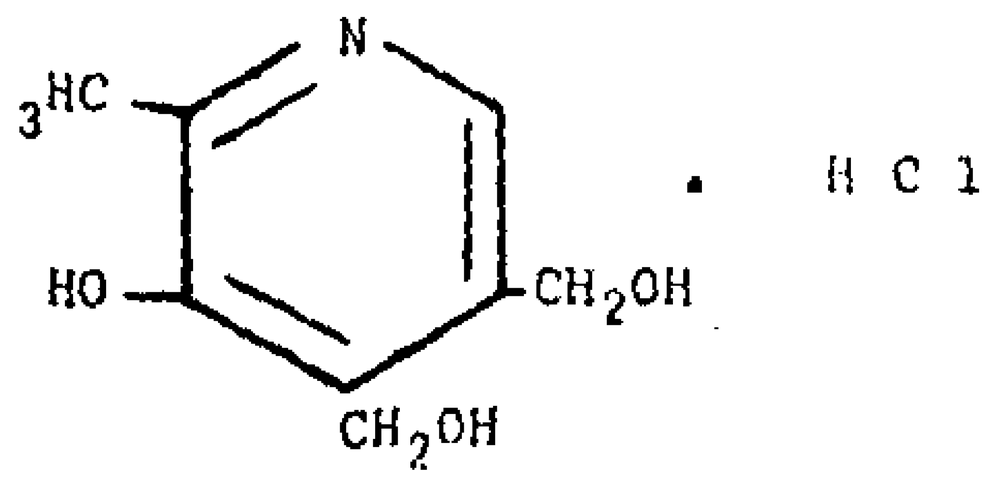
Requerimiento diario es de aproximadamente entre 1 y 5 - microgramos.

FORMULAS ESTRUCTURALES DE LAS VITAMINAS

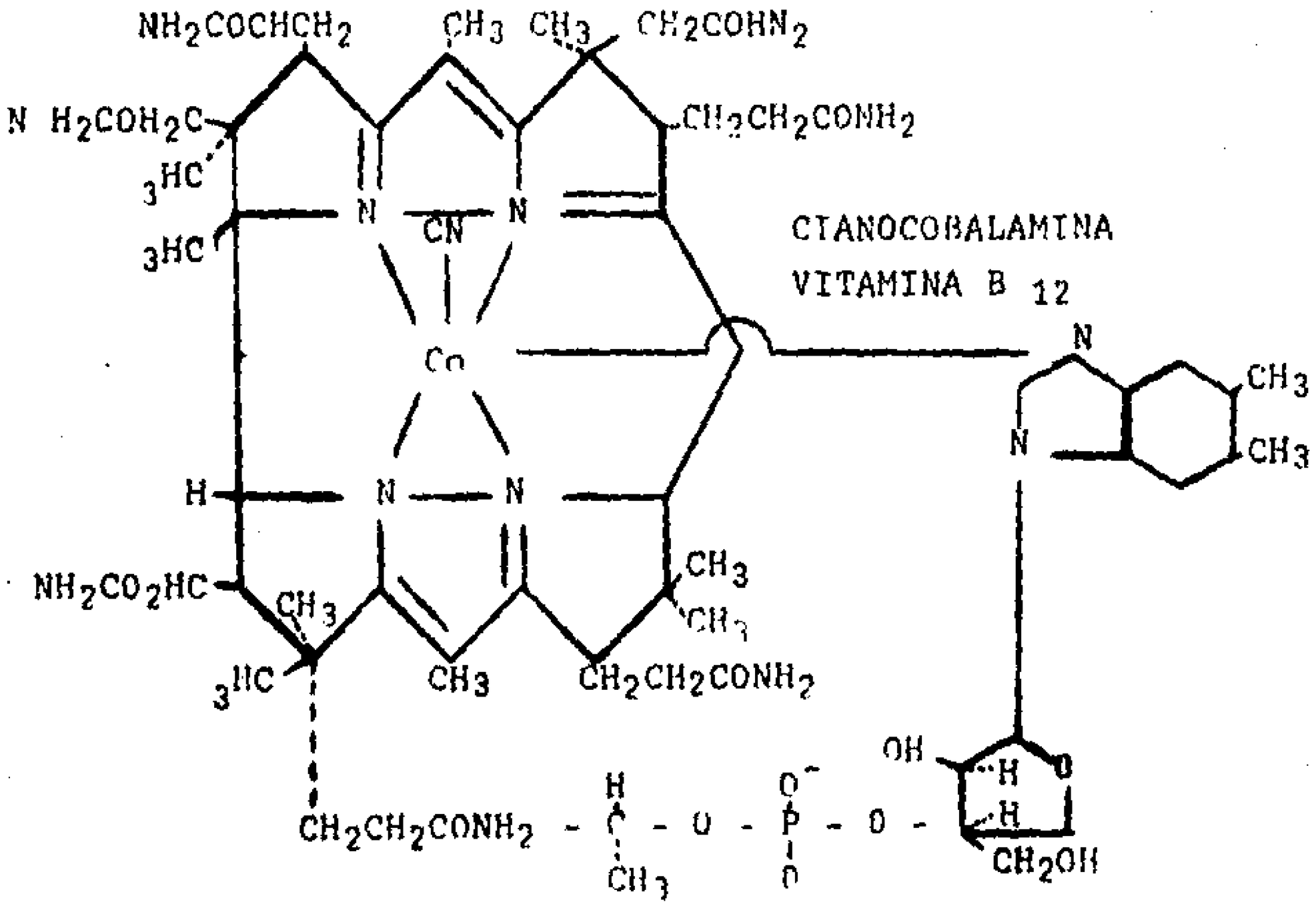
Fig. 1



CLORHIDRATO DE TIAMINA (VITAMINA B_1)



CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA (VITAMINA B_6)



CIANOCOBALAMINA
VITAMINA B_{12}

II.5. MONOCLORHIDRATO DE L-LISINA

Los aminoácidos son compuestos orgánicos caracterizados por tener simultáneamente una función ácida (radical carboxilo -COOH-) y una función básica (radical amino -NH2-). - Son sólidos cristalinos de carácter salino, solubles en agua formando un electrolito anfótero (ión dipolar). Presentan actividad óptica siendo generalmente levógiros y se obtienen por acción del amoniáco sobre los ácidos grasos halogenados y por hidrólisis con ácido clorhídrico, de las proteínas. Se - conocen 25 aminoácidos naturales que constituyen la estructura primaria de las proteínas. Uno de estos aminoácidos se encuentra en la formulación analizada el llamado: lisina.

