

25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO
ANALITICO POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS
DE ALTA RESOLUCION PARA CUANTIFICAR
VITAMINA A EN UNA FORMA FARMACEUTICA DE
SOLUCION ORAL,

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

GARCIA MORALES ANGELICA

ASESOR: O.F.B. JOSE A. GARDUÑO ROSAS

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1999.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

278255



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACION

DISCONTINUA.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



Departamento de

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución, para cuantificar vitamina A en una forma farmacéutica de solución oral.

que presenta la pasante: García Morales Angélica

con número de cuenta: 9361318-7 para obtener el TÍTULO de:
Química Farmacéutica Bióloga.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 9 de Abril de 199 3

PRESIDENTE

Q.F.B. José A. Garduño Rosas

VOCAL

Q.F.B. Guadalupe Rebollar Barrera

SECRETARIO

M.en.C. Frén Hernández Baltasar

PRIMER SUPLENTE

M. en C. Rafael Villalobos García

SEGUNDO SUPLENTE

Q.F.B. Sergio Galindo Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

☆ **Gracias a Dios** por regalarme estos momentos de dicha, para mí y todas las personas que me estiman.

☆ **Por ayudarme, apoyarme, compartiendo sus conocimientos y experiencia en la realización de este trabajo. Gracias profesor.**

José Antonio Garduño Rosas.

☆ **Gracias a mi Mamá**, que con sus consejos, cariño, apoyo y comprensión, me ha ayudado a terminar mi carrera, igualmente a mi Padre que espero este también orgulloso de mí.

☆ **A mi hermana Rosaura**, que ha sido una compañera grandiosa de toda mi vida, hemos compartido tantas cosas, gracias hermana

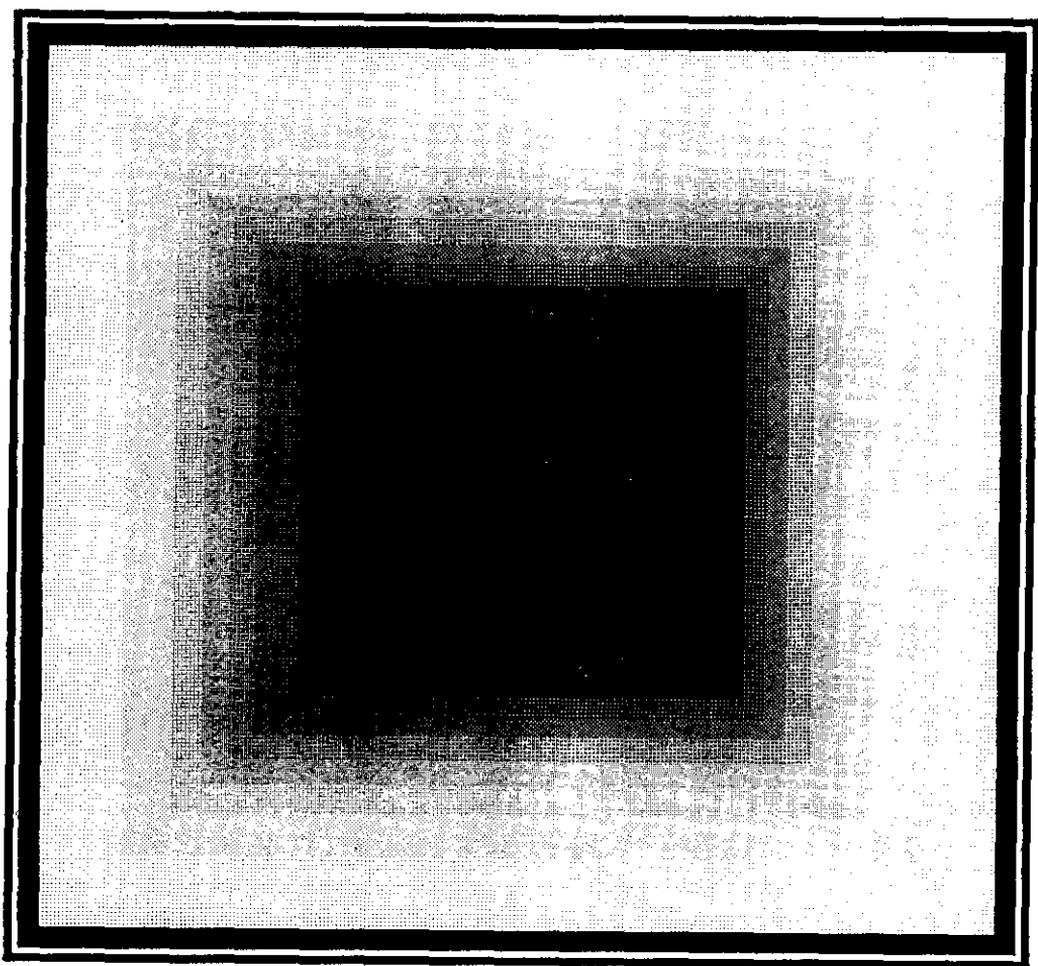
☆ **Por apoyarme en todo lo posible, ha culminar este proyecto, gracias por siempre, Ismael.**

DEDICATORIAS

☆ A todos mis amigos y compañeros de Importadora y Manufacturera Bruluart S.A. Por darme su apoyo, en especial a la Química **Martha Irma Romero**, al Ingeniero **Padilla**. Al departamento de Validación y Estabilidad, en especial a mi amiga de siempre y para siempre **QFB. María Robles León**, por compartir sus Conocimientos y darme muchas facilidades.

☆ A todas mis grandes amigas que siempre me comprendieron y apoyaron, **Mari, Adriana, Arcelia, Ofelia, Claudia, Fabiola, Sara** y todos mis compañeros de generación **20^{ava} QFB**, con los que viví muchos momentos agradables

☆ A todas mis **Profesores**, que compartieron sus conocimientos y algunas veces experiencias, que me llevaron a seguir adelante en mi carrera.

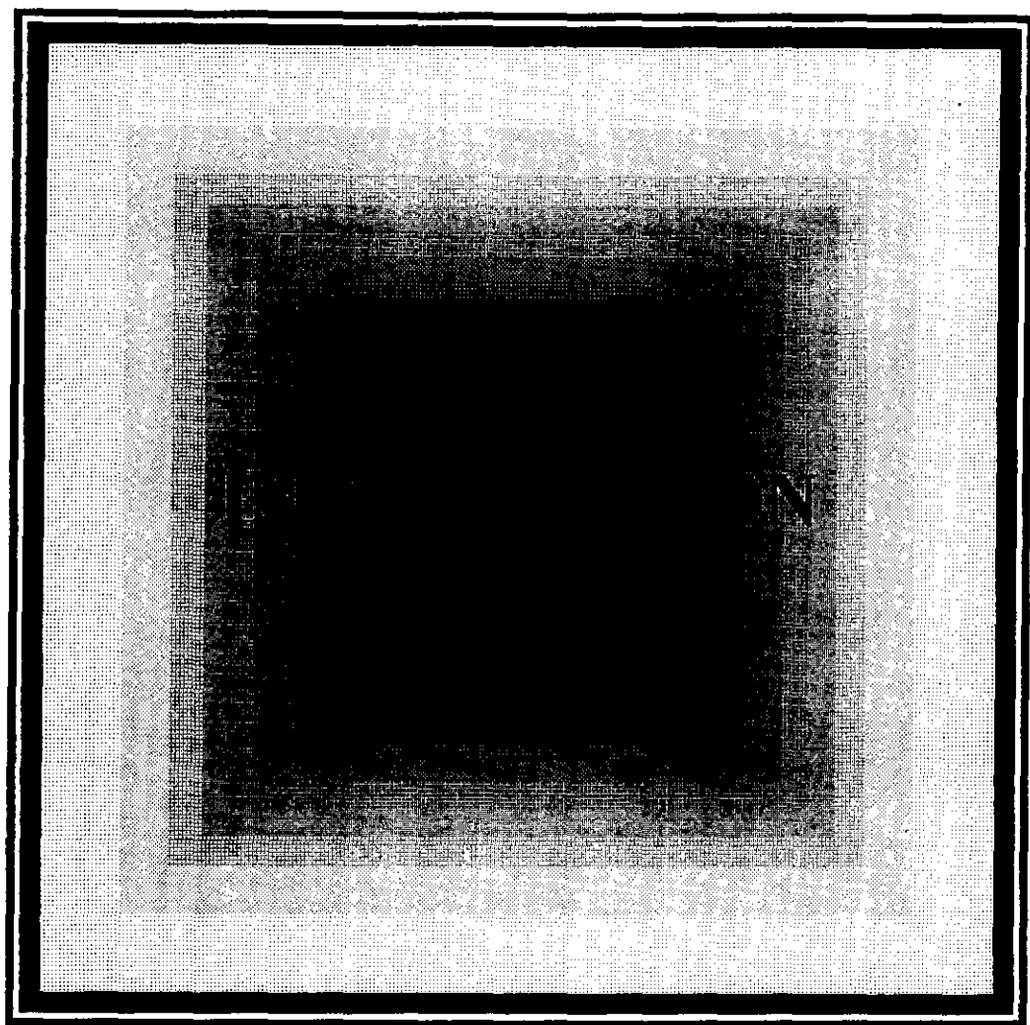


	Pág
I. INTRODUCCIÓN	1
I. OBJETIVOS	4
II. HIPÓTESIS	5
III. GENERALIDADES	6
4.1. Vitaminas	6
4.1.1. Historia de las vitaminas	7
4.1.2. Clasificación, uso y fuentes alimentarias	8
4.2. Vitamina A	14
(propiedades, farmacología, farmacocinética, usos y presentaciones farmacéuticas).	
4.3. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. (CLAR)	27
4.3.1. Clasificación de la cromatografía	27
4.3.2. Equipo	34
4.4. Validación de métodos	43
4.4.1. Definición	43
4.4.2. Características de validación	43
4.4.3. Clasificación	45

	Pág
V. EXPERIMENTACIÓN	47
5.1. Material	47
5.2. Desarrollo del método	49
5.3. Validación del método	54
VI. RESULTADOS	57
VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS	74
VIII. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN	78
IX. CONCLUSIONES	80
X. ANEXOS	81
Anexo 1.- Espectros de absorción y cromatogramas del HPLC 1100	81
Anexo 2.- Procedimiento general de calificación de columnas comatográficas	88
Anexo 3.- Procedimiento general de calificación del cromatógrafo de líquidos HP 100	105
XI. BIBLIOGRAFÍA.	118

INDICE DE FIGURAS.

	Pág
Fig 1.- Fórmula desarrollada de vitamina A	14
Fig 2.- Estructuras de ésteres de la vitamina A	16
Fig 3.- Separación de una mezcla hipotética de 3 componentes.....	34
Fig 4.- Esquema de un equipo de CLAR	35
Fig 5.- Detector de onda variable o espectrofotómetro	39
Fig 6.- Gráfica de linealidad del sistema para vitamina A	57
Fig 7.- Gráfica de linealidad del método para vitamina A	59
Fig 8.- Cromatograma correspondiente al estándar de vitamina A	81
Fig 9.- Espectro de absorción ultravioleta del estándar de vitamina A a las condiciones IX.....	82
Fig 10.- Cromatograma correspondiente a La muestra de vitamina A solución.....	83
Fig 11.- Espectro de absorción ultravioleta de la muestra de vitamina A a las condiciones IX.....	84
Fig 12.- Análisis de pureza de pico, del cromatograma de Vitamina A solución.....	85
Fig 13.- Cromatograma correspondiente al placebo.....	86
Fig 14.- Diagrama de isoabsorbancia de la muestra de vitamina A.....	87



I. INTRODUCCIÓN

La preferencia en el uso de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para la cuantificación de infinidad de compuestos, ha hecho que ésta sea perfeccionable y actualmente alcance avances notables. Esencialmente, la cromatografía es un proceso de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen en dos fases: una fase estacionaria y una fase móvil la cual se mueve a través de la primera. Entre ambas se lleva a cabo el proceso cromatográfico.

Así, las diferencias entre estas fases y los cambios y combinaciones que pueden hacerse entre ellas, permiten lograr separaciones complejas, que de otra manera serían prácticamente imposibles, al menos en cuanto a la pureza obtenida para cada componente.^{1,2}

El desarrollo de la cromatografía se remonta a 1906, cuando un botánico ruso llamado Mijail S. Tswett separó pigmentos vegetales, muy parecidos entre sí químicamente, haciéndolos pasar en sentido descendente, a través de una columna de piedra caliza en polvo, con ayuda de un disolvente y observó que dichos pigmentos se separaban en una serie de bandas, cada una de ellas de distinto color, por lo que a esta técnica le llamó "cromatografía" que etimológicamente significa: escritura en color.

La historia de la cromatografía de alta velocidad se remota a 1959, cuando Purnell y colaboradores intentaron construir columnas de cromatografía de gases de alta velocidad. En ese entonces, la cromatografía de gases se consideraba una técnica mucho más rápida que la cromatografía líquida, porque se consideraba que las velocidades de difusión de las sustancias en los medios gaseosos eran de cuatro a cinco veces mayores que en los sistemas líquidos; sin embargo, en 1974 fue cuando se desarrollaron sistemas de empacado de columnas y procedimientos que utilizaban alta presión para la cromatografía líquida, se incrementó el interés y la aplicación de ésta técnica. Posiblemente la razón principal de este nuevo renacimiento de la cromatografía fue el hecho de que la velocidad del análisis se relaciona con la economía (costos de análisis).²

La aceptación de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución sobre la cromatografía de gases en el análisis farmacéutico se debe principalmente a su selectividad y eficiencia mejoradas para la separación de fármacos no volátiles.

Las técnicas por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución ofrecen una sensibilidad mayor en la detección, una mayor exactitud y reproducibilidad en el análisis farmacéutico ya sea durante su investigación, desarrollo y análisis de control de calidad cuando el producto se encuentra en el mercado.

En la cromatografía líquida moderna las columnas pueden ser utilizadas repetidas veces, los tiempos de análisis son cortos, la detección y cuantificación son automatizadas, la detección es prácticamente inmediata y tiene una alta reproducibilidad. En cuanto a la cromatografía tradicional es poco reproducible, la detección y la cuantificación es manual.

Para lograr desarrollar un método por cromatografía de líquidos de alta resolución es importante conocer principalmente las propiedades físicas y químicas del analito, puesto que de estas depende la selección de las fases móviles y estacionarias a emplear, la detección que se va a realizar y saber si el análisis es cuantitativo o cualitativo.^{3,4,5}

El análisis cualitativo se refiere a la identificación de las bandas separadas por cromatografía de líquidos en base a los valores en el tiempo de retención de un compuesto en un sistema cromatográfico dado, ya que éste es característico para dicho compuesto. Con esto se da lugar a una alta capacidad de identificación y con la finalidad de corroborar el análisis se pueden hacer pruebas de identidad del compuesto (Espectroscopia, Calorimetría, Polarografía, Resonancia Magnética Nuclear, Análisis elemental, Espectrofluorometría e Infrarrojo).⁴

La aplicación más utilizada de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es en el análisis cuantitativo y para la optimización de éste requiere de cuatro atributos básicos: resolución, velocidad, carga y alcance. El alcance es la capacidad del sistema cromatográfico para separar mezclas de diversa polaridad, la carga está relacionada directamente al diámetro de la columna.

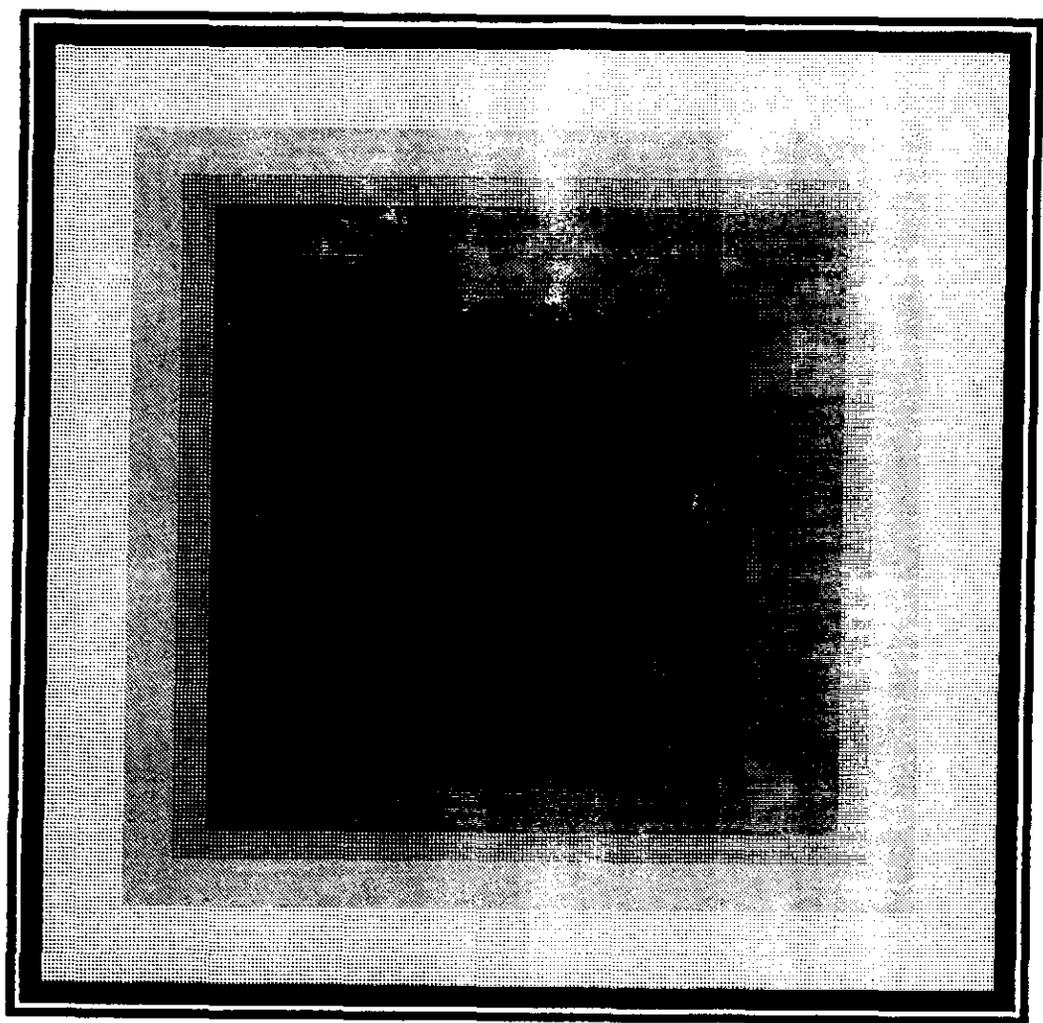
Se sabe que si se desea aumentar la resolución se debe hacer mediante la obtención de una mayor eficiencia en la columna, es decir aumentando el número de platos teóricos o la selectividad de la fase móvil.

Para mejorar la velocidad de separación se pueden utilizar partículas pequeñas y columnas cortas operadas a una velocidad de flujo alta.

Las mejoras necesarias en el sistema cromatográfico pueden ser pocas o muchas dependiendo si el método desarrollado fue el mejor considerando el número de pruebas para la obtención de las condiciones de análisis, lo cual aseguraría su efectividad cuando se realice la validación del mismo. ^{1, 2, 3}

El proceso de validación de un método en particular está basado en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos prácticos de medición. Para una aplicación de los criterios de evaluación de un método analítico, prevalece ante todo la experiencia y el criterio de la persona que lleva a cabo la validación. ^{3, 6}

La validación de métodos analíticos se define como un conjunto de evidencias que establecen la capacidad del método analítico y la medida en que este satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas que se deseen. ^{1, 3}



II. OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

1.1. Desarrollar un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en fase inversa, para cuantificar Vitamina A contenida en una forma farmacéutica de solución oral.

1.2. Validar el método analítico desarrollado para determinar Vitamina A (Palmitato de Retinol) contenida en una forma farmacéutica de solución oral.

)

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1 Desarrollar un método analítico para Vitamina A en solución oral, teniendo como base el método científico para obtener resultados confiables y rápidos.

2.2 Validar el método analítico de Vitamina A desarrollado, evaluando las siguientes características:

2.2.1. Linealidad del Sistema.

2.2.2. Linealidad del Método.

2.2.3. Precisión del Sistema.

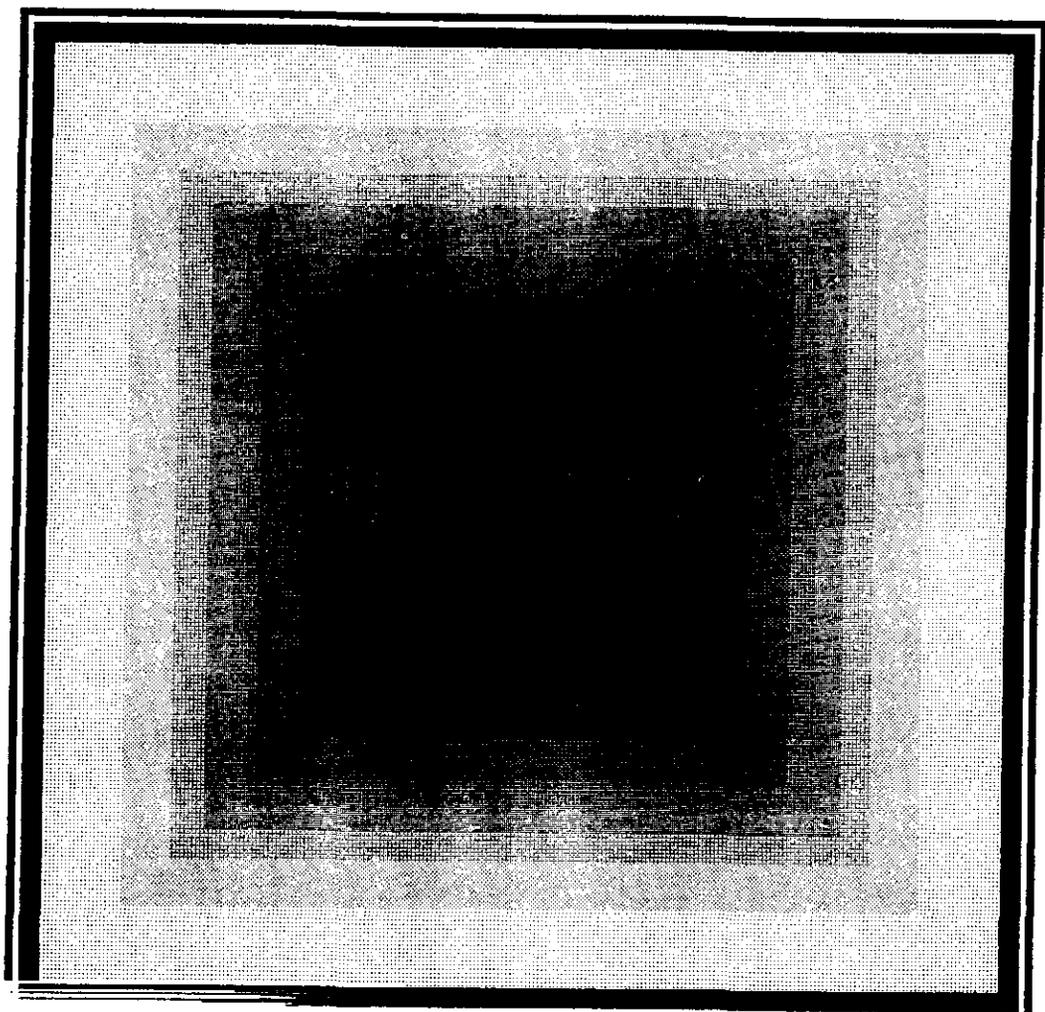
2.2.4. Precisión del Método.

2.2.4.1. Repetibilidad.

2.2.4.2. Reproducibilidad entre días.

2.2.4.3. Reproducibilidad entre analistas.

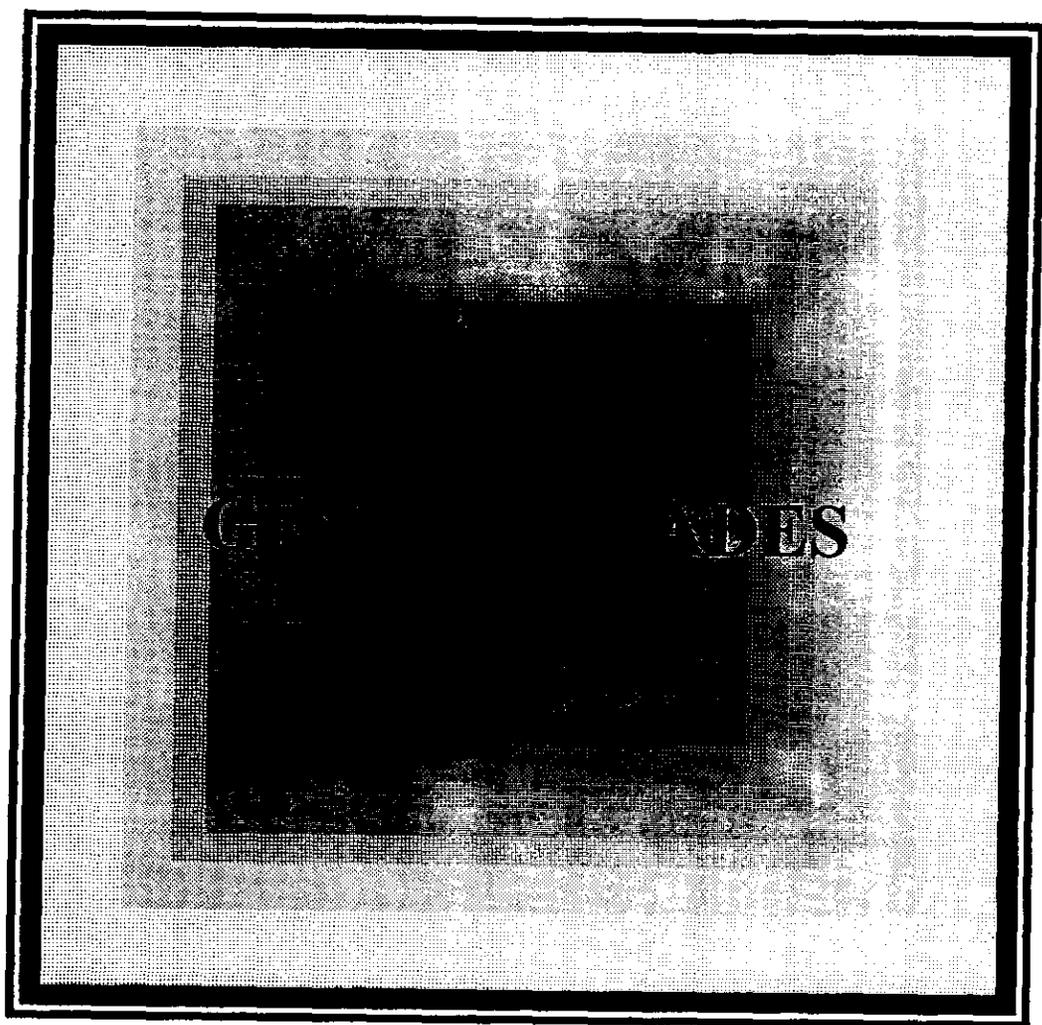
2.2.5. Exactitud del Método.



