

Zij: 32



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"ZARAGOZA"

DESARROLLO Y VALIDACION DE DOS METODOS ANALITICOS; UNO PARA LA CUANTIFICACION DEL PALMITATO DE VITAMINA "A" Y OTRO PARA EL ANALISIS DEL ERGOCALCIFEROL EN UNA SOLUCION ORAL POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

*QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO*

P R E S E N T A :

MARIA TRINIDAD TERESA ORRALA JIMENEZ



MEXICO, D. F.

1988.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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.

C O N T E N I D O

P A G .

CAPITULO I.	ESPECIFICIDAD DE LOS METODOS ANALITICOS	3.
CAPITULO II.	CROMATOGRAFIA	
	- Tipos de cromatografía de líquidos.	9.
	- Conceptos teóricos de la cromatografía en columna.	13.
	- Cromatografía en capa delgada.	21.
	- Cromatografía de líquidos de alta resolución.	31.
CAPITULO III.	MONOGRAFIAS	
	- Monografía del palmitato de vitamina A.	47.
	- Monografía del ergocalciferol.	55.
CAPITULO IV.	PARTE EXPERIMENTAL	
	- Determinación cuantitativa del palmitato de vitamina A en una solución oral por cromatografía de líquidos de alta resolución.	66.
	- Determinación cuantitativa del ergocalciferol en una solución oral de 400 UI/ml. por cromatografía de líquidos de alta resolución.	89.

CAPITULO V. DISCUSION DE RESULTADOS	116.
CAPITULO VI. CONCLUSIONES	121.
CAPITULO VII. LISTA DE REFERENCIAS	124.

## INTRODUCCION

Las vitaminas son sustancias orgánicas que son necesarias para el mantenimiento de las funciones metabólicas normales del organismo y la salud. La carencia de ellas conduce a diversas enfermedades llamadas avitaminosis, por lo que es necesario administrar medicamentos que contengan una o varias vitaminas.

El problema que se presenta para el análisis de las vitaminas en estos medicamentos es el de no contar con métodos específicos exactos y precisos.

Para el desarrollo de este trabajo se empleó una solución que contiene las siguientes vitaminas:

Palmitato de vitamina A	5000 UI/ml
Ergocalciferol	400 UI/ml
Vitamina C	60 UI/ml

La cuantificación del palmitato de vitamina A es realizada por un método espectrofotométrico con el que no es posible detectar y diferenciar los productos de degradación del palmitato de vitamina A.

Con respecto al ergocalciferol la valoración puede realizarse por métodos químicos o biológicos.

El método biológico requiere del uso de animales de experimentación tales como el pollo o la rata; este método es específico pero los resultados se obtienen varias semanas después del inicio de la valoración.

Se cuenta con un método espectrofotométrico que es sencillo, pero no es específico ni aplicable si la formulación contiene una alta concentración de vitamina A.

El objetivo de este trabajo es desarrollar y validar dos métodos analíticos por cromatografía de líquidos de alta resolución, uno para el análisis del palmitato de vitamina A y otro para la cuantificación del ergocalciferol en una solución oral. Se requiere que ambos métodos sean específicos, exactos, precisos y reproducibles.

## CAPITULO I

## ESPECIFICIDAD DE LOS METODOS ANALITICOS

Especificidad es un término que indica que la respuesta del detector o la medición del parámetro fisicoquímico relacionado con la concentración de la sustancia de interés, se debe únicamente a esta sustancia y no a otros compuestos que pudieran estar presentes en el material por analizar; como son los productos de degradación, sustancias relacionadas o algún otro contaminante.

El método debe estar libre de interferencias significativas o debe distinguir entre sustancias que se sabe existen en el producto, o sustancias relacionadas de acuerdo al proceso de producción usado.

Los niveles de estas posibles interferencias se deben estudiar, ya sea al nivel máximo que puede ocurrir en el producto o a los niveles mínimos detectables; si la técnica analítica no permite analizar separadamente el producto de interés y los productos relacionados o contaminantes, debe cambiarse el método analítico.

Debe de haber una especificidad tal que permita que la precisión y la exactitud del método se cumplan; si se busca cuan-

tificar componentes adicionales debe existir especificidad entre ellos y otros productos contaminantes.

La especificidad de una técnica analítica convencional para productos elaborados puede demostrarse analizando placebos del ingrediente activo en el material de prueba e identificando que la respuesta correspondiente al principio activo, no tiene ningún valor con el placebo.

En algunas ocasiones es necesario utilizar en lugar de placebos, sustancias ajenas que pudieran estar presentes en el material por analizar, y que no necesariamente es una del placebo del producto, éste pudiera ser el caso del análisis de materia prima o reactivos. En su caso del material de acondicionamiento, frascos, tapones, etc...

La demostración de especificidad muestra su máxima utilidad, cuando la técnica que se está desarrollando se va a emplear para determinar el compuesto en estabilidad y cuando se va a usar para análisis en fluidos biológicos (para estudios de biodisponibilidad o farmacocinética).

#### ESPECIFICIDAD EN ESTABILIDAD

Es un tipo de especificidad en el cual las "otras" sustancias que pudieran estar presentes en el material por analizar



son aquéllas que se producen durante el período de almacenamiento del material en condiciones normales o aceleradas de temperatura, luz, por hidrólisis o por oxidación.

Por lo tanto, para establecer que un método analítico es específico en estabilidad para una sustancia, es necesario de mostrar que ningún producto de degradación va a interferir en el análisis. Los productos de degradación pueden provenir del mismo principio activo, de los demás ingredientes de la formulación o de la interacción de ambos bajo ciertas condiciones (1).

Un ejemplo de metodología que podemos utilizar para demostrar la especificidad en estabilidad de un método cromatográfico se describe a continuación:

1. Preparar las muestras del producto y placebos de cada uno de los ingredientes activos.
2. Degradar muestras de los ingredientes activos y de los lotes preparados en 1 bajo las siguientes condiciones:
  - a). Temperatura 60-80°C durante 2 - 4 semanas.
  - b). Luz visible (luz solar) y ultravioleta.
  - c). Oxidación.
  - d). Hidrólisis
  - e). Conocer los productos de degradación por literatura.

3. Analizar las muestras con el método de ensayo y observar si se ha producido una degradación del principio activo.
4. Identificar los productos de degradación del principio activo y demostrar que los principales no interfieren en el análisis. Adicionando cada uno de ellos a blancos y a placebos del producto y demostrar que no interfieren con la respuesta del ingrediente de prueba.

Para el caso en que no se cuente con los productos de degradación, lo menos que debe realizarse es un análisis de la materia prima degradada con otro sistema cromatográfico o con otro método analítico y en ambos casos deben dar resultados parecidos. (1)

Se cuenta con varios métodos indicadores de estabilidad, pero no todos ellos presentan la especificidad requerida. Algunos de estos métodos son:

MÉTODOS VOLUMÉTRICOS.— Los métodos volumétricos (acuosos y no acuosos) pueden ser usados para el análisis de principios activos, mas a menudo no ofrecen la especificidad requerida para el análisis de productos farmacéuticos en estabilidad.

MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS.- La determinación espectrofotométrica directa en la región ultravioleta o visible, las reacciones que producen un compuesto colorido cuya medición se efectúa en la región visible, y otro tipo de reacciones que incrementan la conjugación para permitir la medición de los compuestos en la región ultravioleta, son ampliamente utilizadas en el análisis farmacéutico, pero generalmente carecen de especificidad. La especificidad puede conseguirse a través de una combinación con métodos de separación apropiados.

Debido a su limitada sensibilidad, el análisis infrarrojo es usado para identificación de productos de degradación, pero tiene muy pocas aplicaciones en la evaluación de la estabilidad (2).

MÉTODOS CROMATOGRAFICOS.- Un gran número de métodos indicativos de estabilidad están vinculados con alguna forma de cromatografía: cromatografía en capa delgada, además, cromatografía de gases y cromatografía de líquidos de alta resolución, los dos últimos métodos no sólo ofrecen una buena separación, sino que suministran métodos precisos de cuantificación.

La cromatografía en capa delgada unida a técnicas espectrofotométricas, es frecuentemente empleada para cuantificar fármacos en pruebas de estabilidad, ya que ofrecen especificidad, simplicidad en la operación y economía.

## CAPITULO II

## CROMATOGRAFIA

Las formulaciones farmacéuticas son mezclas complejas que incluyen además de uno o más ingredientes activos, un número de materiales inertes tales como: diluentes, desintegrantes, colores y sabores. Para asegurar la calidad y estabilidad del producto final, se debe tener un método capaz de separar estas mezclas en componentes individuales. Entre las técnicas de mayor aplicación para la resolución de estas mezclas, destaca un grupo de métodos de alta eficiencia que son llamados colectivamente cromatografía (3).

La cromatografía está integrada por un grupo de métodos que se emplean para la separación molecular de mezclas, que dependen de las afinidades diferenciales de los solutos entre dos fases inmiscibles; una estacionaria y una móvil, de tal forma que cada uno de los componentes es retenido selectivamente por la fase estacionaria. Esta retención selectiva obedece a razones de diferencias en adsorción, partición, presión de vapor, tamaño molecular o carga iónica (4).

Los métodos cromatográficos pueden ser clasificados de acuerdo a la naturaleza de las fases móvil y estacionaria.

Si la fase estacionaria es un sólido, el proceso es llamado cromatografia de adsorción; si la fase estacionaria es un líquido, se llama cromatografia de partición.

En la cromatografia de adsorción, la fase móvil que contiene los solutos disueltos pasa por la superficie de la fase estacionaria. La retención de los componentes y su consecuente separación depende de la disponibilidad de los átomos de la superficie para remover los solutos de la fase móvil y adsorberlos temporalmente por medio de fuerzas electrostáticas. Si la fase móvil es un líquido, el proceso se llama cromatografia líquido-sólido (CLS), pero cuando la fase móvil es un gas, el método es llamado cromatografia gas-sólido (CGS).

En la cromatografia de partición, un material sólido inerte, tal como la sílica gel o tierra de diatomeas, sirve como soporte a una capa delgada de líquido la cual es la fase estacionaria; la fase móvil que contiene los solutos pasa cerca de esta fase líquida y entonces se lleva a cabo la retención y separación de los solutos entre los dos fluidos; esta separación depende de los coeficientes de partición de los solutos. Si la fase móvil es un líquido, este tipo de cromatografia de partición se llama cromatografia líquido-líquido (CLL) y si la fase móvil es un gas el proceso se denomina cromatografia gas-líquido.

Existen otras dos formas de cromatografía en las cuales la fase estacionaria es un sólido y se clasifican aparte de la CLS y de la CGS por su naturaleza única en el proceso de separación; estas son cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión molecular (3).

En la cromatografía de intercambio iónico la fase estacionaria consiste de una matriz polimérica rígida cargada ya sea positiva o negativamente. Si tiene carga positiva da sitios de intercambio positivos ( $R^+$ ) que atraen y retienen a los aniones de la fase móvil ( $Y^-$ ); después éstos se intercambian por los aniones de la muestra ( $X^-$ ). Este proceso se denomina de intercambio aniónico y puede representarse por:



El proceso complementario de intercambio catiónico ocurre cuando la superficie de la resina tiene cargas negativas, dando sitios de intercambio negativos ( $R^-$ ). Los iones de la fase móvil ( $Y^+$ ) y muestra ( $X^+$ ) son cationes y su intercambio puede representarse por:



La separación se basa sobre la fuerza de las interacciones entre los iones de la muestra y los sitios de intercambio. Los iones que interactúan débilmente con los sitios de intercambio se retienen poco, mientras que los iones que tienen interacciones fuertes se retienen más.

Este tipo de cromatografía se aplica a compuestos iónicos. (4).

En la cromatografía de exclusión, la fase estacionaria es una sustancia polimérica que contiene numerosos poros de dimensiones moleculares. Los solutos cuyo tamaño molecular es suficientemente pequeño, se separan de la fase móvil para difundirse en los poros. Las moléculas grandes, que no se adaptan dentro de los poros, permanecen en la fase móvil y no son retenidas. Este método es el más apropiado para la separación de mezclas en las cuales los solutos varían considerablemente en tamaño molecular. La fase móvil en la cromatografía de exclusión puede ser líquida o gaseosa. (3).

Es importante hacer notar que la CLL tiene dos variantes: a) Fase Normal, donde la fase estacionaria es un líquido polar (agua); mientras que la fase móvil es relativamente no polar (hexano, benceno, cloroformo). Este modo de operación es usado para separar compuestos polares que son distribuidos preferente-



mente en la fase estacionaria polar; b) Si la fase estacionaria es no polar (hidrocarburos) y la fase móvil, polar (agua, metanol, acetoneitrilo) hablamos de una Fase Inversa. (4).

La separación se lleva a efecto en una columna tubular rellena de un sólido poroso finamente dividido, el cual puede actuar como fase estacionaria propiamente dicha o como soporte de una fase estacionaria líquida. También se puede efectuar utilizando como fase estacionaria, papel filtro o un sólido finamente dividido colocado en forma de capa delgada sobre una placa de vidrio. Estos tres tipos de cromatografía se basan en los mismos principios fundamentales y se conocen respectivamente como cromatografía en columna, en papel y de capa delgada. (5).

## CONCEPTOS TEORICOS DE LA CROMATOGRAFIA EN COLUMNA

### Separación cromatográfica.

Para lograr una buena separación cromatográfica se deben seleccionar las óptimas condiciones de trabajo, y para ello se requiere un entendimiento de los factores que controlan la separación.

