



59
29
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO
ANALÍTICO POR CROMATOGRFIA LÍQUIDA DE
ALTA RESOLUCIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN
DE S-CARBOXIMETILCISTEINA EN JARABE.**

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

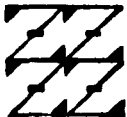
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

RODRIGUEZ LEDESMA EVA

**U N A M
ZARAGOZA**



**LO HUBO
DE NUESTRA REFLEXIÓN**

OCTUBRE 1995



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACION DE SINDOIALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a usted como Sindol del Examen Profesional del (la) señor (ita):
RODRIGUEZ LEDESMA EVA

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo:

Le agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: Desarrollo y Validación del método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución para la cuantificación de S-Carboximetilcisteína en Jarabe.

y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE	Q.F.B. MAURO ARRIETA SANCHEZ	
VOCAL	Q.F.B. MA. ANGELICA PEREZ MORA	
SECRETARIO	Q.F.B. LOURDES CERVANTES MARTINEZ	
SUPLENTE	Q.F.B. MARTHA UGALDE HERNANDEZ	
SUPLENTE	Q.F.B. IRMA ALEJANDRE RAZO	

ATENTAMENTE,
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
México, D.F. 23 de junio de 1995.

Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES
JEFE DE LA CARRERA

c.c.p. Departamento de Control de Egresados.
c.c.p. Interesado.

Agradecimientos:

A Dios, por darme la oportunidad de existir y disfrutar de este momento.

A mis Papás, que con su ejemplo, esfuerzo y cariño, me supieron guiar por el mejor camino.

A mis hermanos, que con su comprensión y entusiasmo me han ayudado a seguir adelante.

A Javier, que con su amor y compañía me han impulsado a seguir superándome.

A Angélica Pérez Mora, que con su asesoría fue posible la realización de este trabajo.

Con mucho agradecimiento a: Ángel y Benjamín y a todas aquellas personas que me apoyaron y que de alguna manera contribuyeron a la culminación de este trabajo.

EVA RODRÍGUEZ LEDESMA.

CONTENIDO.

INTRODUCCION.	1.
I. GENERALIDADES.	2.
A. MONOGRAFIA DE S-CARBOXIMETILCISTEINA.	3.
B. JARABE DE S-CARBOXIMETILCISTEINA.	
1. Farmacocinética y Farmacodinamia	6.
2. Indicaciones Terapéuticas.	7
3. Contraindicaciones.	7.
4. Reacciones secundarias.	7
5. Posología.	7
C. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.	
1. Definición.	8.
2. Parámetros Analíticos (Diseño y Criterio).	8.
a. Linealidad del sistema.	9.
b. Precisión del sistema.	10.
c. Linealidad del método.	10.
d. Exactitud.	11.
e. Precisión.	11.
1) Repetibilidad.	12.
2) Reproducibilidad.	12.
f. Tolerancia.	13.
g. Estabilidad de la muestra.	13.
h. Especificidad para Control de Calidad y Estabilidad.	14.

D. CROMATOGRAFIA.

1. Historia de la Cromatografía.	15.
2. Definiciones.	19.
a. Tiempo de retención.	19.
b. Tiempo muerto.	19.
c. Tiempo de retención ajustado.	19.
d. Número de platos teóricos.	19.
e. Anchura de la base del pico.	19.
f. Altura equivalente a un plato teórico.	20.
g. Vel. lineal promedio de la fase móvil.	20.
h. Coeficiente de Distribución.	20.
i. Relación de fases.	20.
j. Factor de Capacidad.	20.
k. Resolución.	21.
l. Selectividad.	21.
3. MECANISMOS DE SEPARACION.	
a. Adsorción.	22.
b. Reparto Clásico (Partición).	23.
c. Intercambio Iónico.	27.
d. Permeación o Exclusión.	30.
4. SISTEMA CROMATOGRAFICO.	33.
a. Reservorio.	35.
b. Bomba Cromatográfica.	35.
c. Inyector.	36.
d. Columna Cromatográfica.	37.
e. Detector.	38.

II. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA.	42.
III. OBJETIVOS.	44.
IV. HIPOTESIS.	45.
V. PARTE EXPERIMENTAL.	46.
VI. RESULTADOS.Y DISCUSION DE RESULTADOS	53.
VII. CONCLUSIONES.	67.
VIII. BIBLIOGRAFIA.	68.

INTRODUCCION

Los métodos analíticos para asegurar los niveles de calidad de los productos farmacéuticos, requieren de técnicas capaces de determinar y cuantificar a cada uno de los activos que constituyen a dicho medicamento.

Debido a la necesidad de un control de medicamentos más riguroso en nuestro país, la validación de los métodos analíticos es ahora un requisito que establece la Ley General de Salud en el diario oficial en 1994, donde marca los parámetros mínimos para ser validados, cumpliendo estos con las características de linealidad, exactitud, precisión, reproducibilidad y especificidad. Cuya finalidad es tener un medicamento seguro en todo aquello que pueda afectarlo en su fabricación además de ser eficaz en cuanto a su acción terapéutica.

De lo anterior se desarrolló un método analítico por Cromatografía de Alta Presión para la cuantificación de S-Carboximetilcisteína en jarabe, que pueda ser empleado como método de rutina, así como indicativo de estabilidad. Posteriormente se realizó la validación de dicho método, evaluando los siguientes parámetros: linealidad y precisión del sistema, linealidad, exactitud, reproducibilidad, estabilidad de la muestra, tolerancia y especificidad del método.

Los resultados obtenidos mostraron que el método analítico es lineal, exacto, preciso y reproducible para la cuantificación de S-Carboximetilcisteína, asegurando la calidad del medicamento con resultados confiables y aplicable para análisis de Control de Calidad e indicativo de Estabilidad.

I. GENERALIDADES.

En todo desarrollo de nuevos productos, es necesario llevar a cabo diversos estudios de preformulación y formulación, encaminados a conocer las propiedades del principio activo y de la formulación en sí, que ayuden a la obtención de un producto final de calidad.

La S-Carbiximetilcisteína (Carbocisteína), es un mucolítico y expectorante que por su estructura química $\text{HOOCCH}_2\text{SCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ se absorbe bien por vía oral, sigue la vía metabólica hepática, desmetilandose con ácido glucorónico dando así un efecto mucoprotector de las vías respiratorias.

Para que el medicamento logre mantener su integridad como tal y cumplir con el fin terapéutico para el que fue diseñado se debe asegurar su estabilidad física y química durante el tiempo de almacenamiento y uso.

En la industria farmacéutica se requiere de métodos analíticos capaces de cuantificar en forma selectiva al fármaco, tanto en presencia de excipientes como de productos de degradación, es decir, un método analítico que sea el adecuado para análisis de rutina como para estudios de estabilidad.

A. MONOGRAFIA DE S-CARBOXIMETILCYSTEINA (2)

1. Nombres Químicos:

S-(Carboximetil)-L-Cisteína.

3-[(Carboximetil)io]alanina.

S-Carboximetilcisteína.

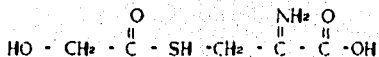
2. Nombre Genérico:

Carbocisteína.

3. Fórmula Condensada:

$C_5H_9NO_3S$.

4. Fórmula Desarrollada:



5. Peso Molecular: 179.21

6. Descripción:

Polvo cristalino blanco.

7. Solubilidad:

Insoluble en agua fría, soluble en ácidos y álcalis fuertes.

8. Identificación:

Espectroscopía de absorción en el IR. Examinar la muestra en forma de pastillas preparadas con bromuro de potasio. Los máximos de absorción obtenidos con la muestra corresponden en posición y en intensidad relativa a los del espectro obtenidos con un estándar de referencia de S-Carboximetilcisteína.

9. Valoración:

Disolver alrededor de 0.300 g exactamente pesados en 25 ml de NaOH 0.1 N, V.S. Hacer la disolución en el momento de titular.

Titular con HCl 0.1 N V.S. usando el titulador automático Mettler DL25, bajo las siguientes condiciones:

CONFIGURACION:

a. TYPE	12
b. CONTROL	2
c. PREDOSING	0.2
d. BUR-MAXVOL	1040
e. CONECCION	0
f. STIR TIME	15
g. OUT PUT	900
h. SISTEM	1
i. PRINTER	0
j. A	0
k. B	0
l. C	0

Hacer un blanco y titularlo potenciométricamente. Usando

electrodo 119 para titulaciones ácido-base. Es necesario el blanco ya que es una titulación por retroceso.

Cada ml de HCl 0.1 N es equivalente a 0.01792 g de S-Carboximetilcisteína.¹³⁾

CALCULOS:

$$\frac{(V_b \times N - V_m \times N) \times RR \times PM_{s-cmc} \times 100}{W_{mta}} = \% \text{ S-Carboximetilcisteína}$$

Donde:

V_b = Volumen blanco (ml).

V_m = Volumen muestra (ml).

N = Normalidad del HCl.

RR = Relación de Reacción.

W_{mta} = Peso de la muestra (mg).

B. JARABE DE S-CARBOXIMETILCISTEINA.(P. L. M.)

1.Farmacocinética y Farmacodinamia en humanos del Jarabe de S-Carboximetilcisteína:

La Carbocisteína se absorbe bien por vía oral, sigue la vía metabólica hepática, desmetilándose y conjugándose con ácido glucorónico. Se elimina por vía renal hasta en un 30 % en forma de su principal metabolito, el ácido tioglicólico. Se distribuye ampliamente en el organismo, especialmente en el tejido pulmonar y bronquial, en donde ejerce su efecto mucolítico y reológico. Después de la administración de una dosis oral única de 750 mg. la concentración plasmática máxima es de 8.4 ± 1.0 ng/ml en un tiempo máximo de 1.4 ± 0.2 hrs.