III. HIPÓTESIS

- ◆ Conocidas las propiedades físicas y químicas de la vitamina A (Palmitato de Retinol), *se puede desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificación de la misma.*

- ◆ Al tener un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa, para cuantificar Vitamina A en solución oral, puede demostrarse que existen evidencias documentales de que el método es confiable.



IV. GENERALIDADES.

4.1 VITAMINAS.

Las vitaminas son sustancias alimentarias auxiliares pero indispensables. Son compuestos orgánicos que revisten de importancia para el mantenimiento de la función normal de los tejidos y que no se sintetizan en el cuerpo.

Las vitaminas se disuelven en el agua y en la grasa del cuerpo, las primeras son las vitaminas del complejo B y la vitamina C que son hidrosolubles y no se almacenan en el cuerpo, las liposolubles son las vitaminas A,D,E y K, se almacenan en el cuerpo y son solubles en solventes.

Un consumo de alimentos variados garantiza en general un aporte suficiente de vitaminas. El consumo deficiente conduce en su forma ligera a una hipovitaminosis y en su forma grave en avitaminosis, puede deberse a un aporte deficiente en los alimentos o también a una alteración de la absorción o bien situaciones de estrés, por ello es importante el conocimiento de las necesidades diarias de las vitaminas.^{2,7}

Tabla 1. Necesidades vitamínicas medias del hombre a distintas edades.

VITAMINA	UNIDAD	LACTANTES	NIÑOS < 4 AÑOS	ADULTOS, NIÑOS > 4 AÑOS	MUJERES EMBARAZA- DAS
Vitamina A	UI	1500	2500	5000	8000
Vitamina D	UI	400	400	400	400
Vitamina E	UI	5	10	30	30
Vitamina C	mg	35	40	60	60
Tiamina	mg	0.5	0.7	1.5	1.7
Riboflavina	mg	0.6	0.8	1.7	2
Niacina	mg	8	9	20	20
Vitamina B ₆	mg	0.4	0.7	2	2.5
Vitamina B ₁₂	mg	2	3	6	8

El hecho de que las vitaminas deben ser regularmente administradas a la dieta, implica que continuamente se están destruyendo y excretando durante el metabolismo. Esto se ha verificado con estudios empleando isótopos.

Se ha demostrado que la mayoría de las vitaminas sirven como componentes de coenzimas específicas.⁸

4.1.1. HISTORIA DE LAS VITAMINAS.

Los antiguos egipcios e Hipócrates en Grecia (siglo IV A. C.), conocían los efectos de una dieta a base de hígado para remediar la ceguera nocturna. La presencia de escorbuto entre los cruzados en el siglo XIII y la realización de su cura en 1520 por el médico australiano Kramer, administrando frutos cítricos, fue seguido de la introducción de jugos de lima y limón en la marina Inglesa para prevenir esta enfermedad.

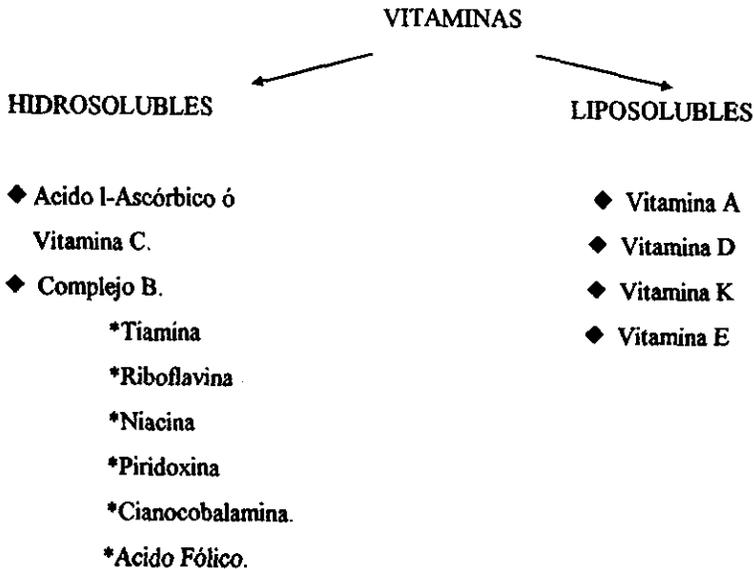
El almirante japonés Takaki en 1880 obtuvo una disminución notable de la enfermedad nerviosa llamada beriberi, por aumentar el contenido de carne y leche en la dieta.

El primer trabajo experimental bien definido sobre las relaciones de las vitaminas en las enfermedades fue realizado en 1896 en las Indias Holandesas por un médico militar llamado Eijkman. Trabajó con el arroz descortezado que provocaba una enfermedad nerviosa en los pollos, se concluyó que era por deficiencia de factores dietéticos en este caso de la vitamina B₁^{9,10}

En 1912 Funk introdujo el término "vitamina" para designar a aquellos nutrientes orgánicos naturales y propuso que enfermedades como el beriberi, escorbuto, pelagra y posiblemente raquitismo eran causados por la deficiencia o carencia en la dieta de vitaminas.

4.2.1 CLASIFICACIÓN. ^{7, 10, 11, 12}

Las vitaminas se subdividen generalmente en dos grupos basándose en sus propiedades de solubilidad. La mayoría se disuelve relativamente fácil en el agua y se les llama hidrosolubles. Aquellas que son insolubles en este líquido, pero que se disuelven en grasas o en solventes de las grasas reciben el nombre de vitaminas liposolubles.



VITAMINAS HIDROSOLUBLES

Vitamina C. ^{7, 10}

Es un antióxidante potente que participa en muchas reacciones de óxido-reducción y también se requiere para la síntesis de colágeno. Incrementa la absorción de hierro no hem y participa en el metabolismo de la tirosina, la cicatrización de heridas y el metabolismo de fármacos.

La carencia produce escorbuto, las manifestaciones incluyen hemorragias perifoliculares, pápulas hiperqueratóticas perifoliculares, petequias y púrpura.

Vitamina B₁¹³

La tiamina en forma de pirofosfato de tiamina desempeña funciones importantes en la descarboxilación de α -cetoácidos y en las reacciones de transcetolación.

Su deficiencia produce beriberi que se caracteriza por neuritis periférica, insuficiencia cardíaca o alteraciones cerebrales con encefalopatía de wernicke. Los síntomas incluyen parestesia, debilidad muscular, depresión, confusión y falta de memoria.

Vitamina B₂^{13,14}

La Riboflavina es una coenzima flavina mononucleótido o flavina adenina dinucleótido. Las manifestaciones de la carencia de riboflavina incluyen ulceraciones bucales, quelosis, estomatitis angular, glositis, dermatitis seborreica, debilidad, vascularización corneal y anemia.

Vitamina B₃^{2,7}

Forma parte de por lo menos dos coenzimas importantes, el dinucleótido de nicotinamida-adenina (NAD) y el fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina (NADP).

El NAD y NADP se encuentran en estado oxidado o reducido y en consecuencia pueden actuar como aceptores o dadores de hidrógeno en muchas reacciones enzimáticas del metabolismo intermedio.

La deficiencia causa la pelagra; se caracteriza por pigmentación y lesiones de la piel expuesta, alteraciones de la mucosa gastrointestinal con glositis, estomatitis, anorexia, diarrea y por síntomas mentales similares a los de la deficiencia de tiamina.

Vitamina B₆.¹³

Es en realidad un grupo de sustancias estrechamente relacionadas que participan en el metabolismo intermedio. Incluyen la piridoxina en sí, el piridoxal, la piridoximina y sus ésteres, siendo el 5-fosfato piridoxal el más importante. Su carencia origina úlceras bucales, dermatitis, lesiones nerviosas y anemia.

Ácido fólico.¹⁹

Designa en general a un grupo de compuestos relacionados química y biológicamente que sirven como vitaminas para ciertos organismos, incluyendo aves, mamíferos, varios insectos y ciertos microorganismos. Se conocen varias formas diferentes de ácido fólico, la más simple es la molécula llamada pteroilglutámico consiste en ácido glutámico, ácido para-aminobenzoico y una doble estructura cíclica llamada pterina. Esta vitamina tiene una función metabólica importante en la síntesis enzimática del aminoácido serina a partir del aminoácido glicina.

Vitamina B₁₂.^{1,7}

Es una vitamina que actúa como factor de crecimiento para varios animales incluyendo al hombre. La anemia perniciosa es el resultado de una absorción insuficiente de la vitamina en el tracto digestivo.

La vitamina B₁₂ funciona como parte de una coenzima en la interconversión de algunos ácidos orgánicos.

VITAMINAS LIPOSOLUBLES.

Vitamina A⁷

Fue descubierta en 1913 por McCollum y Davis, quienes la reconocieron como un factor nutricional liposoluble necesario para el crecimiento de las ratas, la ingestión excesiva origina un color amarillo naranja en la piel. Las manifestaciones primarias son piel seca, escamosa, pérdida de pelo, úlceras bucales, hiperostosis dolorosa, anorexia y vómito. Uno de los primeros indicios de su deficiencia es la ceguera nocturna. Se comentará un poco más sobre dicha vitamina en el siguiente apartado.

Vitamina D. ¹³

La vitamina D existe en diversos estados químicos, uno de los cuales es un esteroide relacionado con el colesterol y llamado calciferol o vitamina D₂.

Se encontró que bajo la exposición de la luz ultravioleta un derivado natural del colesterol llamado ergosterol se transformaba por medio de una serie de reacciones químicas en calciferol. El ergosterol por sí mismo es inactivo en la curación o prevención del raquitismo, a menos que se exponga a la luz ultravioleta y se transforme en calciferol, lo mismo sucede con el compuesto 7-dehidrocolesterol.

En realidad el efecto de la luz solar o radiaciones ultravioleta como preventivo o curativo del raquitismo se atribuyen a la conversión del 7-dehidrocolesterol inactivo de la piel a vitamina D₃. Esta vitamina estimula de alguna manera la absorción de iones calcio del tracto intestinal, su papel metabólico no está bien definido.

Vitamina E. ^{9,7,13}

La actividad de la vitamina E se deriva cuando menos de 8 tocoferoles naturales, el más potente de los cuales es el α -tocoferol; se considera que actúa como antióxidante, protegiendo las membranas y otras estructuras celulares de ataques por radicales libres.

La carencia de vitamina E suele deberse a mala absorción grave, al trastorno genético abetalipoproteinemia y en niños a enfermedades crónicas colestáticas del hígado, atresia biliar o fibrosis quística. ^{14, 15, 16}

Vitamina K. ⁷

Fue descubierta desde 1930 como un factor esencial en la dieta de los pollos para prevenir las hemorragias corrigiendo el tiempo de coagulación (antihemorrágica). De acuerdo con esto se le designa vitamina K o vitamina de la coagulación.

La irregularidad de la coagulación de la sangre es el síntoma principal de su deficiencia, condición que puede ser extrema por ocasionar hemorragias profusas a partir de heridas o lesiones relativamente pequeñas, a las cuales sigue un estado de shock y luego la muerte.

La deficiencia dietética de vitamina K es muy rara en los mamíferos debido a que las bacterias intestinales sintetizan esta vitamina en cantidades suficientes para llenar las necesidades del huésped.

Tabla 2. Vitaminas comunes, sus funciones principales y fuentes alimentarias comunes.

VITAMINA A	Crecimiento de las células del cuerpo. Visión, piel y cabello saludables e integridad del epitelio.	Grasas animales, mantequilla, queso, crema, clara de huevo y leche entera. Hígado y aceite de hígado de pescado. Frutas y verduras amarillas y verdes.
VITAMINA B₁ Tiamina.	Metabolismo de los carbohidratos. Funcionamiento del sistema nervioso. Digestión normal. Previene el beriberi.	Pescado. Carne magra y de ave de corral. Glándulas. Leche. Cereales de grano entero. Guisantes, frijoles y cacahuates.
VITAMINA B₃ Niacina	Metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Componente de enzimas. Previene la anorexia. Previene la pelagra.	Carne magra e hígado. Pescado Guisantes y frijoles. Cereales de grano entero. Cacahuates. Levadura. Huevos.
VITAMINA B₂ Riboflavina.	Formación de ciertas enzimas. Crecimiento normal. Adaptación visual a la luz.	Huevos. Verduras de hoja verde. Carne magra. Leche. Granos enteros. Levadura seca.
VITAMINA B₆ Piridoxina.	Salud de encías y dientes. Formación de eritrocitos. Metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas.	Cereales de grano entero y germen de trigo. Verduras. Levadura. Carne roja.

VITAMINA B₁₂	Metabolismo de proteínas. Formación de eritrocitos. Estado saludable de los tejidos del sistema nervioso. Previene la anemia perniciosa.	Hígado y riñón. Productos de granja. Carne magra.
ACIDO FÓLICO	Metabolismo de las proteínas. Formación de los eritrocitos. <i>Función intestinal normal.</i>	Verduras de hoja verde. Glándulas. Levadura.
VITAMINA C Acido ascórbico	Huesos, dientes y encías saludables. Formación de vasos sanguíneos incluidas las paredes de los capilares. Cicatrización apropiada de huesos y otros tejidos. Facilita la absorción del hierro y el ácido fólico. Previene el escorbuto.	Cítricos y sus jugos. Tomate. Bayas. Col. Verduras de hoja verde. Papas.
VITAMINA D	Absorción de calcio y el fósforo. Previene el raquitismo.	Aceites de hígado de pescado, salmón, atún. Leche. Yema de huevo. Mantequilla. Hígado. Ostras.
VITAMINA E	Formación de eritrocitos. Protege a ácidos grasos esenciales.	Aceite de germen de trigo. Verduras de hoja verde. Margarina. Arroz.
VITAMINA K	Síntesis de protrombina.	Hígado. Huevos. Verduras de hoja verde.
BIOTINA	Actividad enzimática. Metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas.	Yema de huevo. Verduras de hoja verde. Leche. Hígado y riñón. Levadura.

4.2. VITAMINA A.

I. QUÍMICA.

NOMBRE QUÍMICO : 3,7 - dimetil - 9-(2,6,6 -trimetil -1-ciclohexen - 1 - il) -2,4,6,8-nonatetraen -1 ol .

FÓRMULA CONDENSADA : $C_{36}H_{60}O_2$

FÓRMULA DESARROLLADA :

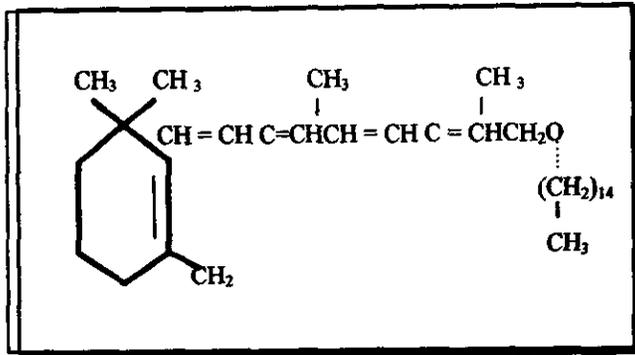
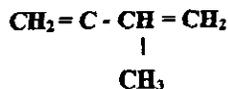


Fig 1. Fórmula desarrollada de vitamina A (palmitato de retinol)

Químicamente la vitamina A se deriva de un hidrocarburo de enlaces conjugados, el llamado isopreno, y de un núcleo cíclico contenido en el β-ionona . El isopreno es el metil -2 -buta -dieno, cuya fórmula desarrollada es la siguiente :



Es un hidrocarburo extraordinariamente importante en biología y en la industria; es la sustancia madre del caucho sintético y de otros polimeros industriales . El β-ionona es una sustancia de olor muy parecido al aroma de las violetas y constituye la esencia de violetas, posee un núcleo cíclico de naturaleza especial. ^{1, 17}

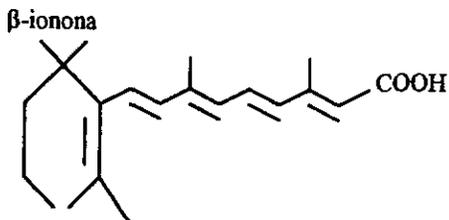
La vitamina A está constituida por dos radicales isoprénicos y un ciclo β -ionona. Se encuentra en los organismos animales, pero en el reino vegetal se hayan difundidas unas sustancias que tienen composición química muy semejante a ella; son las carotinas (llamadas así por obtenerse de las zanahorias, en gran proporción), la criptoxantina obtenida del maíz amarillo y otras muchas que engloban los llamados carotenoides. Muchas tienen la actividad de la vitamina A cuando son ingeridas por los animales, por lo que se les ha dado el nombre de provitaminas. Es común a todas ellas el poseer una cadena de restos de isopreno que enlaza dos núcleos. Los núcleos de ionona pueden ser α , β , γ , según la posición del doble enlace, el ionón de la vitamina A es el β , la única carotina cuyos dos núcleos extremos están unidos por β - ionón.

La actividad biológica está en íntima relación con su constitución química y bastan pequeñísimas alteraciones de la molécula para que desaparezca, por ejemplo el cambio de posición de un doble enlace, la ruptura del anillo ionón, la introducción de una función alcohólica, la hidrogenación de los dobles enlaces, etc. Además de la vitamina A descrita, que procede de los hígados de peces de agua salada, se encuentra en los peces de agua dulce un vitámero, que se distingue del anterior por poseer un doble enlace adicional en el núcleo ionón; se le denomina vitamina A₂.

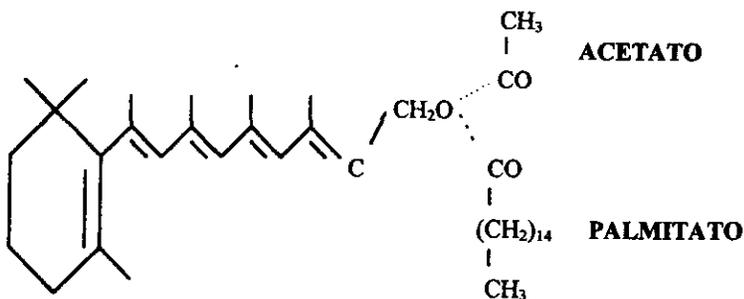
La vitamina A o retinol es un alcohol primario isoprenoide con 5 enlaces dobles. La vitamina A sufre oxidación atmosférica, especialmente en presencia de luz y calor, pero en solución oleosa es bastante estable.

La esterificación aumenta la estabilidad de la vitamina A, por ello la vitamina A sintética especialmente el acetato y palmitato, son los ésteres que existen en las fuentes naturales y en el organismo. Otro derivado de la vitamina A, pero su uso es local, es la tretinoína o ácido retinoico (Aírol) que se obtiene por oxidación del retinol y es un metabolito del mismo. En los aceites de peces de agua dulce existe la vitamina A₂ o 3- dehidrorretinol, su actividad es de alrededor de 40 % con respecto a la vitamina A₁ o retinol.^{1, 2}

TRETINOÍNA Ó ÁCIDO RETINOICO,
ACIDO TODO-TRANS-RETINOICO



VITAMINA A, ACETATO O PALMITATO.



VITAMINA A Ó RETINOL

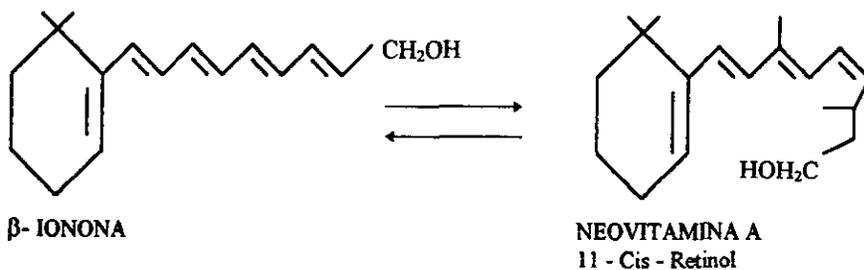


Fig 2. Estructuras de ésteres de la vitamina A.

Carotenoides y vitamina A

Los carotenoides son los pigmentos responsables de la mayoría de los colores amarillos y anaranjados de las frutas y verduras. Químicamente se clasifican como terpenoides, sustancias derivadas en la naturaleza del intermediario metabólico ácido mevalónico. Se encuentran carotenoides en todos los tejidos fotosintéticos, junto con las clorofilas, así como en una serie de tejidos vegetales no fotosintéticos, como componentes de los cloroplastos.^{9,14}

De los diversos carotenos, solo el β - caroteno (dos moléculas de retinol unidas extremo con extremo) se rompe en la mucosa intestinal para dar dos moléculas de retinal, el aldehído derivado del retinol, el γ -caroteno es solo la mitad de activo que el β - caroteno. Por lo tanto otros compuestos como el licopeno (pigmento rojo de los tomates) , en el que ningún anillo puede dar retinol, son inactivos.¹⁴

II. BIOGÉNESIS DE LA VITAMINA A.^{14, 16, 17}

La vitamina A es un producto de desintegración de la provitamina A o β -caroteno que se encuentra en las partes verdes y amarillas de los vegetales , abundando especialmente en la zanahoria, espinaca, lechuga, tomate, maíz amarillo y durazno. La provitamina A es un pigmento vegetal correspondiente al grupo general de los carotenoides ; existen en realidad varios carotenos, pero el principal es el β - caroteno, hidrocarburo complejo, con dos anillos de β - ionona, que se desdobra en el intestino y en el hígado con dos moléculas de vitamina A aldehído o retinal y se transforma luego en retinal por la retinorreductasa del intestino.^{16, 18}

III. ACCIONES FARMACOLÓGICAS. ^{14, 17, 23}

Relaciones entre estructura y actividad farmacológica. ^{1, 14, 17}

La estructura anular de β -ionona es indispensable para la actividad farmacológica de la vitamina A, debe presentar un doble enlace entre carbonos 5 y 6 -retinol, y la hidrogenación del mismo suprime dicha actividad; la presencia de otro doble enlace entre los carbonos 3 y 4 -3 dehidrorretinol -disminuye la actividad farmacológica. El retinol posee una función alcohol primario en el extremo de la cadena lateral y la transformación de la misma en el aldehído -retinal- o en ácido - ácido retinóico- que no modifica la actividad biológica, como tampoco la esterificación, y entonces los compuestos poseen una potencia en relación con su contenido en retinol.

Se tiene que una U.I. de vitamina A equivale a:

0.344 μg de (todo) - retinil acetato

0.550 μg de (todo) - retinil palmitato

0.6 μg de (todo) -trans β -caroteno ó 1.2 μg de provitamina A.

La vitamina A en los alimentos como equivalentes de retinol:

1 ER = 1 μg de (todo) - trans retinol.

1 ER = 6 μg de (todo) -trans β -caroteno

IV. FARMACOCINÉTICA. (ABSORCIÓN, DISTRIBUCIÓN Y ELIMINACIÓN) ^{14, 19, 20}

• ABSORCIÓN:

En dosis normales, la vitamina A se absorbe fácil y completamente si la absorción de las grasas es normal. Las dosis altas en pacientes con absorción deficiente de grasas, ingestión baja de proteínas o enfermedades hepática o pancreática, pueden absorberse de manera incompleta.

Se absorbe fácilmente en el intestino delgado y como es liposoluble, dicha absorción está relacionada con la de las grasas, requiere bilis y lipasa pancreática. Si se emplea una dispersión acuosa micelar (emulsión clara), la absorción es más rápida y completa. Por vía parenteral se absorbe bien pero es dolorosa y puede producir enquistamiento; también se absorbe por la piel.

• **DISTRIBUCIÓN :**

La vitamina A, al atravesar la pared intestinal durante la absorción -vía linfática - se esterifica formando palmitato de retinol ,pasando como tal a la sangre . Se almacena en las células de Kupffer del hígado (95 %). Los depósitos normales del adulto en el hígado son suficientes para proporcionar requerimientos de la vitamina A por 2 años. Cantidades menores de palmitato de retinil se almacenan en riñones, pulmones, suprarrenales, retina y grasa intraperitoneal.