La cromatografía efectúa la separación de los componentes de una mezcla por virtud de diferencias en la distribución de los componentes entre la fase móvil y la fase estacionaria. El

equilibrio de esta distribución se representa por el coeficiente de distribución:

$$K = C_s / C_m$$

donde

K= coeficiente de distribución.

C<sub>s</sub>: concentración del soluto en la fase estacionaria.

C<sub>m</sub>: concentración del soluto en la fase móvil.

En la separación cromatográfica puede reconocerse dos características principales, la primera es la migración diferencial de los componentes de la muestra que se refiere al movimiento propio de cada compuesto a través de la columna. El movimiento de las moléculas del componente ocurre sólo cuando las moléculas están en la fase móvil, entonces, la velocidad de migración es inversamente proporcional al coeficiente de distribución. Por tanto, la migración diferencial depende de las variables experimentales que afectan la distribución como son la composición de la fase móvil, la composición de la fase estacionaria, la temperatura de separación.

Los componentes con alta distribución en la fase estacionaria presentan un movimiento lento a través de la columna y de aquí que sean separados de los componentes con distribución baja en la fase estacionaria, los cuales se mueven rápido. (4).

Debido a la retención, las zonas cromatográficas se mueven a través de la columna a una velocidad menor que la velocidad de la fase móvil. Las zonas cromatográficas se caracterizan por dos medidas de retención: el volumen de retención ( $V_r$ ) y el tiempo de retención ( $T_r$ ). El volumen de la fase móvil requerido para eluir un compuesto de la columna cromatográfica se llama volumen de retención. Por otra parte, se conoce como tiempo de retención al tiempo transcurrido desde la introducción de la muestra en la columna hasta el momento en que eluye el compuesto en estudio. La medición, tanto del  $V_r$  como del  $T_r$ , se inicia desde el momento en que se introduce la muestra en la columna hasta el momento en que aparece el máximo del pico en la gráfica trazada por el registrador. Para un conjunto dado de variables de columna (tipo y cantidad de fases móvil y estacionaria, longitud de la columna, temperatura, etc...) el volumen de retención de un compuesto es constante, el volumen de retención se relaciona con el tiempo de retención por:

$$V_r = F \times T_r$$

donde  $F$  es la velocidad de flujo (ml/min).

La segunda característica de la separación cromatográfica es la difusión molecular. Al introducir a la columna una muestra, las moléculas de los componentes inicialmente forman una banda angosta, pero conforme avanzan a través de la columna esta banda se ensancha. Esto no se debe a diferencias en la distribución, sino a procesos físicos.

### Resolución Cromatográfica

La mayor utilidad de la cromatografía está basada en su habilidad para separar los componentes de una mezcla.

Para lograr una separación adecuada de dos picos adyacentes es necesario ajustar las variables experimentales, de tal manera que los centros de las bandas o máximos de los picos eluyan en puntos significativamente diferentes en el cromatograma. Para ésto se requiere que los coeficientes de partición de los dos solutos sean suficientemente diferentes para que una sustancia sea más fuertemente retenida que la otra. (3).

La resolución de dos bandas adyacentes (Figura No. 1), está definida como la distancia entre los centros de las dos bandas dividida entre el promedio de la amplitud de sus bases.

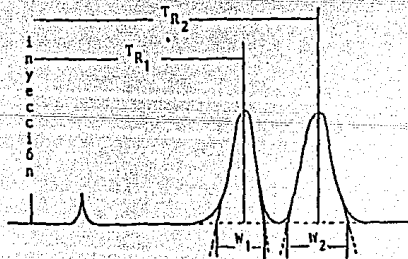


Figura No. 1 Resolución cromatográfica.

$$R_s = \frac{T_{r2} - T_{r1}}{\frac{W_2 + W_1}{2}}$$

donde

$R_s$  = resolución

$T_{r1}$  y  $T_{r2}$  = tiempo de retención de las bandas 1 y 2 respectivamente.

$W_1$  y  $W_2$  = amplitud de la base de las bandas 1 y 2 respectivamente.

El valor de la resolución depende de dos factores: separación de los centros de banda y amplitud de banda. (7).

Las amplitudes de las bandas son medidas por la distancia entre las tangentes de los puntos de inflexión y son consideradas como 4 veces la desviación estándar. Para dos picos adyacentes de igual tamaño, cuando  $R_s$  es igual a uno indica una buena separación, valores mayores de  $R_s$  indican separaciones excelentes y valores pequeños de  $R_s$  representan separaciones deficientes. (3).

Es de gran importancia conocer como varía la resolución con los parámetros fundamentales de la separación cromatográfica: eficiencia, selectividad y capacidad.

Eficiencia, - la eficiencia es una medida de la habilidad relativa de una columna dada para dar bandas angostas y mejorar las separaciones, puede medirse cuantitativamente por el número de platos teóricos. (N) (3).

$$N = 16 \left( \frac{T_r}{W} \right)^2$$

donde

$T_r$  = tiempo de retención

$W$  = amplitud de la base del pico.

El valor de N es aproximadamente constante para diferentes bandas en un cromatograma, para una serie de condiciones de operación (una columna en particular, fase móvil, con velocidad de fase móvil y temperatura fijos). (7).

Debido a que N permanece constante para diferentes bandas en un cromatograma, predice que la amplitud de la banda se incrementará proporcionalmente con el tiempo de retención además de una reducción en la altura del pico.

El número de platos teóricos (N) es proporcional a la longitud de la columna (L), así que un incremento en L dará como resultado un incremento en N; esta proporcionalidad de N y L puede ser expresada por la siguiente ecuación:

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

donde H = altura equivalente de un plato teórico (AEPT)

En general:

- . H es pequeña para columnas con empaque de tamaño de partícula pequeño y para velocidades de flujo de fase móvil bajas.
- . H es pequeña para fases móviles menos viscosas y para temperaturas de separación mayores.
- . H es pequeña para moléculas pequeñas de la muestra.

Un valor pequeño de H indica que la columna es más eficiente y tiene un número mayor de platos teóricos. (7).

Selectividad.— la selectividad de la columna ( $\alpha$ ) es medida por la separación relativa de los picos de los compuestos y está en función de los coeficientes de distribución.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

donde  $k_1$  y  $k_2$  = coeficiente de distribución de los componentes 1 y 2 respectivamente.

La selectividad de la columna puede modificarse variando el pH de la fase móvil, modificando la superficie de la fase

estacionaria, por cambios en la temperatura de separación y/o cambiando la naturaleza química del soluto. (7).

Factor de capacidad. - el factor de capacidad es un parámetro que expresa la habilidad de un soluto en particular para interactuar con un sistema cromatográfico; el factor está dado -- por la relación entre el coeficiente de distribución de la sustancia y algunos parámetros de las fases estacionaria y móvil; se representapresenta por la siguiente fórmula:

$$K^1 = k \frac{V_s}{V_m}$$

donde

$K^1$  = factor de capacidad

$V_s$  = volumen de fase estacionaria

$V_m$  = volumen de la fase móvil en los intersticios

$K$  = coeficiente de distribución.

Considerando que los volúmenes de las fases móvil y estacionaria son constantes para cualquier experimento cromatográfico,  $K^1$  es directamente proporcional al coeficiente de distribución. (3).

Valores pequeños de  $K^1$  indican que los componentes son poco retenidos por la fase estacionaria, por lo que se obtienen separaciones deficientes, valores grandes de  $K^1$  mejoran la separación pero llevan a análisis prolongados.



La siguiente ecuación es una relación fundamental en cromatografía que nos presenta los parámetros que pueden variarse para modificar la resolución.

$$R_s = \frac{1}{4} \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} N \left( \frac{k^1}{1 + k^1} \right)$$

En donde el primer término describe la selectividad, el segundo la eficiencia de la columna y el último término es el factor de capacidad. (7); cualquier variación en alguna de las variables repercute en las otras.

#### CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA. (CCD).

La cromatografía en capa delgada es un método de análisis en donde la fase estacionaria es un sólido finamente dividido que es esparcido como capa delgada en un soporte rígido y la fase móvil que es un líquido migra a lo largo de la superficie de la placa que funciona como soporte rígido; esta técnica difiere de otras en que la separación no se lleva a cabo en una columna cerrada, se realiza en una superficie plana y la fase móvil no fluye por influencia de la gravedad o presión alta; eluye por acción capilar. (3).

La cromatografía en capa delgada es una de las técnicas de separación más populares y ampliamente usadas en el análisis

farmacéutico cualitativo y cuantitativo, ya que es sencilla, versátil, sensible, reproducible y barata. Pero el área farmacéutica no es su único campo de aplicación, sino que también es útil en áreas como la de alimentos y la toxicológica. (8).

Los primeros trabajos de cromatografía en capa delgada fueron realizados en 1938 por Izmailov y Schraiber en el Instituto Ucraniano de Farmacia Experimental; pero la técnica tuvo aceptación hasta la década de los 50's con los trabajos de Stahl y co laboradores. (3,8).

Los adsorbentes que se usan más comunmente en CCD son: sílica gel, alúmina, Kieselgult (tierra de diatomeas) y celulosa en polvo, entre otros. (8).

Cualquiera de los adsorbentes que se mencionaron se -- pueden usar puros, pero es más conveniente incorporarles un agente aglutinante, por ejemplo: sulfato de calcio o almidón para -- que tenga una mayor cohesión. Ya que la adsorción es esencialmente un fenómeno de superficie, el grado de separación depende del área de superficie del adsorbente, de aquí el interés por los -- adsorbentes con tamaño de partícula pequeño. En la actualidad los adsorbentes son de tamaño de partícula y características uni formes, por lo que es posible reproducir la calidad de una capa. (3,9).

Para efectuar el desarrollo que en CCD es el proceso por el cual, la fase móvil se mueve a través de la capa de adsorbente con el fin de llevar a cabo la separación de las sustancias de la muestra, se necesita una cámara cerrada para evitar la evaporación del disolvente. Una vez completo el desarrollo, las placas se secan con una corriente de aire y las manchas pueden localizarse de diferentes maneras: zonas coloridas son localizadas visualmente, la iluminación con luz ultravioleta está particularmente indicada para compuesto fluorescentes, en otros casos pueden localizarse rociando reactivos que al reaccionar producen sustancias coloridas o fluorescentes. (9).

La cuantificación puede efectuarse por desprendimiento del área adsorbente que contiene la sustancia, por raspado o aspiración en una pipeta Pasteur; el compuesto se separa del adsorbente usando un disolvente apropiado y la fase estacionaria sólida es removida por centrifugación o filtración. Entonces el soluto puede ser identificado y/o cuantificado por algún método espectrofotométrico o cromatográfico. (3).

#### CRITERIO PARA LA SEPARACION CROMATOGRAFICA.

En todo procedimiento cromatográfico las condiciones óptimas para la separación se obtienen de una selección adecuada de las fases móvil y estacionaria. En CCD el adsorbente más apropia

do (fase estacionaria) se puede encontrar fácil y rápidamente. Los adsorbentes para CCD difieren de los usuales para cromatografía en columna en su estructura ya que para CCD es más fina que para columna. (8).

La elección de las fases móvil y estacionaria se hará de acuerdo al problema particular en estudio y se considera la estructura química y el comportamiento cromatográfico del soluto. De aquí la importancia de conocer conceptos como el de polaridad y coeficiente de distribución.

La polaridad depende de la naturaleza de los grupos funcionales, el siguiente ejemplo ilustra el concepto de polaridad en relación a la actividad de grupos funcionales sin considerar interacciones moleculares:



> arilo > alquilo. (9).

El movimiento de cada sustancia en sistema cromatográfico es una característica particular que puede usarse para identificar dicha sustancia; esta característica se llama  $R_f$  el cual, es un valor que indica la posición del compuesto sobre un cromatograma desarrollado, y se calcula por la siguiente relación:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por la muestra desde el origen}}{\text{distancia recorrida por el frente del disolvente desde el origen.}}$$

Los valores de  $R_f$  varían de 0 a 0.999

Las sustancias con grupos funcionales similares a los de los solutos, tales como éteres, alcoholes o carboxilos, pueden ser agregados para incrementar el valor de  $R_f$  por el aumento de la solubilidad del soluto en la fase móvil. (3).

El factor principal en cualquier forma de cromatografía es el coeficiente de distribución ( $K$ ) de una sustancia entre las dos fases del sistema cromatográfico. En la cromatografía de adsorción,  $K$  depende de la temperatura y de la concentración del soluto. A una temperatura dada la relación entre la cantidad de soluto en cada fase puede expresarse gráficamente por la isoterma de adsorción.

La isoterma ideal es una línea recta con pendiente -- igual a uno, que se obtiene al graficar la concentración de soluto en la fase estacionaria contra su concentración en la fase móvil (Figura No. 2).

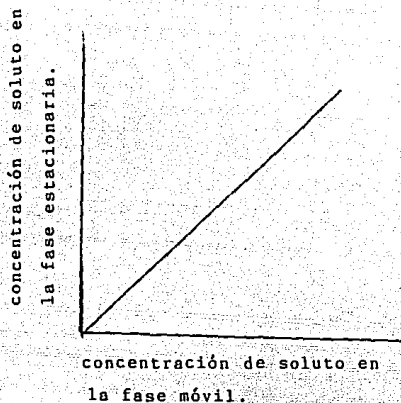


Figura No. 2.- Isoterma de adsorción lineal.