De acuerdo con los estudios tanto en animales, como en el hombre, se pone en evidencia el mecanismo mucorregulador de la Carbocisteína:

a) Produce una activación de la sialiltransferasa, con aumento de la tasa de sialomucinas en el moco bronquial y pulmonar, restableciendo el perfil de secreción normal. También tiene un importante efecto en la tasa de IgA secretoria.

b) Restaura los enlaces SH (disulfuros) de la secreción mucosa bronquial. Clínicamente la Carbocisteína ejerce un efecto in vitro caracterizado por:

-Normalización de las cualidades reológicas del moco en el aparato respiratorio. Estas cualidades son: Viscosidad, elasticidad y plasticidad.

-Normaliza el transporte mucociliar por su acción en el moco, en consecuencia habrá una disminución en la resistencia al paso del aire

en las vías respiratorias.

c) Protección para el epitelio ciliar.

d) Reducción de la hiperplasia de las células caliciformes ciliadas, por consecuencia favorece la penetración de algunos antibióticos, a nivel de las secreciones de la mucosa respiratoria.

2. Indicaciones Terapéuticas:

Está indicado en todas las enfermedades de las vías respiratorias altas y bajas, que curean con mucopatías: Rinofaringitis, sinusitis, otitis, traqueítis, asma bronquial, bronquitis agudas y crónicas y bronconeumonía.

3. Contraindicaciones:

Sensibilidad conocida a los componentes de la fórmula. Úlcera gastroduodenal.

4. Reacciones secundarias:

Las reacciones adversas son raras, pero pueden presentarse: Náuseas, gastralgia, cefalea, erupciones cutáneas y diarrea. La mayoría de estas reacciones ceden al disminuir la dosis o eventualmente se requiere suspender el medicamento.

5. Posología:

Cada 100 ml de Jarabe contienen: 5 g. de S-Carboximetilcisteína

Vía de administración: Oral.

Niños de 1 a 5 años: 2.5-5 ml tres veces al día de Jarabe .

Niños de 6 a 12 años: 10 ml tres veces al día de Jarabe.

C. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

1. Definición:

Proceso por el cual queda establecido por estudios de laboratorio que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. (4)

2. Parámetros Analíticos:

Para que una técnica analítica se considere validada, se deben establecer parámetros estadísticos para evaluar linealidad y precisión del sistema, linealidad, exactitud, precisión, estabilidad de la muestra, tolerancia y especificidad del método que está siendo evaluado. También es importante conocer los términos utilizados en la validación de métodos analíticos:

b = Ordenada al origen o intercepto.

r = Coeficiente de correlación.

r^2 = Coeficiente de determinación.

C.V. = Coeficiente de variación.

m = Pendiente.

Placebo •Es la mezcla de todos los componentes que contiene una formulación exceptuando el o los principios activos que se van a cuantificar.

Placebo cargado •Son muestras de placebos a los que se les ha adicionado cantidades conocidas del principio activo

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

error de un método analítico se divide en error sistemático y error aleatorio, los cuales son independientes y aditivos.

El error sistemático es aquel que da lugar a medidas incorrectas y por lo tanto la exactitud se ve afectada por este error. Se divide en error constante o absoluto, el cual es independiente de la concentración del fármaco en el medicamento y en error proporcional o relativo, el cual depende de la concentración del fármaco en el medicamento. Se clasifican en:

Error instrumental, debido a la mala calibración de los instrumentos.

Error de método, debido a reacciones incompletas o no cuantitativas.

Error operativo, debido a la falta de experiencia del analista con el método analítico y que por ello, omite o realiza defectuosamente la técnica correspondiente.

Error personal, debido a la mala apreciación de un resultado, un mal cálculo o una lectura errónea.

El error aleatorio es aquel error que permanece aún cuando se ha eliminado el error sistemático por lo que da lugar a medidas imprecisas y por lo tanto la precisión del método está determinada por esta clase de error.⁽⁵⁾

Por lo tanto los parámetros estadísticos a definir son:

LINEALIDAD DEL SISTEMA: Es la habilidad para asegurar que los resultados obtenidos son los proporcionales a la concentración de la sustancia a un rango determinado.^(6,6,7,8)

Se determina construyendo una curva de calibración (Concentración

vs Respuesta), utilizando cuando menos cinco diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo análisis cuando menos por triplicado para cada dilución

El criterio para determinar la linealidad:

$$\text{C.V.} \leq 1.5 \%$$

$$r \geq 0.99.$$

$$r^2 \geq 0.98.$$

b) PRECISION DEL SISTEMA: Se refiere a la semejanza de una serie de análisis sobre la misma muestra. (4,5,7,8)

Se determina por el análisis de mínimo 6 muestras de una misma solución estándar correspondientes al 100 %

El criterio utilizado es:

$$\text{C.V.} \leq 1.5 \%$$

c) LINEALIDAD DEL METODO: Es la relación o función lineal entre la cantidad de un medicamento o fármaco recuperado, y el valor real de la cantidad de sustancia adicionada. (4,5,7,8)

Se determina a partir de placebos cargados adicionados de cuando menos tres diferentes cantidades de sustancia de interés, cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado. Las concentraciones de los placebos cargados deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema, incluyendo siempre la correspondiente al 100%

El criterio utilizado es:

Cantidad adicionada vs cantidad recuperada.

m \approx 1

b \approx 0

r^2 \approx 0.98

C.V. \leq 2 %

% recuperado del 98 al 102 %

En donde la pendiente indica la magnitud en que la variable Y cambia por cada unidad de incremento en X.

La ordenada al origen, punto por donde la recta cruza el eje vertical.

El coeficiente de correlación mide el grado de la relación lineal entre la variable X y Y.

EXACTITUD: La exactitud es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia que se espera obtener. (4,5,7,8)

Se determina haciendo el análisis mínimo de 6 muestras de manera independiente en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista

El criterio utilizado es:

% recuperado del 98 al 102 %

C.V. \leq 2 %

PRECISION: La precisión es el grado de concordancia de mediciones repetidas de una misma propiedad. Esto es, debe existir

homogeneidad o uniformidad en el resultado para todas las ocasiones en que se realice la determinación de una magnitud constante, para efectos de evaluar este parámetro, puede ser expresada en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

1) **Repetibilidad.** Es la concordancia relativa de determinaciones independientes bajo las mismas condiciones de operación. (4,6,7,8)

Se expresa como el % de recobro obtenido de las muestras a las que se les haya adicionado cantidades conocidas de la sustancia

El criterio utilizado es:

% recuperado del 98 al 102 %

C.V. \leq 2 %

2) **Reproducibilidad** Es la concordancia relativa de determinaciones independientes bajo condiciones diferentes, es decir, en dos días por dos analistas. (4,6,7,8)

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

El criterio utilizado es:

C.V. \leq 2 %

La prueba estadística siguiente evalúa el método con el estudio de las siguientes variables, analista, día.

Cuando se evalúa el efecto del analista sobre el método en diferentes días, se está observando el comportamiento del método con

dos factores fundamentales.

Para este caso en particular, es con dos analistas en dos días diferentes y por tres aplicaciones cada uno. Realizándose el análisis de varianza.

El modelo hipotético es el siguiente:

$$Y_{ijk} = A_i + D_{j(i)} + E_{k(i,j)}$$

Donde:

Y_{ijk} = El ensayo de la sustancia de interés de la k-ésima cuanta analizada por el i-ésimo analista en el j-ésimo día.

A_i = Efecto del analista en el ensayo (donde $i = 1...a$).

$D_{j(i)}$ = Efecto del día anidado con el analista (donde $j = 1...b$).

$E_{k(i,j)}$ = Error del método analítico (donde $k = 1...r$).

a = Número de analistas.

b = Número de días.

r = Número de replicaciones.

¡)TOLERANCIA: Es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos, por el análisis de la misma muestra con modificaciones de las condiciones normales de operación (4,5,7,8).

Se determina por el análisis de la misma muestra con modificaciones de las condiciones normales de operación, como son: diferente longitud de columna, diferentes proveedores de reactivos y columnas, etc.

¡)ESTABILIDAD DE LA MUESTRA: Son los requerimientos o condiciones a determinar a fin de que la muestra preparada mantenga constante su propiedad medible dentro de un cierto intervalo de

tiempo.(4,5,7,8)

Se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de 3 muestras, con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones.

Almacenar las muestra analíticas bajo distintas condiciones (por ejemplo: temperatura ambiente, refrigeración, oscuridad, etc) durante un tiempo preestablecido por el analista dependiendo de las propiedades de la sustancia. Reanalizarlas bajo las mismas condiciones de operación utilizando una solución de referencia recientemente preparada para cada tiempo de acuerdo a lo establecido en el método analítico, la determinación debe ser efectuada por un mismo analista.

