



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
PROFESIONALES
"ZARAGOZA"



ESTUDIO COMPARATIVO DE METODOS ANALITICOS
PARA EVALUAR CLORHIDRATO DE RANITIDINA
EN JARABE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

NICASIO HERNANDEZ ALVARADO

MEXICO, D. F.,

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1988



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

C O N T E N I D O

1.	INTODUCCION	1
2.	FUNDAMENTACION DEL TEMA	2
2.1.	Propiedades del Clorhidrato de Ranitidina	2
2.2.	Consideraciones teóricas	5
2.2.1.	Definición de cromatografía	5
2.2.2.	Fundamentos de la cromatografía de líquidos de alta resolución	6
2.2.3.	Clasificación de los métodos cromatográficos	7
2.2.4.	Factores para evaluar la efectividad de la cromatografía de líquidos de alta resolución	13
2.2.5.	Selección de un método cromatográfico de líquidos de alta resolución	15
2.2.6.	Equipo para cromatografía de líquidos de alta resolución	17
2.2.7.	Fundamentos de la cromatografía en capa fina	20
2.2.8.	Factores que afectan la separación cromatográfica.	21
2.2.9.	Tipo de errores	22
2.2.10.	Validación	23
2.2.11.	Comparación entre métodos analíticos	32
2.2.12.	Métodos de análisis reportados	35
2.2.12.1.	Cromatografía de líquidos de alta resolución	35
2.2.12.2.	Cromatografía en capa fina	36
2.2.12.3.	Espectrofotometría	36

3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
4.	OBJETIVOS	39
5.	HIPOTESIS DE TRABAJO	40
6.	MATERIALES	41
6.1.	Reactivos	41
6.2.	Equipo	41
7.	DESARROLLO	44
7.1.	Método para determinar cuantitativamente Clorhídrido de Ranitidina en jarabe por cromatografía de líquidos de alta resolución (par iónico)	44
7.2.	Método para determinar cuantitativamente Clorhídrido de Ranitidina en jarabe por cromatografía de líquidos de alta resolución (supresión iónica)	46
7.3.	Método para determinar cuantitativamente Clorhídrido de Ranitidina en jarabe por cromatografía en capa fina- cuantificación final por espectrofotometría ..	49
7.4.	Validación del sistema (Linealidad)	52
7.4.1.	Linealidad con placebos cargados, para el método por cromatografía de líquidos de alta resolución (formación del par iónico)	53
7.4.2.	Linealidad con placebos cargados, para el método por cromatografía de líquidos de alta resolución (supresión iónica)	53
7.4.3.	Linealidad con placebos cargados, para el método por	

cromatografía en capa fina-evaluación final por espectrofotometría	54
7.5. Validación de los métodos analíticos desarrollados .	55
7.5.1. Placebos cargados para la validación del método por cromatografía de líquidos de alta resolución (formación del par iónico)	55
7.5.2. Placebos cargados para la validación del método por cromatografía de líquidos de alta resolución (supresión iónica)	56
8. RESULTADOS Y DISCUSION	57
8.1. Validación del sistema (Linearidad)	57
8.1.1. Método por cromatografía de líquidos de alta resolu- ción (método por formación del par iónico)	57
8.1.2. Método por cromatografía de líquidos de alta resolu- ción (método por supresión iónica)	57
8.1.3. Método por cromatografía en capa fina- evaluación final por espectrofotometría	59
8.2. Validación de los métodos analíticos	59
8.2.1. Método por cromatografía de líquidos de alta resolu- ción (método por formación del par iónico)	59
8.2.2. Método por cromatografía de líquidos de alta resolu- ción (método por supresión iónica)	67
8.3. Comparación entre métodos analíticos	75
8.4. Cromatografía en capa fina a las muestras degradadas	

	con peróxido de hidrógeno	80
9.	CONCLUSIONES	81
10.	PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES	82
11.	BIBLIOGRAFIA	83

1. INTRODUCCION.

Con la obtención de nuevos fármacos, la industria farmacéutica tiene la necesidad de llevar a cabo estudios, que permitan conocer lo que sucede a un fármaco al ser formulado y almacenado hasta su administración. De ahí que se tenga el interés de contar con métodos de análisis para cada necesidad (control de calidad y/o estudios de estabilidad). Por lo cual se asegura que el medicamento, tenga la efectividad terapéutica para lo cual fue creado.

El presente trabajo, involucra el desarrollo de 2 métodos por cromatografía de líquidos de alta resolución y 1 método por cromatografía en capa fina-espectrofotometría para la evaluación del Clorhidrato de Ranitidina en forma farmacéutica jarabe. Los métodos por cromatografía de líquidos de alta resolución demostraron su validez. Aunque el método por cromatografía en capa fina no demostró ser una técnica cuantitativa, es un indicador de la estabilidad del Clorhidrato de Ranitidina.

2. FUNDAMENTACION DEL TEMA.

2.1. PROPIEDADES DEL CLORHIDRATO DE RANITIDINA.

La Ranitidina es un antagonista de los receptores H_2 de la Histamina, por lo cual es utilizada para el tratamiento de la úlcera duodenal, en el manejo de las condiciones hipersecretorias tales como el síndrome de Zollinger-Ellison, en la mastocitosis sistémica siendo cuatro veces más potente que la Cimetidina.