Si al desarrollar una placa se obtienen manchas poco definidas con tendencia al barrido y con forma de gota que cae o se levanta, es porque la isoterma de adsorción no es lineal sino cóncava o convexa.

Es por esta razón que en CCD se busca trabajar a concentraciones en las que la isoterma de adsorción se aproxime a la línea recta. (9).

Los métodos apropiados de separación y detección son parte del equipo para trabajar con mezclas de compuestos químicos, no existe un método universal, ya que una mezcla compleja es some

tida primero a una separación preliminar de sus componentes, por ejemplo: una fracción hidrofílica y una lipofílica, la fracción de interés es entonces subdividida en sus componentes hasta el aislamiento del compuesto en estudio para su identificación y cuantificación final. (8).

La sílica gel y la alumina son adsorbentes inorgánicos que se usan principalmente para separar compuestos lipofílicos teniendo como fase móvil a disolventes no polares. La celulosa se usa generalmente para separar compuestos polares con fase móvil de disolventes polares.

La elección de la fase móvil depende de la naturaleza del compuesto a separar. Las interacciones soluto-fase móvil y soluto-adsorbente están determinadas por el número y naturaleza de los grupos funcionales en el soluto. El grado de interacción del soluto con las fases móvil y estacionaria determina su distribución entre las dos fases.

El éxito en la cromatografía en capa delgada depende en gran medida de la selección adecuada de la fase móvil por lo que deben considerarse algunas recomendaciones:

- Muchos disolventes son higroscópicos y pueden ser afectados por la humedad, por lo que es conveniente almacenarlos en lugares secos y en recipientes bien cerrados.

- Las condiciones y duración de almacenamiento pueden causar deterioro en los disolventes; por lo que debe procurarse no utilizar disolventes viejos.
- La mezcla de disolventes no debe prepararse con mucha anticipación, ya que puede haber interacciones que modifiquen la naturaleza de la mezcla.
- La mezcla de disolventes no debe usarse varias veces, ya que puede variar la composición al evaporarse alguno de los componentes al abrir la cámara cromatográfica. (3,9).

#### FACTORES QUE AFECTAN LA REPRODUCIBILIDAD EN CCD.

La reproducibilidad de un valor de  $R_f$  en CCD se ve afectada por varios factores experimentales; por lo que se debe tener control sobre los factores ambientales durante el manejo y aplicación de la muestra, así como durante el desarrollo del cromatograma.

Es conveniente correr en la misma placa muestras conocidas junto con la desconocida para compensar las variaciones producidas por los siguientes factores:



Grosor de la capa adsorbente. El Rf varía con el grosor de la capa porque el flujo de la fase móvil no es igual en una capa gruesa que en una delgada.

Humedad de la capa adsorbente. El contenido de agua de un adsorbente afecta la actividad, por consiguiente afecta el Rf y la resolución.

Saturación de la cámara cromatográfica. Para lograr reproducibilidad en el valor de Rf es necesario que la cámara cromatográfica esté completamente saturada con la fase móvil.

Temperatura. La temperatura es un factor importante para la reproducibilidad del Rf, ya que un incremento en la temperatura conduce a la evaporación del disolvente y en consecuencia un cambio en el Rf.

Naturaleza del adsorbente. Parámetros tales como el tamaño de partícula y el tamaño de poro deben estar bajo control en el adsorbente para lograr una separación buena y reproducible, ya que ellos controlan las características de flujo de la fase móvil.

Tamaño de la muestra. La concentración de la solución de la muestra puede afectar el Rf y la resolución, cuando se aplica en gran cantidad se obtienen zonas o manchas barridas que son

difíciles de delimitar para obtener el valor de  $R_f$ , además de dificultarse la cuantificación por no tener una mancha bien definida.

Fase móvil. El uso repetido de fase móvil no es recomendable en CCD porque el valor de  $R_f$  puede ser afectado. La volatilidad de los disolventes ocasiona variación en la composición de la fase móvil, por esta razón, la mezcla de disolventes no debe ocuparse para el desarrollo de varias placas. La pureza de los disolventes usados es un factor decisivo para la reproducibilidad de la  $R_f$ 's, ya que las impurezas pueden cambiar la viscosidad y/o la polaridad de la fase móvil. (3,8).

## CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (CLAR)

La cromatografía líquida se puede realizar por dos métodos. El primero es el procedimiento clásico desarrollado por Tswett, o también llamado de columna abierta, donde la fase móvil fluye a través de una columna de vidrio cuyo diámetro varía entre dos y diez cm. rellena de algún material como sílice, alúmina, azúcar, etc..., cuyo tamaño de partícula por lo general es cercano a las 200 micras. Los tamaños de la muestra varían entre 0.1 y 1 g o más. El disolvente o fase móvil fluye por efecto de la gravedad produciéndose apenas una débil presión ejercida por el volumen de la fase móvil que se agrega a la columna. El disolvente se recolecta en la base de la columna en fracciones de determinado volumen. Uno de los inconvenientes de esta técnica es el largo tiempo de análisis requerido que muchas veces puede ser de horas e incluso días, otra desventaja es que el material de relleno se utiliza por lo general una sola vez, debido a que parte de la muestra se adsorbe en forma irreversible. (3,5).

La cromatografía líquida de alta presión utiliza instrumental muy distinto con ventajas significativas. En este método se usan columnas de diámetro muy reducido, por ejemplo: 2 mm. rellenas de materiales cuyas partículas tienen un tamaño de 30 a 40 micras y en ocasiones hasta de 5 micras. Este tipo de columna es muy eficaz, pero ofrece una gran resistencia al flujo de la fase

móvil, o sea una gran caída de presión. Por esta razón es necesario emplear sistemas de bombeo de alta presión (hasta 400 atm) que hagan fluir la fase móvil a una velocidad razonable a través de la columna.

La cantidad de fase estacionaria dentro de la columna es pequeña, por lo que se requiere que la muestra también sea pequeña, del orden de los microgramos. Un detector, colocado a la salida de la columna, proporciona un registro continuo de la composición del líquido que sale, lo que permite obtener un cromatograma similar a los obtenidos en cromatografía de gases y que se utiliza para identificar y cuantificar los componentes de la muestra. Otra ventaja de este método es el escaso deterioro de la columna a pesar de su repetido uso. (3,5).

A pesar de que la cromatografía líquida de alta presión es una técnica relativamente nueva, se cuenta ya con numerosas publicaciones en la literatura química que describen muy diversas aplicaciones. En la mayoría de los casos, éstas consisten en determinaciones de sustancias cuyo análisis por otra técnica cromatográfica resulta muy difícil o imposible. Estas sustancias son:

- a) Compuestos iónicos, como aminoácidos, sales inorgánicas, ácidos orgánicos, etc...

- b) Compuesto de alto peso molecular, como polímeros, hidrocarburos polinucleares, productos naturales, etc...
- c) Compuestos termolábiles y no volátiles, como vitaminas, pesticidas, esteroides, plastificantes, drogas y un número muy grande de otros productos farmacéuticos. (5).

Las ventajas de la cromatografía de líquidos de alta resolución sobre otras formas de cromatografía líquida son:

- Las columnas se deterioran poco a pesar de su uso repetido.
- La resolución lograda es buena.
- Es reproducible.
- Los tiempos de análisis son cortos.
- Es muy sensible.

El costo del equipo, de las columnas y de la fase móvil es muy elevado, sin embargo la inversión es justificable cuando el número de análisis por realizar es grande o cuando no se cuenta con técnicas específicas para un determinado compuesto.

## EQUIPO.

El instrumental apropiado para la cromatografía de líquidos de alta resolución, se perfecciona día a día y hay una amplia gama de ellos en cuanto a costo, versatilidad y complejidad.

En todo tipo de instrumental hay ciertas características de índole general que deben evaluarse al considerar un instrumento dado, ya sea con fines de adquisición o de formarse una idea sobre la utilidad que puede prestar. Dichas características son:

- a) Versatilidad. El instrumento debe ser apto para resolver y trabajar con muestras de diferente tipo.
- b) Rapidez. Para obtener rapidez en el análisis es necesario contar con materiales de relleno de columna de alta eficiencia y que el instrumento posea sistemas de bombeo de alta presión para la fase móvil.
- c) Reproducibilidad y estabilidad. Son características esenciales si se quiere obtener del instrumento un funcionamiento efectivo a largo plazo. El instrumento debe proveer un control adecuado sobre los parámetros de operación.

- d) **Sensibilidad.** La sensibilidad de todo cromatógrafo de líquidos depende sobre todo del sistema de detección que utiliza. Con los adelantos registrados en el diseño de detectores, ahora es posible detectar componentes de la muestra en el intervalo de los microgramas.

La figura No. 3 muestra los componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

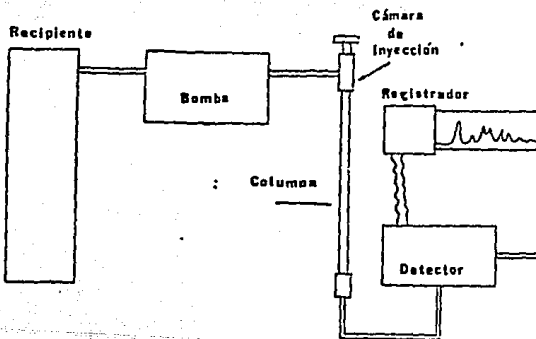


Figura No. 3 Representación de los componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

FASE MOVIL.

Aunque la fase móvil no es parte del instrumental propiamente dicho, el control de la presión, el flujo y la composición de la misma, son muy importantes. Las características que debe presentar toda fase móvil para ser utilizada en cromatografía líquida son las siguientes:

- disolver la muestra.
- no degradar o disolver la fase estacionaria.
- tener baja viscosidad.
- ser compatible con el detector utilizado.
- tener alta pureza.

Muchas veces, en especial con fases móviles polares hay una marcada tendencia del oxígeno y otros gases a disolverse en el líquido. Si estos gases se gasifican dentro del instrumento y forman burbujas, pueden afectar seriamente el funcionamiento del detector y la eficacia de la columna. La fase móvil se degasifica usando vacío o un baño ultrasónico.



### RECIPIENTES DE ALMACENAMIENTO DE LA FASE MOVIL.

Se pueden utilizar recipientes de vidrio, acero inoxidable o plásticos inertes, de una capacidad entre 1 y 3 litros, que en la mayoría de los casos es suficiente volumen para todo un día de operación. (5).

### SISTENAS DE BOMBEO.

Debido a que los materiales que se usan para rellenar las columnas usadas en cromatografía de líquidos de alta resolución tienen un tamaño de partícula muy pequeño, que hace que la resistencia al flujo sea muy elevada, se requiere de un sistema de bombeo que haga fluir la fase móvil a un flujo razonable, pues de lo contrario los análisis serían excesivamente lentos.

De acuerdo con las características de funcionamiento y de diseño se pueden considerar básicamente dos tipos de bombas:

- Bombas mecánicas.
- Bombas neumáticas.

### CAMARAS DE INYECCION.

Esta parte del instrumento exige cuidadoso diseño puesto que debe resistir altas presiones, tener un volumen pequeño y sus cavidades deben ser bien barridas por la fase móvil. Es en estas cámaras donde se introduce la muestra que luego es arrastrada a la columna. Hay tres modalidades distintas de introducir la muestra:

- por medio de jeringas de alta presión.
- por medio de válvulas inyectoras, y
- suspendido el flujo momentáneamente.

### PROGRAMADORES DE FASE MOVIL.

Esta técnica consiste en cambiar la composición de la fase móvil conforme transcurre el análisis. Por lo general, se utilizan dos disolventes de diferente polaridad y se varía el porcentaje de disolvente más polar en la mezcla binaria.

Desde el punto de vista instrumental, el programador de fase móvil es un dispositivo muy complejo que puede resultar tan costoso como el instrumento mismo. Básicamente hay programadores de dos clases:

- 1) Programadores que efectúan el mezclado en un cámara.
- 2) Programadores de mezclado en corriente.

### COLUMNA.

En todos sistema cromatográfico, ya sea en fase líquida o gaseosa la columna es el corazón del sistema, puesto que en ella se lleva a efecto la separación de los componentes de la mezcla en estudio.

Básicamente la columna consiste en un segmento de tubo de algún material inerte, de diámetro uniforme y capaz de resistir altas presiones. De entre todos los materiales, el acero inoxidable es el más usado. En algunos casos se ha usado vidrio de paredes gruesas, pero tiene el inconveniente de no permitir conexiones metal-vidrio herméticas a altas presiones.

La longitud de la columna varía entre 15 cm. y varios metros y el diámetro en la mayoría de los casos, entre 2 y 3 mm., aunque puede ser de hasta 9 mm. Con respecto a la forma o geometría de la columna, por regla general, se prefieren las rectas. (5).

Los materiales usados para empear la columna son de dos tipos: superficialmente poroso o pelicular y totalmente poroso.

El adsorbente pelicular consiste de partículas esféricas generalmente vitreas, no porosas, recubiertas de una capa muy fina de adsorbente poroso, como gel de sílice o alúmina. El espesor de esta capa es 1/40 del diámetro total de la partícula. Las moléculas del soluto pueden penetrar a la capa superficial pero no al soporte sólido.

El adsorbente totalmente poroso tiene un tamaño de partícula desde 3 micras hasta 20 micras y su distribución de tamaño de partícula perfectamente controlada. Tiene una amplia superficie para interaccionar con los solutos y tiene un tamaño promedio de poro de aproximadamente  $80 \text{ \AA}$  que permite que la mayoría de las sustancias se difundan dentro de los poros. La sílica gel es el material que se usa con mayor frecuencia.