El criterio utilizado es:

La muestra es estable si el intervalo de confianza para la diferencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor cero.

h) ESPECIFICIDAD PARA METODOS DE CONTROL DE CALIDAD Y ESTABILIDAD:

Consiste en la verificación de la capacidad que tiene el método analítico en lo concerniente a la cuantificación del principio activo, sin que interfiera con los demás excipientes de la forma farmacéutica, con los productos de degradación y alguna impureza del activo.(4,5,7,8)

Se realiza corriendo muestras de estándar, placebo y placebo cargado en donde

MUESTRA	RESPUESTA
Placebo	No
Placebo cargado	Igual al estándar
Estándar	Si
Muestra degradada H^+	Ninguna interferencia con el estándar.
Muestra degradada OH^-	Ninguna interferencia con el estándar.

El criterio utilizado es:

Verificar que los productos de degradación y sustancias relacionadas no interfieran con la cuantificación de la sustancia de interés utilizando el método desarrollado.

D. CROMATOGRAFIA. (9, 10, 11)

I. HISTORIA DE LA CROMATOGRAFIA.

Los métodos de separación han constituido siempre una de las herramientas más importantes de la Química analítica. Las separaciones siguen siendo indispensables en muchos casos, particularmente en el análisis de trazas o para el análisis de mezclas que contienen compuestos con propiedades y estructura muy similares.

Entre los métodos de separación se distinguen especialmente la extracción y la cromatografía. En ambos casos la separación está basada en las diferencias de distribución de los compuestos de la muestra entre dos fases no miscibles.

La gran importancia actual de la cromatografía como método de separación proviene de su velocidad, su gran poder de resolución y de la posibilidad que ofrece para trabajar con cantidades muy pequeñas de muestra, por ejemplo, ciertas técnicas cromatográficas permiten realizar separaciones y análisis de rutina con cantidades de compuestos del orden de nanogramos.

La historia de la cromatografía se puede dividir en varios periodos que corresponden cada uno, al desarrollo de un método cromatográfico:

-La cromatografía de líquidos en columna "clásica" aparece a principios de este siglo con la publicación de los trabajos de Tswett, quien separó una mezcla de colorantes en una columna empacada con sílice utilizando como eluyente un líquido. Sin embargo, este método de separación presentaba algunas desventajas que limitaron su popularidad, básicamente éstas fueron la falta de detectores y la

lentitud de las separaciones.

-En la década de los 40's se desarrolló la cromatografía en papel.

-En los 50's aparece la cromatografía en capa delgada.

En los 60's se desarrolla la cromatografía de exclusión.

Finalmente en los 70's, los progresos en materia de instrumentación y en tecnología de preparación de fases estacionarias y columnas llevan al desarrollo de técnicas de muy alta eficiencia, la cromatografía de líquidos moderna y la cromatografía de gases en columnas capilares.

La cromatografía de líquidos moderna, mejor conocida como Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia o de Alta Resolución (en Inglés HPLC ("High Performance Liquid Chromatography")) se ha convertido en la actualidad en una herramienta indispensable en los laboratorios de control analítico, de control de proceso y de análisis clínicos.

En la cromatografía de líquidos, como en todos los métodos cromatográficos, las separaciones están basadas en la diferencia de distribución de las especies entre dos fases no miscibles, una estacionaria (sólido o líquido impregnado sobre un soporte) y una móvil (disolvente o mezcla de disolventes). La fase estacionaria se encuentra empacada en una columna a través de la cual se hace fluir, en forma continua la fase móvil.

La distribución de cada soluto en un sistema cromatográfico dado está representada por un equilibrio al cual se asocia una constante característica denominada Coeficiente de Distribución:

$$k = [S]_t / [S]_m$$

donde:

st= fase estacionaria.

m= fase móvil.

Si los diferentes componentes de una mezcla poseen coeficientes de distribución diferentes, su velocidad de migración a lo largo del sistema será diferente y podrán separarse. Debido a que los solutos solo migran cuando se encuentran en la fase móvil, aquellos que tengan mayor afinidad por la fase estacionaria, interaccionarán más fuertemente con ella, tendrán un coeficiente de distribución mayor y viajarán más lentamente. Por el contrario, los solutos que se distribuyen principalmente con la fase móvil aparecerán en el afluente de la columna rápidamente.

El valor del coeficiente de distribución puede depender de la concentración inicial del compuesto y este efecto es debido a la diferencia en el tipo de interacciones que presentan las moléculas del soluto consigo mismas y con el medio que las rodea. Sin embargo se ha demostrado que en soluciones muy diluidas este coeficiente tiene un valor fijo, bajo esas condiciones, recibe el nombre de Constante de Distribución.

En la cromatografía con fines analíticos las separaciones se realizan en general bajo condiciones en las cuales los coeficientes de distribución de los diversos componentes de la muestra son constantes. En estas condiciones, los solutos migran a lo largo de la columna en forma de bandas simétricas, con una distribución normal de concentraciones, que al salir de la columna son detectadas y representadas gráficamente por picos gaussianos. Esta representación gráfica de los componentes eluidos de la columna recibe el nombre de cromatograma.

2. DEFINICIONES.

El lenguaje común empleado en cromatografía utiliza algunos términos y símbolos característicos de esta técnica instrumental:

a) Tiempo de retención (t_r). Es el tiempo transcurrido desde el momento en que el soluto es depositado en la fase estacionaria (inyección), hasta que el máximo de la banda atraviesa la celda del detector.

b) Tiempo muerto (t_0 o t_m). Es el tiempo requerido para eluir una muestra no retenida en la columna y se determina midiendo el tiempo de retención de la fase móvil misma, o bien de una muestra similar.

c) Tiempo de retención ajustado (t_r'). Es la diferencia entre t_r y t_0 , es decir de la medida de tiempo que la muestra permanece retenida en el material de relleno de la columna.

$$t_r' = t_r - t_0$$

d) Número de platos teóricos (N). Un plato teórico es el equilibrio de la distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria.

N se determina de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$N = 16 (t_r' / W)^2$$

El número de platos teóricos es una medida de la eficiencia de la columna y sistemas asociados, y es así que cuanto mayor sea N , más eficiente será la columna.

e) Anchura de la base del pico (W). Es la porción de la línea basal interceptada por tangentes trazadas a ambos lados de un pico, asumiendo que la forma del pico es gaussiana, esta anchura es aproximadamente igual a cuatro veces al valor de la desviación

estándar de una distribución gaussiana.

f) Altura equivalente a un plato teórico (AEPT)

$$AEPT = L/N$$

Donde, L es la longitud de la columna, expresada en mm

Recordando la definición de plato teórico, se deduce que AEPT es la longitud de la columna requerida para obtener un equilibrio de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. Si el valor de AEPT es pequeño, esto se traduce en un mayor número de platos teóricos por unidad de longitud.

g) Velocidad lineal promedio de la fase móvil (u)

$$u = L/t$$

Este parámetro de operación se usa cuando se presenta esquemáticamente AEPT en función de u (gráficas de Van Doozer)

h) Coeficiente de distribución o de reparto (K).

$$K = \frac{\text{Cantidad de muestra, ml de fase estacionaria}}{\text{Cantidad de muestra, ml de fase móvil}}$$

El coeficiente de distribución es una propiedad física fundamental de cada sustancia. Es característico de cada muestra y del sistema de fase móvil y de fase estacionaria en consideración, y también en función de la temperatura.

(Relación de fases o coeficiente de permeabilidad específica)

$$f = \frac{\text{ml de fase móvil}}{\text{ml de fase estacionaria}}$$

De este término se expresa de otra forma se puede decir que por una sección de columna equivale a la porción del volumen de dicha columna ocupado por la fase móvil y la fase estacionaria.

i) Factor de capacidad (k')

$$k' = f \cdot K$$

K Resolución (R) Es una medida cuantitativa del grado entre dos picos, y se expresa así:

$$R = t_{r2} - t_{r1} / (1/2(W_a + W_b)) = 2(t_{r2} - t_{r1}) / W_a + W_b$$

Todos los miembros de esta ecuación deben de ser expresados en las mismas unidades. Un valor de R igual a 1.5 significa una separación completa, por lo tanto valores por debajo de este indicarian una mala separación de los solutos

1) Selectividad (α) Valores elevados de alfa significan mejores separaciones:

$$\alpha = t_{r2} / t_{r1}$$

En forma práctica se puede decir que alfa es una medida de la solubilidad diferencial de dos compuestos en la fase estacionaria.

3. MECANISMOS DE SEPARACION. (p. 10,11)

Existen diferentes mecanismos de separación en cromatografía, los cuales nos sirven para tener una separación de los componentes de la muestra mediante diferente naturaleza de fase móvil y diferentes tipos de columnas.

a) **A D S O R C I O N** : En este tipo de separación, los solutos son retenidos como resultado de la capacidad de la fase estacionaria para unirse a ellas temporalmente, a nivel de superficie activa. Los adsorbentes son sólidos porosos de alta superficie específica en Cromatografía Líquida de Alta Presión usa casi exclusivamente sílice. La sílice está constituida por una red tridimensional de enlaces siloxano (Si-O-Si) con grupos silanol (Si-oh) de superficie.

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

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

adsorbida y corresponde a una retención mayor de los solutos.

Aunque la afinidad del agua por los silanoles sea muy grande, hay un equilibrio de reparto del agua entre las dos fases; es decir que el contenido de agua del eluente va a modificar la actividad del adsorbente hasta llegar a la concentración de equilibrio. Para eluente polares que contienen mayores cantidades de agua, el equilibrio se puede alcanzar rápidamente, pero para disolventes apolares, puede ser necesario esperar varios días para alcanzarlo. Aunque la sílice permita lograr excelente selectividad y eficiencia para moléculas orgánicas apolares y de polaridad intermedia, experimentalmente tiene la deficiencia del tiempo para alcanzar el equilibrio, por lo que en la actualidad los métodos desarrollados con esta fase son reemplazados por métodos utilizando fases injertadas.