Biodisponibilidad:

Después de una dosis oral de 150 mg, aproximadamente el 50 %.

Vida media:

De 2.5 a 3 horas⁽¹⁾.

Efectos adversos:

Dolor de cabeza, constipación, náuseas, dolor abdominal y hepatotoxicidad⁽¹⁻²⁻³⁾.

Peso molecular:

Base: 314.4 gr/mol.

Clorhidrato: 350.9 gr/mol.

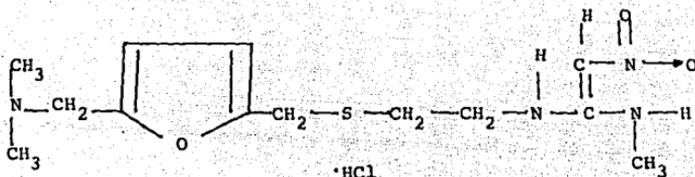
Sinónimo:

Ranitidina.

Punto de fusión:

138-139 °C.

Formula desarrollada.



Fórmula condensada:

Base: $C_{13}H_{22}O_3N_4S$.

Clorhidrato: $C_{13}H_{23}O_3SN_4$.

Descripción:

Polvo blanco o ligeramente amarillo con olor característico.

Nombre químico:

N,N dimetil-5- (2-(2 metil amino-2-nitro vinilamino))etil tioetil
furfuralamina.

Espectro de absorción al ultravioleta:

En metanol tiene dos picos característicos a 228 y 320 nm
respectivamente (4-5).

Espectro de absorción al infrarrojo:

En pastilla de bromuro de potasio presenta los principales picos
en las siguientes regiones.

A: 1554 y 1382 cm^{-1}

B: 1505 y 1540 cm^{-1}

C: 1260 cm^{-1}

D: 2560 y 2640 cm^{-1}

Solubilidad:

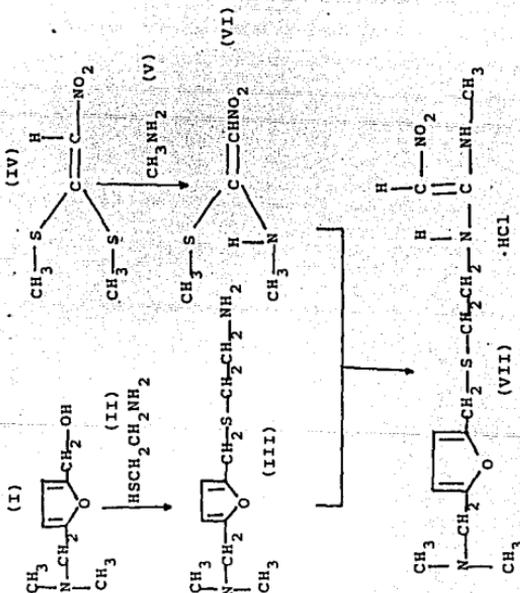
Soluble en: agua, metanol, etanol soluciones ácidas y alcalinas.

Parcialmente soluble en cloroformo, insoluble en acetato de etilo y acetona.

Constante de disociación: (4,5)

pKa= 2.19 \pm 0.04.

Ruta sintética para Clorhidrato de Ranitidina.

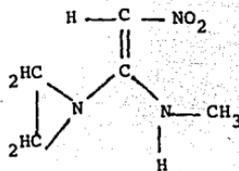
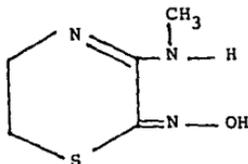


Donde:

- I = 5-dimetilaminometil-2-furanil metanol.
- II = 2-mercaptoetanolamina.
- III = 2 (((5dimetilaminometil-2-furanil)metil)tio)etenamina).
- IV = 1,1-bis (metiltio)-2-nitroetano.
- V = Metilamina.
- VI = N-metil-1-metiltio-2-nitro etenamina.
- VII = Clorhídtrato de Ranitidina.

En Ranitidina materia prima se pueden encontrar como contaminantes de síntesis, los compuestos del I a VI.

Impurezas de degradación:



2.2. CONSIDERACIONES TEORICAS.

Debido a que el presente trabajo está basado en los métodos cromatográficos para la evaluación cuantitativa del Clorhídtrato de Ranitidina en la formulación de interés, es necesario, mencionar los fundamentos de este tipo de cromatografías.

2.2.2. DEFINICION DE CROMATOGRAFIA.

Es esencialmente un método físico de separación en el cual los componentes a ser separados son distribuidos entre dos fases una de ellas es un lecho estacionario y la otra se mueve pasando a través del lecho. El proceso cromatográfico ocurre como un resultado de repetidas adsorciones-desorciones que actúan a lo largo del lecho estacionario y la separación es llevada a cabo por diferencias en los coeficientes de distribución de los componentes individuales de la muestra (6).

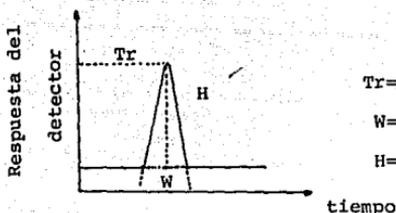
FASE ESTACIONARIA.

Se usa como término general para denotar una de las diferentes formas en la cual el soporte puede ser empacado, asperjado en una capa o bien puede ser un líquido, entre sus características se encuentran el tamaño, forma, grado de recubrimiento (fases enlazadas) y porosidad de las partículas.