La sílica gel puede ser usada como tal para cromatografía de adsorción, pero con mayor frecuencia se enlazan fases líquidas químicamente a la superficie de adsorbente para realizar cromatografía líquido-líquido. (3,5).

#### DETECTOR.

Durante mucho tiempo el desarrollo de la cromatografía en fase líquida se vio obstaculizado por falta de detectores adecuados. El detector ideal sería aquél que satisficiera los si-

guientes requisitos: altamente sensible, estable, de lectura continua y de respuesta universal.

Hace falta un cierto dispositivo que mida en forma continua alguna propiedad fisicoquímica de los componentes de la muestra o de la solución que los contiene y que genere una señal proporcional a la concentración de la muestra a medida que ésta sale de la columna.

Al considerar un detector en términos de aplicación a un cierto problema, deben tenerse en cuenta ciertas propiedades generales tales como:

- |              |  |
|--------------|--|
| Respuesta    | Puede ser universal o selectiva, según la capacidad que tenga el detector de trabajar con todo tipo de muestras o sólo con uno específico .  |
| Sensibilidad | Defínase la sensibilidad de un detector como la razón entre la señal generada y la cantidad de muestra que produce dicha señal.  |
| Ruido        | Es la variación en la señal del instrumento que no es atribuida a la muestra y que puede ser producida por fallas electrónicas, variaciones de flujo o temperatura, fluctuaciones en el voltaje, burbujas de aire atrapadas en el detector, etc... |

**Linearidad** Para utilizar la señal generada por el detector como una medida cuantitativa, dicha señal debe guardar una relación lineal con la concentración de la muestra, esta propiedad se conoce como linealidad.

El intervalo lineal de un detector se puede definir como la razón entre las concentraciones máximas y mínimas respecto a las cuales la respuesta del detector es lineal.

**Estabilidad** Un buen detector debe ser insensible a los cambios de temperatura y a la variación de flujo a la vez de ser compatible con programaciones de fase móvil.

Actualmente existen dos tipos de detectores de uso muy generalizado que se describen a continuación:

- Detector de índice de refracción
- Detector de absorción de luz ultravioleta

**REGISTRADORES** Su función es representar en un registro gráfico la señal dada por el detector. Generalmente se -

utilizan registradores potenciométricos de 1 ó 10 milivolt. Otras características deseables de los registradores son respuesta rápida de la pluma y velocidad variable del papel. (5).

### ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO.

La cromatografía líquida es en esencia una técnica de separación y no de identificación, y aunque es posible obtener alguna información de tipo cualitativo, en general siempre se requiere de alguna técnica no cromatográfica para efectuar la identificación certera de un compuesto determinado.

El análisis cuantitativo de mezcla de sustancias siempre ha sido fácil efectuar mediante cualquier técnica cromatográfica con resultados válidos.

En general, todo análisis cuantitativo puede dividirse en varias etapas:

- muestreo
- separación y detección
- integración de las señales
- cálculo de la composición
- interpretación estadística

La tercera etapa, integración de las señales, se lleva a cabo por diversas técnicas que varían en cuanto a complejidad y exactitud. El propósito de esta etapa es transformar de alguna forma la intensidad de las señales emitidas por el detector en medidas que puedan relacionarse con la cantidad de muestra. Las señales obtenidas, en la mayoría de los detectores, aparecen en el registrador como picos de forma aproximadamente "gaussiana" cuya altura o área se utiliza como una medida de tipo cuantitativo.

Las técnicas manuales e instrumentales que se conocen para integrar son las siguientes:

- a) Altura por el ancho a la mitad de la altura.
- b) Altura del pico.
- c) Triangulación.
- d) Cortar y pesar.
- e) Planímetro.
- f) Integradores de disco.
- g) Integradores electrónicos.



En el cálculo de la composición se lleva a cabo por los siguientes métodos:

- a) Normalización de las áreas.
- b) Calibración externa.
- c) Uso de un patrón interno.

a) Normalización de las áreas. Se supone que cada sustancia de la mezcla inyectada produce un pico separado en el cromatograma. El peso del material en cualquiera de los picos, se calcula determinando la relación del área del pico con la suma total de las áreas de todos los picos y multiplicando ésta - por el peso total de soluto en la cantidad inyectada.

b) Calibración externa. Consiste en comparar el área correspondiente a cantidades conocidas de la sustancia en la mezcla y cuya concentración se desea determinar. Se procede inyectando en el cromatógrafo cantidades exactas de la solución del compuesto problema y se obtienen las áreas de los picos correspondientes. A partir de estos datos se hace un gráfico de calibración en que se representa la concentración en función del área del pico; a continuación se inyecta un cierto volumen de la muestra de composición desconocida, se determina el área del pico obtenido y se encuentra su concentración

por interpolación.

- c) Patrón interno. Consiste en comparar la relación entre áreas obtenidas del compuesto problema y del patrón interno con diversas concentraciones del compuesto problema.

A la mezcla problema se le agrega una cantidad conocida de una sustancia que sirve de patrón interno y se determina la relación de las áreas (muestra/patrón). Se efectúa así la lectura de la composición de la muestra en el gráfico de calibración.

Las diferencias entre un patrón interno y un externo son las siguientes:

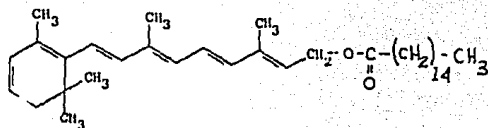
Un patrón externo es exactamente el mismo compuesto que se desea cuantificar; el patrón interno puede tener una estructura semejante. En cuanto a la potencia, la del patrón externo debe ser exactamente conocida, pero la del patrón interno no es necesario conocerla. El método del patrón externo se tiene que cuidar de muchos detalles como la precisión de los volúmenes que se inyectan al cromatógrafo, el método del patrón interno no requiere inyectar volúmenes de muestra con mucha precisión, además muchos otros errores como por ejemplo: recuperación de la muestra y variaciones instrumentales, se ven compensados porque tanto el problema como el patrón interno se analizan en las mismas condiciones. (3,5).

## CAPITULO III

## MONOGRAFIA DEL PALMITATO DE VITAMINA A

NOMBRES QUIMICOS Y SINONIMOS

3, 7-dimetil - 9 - (2,6,6- trimetil - 1 - ciclohexen - 1 -,11)- 2,4,6,8-nonatetraen- 1 Palmitato; Arovit. (14).

FORMULA DESARROLLADAFORMULA CONDENSADA

C<sub>36</sub> H<sub>60</sub> O<sub>2</sub>

PESO MOLECULAR

524.86

### ORIGEN

Es el éster preponderante en aceites de hígado de pescado. (15).

### DESCRIPCION

Forma cristalina o amorfa, puede ser diluida en aceites. La forma líquida es un aceite de color que varía del amarillo claro o rojizo, que puede solidificar bajo refrigeración. Puede ser casi inodora o con ligero olor a pescado, pero no debe tener olor ni sabor a rancio. Es inestable cuando se expone al aire y a la luz. (16,17).

### SOLUBILIDAD

Insoluble en agua o glicerol, soluble en alcohol absoluto, metanol, cloroformo, éter, éter de petróleo, grasas y aceites. (14).

### ENSAYOS DE IDENTIDAD

A. Adicionar Tricloruro de Antimonio; aparece un color azul que desaparece inmediatamente. (15,17).

B. El espectro de absorción en el rango de 300 a 400 nm exhibe inflexión cerca de 332 nm y máximos a 348, 367 y 389 nm - (16);  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 975$  (14).

C. Cromatografía en capa delgada. La mancha azul que se forma indica la presencia de retinol. Los valores de Rf aproximados de las manchas predominantes, corresponden a las diferentes formas de retinol que son en forma de acetato 0.45 y como palmitato 0.7 (15,17).

VALOR DE ACIDEZ No más de 2.0 (16)

VALOR DE PEROXIDO No más de 1.4 ml de tiosulfato de sodio 0.01 N es consumido. (16).

### RETINOL

La fluorescencia de cualquier mancha que corresponda al retinol en los cromatogramas obtenidos con la muestra no será más intensa que la de la mancha obtenida con el retinol (15,17).

### RELACION DE ABSORBIENCIAS

La relación entre la absorbancia corregida observada  $A_{325}$  y la de la absorbancia  $A_{325}$  determinada como se indica en la valoración de vitamina A; es cuando menos 0.85. (15,17).

RANGO DE FUSION 28 C a 29 C. (14).

VALORACION

Saponificar la muestra con hidróxido de potasio y alcohol refluendo durante 30 minutos. Extraer con éter etílico; posteriormente lavar los extractos reunidos con agua. Transferir el extracto a un matraz volumétrico de 250 ml. Tomar una alícuota y hacer las diluciones necesarias hasta obtener una solución cuya concentración estimada sea de 3 a 5 mcg de vitamina A por mililitro. La última dilución se hace usando como disolvente alcohol isopropílico. Determinar la absorbancia de la solución a 310,325 y 334nm (15,17).

PORCION HIDROGENADA

Después de hidrogenar una alícuota de la solución obtenida para la valoración, no aparece un color azul al adicionar tricloruro de antimonio S. R.. De la porción hidrogenada hacer una dilución en alcohol isopropílico cuya concentración estimada de vitamina A sea de 3 a 5 mcg/ml. Determinar las absorbancias de la solución a 310,325 y 334 nm.

CALCULOS

El contenido de vitamina A en mg. se calcula por medio de la fórmula  $0.549 A_{325}/LC$  donde  $A_{325}$  es la absorbancia observada a 325 nm, L es la longitud de la celdilla en cm y C es la cantidad de la muestra expresada en g en 100 ml de la solución final en alcohol isopropílico, siempre que  $A_{325}$  tenga un valor entre  $(A_{325})/1.03$  y  $(A_{325}/0.970)$ ; donde  $(A_{325})$  es la absorbancia corregida a 325 nm y está dada por la ecuación:

$(A_{325})=6.815A_{325}-2.555A_{310}-4.260A_{334}$ ; en la que A es la absorbancia a la longitud de onda indicada por los subíndices.

En los casos donde  $(A_{325})$  tenga un valor menor de  $-----$   
 $A_{325}/1.03$  se aplica la siguiente ecuación: Contenido en  $-----$   
 mg= $0.549 A_{325}/LC$  cuyas equivalencias ya se indicaron.

La discrepancia que puede aceptarse en los resultados de diferentes laboratorios a  $P=0.05$  es aproximadamente  $\pm 8\%$  (15).

EMPAQUE Y ALMACENAMIENTO

Se conserva en contenedores herméticamente cerrados, de preferencia bajo atmósfera de nitrógeno y protegidos de la luz.

## MARBETES

Deben indicar la forma de la vitamina, la substancia conservadora (si contiene) así como las sustancias empleadas como dispersantes, antioxidantes o cualquier otra que se haya agregado e incluir la actividad de la vitamina A equivalente a la cantidad de retinol, en mg. por g. y en unidades internacionales de vitamina A.

Una unidad internacional de vitamina A es la actividad biológica específica de 0.3 mcg. de todos los isómeros trans del retinol (15,17).

## TOXICOLOGIA

El cuadro de intoxicación por vitamina A no es frecuente, siendo necesarias grandes dosis para producirlo, se ha observado en niños pequeños que la recibían (100,000 a 300,000 unidades internacionales por día) durante meses y alguna vez en los adultos con dosis de 600,000 unidades internacionales por día durante años.

En los lactantes, los síntomas de hipervitaminosis A consisten en la aparición de nódulos subcutáneos duros y dolorosos en los antebrazos, pies y cabeza, además hepatoesplenomegalia



densificación ósea con hiperostosis, detención del crecimiento óseo y en general, anorexia, piel seca y una concentración alta de vitamina A en la sangre. Se ha observado aumento de presión intracraneana con hidrocefalia y vómito. En los adultos los síntomas consisten en pigmentación cutánea, hiperqueratosis, alopecia, prurito, anorexia y dolores osteoarticulares. En los animales dicha hipervitaminosis se manifiesta por rarefacción ósea, alopecia, hiperostosis, retardo del crecimiento, engrosamiento cutáneo, anorexia y hemorragias; en ratas preñadas se ha descrito una acción teratogénica, con producción de deformaciones esqueléticas en el feto. (10).

#### CATEGORIA TERAPEUTICA

Vitamina antixeroftálmica. (14).

#### USOS

Se sugiere en los casos de nictalopia, queratosis y sobre todo xeroftalmia. (10).

#### CONTRAINDICACIONES

Hipervitaminosis A y pacientes hipersensibles a la vitamina A.

DOSIS

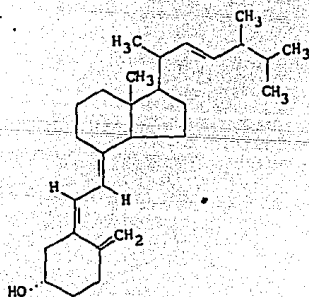
Por vía oral: adultos 50,000 unidades internacionales  
por día.

niños 25,000 a 50,000 unidades inter-  
nacionales dia-  
rias. (10).