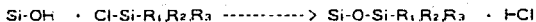
REPARTO CLASICO P A R T I C I O N E En este tipo de separación la mezcla de los solutos se separa de acuerdo con las tendencias relativas de sus componentes para unirse ya sea a la fase móvil o a la fase estacionaria que consta de una capa de líquido colocada sobre la superficie del soporte sólido. Para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

1. La cromatografía en fase normal, en donde la fase estacionaria es polar y la fase móvil apolar.

2. La cromatografía en fase inversa, en donde la fase estacionaria es apolar y la fase móvil polar.

Estas fases se sintetizan por una reacción de los grupos silanol de

superficie de la sílice por un cloro o un etoxi silano conteniendo la función química deseada según la siguiente reacción:



En general, R₁, R₂, R₃ es una cadena conteniendo la función química deseada.

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

Cuando se injerta un grupo apolar (Cl, Co, Ca, C₁₈, fenil), se usa un cloro silano y se obtiene una fase estacionaria de tipo fase "inversa".

Cuando se injerta un grupo polar (NO₂, NH₂, CN, diol) se usa en general un metoxi o etoxi silano y se obtiene una fase estacionaria tipo fase "normal".

La capacidad de estas fases estará ligada a la cantidad de grupos funcionales injertados que se puede expresar en moles por gramo o en % de carbon en el caso de la fase inversa. La sílice injertada presenta muchas ventajas:

buena estabilidad química

desaparición del problema de la actividad de la sílice

grandes posibilidades de polaridades compatibles con todos los solventes.

En la fase "inversa" las fases estacionarias modificadas por una función apolar se usa en general como fase móvil una mezcla de agua

con disolvente orgánico polar por ej. metanol, acetonitrilo, isopropanol, tetrahidrofurano, dioxano. La retención del soluto no se puede explicar entonces por una mayor interacción con la fase estacionaria porque las únicas interacciones posibles con grupos apolares son de tipo dispersión y son mucho menos fuertes que las interacciones de tipo dipolo-dipolo y puente de hidrógeno. La técnica está regida por el efecto hidrofóbico que se puede explicar de la siguiente manera:

una molécula apolar o poco polar tiene más repulsión que atracción por el agua,

las cadenas hidrocarburadas de la fase estacionaria también tienen una repulsión con respecto a la fase móvil,

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

El mecanismo exacto de la retención en fase inversa todavía no se conoce de manera precisa y es probable que además el solvente orgánico se absorba en la superficie de la fase estacionaria para formar una pseudo fase líquida en la cual se disuelve o se adsorbe el soluto.

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

la retención del soluto aumenta cuando la parte apolar de su

molécula aumenta y disminuye cuando su polaridad aumenta.

-el aumento de concentración del solvente orgánico en la fase móvil hace bajar la retención del soluto.

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

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

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

-el orden de fuerza de los eluentes es aproximadamente el inverso de orden observado en adsorción y fase normal, lo que explica también que el término fase inversa haya sido conservado.

-la fase inversa permite separar homólogos funcionales que difieren por la longitud de cadena hidrocarbonada, lo que no se puede hacer en general en cromatografía de adsorción.

-la fase inversa no permite separar fácilmente familias funcionales.

-la selectividad de la fase inversa no es muy buena para la separación de isómeros de posición.

Resulta de las propiedades de la fase inversa que las moléculas muy polares y ionizadas no deberían tener retención en este sistema. Sin embargo, se observa experimentalmente que muchas moléculas experimentan retenciones mucho mayores a lo que se podría esperarse del mecanismo de fase inversa. Esto se debe a la interacción de esas moléculas con la matriz de sílice de la fase estacionaria y en particular con los grupos silanol residuales. En general la eficiencia en estos casos está muy por abajo de las condiciones de la columna y

se notan grandes variaciones de retención de una fase a otra y eventualmente de una columna a otra de la misma fase. Para esos casos, la situación puede mejorarse de diversas maneras:

1. usando un pH más adecuado.
2. utilizando reactivos de pares de iones.
3. utilizando una fase estacionaria con mayor tasa de carbón.

El uso de las columnas de fase inversa son las más utilizadas en la actualidad y permite realizar con éxito probablemente más de 70% de las separaciones.

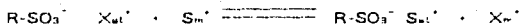
INTERCAMBIO IÓNICO: Los dominios principales de aplicación de esta técnica son en las áreas de los productos inorgánicos, aniones y cationes minerales y en bioquímica.

La técnica conocida como intercambio iónico ha sido ampliamente estudiada en el pasado bajo su forma clásica, es decir utilizando resinas de intercambio iónico de granulometría relativamente grande como fases estacionarias. En la actualidad, el intercambio iónico se ha adaptado a la cromatografía de líquidos moderna mediante la introducción de resinas de granulometría fina, entre 5 y 15 μ m, una matriz de poliestireno/divinilbenceno y una estructura macroporosa a diferencia de las resinas clásicas microporosas con estructura de gel. Eso permite disminuir la tasa de hinchamiento de las resinas que es variable según el solvente y la naturaleza del ión utilizado y también obtener una estructura porosa con canales internos de mayor diámetro, lo que mejora la cinética de intercambio y entonces la eficiencia.

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

(amonio cuaternario o amina).

Para el equilibrio de cationes, la retención es regida por el siguiente equilibrio:



donde:

st y m representan las fases estacionaria y móvil.

x representa el catión presente en la fase móvil.

s representa el soluto

Es decir que el soluto compete con el catión del eluente por los sitios de intercambio iónico.

El mismo mecanismo ocurre con el intercambio de aniones.

En todos los casos, la influencia del pH es grande cuando los solutos son ácidos o bases débiles y que se puede modificar el estado de ionización.

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

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

Para hacer cromatografía de pares de iones se usa una columna de fase inversa clásica de tipo C₁₈ o C₈.

La fase móvil está constituida por una mezcla agua disolvente primario y contiene además un buffer que permite fijar el pH del medio.

de manera que los solutos y los contra-iones se encuentren ionizados en esta fase.

La fase móvil contiene también una sal de contra-ión que se pretende utilizar para la realización de pares de iones con los solutos.

El contra-ión es en general un ion orgánico cuya molécula contiene una parte hidrocarbonada importante como por ejemplo:

-Contra-ión aniónico: alquisulfonatos.

Contra-ión catiónicos: tetraquilamonios o aminas terciarias.

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

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

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

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

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

d) PERMEACION O EXCLUSION: Es aplicada particularmente para la separación de sustancias de peso molecular elevado mas de 2.000 g/mol. se utiliza para estudios de la distribución de pesos moleculares en polímeros sintéticos y también para separación de mezclas donde los constituyentes son de pesos moleculares muy diferentes y finalmente en estudios iniciales de muestras desconocidas. Ya que la cromatografía de permeación indica en este caso, rápidamente, si la muestra es simple o complicada y el rango de pesos moleculares en que se sitúan sus contituyentes.

La cromatografía de permeación se basa en la retención selectiva de las moléculas de solutos en función de su talla debido a la mayor o menor penetración e incluso a la exclusión de dichas moléculas de los poros de una fase estacionaria apropiada. Las moléculas grandes migran rápidamente pues son excluidas de la totalidad o de una parte de los poros de la fase estacionaria mientras que las moléculas más pequeñas pueden entrar en todos los poros y viajan más lentamente.

Es decir que la separacion no está basada en interacciones físico-químicas con la fase estacionaria sino solamente en la dimensión de las moléculas en solución

Por otra parte como las moléculas del disolvente son generalmente pequeñas y penetran en todos los poros, la fase móvil migra más lentamente que toda la muestra, es decir que todos los compuestos son eluidos antes del tiempo t_0 que corresponde a la

salida de los volúmenes intersticial y poroso, al contrario de lo que sucede en las demás técnicas cromatográficas de interacciones.

Esas características dan lugar a varias ventajas como:

1 Se obtienen bandas estrechas de los solutos, lo que facilita la detección.

2 La capacidad de la fase estacionaria es en general superior, lo que permite el uso del refractómetro para la mayoría de los polímeros sintéticos.

3 Las separaciones son rápidas para cualquier tipo de soluto sin necesidad de efectuar gradiente de elución.

4. El tiempo de análisis es fácilmente predecible. Todos los compuestos son eluidos entre el tiempo que tardan en migrar las moléculas completamente excluidas y to.

5 Se facilita la identificación de los picos correspondientes a los diferentes compuestos de la muestra ya que la retención depende únicamente de la talla de la molécula.

6. No hay pérdidas o alteraciones químicas de la muestra durante la separación.

7 La columna acumula menos impurezas por lo que se degrada o se desactiva menos rápidamente.

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

1 Es inaplicable para la separación de compuestos de talla similar. Se requiere al mínimo 10 % de diferencia en los pesos moleculares de los solutos.

2 La capacidad de picos es limitada. Esto quiere decir que solo algunos picos separados pueden ser acomodados en el cromatograma total porque este es muy corto.

Dependiendo de la solubilidad de las muestras, se requerirán fases móviles acuosas u orgánicas, lo cual a su vez, condiciona material de que está hecha la fase estacionaria. Esto ha dado origen a una división, un poco artificial, de la cromatografía de exclusión en:

a) Cromatografía de permeación de gel para los disolventes orgánicos y.

b) Cromatografía de filtración de gel para los disolventes acuosos.