2.2.2. FUNDAMENTOS DE LA CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

Se fundamenta en la diferencia de equilibrio de distribución de una mezcla de componentes en fases heterogéneas, donde una de estas fases es un sistema líquido (fase móvil) que es bombeada a través del lecho estacionario (fase estacionaria), durante el trayecto las moléculas migran a una velocidad en función del equilibrio, dado por la interacción entre los componentes de la muestra y las fases, de tal manera que cada sustancia invierte un

tiempo particular en pasar a través del sistema cromatográfico al cual se le denomina tiempo de retención (T_r), al salir la sustancia es monitoreada por un detector para cuantificarla (por medio de absorción al ultravioleta, fluorescencia, índice de refracción, infrarrojo, etc) y posterior conversión en señal mecánica que es registrada en forma de pico, los cuales generalmente adquieren forma simétrica gaussiana debido a que el promedio de las moléculas de soluto mantienen un equilibrio de distribución en su trayecto a través de la columna, originando así una isoterma de distribución lineal (7).



Donde:

T_r = Tiempo de retención.

W = Amplitud del pico'

H = Altura del pico.

Figura 2.1. Representación de un pico cromatográfico característico.

El área de un pico es proporcional a la cantidad de soluto. La altura del pico corresponde a la máxima concentración y los tiempos de retención se miden en esta zona.

2.2.3. CLASIFICACION DE LOS METODOS CROMATOGRAFICOS.

A). DE ACUERDO A LA ELECCION DE LA FASE ESTACIONARIA.

1. CROMATOGRAFIA LIQUIDO-SOLIDO.

Fundamento.

Es la separación por afinidad de los materiales polares y no polares, se puede utilizar como fase estacionaria a la sílica gel para separar muestras ácidas o neutras, se emplea alumina para separar compuestos básicos (6-7-8).

2. CROMATOGRAFIA LIQUIDO-LIQUIDO.

Fundamento.

Se basa en el coeficiente de distribución de un soluto entre los líquidos inmiscibles, en el cual un líquido es la fase móvil (algunas veces llamado acarreador), el otro líquido (fase estacionaria) está disperso en un soporte inerte finamente dividido, se emplea para separar isómeros (6-7-8).

3. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION POR TAMAÑO.

Fundamento.

La columna está rellena por un material que precisa el control de tamaño de los poros, la muestra es tamizada o filtrada de acuerdo a la diferencia en los tamaños moleculares por lo cual es eluida a través de la columna (6-7-8-9).

4. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.

Fundamento.

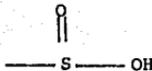
La fase estacionaria es una superficie iónica, cargada opuestamente a la muestra, este método es empleado exclusivamente con muestras iónicas o ionizables, la fase móvil es un amor-

tiguador acuoso en el cual se emplean el pH y la polaridad para controlar el tiempo de retención (10).

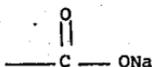
Las resinas son enlazadas o recubiertas con una fase orgánica que contiene grupos funcionales aniónicos o catiónicos.

GRUPOS FUNCIONALES

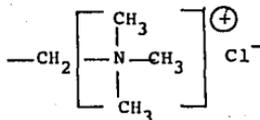
Fuerte intercambiador catiónico.



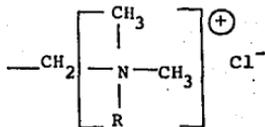
Débil intercambiador catiónico.



Fuerte intercambiador aniónico.



Débil intercambiador aniónico.



5. CROMATOGRAFIA DEL PAR IONICO.

Fundamento:

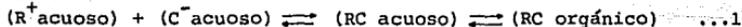
La teoría básica de las técnicas del par iónico han sido discutidas por Schill (al cual se le atribuye el desarrollo de la cromatografía por par iónico), se han postulado 2 modelos para explicar el mecanismo de separación de dos o más sustancias por medio de este método.

Primer postulado: Indica que las moléculas del soluto forman un par iónico con el ión opuesto en la fase móvil, este par iónico ahora sin carga es entonces distribuido en la fase lipofílica estacionaria.

Segundo postulado: Propone la distribución del ión opuesto en la fase estacionaria con su grupo iónico orientado hacia la superficie, la columna se "transforma" en un intercambiador iónico (7-8-11-12-13).

ECUACIONES

Un catión (C^+) puede ser distribuido en una fase estacionaria no polar como un par iónico (R^+C^-) formado por el ión opuesto (C^-).



La constante de equilibrio se expresa como:

$$K_{PI} = (RC)_{orgánico} / (R^+_{acuoso})(C^-_{acuoso}) \quad \dots 2$$

Y puede ser rearrreglada para expresar la razón de soluto en las dos fases.

$$(RC \text{ orgánico}) / (R^+ \text{ acuoso}) = K_{PI} (C^- \text{ acuoso}) \quad \dots 3$$

El tiempo de retención (Tr) de un soluto en cromatografía de líquidos de alta resolución está dado por:

$$Tr = (L/\mu) (1+k') \quad \dots 4$$

Donde: L = Longitud de la columna.