Desde el hígado se libera a la circulación en forma de retinol que circula combinado con la α_2 -globulina (la proteína de enlace del retinol PER). No cruza la placenta.

Los análisis de los valores en la sangre pueden no reflejar el almacenamiento hepático de vitamina A porque los valores séricos dependen en parte de PER circulante.

• **METABOLISMO Y EXCRECIÓN**

Se metaboliza en tres formas : a) oxidación con formación de ácido retinoico (activo) especialmente en el hígado, con degradación posterior y formación de metabolitos no bien identificados inactivos hidrosolubles, que se excretan en la orina y b) conjugación del retinol y del ácido retinoico con el ácido glucurónico a nivel del hígado, con eliminación de los conjugados a la bilis, que se reabsorben parcialmente- circulación enterohepática- y el resto se elimina con las heces; c) muy poco de la vitamina A se excreta por los emuntorios. La vida media del retinol (unido a la proteína de enlace) es de alrededor de 4 horas.

V. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS.^{9, 20, 21}

Solubilidad.

La vitamina A es insoluble en agua; soluble en alcohol, en dietil éter, éter de petróleo, cloroformo, acetona, grasas y aceites.

El β -caroteno es insoluble en agua; muy soluble en alcohol, grasas y aceites, soluble en éter, acetona, cloroformo y benceno.

VI. ESTABILIDAD.^{8, 14}

La vitamina A por su estructura química insaturada sufre una reacción de oxidación. Con el oxígeno atmosférico, se forma el 5,6-epóxido entre otros productos de oxidación. Los ésteres acetato y palmitato de vitamina A son algo más estables ante la oxidación por el alcohol libre que presentan (figura 2). El palmitato de retinol es extremadamente sensible a los medios ácidos, lo cual causa rearrreglos de los dobles enlaces y deshidratación, eventualmente sigue una isomerización cis-trans. La isomerización ocurre por almacenamiento a pH's menores a 4.5. no se ve afectada por agentes reductores y es relativamente estable en medios alcalinos.

La isomerización cis-trans se encuentra directamente promovida por la luz de longitudes de onda menores a 500 nm, depende de la longitud de onda y del solvente empleado.

Landers y Olson (1986) demostraron que las soluciones de todo-trans-retinil palmitato en cloroformo y diclorometano experimenta isomerización al exponerse a la luz por 23 horas, la mezcla contiene aproximadamente cantidades iguales de 9-cis y todo-trans-retinil palmitato. En hexano experimenta una escasa isomerización.

En general los carotenoides son destruidos o alterados por ácidos y halógenos libres, particularmente en presencia de luz y alta temperatura, se forman mezclas *cis-trans* de estructuras *todo-trans*. Se oxidan en presencia de oxígeno o agentes oxidantes (catalizados por luz fluorescente y lipoxigenasa). El sitio inicial de ataque es el doble enlace 5,6 de la cadena dando la formación de un epóxido en la cadena.

En los medicamentos y alimentos los esteres de retinilo y carotenoides se disuelven en una matriz grasa, se protegen de la oxidación dada por acción del oxígeno atmosférico usando vitamina E y otros antioxidantes. El antioxidante intercepta el oxígeno, sufriendo oxidación en el proceso.

Uno de los problemas de la oxidación es la producción de peróxidos activos que producen rancidez y finalmente destruyen la vitamina A y carotenoides.

VII. MECANISMO DE ACCIÓN ^{14, 17, 21}

No se conoce en qué la vitamina A influye sobre la integridad de los epitelios, pero en cambio sí se sabe el papel que desempeña en la visión en la oscuridad mediante el ciclo visual de la rodopsina. Se sabe que la visión en la oscuridad depende esencialmente de la presencia en los bastones de la retina del pigmento rojo rodopsina (combinación de una proteína, la opsina y un grupo prostético, el retineno o retinal), el primer paso de la síntesis de la rodopsina es la transformación de la *cis*-vitamina A u 11-*cis*-retinol (neovitamina A) en *cis*-retineno u 11-*cis* retinal (neoretineno b), mediante la enzima alcoholdehidrogenasa o retinorreductasa, con intervención del nicotinamidinucleótido (NAD) o coenzima Y. Se combina entonces con la opsina para formar rodopsina desdoblándose, sufre una reacción previa a *cis*-retineno en *trans*-retineno o *todo-trans*-retinal (vitamina A aldehído) -por la enzima retineno isomerasa, en este último y opsina; el *trans*-retineno puede pasar directamente a *cis*-retineno o bien transformarse en *trans*-vitamina A o *todo-trans*-retinol - por la enzima alcoholdehidrogenasa - que nuevamente pasa a *cis*-vitamina A, para repetir el ciclo.

VIII. DEFICIENCIAS ^{1, 12, 16}

Las acciones farmacológicas de la vitamina A, como todas las vitaminas son diferentes según se ejerzan en un individuo normal o en el que padezca de carencias vitamínicas. La mejor comprensión de la actividad de una vitamina cualquiera se obtiene considerando los fenómenos de carencia. En el caso de la vitamina A las alteraciones más importantes que produce su falta son las siguientes:

1. Alteraciones oculares.

Ceguera nocturna o falta de adaptación de la retina a la oscuridad, desecación de la conjuntiva, aumento de la sensibilidad de la misma a las infecciones y por último, quertomalacia.

La función más estudiada de la vitamina A es en el proceso visual. La retina del hombre posee dos sistemas fotorreceptores diferentes. Los bastones que son los componentes estructurales de un sistema especialmente sensibles a la luz de baja intensidad. Un aldehído de la vitamina A específico es esencial para la formación de rodopsina (la porción glucoproteica de alto peso molecular del pigmento visual contenido en los bastones).

2. Transtornos cutáneos .

Desecación de la piel y disminución de la inmunidad. También aparecen alteraciones del color y del cabello, por lo que la vitamina A contribuye al mantenimiento de la integridad de las membranas epiteliales de modo que en casos de deficiencia las estructuras normales pueden ser sustituidas por epitelio queratinizante estratificado en los ojos y glándulas paraoculares y en los tracto respiratorio y genitourinario. Las células basales no pierden sus funciones a estas condiciones, por lo tanto son capaces de retornar a la normalidad cuando se absorbe suficiente vitamina A.

3. Alteraciones del sistema glandular del organismo

4. Alteraciones del aparato digestivo .

Comienzan en el sistema dentario y llegan hasta el intestino con tendencia a formar heces diarreicas y sanguinolentas.

5. Alteraciones de las vías respiratorias.

Como producción de bronquitis y modificaciones en el epitelio.

6. Alteraciones del sistema nervioso central.

Casi siempre se trata de polivitaminosis.

IX. HIPERVITAMINOSIS ^{14, 17, 20, 21}

La administración de dosis elevadas de vitamina A durante períodos prolongados produce fenómenos de hipervitaminosis, caracterizados por hipertrofias óseas, pérdida de apetito, caída del cabello y niveles elevados de vitamina A en la sangre. En los lactantes la hipervitaminosis A produce agitación, insomnio e hidrocefalia con prominencia de las fontanelas. El hígado del atún y del oso polar son tóxicos para el hombre por su elevado contenido en vitamina A. Los síntomas son reversibles y desaparecen al suprimir la administración de vitamina A.

En algunas alteraciones patológicas, que con seguridad no son debidas a carencia de vitamina A, el axeroftol produce algunos efectos de interés, por ejemplo, si se les administra a los enfermos de Basedow. grandes dosis, mejora el estado general y desciende la cifra de su metabolismo. La vitamina A también produce aumento de peso, en especial en los niños. Por otra parte favorece la epitelización de las heridas cuando se aplica localmente.

También tiene acción beneficiosa en los trastornos alérgicos, sobre todo cuando radican en las vías respiratorias.

La administración crónica de 50.000 a 75.000 UI de vitamina A por día induce alteraciones patológicas en los tejidos óseos y periósticos, piel y mucosas, hígado y alteraciones en el comportamiento.

X. CONTRAINDICACIONES Y PRECAUCIONES.^{20,22}

La vitamina A está contraindicada en pacientes con hipervitaminosis A y en aquellos con sensibilidad a la vitamina A u otros ingredientes en los preparados disponibles en el comercio . El uso intravenoso está contraindicado porque puede causar anafilaxis mortal.

La ingestión de vitamina A de alimentos fortificados suplementos dietéticos, medicamentos de autoprescripción y con receta deben valorarse. La administración prolongada de dosis que exceden 25,000 UI/día requiere estrecha supervisión.

No se ha establecido la eficacia de grandes dosis sistémicas de vitamina A en el tratamiento del acné ; se evita este uso por el potencial tóxico que presenta.

XI. REACCIONES ADVERSAS.^{17, 21}

Las reacciones adversas sólo suelen observarse con la toxicidad (hipervitaminosis A).

- **Hemáticas** : anemia hipoplásica, leucopenia.
- **SNC** : irritabilidad, cefalea aumento de presión intracraneal, fatiga, letargo, malestar.
- **Gastrointestinal** : anorexia, dolor epigástrico, diarrea, vómitos .
- **Hepáticas**: ictericia, hepatomegalia.
- **Metabólicas** : hipercalcemia.
- **Dérmicas** : alopecia, resequedad, agrietamiento, descamación masiva, aumento de pigmentación, fisuras de los labios.

- **Otras** : sudación nocturna; esqueléticas -crecimiento lento, descalcificación osea, fracturas, hiperostosis, periostitis dolorosa, cierre prematuro de la epifisis, artralgias migratorias, engrosamiento cortical en el radio y la tibia, fontanelas abultadas, esplenomegalia.

XII. PRESENTACIONES FARMACEUTICAS ^{1, 17, 22}

Vitamina A ,F.N.A. (USP ; FP) (Roavit , NR ; Atunol , NR ; Aquasol A , NR ; Hidro, NR ; Vitalfa , NR) . Con retinol natural o sintético a sus ésteres en solución oleosa o no bien preparados hidromiscibles en forma de dispersión clara micelar en agua.

En el comercio existen :

- **Vitamina A natural:** cápsulas de 50,000 U:I , granulado , 50,000 y 100,000 U:I por 10g ,
- **Vitamina A sintética:** grageas de 50,000 y ampollas de 1 ml con 300,000 U:I (solución oleosa) ,
- **Vitamina A hidromiscibles:** cápsulas y perlas de 50,000 y 100,000 U:I (natural) y frascos de 7.5 ml (1 ml corresponde a 150,000 U:I, sintética) .
- **Tretinoína (ácido retinoico) USP** , se expende en crema al 0.05 , 0.1 y 0.2 % y en loción al 0.05 % , aplicación local.

XIII. VIAS DE ADMINISTRACIÓN Y DOSIS^{17, 20}

La vía de elección para vitamina A, universalmente empleada, es la oral. La vía intramuscular, poco utilizada aunque efectiva, se indica cuando la primera no se pueda usar, por ejemplo en caso de vómitos.

La dosis usual es de 15 mg o sea 50,000 UI por día, los límites son 1.5 mg a 150 mg (5,000 a 500,000 UI) en los niños las dosis terapéuticas son las del adulto.

XIV. INDICACIONES TERAPEUTICAS Y PLAN DE ADMISTRACIÓN^{13, 17, 20}

1. Deficiencia de vitamina A.

En los casos de xeroftalmia y cuando el nivel plasmático de vitamina A es bajo, menor de 10 mcg o sea 30 UI/100ml, debe instituirse una dieta rica en provitamina y vitamina A (leche, manteca, huevo, vegetales verdes) ó un tratamiento con dicha vitamina a la dosis de 15 a 30 mg o sea de 50,000 a 100,000 unidades internacionales por día. Puede añadirse vitamina E para facilitar la absorción y almacenamiento de vitamina A, a razón de 50 mg de la primera por 100,000 UI de la segunda.

2. Uso local.

Se utiliza la tretinoína en forma de crema o loción, en aplicación de 0.05 % una o dos veces por día, para el tratamiento del acné, debiendo durar el mismo 3 ó 4 meses pero sin extenderse a un año.

3. Suplemento alimentario y profilaxis.

Durante el embarazo, lactancia, ictericia obstructiva y en los niños pequeños sometidos a alimentación artificial, conviene suplementarla con vitamina A administrando diariamente 1.5 mg o 5000 UI.

XV. INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS.^{19, 20}

La única a considerar es con respecto al aceite mineral o vaselina líquida cuya ingestión junto con vitamina A puede llevar a una disminución de la absorción digestiva de esta última.

4.3. CROMATOGRAFIA.^{11, 23}

La cromatografía es la separación en base a la diferencia en las velocidades de migración de los compuestos de una mezcla a través de una fase estacionaria cuando son arrastrados por una fase móvil.

La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido y la fase móvil un líquido a un gas.

4.3.1 CLASIFICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA^{11, 23, 30}

Si se clasifica de acuerdo al mecanismo de separación, la cromatografía se puede dividir en dos grandes ramas:

- a) **Cromatografía de gases:** Cuando la fase móvil es un gas. Esto da lugar a dos alternativas:
 - * **Cromatografía Gas-sólido:** Cuando la fase estacionaria es un sólido. El proceso de separación es por adsorción.
 - * **Cromatografía Gas-líquido:** Cuando la fase estacionaria es un líquido. El proceso de separación es por partición.

- b) **Cromatografía de líquidos:** Cuando la fase móvil es un líquido. En este caso los fenómenos de separación pueden ser muy diversos:
 - * **Cromatografía Líquido - Líquido:** Cuando la fase estacionaria es un líquido. El proceso de separación es por partición.

- * **Cromatografía Líquido - Sólido:** Cuando la fase estacionaria es un sólido, como sílica, alúmina, carbón, tierra de diatomeas, etc. El proceso de separación es por adsorción.

- * **Cromatografía de intercambio iónico:** Cuando existe un intercambio de los iones de la fase estacionaria con los componentes de la mezcla. La fase estacionaria es un sólido reticulado que posee iones.

- * **Cromatografía de Exclusión Molecular:** La fase estacionaria es un sólido reticulado, con un tamaño de los espacios característico y específico, el cual permite o excluye la entrada en la fase de las moléculas de la sustancia de acuerdo a su tamaño.

Otra manera de clasificar es en base al tipo de empaque presente en la columna, los más ampliamente utilizados son los empaques de fase enlazada. Este tipo de empaques es muy estable, debido a que la fase estacionaria está enlazada químicamente al soporte y por lo tanto no se elimina o se pierde fácilmente.

Existe una amplia variedad de grupos funcionales en los empaques enlazados químicamente que permite tanto realizar de manera relativamente simple tanto cromatografía normal como una en fase inversa.

Se ha mencionado tanto la fase normal como la inversa. A continuación se hará una descripción de estos tipos de cromatografía además de otros usados en la actualidad.

a) Fase normal. ^{11,30}

En la cromatografía de fase normal, el lecho estacionario es de naturaleza fuertemente polar y la fase móvil es apolar. Las muestras polares quedan retenidas en la columna durante tiempos mayores que los materiales menos polares o apolares.

Se emplea para muestras más polares y solubles en agua y el orden de elución de los solutos es similar al de la cromatografía de adsorción. Dentro del proceso de adsorción en la cromatografía en fase normal, la selección de la fase móvil se puede efectuar con la ayuda de la escala de Hildebrand, que clasifica los diferentes solventes utilizados como fase móvil de acuerdo a ϵ° (fuerza de solvente).

- Puesto que el proceso de adsorción implica una competencia por los sitios activos del soporte, la adición a una fase móvil poco polar de un líquido polar, llena selectivamente muchos puntos activos, originando un rápido aumento de la polaridad efectiva de la fase móvil.

Es necesario una fase móvil polar para lograr eluir de la columna los compuestos polares, pero si la fase móvil es demasiado polar, competirá con las moléculas de la muestra por los puntos activos de la fase estacionaria, originando una reducción de k' entre los componentes de la muestra.

b) Fase inversa. ^{11,30}

El lecho estacionario es un líquido menos polar y el polar la fase móvil, la cual se emplea para separar muestras con poca solubilidad en el agua.

Las columnas de fase enlazada de Octadesilsilano son las de mayor uso. En esta cromatografía las fases móviles habituales son mezclas agua-metanol o agua-acetonitrilo.

La difusión de la fase inversa se debe a un factor clave: la silica gel (como también la alúmina), es de material fuertemente higroscópico. El agua adsorbida, que forma capas simples o múltiples alrededor de la partícula y llega a tapar sus poros, es responsable de la pérdida de actividad de la fase estacionaria en fase normal, o al menos, conduce a mecanismos mixtos de retención: por una parte, fenómenos de adsorción debidos a los silanoles superficiales de la fase estacionaria y por otra, a mecanismos de partición entre la fase móvil y el agua retenida sobre la fase estacionaria.

Los cambios de pH en la fase móvil pueden cambiar la selectividad de la separación para los solutos ionizados o ionizables ya que las moléculas cargadas se distribuyen preferentemente en la fase más polar o acuosa.

Cuando se analizan muestras complejas, o muestras cuyos componentes poseen valores muy diferentes del factor de capacidad, resulta útil la elución por gradiente.

Las ventajas de la cromatografía en fase inversa pueden resumirse así:

- ♦ Compuestos no iónicos, iónicos e ionizables pueden ser separados en la misma columna, con la misma fase móvil.
- ♦ La fuerza de atracción superficie no polar-soluto es débil.
- ♦ La adsorción irreversible, frecuente en silicagel, raramente ocurre.
- ♦ La fase móvil predominante es agua, abundante y económica.
- ♦ El modificador orgánico predominante, metanol, es accesible en calidad y precios adecuados.
- ♦ El orden de elución es predecible, en función de la hidrofobicidad del analito.
- ♦ Se necesita poco tiempo para el equilibrio del sistema luego de un cambio de fase móvil.

c) **Cromatografía de intercambio iónico** ^{11, 23 30}

La cromatografía de intercambio iónico fué la primera en usarse bajo las condiciones de la cromatografía líquida moderna.

La cromatografía de intercambio iónico se lleva a cabo en empaques que poseen grupos funcionales cargados. El mecanismo de retención más común es un simple intercambio iónico de los iones de la muestra X y los iones de la fase móvil y con los grupos cargados R de la fase estacionaria:



Para el intercambio aniónico, el ión de la muestra X^- está en competencia con la fase móvil Y^- por los sitios iónicos R^+ del intercambiador iónico. De manera similar, en el intercambio catiónico los cationes de la muestra X^+ compiten con los cationes de la fase móvil Y^+ por los sitios iónicos R^- del intercambiador.

La diferencia en la retención estará en la mayor o menor interacción que tengan estos iones con el intercambiador. El empleo de esta técnica es principalmente para la separación de ácidos orgánicos y bases que pueden existir como iones bajo condiciones adecuadas de pH.

Por lo tanto, esta ionización, y por ende, la mayor o menor retención de los solutos podrá controlarse con variaciones de pH en la fase móvil. Un incremento del pH producirá una mayor ionización de los ácidos y una menor ionización de las bases y viceversa.

Muchos intercambiadores iónicos en cromatografía de líquidos consisten en fase estacionaria polimérica con grupos iónicos funcionales, por ejemplo, SO_3^- para intercambiadores catiónicos y grupos $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ para intercambiadores aniónicos.

La retención de la muestra dependerá de dos procesos:

- 1) *Distribución de los compuestos entre la fase móvil (acuosa y una fase estacionaria(orgánica)).*
- 2) *Reacción con los sitios iónicos en la fase estacionaria.*

En la cromatografía de intercambio iónico se emplean empaques tales como: partículas poliméricas porosas, partículas peliculares de fase enlazada y partículas porosas de fase enlazada.

La fase móvil en la cromatografía de intercambio iónico se selecciona para:

- 1) proporcionar la solubilidad adecuada a las sales y soluciones reguladoras necesarias para el intercambio; 2) controlar la retención de los componentes de la muestra mediante el uso del solvente adecuado y 3) proporcionar selectividad en la separación.^{23, 30}

La retención en la cromatografía de intercambio iónico puede controlarse con la variación del pH en la fase móvil, por ejemplo, una base no ionizada [B] en la fase móvil y la base ionizada [BH^+] en la fase estacionaria están relacionados por la variación de la ecuación de Henderson-Hasselbach.

$$\text{Log}([\text{B}]/[\text{BH}^+]) = \text{pH} - \text{Pka}$$

donde se observa que la concentración de [B] es directamente proporcional al pH, por lo que un incremento del pH proporcionará una disminución de k' (factor de capacidad).

El incremento de pH en el intercambio catiónico equivale al incremento de la fuerza de solvente, de la misma manera, una disminución de pH en el intercambio aniónico es equivalente a un incremento de la fuerza de solvente

d) Cromatografía de par iónico

A esta técnica se le llama también cromatografía de ión apareado. Puede llevarse a cabo en fase normal o en fase reversa. La fase móvil consiste en una solución amortiguadora acuosa (más un cosolvente orgánico como MeOH o CH₃CN) y un contra-ión de carga opuesta a la de la molécula de la muestra.

e) Cromatografía de exclusión

Este tipo de cromatografía también se conoce como filtración en gel, permeación en gel y exclusión molecular. Originalmente se limita a columnas de geles orgánicos blandos. Actualmente se cuenta con geles rígidos del tipo divinilbenceno.

La cromatografía de exclusión se comporta como un tamiz: las moléculas más pequeñas entran a los poros mientras que las más grandes, al no poder entrar, se excluyen y salen rápidamente de la columna. Su uso frecuente es en el análisis de polímeros de elevado peso molecular.

PROCESO CROMATOGRÁFICO ^{22, 27}

La fase móvil arrastra las moléculas a través del lecho de la fase estacionaria. Durante su recorrido las moléculas de la muestra son retenidas por la fase estacionaria en función de la interacción entre los componentes de la muestra y la fase estacionaria y móvil, esta interacción es selectiva.

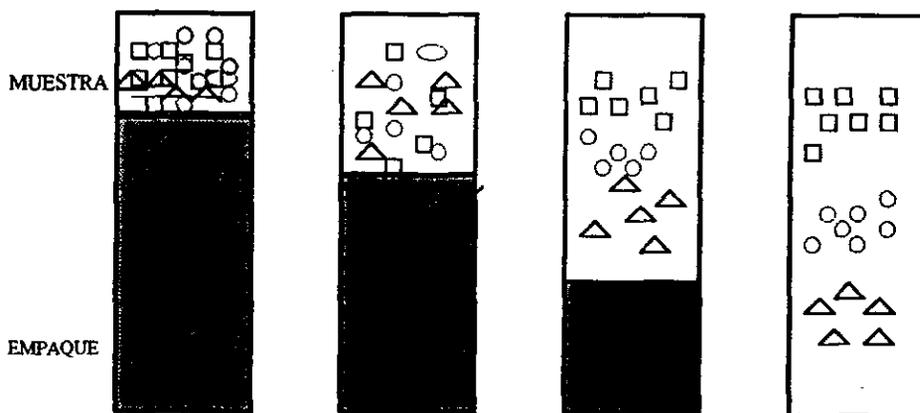


Fig 3. Separación de una mezcla hipotética de 3 componentes.

1. Aplicación de la muestra (Previo acondicionamiento de la columna y tratamiento de la muestra).
2. Paso de la fase móvil (solventes) a través de la columna arrastrando la muestra (se inicia la separación de los componentes).
3. Migración y separación de los componentes que se incrementan conforme la fase móvil ha recorrido una mayor distancia.
4. Los componentes se han separado completamente en forma de bandas a lo largo de la columna.

4.3.2. EQUIPO ^{3, 11, 23}

Actualmente no hay ningún equipo que sea el mejor, ya que las necesidades para resolver un problema específico pueden resolverse de manera diferente.

Los equipos pueden ser con unidades modulares o totalmente integrado, pudiera ser una ventaja el tener un equipo modular ya que para cada parte del equipo existen constantemente mejoras pudiendo introducirse como se requiere sin necesidad de cambiar o modificar el equipo completo.

El equipo debe contar como mínimo con su bomba, detector, columna e inyector existen bombas cuaternarias, detectores de índice de reflexión, selectivos (de U.V., de fluorescencia y electroquímico), inyector automáticos o manuales y una gran variedad de columnas.^{11, 23}

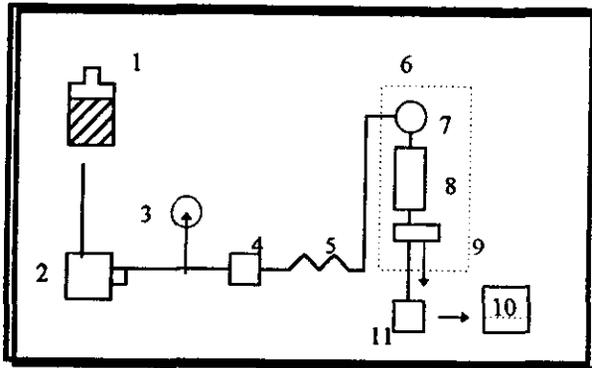


Fig 4. Esquema de un equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

- | | |
|---------------------------------|----------------------------------|
| 1) Reservorio de la fase móvil. | 6) Termostato |
| 2) Bomba | 7) Inyector |
| 3) Indicador de presión | 8) Columna |
| 4) Filtro | 9) Detector |
| 5) supresor de pulsos | 10) Registrador |
| | 11) Equipo para manejo de datos. |

1. Contenedores de fase móvil.^{11, 30}

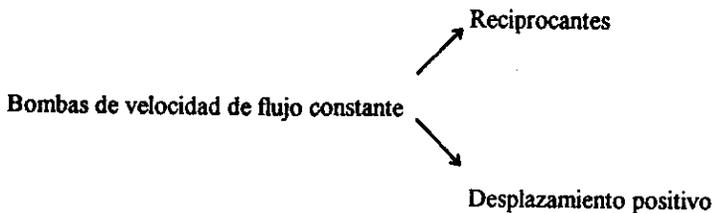
Pueden ser de cristal o de acero inoxidable. Algunos equipados con un degasificador, un calentador y un mecanismo de agitación. La degasificación se emplea para eliminar los gases disueltos en la fase móvil y reducir la posibilidad de formación de burbujas en la bomba o en el detector.