4. SISTEMA CROMATOGRAFICO

Debido a las precisiones que son relativamente altas y que son necesarias para realizar la Cromatografía líquida de alta Presión, se requiere de un equipo experimental más elaborado que el que se emplea en la cromatografía de líquidos llamada clásica...

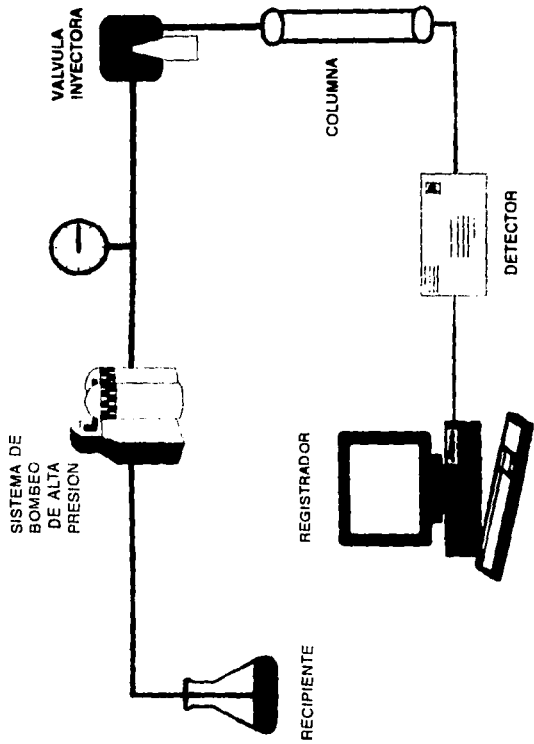
El sistema cromatográfico está constituido por los elementos esenciales para un cromatografo de líquidos de alta presión, como se muestra en el esquema No. 1.

Algunos elementos son indispensables para la aplicación de la técnica:

- RESERVORIO
- BOMBA CROMATOGRAFICA.
- INYECTOR.
- COLUMNA.
- GRAFICADOR Y/O INTEGRADOR.

Otros son opcionales:

- SISTEMA DE GRADIENTE.
- MUESTREADOR AUTOMATICO.
- REGULACION DE TEMPERATURA DE LA COLUMNA.
- SISTEMA COMPUTARIZADO DE OPERACION DEL CONJUNTO.



SISTEMA CROMATOGRAFICO

Esquema 1. Representacion Basica de un Cromatografato de Alta Presion.

a) RESERVORIO: Los reservorio de los solventes son de vidrio o acero inoxidable, capaces de tener hasta un litro de fase móvil, la cual puede constar de solventes orgánicos puros o de soluciones acuosas de sales o buffers. Las sustancias usadas para preparar estas mezclas deben de ser de la mayor pureza posible dado que los contaminantes se depositarán eventualmente sobre la columna o interrumpirán la cromatografía. Las fases móviles se someten a tratamiento para desgasificarlas usando vacío o sonicación para eliminar gases en la bomba o en el detector y se filtra para remover partículas extrañas que puedan obturar el sistema

b) BOMBA CROMATOGRÁFICA: El sistema de bombeo debe presentar un flujo de 0.025 - 5 ml/min para cromatografía analítica

Soportar presiones desde 30 - 50 atm (400 - 700 psi) hasta 300 - 400 atm (4000 - 5600 psi)

La reproducibilidad del flujo debe ser menor de 1 % y este debe ser independiente de la presión y viscosidad del líquido

No debe de tener pulsaciones y estar estable

El material del que esta hecho debe de ser químicamente resistente a la fase móvil y tener la posibilidad de gradiente de elución con bajo volumen muerto

Los principales tipos de bombas son:

1 Bombas de presión de gas directa o con amplificación de presión

2 Bombas tipo jeringas

3 Bombas de diafragma o de pistón.

La totalidad de las bombas actuales son reciprocantes de diafragma o de pistón, el elemento unitario está constituido por:

- una cámara de bombeo de alta presión y bajo volumen (50 - 1000 μ l),

- un elemento móvil alternativo que provoca el movimiento del líquido (diafragma o pistón),

- dos válvulas de retención funcionando en sentido contrario para asegurar el flujo.

La reserva del eluente aspirado por la bomba cromatográfica no necesita tener características especiales. Sin embargo, es recomendable tomar las siguientes precauciones:

- utilizar un filtro de aspiración del eluente para evitar introducir partículas sólidas en suspensión que pueden dañar empaques y válvulas check de las bombas y tepar progresivamente la cabeza de la columna por acumulación. Este filtro esta constituido por un cilindro de acero inoxidable fritado de poro de entre 0.5 - 10 μ m.

- degasificar el eluente antes de utilizarlo, ya que el oxígeno disuelto en el eluente puede provocar burbujas indeseables durante la aspiración de la bomba y sobre todo durante la decompresión en la celda del detector.

- mantener tapada o cubierta la reserva de disolvente para evitar la entrada de polvo y la evaporación de los solventes volátiles que puede provocar daños a la salud y cambiar la composición de la fase móvil

INYECTOR El inyector mas común es el de tipo "loop", este inyector es una válvula de alta presión con 6 puertos y 2 posiciones

Una de las posiciones comunica directamente la bomba con la columna mientras que se puede introducir la muestra en el "loop" a baja presión. El "loop" es en general un capilar externo con un volumen conocido o para volúmenes muy pequeños, un canal interior.

La válvula de "loop" puede ser de inyección externa o central.

En inyección externa se tiene que lavar al "loop" con la muestra y se inyecta el volumen total.

En inyección central, además de la opción de inyección en "loop" lleno existe la opción de inyección en "loop" parcial, lo que permite introducir un volumen parcial conocido.

La inyección en "loop" lleno permite alcanzar una excelente reproducibilidad del volumen inyectado y el uso de un estándar interno no es necesario.

La inyección en "loop" parcial permite variar las cantidades inyectadas, pero la reproducibilidad de la inyección depende de la jeringa y del estado de la válvula.

Existen también equipos de muestreo automático, muchos de ellos usan el mismo tipo de válvulas con sistema automático de limpieza e introducción de la muestra. Otros equipos usan sistemas más complejos pero que utilizan el mismo principio de inyección.

d) COLUMNA CROMATOGRÁFICA. La columna cromatográfica está constituida por un tubo de acero inoxidable que contiene la fase estacionaria. El tubo tiene una superficie interior con excelente nivel de pulido, diámetros interiores (D.I.) más comunes: 4.6 , 2.3 , 5.7 mm. y una longitud de 3 - 3- cm.

Las dos extremidades tienen conexiones de reducción y contiene

una pastilla de acero inoxidable fritado poroso que permite mantener la fase estacionaria en la columna. Esas conexiones deben ser cuidadosamente diseñadas para tener un volumen muerto mínimo y lograr una repartición regular de la fase móvil en la columna.

La columna cromatográfica es el elemento central del sistema y hay que tener algunas precauciones para obtener un tiempo de vida correcto y una buena reproducibilidad de las características cromatográficas:

- evitar las partículas en suspensión en los eluentes porque se acumula en el fritado de entrada de la columna, lo que va a tapar progresivamente la columna.

- evitar muestras con impurezas que se adsorben irreversiblemente en la columna y modifican sus características.

- evitar eluentes con un pH superior a 8 cuando la fase estacionaria tiene una matriz de sílice.

e. DETECTOR. La detección del soluto fue durante mucho tiempo una de las principales dificultades de la Cromatografía de líquidos de alta Presión. La fase móvil está constituida por uno o varios solventes, lo que dificulta la posibilidad de utilizar detectores universales sensibles como son los detectores de ionización de flama o de conductividad térmica en cromatografía de gases.

Por lo que un detector ideal debe tener una alta sensibilidad y una respuesta estable en el tiempo, tener una celda y conexiones de bajo volumen, tener un rango alto de linealidad de respuesta y debe ser ya sea universal o específico.

DETECTORES REFRACTOMETRICOS. Es un detector universal, la señal es la diferencia entre el índice de refracción de la celda de medida que recibe el efluente de la columna y la celda de referencia que contiene el eluente empleado. El soluto provoca entonces una variación muy pequeña del índice en la celda de medida proporcional a la concentración. El detector refractométrico no es muy sensible y sus límites de detección son en general del orden de 0.1 a 1 μg inyectados.

DETECTORES DE LUZ ULTRAVIOLETA (UV). Son los detectores más utilizados y representan aproximadamente el 80 % de los detectores de HPLC.

El principio de la detección está basado en la absorción de luz provocada por el soluto. La concentración del soluto en la celda está relacionada a la fracción de luz transmitida por la ley de Lambert-Beer:

$$A = -\log_{10} \frac{I_t}{I_0} = \epsilon lc$$

Donde:

A* Absorbancia

I_0 * Intensidad de la luz incidente

I_t * Intensidad de la luz transmitida.

ϵ * Coeficiente de extinción molecular del soluto a la longitud de onda de trabajo.

l * Longitud del camino óptico en la celda.

c * Concentración del soluto.

ϵ que es el coeficiente de respuesta del soluto varía mucho con la longitud de onda y la naturaleza del producto, lo que implica que el detector UV es específico. Si se escoge un eluente constituido por

solventes de bajo ϵ es posible obtener sensibilidades altas y en casos favorables límites de detección muy bajos.

DETECTORES DE LONGITUD DE ONDA FIJA. Es el detector más sencillo y menos caro. La fuente UV es un lámpara de vapor de mercurio que proporciona una longitud de onda de 254 nm y 280 nm.