μ = Velocidad lineal del eluyente.

k' = Factor de capacidad, número de moles de soluto en la fase estacionaria dividida por el número de moles en la fase móvil.

$$o \ k' = (RC \text{ orgánica}) V_s / (R^+ \text{ acuoso}) V_m \quad \dots 5$$

donde: V_s = Volumen de fase estacionaria.

V_m = Volumen de la columna.

Sustituyendo 5 en 4 y considerando la ecuación 3.

$$Tr = (L/\mu) (1 + (V_s/V_m) (K_{PI} (C^- \text{ acuoso}))) \quad \dots 6$$

Para una columna de fases enlazadas V_s/V_m es una constante, y se puede simplificar a:

$$Tr = (L/\mu) (1+k (C^- \text{ acuoso})) \quad \dots 7$$

donde $k = K_{PI} (V_s/V_m)$.

De la ecuación 7 se puede observar que la retención puede ser controlada por la fuerza del enlace del par iónico K_{PI} y la concentración del ión opuesto.

El par iónico más soluble en la fase estacionaria hidrofóbica es el que se retiene, es decir k' es grande. La solubilidad en la fase estacionaria puede ser incrementada usando iones

opuestos más hidrofóbicos.

B). CLASIFICACION DE ACUERDO A LA FASE MOVIL.

1. CROMATOGRAFIA EN FASE NORMAL.

La fase estacionaria es fuertemente polar, es decir (silica gel) y la fase móvil es no polar (n-hexano o tetrahidrofurano). Las muestras polares son retenidas sobre la columna y se retienen menos o no los materiales no polares (ver figura 2.2.) (10).

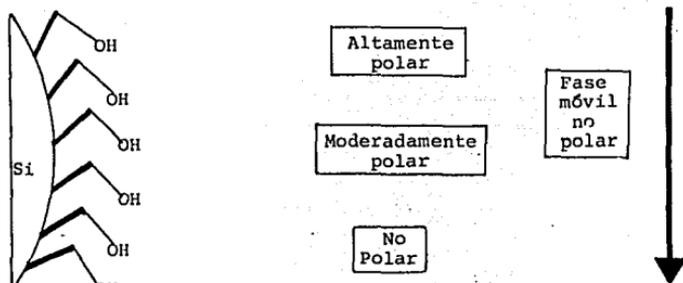


Figura 2.2. Fase estacionaria: Fase normal.

2. CROMATOGRAFIA EN FASE INVERSA.

La fase estacionaria es no polar (hidrocarburo) y la fase móvil es un líquido polar tales como el agua o algún alcohol, en este caso el material que tiene características no polares es retenido mayor tiempo (ver figura 2.3.) (10).

Y estas a su vez se dividen en:

1. Elución isocrática y

2. Elución por gradiente.

La elución isocrática es cuando la composición de la fase móvil se mantiene constante y por gradiente es cuando varía con respecto al tiempo.

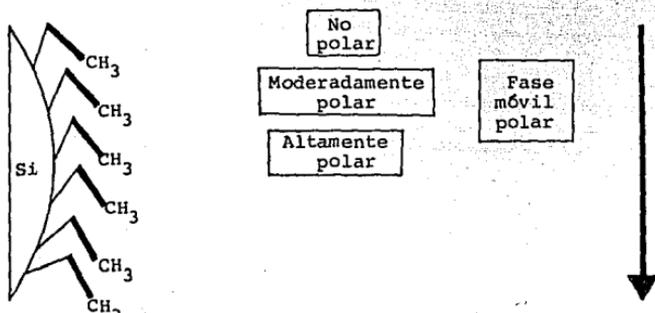


Figura 2.3. Fase estacionaria en: Fase inversa.

2.2.4. FACTORES PARA EVALUAR LA EFECTIVIDAD DE LA CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

a). Resolución: Evalua el grado de separación de dos picos cromatográficos y se expresa como:

$$R_s = \frac{Tr_2 - Tr_1}{2(W_1 + W_2)}$$

Donde: Tr_1 y Tr_2 son los tiempos de retención de los solutos 1 y 2 respectivamente.

W_1 y W_2 es la amplitud de los picos 1 y 2 respectivamente.

(ver figura 2.4) (7'8'10'14'15).

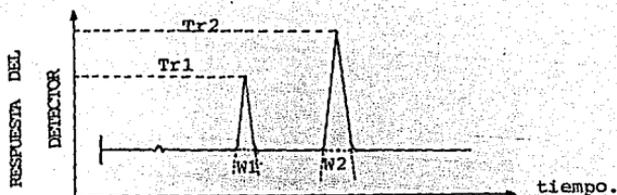


Figura 2.4. Resolución entre dos picos cromatográficos.

- b). Selectividad: se define por la siguiente ecuación.

$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) (\text{NEPT})^{1/2}$$

Donde: α = la selectividad del sistema determinado por la separación relativa de los componentes, dadas por el coeficiente de distribución de los solutos (k) el cual es de la siguiente manera: $\alpha = k_2/k_1$.

- c). Número efectivo de platos teóricos que indica la eficiencia de una columna cromatográfica expresada como:

$$N = 16 \left(\frac{Tr}{W} \right)^2 \quad \text{y} \quad \text{NEPT} = \left(\frac{K'}{1+K'} \right)^2 N$$

- d). Factor de capacidad (k'): Indica la afinidad de los componentes en la fase móvil y la fase estacionaria expresado como:

$k' = \frac{\text{moles de soluto en la fase estacionaria.}}{\text{moles de soluto en la fase móvil.}}$

Por lo cual, cuando α es pequeño, se deben tener valores altos de NEPT para obtener separaciones óptimas (7, 8, 10, 14, 15).