La degasificación puede llevarse a cabo aplicando vacío en el reservorio y agitando vigorosamente la fase móvil.

2. Bomba ^{11, 23}

La función de esta es proporcionar un aporte constante y reproducible de la fase móvil a la columna, como se emplean partículas pequeñas para empacar las columnas (4 o 5µm de diámetro) provocando una resistencia sustancial al flujo a través de la columna y por lo tanto se requieren bombas de alta presión.

Las bombas pueden ser:



Bombas de presión constante: Neumáticas.

El material suele ser acero inoxidable y Teflón. Los sellos son de Teflón rellenos de grafito.

Las bombas reciprocantes utilizan cámaras de pequeño volumen con pistones reciprocantes o diafragmas flexibles para dirigir el flujo de solvente contra la presión de la columna. Estas bombas pueden ser de una, dos y hasta tres cabezas. Pueden ser de dos formas: tipo jeringa y de amplificador hidráulico. Las desventajas de la bomba tipo jeringa es que se requieren de un equilibrio inicial prolongado y la alimentación del solvente está limitada.

En las bombas neumáticas o de presión constante, la ventaja es que el flujo es completamente sin pulsos. Entre las desventajas se encuentra que como se utiliza un gas para presurizar el solvente, las presiones de bombeo se limitan a la presión que puede proporcionar al tanque de gas. Otro problema es que el gas se disuelve en el solvente y sólo puede utilizarse una parte de éste.

3. Inyectores.^{11,30}

La muestra debe inyectarse de la manera más compacta posible para disminuir la dispersión dentro de la columna y minimizar el ancho del pico.

Las características de un inyector son:

- ♦ Ser reproducible
- ♦ Ser sencillo de usar
- ♦ Operar a altas presiones

Los inyectores pueden ser: tipo: válvulas de muestreo, jeringa y automáticos. La reproducibilidad es difícil cuando se trata de tipo jeringa, algunos inyectores de este tipo utilizan un sistema (loop de carga) que desvía el flujo que pasa por el inyector sin afectar la presión de la columna, se introduce la muestra y se reanuda el flujo.

Las válvulas de muestreo mejoran la reproducibilidad, las cuales consisten en un loop que se llena con la solución de la muestra con una jeringa ordinaria. La válvula gira y coloca el loop lleno en la corriente de la fase móvil, con lo que la muestra penetra en la columna. La precisión obtenida con estos inyectores es en general superior a la de los métodos manuales, porque no dependen de la habilidad del operador.

Los inyectores automáticos son útiles en análisis de rutina, ya que pueden estar conectados a sistemas automatizados de manejo de datos.

4. Detectores.^{11,23}

El detector es la parte del equipo que permite "ver" y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica. Existen varios tipos de detectores, los cuales tienen aplicaciones diferentes, según el tipo de moléculas que separen. Los detectores más utilizados son los ópticos. En estos se hace pasar el solvente a través de una microcelda que es atravesada por un rayo de luz.

Las variaciones en la intensidad de la luz causadas por absorción UV, emisión de fluorescencia, absorción al IR o el cambio en el índice de refracción que resultan de la interacción de la luz con los componentes de la muestra, se registran en la forma de variaciones del voltaje de salida, que a su vez se registran gráficamente en un registrador, un computador o un integrador.¹¹

Los detectores deben tener un amplio rango dinámico de respuesta, poseer una respuesta lineal, no contribuir a el ensanchamiento de banda extracolumnar, que responda a todo tipo de solutos, no afectarse por cambios de temperatura, poseer una buena relación señal/ruido, no destruir la muestra (resulta especialmente importante cuando se trata de cromatografía preparativa) y tener una constante de velocidad de respuesta instantáneo a un cambio en la concentración del analito.^{23 30}

Existen dos tipos generales de detectores: Detectores generales y los selectivos. Los primeros son los que miden algún cambio en las propiedades físicas de la fase móvil con el soluto, como el caso del índice de refracción y los segundos son sensibles sólo para algunas propiedades del soluto, como la absorción UV.

El detector más empleado en la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es el de UV de longitud de onda variable; es el detector ideal para desarrollar métodos analíticos por cromatografía, pues permite asegurar dentro de ciertos límites, la integridad de un pico cromatográfico.²³

El detector del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución usado tiene un sistema óptico invertido: la celda se ilumina con luz "blanca", es decir, no monocromada y la luz emerge de la celda llega a la red de difracción y allí es dispersada hacia el elemento fotosensible, en los convencionales la red de difracción se ubica antes de la celda, la cual recibe luz monocromática seleccionada por la red. En lugar de una fotocelda se emplea un conjunto de fotoceldas o fotodiodos montados en un chip de silicio, por lo que se consigue no sólo medir la luz transmitida a una longitud de onda, sino todo el espectro de absorción del eluido en tiempo real y opera en un rango de 190 a 350 nm.

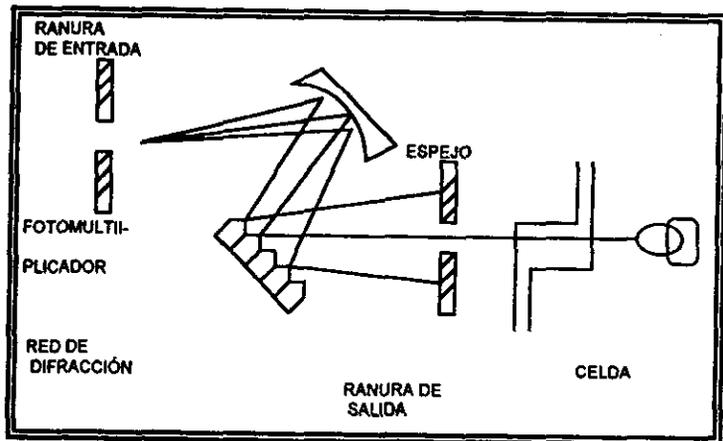


Fig 5. Detector de onda variable o espectrofotométrico.

La concentración del analito en la muestra se determina por aplicación de la ley de Beer: $A = a \cdot b \cdot C$, donde A es la absorbancia, a es la absortividad molar del analito, b es el camino óptico de la celda medido en cm y C es la concentración de analito en la muestra expresada en moles/l.

Los detectores de IR se emplean ampliamente, se considera universal, ya que responde a todos los solutos siempre y cuando el IR del soluto sea significativamente diferente del de la fase móvil. ^{23 30}

Los detectores electroquímicos (amperimétricos) permiten la detección de compuestos que son electroreducibles o electrooxidables en el eluyente de la columna a muy bajas concentraciones. En estos detectores las corrientes, la corriente entre los electrodos polarizables y de referencia se mide como una función del voltaje aplicado. Su aplicación se ve limitada al hecho de que la fase móvil debe ser conductiva.

Los detectores de fluorescencia tienen una alta selectividad y sensibilidad. Cuando una molécula absorbe energía, adquiere un estado de energía excitado. Al volver la molécula a su estado de energía basal, la energía debe disipar la energía absorbida.

Si la emisión de energía es en forma de luz, se dice que la molécula fluoresce. La luz emitida es generalmente de baja energía (mayor longitud de onda) que la radiación de excitación.

La cantidad de fluorescencia es la relación entre el número de fotones emitidos con el número de fotones absorbidos (rendimiento cuántico de fluorescencia $=\phi$). Las moléculas con un valor de ϕ mayor a 0.5 son altamente fluorescentes y los que tienen un valor menor a 0.1 tienen muy poca fluorescencia. Los compuestos que tienen fluorescencia se pueden dividir en dos grandes grupos:

- Fluorescencia nativa.
- Derivados fluorescentes.

5. Columnas. 11, 24, 30

La columna es la parte fundamental de un sistema de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución ya que es en ésta donde se lleva a cabo la separación. Las columnas de alta resolución proporcionan una dispersión mínima de los picos de la muestra separada.

El objetivo que persigue una buena columna es minimizar los factores que afectan la dispersión de banda como la difusión de Eddy, la difusión longitudinal y la transferencia de masas de la fase estacionaria y móvil. El efecto de cada uno de estos factores puede relacionarse con la velocidad de la fase móvil, el diámetro de la partícula, el coeficiente de difusión de la muestra en la fase móvil, el grosor de la fase estacionaria y el coeficiente de difusión de la muestra en la fase estacionaria.

Los empaques para Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución pueden clasificarse como:

- ◆ Sólidos rígidos, geles duros o suaves
- ◆ Sólidos porosos, peliculares a superficialmente porosos
- ◆ Sólidos de partículas esféricas y partículas irregulares

Los sólidos rígidos se basan en una matriz de silica, pueden obtenerse en gran variedad de tamaños, formas y grados de porosidad, además que se les puede unir grupos funcionales o capas de polímeros para su aplicación en otros métodos.

Los geles duros se basan en partículas porosas de poliestireno entrelazadas con divinilbenceno.

Los empaques descritos como peliculares están hechos de esferas de vidrio recubiertas con una capa de fase estacionaria.

En general, es preferible trabajar con partículas que tengan un rango estrecho en sus tamaños, ya que la permeabilidad de la columna estará mayormente determinada por las partículas más pequeñas mientras que la eficiencia (H) está determinada por las partículas más grandes.

Evaluación de Columnas.²⁴

Para evaluar una columna es necesario considerar lo siguiente:

★ Condiciones de operación

- Empaque
- Composición de la fase móvil
- Composición de la muestra
- Método de detección
- Longitud de la columna

★ Parámetros cromatográficos

- Volumen de muestra inyectado
- Tiempos de retención (solutos retenidos y no retenidos)
- Número de platos teóricos
- Asimetría del pico

4.4 . VALIDACIÓN DE MÉTODOS ^{3, 4, 25}

La validación de métodos analíticos se define como un conjunto de evidencias que establecen la capacidad del método analítico y la medida en que éste satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas que se deseen.

La capacidad de un método analítico queda expresada en términos de características analíticas, tales como:

Linealidad: La linealidad de un sistema o método analítico, se define como el aseguramiento de que los resultados analíticos (que pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática) son proporcionales a la concentración del activo dentro de un intervalo determinado.

Exactitud: Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor obtenido de referencia (estándar). Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestra a las que se les ha adicionado cantidades conocidas del activo.

Precisión del sistema: Es el grado de concordancia entre respuestas analíticas individuales, expresándose en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación.

Precisión del método: Es el grado de reproducibilidad o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

a) **Repetibilidad:** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre las determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analistas, tiempo, aparato, laboratorio, etc.).

b) **Reproducibilidad:** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes días y analistas).

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

Tolerancia: Es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como: diferente temperatura, lotes de reactivos, columna, condiciones ambientales, etc.

Estabilidad de muestra analítica: Es la propiedad de una muestra a cuantificar, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Son varias las razones por las cuales en la industria farmacéutica deben validarse los métodos analíticos:

- ♦ Es una parte integral del sistema de control de calidad.

- ◆ Apoya el desarrollo de nuevos productos.
- ◆ Se necesitan nuevos métodos analíticos.
- ◆ Instrumentos y reactivos analíticos nuevos.
- ◆ Cambio en la formulación.
- ◆ Cambios en el proceso.
- ◆ Cambios en equipos analíticos.

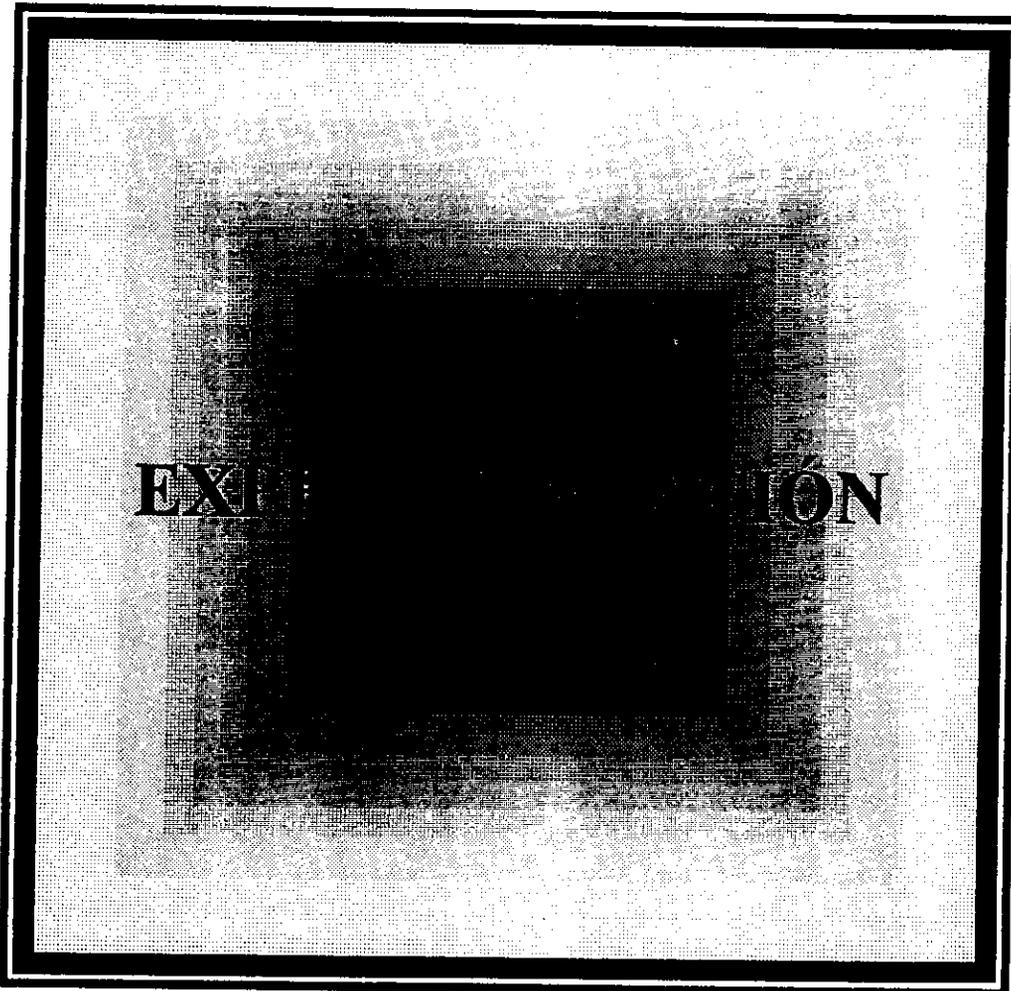
La validación de métodos analíticos puede elaborarse de diferentes maneras:

Prospectiva: Establecer la evidencia documentada de que un método analítico realiza aquello para lo que fue diseñado basándose en un protocolo previamente elaborado.

Introspectiva: Conocida como validación en fase de desarrollo, es el establecimiento de la evidencia documentada de que un método analítico realice aquello para lo que fue diseñado basándose en información generada durante la ejecución real del proceso.

Retrospectiva: Es el establecimiento de la evidencia documentada de que un método realice aquello para lo que fue diseñado basándose en la revisión y el análisis de información histórica

Una vez validado el método analítico debe entregarse al laboratorio de control químico para efectuar los procedimientos de análisis como ensayo de rutina.



EXI : IÓN

V. EXPERIMENTACIÓN

5.1. MATERIALES

I. EQUIPO

1.1 Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (Hewlett Packard)

HPLC 1100 HP ASTERIX

Bomba cuaternaria G13311A US53606781

Automuestreador G1313A DE54901581

Detector con Arreglo de Diodos G1315A DEG1801174

Termostato para Columna G1316A US54000803

Ordenador PC HP Pentium.

1.2 Balanza Analítica Mettler Toledo AG204

1.3 Parrillas de agitación y calentamiento Pyro-Multi-Magnestir No. 1268.

Lab-Line.

II. MATERIAL

2.1 Material de vidrio comúnmente utilizado en el Laboratorio. Se usa material actínico

2.2 Membranas para filtración Millipore 0.45 μ .

2.3 Barras magnéticas.

III. REACTIVOS

3.1 Estándar secundario y Materia Prima de Vitamina A (Palmitato),

3.2 D-L- Tocoferol, grado reactivo

3.3 Nipagin, grado reactivo

3.4 Nipazol, grado reactivo

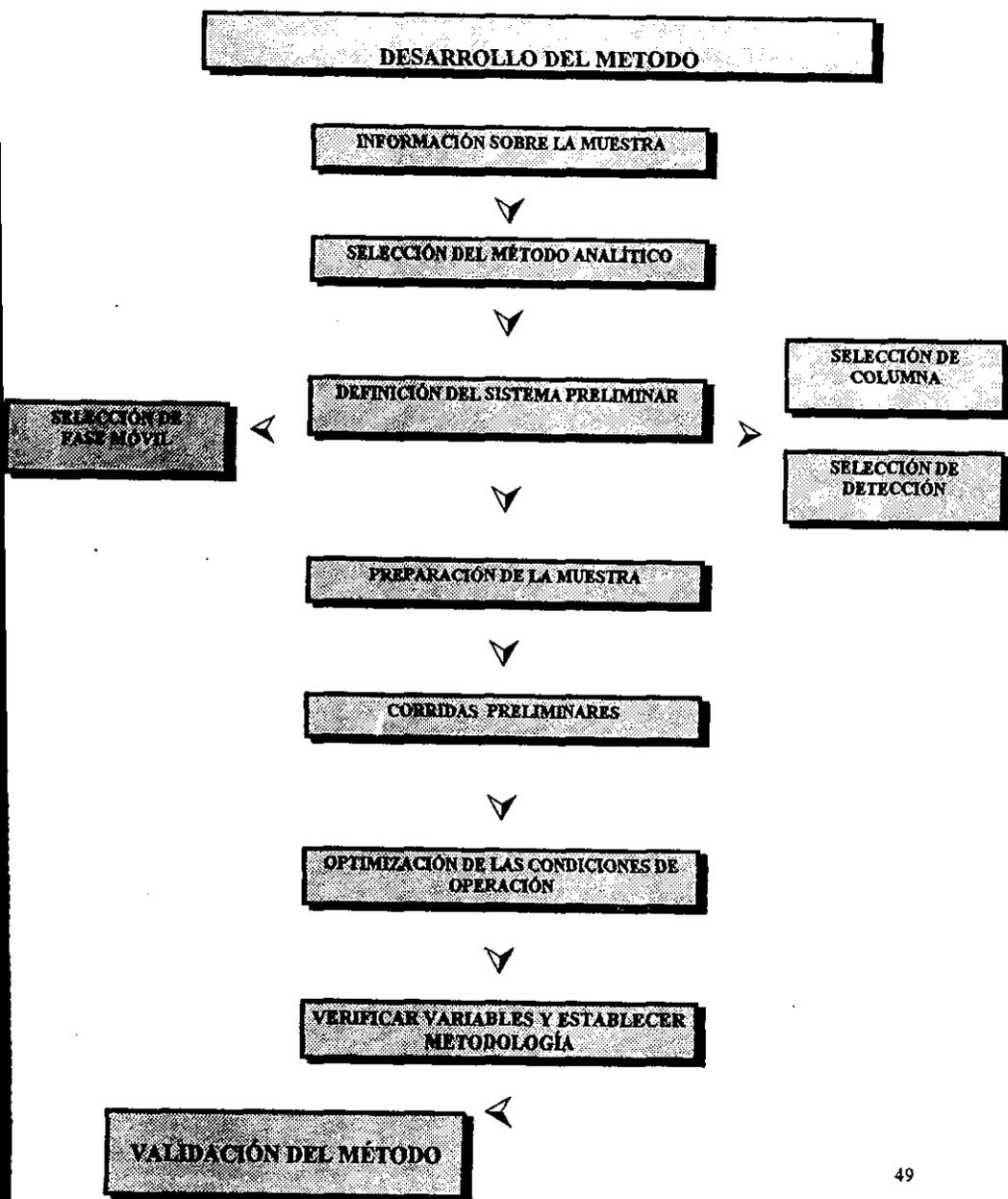
3.5 Escencia de Naranja, grado reactivo

3.6 Aceite de cacahuete, grado reactivo

3.7 Metanol grado cromatográfico

3.8 Acetonitrilo, grado cromatográfico.

3.9 Agua desionizada.



5.2 DESARROLLO DEL MÉTODO

Al realizar una revisión bibliográfica acerca de vitamina A, se encontraron las siguientes propiedades fisicoquímicas :

- 1.- La vitamina A es un éster o mezcla de ésteres de retinol (usualmente acetato, propionato • palmitato) en un aceite vegetal adecuado.
- 2.- Su peso molecular es de 524 g/mol (como palmitato de retinol).
- 3.- De acuerdo a su molécula y grupos funcionales presentes se considera a la vitamina A como una molécula no iónica.
- 4.- La concentración de vitamina A, palmitato de retinol en solución oral (solución oleosa) es de 1,250,000 UI/ml.

Pruebas preliminares

- El máximo del espectro de absorción U.V. se encuentra a 330nm, en la fase móvil empleada (anexo 1).
- La solubilidad de la vitamina A se evaluó en cloroformo, etanol, éter, aceite mineral, glicerol, hexano y éter dietílico.
- Se evalúa la solubilización de la vitamina A, usando 100 mg de muestra para cada tubo de ensaye con 10 ml de solvente.

Tabla 3. Prueba de solubilización de la vitamina A en varios solventes.

SOLVENTE	SOLUBLE	Nº- SOLUBLE
Isopropanol	√	
Cloroformo	√	
Éter	√	
Etanol	√	
Hexano	√	
Aceite mineral	√	
Glicerol		√

Posteriormente se realizó la cuantificación de la vitamina A usando fase reversa, de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas y uso de tablas de selección de columnas y métodos. Se trabaja con materia prima previamente estandarizada y la columna calificada (anexo 2)

Como el método a desarrollar es cuantitativo se probaron distintas concentraciones, para tomar aquella que nos lleva a una respuesta fácilmente reproducible.

La forma farmacéutica contiene propilparabeno, metilparabeno, D-L-tocoferol, por lo que al programar el detector a una longitud de onda donde se tiene la absorción máxima de vitamina A se minimizaron las respuestas de los estos excipientes.

El medio de dilución para la muestra debe ser muy parecido en polaridad al de la fase móvil, para evitar la existencia de partículas visibles insolubles en el sistema cromatográfico.

Tabla 4. Condiciones cromatográficas empleadas en el desarrollo del método.

CONDICION	FASE MÓVIL ACN: MEOH: H2O	Tr (min)	Medio de Dilución ACN:MEOH	LONG. DE ONDA (nm)	Simetría	No Platos	K'	Conc. (mcg/ml)	COLUMNA SYMETRY WATERS
I	55:43:02	11.58	50:50:00	310	0.71	3250	10.51	141.7	C 18
II	55:44:01	9.69	50:50:00	310	0.71	3089	8.7	141.7	C 18
III	60:39:01	9.957	50:50:00	310	0.71	3240	8.97	141.5	C 18
IV	40:55:05	13.424	50:50:00	330	0.75	3250	12.42	141.5	C 18
V	70:30:00	8.35	60:40:00	330	0.71	3230	12.5	141.5	C 18
VI	80:20:00	9.37	60:40:00	330	0.71	3250	12.5	141.5	C 18
VII	70:30:00	8.0	70:30:00	330	0.875	3545	15	199.22	C8
VIII	50:50:00	7.18	50:50:00	330	0.69	3240	13	50	C8
IX	50:49:01	3.65	60:40:00	330	0.92	4012	22.58	38	C8

Las mejores condiciones cromatográficas fueron las del ensayo IX.

La metodología es la siguiente:

Preparación del estándar de referencia:

Pesar aproximadamente 95 mg de Vitamina A patrón de referencia; transferir a un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar 50 ml de Isopropanol y agitar mecánicamente por espacio de 15 minutos, llevar al aforo con Isopropanol. Tomar de la solución anterior una alícuota de 2ml y transferir a un matraz volumétrico de 100ml, y llevar al aforo con el medio de dilución. Esta solución contiene aproximadamente 38 $\mu\text{g/ml}$ ó 69.0909U.I de Vitamina A (palmitato de retinol).

Preparación del medio de dilución.

Sistema de dilución Acetonitrilo grado cromatográfico (filtrado y degasificado) y Metanol grado cromatográfico (filtrado y degasificado) en la proporción de 60:40.

Preparación de la muestra:

Pesar aproximadamente entre 0.9 –1gr de Solución Oral, equivalente a 687.5 mg de Vitamina A (aproximadamente 1ml). Transferirla a un matraz volumétrico de 100ml, adicionar 50 ml de Isopropanol, agitar mecánicamente durante 15 min, llevar al aforo con Isopropanol y mezclar. Transferir una alícuota de 2 ml de esta solución a un matraz volumétrico de 100ml, llevar al aforo con el medio de dilución y mezclar. De la solución anterior transferir una alícuota de 7 ml a un matraz volumétrico de 25 ml, llevar al aforo con el medio de dilución y mezclar. Esta solución contiene aproximadamente 38 $\mu\text{g/ml}$ o 69.09 U.I de Vitamina A (palmitato de retinol).