## MONOGRAFIA DEL ERGOCALCIFEROL

NOMBRES QUIMICOS Y SINONIMOS

9,10 - Secoergosta - 5,7,10 (19), 22 - tetraen - 3 B-ol;  
 9,10 Secoergosta - 5,7 - 10 (19), 22 tetraen - 3 - ol, (3B, 5Z,  
 7E, 22E) -Ergocalciferol; 24 metil - 9,10 - secocolesta - 5,7,10(19)  
 ,22 tetraen - 3-ol. Ergosta irradiada -5,7,22 -trien- 3-beta- ol;  
 calciferol, ergocalciferol, oleovitamina D<sub>2</sub>, Ergosterol irradiado,  
 vitamina D<sub>2</sub>, ergosterol activado; viosterol, Drisdol, D-tracetten,  
 Di vit Urto, Ostelin, condol, Ergorone, Daritin, Metadee, Mina D<sub>2</sub>,  
 Mulsiferol; Mykostin, Radstevin, Shockferol; Dee-Ron, Decaps, Del  
 talin; De Rat; Deratol; Detalup; Diactol; Doral; Vit-D; Ertron;  
 Infron; Radiostol; Sterogyl; Fortodyl (14,15,16,17 y 18).

FORMULA DESARROLLADA

FORMULA CONDENSADAPESO MOLECULAR

396.63

ORIGEN Y PREPARACION

La vitamina D existe exclusivamente en el reino animal, siendo las fuentes más importantes los aceites de hígado de pescado. Se prepara de manera sintética por irradiación ultravioleta del ergosterol, que se extrae de la levadura. (10).

DESCRIPCION

Cristales blancos o polvo cristalino blanco inodoro.

SOLUBILIDAD

Insoluble en agua, soluble en 2 partes de alcohol; en 2 partes de éter; en 0.7 partes de cloroformo y en 10 partes de acetona, ligeramente soluble en aceites vegetales. (14, 16 y 17).

ENSAYOS DE IDENTIDAD

A. El espectro de absorción infrarrojo de una dispersión de la muestra en bromuro de potasio, en la escala de 2 a 12  $\mu$  exhibe máximos solamente a las mismas longitudes de onda que una preparación igual de ergocalciferol patrón de referencia.

B. El espectro de absorción ultravioleta, exhibe máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda que una solución patrón de referencia.

C. Al adicionar ácido sulfúrico y anhídrido acético se produce una coloración roja brillante que cambia rápidamente a verde, pasando por violeta y azul.

D. El derivado dinitrobenzoilo funde entre 147° y - 149°C (15,16,17).

E. Se produce un color rojo al adicionar tricloruro de antimonio (16).

F. Usando una solución de cloruro de yodo-etileno se produce una reacción con el ergocalciferol que da un color amarillo intenso. (18).

G. Cromatografía en capa delgada. El cromatograma obtenido con la solución de la muestra exhibe un área color naranja amarillento (ergocalciferol) y tiene el mismo Rf que el área de ergocalciferol de la solución patrón y puede mostrar un área color violeta bajo el área del ergocalciferol. El color violeta será menos intenso que el área violeta en el cromatograma obtenido de la solución de ergosterol. (15).

RANGO DE FUSION 115° y 119° C (15)

ROTACION ESPECIFICA

De + 103° a +106° determinada en una solución en alcohol que contenga 150 mg de muestra por cada 10 ml (14).

ERGOSTEROL

Al adicionar digitonina y dejar reposar durante 18 horas; no se forma precipitado. (17).

SUSTANCIAS REDUCTORAS

La absorbancia es cuando más, igual a la de una solución que contiene 0.2 mcg por ml de hidroquinona en alcohol deshidratado, tratada en igual forma. (15,17).

### VALORACION

El ergocalciferol contiene no menos de 97.0% y no más de 103.0% de  $C_{22}H_{44}O$  determinado por cromatografía de líquidos de alta resolución. (15,17).

### EMPAQUE Y ALMACENAMIENTO

Conservar el ergocalciferol en recipientes herméticamente sellados, protegidos de la luz y el oxígeno atmosférico; almacenar en lugares fríos. (15,17).

### MARBETE

Debe indicar la potencia del ergocalciferol. El ergocalciferol contiene en 1 mg 40 000 unidades de actividad antirraquítica. (10,15,17).

## TOXICOLOGIA

El ergocalciferol a dosis altas es capaz de provocar reacciones adversas debido esencialmente a la producción de hipercalcemia; se considera como tóxica una dosis de 150,000 unidades internacionales por día. (10).

Las manifestaciones principales de la hipervitaminosis D son digestivas, nerviosas, renales, óseas y metabólicas.

1. Los trastornos digestivos son la anorexia, vómitos, diarrea, siendo los primeros en aparecer.
2. Los síntomas nerviosos y generales consisten en la-  
situd, debilidad muscular, mareos, cefalea, palidez,  
emaciación.
3. Los trastornos renales son la albuminuria, nicturia  
y retención nitrogenada (insuficiencia renal).
4. Las alteraciones óseas consisten en osteoporosis,  
revelable radiológicamente; a pesar de la calcifi-  
cación de la metáfisis, se produce decalcificación  
de la diáfisis.



5. Las modificaciones metabólicas son la hipercalcemia e hipercalciuria, siendo conveniente la determinación del calcio en el plasma sanguíneo y en la orina a intervalos frecuentes cuando se suministran dosis altas de vitamina D.

El tratamiento consiste en la supresión de la administración del preparado, cediendo generalmente los síntomas, pues las alteraciones son reversibles, si no están muy avanzadas. (10).

#### CATEGORIA TERAPEUTICA

Vitamina antirraquitica.

#### USOS

La administración de la vitamina D previene y cura rápidamente el síndrome de carencia de dicha vitamina, tanto en los animales, como en el hombre.

En el hombre tanto el raquitismo infantil como la osteomalacia del adulto son prevenidos y rápidamente curados por la vitamina D (10).

### CONTRAINDICACIONES

La vitamina D está contraindicada en hipervitaminosis de vitamina D y en pacientes hipersensibles a la misma. (10).

### DOSIS

En la prevención del raquitismo, no más de 20 mcg. 800 unidades internacionales) diariamente.

En el tratamiento del raquitismo y osteomalacia; 0.125 a 1.25 mg. (5,000 a 50,000 unidades internacionales) diariamente.

En el tratamiento de hipoparatiroidismo 1.25 a 5 mg. (50,000 a 200,000 unidades internacionales) diariamente. (16).

El método que se menciona en la monografía para la valoración del palmitato de vitamina A tiene la desventaja de no ser específico e indicador de estabilidad, además de que el tiempo de análisis es prolongado.

En cuanto al método para el análisis cuantitativo del ergocalciferol, se describió un método por cromatografía de líquidos de alta resolución, pero este método no puede ser empleado para valorar el ergocalciferol cuando está en tan pequeña cantidad en una formulación, en la que además hay otros principios activos en una proporción de aproximadamente 1:12.5 con respecto a la vitamina A, como es el caso de la solución oral para la cual se desarrollaron los métodos que se describen en el siguiente capítulo.

## CAPITULO IV

## PARTE EXPERIMENTAL

Los fármacos en estudio son el palmitato de vitamina A y el ergocalciferol, formulados en una solución oral que contiene 5,000 y 400 unidades internacionales por mililitro respectivamente.

El trabajo experimental consiste en la determinación cromatográfica del palmitato de vitamina A y del ergocalciferol en muestras preparadas recientemente y almacenadas a temperatura ambiente.

Para la determinación del palmitato de vitamina A, se emplea el método de cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa, en el cual se usa una columna microbondapak C<sub>18</sub> y como fase móvil acetonitrilo para la separación; el fármaco se cuantifica por relación de las áreas obtenidas de los picos del palmitato de vitamina A y del ergocalciferol usado como referencia interna, tanto para el problema como para la solución de referencia.

Para la cuantificación del ergocalciferol se emplean dos métodos cromatográficos: A) El método de cromatografía en

capa delgada, que consiste en una separación utilizando una fase estacionaria de sílica F<sub>254</sub> y una fase móvil ciclohexano: éter (1 : 1).

B) El método de cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa, en el que se usa una columna microbondapak C<sub>18</sub> y como fase móvil metanol: agua (98:2) para la separación; posteriormente el fármaco se cuantifica por relación de las áreas obtenidas de los picos del ergocalciferol y del acetato de vitamina E usado como referencia interna, tanto para el problema como para la solución de referencia.

DETERMINACION CUANTITATIVA DEL PALMITATO DE VITAMINA-A EN UNA SOLUCION ORAL DE 5,000 U.I./ML. POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

### APARATOS

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución que consta de los siguientes módulos: Dupont Instruments Column Compartment, Dupont Instruments UV Spectrophotometer y Dupont Instruments 870 Pump Module. Equipado con un registrador Hewlett - Packard modelo 3390 A, columna microbondapak C<sub>18</sub> de 30 cm. de longitud x 3.9 mm. de diámetro interno (Waters Associates), baño ultrasónico Mettler Electronics Ultrasonic, Corp. Ultrasonic Cleaner, balanza analítica Mettler modelo H 35AR.

### MATERIALES

Equipo de filtración Millipore, membranas Millipore tipo F.G. de 0.2 micras; matraz Kitasato de 1,000 ml., matraces volumétricos de vidrio rojo de 25, 50, 100 ml., pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, 5, 10 y 20 ml., vasos de precipitado de 400 ml., tubos de vidrio con tapón de rosca.

REACTIVOS

Acetonitrilo Lichrosolv (Merck)

Alcohol etílico absoluto (Baker)

SOLUCION DE REFERENCIA INTERNA

Pesar exactamente alrededor de 500 mg de ergocalciferol y transferirlos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 ml y disolverlos con 10 ml de alcohol etílico absoluto y aforar con acetonitrilo Lichrosolv Concentración  $\pm$  5 mg/ml.

SOLUCION PATRON DE REFERENCIA

Pesar exactamente alrededor de 420 mg de patrón secundario del palmitato de vitamina A (50 099.67 U.I./340 mg) en un matraz volumétrico de 100 ml, agregar 70 ml de agua destilada y colocarlo en el baño ultrasónico durante 15 minutos; dejar enfriar la solución y llevar a volumen con agua destilada. Tomar una alícuota de 2 ml y transferir a un matraz volumétrico de 100 ml, agregar volumétricamente 20 ml de la solución de referencia interna, agitar y llevar a volumen con acetonitrilo Lichrosolv. Concentración del palmitato de vitamina A  $\pm$  12.38 UI/ml; concentración del ergocalciferol  $\pm$  1 mg/ml.

## PROCEDIMIENTO

### PREPARACION DE LA MUESTRA

Transferir cuantitativamente 3 ml de la solución oral a un matraz volumétrico de 25 ml, dejar drenar perfectamente la pipeta; llevar al volumen con agua destilada. Tomar con pipeta volumétrica 1.0 ml de la solución y transferirla a un matraz volumétrico de 50 ml. Agregar 10 ml. de la solución de referencia interna, agitar y llevar al volumen con acetonitrilo Lichrosolv - Concentración del palmitato de vitamina A  $\pm$  1.0 mg./ml.

Inyectar la solución de referencia externa por duplicado hasta que la relación del área de los picos no presente una variación mayor del 2%; continuar de la misma manera con las soluciones de la muestra.

Inyectar la solución de referencia externa cada seis inyecciones de la solución de la muestra para asegurar la estabilidad del sistema. Al final deberá inyectarse la solución de referencia externa.

#### Condiciones para el cromatógrafo de líquidos:

Temperatura: ambiente.

Fase móvil\*: acetonitrilo Lichrosolv.



Velocidad de flujo: 2ml./minuto.  
 Presión:  $\pm$  50 BAR.  
 Detector: 325 nm.  
 Sensibilidad: 0.04 UAET.

\* La fase móvil debe ser filtrada a través de filtro millipore tipo Fg de 0.22 micras y degasificada durante 15 minutos en un baño ultrasónico o con vacío.

Tiempo de retención aproximado:

Ergocalciferol: 5.37 minutos.  
 Palmitato de vitamina A: 13.60 minutos.

Condiciones para el integrador:

Cero (Zero)	0.0
Atenuación (ATT 2f)	3.0
Velocidad de la carta (CHT SP)	0.5
Amplitud del pico (PK WD)	0.16
Umbral de integración (THRSH)	3.0
Area de rechazo (AR REJ)	0.0

CALCULOS:

Determinar la relación del área de los picos del palmitato de vitamina A: ergocalciferol para cada inyección y calcular la relación promedio para cada referencia externa y muestra.

$$\text{Relación del área de la muestra} = \frac{\text{Área del palmitato de vitamina A}}{\text{Área de la referencia interna}}$$

= X

$$\text{Relación del área de la referencia externa} = \frac{\text{Área del palmitato de vitamina A}}{\text{Área de la referencia interna}}$$

$$\frac{\text{vitamina A}}{\text{interna}} = Y$$

Calcular el contenido de palmitato de vitamina A con la siguiente fórmula:

$$\text{U.I. palmitato de vitamina A/ml.} = \frac{X \text{ promedio U.I. de referencia}}{Y \text{ promedio}} \times 3$$

externa x 0.25

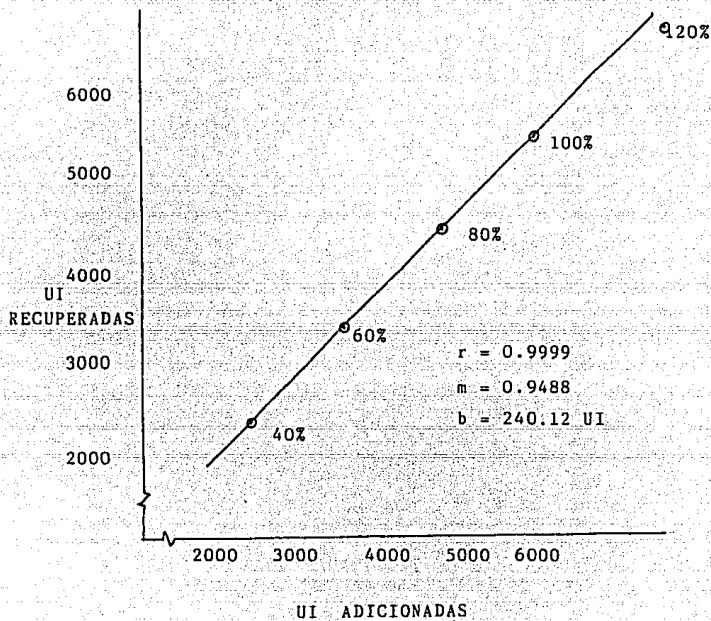
U.I. = Unidades internacionales.