Estructura química $C_6 H_{15} Cl N_2 O_2$

Propiedades. Es un aminoácido clasificado como escen--- cial no sintetizado por el cuerpo humano; se localiza como un polvo cristalino o blanco; tiene un punto de fusión de 260 °C aunque descompone a 224.5 °C. La solución acuosa al 10% tiene aspecto turbio, opalino y débilmente coloreada de amarillo. Sus funciones elementales conocidas son: a) ayudar a mante-- ner la función de los tejidos corporales y b) auxiliar en el crecimiento de los niños.

Solubilidad. Es muy soluble en agua y prácticamente insoluble en alcóhol y éter.

Fórmula estructural desarrollada

$$H_2N - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - \underset{\displaystyle NH_2}{CH} - COOH \quad . H C 1$$

PESO MOLECULAR = 146.19

II.6. GLUCONATO FERROSO

Minerales. En los organismos vivos pueden encontrarse una buena cantidad de elementos químicos, entre ellos escencialmente 13 de origen no metálico: C,H,O,N,S,P,Cl,Br,F,I, B,S,As; y 16 de tipo metálico: Ca,Mg,K,Na,Fe,Cu,Zn,Ni,Co,Mn, Al,Pb,Sn,Mo,V y Ti. De ellos los llamados macroelementos - se encuentran en cantidades mayores a un miligramo siendo estos: Ca,Mg,Na,K,P,S,Cl, y Fe; los demás se encuentran presentes en cantidades muy pequeñas del orden de los microgramos o picogramos por gramo de tejido húmedo.

Sales de Fe. El uso de las sales de fierro administradas por vías generales es para corregir o impedir las ane--- mias ferroprivas. En los alimentos el fierro existe pero no es fácilmente absorvible por el organismo, por otro lado la pérdida de fierro diaria es baja pero se aumenta en determinados estados como en el embarazo de la mujer. La anemia o depauperización del hierro de la hemoglobina se presenta también cuando existe pérdida de sangre como en la menstruación femenina y es común en los lactantes durante su primer año, y en el crecimiento dada la alimentación básica de leche -- (muy deficiente en fierro); por lo que se hace necesario administrar fierro en forma complementaria.

El fierro es administrado normalmente en forma de gotas o tabletas como sulfato de fierro, el cual, puede tener efectos colaterales como malestar gástrico, calambres y diarreas en forma ligera. Dado el contenido menor de fierro en su -- formulación el gluconato ferroso (contiene aproximadamente un 12% de fierro) se encuentra substituyendo en muchos medicamentos al sulfato (contiene un 30%) con el fin de corregir o disminuir los efectos secundarios ayudando a la tera-- péutica sobre todo en tratamientos largos.

II.6. GLUCONATO FERROSO

Minerales. En los organismos vivos pueden encontrarse una buena cantidad de elementos químicos, entre ellos escencialmente 13 de origen no metálico: C,H,O,N,S,P,Cl,Br,F,I, B,S,As; y 16 de tipo metálico: Ca,Mg,K,Na,Fe,Cu,Zn,Ni,Co,Mn, Al,Pb,Sn,Mo,V y Ti. De ellos los llamados macroelementos - se encuentran en cantidades mayores a un miligramo siendo estos: Ca,Mg,Na,K,P,S,Cl, y Fe; los demás se encuentran presentes en cantidades muy pequeñas del orden de los microgramos o picogramos por gramo de tejido húmedo.

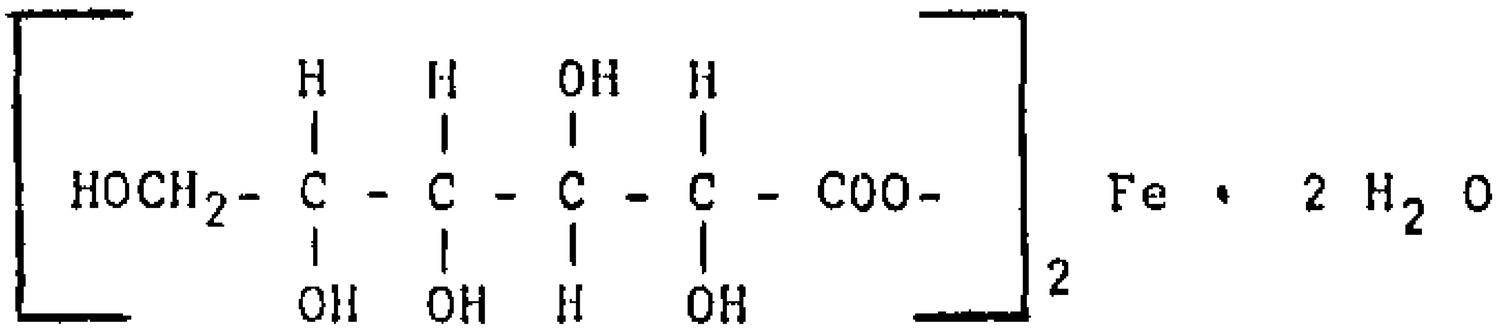
Sales de Fe. El uso de las sales de fierro administradas por vías generales es para corregir o impedir las ane--- mias ferroprivas. En los alimentos el fierro existe pero no es fácilmente absorvible por el organismo, por otro lado la pérdida de fierro diaria es baja pero se aumenta en determinados estados como en el embarazo de la mujer. La anemia o depauperización del hierro de la hemoglobina se presenta también cuando existe pérdida de sangre como en la menstruación femenina y es común en los lactantes durante su primer año, y en el crecimiento dada la alimentación básica de leche -- (muy deficiente en fierro); por lo que se hace necesario administrar fierro en forma complementaria.