Procedimiento:

Inyectar en el cromatógrafo 20 µl de la solución patrón estándar de referencia por triplicado y determinar el coeficiente de variación de las áreas obtenidas, el cual no debe ser mayor de 1.0 %.

Inyectar 20 µl de las soluciones muestra. El coeficiente de variación de las áreas obtenidas no debe ser mayor de 1.0%.

Finalmente inyectar 20 µl de la solución estándar de referencia y comparar el área obtenida con respecto al promedio de las primeras tres inyecciones.

Nota : se utiliza material actínico. Debe considerarse que 1ml de la solución contiene 1,250,000 U.I/ml.

Condiciones Cromatográficas:

COLUMNA : SYMETRY WATERS C₈
15cm X 3.9, diámetro de 5 micras

FASE MOVIL: Acetonitrilo : Metanol : Agua
50 : 49 : 1

VEL. DE FLUJO : 2.5 ml/min

LONGITUD DE ONDA : 330 nm

VOL DE INYECCION : 20 µl

MEDIO DE DILUCION : Acetonitrilo : Metanol (60:40)

TEMP. 25 °C

5.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

I. Linealidad del Sistema

Se determinó construyendo una curva de calibración (Concentración - Área) a partir de una solución Stock de Vitamina A (palmitato de retinol) estándar de referencia, se prepararon cuando menos 5 diluciones, incluyendo el 100% (38 µg /ml de Vitamina A), haciendo el análisis por triplicado para cada dilución.

II. Linealidad del método.

Se prepararon de manera independiente placebos cargados de principio activo cuando menos a cinco diferentes concentraciones, incluyendo el 100 % (de 60 – 140%), considerando los mg o UI de activo por ml que presenta en la formulación , se hicieron los análisis por triplicado de cada concentración y recuperar el activo adicionado, tomando como referencia una solución estándar de Vitamina A (palmitato de retinol). Se siguió el procedimiento de manufactura dado por Desarrollo Farmacéutico, para la elaboración del placebo.

III. Precisión del sistema.

Se determinó por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar de concentración igual al 100 % (38 µg /ml para Vitamina A palmitato).

IV. Precisión del método (Reproducibilidad al 100 %)

Se determinó de una muestra homogénea del producto (Vitamina A, Solución oral) cercana al 100 % de Vitamina A Palmitato (38 µg /ml de Vitamina), analizada por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado.

V. Exactitud y repetibilidad al 100%

Se realizó con seis placebos cargados de Vitamina A a una concentración cercana al 100 % (38 µg/ml) de manera independiente, por el mismo analista y en las mismas condiciones de operación.

Se realizó también para el 80 % y 120 %.

VI. Especificidad.

Se determinó preparando un placebo de vitamina A, solución oral, de acuerdo a la formulación otorgada por el departamento de Desarrollo Farmacéutico, del cual se tomaron tres muestras y se analizaron con el método propuesto. Así mismo se preparó un estándar de referencia.

Se sometió la muestra y placebo a condiciones de degradación para evaluar la especificidad.

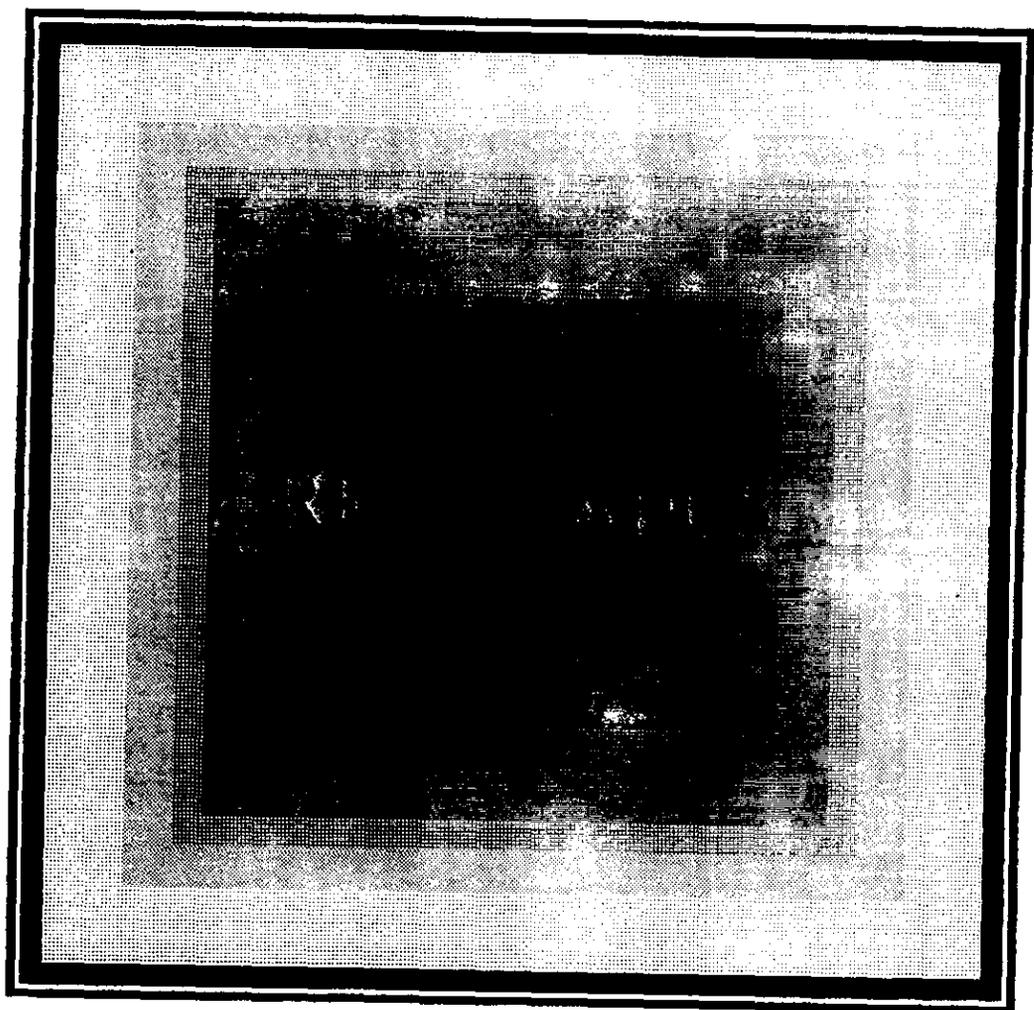
VII. Tolerancia del método.

Se determinó de una muestra homogénea del producto, solución oral de vitamina A, lote 705574, a una concentración cercana al 100% (38 µg/ml), analizada por un solo analista, usando un peso distinto de estándar y metanol grado reactivo. Se analizó por triplicado.

VIII. Estabilidad de la muestra analítica.

Se determinó mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de tres muestras con los obtenidos de las mismas muestras, después de un tiempo determinado. Se almacena la muestra por 24 horas a temperatura ambiente.

La determinación se efectuó por un mismo analista.



VI. RESULTADOS

I. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Se determinó construyendo una curva de calibración (concentración – área) a partir de una solución Stock de Vitamina A, palmitato de retinol estándar de referencia, utilizando 5 diluciones, incluyendo el 100% (38.0 µg/ml de Vitamina A). Se hizo el análisis por triplicado para cada dilución.

Solución Stock : $97.3.0 \text{ mg}/200 \text{ ml} \times 1000 = 475 \text{ mg/ml}$ o $884.5454 \text{ .U.I./ ml}$.

Tabla 5. Preparación de muestras para la realización de la linealidad del sistema.

VOLUMEN DE ALICUOTA (ml)	VOLUMEN DE AFORO (ml)	CONCENTRACIÓN (µg/ml)	CONCENTRACIÓN (U.I./ ml)	PORCENTAJE (%)
2.0	50	19.46	35.38180	50
3.0	50	29.19	53.072720	75
4.0	50	38.92	70.763636	100
5.0	50	48.65	88.454545	125
6.0	50	58.38	106.14545	150

Tabla 6. Análisis de variancia para la evaluación de la linealidad del sistema.

ANÁLISIS DE VARIANCIA				
FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA
REGRESIÓN	1	1470199.12	1470199.1212	49409.83
ERROR DE REGRESIÓN	13	386.82	29.7552	
FALTA DE AJUSTE	3	190.65	63.5516	3.24
ERROR PURO	10	196.16	19.6163	

$$F_{95 \text{ CRÍTICA}}(1, 13) = 4.67$$

$$F_{99 \text{ CRÍTICA}}(1, 13) = 9.07$$

$$F_{95 \text{ CRÍTICA}}(3, 10) = 3.71$$

$$F_{99 \text{ CRÍTICA}}(3, 10) = 6.55$$

Tabla 7. Comparación de las respuestas analíticas obtenidas en la linealidad del sistema a partir de la línea de mejor ajuste.

CANTIDAD ADICIONADA (µg/ml)	ÁREA OBSERVADA	ÁREA ESTIMADA	DIFERENCIA
19.46	448,87	442,74884	-6,12116
19.46	443,95	442,74884	-1,20116
19.46	446,29	442,74884	-3,54116
29.19	661,47	664,12326	2,65326
29.19	666,16	664,12326	-2,03674
29.19	663,08	664,12326	1,04326
38.92	877,99	885,49768	7,50768
38.92	878,11	885,49768	7,38768
38.92	880,52	885,49768	4,97768
48.65	1104,61	1106,8721	2,2621
48.65	1112,07	1106,8721	-5,1979
48.65	1107,36	1106,8721	-0,4879
58.38	1325,04	1328,2465	3,2065
58.38	1340,36	1328,2465	-12,1135
58.38	1327,46	1328,2465	0,7865

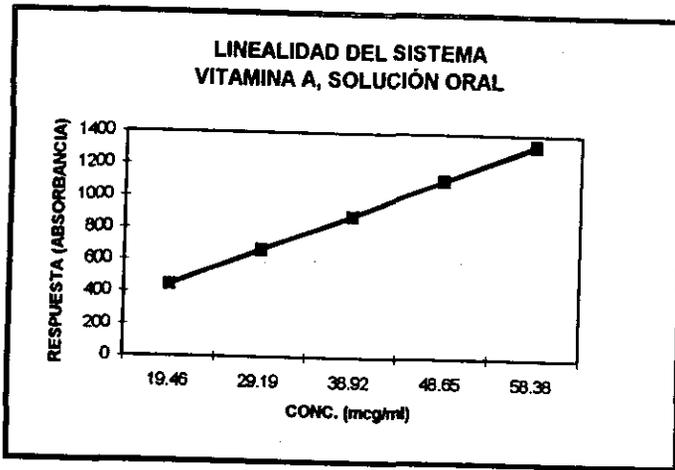


Fig. 6. Gráfica de linealidad del sistema para vitamina A.

Tabla 8. Análisis estadístico para la linealidad del sistema de vitamina A

PARÁMETRO	RESULTADO
Pendiente (m)	22.75173977
Intercepto (b)	0.04560667
Coef. Correlación (r)	0.99986847
Coef. Determinación (r ²)	0.99973696
Desv. Std. De la pendiente	0.102354734
Desv. Std. Del intercepto	4.225294917
t (gl = 13, 95 %)	2.1600000
Intervalo de confianza 95% (b)	-9.081010 < 0.04560667 < 9.172243
Intervalo de confianza 95% (m)	22.530653 < 22.751739 < 22.972826
Desv. Std estimado de y dado x	0.00115629

II. PRECISIÓN DEL SISTEMA

Se determinó mediante el análisis sextuplicado de una misma solución estándar a la concentración del 100% (38.920 µg/ml).

Tabla 9. Resultados de la determinación de la precisión del sistema

CONCENTRACIÓN	ÁREA
38.92	877.99359
38.92	883.60022
38.92	878.11047
38.92	880.52728
38.92	878.18677
38.92	880.52350
MEDIA	879.8236383
DESV.STD.	2.02000493
C.V. %	0.25106149

EL SISTEMA ES PRECISO A ESTE NIVEL DE CONCENTRACIÓN.

III. LINEALIDAD DEL MÉTODO

Se prepararon de manera independiente placebos cargados de principio activo a cinco diferentes concentraciones, incluyendo el 100%, los mg de activo por ml de solución que presenta la formulación. Se hizo el análisis por triplicado para cada concentración recuperando la cantidad de activo adicionado, tomando como referencia una solución estándar de vitamina A (Palmitato de Retinol), a la concentración del 100 % (38.0 µg/ml).

Tabla 10. Preparación de muestras para la determinación de la linealidad del método

PORCENTAJE (%)	ACTIVO ADIC. (mg)	ACTIVO ADIC. U.I.	CANTIDAD DE PLACEBO (mg)	RESPUESTA (ÁREA)
60	227.3	413,272.7273	9.460	358.08256
	225.2	409,454.5455		358.56144
	227.6	413,818.1818		360.24004
80	302.2	549,454.5455	9.460	646.1600
	303.5	551,818.1818		652.4084
	302.4	549,818.1818		640.2004
100	378.7	688,545.4545	9.460	997.0196
	378.1	687,454.5455		999.0025
	378.0	687,272.7273		997.0196
120	456.6	830,181.8182	9.460	1438.8064
	456.6	830,181.8182		1439.6001
	455.8	828,727.2727		1436.0225
140	530.3	964,181.1882	9.460	1971.1600
	530.3	964,181.1882		1966.2576
	536.3	975,090.9091		1959.6009

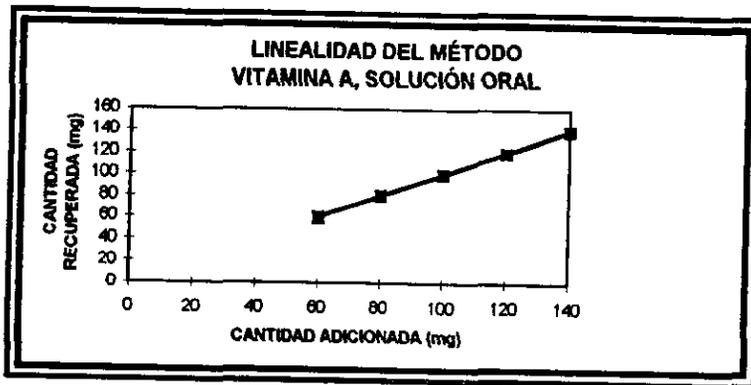


Fig 7. Gráfico de la linealidad del método para vitamina A

Tabla 11. Análisis estadístico para la linealidad del método.

X	(X ²)	(Y)	(Y ²)	(XY)	(SYi)	(SYi ²)
60	3600	59.84	3580.8256	3590.40		
60	3600	59.88	3585.6144	3592.80		
60	3600	60.02	3602.4004	3601.20	179.74	32306.4676
80	6400	80.40	6464.1600	6432.00		
80	6400	80.78	6525.4084	6462.40		
80	6400	80.02	6403.2004	6401.60	241.2	58177.44
100	10000	99.86	9972.0196	9986.00		
100	10000	99.95	9990.0025	9995.00		
100	10000	99.86	9972.0196	9986.00	299.67	89802.1089
120	14400	119.92	14380.8064	14390.40		
120	14400	119.99	14397.6001	14398.80		
120	14400	119.85	14364.0225	14382.00	359.76	129427.257
140	19600	140.40	19712.1600	19656.00		
140	19600	140.24	19667.2576	19633.60		
140	19600	139.97	19591.6009	19595.80	420.61	176912.772
Σ=1500	162000	1500.98	162209.098	162104.00		486626.046

Tabla 12. Análisis de regresión de la linealidad del método

$m = 1.0005$	$R^2 = 0.999914145$
I.C. Sup. $m = 1.006053917$	$R = 0.999957072$
I.C. Inf. $m = 0.99494460$	$S_m = 0.002571258$
$b = 0.0153333$	$S_b = 0.267212966$
I.C. Sup. $b = 0.59251334$	$S(XY) = 0.281667198$
I.C. Inf. $b = -0.561846673$	$t(g.l.13,0.05) = 2.1600$

Tabla 13. Comparación de respuestas obtenidas en la determinación de la linealidad del método, calculadas a partir de la línea de mejor ajuste.

CANTIDAD ADICIONADA ($\mu\text{g/ml}$)	CANTIDAD DETERMINADA	CANTIDAD ESTIMADA	Temp	DIFERENCIA
60	59,84	60,036	-0.32	0,196
60	59,88	60,036	-0.32	0,156
60	60,02	60,036	-0.32	0,016
80	80,4	80,048	+0.140	-0,352
80	80,78	80,048	+0.140	-0,732
80	80,02	80,048	+0.140	0,028
100	99,86	100,06	+0.530	0,2
100	99,95	100,06	+0.530	0,11
100	99,86	100,06	+0.530	0,2
120	119,92	120,072	+1.050	0,152
120	119,99	120,072	+1.050	0,082
120	119,85	120,072	+1.050	0,222
140	140,4	140,084	+1.450	-0,316
140	140,24	140,084	+1.450	-0,156
140	139,97	140,084	+1.450	0,114

Tabla 14. Análisis de Variancia para la evaluación de la linealidad del método.

ANÁLISIS DE VARIANCIA				
FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F _{CALCULADA}
REGRESIÓN	1	12012.00	12012.0030	151405.93
ERROR DE REGRESIÓN	13	1.03	0.0793	
FALTA DE AJUSTE	3	0.42	0.1388	2.25640
ERROR PURO	10	0.62	0.0615	

$$F_{95 \text{ CRÍTICA}}(1, 13) = 4.67$$

$$F_{99 \text{ CRÍTICA}}(1, 13) = 9.07$$

$$F_{95 \text{ CRÍTICA}}(3, 10) = 3.71$$

$$F_{99 \text{ CRÍTICA}}(3, 10) = 6.55$$

IV. PRECISIÓN DEL MÉTODO (Reproducibilidad al 100 %)

Se determinó de una muestra homogénea del producto, solución oral de vitamina A, lote 705574 cercana al 100% (38.0 µg/ml), analizada por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado.

Tabla 15. Comparación de valoraciones obtenidas en la reproducibilidad del método

	ANALISTA 1	ANALISTA 2
DIA 1	106.8963	107.5231
	107.8831	107.8776
	107.7467	107.6748
DIA 2	106.8756	108.0253
	107.5553	107.0807
	107.0515	107.5490

Tabla 16. Análisis estadístico de la linealidad del método

	ANALISTA 1	SUMA DE CUADRADOS A1	ANALISTA 2	SUMA DE CUADRADOS A2
DIA 1	106.8963	11426.81960	107.5231	11561.22564
	107.8831	11638.76478	107.8776	11637.58521
	107.7467	11609.34274	107.6748	11593.86471
SUMATORIA	322.5261	34674.92711	323.0756	34792.67556
DIA2	106.8756	11422.38768	108.0253	11669.46544
	107.5553	11568.14729	107.0807	11466.27631
	107.0515	11460.02387	107.5490	11566.78310
SUMATORIA	321.4824	34450.55883	322.6550	34702.52485

Tabla 16. Análisis de variancia para la evaluación de la reproducibilidad del método.

ANÁLISIS DE VARIANCIA

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F CRÍTICA
ANALISTA	1	0.247137423	0.247137423	2.34221592	5.05033881
DÍA	2	0.211028727	0.105514364	0.63457657	6.60787691
ERROR	8	1.330201814	0.166275227		

$$\text{Repetibilidad} = \pm (Mce)^{1/2}$$

$$\text{Repetibilidad} = 0.40776$$

V. EXACTITUD DEL MÉTODO

Se realizó con seis placebos cargados de vitamina A, palmitato de retinol a una concentración cercana a 80, 100 y 120% de manera independiente, por un mismo analista y bajo condiciones de operación establecidas.

Tabla 17. Preparación de muestras para la determinación de la exactitud al 80 %

EXACTITUD DEL MÉTODO AL 80 %

CONCENTRACIÓN (µg/ml)	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (%)
30.3	9.46	81.235400
30.4	9.46	81.048200
30.5	9.46	81.020020
30.5	9.46	80.289700
30.7	9.46	81.420370
30.9	9.46	80.257600

Tabla 18. Análisis estadístico de la exactitud al 80 %

MEDIA	80.87854833
DESV. STD	0.49031193
C.V.	0.60623235 %
C.V. crítico	1.50 %
STD (área)	836.89453
CONC STD.	37.92 mcg/ml.
t experimental	2.1395
t crítica	2.6

Tabla 19. Preparación de muestras para la determinación de la exactitud al 80 %

EXACTITUD DEL MÉTODO AL 100 %

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/ml}$)	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (%)
37.86	9.46	99.857130
37.85	9.46	99.840560
37.97	9.46	100.010550
37.97	9.46	100.249460
37.97	9.46	100.172683
37.96	9.46	100.018510

Tabla 20. Análisis estadístico para la exactitud del método al 100 %

Concentración del estándar	37.92 $\mu\text{g/ml}$.
Respuesta del estándar	836.8945333
Promedio de cantidad recuperada	100.0248155%
Desviación estándar	0.164097532
Coefficiente de Variación crítico (%)	1.500
Coefficiente de Variación experimental (%)	0.582094226
Valor de t con cinco grados de libertad	2.571
Valor de t experimental	1.08457144

Tabla 21. Preparación de muestras para la determinación de la exactitud al 120 %

EXACTITUD DEL MÉTODO AL 120 %

CONCENTRACIÓN (µg/ml)	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (%)
45.66	9.46	119.379200
45.58	9.46	121.808000
45.68	9.46	119.974200
45.61	9.46	119.861320
45.56	9.46	121.024790
45.59	9.46	119.732900

Tabla 22. Análisis estadístico para la exactitud del método al 120 %

MEDIA	120.296835
DESV.STD	0.923837801
C.V.	0.7679658 %
C.V. crítico	1.50 %
STD (área)	836.89453
CONC STD.	37.92
t experimental	2.1239
t crítica	2.6

VI. ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO.

Se preparó un placebo de vitamina A, solución oral de acuerdo a la formulación otorgada por el departamento de Desarrollo Farmacéutico, del cual se tomaron tres muestras y se analizaron con el método propuesto, asimismo se preparó un estándar de referencia de vitamina A, palmitato de retinol. El placebo no presentó respuesta alguna en el tiempo de retención que presenta el estándar de referencia.

Tabla 22. Preparación de muestras para la determinación de la especificidad del método.

TIPO DE MUESTRA	PESO (mg)	RESPUESTA (ÁREA)
STD	94.8	854.16973
MUESTRA 1	9.46	No hay respuesta
MUESTRA 2	9.46	No hay respuesta
MUESTRA 3	9.46	No hay respuesta
C.V.	-----	-----

Se sometió la solución de vitamina A a diferentes condiciones para propiciar su degradación, buscando evaluar la respuesta de algún producto de degradación que tuviera respuesta a la longitud de onda de la vitamina A.

Tabla 23. Observaciones realizadas después de someter a diferentes condiciones de degradación la solución de vitamina A

CONDICIÓN	OBSERVACIÓN
Expuesta a la luz 3 semanas	Cambia en la apariencia de la solución, se torna color naranja intenso. Sin cambio en el cromatograma.(tiempo de retención o existencia de un nuevo pico). Disminuye el área.
Expuesta al aire 3 semanas	Cambio de apariencia de la solución, es muy viscosa, de color naranja pálido. No hay cambio en el cromatograma. Disminuye el área.
40°C por 3 meses.	Sin ningún cambio en la apariencia de la solución, tampoco en el cromatograma. Disminuye la valoración del producto en un 3.267 %.
60°C por 15 días.	Sin ningún cambio en la apariencia de la solución, tampoco en el cromatograma. Disminuye la valoración del producto en un 1.55 %.

VII. TOLERANCIA DEL MÉTODO

Se determinó de una muestra homogénea de producto, solución oral de vitamina A, cercana al 100%, analizada por un solo analista y por triplicado. La cantidad de estándar a pesar es distinta a la usada en el análisis de rutina, fue de 144 mg y el metanol empleado fue grado reactivo.