2.2.5. SELECCION DE UN METODO CROMATOGRAFICO DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

Al desarrollar un método por cromatografía de líquidos de alta resolución debemos tener en cuenta a los siguientes parametros:

1. Peso molecular de la sustancia que se desea separar.
2. Fase móvil.
3. Solubilidad de la muestra.
4. Columna cromatográfica.
5. Estabilidad de la columna, muestra y fase móvil.
6. Interferencias por excipientes o posibles productos de degradación.

De tal forma que se conjuguen una serie de factores para que se logre una separación deseada. En la figura 2.5 se resumen los pasos fundamentales para la selección de un método analítico.

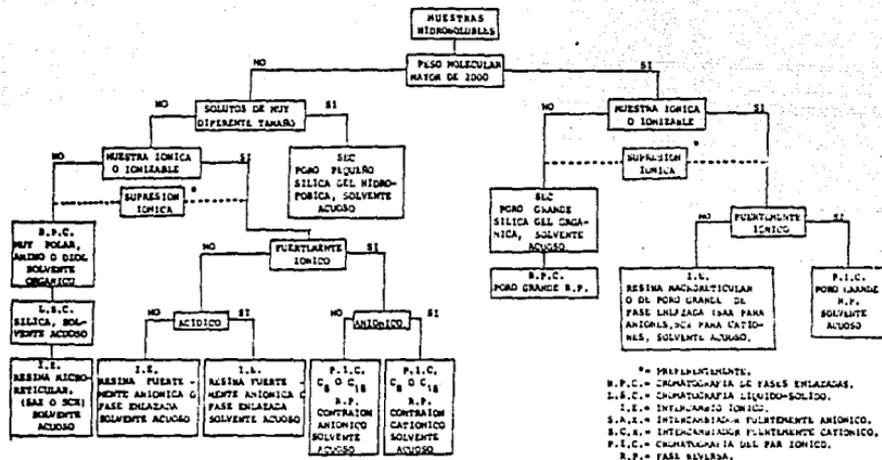
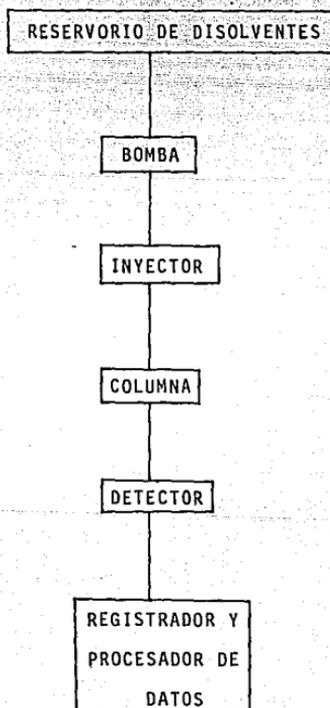


Figura 3.5. SELECCION DE UN METODO POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS A ALTA PRESION.

2.2.6. EQUIPO PARA CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

DIAGRAMA DE UN SISTEMA CROMATOGRAFICO



1. RESERVORIOS DE DISOLVENTES.

Es la serie de recipientes que han de contener a las fases móvil, es importante seleccionar el material del cual han de estar fabricados, pues deben de resistir a los disolventes y no deben de reaccionar con ellos.

2. BOMBA.

Tiene la función la de introducir a los disolventes a través del sistema cromatográfico por medio de presión, la cual es dependiente de la permeabilidad de la columna. Entre los sistemas de bombeo se encuentran las bombas de flujo constante, las cuales tienen mecanismos que reducen las pulsaciones de flujo y tienen la capacidad de bombear hasta 28 ml/min. Las bombas de presión constante se aplica un gas sobre la fase móvil, teniendo como desventaja que se disuelva una pequeña cantidad del gas provocando que se formen pequeñas burbujas en las celdas del detector.

3. INYECTOR.

Es el sistema para introducir la muestra de tal forma que no se difunda demasiado a la entrada de la columna, para permitir que exista una separación y debe de contar con características como el de resistir altas presiones y ser lavado completamente por la fase móvil de tal manera que en la siguiente inyección no exista contaminación con residuos de la inyección anterior.

4. COLUMNA.

Es la parte fundamental del cromatógrafo, es el lugar donde ocurre la separación, básicamente consiste de un tubo de material inerte de diámetro uniforme, el cual es capaz de resistir altas presiones, existe una gran variedad de columnas disponibles, las cuales son seleccionadas de acuerdo a la naturaleza química de la mezcla de solutos a separar, teniendo diferentes adsorbentes, con diferente polaridad o bien diferentes grupos funcionales específicos como lo es el Ciano (CN^-) o bien el amino ($-\text{NH}_2$).

5. DETECTOR.

Este instrumento tiene la finalidad la de monitorear constantemente el eluato de la columna cromatográfica a una determinada longitud de onda. Los detectores más utilizados son: absorción al ultravioleta, visible, absorción al infrarrojo, fluorescencia, índice de refracción, radiactividad, conductividad térmica y electroquímicos.