El fierro es administrado normalmente en forma de gotas o tabletas como sulfato de fierro, el cual, puede tener efectos colaterales como malestar gástrico, calambres y diarreas en forma ligera. Dado el contenido menor de fierro en su -- formulación el gluconato ferroso (contiene aproximadamente un 12% de fierro) se encuentra substituyendo en muchos medicamentos al sulfato (contiene un 30%) con el fin de corregir o disminuir los efectos secundarios ayudando a la tera-- péutica sobre todo en tratamientos largos.

Gluconato Ferroso. Fórmula condensada:

$C_{12}\ H_{22}\ Fe\ O_{14} \cdot 2\ H_2\ O$

Fórmula desarrollada:



PESO MOLECULAR = 482.19

Propiedades. Se localiza como un polvo fino amarillo-gris o amarillo-verde pálido; o como gránulos; tiene ligero olor que recuerda al azúcar quemada o caramelo.

Solubilidad. Un gramo de gluconato ferroso se disuelve en cerca de 10 mililitros de agua con ligero calentamiento; es casi insoluble en alcohol y un poco soluble en glicerina. - Sus soluciones acuosas son afectadas estabilizadas por la - adición de glucosa. Es afectado por la luz y el ión ferroso lentamente oxidado a férrico si se expone al aire.

Farmacología. Es utilizado para el tratamiento de anemias por deficiencia de fierro ya que tiene como ventajas el ser eficiente y barato; la regeneración de la hemoglobina es -- comparable a la producida por el sulfato ferroso y según estudios realizados en animales se indica que es algo menos - tóxico que el sulfato en dosis equivalentes, lo que lo hace más seguro.

C A P I T U L O III

TRABAJO DESARROLLADO

III.1. Presentación de la formulación.

III.2. Separación cromatográfica de Vitaminas B_1 y B_6 .

III.3. Valoración de Vitaminas B_1 y B_6 .

III.4. Valoración del Monoclorhidrato de L-Lisina.

III.5. Valoración del Gluconato Ferroso.

III.6. Identificación de Cianocobalamina.

III.1. PRESENTACION DE LA FORMULACION

El desarrollo experimental se realizó en un producto comercial cuya fórmula es:

Por cada mililitro contiene ...

Vitamina B_1 (Clorhidrato de Tiamina) ..... 10 mg.

Vitamina B_6 (Clorhidrato de Piridoxina) ..... 5 mg.

Vitamina B_{12} (Cianocobalamina) ..... 5 mcg.

Monoclorhidrato de L-Lisina ..... 300 mg.

Gluconato Ferroso (equivalente a 4.34 mg. de Fe)..... 37.5 mg.

Además contiene: azúcar granulada, ácido cítrico, nipagin, nipasol, color moreno caramelo, esencia de durazno, escencia de naranja y agua destilada.

III.2. SEPARACION CROMATOGRAFICA DE VITAMINAS

Se prepararon placas de vidrio de 10 x 20 centímetros aplicando sobre ellas una capa de sílica gel de 0.5 mm. de espesor, se utilizó como sorbente sílica gel 60 HF 254 para las vitaminas.

Se saturó una cámara de cromatografía vertiendo sobre la misma el eluente elegido y dejando actuar sus vapores por espacio de 30 minutos como mínimo manteniendo perfectamente cerrada la cámara. Para la separación de las vitaminas se hicieron pruebas a varias mezclas de eluentes a fin de conocer y por ende utilizar, el más adecuado para el producto en cuestión.

En la tabla presentada a continuación se muestran los diferentes sistemas utilizados así como los Rf encontrados:

Tabla 1. Diferentes eluentes utilizados en la cromatografía - para vitaminas B_1 y B_6.

MEZCLAS DE ELUENTES	Rf de B_1	Rf de B_6
1. Cloruro de Sodio 10% - Agua	0,150	0,450
2. Acetato de Sodio 10% - Agua	0.100	0.550
3. Isopropanol - Hidróxido de Amonio 25% (94 ; 6)	0.000	0.493
4. Isopropanol - Isobutanol - - Agua (1 ; 1 ; 1)	0.000	0.660
5. Isopropanol - Hidróxido de Amonio 25% (95 ; 5)	0.000	0.420

De todas las mezclas probadas resultó ser la más apropiada la - mezcla de Isopropanol - Hidróxido de Amonio 25% en proporción - de 95 ; 5 (el sistema dió manchas compactas y bien definidas - sin muestras de arrastre en el desarrollo) con un tiempo de desarrollo promedio de 55 minutos. Se utilizó una lámpara de luz ultravioleta como detector.

III.3. VALORACION DE VITAMINAS

La cuantificación de las vitaminas se llevó a cabo en un espectrofotómetro de luz U.V. y V, Coleman 139 de Hitachi Perkin Elmer; precedida por una separación de las mismas de la sílica gel mediante la extracción con agua acidulada con ácido clorhídrico en proporción de 99 ; 1 ; el volumen utilizado para llevar a cabo la extracción fué de 5 mililitros. En seguida se procedió a agitar fuertemente en forma constante durante un tiempo de 3 minutos, al cabo de los cuales, se centriluga-- ron a 4000 R.P.M. por un tiempo de 5 minutos y se extrajo el - líquido sobrenadante para llevar a cabo las mediciones.

En el espectrofotómetro la vitamina B_1 se leyó a una longitud de onda de 246 nm. con una abertura de rejilla aproximada de 0.56; mientras que la vitamina B_6 se leyó a una longitud de onda de 290 nm. con abertura de rejilla aproximada de 0.58.