Tabla 24. Resultados obtenidos en la tolerancia del método

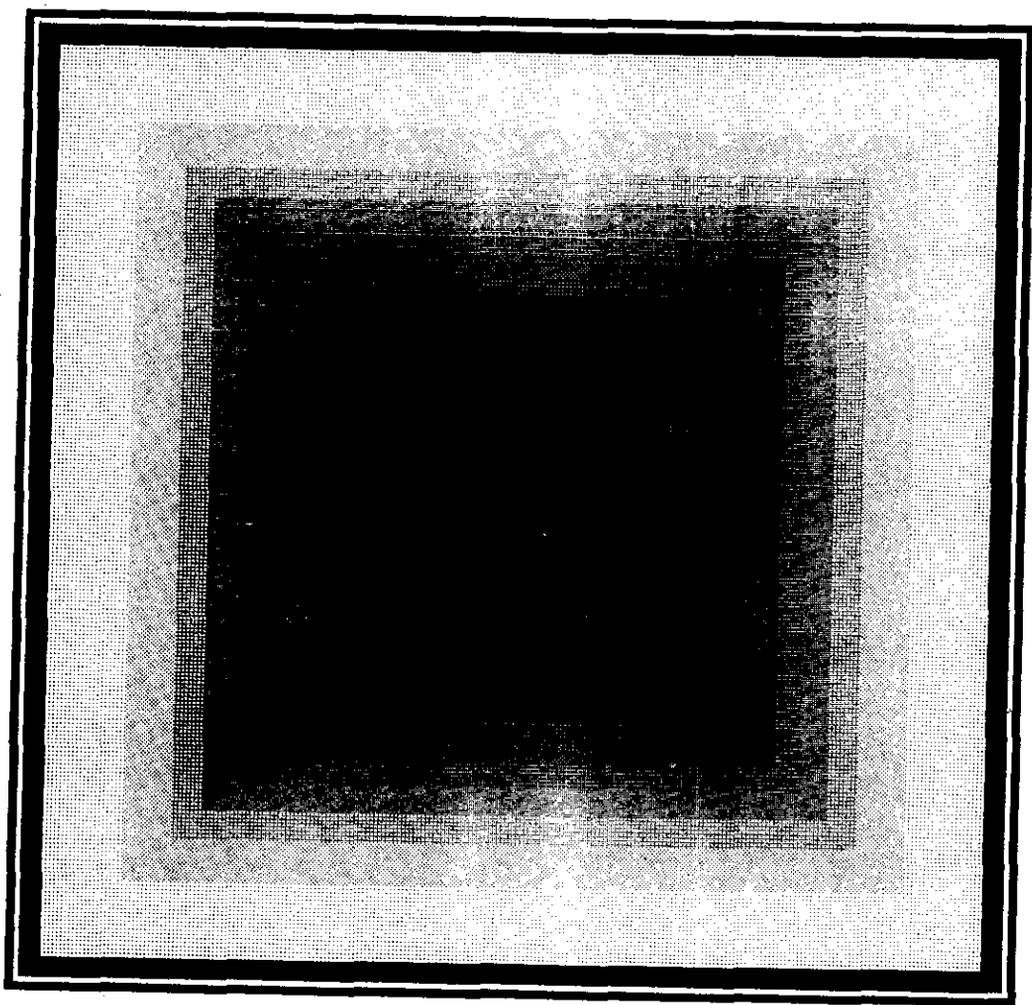
MUESTRA	RESULTADO
1	1,332,102.286 U.I /ml 106.568%
2	1,345,787.75 U.I./ml 107.66302%
3	1,342,313.047 U.I. /ml 107.38504%
PROMEDIO (VALORACIÓN 2)	1,340,066.750 U.I./ml 107.205%
PROMEDIO (VALORACIÓN 1)	1,339,510.00 U.I. /ml 107.1608 %
C.V.	0.0291623 %

VII. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA.

Se determinó mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de 3 muestras con los obtenidos de las mismas muestras, después de 24 hrs de almacenamiento en condiciones normales de análisis.

Tabla 25. Resultados obtenidos en la determinación de la estabilidad de la muestra de vitamina A.

MUESTRA	RESULTADO
VALORACIÓN 1	108.195 %
VALORACIÓN 2	107.993 %



VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se realizó la cuantificación de la vitamina A por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en fase inversa, de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas y haciendo uso de tablas de selección de columnas y métodos, con materia prima previamente estandarizada y la columna cromatográfica calificada (anexo 2)

Como el método es cuantitativo se hacen ensayos a diferentes concentraciones. En un inicio la concentración de vitamina A fue de 141.7 $\mu\text{g/ml}$; pero las áreas del cromatograma eran de 3,869 mAU, puesto que es muy alta se optó por disminuirla hasta obtener respuesta menor a 2873 mAU, sin embargo para no saturar la columna de muestra, se disminuyó la concentración aún más hasta obtener un área de 853 mAU (valor de área que es confiable y es reproducible).

Durante el desarrollo del método se emplearon diferentes condiciones cromatográficas, para establecer las mejores en la cuantificación de la vitamina A (palmitato de retinol) en solución oral. Tomando como primera opción la condición I de la tabla 4, se modificaron los volúmenes de fase móvil, también al cambiar la columna el tiempo de retención del pico es menor, se favorece de esta forma la disminución en el tiempo de análisis.

Los cromatogramas se evalúan en base a que cumplan con las especificaciones establecidas para un sistema cromatográfico ideal, tales como: una resolución mayor o igual a 1.5, el tiempo de retención menor a 10 minutos, presión de 150 – 200 bar, el pico debe ser estrecho.

El cromatograma obtenido bajo las condiciones cromatográficas No IX, tiene una resolución de 3.23, el tiempo de retención para vitamina A es de 3.528 min, el coeficiente de variación de la cuantificación es menor a 1 %, la simetría del pico es de 0.94, el consumo de fase móvil en un análisis de dos horas es de 460ml, por ello estas son las mejores condiciones obtenidas (Ver anexo1).

El tiempo que se requiere para un análisis de rutina debe ser corto, para lograr una disminución en el tiempo de entrega del resultado, porque es una etapa básica en los procesos de manufactura (troquelado, inicio de llenado, recubrimiento y acondicionamiento), ya que se requiere tener conocimiento de la valoración del producto, ya que puede sufrir alguna reacción en las condiciones del proceso.

La muestra de vitamina A no requiere pretratamiento, ya que se disuelve fácilmente en isopropanol (primer medio de dilución), con ello se eliminan problemas por solubilidad del activo (inespecificidad, existencia de partículas extrañas en suspensión).

En general es preferible que el solvente empleado en la dilución final se aproxime a la composición en la fase móvil, para obtener un pico con simetría adecuada, por eso se buscó que el medio de dilución fuera semejante a la fase móvil.

Antes de iniciar la validación del método fue indispensable la realización de la calibración del equipo a utilizar, se verificaron todos los módulos del equipo (bomba, detector, el inyector principalmente), para tener confianza en los resultados generados por dicho equipo (Ver anexo 3).

En cuanto a la validación del método:

LINEALIDAD DEL SISTEMA

- Dado que $F_{\text{regresión calculada}} > F_{\text{regresión crítica}}$ por lo tanto existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y el área obtenida.
- Dado que $F_{\text{ajuste calculada}} < F_{\text{ajuste crítica}}$ por lo tanto no existe falta de ajuste a la regresión lineal simple cantidad adicionada-área.
- De acuerdo al análisis de regresión, existe una relación lineal simple entre el área determinada con la cantidad de fármaco presente, por lo que el sistema es lineal.

PRECISIÓN DEL SISTEMA

- Dado que el coeficiente de variación (C.V.) 0.2510% calculado, es menor al C.V. crítico 1.5% por lo tanto el sistema es preciso.

LINEALIDAD DEL METODO

- Dado que $F_{\text{regresión calculada}} > F_{\text{regresión crítica}}$. Existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.
- Dado que $F_{\text{ajuste calculada}} < F_{\text{ajuste crítica}}$. No existe falta de ajuste a la relación lineal simple : cantidad adicionada-cantidad recuperada.
- De acuerdo a los resultados en el análisis de regresión, existe una relación lineal entre la cantidad de vitamina A recuperada y la cantidad de vitamina A adicionada.

PRECISION DEL METODO (REPRODUCIBILIDAD)

- Dado que $F_{\text{analista calculada}} < F_{\text{analista crítica}}$ entonces el Método Analítico es reproducible por los analistas.
- Dado que $F_{\text{día calculada}} < F_{\text{día crítica}}$ entonces el Método Analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.
- El Método Analítico es reproducible ya que la F calculada por día y por analista es menor a la crítica

EXACTITUD

- Como $t_{95 \text{ experimental}} < t_{95 \text{ critico}}$ entonces el método es **exacto** a los niveles de concentración de 80, 100 y 120 %.
- El intervalo de confianza para la media incluye al 100 %.

ESPECIFICIDAD

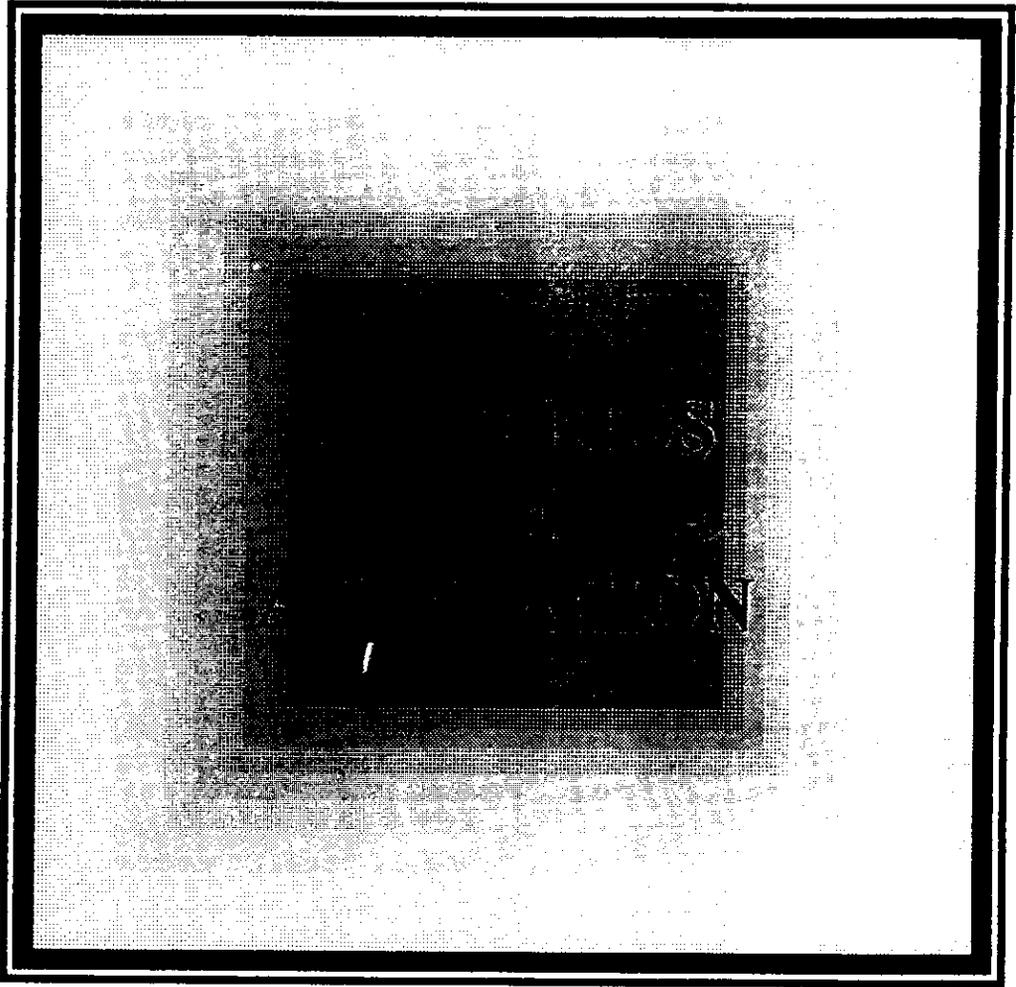
- El método es específico ya que no existe interferencia por parte de los excipientes (aceite de cacahuete, α -Tocoferol, metil-parabeno y propil-parabeno) en la cuantificación del principio activo (vitamina A).

TOLERANCIA

- Dado que el coeficiente de variación entre las dos determinaciones es menor a 1.5 %, el método es capaz de soportar cambios durante el proceso de análisis, por lo tanto el método es tolerable, cuando se cambia el peso del estándar y pureza del metanol.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

- Dado que el coeficiente de variación entre las dos determinaciones es menor a 1.5 % (0.132%), se concluye que la muestra analítica es estable hasta por 24 horas, puesto que se puede obtener un resultado confiable en este intervalo de tiempo de análisis.
- Puede ser analizada una muestra de vitamina A, solución oral hasta un tiempo de 24 hrs con la confiabilidad de que la muestra sólo se degradará el 0.202 %.
- La muestra es estable por 3 meses a temperatura ambiente.
- La muestra analítica se degrada un 3.267 % durante 3 meses Temperatura de 40 ° C.
- La muestra analítica se degrada un 1.55 % a 60 ° C por 15 días.



VIII. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN. ³²

Norma Oficial Mexicana (NOM-EM_003-SSAI-1998)

LINEALIDAD DEL SISTEMA.

CARACTERÍSTICA	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (r^2)	≥ 0.98	0.999736
COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (r)	≥ 0.99	0.999868
ORDENADA AL ORIGEN	≈ 0.0	0.045606
ANÁLISIS DE VARIANZA (REGRESIÓN)	$F_{\text{REGRESIÓN CALCULADA}} \geq F_{\text{REGRESIÓN CRÍTICA (1, 13)}}$ 4.67	49409.83
ANÁLISIS DE VARIANZA (FALTA DE AJUSTE)	$F_{\text{FALTA DE AJUSTE CALCULADA}} \leq F_{\text{FALTA DE AJUSTE CRÍTICA (3, 10)}}$ 3.71	3.24

PRECISIÓN DEL SISTEMA.

CARACTERÍSTICA	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
COEFICIENTE DE VARIACIÓN (C.V.)	≤ 1.5	0.2510614

LINEALIDAD DEL MÉTODO

CARACTERÍSTICA	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (r^2)	≥ 0.98	0.999914
COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (r)	≥ 0.99	0.999957
PENDIENTE (m)	1.0	1.000500
ORDENADA AL ORIGEN (b)	0.0	0.015333
ANÁLISIS DE VARIANZA (REGRESIÓN)	$F_{\text{REGRESIÓN CALCULADA}} \geq F_{\text{REGRESIÓN CRÍTICA (1, 13)}}$ 4.67	151405.93
ANÁLISIS DE VARIANZA (FALTA DE AJUSTE)	$F_{\text{FALTA DE AJUSTE CALCULADA}} \leq F_{\text{FALTA DE AJUSTE CRÍTICA (3, 10)}}$ 3.71	2.25

REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO

CARACTERÍSTICA	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
REPRODUCIBILIDAD ENTRE DIAS	$F_{DIAS\ CALCULADA} \leq F_{DIAS\ CRÍTICA}$ 6.61	0.634576
REPRODUCIBILIDAD ENTRE ANALISTAS	$F_{ANALISTAS\ CALCULADA} \leq F_{ANALISTAS\ CRÍTICA}$ 5.05	2.342215

EXACTITUD DEL MÉTODO

CARACTERÍSTICA	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
PRUEBA DE t (STUDEN).	$t_{CALCULADA} \leq t_{CRÍTICA}$	80 % (2.1395)
		100 % (1.0845)
		120 % (2.1239)
C.V.	$\leq 2.0\%$	80 % (0.6062)
		100 % (0.582)
		120 % (0.767)

ESPECIFICIDAD

CARACTERÍSTICA	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
SEPARACIÓN	QUE HAYA SEPARACIÓN DE COMPONENTES	HAY SEPARACIÓN

TOLERANCIA DEL MÉTODO

CARACTERÍSTICA	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
COEFICIENTE DE VARIACIÓN (C.V.)	< 2.0	0.0291623

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA

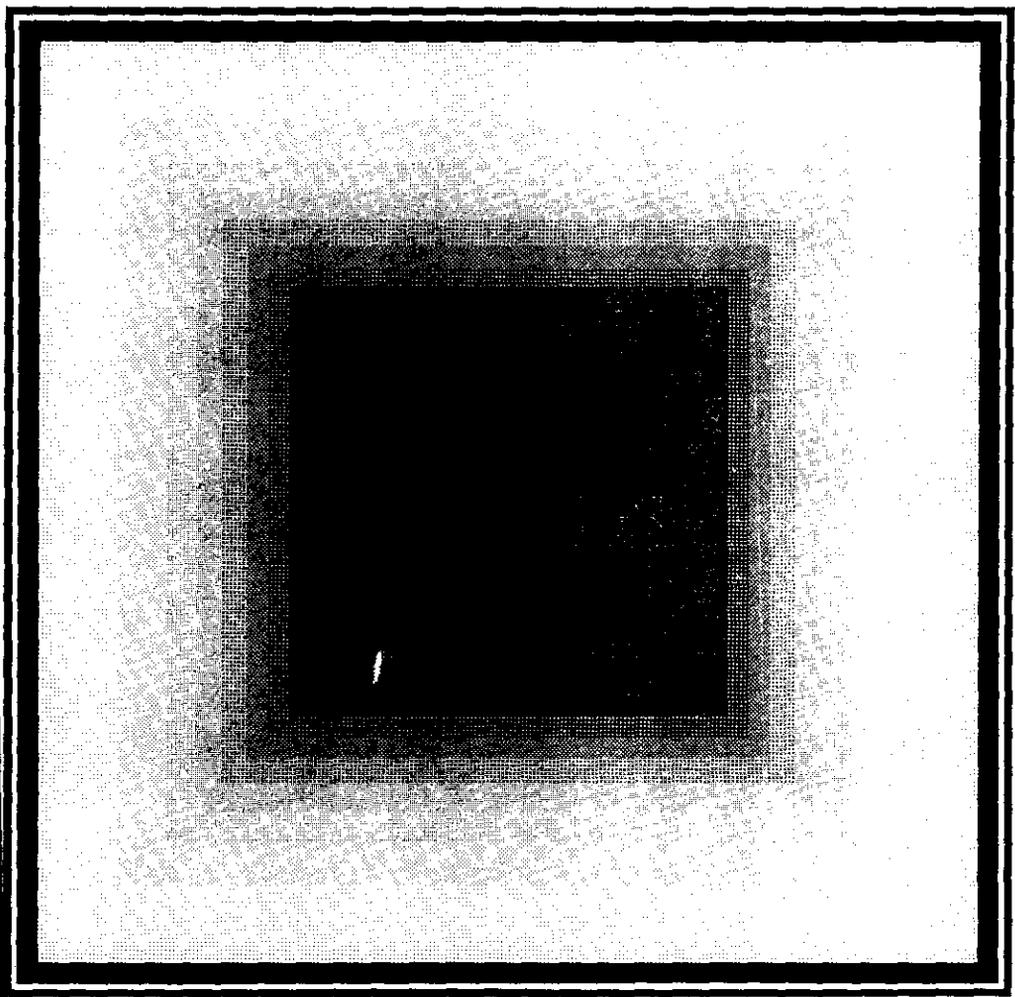
CARACTERÍSTICA	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
COEFICIENTE DE VARIACIÓN (C.V.)	< 2.0	0.13214

COPIES

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

IX. CONCLUSIONES.

- 8.1 Con el método desarrollado por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución de fase inversa, se puede cuantificar vitamina A (palmitato de retinol) en una forma farmacéutica de solución oral
- 8.2 El método analítico es confiable ya que es:
- Lineal: la relación entre la cantidad adicionada de vitamina A y el área obtenida es lineal en el intervalo de 50 % (19.46 mcg/ml) a 150 % (58.38 mcg/ml).
 - Preciso: se obtiene una variación pequeña en el área a la concentración del 100%(38.92 mcg/ml) de vitamina A.
 - Exacto: la cantidad de vitamina A que se adiciona en la solución oral, es la cantidad que se recupera.
 - Reproducible: no se ve afectado el resultado de la valoración de vitamina A por un cambio de analista y de día.
 - Específico: se puede realizar la cuantificación de vitamina A, sin que exista interferencia por parte de los excipientes presentes en la formulación.



ANEXO 1

ESPECTROS

CRONATOGRAMAS

DEL HPLC 1100

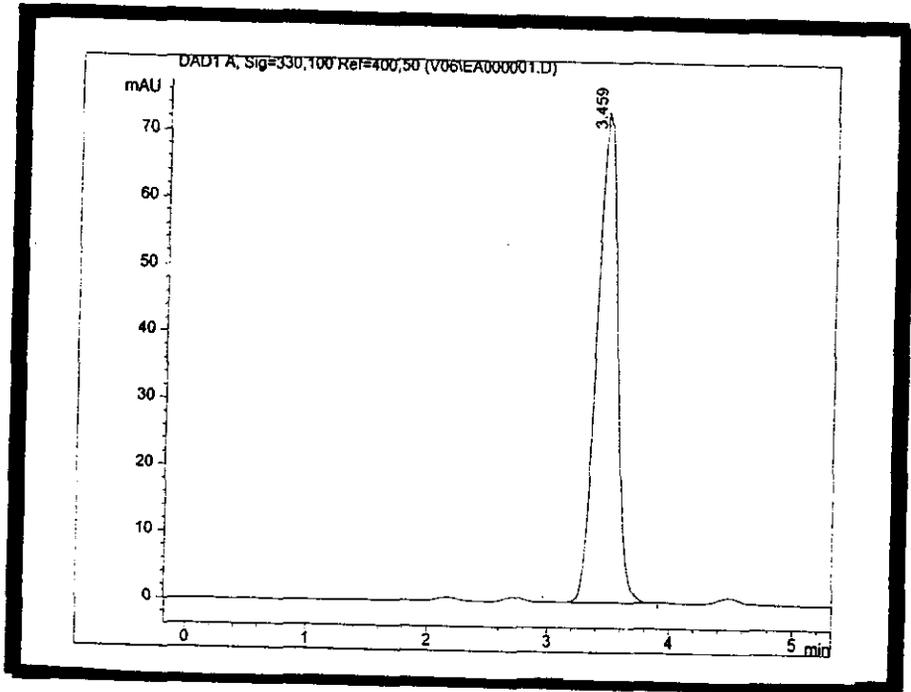


Fig 8. Cromatograma correspondiente al estándar de vitamina A, usando las condiciones IX.

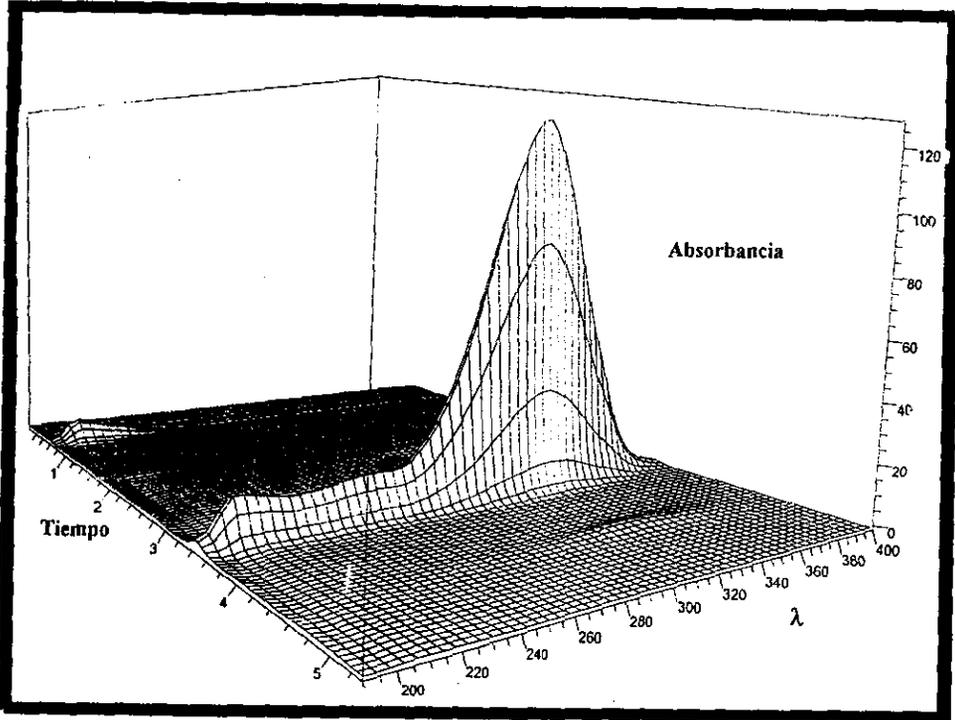


Fig 9. Topograma correspondiente al estándar de vitamina A, usando las condiciones IX, asociado a tres ejes: minutos, nanómetros y absorbancia.

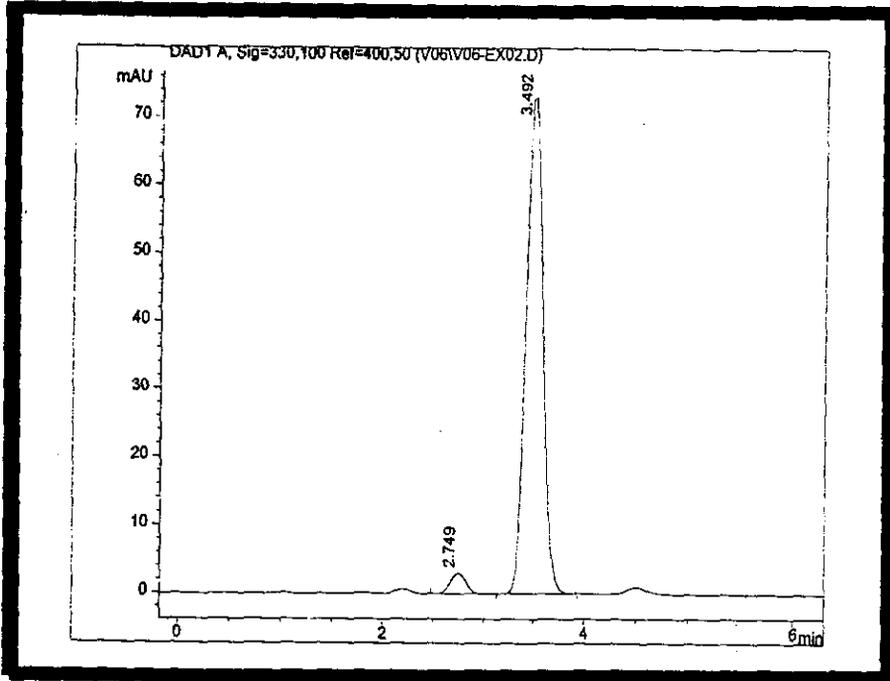


Fig 10. Cromatograma correspondiente a la muestra de vitamina A solución, usando las condiciones IX.