DETECTOR DE LONGITUD DE ONDA VARIABLE. Es el detector más utilizado. Permite trabajar en general de 190 a 500 nm con selección continua manual de la longitud de onda. Los aparatos integrados y computerizados permiten el cambio de longitud de onda programable a tiempos pre-establecidos.

ESPECTOFOTOMETROS. Algunos detectores de longitud de onda variable son también espectofotómetros y permiten trazar el espectro del soluto parando la bomba cromatográfica cuando el soluto se encuentra en la celda.

DETECTORES DE ARREGLO DE DIODOS. El detector no posee monocromador para elegir la longitud de onda. Un haz de luz policromática atraviesa la celda y es dispersada después. Un conjunto de diodos electroluminescentes recibe el haz fraccionado, lo que permite registrar en cada momento la totalidad del espectro UV visible.

DETECTOR DE FLUORESCENCIA. Utiliza las propiedades de fluorescencia de ciertas moléculas. En caso favorable es un detector muy sensible que permite detectar hasta picogramos de soluto.

Es un detector altamente específico que puede utilizarse con gradiente de elución. Es poco sensible a las variaciones de flujo o de temperatura.

INTEGRADORES. En la actualidad, la totalidad de los integradores son electrónicos. El principio básico de la integración consiste en fraccionar la señal del detector en elementos unitarios de superficie muy pequeños, estos elementos se agrupan después por múltiplos del elemento unitario según la sensibilidad escogida. La comparación entre la superficie de un conjunto y del siguiente permite detectar el inicio y el fin de un pico en función de las pendientes escogidas. Existen aparatos dedicados a la integración o softwares de integración que se adaptan a microcomputadoras.

II. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

La S-Carboximetilcisteína es un aminoácido usado por sus propiedades broncosecretolíticas; ya que facilita la respiración y deprime la tos, (13) como es un activo de amplia importancia se decidió desarrollar un método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución, que cuantifique en forma específica la molécula y que sirva como método para Control de Calidad y estudios de Estabilidad; dado que la S-Carboximetilcisteína se cuantifica mediante diversos métodos, tales como por desarrollo de color con ácido sulfúrico y lectura en la región UV, este tipo de métodos implican tiempos de análisis largos, mayor riesgo por utilizar ácidos concentrados, estricto control de tiempo y temperatura lo cual implica que el método tenga mucho error en los resultados y no sea específico para estudios de estabilidad.

Ante estas circunstancias se requiere desarrollar un método de análisis el cual sea de menor riesgo, menor tiempo de análisis y mejores resultados cuantitativos, tal como la Cromatografía de Líquidos, ya que es una técnica práctica, eficiente, versátil y reproducible.

En la literatura para la cuantificación de S-Carboximetilcisteína, por ser un aminoácido, requiere métodos previos de derivatización para su cuantificación. Melucci, Lyman, Bond y Johnson determinaron a la S-Carboximetilcisteína por Cromatografía Líquida de Alta Presión (14), en donde encontraron que el método analítico era indicativo de estabilidad. Se probaron esas condiciones en el laboratorio y se encontró que el método no era

reproducibile ni específico para estudios de Estabilidad

De lo anterior se desprende la necesidad de desarrollar un método de análisis para la S-Carboximetilcisteína que pueda ser empleado como método de análisis, así como indicativo de estabilidad. Teniendo como requisito la validación de métodos analíticos por parte de la Secretaría de Salud, ya que establece los requisitos mínimos para que una técnica analítica se encuentre validada con el objeto de asegurar la calidad de los medicamentos y tener resultados confiables.

La validación del método analítico permite evaluar parámetros estadísticos como son:

Linealidad y Precisión del Sistema.

Linealidad, Exactitud, Precisión, Estabilidad de la muestra, Tolerancia y Especificidad del Método analítico de donde se obtiene la suficiente información para determinar la confiabilidad del mismo para su futura aplicación, por ejemplo: análisis de rutina o estudios de estabilidad.

III. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y Validar un método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución para la cuantificación de S-Carboximetilcisteína en jarabe que sea indicativo de estabilidad y cumpla con los requisitos mínimos que marca la Secretaría de Salud.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Desarrollar un método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución que separe a la S-Carboximetilcisteína de los excipientes de la formulación y de sus productos de degradación.
2. Optimizar el método analítico para la cuantificación de S Carboximetilcisteína.
3. Determinar linealidad y precisión del sistema.
4. Evaluar la linealidad, precisión, especificidad, exactitud, estabilidad de la muestra y tolerancia del método.

IV. HIPOTESIS

El método analítico desarrollado por Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Partición es el adecuado para cuantificar S-Carboximetilcisteína debido a la alta polaridad de la molécula y la columna además no interfiere con los excipientes de la formulación ni con los productos de degradación, obteniéndose resultados más confiables y reproducibles por la gran sensibilidad de la técnica.

V.PARTE EXPERIMENTAL.

A.COMPOSICION.

Cada 100 ml contienen:

S-Carboximetilcisteina	5.000 g.
Excipiente c.b.p.	100 ml.

B.REACTIVOS.

Acetonitrilo grado HPLC Mallinckroft.
Agua grado HPLC.
S-Carboximetilcisteina estándar de referencia.
Fosfato de potasio monobásico. G.A.
Hidróxido de sodio 0.1 M.

C.MATERIAL.

Espátula de Cromo-Niquel.	
Matraz aforado de 500 ml	Pyrex.
Matraces aforados de 100 ml.	Pyrex.
Matraz aforado de 25 ml.	Pyrex.
Matraz aforado de 500 ml.	Pyrex.
Pipeta volumétrica de 4 ml.	Pyrex.
Pipeta volumétrica de 5 ml.	Pyrex.
Pipeta volumétrica de 10 ml.	Pyrex.
Probeta de 500 ml.	Pyrex.

D.EQUIPO.

Detector Waters 991 arreglo de diodos.

Bomba Waters 600E.

Automuestreador Waters 717.

Computadora Personal AcerMate 386SX/33

Equipo de clarificación de solventes Milli Q.

Balanza analítica Bosch 200-14850.

E.METODOLOGIA

1.DESARROLLO DEL METODO ANALITICO.

En 1987 Malucci, Lyman, Bond, Johnson (16) desarrollaron un método por Cromatografía Líquida de Alta Presión, para la cuantificación de la S-Carboximetilcisteína utilizando:

Solvente de dilución: Hidroxido de sodio 0.1N

Solución de fosfatos: Pesar 13.6 g de fosfato monobásico de potasio en un matraz aforado de 2 litros, diluir y aforar con agua. Tomar cuantitativamente 50 ml de esta solución y llevarla a un matraz aforado de 1000 ml diluir y aforar con agua (Concentración 0.01M).

Fase móvil: Mezclar un volumen de 750 ml de solución de fosfatos con 250 ml de Acetonitrilo. Filtrar y desgasificar por vacío.

Solución Estándar: Pesar 40, 50 o 60 mg de Estándar de referencia en un matraz volumetrico de 25 ml, diluir y aforar con NaOH 0.1 N. Tomar una alícuota de 1 ml y llevarlo a un matraz de 10 ml diluir y aforar con agua.

Solución muestra: Tomar la cantidad equivalente de S-Carboximetilcisteína para obtener la concentración del estándar.

Sistema Cromatografico:

Columna:	Spherisorb NH ₂ (5 micras)
Flujo:	0.8 a 1.5 ml.
Detector:	220 nm.
Vol. inyección:	50 μ l

Concluyendo con esto, que el método era el adecuado para la cuantificación de S-Carboximetilcisteína y se separaba de su producto de degradación (Cisteína).

A partir de esta referencia se probó el método analítico en el laboratorio, encontrándonos con varios problemas:

1. El método no era específico de estabilidad
2. El tiempo de retención no era reproducible

Por esta razón se decidió desarrollar el método analítico para la cuantificación de S-Carboximetilcisteína en Jarabe, buscando una fase móvil que mejorará la variación en el tiempo de retención y diera una mejor reproducibilidad, encontrándose que con la adición de un Buffer de Fosfatos pH 4.5 el tiempo de retención de la S-Carboximetilcisteína era constante y por lo tanto era muy reproducible. Optimizando el volumen de inyección a 20 μ l y a un flujo de 1.1 ml.

Posteriormente se requería un método analítico que fuera indicativo de estabilidad, por esta razón se probaron diferentes concentraciones de fase móvil para modificar su fuerza de elución y separar a la S-Carboximetilcisteína de su producto de degradación (Cisteína), encontrando que en una proporción 50 Fase acuosa 50 Fase orgánica era la adecuada. Posteriormente se validó la técnica analítica.

2. METODOLOGIA ANALITICA PARA LA CUANTIFICACION DE S-CARBOXIMETILCISTEINA EN JARABE.

Buffer de fosfatos pH-4.5

Tomar 1.44 ml de Acido Fosfórico y 3.4 g de Fosfato monobásico de potasio en un matraz aforado de 100 ml, disolver y aforar con agua grado HPLC. Transferir una alícuota de 10 ml a un matraz aforado de 500 ml, diluir y aforar con agua grado HPLC.

Fase Móvil.

Preparar una mezcla de buffer de fosfatos:Acetonitrilo en una proporción (1:1), desgasificar por filtración a través del equipo de clarificación de solventes.

Solución Estándar.