Fué conveniente preparar para cada una de las vitaminas, una curva de calibración con estándares que contenían diferentes concentraciones a fin de calcular los porcentajes en que - se encuentran en la muestra.

III.4. VALORACION DEL MONOCLORHIDRATO DE L-LISINA

Conocida es la propiedad de los amonoácidos de actuar como ácido o base, denominada anfoterismo; la cual, le permite una gran flexibilidad en las reacciones químicas. Sin embargo esta propiedad causa serios problemas en el momento en que - los aminoácidos deben ser valorados y se encuentran (como en el presente trabajo) en mezclas que contienen ácidos y bases. Por otro lado se ha notado que cuando los aminoácidos se di--- suelven en alcohol acuoso de 85 a 95%, el grupo carboxilo puede ser titulado en forma directa debido a que el alcóhol inhibe el efecto anfotérico de la molécula.

Esta característica es aprovechada para valorar el monoclorhidrato de l-lisina en el siguiente método, el cual, en forma general consiste en titular una cantidad de muestra equivalente a 30 mg. de l-lisina disuelta en alcohol de 85% con hidróxido de sodio aproximadamente 0.1 N en presencia de timolftaleína como indicador.

Preparación de reactivos:

A) Solución de timolftaleína; se disuelven 0.1 gr. de timolftaleína en 100 mls. de alcohol de 95%.

B) Solución de hidróxido de sodio; se pesan con la mayor exactitud posible 0.4 gr. de hidróxido de sodio, se disuelven en una pequeña cantidad de agua desionizada, se aforan a 100 mls. con alcohol de 95% y se titulan con solución valorada de ácido clorhídrico 0.1 N; se titula por lo menos tres veces y se toma el promedio para establecer la normalidad del hidróxido de sodio.

C) Solución de muestra blanco; se coloca un ml. de muestra en un matraz volumétrico de 100 mls. y se afora a volumen con alcohol de 95%, se agita y se deja reposar unos minutos.

D) Solución de alcohol al 85%; en un matraz volumétrico de 100 mls. se colocan unos 20 mls. de alcohol etílico, se le agregan 15 mls. de agua desionizada y se afora a volumen con alcohol etílico y se mezclan.

Preparación de la muestra:

Se coloca un ml. de muestra problema en un matraz volumétrico de 100 mls., se le agrega 15 mls. de agua desionizada - se agita, se afora a volumen con alcóhol etílico.

Determinación:

En un matraz Erlenmeyer de 125 mls. se coloca una alícuota de 10 mls. de muestra problema y se le agregan 40 mls. de - alcohol de 85%; se añaden unas gotas de solución indicadora de timolftaleína y se titula con solución de hidróxido de sodio - mediante una bureta de 25 mls.; el cambio de color en esta titulación va de color beige claro a azul verdoso. Se da el mismo tratamiento a la solución de muestra blanco con el fin de - conocer el efecto provocado por la titulación de los clorhidratos de tiamina y piridoxina. Los mililitros de titulante utilizados para la titulación de la muestra blanco se restan de - los utilizados para la muestra problema y así se obtienen los mililitros utilizados para titular únicamente el monoclorhidrato de l-lisina. En el caso de la muestra blanco el cambio de - color va de incoloro a azul.

Para esta valoración:

mgr. de l-lisina = (vol. de NaOH de muestra - vol. NaOH - de muestra blanco) N de NaOH X peso Miliequivalente de l-lisina.

III.5. VALORACION DE GLUCONATO FERROSO.

Se intentaron tres métodos para la determinación de gluconato ferroso, dos de ellos basados en titulaciones directas de la muestra diluída en ácido sulfúrico, con sulfato cérico amoniacal y utilizando solución de o-fenantrolina como indicador, y el tercero un método espectrofotométrico que resultó el más preciso y exacto. Los métodos a base de titulación presentaron una serie de problemas debido al fuerte color que presenta la muestra por lo que la detección del punto final siempre fué muy confuso. Por lo anterior, el método utilizado para determinar el gluconato ferroso fué el espectrofotométrico que a - continuación se describe:

Método Espectrofotométrico. (Debe tenerse mucho cuidado

en utilizar durante todo el procedimiento agua desionizada incluso para enjuagar el material a utilizarse con el fin de evitar la contaminación de fierro por prácticas de enjuague). En forma general el método consiste en disolver la muestra en agua acidulada hasta una concentración de 3 mg. por 100 ml. de Fe^{+2} y detectarla con alfa, alfa-dipiridil a un pH = 4.5 y medir en espectrofotómetro a una longitud de onda de 523 nm. su absorbancia.

Preparación de reactivos.

A) Solución de alfa, alfa-dipiridil; disuelva 0.1 g de alfa, alfa-dipiridil en agua y diluya a 100 mls. (esta solución es estable por 4 meses si se almacena en un lugar frío y protegido de la luz solar).

B) Solución madre de 0.3 mg de Fe/ml.; pesar 0.3 g de Fe estándar en polvo (99.99), disolverlo en 100 mls. de agua y 20 mls. de ácido clorhídrico (caliente si es necesario), diluya a 1000 mls. con agua desionizada y mezcle.

C) Solución de trabajo 0.03 mg de Fe/ml.: diluya 50 mls. de la solución madre a 500 mls. con agua desionizada.

D) Solución buffer de acetatos de pH = 4.5; disuelva 273 g de acetato de sodio trihidratado en agua y añada 240 mls. de ácido acético; diluya hasta 2000 mls. con agua desionizada.

E) Solución reactivo blanco; mezcle 4 mls. de ácido clorhídrico con 2000 mls. de agua desionizada en un matraz aforado.

Preparación de la muestra. Pipetee 0.5 ml. de muestra -- problema (2.015 mg. de fierro) dentro de un matraz volumétrico de 100 mls., añádale 2 mls. de ácido clorhídrico y afore -- con agua desionizada y tome 10 mls. de esta solución.