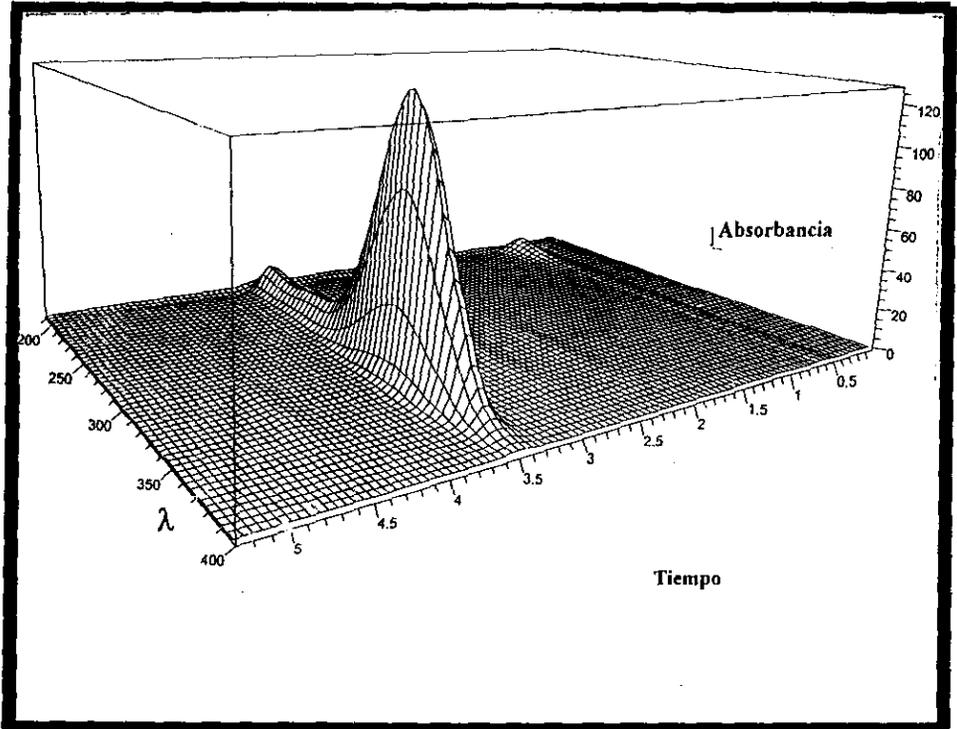


Fig 11. Topograma correspondiente a la muestra de vitamina A solución, usando las condiciones IX, asociado a tres ejes: minutos, nanómetros y absorbancia.

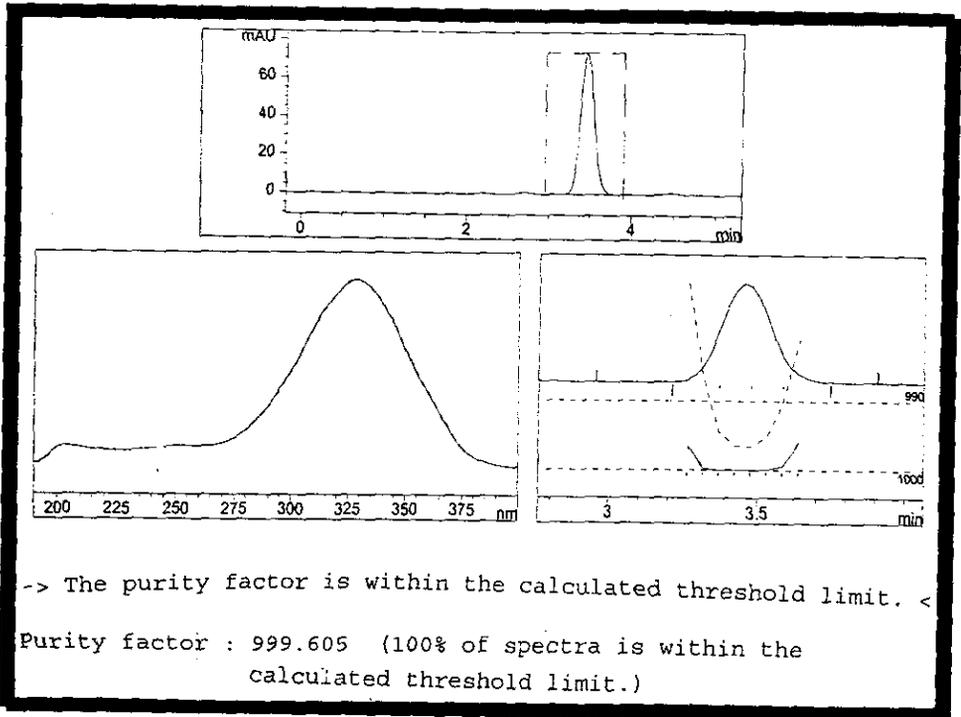


Fig 12. Análisis de pureza del pico cromatográfico correspondiente a la muestra de vitamina A solución, se usan todos los espectros y el factor de pureza de 999.605 siendo el límite de pureza de 1000.

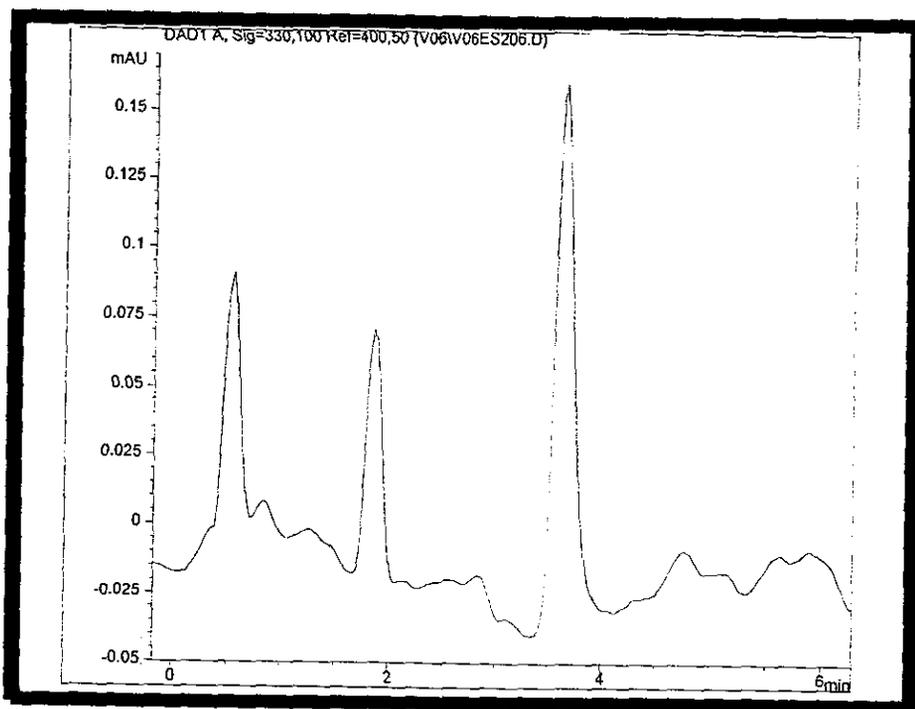


Fig 13. Cromatograma correspondiente al placebo, usando las condiciones cromatográficas establecidas, se observa una respuesta menor a 0.15mAU.

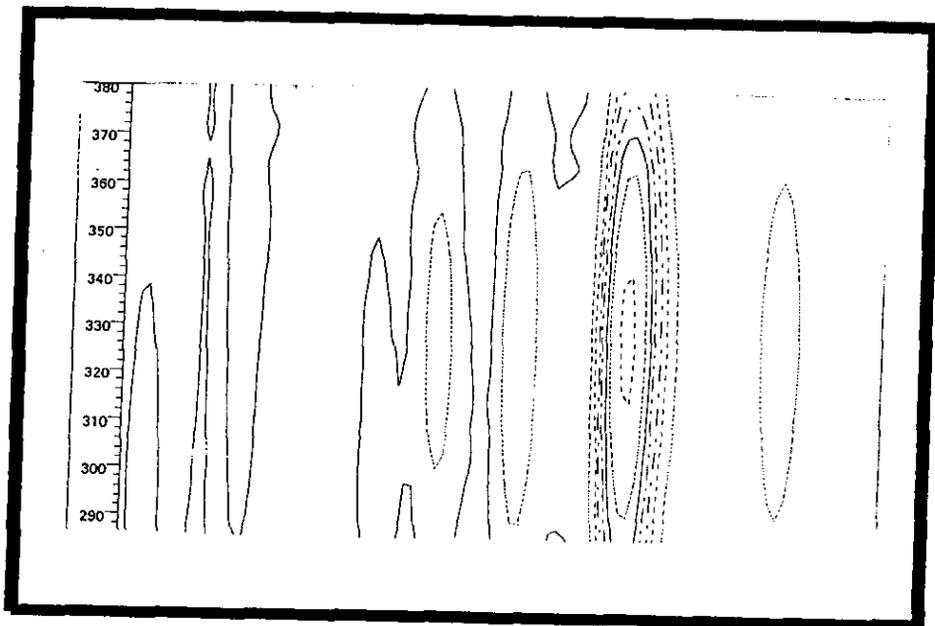


Fig 14. Diagrama de Isoabsorbancia, donde se muestra que la mayor absorbancia corresponde a una longitud de onda de 320 -340 (rango del máximo de vitamina A).

ANEXO 2

PROYECTO DE
LEY
N.º 10.000 DE
1997
DE
COLUMNAS
CROMATOGRAFICAS

PROCEDIMIENTO DE CALIFICACIÓN DE COLUMNAS.

I. OBJETIVO:

- 1.1 Asegurar la eficiencia de las columnas , utilizadas en cromatografía líquida de alta resolución, para el análisis de productos farmacéuticos y materias primas empleadas en la elaboración de medicamentos

II. ALCANCE

- 2.1 Este procedimiento se aplica a todas las columnas nuevas que sean adquiridas por este laboratorio, para que puedan ser utilizadas.
- 2.2 Debe seguir este procedimiento todo analista que utilice una columna nueva.

III. RESPONSABILIDADES

- 3.1 Será responsabilidad de la Gerencia de Control de Calidad, tener conocimiento de este procedimiento, así como autorizarlo.
- 3.2 Será responsabilidad de la jefatura de control de calidad, verificar la correcta aplicación de este procedimiento.
- 3.3 Será responsabilidad del personal Químico y técnico la correcta aplicación de este procedimiento.

IV. GENERALIDADES

4.1 INTRODUCCIÓN

4.1.1 COLUMNAS.

La columna empleada para HPLC puede considerarse como el corazón del sistema cromatográfico, pues en ella tiene lugar la separación de los componentes presentes en las muestras, por consecuencia algún defecto o deterioro en la columna conducirá inevitablemente a separaciones pobres y resultados no confiables, independientemente de otros factores que pudieran afectar al análisis.

El material de relleno de la columna no es tan resistente como el acero que la rodea, por lo que su uso debe ser el más correcto y tener cuidados especiales, además de darle mantenimiento. La vida útil de una columna depende de muchos factores como pueden ser: tipo, naturaleza de la muestra, tipo de solvente, temperatura de trabajo, etc. afectando con ello el número de inyecciones probables a realizar.

Es un hecho que si una columna se emplea sólo para un tipo de muestras, tiene un mayor tiempo de vida útil que aquella que se emplea para varias muestras.

Para evaluar los defectos de cada fase móvil y tipo de muestra sobre la columna cromatográfica, con la finalidad de evaluar las metodologías y tener un historial de la columna, es necesario destinar una columna para cada tipo de muestra y llevar por lo tanto un registro de éstas.

4.2 PÉRDIDA DE LA EFICIENCIA.

La pérdida de la eficiencia de las columnas de HPLC, está dado en forma normal por el uso, esto es el número de inyecciones que se realicen, lo cual puede no constituir un problema, ya que las columnas deben descartarse luego de unas 2,000 ó 3,000 inyecciones, siendo esta una regla muy general, ya que depende muchas veces del tipo de separación efectuada, naturaleza de la muestra, limpieza de la columna, tipo de fase móvil empleada, mantenimiento que en general se le da a la columna. Cuando la pérdida de la eficiencia es notoria hay que determinar en que condiciones de la columna se está trabajando. Para poder evaluar dichas condiciones es necesario aplicar un método de calificación de columnas, en el cual se determinen los parámetros condicionantes de la eficiencia, tales como:

- * Factor de capacidad (K')
- * Factor de separación ()
- * Resolución (R_s)
- * Número de platos teóricos (N)
- * Asimetría (A_s)

4.3 DEFINICIONES

4.3.1. Factor de capacidad (K)

Es el cociente entre el número de moles de soluto en la fase estacionaria y el número de moles del soluto en la fase móvil y estará relacionado con el coeficiente de distribución entre ambas fases.

$$K = \frac{\text{No. de moles del soluto en la fase estacionaria}}{\text{No. de moles del soluto en la fase móvil}}$$

Puede demostrarse que K es proporcional al tiempo de retención del soluto y se calcula para el pico enésimo como:

$$K = \frac{(T_n - T_o)}{T_o}$$

Donde: T_n = Tiempo de retención del enésimo pico.

T_o = Tiempo de la primera respuesta evidente del cromatograma.

4.3.2. Factor de separación (α),

Es el cociente entre los factores de capacidad de un par de picos, si no existe separación, es igual a la unidad y su valor aumenta cuando aumenta la separación se calcula como:

$$\alpha = (K'2/K'1)$$

4.3.3 Resolución (R_s).

Es la expresión cuantitativa de la calidad de la separación, esta expresión se calcula para un par de picos adyacentes como:

$$R = \frac{(T_2 - T_1)}{1/2 (W_2 + W_1)}$$

Donde :

T_1 y T_2 son los tiempos de retención de los picos 1 y 2

W_1 y W_2 son los anchos de los picos medidos desde su base.

4.3.4 Platos teóricos (N)

El concepto de plato teórico fue desarrollado en 1941 por Martin y Syngle, para la cromatografía de partición líquido - líquido, para explicar el fenómeno separativo, compararon el método con un proceso de distribución en contracorriente, donde la extracción de las fases se repite varias veces en forma encadenada. Sin embargo la diferencia fundamental reside en que en la cromatografía el proceso es continuo, pero la columna podía dividirse en cortes o rodajas imaginarias donde se conseguía un equilibrio transitorio, antes que la fase móvil avance hacia el siguiente, cada corte se llama plato y su espesor es la altura equivalente del plato teórico.

La eficiencia de una columna cromatográfica y por tanto su poder separativo se mide en función de su número de platos teóricos y puede calcularse en función del ancho del pico, de la siguiente manera:

$$N = 16 (T_n / W_{TAN})^2$$

Donde:

T_n = Tiempo de retención del pico enésimo

W_{TAN} = Ancho del pico medido sobre la línea base.

4.3.5 Asimetría de picos (A_s).

La Asimetría (Tailing) es una de las formas más comunes de alejamiento de la curva Gaussiana y su medición es importante puesto que puede llevar, de acuerdo a su magnitud, a errores considerables de cuantificación e incluso ocultar picos adyacentes.

Si bien no existe un criterio único para el cálculo de asimetría, las fórmulas empleadas con mayor frecuencia son:

$$As (10\%) = b/a$$

$$As (5\%) = b'/a'$$

Donde a, b, son las medidas entre la línea que une al máximo del pico con la línea base y los extremos anterior y posterior del pico, tomados al 10% de su altura y b' y a' son los mismos parámetros al 5% de la altura.

V. EQUIPO

- 5.1 Cromatografo de líquidos de alta resolución (Automático)
 - Bomba cuaternaria G1311A, Serie: US53600781.
 - Columna con termostato (ColComp) G1316A, sERIE-US54001027
 - Detector con arreglo de diodos G1315A, Serie - DE61801174
 - Automuestreador (ALS) G1313A, Serie- DE54901581
 - Bomba desgasificadora (Degasser) G1322A, Serie - JP63202175
 - Procesador Pentium Ultra VGA 128 Hewlett Packard

- 5.2 Balanza analítica Toledo

- 5.3 Equipo de filtración Millipore

VI. MATERIAL

- 6.1 Material de vidrio utilizado comúnmente.
- 6.2 Membranas Millipore 0.45 micras
- 6.3 Viales con tapón

VII. REACTIVOS

- 7.1 Metil y propil parabeno (estándar secundario)
- 7.2 Agua desionizada grado HPLC o equivalente
- 7.3 Metanol grado HPLC.

VIII. PROCEDIMIENTO

8.1 Condiciones cromatográficas

Columna: Fase reversa (a evaluar)
Fase móvil: Metanol: Agua (50:50)
Vel. Flujo: 1.0 ml/min.
Inyección: 20 µl
Detector: Detector con arreglo de diodos (UV/V) a 254 nm

8.2 Medio de dilución:

En un recipiente adecuado colocar 500 ml de agua desionizada (HPLC), adicionar 500 ml de metanol (HPLC) y mezclar para obtener una proporción 50:50.

8.3 Fase móvil: Metanol : Agua (50:50)

8.3.1 Filtrar 1000 ml de agua desionizada, utilizando un equipo de filtración Millipore, mediante una membrana HA, Millipore de 0.45 micras y colocarlo en un reservorio, identificar correctamente.

8.3.2 Filtrar 1000 ml de metanol grado HPLC, utilizando un equipo de filtración Millipore, mediante una membrana HV, Millipore de 0.45 micras, y colocarlo en un reservorio, identificar correctamente.

8.3.3 Filtrar 1000 ml de Acetonitrilo grado HPLC, utilizando un equipo de filtración Millipore, mediante una membrana HV, Millipore de 0.45 micras, y colocarlo en un reservorio, identificar correctamente.

8.4 Preparación de un estándar de referencia.

Pesar aproximadamente 20 mg de propilparabeno y 20 mg de metilparabeno y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar 50 ml del medio de dilución y agitar por un período de 10 minutos, aforar con medio de dilución, transferir una alícuota de 5 ml de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100 ml, aforar con medio de dilución y mezclar.

8.5 Preparación del equipo .

Depurar las tuberías, haciendo pasar por ellas:

- 1.- 100% de agua
- 2.- 100% de Metanol
- 3.- 100% de Acetonitrilo

Repetir el paso 3, 2, 1, en este orden.

8.6 Preparación de la columna.

Si se trata de una columna nueva debe hacerse pasar 100% de acetonitrilo durante 30 minutos, posteriormente hacer pasar la fase móvil metanol: agua (50:50), hasta obtener una línea base estable.

Si se trata de una columna en uso, se realiza el método de lavado correspondiente, y posteriormente se hace pasar la fase móvil hasta obtener una línea base estable.

Procedimiento:

- 8.7.1 Inyectar por triplicado 20 µl de la solución patrón hasta que el C.V. entre cada una de las respuestas por cada inyección, no sea mayor a 1.0%.

8.7.2 Determinar los parámetros de evaluación de la columna.

- * Factor de capacidad
- * Factor de separación
- * Resolución
- * Número de platos teóricos
- * Altura equivalente de un plato teórico
- * Asimetría de picos

IX. CÁLCULOS

9.1 **Factor de capacidad.**

Expresión matemática:
$$K = \frac{(T_n - T_0)}{T_0}$$
 Donde:

T_n = Tiempo de retención del enésimo pico

T_0 = Tiempo al cual se manifiesta la primera respuesta evidente en el cromatograma.

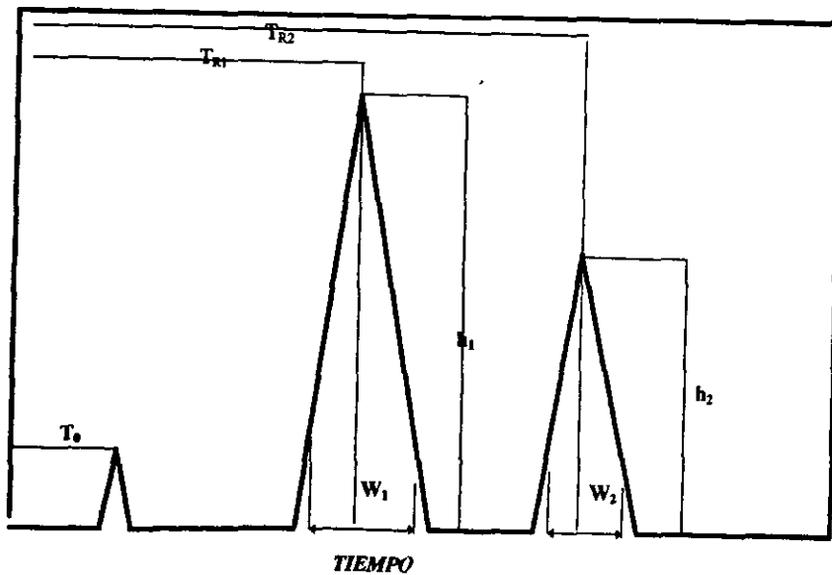
Calcular el factor de capacidad de la ecuación matemática anterior para cada pico.

Ejemplo:

$$\text{Pico N1 : } K = \frac{(T1 - T0)}{T0}$$

$$\text{Pico N2 : } K = \frac{(T2 - T0)}{T0}$$

METILPARABENO - PROPILPARABENO



Criterio de aceptación.

Para pocos componentes	Para varios componentes
2 - 10	0.5 - 20

9.2 factor de separación (α)

Expresión matemática: $\alpha = \frac{K'2}{K'1}$

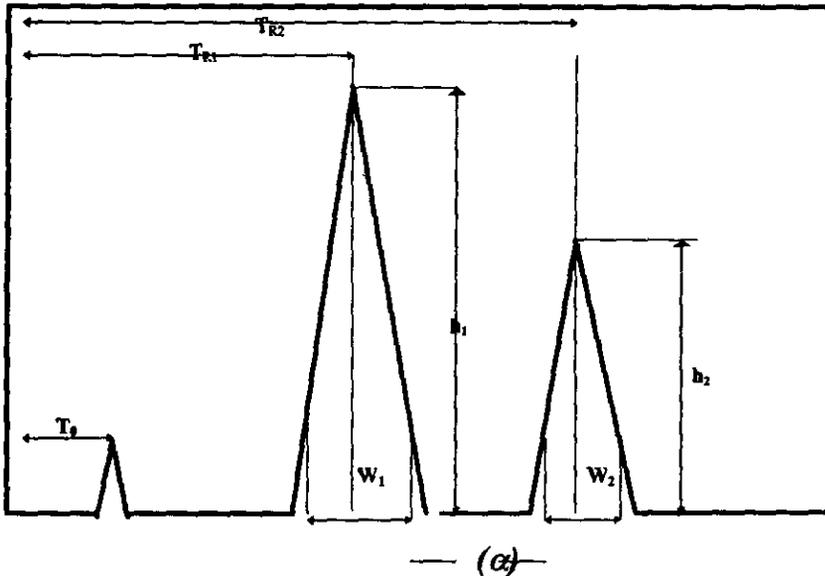
Donde:

$K'1$ = factor de capacidad del pico 1

$K'2$ = factor de capacidad del pico 2

$$K' = \frac{(T_n - T_o)}{T_o}$$

METILPARABENO - PROPILPARABENO



Criterio de aceptación

Cuando existe un factor de capacidad aceptable, el factor de separación (α) será por lo tanto aceptable, si no existiera separación (α) es igual a la unidad y su valor aumenta cuando aumenta la separación. Por lo tanto α debe ser mayor a 1.

9.3 RESOLUCION

Expresión matemática:
$$R = \frac{(T_2 - T_1)}{1/2 (W_2 + W_1)}$$
 Donde:

T_1 = Tiempo de retención del pico 1

W_1 = Ancho del pico 1 medido desde su base

T_2 = Tiempo de retención del pico 2

W_2 = Ancho del pico 2 medido desde su base

Para el cálculo de W, trazar una tangente, en los extremos anterior y posterior del pico, desde su máximo hasta la línea base del cromatograma.

Criterio de aceptación:

Muestra control	Muestra de rutina
≥ 1.5	≥ 1.5

9.4 Número de platos teóricos (N)

Expresión matemática:
$$N = 16 (T_n / W_{TAN})^2$$

Donde:

T_n = Tiempo de retención del pico enésimo

W_{TAN} = Ancho del pico medido sobre la línea base.

Determinar el valor cuantitativo de W_{tan} con ayuda de una regla milimétrica, midiendo el ancho del pico desde su base.

Criterio de aceptación:

Columna nueva	Columna en uso
De acuerdo a lo indicado por el proveedor.	50% de lo indicado por el proveedor

9.5 Altura equivalente a un plato teórico

Expresión matemática: $H = L/N$ Donde:

H = Altura equivalente a un plato teórico

L = Longitud de la columna en micrómetros

N = Número de platos teóricos

9.5.1 Altura reducida del plato:

$$h = H/T_p$$

Donde: H = Altura equivalente a un plato teórico

L = Longitud de la columna en micrómetros

N = Número de platos teóricos

Criterio de aceptación:

Altura del plato reducida	Criterio
$\leq 3 dp$	Columna buena
$4dp \leq h \leq 5dp$	Acceptable
$\geq 6 dp$	Columna muy deteriorada

9.6 Asimetría de picos (As)

Expresión matemática: $As(5\%) = (b/a)$
 $As(10\%) = (b'/a')$

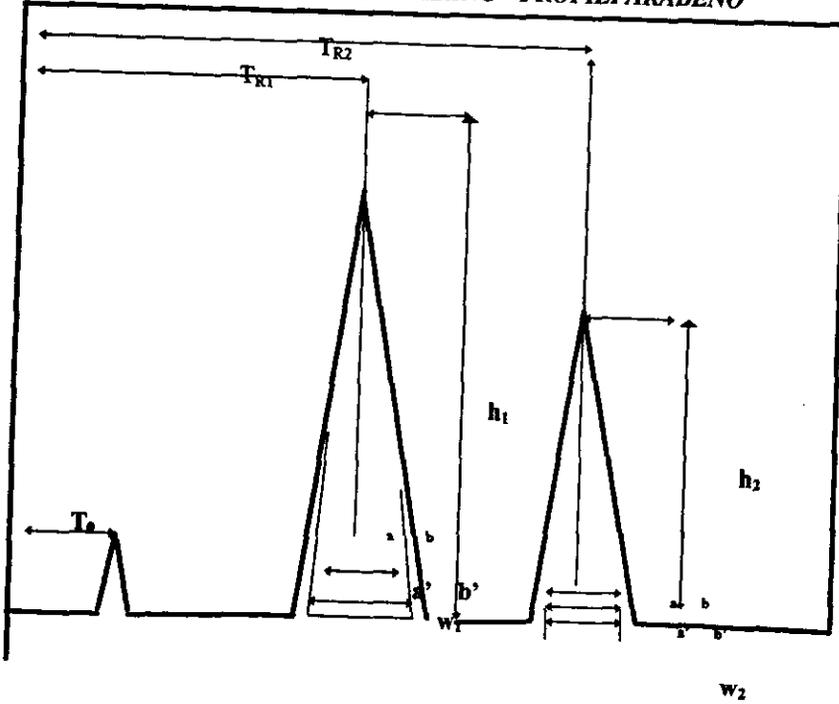
Trazar una tangente de ambos lados del pico desde el punto máximo hasta la línea base para obtener W (anchura del pico).