6. REGISTRADOR.

Tiene la función la de graficar a cada componente que es eluido en forma de pico, dependiendo de la concentración del soluto y del tiempo de retención.

7. PROCESADOR DE DATOS.

Consta del microprocesador, el cual nos proporciona un reporte de los datos obtenidos durante una corrida cromatográfica

los cuales incluyen tiempos de retención, áreas bajo la curva, por ciento de áreas bajo la curva etc.

2.2.7. FUNDAMENTOS DE LA CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

Es un proceso de separación que se basa en la distribución diferencial de una mezcla de componentes entre dos fases en equilibrio heterogéneo, establecido durante el flujo de una mezcla de disolventes (llamada fase móvil que puede ser un líquido o un gas) a través de una fase fija (llamada fase estacionaria, que puede ser solida o un líquido sostenido por un material de soporte). Si la fase estacionaria es un líquido se le conoce como cromatografía de partición y si es un solido se le denomina de adsorción, en el cual la fineza de las partículas permite que la fase móvil se desplace a través de ellas por un fenómeno de capilaridad, entonces la separación ocurre por la diferencia de absorción en la fase estacionaria de los diversos componentes a separar, pero como estos, están en equilibrio entre las fases, la separación también dependerá del coeficiente de distribución (K_D) el cual es:

$$K_D = \frac{\text{Cantidad de soluto por unidad de fase estacionaria.}}{\text{cantidad de soluto por unidad de fase móvil.}}$$

cantidad de soluto por unidad de fase móvil.

En la cual K_D es dependiente de la temperatura y de la concentración del soluto. El parametro para detectar la separación de un componente en este tipo de cromatografía es el llamado R_f

o factor de retención el cual esta definido por:

$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra desde el punto de aplicación.}}{\text{Distancia recorrida por el solvente desde el origen.}}$

Distancia recorrida por el solvente desde el origen.

Una separación eficiente es dependiente de la selección de los disolventes empleados para la fase móvil los cuales se eligen de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas del compuesto a separar (solubilidad, polaridad etc) (6). Normalmente se emplean para sustancias polares, disolventes polares. Para los compuestos no polares se emplean disolventes no polares o de baja polaridad. Cuando se tienen problemas en la separación de los solutos se puede aumentar o disminuir la polaridad de la fase móvil, esto es, cambiando la composición de la fase móvil de tal manera que se aumente la resolución(6,16,17).

2.2.8. FACTORES QUE AFECTAN LA SEPARACION CROMATOGRAFICA.

Al seleccionar el adsorbente, se debe tener cuidado en elegirlo en base a la afinidad por los solutos y tener en cuenta a los factores que influyen en la reproducibilidad entre los cuales se encuentran.

1. GROSOR DE LA CAPA ADSORBENTE.

Al tener diferencia en el grosor de la placa cromatográfica existen diferencias en las velocidades de flujo de la fase móvil con lo cual existe una diferencia en la migración del soluto (6,16,17).

2. HUMEDAD DEL ADSORBENTE.

Esto es debido a que existen interferencias entre soluto-fase móvil-adsorbente, con lo cual existe variación en el grado de actividad de la fase estacionaria (6-16-17).

3. SATURACION DE LA CAMARA CROMATOGRAFICA.

Al tener a la cámara saturada ya no existe un cambio en la composición de la fase móvil, con lo cual no se altera la velocidad de ascenso (6-16-17).

4. TEMPERATURA.

Al existir un aumento en la temperatura, se altera la solubilidad del soluto en la fase móvil pero también ocurre una evaporación de los solventes con lo cual cambia la composición de los solventes y los R_f se ven alterados.

5. TAMAÑO DE PARTICULA DEL ADSORBENTE.

Entre más pequeño sea el tamaño de partícula, será mayor el área de superficie y por lo tanto mayor la capacidad de resolución.

6. CANTIDAD DE MUESTRA.

Si se tiene una concentración alta de soluto, los puntos de interacción soluto-adsorbente se ven saturados y por lo tanto la muestra no migra con igual velocidad dando lugar con ello al barrido de la muestra y por lo tanto una mala separación.

2.9. TIPO DE ERRORES.

Al llevar a cabo cualquier tipo de mediciones sabemos que

están sujetos a errores los cuales son: sistemáticos (determinados) y aleatorios (indeterminados) (11-18-19).

1. Errores sistemáticos (determinados).

Son aquellos que dan lugar a medidas incorrectas, los cuales se pueden clasificar en:

- a). Errores instrumentales: Instrumentos defectuosos o sin calibrar.
- b). Errores del método: La mayoría de estos, se pueden reducir o corregir y entre ellos se encuentra la impureza de los reactivos.
- c). Errores de operación: En este tipo de errores, están incluidos los personales, los cuales pueden reducirse con la experiencia y cuidado del analista en las manipulaciones físicas que se lleven a cabo.

2. Errores aleatorios (indeterminados).

Son los que se producen durante mediciones sucesivas efectuadas por el mismo analista en condiciones prácticamente idénticas, no es posible predecirlos o estimarlos.

2.1. VALIDACION.

La validación de un método analítico es un proceso por el cual queda establecido, por estudios experimentales, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada. Y la capacidad se expresa como: EXACTITUD CONOCIDA// VARIABILIDAD ESTABLECIDA.