LINEARIDAD DEL METODO PARA LA DETERMINACION DEL PALMITATO DE VITAMINA A EN UNA SOLUCION ORAL POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

Con el objeto de determinar si la relación entre los mg agregados y los mg recuperados es lineal en un determinado rango de concentraciones, se analizaron placebos a los que se les adicionó cantidades conocidas del principio activo, correspondientes a aproximadamente al 40, 60, 80, 100 y 120% de la cantidad etiquetada.

Los resultados se muestran en la Figura 1.

Figura No. 1 Linearidad



% correspondiente	UI Adicionadas*	UI Recuperadas**	% Recuperado
40	2175.55	2284.23	105.00
60	3263.32	3357.12	102.87
80	4351.10	4383.89	100.75
100	5438.87	5385.40	99.29
120	6664.77	6561.52	98.48

\* adicionadas a 3 ml de placebo

\*\* los resultados reportados son el promedio de dos muestras por nivel manejado.

EVALUACION ESTADISTICA DEL METODO PARA LA DETERMINACION DEL PALMITATO DE VITAMINA A EN UNA SOLUCION ORAL QUE TAMBIEN CONTIENE ERGOCALCIFEROL; POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

Se evaluó la exactitud y precisión del método. La precisión se determinó de dos diferentes maneras; como repetición y como reproducibilidad. Para determinar la exactitud y repetición se efectuó el análisis estadístico de los resultados obtenidos al analizar 15 placebos a los que se les adicionó cantidades conocidas del palmitato de vitamina A; para determinar la reproducibilidad se analizaron 12 muestras del producto en dos diferentes días por dos analistas.

Los resultados se presentan en las tablas 1 y 2.

Tabla No. 1

EXACTITUD Y REPETICION DEL METODO PARA LA DETERMINACION DEL PALMITATO DE VITAMINA A EN UNA SOLUCION ORAL POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

% correspondiente	UI adicionadas*	UI recuperadas	% recuperado
80	3771.99	3807.09	100.93
80	3771.99	3902.77	103.47
80	3771.99	3897.99	103.34
80	3771.99	3844.38	101.92
80	3771.99	3791.04	100.51
100	4714.98	4746.19	100.66
100	4714.98	4711.00	99.92
100	4714.98	4794.38	101.68
100	4714.98	4658.23	98.79
100	4714.98	4605.50	97.68
120	6776.48	6782.94	100.09
120	6776.48	6867.85	101.35
120	6776.48	6821.82	100.67
120	6776.48	6795.08	100.27
120	6776.48	6899.44	101.81

$$\bar{x} = 100.87\%$$

$$s = 1.52\%$$

$$IC_{95\%} ( 99.99\% < \mu < 101.75 ) \%$$

$$CV = 1.51\%$$

\* adicionadas a 3 ml de placebo

Tabla No. 2

REPRODUCIBILIDAD DEL METODO PARA LA DETERMINACION DEL PALMITATO DE VITAMINA A EN UNA SOLUCION ORAL POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

Día 1	Analista	UI / ml encontradas
	1	4509.17
	1	4517.67
	1	4543.55
	2	4477.53
	2	4526.65
	2	4432.42
Día 2		
	1	4667.05
	1	4487.86
	1	4651.81
	2	4589.25
	2	4577.03
	2	4564.84

$$\bar{x}_{\text{Total}} = 4545.40 \quad S_{\text{Total}} = 69.11 \quad CV_{\text{Total}} = 1.52\%$$

Reproducibilidad interanalista

$$\bar{x}_A = 4501.17 \quad S_A = 40.17 \quad CV_A = 0.89\%$$

Reproducibilidad interdía

$$\bar{x}_D = 4527.95 \quad S_D = 61.96 \quad CV_D = 1.37\%$$



ESPECIFICIDAD DEL METODO PARA LA DETERMINACION DEL PALMITATO DE VITAMINA A EN UNA SOLUCION ORAL POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

Para establecer la especificidad del método se colocaron muestras de palmitato de vitamina A, placebo de palmitato de vitamina A y formulación completa durante 20 días a 60°C y a condiciones ambientales normales durante 6 meses.

Las muestras degradadas y las almacenadas a condiciones ambientales normales se analizaron con el método desarrollado. Al analizar el placebo almacenado a condiciones ambientales, se obtuvo un cromatograma que solo mostró dos picos correspondientes a los excipientes de la formulación, a tiempos de retención diferentes a los del palmitato de vitamina A y de la referencia interna; por lo que se puede decir que el placebo no causa interferencia en la detección del palmitato de vitamina A; el cromatograma se muestra en la figura No. 3.

Al analizar la formulación almacenada en condiciones ambientales normales durante 6 meses se obtuvo un cromatograma como se ve en las figuras 5 y 12; en donde aparecen dos picos pequeños adicionales a los de los excipientes, lo que indica que hubo poca degradación y los productos de degradación no interfieren en la detección del palmitato de vitamina A.

El placebo almacenado a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 20 días, no presentó diferencias con el cromatograma obtenido del placebo almacenado a condiciones ambientales. Los cromatogramas se muestran en las figuras 6 y 10.

Al analizar la formulación almacenada a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 20 días, se obtuvo un cromatograma (Figura 9) muestra un pico ( $T_r = 1.92$ ) que corresponde a algún producto de degradación, el cual no cause ninguna interferencia al palmitato de vitamina A.

La materia prima se colocó a estabilidad acelerada durante 20 días a  $60^{\circ}\text{C}$ ; el cromatograma obtenido es semejante al de la figura No. 11 en donde sólo aparece un producto de degradación el cual no interfiere en la determinación del palmitato de vitamina A.

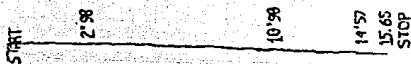


Figura No. 2 Blanco. Cromatograma obtenido para el disolvente.

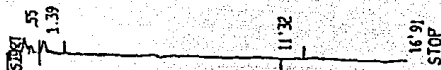


Figura No. 3. Cromatograma obtenido para el placebo de la formulación almacenado durante 6 meses en condiciones ambientales normales.

Producto	Tiempo de retención
excipientes	0.55
	1.39

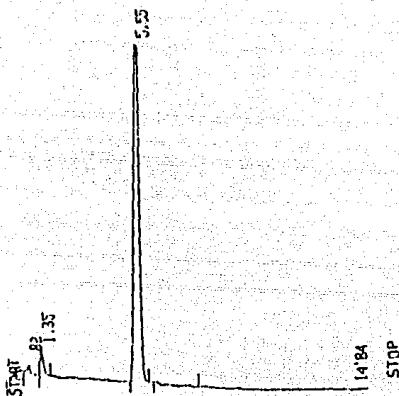


Figura No. 4. Cromatograma obtenido para el placebo con solución de referencia interna.

Compuesto	Tr*
Ergocalciferol	5.55

\* Tr = tiempo de retención.

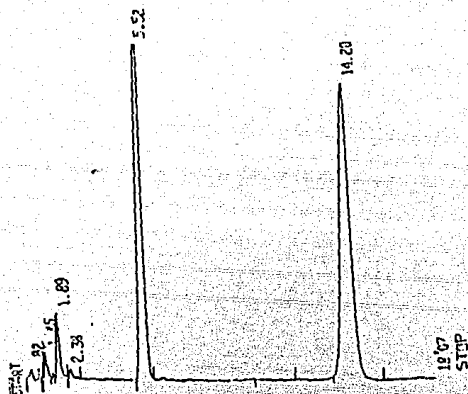


Figura No. 5. Cromatograma obtenido para la formulación completa almacenada durante 6 meses a temperatura ambiente.

Compuesto	Tr
Ergocalciferol	5.52
Palmitato de vitamina A	14.20

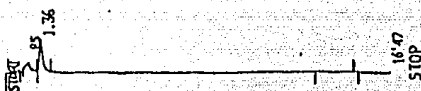


Figura No. 6. Cromatograma obtenido para el placebo degradado a 60°C durante 20 días.

Compuesto	Tr
excipientes	0.85
	1.36

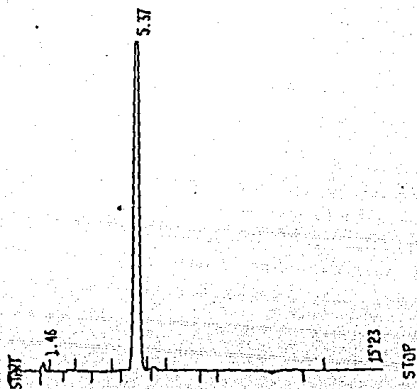


Figura No. 7. Cromatograma obtenido para la solución de referencia interna.

Compuesto	Tr
ergocalciferol	5.37

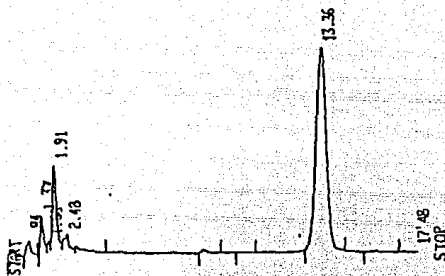


Figura No. 8. Cromatograma obtenido para la formulación completa degradada a 60°C durante 20 días.

Compuesto	Tr
excipientes	0.84 y 1.37
productos de degradación	1.66, 1.91 y 2.48
palmitato de vitamina A	13.36



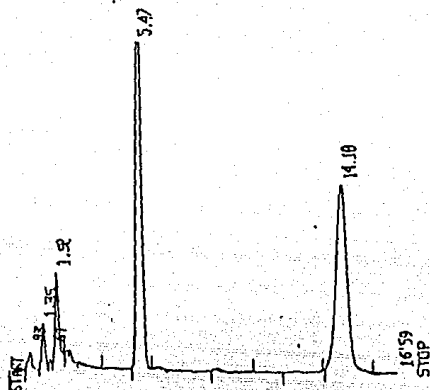


Figura No. 9. Cromatograma obtenido de la formulación completa degradada a 60°C durante 20 días + solución de referencia interna.

Compuesto	Tr
excipientes	0.83 y 1.35
productos de degradación	1.92
ergocalciferol	5.47
palmitato de vitamina A	14.10

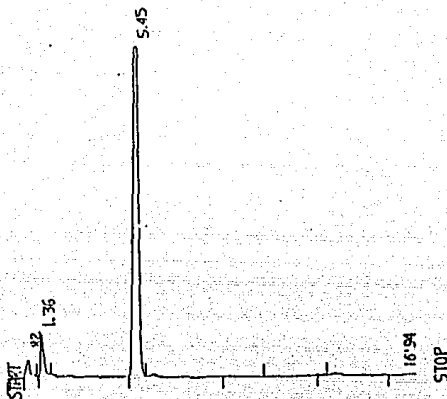


Figura No. 10. Cromatograma obtenido para el placebo almacenado a 60°C durante 20 días + solución de referencia interna.

Compuesto	Tr
excipientes	0.82 y 1.36
ergocalciferol	5.45

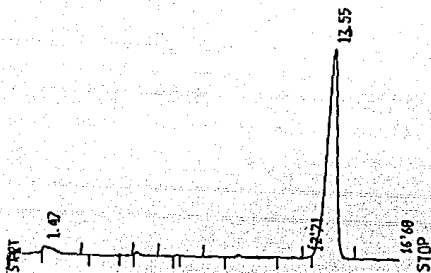


Figura No. 11. Cromatograma obtenido para el palmitato de vitamina A degradado a 60°C durante 20 días.

Compuesto	Tr
producto de degradación	1.47
palmitato de vitamina A	13.55

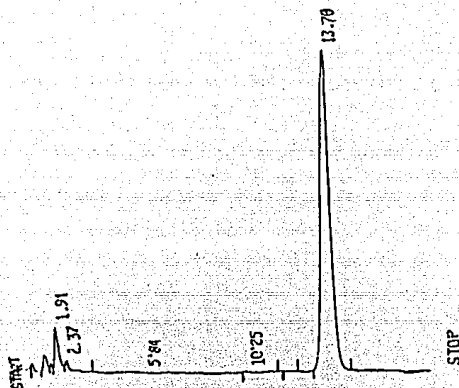


Figura No. 12. Cromatograma obtenido para formulación completa almacenada a temperatura ambiente durante 6 meses.