Transferir alrededor de 50 mg de S-Carboximetilcisteina estándar de referencia, exactamente pesados a un matraz aforado de 25 ml. disolver y aforar con hidróxido de Sodio 0.1M. Transferir una alícuota de 10 ml a un matraz aforado de 100 ml. diluir y aforar con agua grado HPLC. Pasar la solución a través de un filtro Millex de 0.45 micras (Concentración final 0.2 mg/ml)

Solución Muestra:

Transferir una alícuota de 5 ml de Jarabe a un matraz aforado de 50 ml. Diluir y aforar con Hidróxido de sodio 0.1 M. Transferir una alícuota de 4 ml a un matraz aforado de 100 ml. diluir y aforar con agua grado HPLC. Pasar la solución a través de un filtro Millex de 0.45 micras o equivalente (Concentración final 0.2 mg/ml).

Sistema Cromatográfico:

Columna: Spherisorb NH₂ 5L 4.6 x 150 mm.
Detector: 220 nm
Flujo: 1.1 ml/min.
Vol. Inyección: 20.0

Procedimiento:

Inyectar en el cromatógrafo de líquidos 5 veces la solución estándar y calcular el coeficiente de variación para la respuesta del pico correspondiente a S-Carboximetilcisteína. Si el coeficiente de variación es menor de 15 % inyectar la solución muestra, en caso contrario dejar estabilizar al sistema y repetir las inyecciones del estándar hasta que el coeficiente de variación sea menor de 15 %. En caso de que se inyecten 5 soluciones de muestra o más inyectar nuevamente la solución estándar.

METODOLOGIA PARA LA VALIDACION DEL METODO ANALITICO

Estabilidad del Sistema

El propósito de esta prueba es determinar si el sistema de análisis de muestra es capaz de reproducir los resultados de una muestra de referencia exacta durante un período de tiempo suficiente para permitir el análisis de una muestra de referencia exacta.

Hidróxido de sodio 0.1 M. Preparar muestras con las siguientes concentraciones:

	Alicuota	Aforo con H ₂ O	
50 %	2	100	[0.10 mg/ml]
75 %	3	100	[0.15 mg/ml]
100 %	4	100	[0.20 mg/ml]
125 %	5	100	[0.25 mg/ml]
150 %	6	100	[0.30 mg/ml]

b. Precisión del Sistema.

Se determinó por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100 %, establecido en la linealidad del sistema.

c. Linealidad del Método.

A partir de una solución Stock de estándar de S-Carboximetilcisteina. Transferir alrededor de 2.5 g exactamente pesados a un matraz aforado de 500 ml, disolver y aforar con Hidróxido de sodio 0.1 M. Preparar muestras de Placebo Cargado con las siguientes concentraciones:

	Alicuota	Aforo con H ₂ O	
50 %	2	100	[0.10 mg/ml]
75 %	3	100	[0.15 mg/ml]
100 %	4	100	[0.20 mg/ml]
125 %	5	100	[0.25 mg/ml]
150 %	6	100	[0.30 mg/ml]

d. Exactitud del Método.

A partir de una solución Stock de estándar, se prepararon 10 muestras de placebo cargado con porcentajes del principio activo correspondientes al 100 % de la cantidad requerida por el método analítico, establecido en linealidad del método analítico.

e. Precisión del Método.

A partir de una solución Stock de estándar, se prepararon 10 muestras de placebo cargado con porcentajes del principio activo correspondientes al 100 % de la cantidad requerida por el método analítico, establecido en linealidad del método analítico.

f. Reproducibilidad del Método.

A partir de un placebo cargado al 100 % analizar la muestra por triplicado con dos analistas en dos días diferentes.

g. Estabilidad de la muestra

A partir de tres placebos cargados al 100 % , almacenar la muestra preparada a diferentes condiciones: luz, oscuridad y refrigeración, analizándolas con el método analítico en condiciones normales de operación

h. Especificidad para Estudios de Estabilidad

Someter muestras de Estándar, Placebo solo y Placebo Cargado a condiciones drásticas de degradación como por ejemplo: Degradación Ácida y Básica Temperatura posteriormente neutralizarlas y analizarlas con el método analítico en condiciones normales de operación

VI. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS.

a. LINEALIDAD DEL SISTEMA

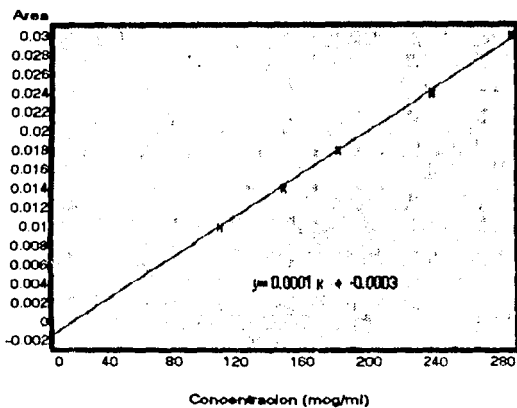
En la tabla 1 se encuentran los resultados que representan la concentración del 50, 75, 100, 125 y 150 % y la respuesta obtenida por el método analítico.

CONCENTRACION microgramos/ml	RESPUESTA area
X	Y
100	0.009678
100	0.009257
100	0.009511
150	0.014478
150	0.014393
150	0.014511
200	0.019504
200	0.019676
200	0.019471
250	0.024672
250	0.024474
250	0.024451
300	0.029564
300	0.029143
300	0.029345

TABLA 1. LINEALIDAD DEL SISTEMA

De estos resultados se determinaron la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación (r)

REGRESION LINEAL DE LOS RESULTADOS	REGLA DE DECISION	CRITERIO DE ACEPTACION
$m = 0.0001$ $b = 0.0003$ $r = 0.9997$	$r > 0.98$	El sistema es lineal ya que 0.997 es mayor que 0.98



GRAFICA 1. LINEALIDAD DEL SISTEMA

Representa la relacion existente entre la concentracion y la respuesta, para la determinacion de S-Carboxamidoesteirina en Jarabe

b. PRECISION DEL SISTEMA

En la tabla 2 se encuentran los resultados de las respuestas obtenidas correspondientes al 100 %, por el método analítico establecido en la linealidad del sistema

Numero de repeticiones	RESPUESTA area
1	0.019504
2	0.019676
3	0.019471
4	0.019631
5	0.019699
6	0.019757

TABLA 2. PRECISION DEL SISTEMA

Con los resultados obtenidos se calculó el coeficiente de variación:

COEFICIENTE DE VARIACION DE LOS RESULTADOS	REGLA DE DECISION	CRITERIO DE ACEPTACION
C.V. = 0.58 %	C.V. < 1.5 %	El sistema es preciso porque 0.58 es menor que 1.5

C.LINEALIDAD DEL METODO

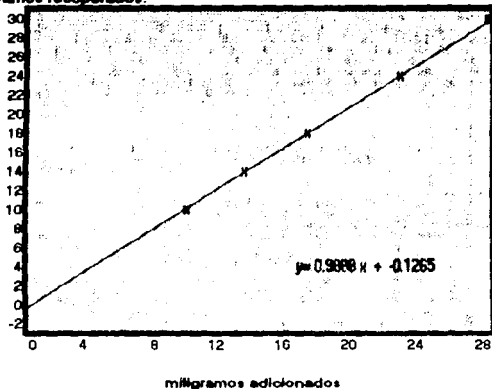
En la tabla 3 se encuentran los resultados que representan los miligramos adicionados correspondientes al 50, 75, 100, 125 y 150% de la cantidad requerida y los miligramos recuperados por el método analítico.

MILIGRAMOS ADICIONADOS	MILIGRAMOS RECUPERADOS
9.9984	9.541
9.9984	9.5761
9.9984	9.5493
14.9976	15.6216
14.9976	14.591
14.9976	14.8846
19.9968	19.6096
19.9968	19.621
19.9968	19.7056
24.996	24.7219
24.996	24.8127
24.996	24.9242
29.9952	29.3633
29.9952	29.3685
29.9952	29.2374

TABLA 3. LINEALIDAD DEL METODO

REGRESION LINEAL DE LOS RESULTADOS	REGLA DE DECISION Estadística t	CRITERIO DE ACEPTACION
t calc.	t tablas = 2.145	El método es lineal con una pendiente igual a 1 ordenada al origen igual a cero ya que t m=0.042 y t b=0.496 son menores que 2.145
m=0.9888 t=0.426	calc. < 1 n-1; 0.95 m = 1	
b=-0.1265 t=0.486	calc. < 1 n-1; 0.95 b = 0	
r = 0.9984	r > 0.99	

miligramos recuperados.



GRAFICA 2 LINEALIDAD DEL METODO

Representa la relación existente entre los miligramos adicionados y los miligramos recuperados para la determinación de S-Carboximetilcisteína en Jirabe.

d. EXACTITUD DEL METODO

En la tabla 4 se encuentran los resultados de los % de recobro correspondientes al 100% por el método analítico.

Numero de muestras n	% RECUPERADO y
1	99.5632
2	99.9504
3	100.1208
4	100.6329
5	100.0175
6	100.54
7	99.5064
8	99.429
9	100.193
10	99.7387

TABLA 4 EXACTITUD DEL METODO

De estos resultados se saca la t calculada y se compara con la t de tablas

t CALCULADA DE LOS RESULTADOS	REGLA DE DECISION	CRITERIO DE ACEPTACION
t calculado = 0.246	t tablas = 2.262 t calculada < t tab [n-1, 0.95]	El metodo es exacto ya que 0.246 es menor que 2.262

e. PRECISION DEL METODO

En la tabla 5 se encuentran los resultados de los % de recobro correspondientes al 100% por el método analítico.