Para llevar a cabo la validación de un método analítico es necesario determinar los siguientes parámetros.

1. LINEARIDAD.

Indica el grado en que la respuesta del método se aproxima a una función lineal del tipo $Y = A + Bx$ (donde $A=0$ y $B= 1$) al trabajar a diferentes concentraciones.

Para llevar a cabo tal fin se gráficán los datos experimentales, de tal manera que la cantidad recobrada este en función de la cantidad adicionada, para observar el grado en que los resultados se comportan como una función lineal. Para conocer numéricamente lo anterior se determina la regresión y correlación de los datos.

a). Por regresión se entiende la relación existente entre las variables, la cual se representa por la ecuación.

$$Y_{ij} = A + Bx_i + E_j(i)$$

Donde:

A = Ordenada al origen.

B = Pendiente de la recta, indicada por dos variables.

x_i = Cantidad adicionada de la i -ésima concentración.

Y_{ij} = Cantidad recobrada de la i -ésima concentración en la j -ésima repetición.

$E_j(i)$ = Error experimental.

Para llevar a cabo la determinación numérica, es necesario efectuarlo mediante el método de mínimos cuadrados⁽¹⁹⁻²¹⁾.

Nota: Todos los calculos estadísticos se efectuaron con micro-computadora CASIO PB-410.

Se determina la dispersión alrededor de la recta de regresión con el error típico de estimación modificado ($\hat{S}_{y/x}$) y la sensibilidad (δ) del método mediante las siguientes expresiones:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{(\sum Y^2) - A(\sum Y) - B(\sum XY)}{n}}$$

$$\hat{S}_{y/x} = \sqrt{\frac{n}{n-2}} \times (S_{y/x}) \quad \delta = \frac{B}{\hat{S}_{y/x}}$$

Dado que $\sigma^2_{y/x}$ es constante para las "x", la regresión es lineal, y la distribución lineal de y para cualquier valor de "x" dado, es una distribución normal. Es posible dar mediante intervalos de confianza, las estimaciones de A y B por las siguientes expresiones.

Inferencias a cerca de A (ordenada al origen).

Contraste de hipótesis.

H₀ A = A₀ Donde A₀ = 0

H₁ A ≠ A₀

Estadígrafo de contraste.

$$tA_0 = \frac{a - A_0}{S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X_i^2}{n \sum (X_i - \bar{X})^2}}}$$

El intervalo de confianza lo podemos calcular con:

$$a - t_{\alpha/2} \hat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X_i^2}{n \sum (X_i - \bar{X})^2}} < A < a + t_{1-\alpha/2} \hat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X_i^2}{n \sum (X_i - \bar{X})^2}}$$

Inferencias a cerca de B (pendiente).

Contraste de hipótesis.

H₀ : B = B₀. Donde B₀ = 1

H₁ : B ≠ B₀.

Estadígrafo de contraste (16-21).

$t_{B_0} = B - B_0 S_x \sqrt{n-1} / \hat{S}_{y/x}$ con $\alpha = 0.05$ y $\alpha = 0.025$

El intervalo de confianza al 95 % se calcula con:

$$b - t_{\alpha/2} \frac{\hat{S}_{y/x}}{S_x \sqrt{n-1}} < B < b + t_{1-\alpha/2} \frac{\hat{S}_{y/x}}{S_x \sqrt{n-1}}$$

Donde:

a = Valor de la ordenada al origen, determinada por los datos experimentales.

\bar{X} = Valor promedio de las cantidades adicionadas.

A₀ = Valor del parámetro (ordenada al origen = 0).

n = Número de observaciones de muestras independientes.

$\hat{S}_{y/x}$ = Error típico modificado.

S_x = Desviación estándar de las cantidades adicionadas.

X_i = Cantidad adicionada de la i-ésima concentración.

- b) = Valor de la pendiente, determinada por la ecuación de la recta de regresión.
- b). Coeficiente de correlación (r). Indica el grado en que se asocian dos variables, una vez obtenido, se puede calcular el coeficiente de determinación r^2 , el cual indica la variabilidad explicada por la recta de regresión⁽¹⁹⁻²¹⁾.

2. EXACTIDUD.

Es la concordancia que existe entre un valor determinado experimentalmente y su valor real.

Contraste de hipótesis.

$$H_0: \mu = 100 \%$$

$$H_1: \mu \neq 100 \%$$

Estadígrafo de contraste "t" de Student ⁽¹⁹⁻²¹⁾.

$$t \text{ calculado} = \frac{\bar{X} - \mu}{S/\sqrt{n}} \quad \text{con} \quad \alpha = 0.05.$$

Donde:

\bar{X} = Promedio de recobro de n muestras independientes.

μ = Parámetro que nos representa el valor real del porcentaje de recobro.

S/\sqrt{n} = Error estándar el cual es una medida del error experimental.

El intervalo de confianza al 95 % se calcula con:

$$I.C. = \bar{X} \pm t_{1-\alpha/2} S/\sqrt{n}$$

Donde:

\bar{X} = Valor promedio de los porcentajes de recobro.

$t_{1-\alpha/2}$ = Valor teórico del estadígrafo de contraste a esa confianza para tal intervalo.

3. REPETIBILIDAD.

Es la concordancia con respecto al valor central entre resultados sucesivos, obtenidos en un método, bajo condiciones iguales de trabajo. Se evalúa mediante el cálculo de la desviación del conjunto de datos (18-19-21).