Compuesto	Tr
productos de degradación	1.91 y 2.37
palmitato de vitamina A	13.70

DETERMINACION CUANTITATIVA DEL ERGOCALCIFEROL EN UNA SOLUCION ORAL DE 400 U.I./ml. POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

APARATOS

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución que consta de los siguientes módulos: Dupont Instruments Column Compartment, Dupont Instruments UV Spectrophotometer y Dupont Instruments 870 Pump Module equipado con un registrador Hewlett Packard modelo 3390A, columna microbondapak C<sub>18</sub> de 30 cm. de longitud x 3.9 mm. de diámetro interno (Waters Associates), baño ultrasónico Mettler Electronics Corp. Ultrasonic Cleaner, balanza analítica Mettler modelo H35Ar, cronómetro Ampass Industries 1/10, centrifuga Sol. Bat Aparatos Científicos, agitador mecánico Super Mixer, modelo 1290 Lab. Line Instruments.

MATERIALES

Equipado de filtración Millipore, membranas tipo F.G. de 0.2 micras, matraz Kitasato de 1000 ml., matraces volumétricos de vidrio rojo de 25, 100 y 250 ml.; pipetas volumétricas de 2, 3, 4, 5, 20 y 25 ml., matraz volumétrico de 1000 ml., vasos de precipitados de 250 ml., embudos de separación de vidrio rojo de 500 y 250 ml.; matraces erlenmeyer de vidrio rojo de 250 ml., embudos de filtración rápida, microjeringa de 250 microlitos, tubos

de vidrio con tapón de rosca, placas cromatográficas Kieselgel 60 F<sub>254</sub>; cámara de elución; tubos de centrifuga.

### REACTIVOS

Metanol Uvasol (Merck)

Alcohol etílico absoluto (Baker)

Ciclohexano (Merck)

Sulfato de sodio anhidro (Baker)

Eter etílico (Baker)

Cloroformo (Baker)

Eter de petróleo (Baker)

### SOLUCION DE REFERENCIA INTERNA

Pesar exactamente alrededor de 15 mg de acetato de vitamina E al 50% y transferirlos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 250 ml y llevar a volumen con metanol uvasol, colocar el matraz en un baño ultrasónico durante 15 minutos. Concentración  $\pm$  60 mcg/ml.

### SOLUCION PATRON DE REFERENCIA

Pesar exactamente alrededor de 15 mg de patrón de referencia de ergocalciferol (40,000 UI/mg) y transferirlos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 ml; disolver y llevar a volumen con alcohol etílico absoluto. Concentración  $\pm$  6000 UI/ml.

### PREPARACION DE LA MUESTRA

Transferir cuantitativamente 25 ml de la solución oral a un embudo de separación de 500 ml. Drenar la muestra durante 5 minutos y debido a la viscosidad de la solución enjuagar la pipeta con 25 ml de alcohol etílico absoluto. Extraer con 3 porciones de éter de petróleo de 75 ml cada una, agitando vigorosamente por 3 minutos en cada extracción y permitiendo que las fases se separen perfectamente. Juntar las fases etéreas y lavarlas con 7 porciones de agua destilada de 100 ml cada una.

(Nota: Si en alguno de los lavados se obtuviera emulsión, añadir 10 ml de alcohol etílico absoluto y esperar que las fases se separen).

Pasar la fase etérea lavada a través de algodón y sulfato de sodio anhidro, recibiendo la en un matraz erlenmeyer de 250 ml. con boca esmerilada, evaporar a sequedad. Recuperar cuantitativamente el ergocalciferol con 2 ml. de cloroformo. Concentración:  $\pm$  5,000 U.I./ml.

### PROCEDIMIENTO

En una placa cromatográfica (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) de --- 0.25 mm. de espesor, previamente activada a 105°C por 30 minutos, aplicar 0.200 ml. de la solución de referencia externa y 0.250 ml. de la solución de la muestra, usando corriente de nitrógeno para secar.

Introducir la placa en una cámara para cromatografía forrada interiormente con papel filtro y conteniendo 200 ml. del sistema ciclohexano: éter (1:1); dejar ascender el solvente 15 cm. arriba del punto de aplicación. Proteger de la luz durante la elución. Sacar la placa y secarla con corriente de nitrógeno. Observar la placa bajo una lámpara de luz ultravioleta a 254 nm. La mancha correspondiente al ergocalciferol de la muestra, tiene



el mismo Rf que la mancha de la referencia externa. Marcar y raspar las manchas con la ayuda de una navaja, transferir la sílica de cada una a dos matraces aforados de 25 ml. separados; aforar con la solución de referencia interna. Agitar en el agitador mecánico durante 2 minutos y centrifugar las soluciones de la muestra y de la referencia externa a 3500 rpm durante 10 minutos. Filtrarlas a través de filtro Millipore tipo FG de 0.22 micras. Concentración de la referencia externa  $\pm$  48 U.I./ml.; concentración de la muestra  $\pm$  50 U.I./ml. concentración de la referencia interna: 60 mcg./ml.

Inyectar la solución de referencia externa por duplicado o hasta que la relación del área de los picos no presente una variación mayor del 2%, continuar de la misma manera con la solución de la muestra.

#### Condiciones para el cromatógrafo de líquidos.

Temperatura:	ambiente
Fase móvil:*	metanol: agua (98:2)
Velocidad de flujo:	1.5 ml./min.
Presión:	$\pm$ 50 BAR.
Detector:	265 nm.
Sensibilidad:	0.02 UAET.

\* La fase móvil debe ser filtrada a través de filtro Millipore tipo F.G. de 0.22 micras y degasificada durante 15 minutos en un baño ultrasónico o con vacío.

**Tiempo de retención aproximado:**

Ergocalciferol:	5.47 minutos
Acetato de vitamina E:	8.07 minutos

**Condiciones para el integrador:**

Cero (Zero)	0.0
Atenuación (ATT 2↑)	2.0
Velocidad de la carta (CHT SP)	0.5
Amplitud del pico (PK WD)	0.16
Umbral de integración (THRSH)	2.0
Area de rechazo (AR REJ)	0.0

**CALCULOS**

Determinar la relación del área de los picos del ergocalciferol: acetato de vitamina E para cada inyección y calcular la relación promedio para la referencia externa y la muestra.

$$\text{Relación del área de la muestra} = \frac{\text{Área del ergocalciferol}}{\text{Área de la referencia interna}} = X$$

Relación del área de la referencia externa =

$$\frac{\text{Área del ergocalciferol}}{\text{Área de la referencia interna}} = Y$$

Calcular el contenido de ergocalciferol con la siguiente fórmula:

$$\text{U.I. ergocalciferol/ml.} = \frac{X \text{ promedio}}{Y \text{ promedio}} \times \frac{\text{U.I. de referencia externa}}{25}$$

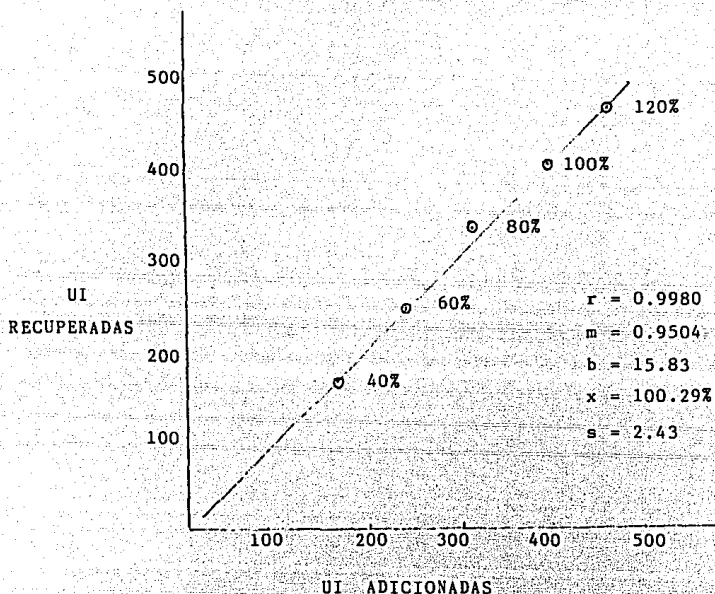
x0.016

LINEARIDAD DEL METODO PARA LA DETERMINACION DEL ERGOCALCIFEROL EN UNA SOLUCION ORAL POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

Con el objeto de determinar si la relación entre los mg agregados y los mg recuperados es lineal en un determinado rango de concentraciones, se analizaron los placebos a los que se les adicionó cantidades conocidas del principio activo correspondientes a aproximadamente al 40,60,80, 100 y 120% de la cantidad etiquetada.

Los resultados se muestran en la figura 13.

Figura No. 13. Linearidad



% Correspondiente	UI Adicionadas*	UI Recuperadas**	% Recuperado
40	161.92	161.11	100.12
60	242.88	248.67	102.38
80	323.84	333.15	102.29
100	404.80	405.85	100.26
120	485.76	468.25	96.40

\* Adicionadas a 25 ml de placebo.

\*\* Los resultados reportados son el promedio de dos muestras por nivel manejado.

EVALUACION ESTADISTICA DEL METODO PARA LA DETERMINACION DEL ERGO-CALCIFEROL EN UNA SOLUCION ORAL QUE TAMBIEN CONTIENE PALMITATO DE VITAMINA A POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

Se evaluó la exactitud y precisión del método. La precisión se determinó de dos diferentes maneras; como repetición y como reproducibilidad. Para determinar la exactitud y repetición se efectuó el análisis estadístico de los resultados obtenidos al analizar 12 placebos a los que se les adicionó cantidades conocidas de ergocalciferol; para determinar la reproducibilidad se analizaron 9 muestras del producto en dos diferentes días por dos analistas.

Los resultados se presentan en las tablas 3 y 4.

Tabla No. 3

EXACTITUD Y REPETICION DEL METODO PARA LA DETERMINACION DEL ERGO-CALCIFEROL EN UNA SOLUCION ORAL POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

% correspondiente	UI adicionadas*	UI recuperadas	% recuperado
80	322.56	313.02	97.04
80	322.56	316.11	98.00
80	322.56	324.08	100.47
80	322.56	326.60	101.25
100	393.60	384.94	97.80
100	393.60	393.17	100.00
100	393.60	391.77	99.53
100	393.60	394.21	100.16
120	518.40	506.99	97.80
120	518.40	533.92	102.99
120	518.40	509.45	98.27
120	518.40	521.06	100.51

$$\bar{x} = 99.49\%$$

$$s = 1.74\%$$

$$IC_{95\%} = ( 98.35 < \mu < 100.63 ) \%$$

$$CV = 1.75\%$$

\* adicionadas a 25 ml de placebo

Tabla No. 4

REPRODUCIBILIDAD DEL METODO PARA LA DETERMINACION DEL ERGOCALCIFEROL EN UNA SOLUCION ORAL POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

Día 1

Analista	UI / ml encontradas
1	344.59
1	355.25
1	354.15

Día 2

1	359.73
1	363.09
1	356.49
2	362.82
2	355.57
2	385.13

$$\bar{x}_{\text{Total}} = 359.64$$

$$s_{\text{Total}} = 11.03$$

$$CV_{\text{Total}} = 3.067$$

Reproducibilidad interanalista

$$\bar{x}_A = 363.81$$

$$s_A = 10.90$$

$$CV = 2.996$$

Reproducibilidad interdía

$$\bar{x}_D = 355.55$$

$$s_D = 6.28$$

$$CV = 1.766$$



ESPECIFICIDAD DEL METODO PARA LA DETERMINACION DEL ERGOCALCIFEROL EN UNA SOLUCION ORAL POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

Para establecer la especificidad del método se colocaron muestras de ergocalciferol, placebo de ergocalciferol y formulación completa durante 20 días a 60°C y condiciones ambientales normales durante 3 meses.

Las muestras degradadas y ps almacenadas a condiciones ambientales normales se analizaron con el método desarrollado. Al analizar el placebo almacenado en condiciones ambientales, se obtuvo un cromatograma que mostró varios picos correspondientes a los excipientes de la formulación a tiempos de retención diferentes a los del ergocalciferol y de la referencia interna; por lo que se concluye que el placebo no causa interferencia en la detección del ergocalciferol; el cromatograma se muestra en la figura 15.

En el análisis de la formulación almacenada en condiciones ambientales durante 3 meses, se obtuvo el cromatograma que aparece en la figura No. 20; aparecen algunos picos adicionales a los que aparecen en el cromatograma obtenido para el placebo; pero no interfieren en la detección del ergocalciferol.

El cromatograma del placebo almacenado a 60°C durante 20 días no presentó diferencias con el cromatograma obtenido del placebo almacenado a condiciones ambientales normales. Los cromatogramas se muestran en las figuras 21 y 22.

Al analizar la formulación almacenada a 60°C durante 20 días se obtuvo un cromatograma (figuras No. 23 y 24) muestra un pico (Tr: 3.70) que corresponde a algún producto de degradación el cual no causa ninguna interferencia al ergocalciferol.

La materia prima se colocó a estabilidad acelerada durante 20 días a 60°C; el cromatograma aparece en la figura No. 25 en donde aparece un producto de degradación (Tr = 3.74) el cual no interfiere en la determinación del ergocalciferol.



Figura No. 14. Blanco. Cromatograma obtenido para el disolvente.

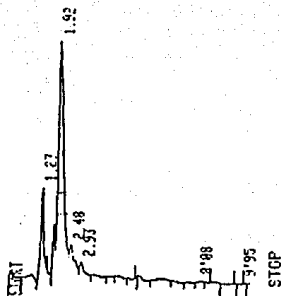


Figura No. 15. Cromatograma obtenido para el placebo de la formulación almacenada durante 3 meses en condiciones ambientales normales.

Producto	Tiempo de Retención (Tr)
excipientes	1.23
	1.74
	1.92
	2.48
	2.93



Figura No. 16. Cromatograma obtenido para la solución de referencias interna.