Numero de muestra n	% RECUPERADO Y
1	99.5632
2	99.9504
3	100.1208
4	100.6329
5	100.0175
6	100.54
7	99.5064
8	99.429
9	100.193
10	99.7387

TABLA 5. PRECISION DEL METODO

De estos resultados se saca el coeficiente de variación C.V

COEFICIENTE DE VARIACION DE LOS RESULTADOS	REGLA DE DECISION	CRITERIO DE ACEPTACION
C.V = 0.395	$C.V < 2\%$	El método es preciso ya que 0.395 es menor que 2

REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

En la tabla 6 se encuentran representados los % de recobro obtenidos por dos analistas en dos diferentes días.

DIA	ANALISTA	
	1	2
1	96.16%	96.15%
	96.17%	95.78%
	96.17%	96.43%
2	95.90%	97.87%
	96.64%	96.62%
	95.20%	96.10%

TABLA 6. REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Con los resultados obtenidos en la tabla 6 se realizó el análisis de varianza de demostrando que los resultados del método analítico son independientes del laboratorio, analista, día del análisis o equipo utilizado en la determinación.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F Calculado	F Tablas
Analista a	a-1 1	SC a 0.3434	SC a 0.3434	$F_a = SC_a / MC_d$ 0.5848	$F(g_l d; g_l d; 0.95)$ 38.51
Día d	(d-1)a 2	SC d 1.1744	SC d/g.l.d. 0.5872	$F_d = MC_d / MC_e$ 1.4599	$F(g_l d; g_l e; 0.95)$ 6.06
error e	(r-1)ad 8	SC e 3.2178	SC e/g.l.e. 0.4022		

TABLA 7. ANALISIS DE VARIANZA PARA REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

F	CALCULADA	REGLA DE DECISION	CRITERIO DE ACEPTACION
Analista a	F = 0.5848	$F_{analista} = F_{tablas} = 38.51$ $F_a < F(g_l d; g_l e; 0.95)$	El método es reproducible por diferentes analistas $0.5848 < 38.51$
Día d	F = 1.4599 2	$F_{dia} = 6.06$ $F_d < F(g_l d; g_l e; 0.95)$	El método es reproducible en diferentes días por un mismo analista $1.4599 < 6.06$

g. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

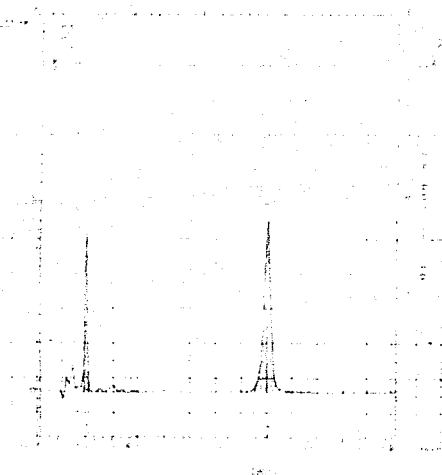
En la tabla 8 se encuentran los resultados del % de recobro de las muestras almacenadas bajo diferentes condiciones.

CONDICION	LUZ			OSCURIDAD			REFRIGERACION		
	0	24	48	0	24	48	0	24	48
Y1	97.56	99.05	102.05	102.09	100.32	101.74	97.51	98.2	100.00
Y2	97.95	99.34	101.62	99.02	98.12	101.36	97.43	99.01	101.69
Y3	98.12	98.65	102.17	102.54	102.46	101.43	98.19	98.46	101.53

TABLA 8. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA:

Para un tiempo dado, se midió el contenido de la muestra en el momento de su almacenamiento en las condiciones de luz y oscuridad. La muestra almacenada en refrigeración se pesó después de 48 horas. Fuente: B. VERA (1998).

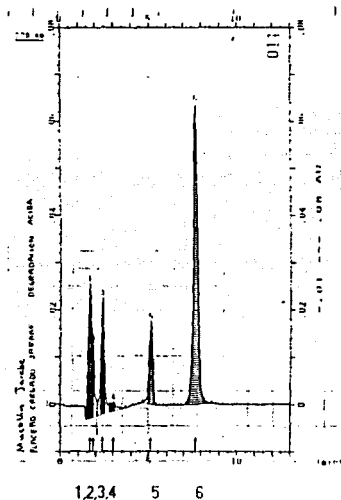
RESPECIFICIDAD PARA CONTROL DE CALIDAD



TRIMETILAMINA (T.M.A.) EN EL DEFECHO DE FARMACIA FARMACOLÓGICA TRIOSTEMA (A. GRUPO)

CONDICIONES: 100°C, 100% NITRÓGENO, 100% GLICOL ETILÉTER

ESPECIFICIDAD PARA ESTABILIDAD



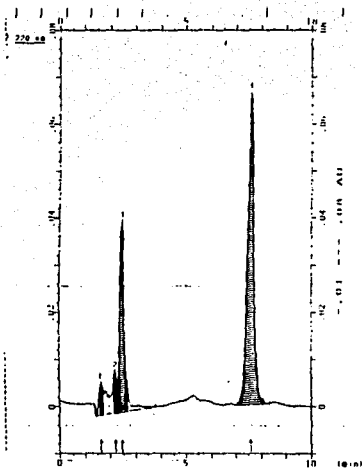
picos 1 2 3 4 5 6

CROMATOGRAMA 1. PLACEBO CARGADO DEGRADACION ACDA

Los picos 1,2,3,4, son señales correspondientes al placebo.

El pico 5, es la señal correspondiente al producto de degradación (Catena)

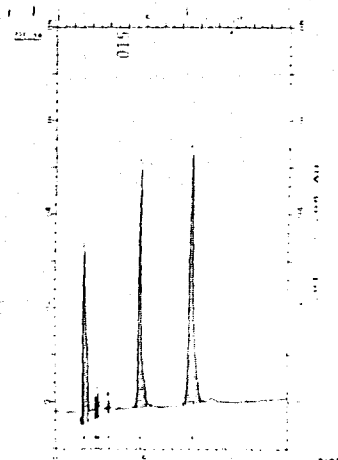
El pico 6, es la señal correspondiente a la S-Carboximetilcisteína



picos 1,2,3 4

CRONATOGRAMA 2 PLACEBO CARGADO DEGRADACION BASICA

Los picos 1,2,3, son señales correspondientes al placebo.
El pico 4, es la señal correspondiente a la S-Carboximetilcisteína



1968 10 24 5 6

DIFFRACTION PATTERN PLAYS OF ANIONS OF RADICALS FOR TEMPERATURE

Fig. 1. Diffraction pattern of the radical anion of the polymer.

Fig. 2. Diffraction pattern of the radical anion of the polymer (KBrO₃).

Fig. 3. Diffraction pattern of the radical anion of the polymer (KBrO₃).

VII. CONCLUSIONES.

1 De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que el método analítico es el adecuado para la cuantificación de S-Carboximetilcisteína.

2 Los parámetros evaluados demuestran que el sistema resultó ser lineal.

3 El sistema es preciso.

4 El método es lineal, con una pendiente (m) estadísticamente igual a uno y una ordenada al origen (b) estadísticamente igual a cero.

5 El Método es exacto.

6. El Método es repetible y reproducible sin que exista interferencia por el día y el analista

7 La muestra es estable por 48 hrs almacenadas en la oscuridad

8 El Método es específico para Control de Calidad y Estabilidad
Para determinar la especificidad del método para estabilidad se utilizó el detector de arreglo de diodos. Por los resultados obtenidos concluimos que el pico es puro. A pesar de que se sometieron a degradación muestras de estándar plabele y plabele cargado al utilizar el procedimiento de pureza para determinar si el pico era puro con se utilizaron los cromatogramas obtenidos al degradar el plabele cargado con que al demostrar que el pico es puro concluimos que no hay interferencia detectable con el método de degradación. Este procedimiento se utilizó para determinar la especificidad del método para estabilidad.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

1. Bron J, "Relative Bioavailability of Carbocysteine from 3 Dosage Forms, Investigated in Healthy-Volunteers", *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 9 (1), 97-111, 1988

2. Codex Medicamentarius Gallicus, Farmacopra Francesa, 10 edición. Francia pag. 645, 1989

3. Sanofi de México, Monografía de Control, para materia prima de S-Carboximetilcisteína, México D.F. Septiembre, 1991

4. Asociación Farmacéutica Mexicana. Taller de Validación México, 1989

5. Adriano J.V. Hardwidge E.A. "Guidelines for Assay Validation" *Pharm Tech* 5 (3), 1982

6. Pune University "Validation Concepts Proceeding of Management Conference for Pharmaceutical Industry", Indiana U.S.A., 1987

7. Guerra J. "Validation of Analytical Methods by FDA Laboratories" *Pharm Tech* March 74-76, 1982

8. Sanofi de México. Manual de Validación de Métodos. México D.F. Agosto, 1985

9. *Pharmaceutical Quality Control*, Edición de Acta Scientifico, Ed. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington, 1985

10. *Pharmaceutical Quality Control*, Edición de Acta Scientifico, Ed. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington, 1985

11. *Pharmaceutical Quality Control*, Edición de Acta Scientifico, Ed. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington, 1985

12. *Pharmaceutical Quality Control*, Edición de Acta Scientifico, Ed. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington, 1985

13. *Pharmaceutical Quality Control*, Edición de Acta Scientifico, Ed. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington, 1985

14. *Pharmaceutical Quality Control*, Edición de Acta Scientifico, Ed. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington, 1985