Determinación; Pipetee por duplicado alícuotas de 10 mls. de solución de muestra (un para blanco), otra alícuota de 10 mls. de solución de trabajo y una más con solución de reactivo blanco; en tubos Nessler de 100 mls. de capacidad. A las soluciones añádales 15 mls. de solución buffer de acetatos y - 20 mls. de agua desionizada, mezcle las soluciones. A las soluciones de: muestra, estándar y reactivo blanco, añádales 5 - mls. de solución de alfa, alfa-dipiridil (además a la solu-- ción estándar agregue 20 mgr. de ácido ascorbico U.S.P. en polvo). Diluya todas las soluciones a volumen con agua desionizada y mezcle. Permita reposar la solución a fin de que se fije el color totalmente por espacio de 3 horas.

Registre la absorbancia de la solución de trabajo, solu-- ción muestra y solución muestra blanco contra la solución de - reactivo blanco, estableciendo el cero de absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 523 nm.

Realice una curva de calibración utilizando las concentraciones de estándares adecuadas y obtenga mediante la gráfica, las concentraciones de la muestra problema.

(El espectrofotómetro utilizado para la realización de la valoración fué un Coleman Junior II Modelo 6/35).

C A P I T U L O IV

RESULTADOS EXPERIMENTALES

IV.1. VITAMINA B_1

IV.2. VITAMINA B_6

IV.3. MONOCLORHIDRATO DE L-LISINA

IV.4. GLUCONATO FERROSO

IV.1. VITAMINA B_1 (CLORHIDRATO DE TIAMINA)

Rf promedio de separación cromatográfica = 0.00
Para una alícuota de 50 microlitros de muestra que contenía una concentración de 1 mg./ml.

	Absorbancia	Concentración	%
Muestra 1	0.460	9.60	96.00
Muestra 2	0.460	9.60	96.00
Muestra 3	0.465	9.75	97.50
Muestra 4	0.465	9.75	97.50
Muestra 5	0.462	9.70	97.00
Muestra 6	0.465	9.75	97.50
Muestra 7	0.470	9.85	98.50
Muestra 8	0.460	9.60	96.00
Muestra 9	0.480	10.00	100.00
Muestra 10	0.462	9.70	97.00

IV.2. VITAMINA B_6 (CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA)

Rf promedio para la separación cromatográfica = 0.42
Para una aplicación de 50 microlitros de muestra que contenía una concentración de 0.50 mg.

	Absorbancia	Concentración	%
Muestra 1	0.210	4.85	97.00
Muestra 2	0.220	5.00	100.00
Muestra 3	0.210	4.85	97.00
Muestra 4	0.205	4.75	95.00
Muestra 5	0.220	5.00	100.00
Muestra 6	0.220	5.00	100.00
Muestra 7	.220	5.00	100.00
Muestra 8	.205	4.75	95.00
Muestra 9	.220	5.00	100.00
Muestra 10	.210	4.85	97.00