Compuesto	Tr
acetato de vitamina E.	7.88

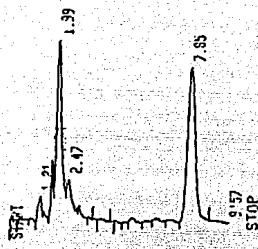


Figura No. 17. Cromatograma obtenido para el placebo almacenado a condiciones ambientales; contiene solución de referencia interna.

Compuesto	Tr
acetato de vitamina E	7.85

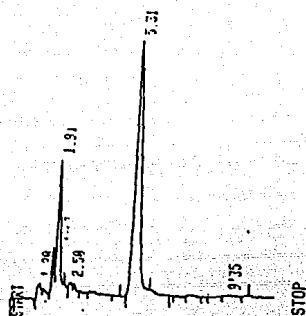


Figura No. 18. Cromatograma obtenido para la solución de referencia externa.

Compuesto	Tr
ergocalciferol	5.31

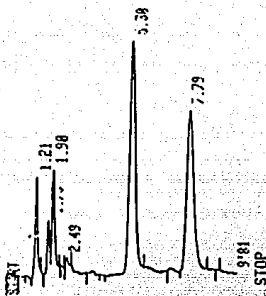


Figura No. 19. Cromatograma obtenido para la solución de referencia externa; contiene solución de referencia interna.

Compuesto	Tr
ergocalciferol	5.30
acetato de vitamina E	7.79



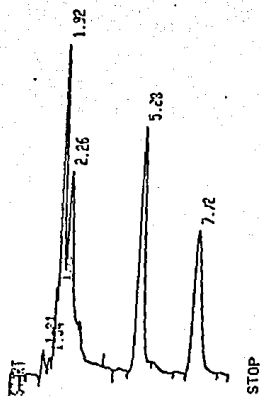


Figura No. 20. Cromatograma obtenido para la formulación completa almacenada durante 3 meses a temperatura ambiente, contiene solución de referencia interna.

Compuesto	Tr
ergocalciferol	5.28
acetato de vitamina E	7.72

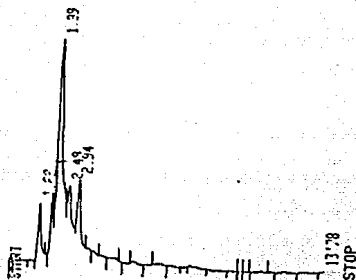


Figura No. 21. Cromatograma obtenido para el placebo degradado a 60°C durante 20 días.

Compuesto	Tr
excipiente y productos	1.22
de degradación.	1.74
	1.99
	2.49
	2.94

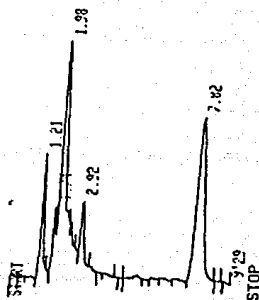


Figura No. 22. Cromatograma obtenido para el placebo degradado a 60°C; contiene solución de referencia interna.

Compuesto	Tr
excipientes y productos de degradación	1.21
	1.74
	1.98
	2.92
acetato de vitamina E	7.82

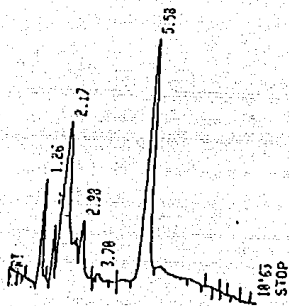


Figura No. 23. Cromatograma obtenido para la formulación completa degradada a 60°C durante 20 días.

Compuesto	Tr
excipientes y productos de degradación	1.26, 1.76, 2.17, 2.98 y 3.70
ergocalciferol	5.58

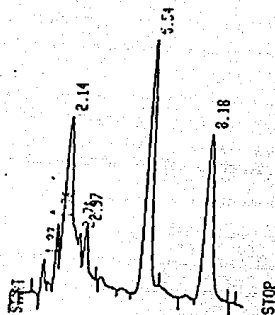


Figura No. 24. Cromatograma obtenido para la formulación completa degradada a 60°C; contiene solución de referencia interna.

Compuesto	Tr
excipientes y productos de degradación	varios
ergocalciferol	5.54
acetato de vitamina E	8.18

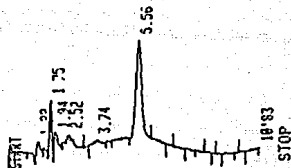


Figura No. 25. Cromatograma obtenido para el ergocalciferol degradado a 60°C durante 20 días.

Compuesto	Tr
productos de degradación	1.94 y 3.74
ergocalciferol	5.56

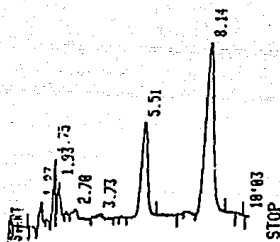


Figura No. 26. Cromatograma obtenido para el ergocalciferol degradado a 60°C; contiene solución de referencia interna.

Compuesto	Tr
ergocalciferol	5.51
acetato de vitamina E	8.14

## CAPITULO V

## DISCUSION DE RESULTADOS

Se desarrollaron dos métodos cromatográficos; uno para determinación cuantitativa del palmitato de vitamina A por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) en fase inversa y otro para cuantificar el ergocalciferol, en este último se involucran la Cromatografía en Capa Delgada para la separación de la vitamina y la CLAR en fase inversa para la cuantificación final. Las dos vitaminas se encuentran formuladas en una solución oral. Las concentraciones son las siguientes:

Palmitato de Vitamina A	5000 UI/ml
Ergocalciferol	400 UI/ml

Cada método se validó estadísticamente con el fin de conocer su confiabilidad, evaluando para ello su exactitud, precisión y linealidad.

La exactitud se evaluó tomando en cuenta dos estadísticos: la media ( $\bar{x}$ ) y el intervalo de confianza (IC) al 95% de probabilidad (1).



$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

n = número de observaciones

$$IC_{95\%} = \bar{M} \pm t^*(0.05, \nu) \cdot Es$$

$t^*(0.05, \nu)$  = valor crítico de t al 95% de probabilidad para  $\nu$  grados de libertad y dos colas.

$$Es = \text{error estándar muestral} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$\nu = n - 1$  grados de libertad.

La precisión ya sea como repetición o como reproducibilidad se evaluó tomando en cuenta la Desviación Estándar (s), el Coeficiente de Variación ( $CV_{\%}$ ) y el Intervalo de Confianza ( $IC_{95\%}$ ).

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

$$CV_{\%} = \frac{s}{\bar{X}} \cdot 100$$

donde:

$\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2$  = sumatoria de cuadrados de las desviaciones de los datos experimentales respecto a la media.

La linealidad se evaluó con los siguientes estadísticos: Pendiente (m), Ordenada al origen (b) y el Coeficiente de Correlación (r), considerando en el eje de las abscisas (x) las cantidades adicionadas y en el de las ordenadas (y) las cantidades recuperadas.

$$m = \frac{\sum XY - \bar{Y} \sum X}{\sum X^2 - \bar{X} \sum X}$$

$$b = \bar{Y} - m\bar{X}$$

$$r = \frac{S_x}{S_y} \cdot m$$

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

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum (Y_i - \bar{Y})^2}{n-1}}$$

donde:

$X_i$  = UI de sustancia agregada

$Y_i$  = UI de sustancia recuperada

$n$  = número de pares de valores

$\bar{X}, \bar{Y}$  = medias de los valores X y Y

Los valores de los estadísticos del método para la cuantificación del palmitato de vitamina A reportados en las tablas 1 y 2 indican que el método desarrollado rinde resultados confiables a las concentraciones usadas para la validación, dado que el

valor máximo de CV% aceptable sería de 2.

En la figura 1 se muestran los resultados de la medición de la linealidad para este método, se obtuvo un valor de  $r = 0.9999$ , la pendiente (m) tiene un valor próximo a 1; el valor de b corresponde al 3.6% de la cantidad máxima agregada, este valor se obtuvo debido a que los recobros correspondientes al 40% de la cantidad en el marbete son de aproximadamente del 105%. Esto nos indica que la respuesta no es tan lineal a concentraciones bajas, pero a concentraciones mayores al 40%, la relación entre las UI adicionadas y las recuperadas es completamente lineal.

Se demostró también que el método es específico y puede ser usado en estudios de estabilidad (figuras 2 a la 12).

Con respecto al método desarrollado para el análisis del ergocalciferol los valores de los estadísticos obtenidos en la evaluación de exactitud y precisión (tabla No. 3) indican que es un método confiable en el rango de concentraciones usadas para la validación, los datos obtenidos para la reproducibilidad que se muestran en la tabla No. 4 indican que el método es más reproducible de día a día que de analista a analista, ya que el coeficiente de variación de día a día de los análisis realizados

por un mismo analista es menor de 2, y el coeficiente de variación entre los análisis realizados por dos analistas es mayor de 2; pero ésto es justificable dado que el tratamiento de la muestra es muy largo y se requiere de experiencia en el método.

Los resultados de la medición de la linealidad se muestran en la figura No. 13; el valor de  $r$  es de 0.9980, el valor de  $m$  es de 0.9504 y el valor de  $b$  corresponde al 3.3% de la cantidad máxima agregada, considerando que el tratamiento de la muestra es muy prolongado, los resultados obtenidos son buenos, y teniendo la referencia de que cantidades tan pequeñas de ergocalciferol, en una formulación tan compleja como la que se manejó; es imposible cuantificarlas por métodos tradicionales. Con lo expuesto anteriormente se puede considerar que el método es lineal.

En las figuras 14 a la 16 aparecen los cromatogramas que demuestran la especificidad del método.

## CAPITULO VI

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se desarrollaron dos métodos analíticos, uno para el análisis del palmitato de vitamina A por CLAR y otro para la determinación cuantitativa del ergocalciferol, en donde se emplea la cromatografía en capa delgada y CLAR. Los dos métodos por CLAR son en fase inversa. Las dos vitaminas se encuentran formuladas en una solución oral.

A cada uno de los dos métodos cromatográficos se les determinó exactitud, precisión, linealidad, reproducibilidad y especificidad en estabilidad. Los resultados aparecen en la siguiente tabla.

	ESTADISTICO	PALMITATO DE VITAMINA A	ERGOCALCIFEROL
LINEARIDAD	r	0.9999	0.9980
	m	0.9488	0.9504
	b	240.12 UI	15.83 UI
PRECISION Y EXACTITUD	x	100.87%	99.49%
	s	1.52%	1.74%
	IC <sub>95%</sub>	99.99 a 101.75%	98.35 a 100.63%
	CV%	1.51	1.75
REPRODUCIBILIDAD	x	4501.17 UI	359.64 UI
	s	69.11 UI	11.03 UI
	CV%	1.52	3.07

Por los datos obtenidos se concluye que ambos métodos son exactos, precisos y lineales en los rangos de concentración probados.

El trabajo realizado nos proporciona dos métodos analíticos capaces de cuantificar: 1) palmitato de vitamina A y 2) ergocalciferol en una solución oral aún cuando la concentración es muy pequeña con respecto a la del palmitato de vitamina A.

Ambos métodos además de ser reproducibles por su especificidad, pueden ser empleados tanto para control de calidad como para estudios de estabilidad.

## CAPITULO VII

## LISTA DE REFERENCIAS

1. Espectroscopia y Validación de Técnicas Analíticas. Curso Teórico Práctico. A F M 1981.
2. Mollica J. A., Satinder Ahuja and Jerold Cohen. Stability of Pharmaceutical. J. Pharm. Sci. 67: 442-65 (1978).
3. Gennaro A. R., Remington's Pharmaceutical Sciences 17<sup>th</sup>, Mack Publishing Company, USA 1985.
4. Johnson E.L. and Stevenson R., Basic Liquid Chromatography USA Varian Associates, Inc. 1978.
5. Mc Nair Harold, Cromatografía Líquida de Alta Presión O E A Washington D. C. 1973.
6. Carrol L., A user's guide to Chromatography gas, liquid, TLC. Regis Chemical Company USA 1976.
7. Synder L., Kirkland J., Introduction to Modern Liquid Chromatography; Wiley Intersciences. New York 1976.



8. Stahl E., Thin Layer Chromatography, A Laboratory Handbook, Springer-Verlag. New York 1969.
9. Touchstone C. J. and Murrel F. Dobbins, Practice of Thin Layer Chromatography, Wiley Interscience New York 1978.
10. Litter M., Farmacología Experimental y Clínica; sexta edición, Ed. El Ateneo, Argentina 1980.
11. Harper H. A., Manual de Química Fisiológica, 15<sup>a</sup> Ed Trad. Cast. El Manual Moderno S. A. 1976.
12. Grollman A., Pharmacology and Therapeutics, 7<sup>th</sup> Ed. Mack Publishing Company USA 1985.
13. Goodman G. A., The Pharmacological Basis of Therapeutics 6<sup>th</sup>, Macmillan Publishing Co. Inc. USA 1980.
14. The Merck Index, an encyclopedia of Chemicals and drugs, ninth edition published by Merck & Co. Inc. USA 1976.
15. United States Pharmacopeia XXI 1985.
16. British Pharmacopeia 1973.

17. Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos 4<sup>a</sup>, SSA, 1974.
18. Isolation and Identification of Drugs Vol. 1 Edited by EGC Clarke; An Extra Pharmacopeia Co. Pharmaceutical Press, - London 1969.