Tomando el punto máximo del pico enésimo, trazar con ayuda de una regla una línea recta hasta el punto que une con la línea base.

Determinar los valores de b, a del pico enésimo para 10 y 5% de h total.

Substituir los valores obtenidos en la expresión matemática para cada valor porcentual de As.)

METILPARABENO - PROPILPARABENO



Criterio de aceptación:

Muestra control	Muestra de rutina
≤ 1.5	≤ 2.0

X. EVALUACIÓN DE LOS CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

- 10.1 Ningún parámetro debe estar fuera de lo establecido.
- 10.2 Medir la eficiencia de acuerdo a lo indicado por el proveedor y descartar la columna cuando la eficiencia llegue al 50% de su valor inicial.

RESULTADOS DE LA CALIFICACIÓN DE COLUMNA

COLUMNA: SYMMETRY WATERS **PRODUCTO:** VITAMINA A,
 SOLUCIÓN
No DE SERIE: T63101L08 **TIPO:** C18, 15 cm x 3.9 mm
 5µm.

CARACTERÍSTICA	RESULTADO	ESPECIFICACIONES DEL PROVEEDOR
N	1861.67	2,000-10,000
	3820.33	
Rs	31.50	> 20
K'	1.25	> 1
	4.82	
α	4.23	> 1
As	0.92	0.8-1.2
	0.99	

CONCLUSIÓN: La columna se encuentra en condiciones óptimas para ser utilizada y obtener picos cromatográficos con las características deseadas, según la metodología que se utilice.

ANEXO 3

PROCEDIMIENTO

DE ANÁLISIS

EN CROMATOGRÁFO
DE LÍQUIDOS HP 1100

CALIFICACIÓN DEL CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS HP 1100.

I. OBJETIVO.

- 1.1 Conocer el procedimiento para calificar el equipo cromatográfico Hewlett Packard, Asterix 1100, para determinar si este necesita ser calibrado o se encuentra en condiciones adecuadas para ser utilizado.

II. ALCANCE.

- 2.1 Este procedimiento se aplica al equipo cromatográfico Hewlett Packard, Asterix 1100 situado en este laboratorio.
- 2.2 Debe seguir este procedimiento todo analista que utilice el equipo por lo menos una vez al mes o antes de iniciarse alguna validación.

III. RESPONSABILIDAD.

- 3.1 Será responsabilidad de la Gerencia de Control de Calidad, tener conocimiento de este procedimiento, así como autorizarlo.
- 3.2 Será responsabilidad de la jefatura de control de calidad, verificar la correcta aplicación de este procedimiento.
- 3.3 Será responsabilidad del personal químico y técnico la correcta aplicación de este procedimiento.

IV.GENERALIDADES.

4.1 INTRODUCCIÓN

Los equipos de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, pueden ser clasificados en integrados y modulares, en este caso el equipo cromatográfico Hewlett Packard, Asterix 1100, es de tipo modular es decir cada uno de sus componentes se encuentran separados uno de otro.

Las partes que conforman el equipo cromatográfico son:

1. Reservorios.
2. Bomba. (Mezcladora y degasificadora
3. Inyector.
4. Detector.

El reservorio es el recipiente que contiene la fase móvil, generalmente son frascos de vidrio o polímero resistentes que no interactue con la fase móvil y bien cerrado para prevenir la introducción de partículas ambientales al sistema.

Las bombas en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución tiene la función de impulsar la fase móvil proveniente del reservorio hacia el inyector y de ahí hacia la columna, están constituidas en forma general de acero inoxidable, zafiro, rubí y teflón evitando con esto alguna interacción de la fase móvil con la bomba.

El inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal de solvente a través del sistema, este debe ser fácil de operar, inerte a la muestra o fase móvil, preciso en cuanto a la cantidad de muestra que se introduce al sistema, no debe provocar diluciones importantes de la muestra inyectada.

El detector es la parte del equipo que permite "ver" y "ubicar" en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica, hay de varios tipos, pueden ser generales o receptivos, los detectores deben tener ciertas características como son :

1. Amplio rango de respuesta.
2. Poseer una respuesta lineal.
3. No contribuir al ensanchamiento de banda extracolumnar.
4. Responder a todo los componentes.
5. Ser sensible.
6. No afectarse por cambios en la temperatura.
7. Poseer una buena relación respuesta/ruido.
8. No destruir la muestra.

V. EQUIPO.

5.1 Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Automático).

Bomba cuaternaria G1311A. Serie: US53600781.

Columna con termostato (ColComp) G1316A. Serie-US54001027.

Detector con arreglo de diodos G1315A. Serie-DE61801174.

Automuestreador (ALS) G1313A. Serie-DE54901581.

Bomba desgasificadora (Degasser) G1322A. Serie-JP63202175.

Procesador Pentium Ultra VGA 128 Hewlett Packard.

5.2 Balanza analítica Toledo

5.3 Equipo de filtración millipore

VI. MATERIAL

6.1 Material de vidrio utilizado comúnmente.

6.2 Membranas millipore 0.45 micras.

6.3 Viales con tapón.

6.4 Probeta de 10 ml.

VII. REACTIVOS.

7.1 Metilparabeno (estándar secundario).

7.2 Agua desionizada grado cromatográfico o equivalente.

7.3 Metanol, grado cromatográfico

NOTA: Puede utilizarse cualquier otro estándar, empleando la metodología cromatográfica correspondiente.

VIII. PROCEDIMIENTO.

8.1 **Condiciones cromatográficas.**

Columna: Fase inversa (según la metodología a utilizar, por ejemplo: si se utiliza estándar de Albendazol, emplear columnas asignada para albendazol).

Fase móvil: Metanol : Agua (50 : 50) o la correspondiente al método a utilizar.

Vel. De Flujo: 1.0 ml/min. ó el correspondiente detector.

Inyección: 20 µl ó el correspondiente.

Detector: Detector con arreglo de diodos (UV/ Vis).

Long. de onda: 254 nm o la correspondiente.

8.2 Fase móvil:

Preparar según el método a utilizar.

8.2.1. Filtrar 1000 ml de agua desionizada, utilizando un equipo de filtración millipore, mediante una membrana HA, millipore de 0.45 micras y colocarlo en un reservorio, identificar correctamente.

8.2.2. Filtrar 1000 ml de Metanol grado cromatográfico, utilizando un equipo de filtración millipore mediante una membrana HV, millipore de 0.45 micras, y colocarlo en un reservorio, identificar correctamente.

8.2.3. Filtrar 1000 ml de Acetonitrilo grado cromatográfico, utilizando un equipo de filtración millipore, mediante una membrana HV millipore de 0.45 micras, y colocarlo en un reservorio, identificar correctamente.

8.3 Preparación de un estándar de referencia.

Preparar según el método a utilizar.

8.4 Preparación del equipo.

Depurar las tuberías, haciendo pasar por ellas:

1.-100 % de agua

2.-100 % de Metanol.

3. - 100 % de Acetonitrilo.

Repetir el paso 3, 2, 1 en este orden.

8.5 Preparación de la columna.

Si se trata de una columna nueva debe hacerse pasar 100 % de acetonitrilo durante 30 min, posteriormente hacer pasar la fase móvil, hasta obtener una línea base estable.

Si se trata de una columna en uso, se realiza el método del lavado correspondiente y posteriormente se hace pasar la fase móvil hasta obtener una línea base estable.

8.6 Procedimiento.

EVALUACIÓN DE LA BOMBA

Respuesta a medir: Volumen de fase móvil liberada.

Presión registrada.

1.- Realizar 6 mediciones repetidas del solvente liberado en los siguientes niveles de flujo y registrar en una tabla como la siguiente:

MEDICIÓN	1 ml / min	1.5 ml / min	2 ml / min
1			
2			
3			
4			
5			
6			

2.- Calcular media, desviación estándar y coeficiente de variación.

Especificación C.V. < 1 %.

EVALUACIÓN DEL INYECTOR.

Respuesta a medir : Volumen inyectado.

1.- Preparar una solución de concentración conocida de un estándar de pureza conocida e inyectar por triplicado 5 diferentes volúmenes de dicha muestra, registrar la respuesta del detector en una tabla y correlacionarla con el volumen inyectado de la siguiente forma:

VOL INYECTADO	RESPUESTA 1	RESPUESTA 2	RESPUESTA 3
10			
20			
30			
40			
50			

2.- Calcular la ordenada al origen (b), pendiente (m), coeficiente de determinación (r^2) y coeficiente de correlación (r), mediante un análisis de regresión lineal.

Especificación: $b \approx 0$ $m \approx 1$ $r \approx 0.99$ $r^2 \approx 0.98$

EVALUACIÓN DEL DETECTOR.

Respuesta a medir: Picos obtenidos.

- 1.- Preparar 5 soluciones de concentraciones conocidas de un estándar incluyendo la del 100 % de dicho método, inyectar por triplicado cada concentración.
- 2.- Realizar las determinaciones de absorbancia de las mismas muestra (las 5 concentraciones por triplicado) en el Espectrofotómetro Hewlett Packard 8453, previamente calibrado y la misma longitud de onda.
- 3.- Registrar las respuestas de cada determinación en una tabla como la siguiente:

CONCENTRACIÓN	RESPUESTA 1		RESPUESTA 2		RESPUESTA 3	
	AREA	ABS	AREA	ABS	AREA	ABS
60 %						
80 %						
100 %						
120 %						
140 %						

- 4.- Determinar la equivalencia entre el detector del H.P..L.C. y en el de otro instrumento comparando las linealidades de ambas curvas, para ello realizar un análisis de regresión de Concentración vs Área y Concentración vs Absorbancia.
- 5.- Evaluar m, b, r y r^2 para cada curva y evaluar la paralelidad.

X. EVALUACIÓN DE LOS CRITERIOS DE ACEPTACIÓN.

10.1 Ningún parámetro debe estar fuera de lo establecido, de no ser así el equipo debe ser calibrado.

XI. REFERENCIAS.

- 1.- Introducción al H.P.L.C. Aplicación práctica. Merck. Pag. 42-51, 361-370.
- 2.- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 6ª. Edición. 1994. Pag. 110 - 113.

RESULTADO DE CALIFICACIÓN DE H.P.L.C.

EVALUACIÓN DEL INYECTOR

VOL INYECTADO (ml)	AREA
5	235,83
5	236,95
5	236,85
10	473,93
10	475,34
10	477,07
15	718,81
15	724,97
15	723,82
20	965,45
20	964,85
20	960,66
25	1193,81
25	1196,14
25	1192,64

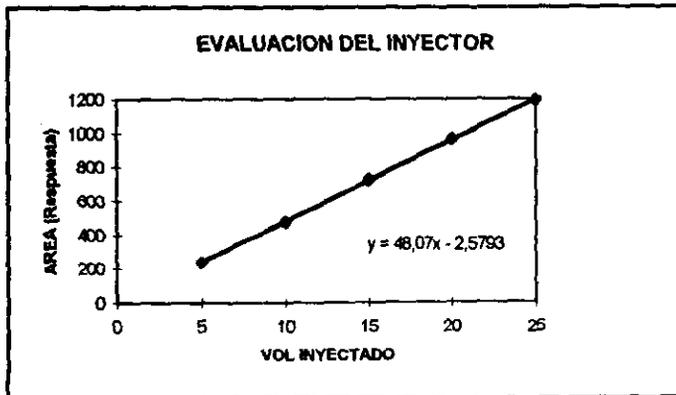
ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL

$$m = 48.0703708$$

$$b = -2.58107266$$

$$r^2 = 0.99846020$$

$$r = 0.999923008$$



EVALUACIÓN DEL DETECTOR

CONC(mcg/ml)	AREA
10	379,58
10	380,28
10	379,66
15	565,96
15	567,38
15	567,25
20	757,87
20	758,09
20	758,11
25	955,88
25	956,66
25	954,98
30	1128,47
30	1127,56
30	1130,08

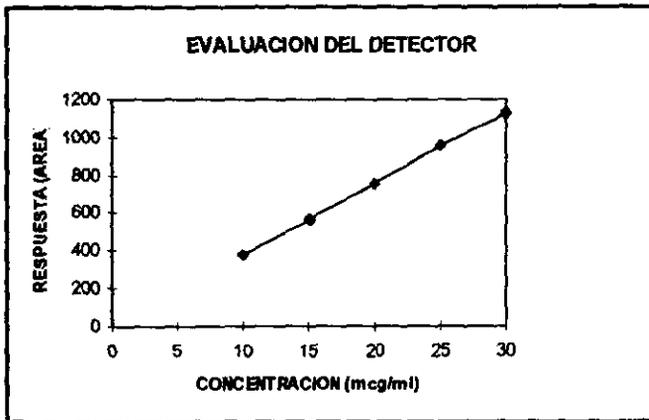
ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL

$$m = 37.7336624$$

$$b = 3.16878466$$

$$r^2 = 0.99961579$$

$$r = 0.999807878$$



EVALUACIÓN DEL DETECTOR

CONC(mcg/ml)	ABSORBANCIA
10	1,008
10	1,0072
10	1,0075
15	1,5032
15	1,5068
15	1,4976
20	2,0493
20	1,9856
20	1,9946
25	2,509
25	2,535
25	2,5037
30	*
30	*
30	*

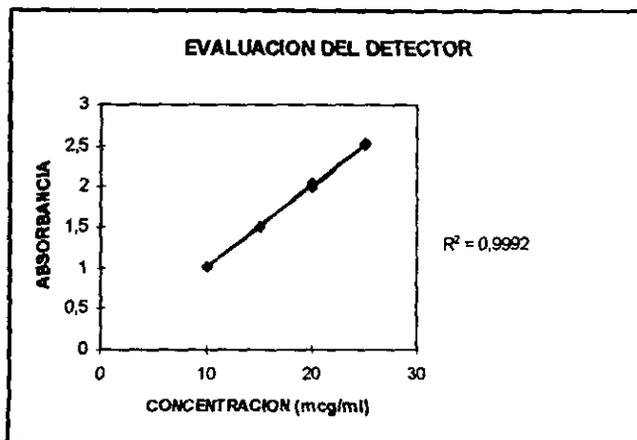
ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL

$$m = 0.100646$$

$$b = -0.002346$$

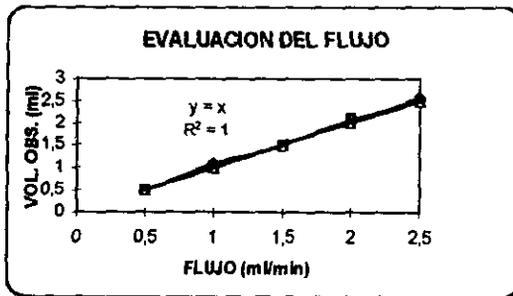
$$r^2 = 0.9991841$$

$$r = 0.99959200$$



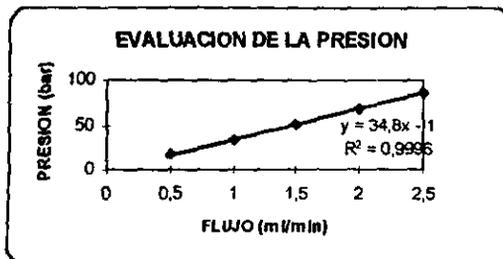
EVALUACIÓN DEL FLUJO

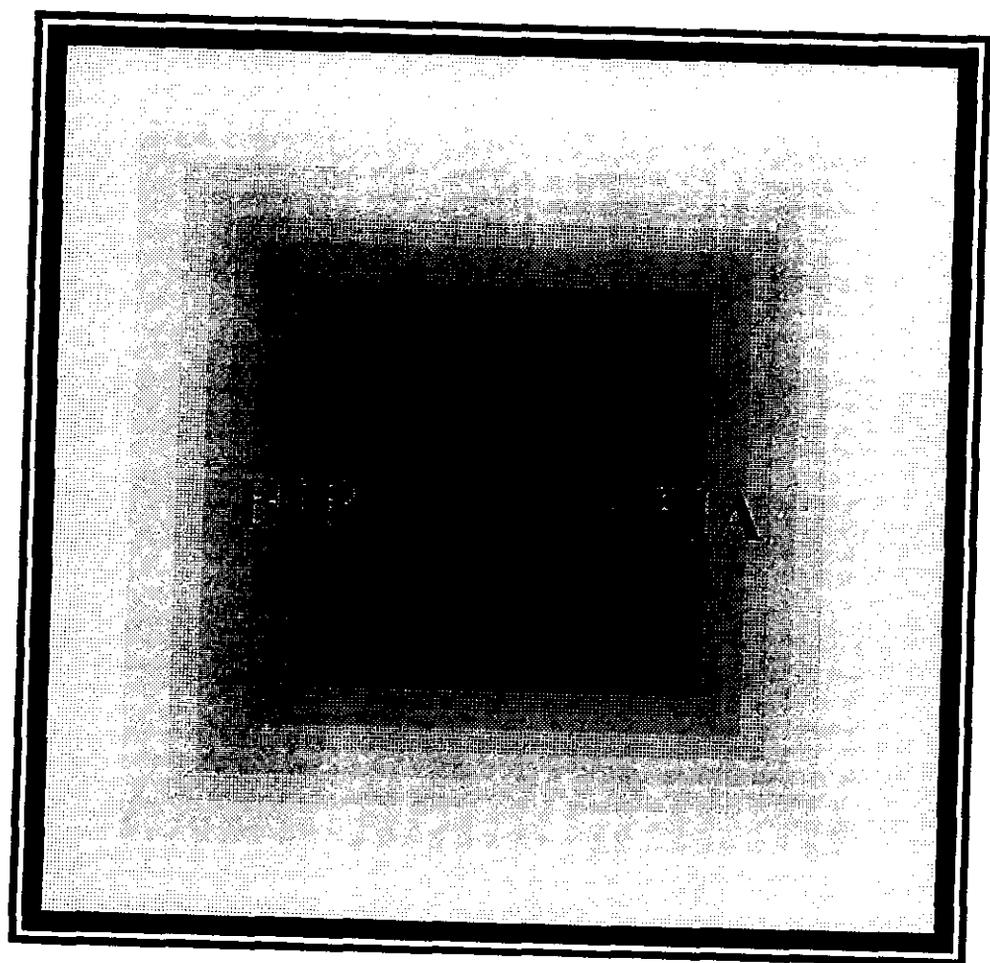
FLUJO (ml / min.)	VOLUMEN OBSERVADO ml		
0,5	0,5	0,5	0,5
1	1,1	1	1
1,5	1,5	1,5	1,5
2	2	2,1	2
2,5	2,6	2,5	2,5



EVALUACIÓN DE LA PRESIÓN

FLUJO (ml/min)	PRESIÓN bar
0,5	17
1	33
1,5	51
2	69
2,5	86





X. BIBLIOGRAFÍA

1. Remington, Farmacología. Vol II . 17ª Ed. Editorial panamericana Argentina. 1990 pp. 1005 - 1012.
2. Spratto, George. Manual de Farmacología. Editorial Limusa. México 1986. pp. 721- 725.
3. Good laboratoty Practice and Current, Good Manufacturing Practice. For HPLC, GC, MS, CE, and UV-Vis Spectroscopy. Hewlett Packard. Company. (1994).pp.36,52-58.
4. Pérez Torromé, Aurora . Fundamentos de Nutrición . 4ª Ed. Editorial Acribia. México pp. 153-160.
5. Smith GH; Andrews, GR; Ballinger PJ y et al . Determination of vitamina A in animal feedingstuffs by high performance liquid cromatography. *ANALYST*. Vol 110. Agosto. (1985) p. 1019-1026.
6. "Comite de Validación de Métodos Analíticos" (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A.C.),1993 pp. 1-73.
7. Wesley G., Clark; Johnson R., Alice. Farmacología Clínica GOTH. Editorial Panamericana. 12ª Edición. México D.F. 1990. pp. 487-493.
8. Katedry Tech, Z. Estimation of vitamin A stability in prescription ointments. *JOURNAL PHARMACY* Vol 48. Septiembre - Octubre. (1992)p. 605-608.
9. Ball, GFM, Elsevier. Fat Soluble Vitamin Assays in Food Analysis. División Services Scientific. New York 1990. pp. 2-24.

10. Weitzel H., Marlene. Curso de Enfermería Moderna. Editorial Harla 7 de México 1988 p. 609-611.
11. Soberón Mobarak E. Memorias del curso de : Cromatografía de Líquidos de alta resolución. Impartido por IMCAQUIF (Instituto Mexicano de capacitación de la Industria Farmacéutica y Químico Farmacéutica) en IMCAQUIF. CANIFARMA México. Septiembre 1998.
12. USP XXIII The National Formulary XVIII (1995). pp. 1630 - 1631, 1982 - 1982
13. Lewis Wolff, Luverne; Timby Kuhn, Barbara. Fundamentos de Enfermería. Ed Harla. México, D.F. 1992 pp. 144-147.
14. Litter, Manuel. Farmacología Experimental y clínica. Editorial El Ateneo. 6ª Edición. Buenos Aires. 1992. p.p. 1088-1091.
15. Cartensen J. Estability Patterns of Vitamin A in various Pharmaceutical dosage forms. *JOURNAL PHARMACY*, Vol 53 , No 7, July 1984 . pp. 24-27.
16. C.N. Ong y B.L. Lee. High-performance liquid Chromatographic metod for routine determination of vitamins A and E and β -carotene in plasma. *LIQUID CROMATOGRAPHY*. Biomedical Application. Vol 581 (1992) pp. 41-47.
17. C. Timothy and E. Ong David. Vitamin A metabolism in the Human Intestinal CaCo-2 Cell Line. *BIOCHEMISTRY*. Vol 29 (1990) pp. 11116 - 11123.
18. Litter, Manuel. Compendio de Farmacología. 4ª Ed. Editorial El Ateneo. Argentina. 1988. pp. 1020 -1024.

19. García Valdecasas, Francisco; Salva, José Antonio. Farmacología. Editorial Expans. 7ª Edición. Barcelona España. 1990. pp. 297-301.
20. A. Seija y Markku T. Parviainen. Determination of retinyl palmitate and total vitamin A content in liver and liver - based ready-to-eat-foods. LIQUID CROMATOGRAPHY. Biomedical Application. Vol 577 (1992) pp. 163 - 166.
21. Martindale. The Extrapharmacopeia. 30 Ed. Edited by James Reynolds. London. 1993. p.p. 1051 -1052.
22. Wayne W., Daniel. Bioestadística. Editorial Limusa. 3ª Ed. México D.F. 1992. pp. 188-198, 283-312, 383-390 y 627.
23. Rosentein Ster, Emilio. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. Ediciones PLM . 40ª Edición. México. 1994.p.p. 152, 479 y 879.
24. Quattrocchi, Alberto Oscar y Andrizzi Sara Inés. Introducción a la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución , Aplicación y Práctica. 1994. pp. 22-54, 106-264.
25. Especificaciones Internas. PCQ-040. Procedimiento General de Calificación de columnas cromatográficas IM Bruluart. Abril 1997.
25. Semenzato Secchieri , M. Stability of vitamina A palmitate in topical formulations. FARMACO. Vol 47. Noviembre. (1992) p. 1407-1417.
26. Especificaciones Internas. PCQ-049. Procedimiento General de Calificación de equipo cromatográfico. IM Bruluart. Agosto 1997.
27. Especificaciones Internas. PCQ-052. Procedimiento General de Desarrollo de métodos analíticos. IM. Bruluart. Agosto 1997.

28. Especificaciones Internas. PGMV-01. Procedimiento General de Validación de métodos analíticos. IM. Bruhuart. Abril 1997.

29. Hoffsass, Grant, H. High pressure liquid chromatographic determination of vitamin D₃ (cholecalciferol) in resins, oils, dry concentrates, and dry concentrates containing vitamina A. *JOURNAL-ASSOC-OFF-ANAL-CHEMISTRY*. Vol 59. Marzo (1986). p.251-260.

30. Bortolotti Angela y et al. Simultaneous determination of retinol, α - tocoferol and retinyl palmitate in plasma of premature newborns by reverse -phase high-performance. *LIQUID CROMATOGRAPHY*. Biomedical Application. Vol 617 (1993) pp. 313-317.

31. Alcantara Pineda; Alejandro; et al. Validación de Métodos Analíticos. material de apoyo al curso. CSEBIOFAR AP (1989) pp. 1 - 104.

32. Windholz M., Badavari S., Blumetti R., Index Merck. 12ª Edición. Merck & CO. Inc.1990. pp. 10150-10151.