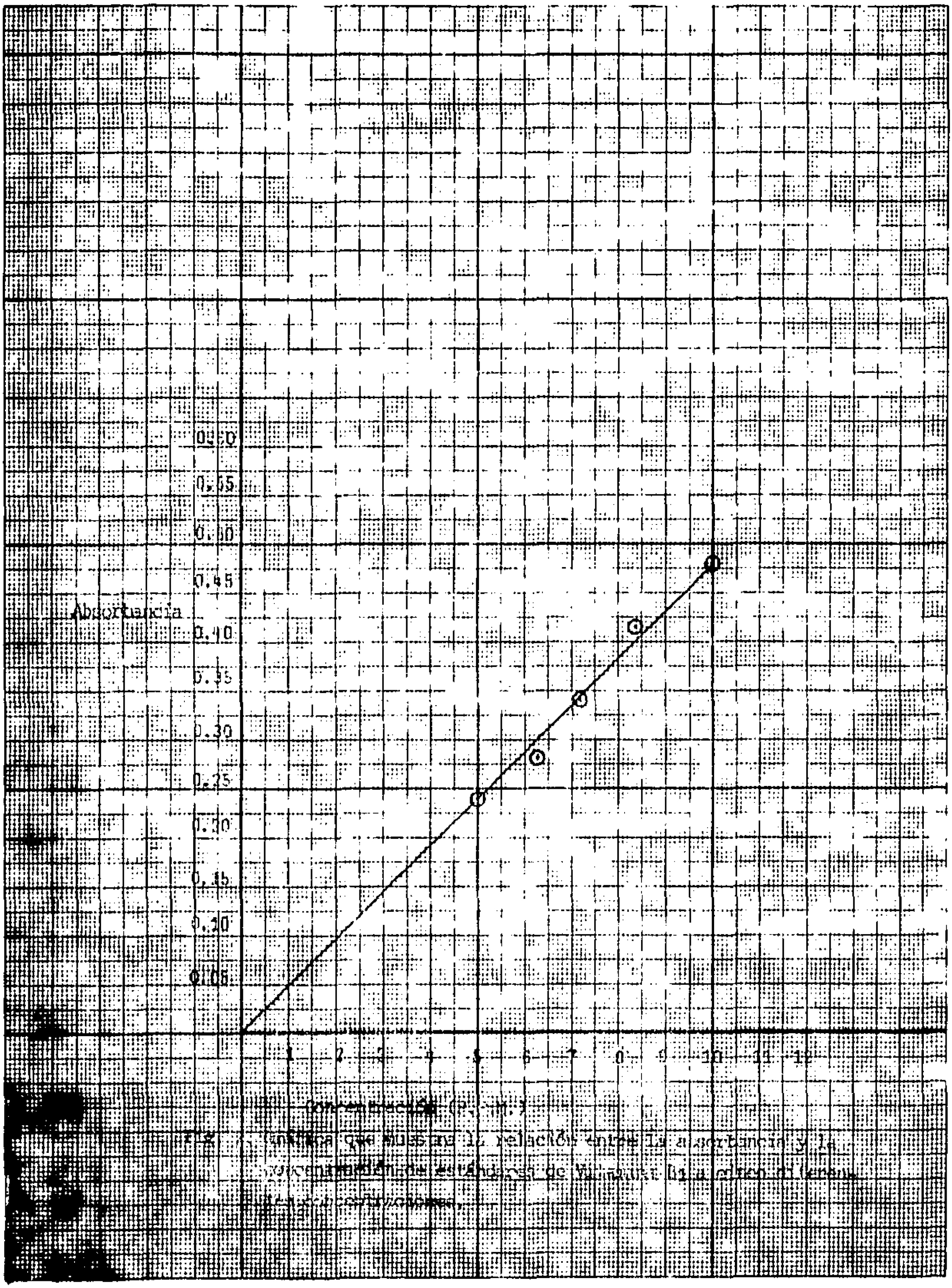


Figura que muestra la relación entre la absorbancia y la concentración de estándares de valina a diferentes concentraciones.

IV.3. MONOCLORHIDRATO DE L-lisina

Se trabajó con una alícuota de 30 mg. del monoclorhidrato.

DATOS OBTENIDOS:

	Volumen de NaOH 0.093 N (mls.)	Concentración (mg.)	%
Muestra 1	3.5	29.73	99.10
Muestra 2	3.4	28.88	96.20
Muestra 3	3.4	28.88	96.20
Muestra 4	3.4	28.88	96.20
Muestra 5	3.6	30.50	101.90
Muestra 6	3.55	30.15	100.50
Muestra 7	3.45	29.30	97.60
Muestra 8	3.55	30.15	100.50
Muestra 9	3.60	30.50	101.90
Muestra 10	3.45	29.30	97.60

IV.4. GLUCONATO FERROSO

Para 0.5 mls. de muestra equivalente a 2.015 mg. de Fe^{+2} que - proporciona 4.03 mg. de Fe^{2} por mililitro de muestra:

Absorbancia del blanco = 0.19 Absorbancia de un estándar de 10 mg.-ml. = 0.54

	Absorbancia	Concentración (mg./ml.)	%
Muestra 1	0.350	3.90	96.70
Muestra 2	0.360	3.96	98.26
Muestra 3	0.355	3.92	97.27
Muestra 4	0.350	3.90	96.70
Muestra 5	0.350	3.90	96.70
Muestra 6	0.370	4.10	101.73
Muestra 7	0.350	3.90	96.70
Muestra 8	0.360	3.96	98.26
Muestra 9	0.375	4.16	103.22
Muestra 10	0.350	3.90	96.70

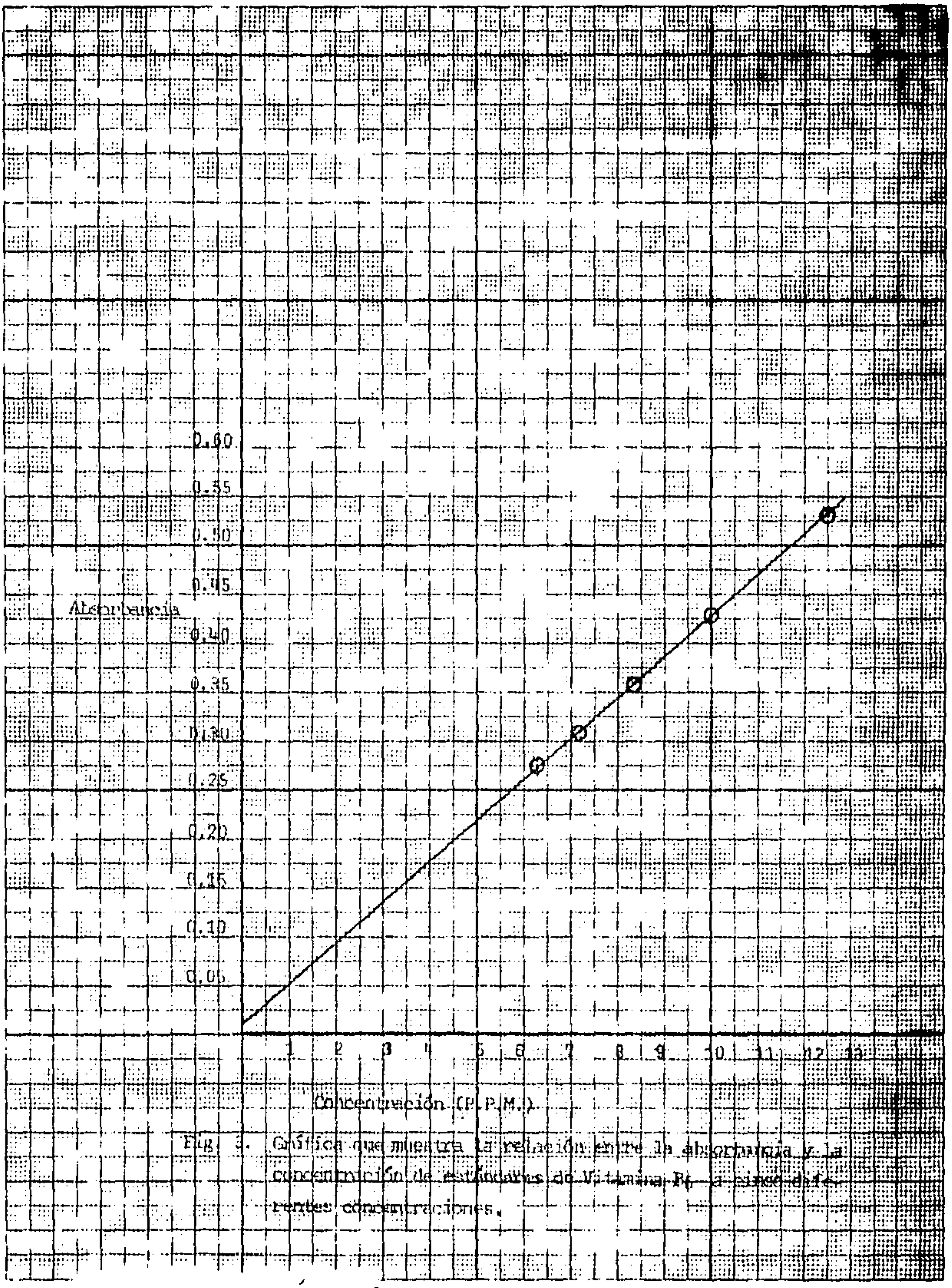


Fig. 3. Gráfica que muestra la relación entre la absorbancia y la concentración de estándares de Vitamina B$_6$ a diferentes concentraciones.

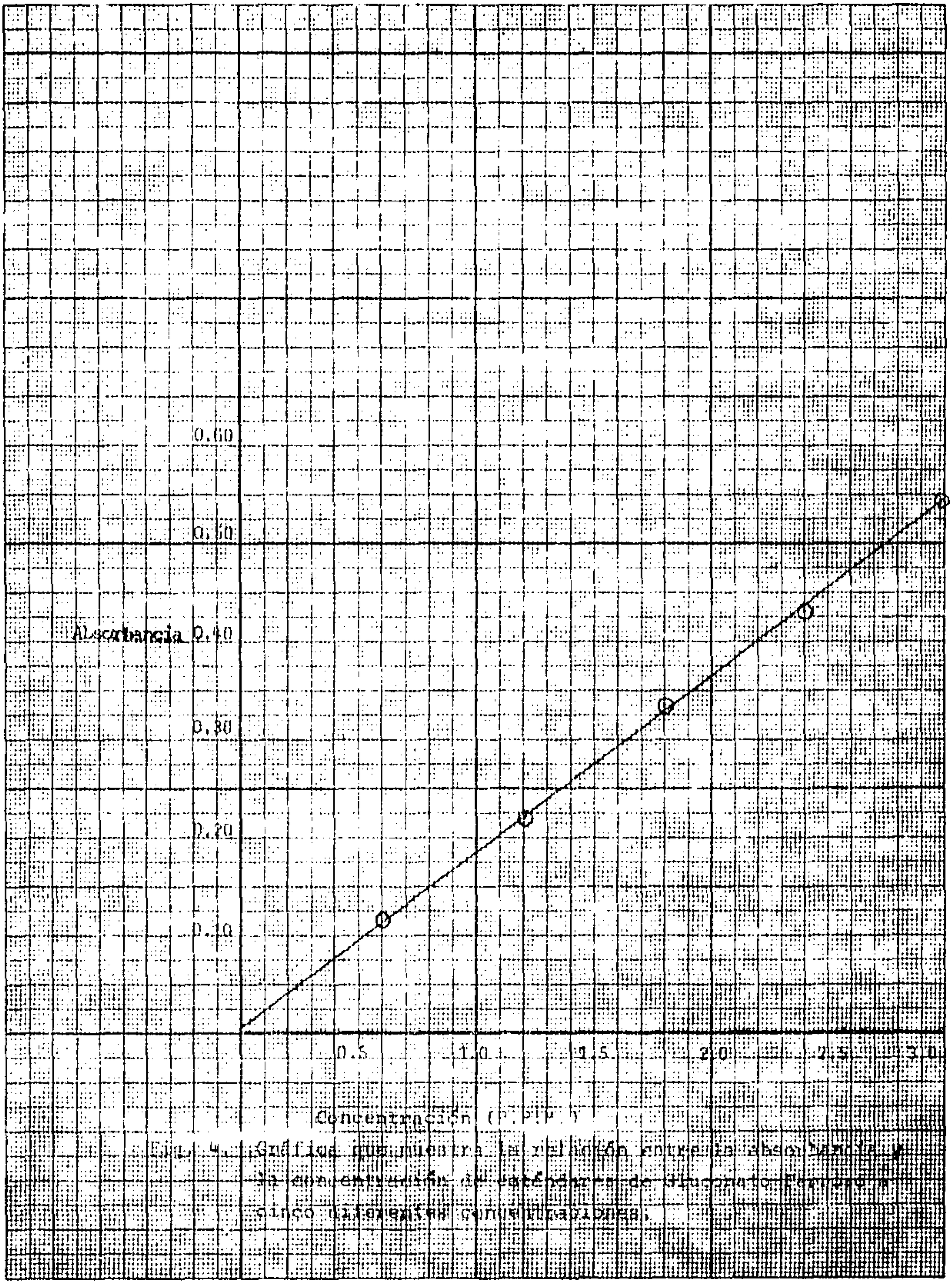


Fig. 4. Gráfica que muestra la relación entre la absorbancia y la concentración de cafeína de diversas concentraciones.

C A P I T U L O V

ANALISIS ESTADISTICO

A N A L I S I S E S T A D I S T I C O

Formulario de parámetros estadísticos a utilizar:

$$N = n_1 \quad n_2 \ . \ . \ . \quad n_n$$

$$\bar{X} = \frac{n_1 \quad n_2 \ . \ . \ . \quad n_n}{}$$

$$D.E. = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

$$C.V. = \frac{D.E.}{\bar{X}}$$

$$I.C. = \bar{X} \pm 2.6222 \ \frac{D.E.}{\sqrt{N}}$$

$$Es = \frac{D.E.}{\sqrt{N}}$$

Donde:

N = Número de muestras

D.E. = Desviación estándar

I.C. = Intervalo de confianza con 95% de confiabilidad.

Es = Error estándar.

$\bar{X}$ = Promedio aritmético

C.V. = Coeficiente de variación

V.I. VITAMINA B_1 (CLORHIDRATO DE TIAMINA)

N = 10 $\bar{X}$ = 97.30 D.E. = 1.25

Es = 0.40 C.V. = 0.0128 I.C. = 97.30 $\pm$ 1.037

V.2. VITAMINA B_6 (CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA)

N = 10 $\bar{X}$ = 98.10 D.E. = 2.13

Es = 0.674 C.V. = 0.0217 I.C. = 98.1 $\pm$ 1.767

V.3. MONOCLORHIDRATO DE L-LISINA

N = 10 $\bar{X}$ = 98.77 D.E. = 2.31

Es = 0.73 C.V. = 0.023 I.C. = 98.77 $\pm$ 1.917

V.4. GLUCONATO FERROSO

N = 10 $\bar{X}$ = 98.22 D.E. = 2.35

Es = 0.74 C.V. = 0.023 I.C. = 98.22 $\pm$ 1.95

De acuerdo a los resultados obtenidos por los parámetros estadísticos anteriores, es posible notar que en ellos existe información suficiente para hablar de métodos experimentales con características como linearidad (tanto el coeficiente de variación como la desviación típica lo demuestran) así como de repetibilidad ya que el error estándar es bajo y de una buena eficiencia ya que los promedios alcanzados son lo suficientemente cercanos al 100%.

C A P I T U L O VI

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

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

Es importante hacer notar que el presente trabajo pretendió contribuir a que en un laboratorio de producción de medicamentos como el que se describe al inicio del mismo, pueda contar con medios prácticos para desarrollar sus rutinas de control de calidad de acuerdo a su capacidad y así se desarrolló la labor experimental, y en base precisamente a esta idea y necesidad es posible concluir que en forma general los métodos descritos y desarrollados son viables de llevar a cabo en el laboratorio de control de calidad de esa empresa. Así, podemos asegurar con las limitaciones de las técnicas estadísticas utilizadas que:

1.- El método de valoración para las vitaminas hidrosolubles B_1 y B_6 (que consistió en una separación cromatográfica utilizando como eluente la mezcla isopropanol - hidróxido de amonio al 25% en proporción de 95:5 con revelador de lámpara de luz U.V. y V.; con una posterior cuantificación por medio de un espectrofotómetro leyéndose la B_1 a 240 y la B_6 a 290 nm., habiendo sido extraída la muestra con agua acidulada con ácido clorhídrico) es un método muy aceptable y adecuado para llevar a cabo las valoraciones de acuerdo al promedio de - un 97.30% la B_1 y de 98.10% la B_6 .

2.- El método de valoración para el monoclorhidrato de l-lisina, el cual consistió en una serie de titulaciones -- del grupo carboxilo del aminoácido una vez que le ha inhibido el efecto anfótero por medio de una saturación - con alcohol al 85% en agua y cuyos resultados se obtuvieron por volumetría; es un método que puede ponerse - en práctica con un 98.77% de probabilidades de un resultado exitoso.

3.- El método colorimétrico para determinar el Fe del gluco

nato ferroso aprovechando la propiedad colorimétrica - con el indicador alfa, alfa-dipiridil a un pH = 4.5 y que proporcionara un porcentaje promedio de efectivi-- dad de 98.22%, lo que lo hace un método eficiente y - confiable.

Capítulo aparte merece la cianocobalamina en esta formulación dada la cantidad tan pequeña-proporcionalmente a los o-- tros componentes escenciales-en que se encuentra presente, - siendo ésta la principal limitante para poder captar en forma clara y efectiva su concentración; de acuerdo a los medios -- con que la empresa cuenta actualmente no es posible anotar - una técnica que logre captar debidamente la cantidad de vitamina.

Es preciso hacer notar que se intentaron técnicas cromatográficas de separación sin resultados que fueran siquiera a-- ceptables, así como se intentaron ensayos de identificación - que fracasaron elementalmente debido a la baja concentración de la vitamina así como a la fuerte coloración del producto - que impide cualquier posibilidad de captar un punto final sin interferencias sensibles. Esta determinación es posible de - llevarse a cabo mediante técnicas analíticas de alto poder de resolución como la cromatografía de líquidos a alta presión o métodos microbiológicos que desgraciadamente escapan a las posibilidades actuales de la empresa.

C A P I T U L O VII
B I B L I O G R A F I A

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

1. SKOOG D.A., WEST D.M.
Análisis Instrumental
México, 1984.
Editorial Interamericana.

2. MEYERS F., JAWETE E., GOLDFIEN A.
Manual de Farmacología Clínica
México, 1974
Editorial El Manual Moderno.

3. STROHECKER R., HENNING H.
Análisis de Vitaminas (Métodos Comprobados)
Madrid, 1967
Editorial Paz Montalvo.

4. HIGUCHI, BROCHMAN, HANSSEN
Pharmaceutical Análisis
New York - London - Sydney, 1961
Editorial Interscience.

5. BECKETT, STENLAKE
Practical Pharmaceutical Chemestry
London, 1975
Editorial The Athlone Press.

6. CLARCKE E.G.C.
Isolation and Identification of Drugs
México, 1978
Editorial The Pharmaceutical Press Vol. I

7. MERCK - INDEX
X Edition
U.S.A., 1983
Merck Co. Inc.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

8. THE CONDENSED CHEMICAL DICTIONARY
U.S.A., 1971
Edit. Van Nostrand Reinhold VIII Edition

9. UNITED STATES PHARMACOPEIA
U.S.A., 1980
XX Edition.

10. HANDBOOK OF CHROMATOGRAPHY
U.S.A., 1972
Chemical Rubber Co. Vol. I

11. METHODS OF VITAMIN ASSAY
London, 1947
Edit. Interscience

12. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS
Association of Oficial Analytical Chemist
U.S.A., 1980
XIII Edition.

13. REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES
XVI Edition
U.S.A., 1980
Edit. Mack Publishing Co.

14. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS
Association of Official Analytical Chemist
XII Edition
U.S.A., 1980

15. DICK J.G.
Química Analítica
México, 1979
Editorial El Manual Moderno.

16. MURRAY F. SPIEGEL PhD
Teoría y Problemas de Estadística
México, 1976
Ed. Libros de Mc Graw Hill de México S.A. de C.V.