Contraste de hipótesis.

H_0 : $\sigma \leq 2\%$

H_1 : $\sigma > 2\%$

Estadígrafo de contraste: χ^2 , llamada Ji-Cuadrada.

Donde:

n = Número de observaciones de muestras independientes.

s^2 = Varianza muestral.

σ^2 = Parámetro, que nos representa la variabilidad del método, el intervalo es de la siguiente manera:

$$\sqrt{\frac{(n-1) s^2}{\chi^2_{1-\alpha/2}}} < \sigma < \sqrt{\frac{(n-1) s^2}{\chi^2_{\alpha/2}}}$$

Donde:

n = Número de muestras independientes.

χ^2 = Valor teórico del estadígrafo de contraste, el cual tiene una confianza del 95 %.

s^2 = Varianza de los datos obtenidos del porcentaje de recobro.

σ = Desviación estándar poblacional.

4. REPRODUCIBILIDAD.

Es la concordancia con respecto a un valor real en un método, pero bajo diferentes condiciones (analista, tiempo, aparatos, laboratorios, etc.). Para evaluar este parámetro se aplica un estadígrafo de prueba F con dos varianzas, donde su modelo estadístico lineal del diseño experimental es:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_j + AD_{ij} + E_{(ij)k}$$

Donde:

Y_{ijk} = Porcentaje cuantificado con el i -ésimo analista, dado el j -ésimo día de la k -ésima repetición.

A_i = Efecto del i -ésimo analista en el porcentaje cuantificado.

AD_{ij} = Interacción analista-día

$E_{(ij)k}$ = Error experimental, el cual es una medida de la reproducibilidad.

μ = Parámetro el cual representa el valor real del porcentaje de recobro, donde no existe efecto por día o por analista.

D_j = Efecto del j -ésimo día del porcentaje cuantificado.

LA TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA ES DE LA SIGUIENTE FORMA:

Fuente de variación	Grados de libertad	Producto simplificado	Suma de cuadrados	Media cuadratica	F calculada
A_i	$a-1$	$(i-1)$	$\frac{\sum y_{i..}^2 - y^2}{bc}$	$SC_A/a-1$	CM_A/CM_E
D_j	$b-1$	$(j-1)$	$\frac{\sum y_{.j.}^2 - \sum y^2}{ac}$	$SC_D/b-1$	CM_D/CM_E
AD_{ij}	$(a-1)(b-1)$	$(ij-i-j+1)$	$\frac{\sum y_{ij.}^2 - \sum y^2}{ac} - \frac{\sum y_{.j.}^2 - \sum y^2}{abc}$	$\frac{SC_{AD}}{(a-1)(b-1)}$	CM_{AD}/CM_E
$E_{(ij)k}$	$ab(c-1)$	$(ijk-ij)$	$\sum y^2_{ijk} - \frac{\sum y^2_{ij.}}{c}$	$\frac{SC_E}{ab(c-1)}$	---

Donde la media cuadratica del error (CM_E) es el estimador de la REPRODUCIBILIDAD.

5. ESPECIFICIDAD.

En este tipo de prueba se asegura que la respuesta medible solo se debe a la sustancia que se desea analizar y no a excipientes o productos de degradación, los cuales se pueden formar durante el almacenamiento del material. para demostrar este punto se pueden llevar a cabo las siguientes pruebas:

- a). Analizando el placebo de la formulación bajo las mismas condiciones en que se trabaja la formulación.
- b). Se pueden adicionar los productos de degradación del principio activo al placebo de la formulación, cuando no se conocen tales productos, entonces es necesario someter al fármaco y a la formulación bajo condiciones que aceleren el proceso degradativo se emplean: Temperatura, luz solar, luz ultravioleta, medio oxidante, pH alcalino, pH ácido etc.

6. SENSIBILIDAD.

Para evaluar tal parámetro se lleva a cabo el análisis de la muestra donde se vaya disminuyendo la concentración hasta un punto donde la respuesta deje de ser confiable.

2.2.11. COMPARACION ENTRE METODOS ANALITICOS.

Para comparar dos métodos analíticos entre si, con el fin de determinar si son equivalentes, es necesario llevar a cabo las siguientes evaluaciones.

1. LINEARIDAD.

El objetivo consiste en determinar si las rectas de regresión difieren significativamente, se utiliza la prueba estadística de paralelismo, que sigue una distribución "t".

Contraste de hipótesis.

$$H_0 : \beta_1 = \beta_2$$

$$H_1 : \beta_1 \neq \beta_2$$

Estadígrafo de contraste.

$$t = \frac{\hat{\beta}_1 - \hat{\beta}_2}{\sqrt{\hat{S}_{y/x1}^2 + \hat{S}_{y/x2}^2 \left[\frac{1}{\frac{\sum x_1^2 - (\sum x_1)^2}{n_1}} + \frac{1}{\frac{\sum x_2^2 - (\sum x_2)^2}{n_2}} \right]}}$$

Donde:

$\hat{\beta}_1$ y $\hat{\beta}_2$ = Son las pendientes de los métodos 1 y 2 respectivamente

2. EXACTITUD.

Contraste de hipótesis.

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2$$

H1: $\mu_1 \neq \mu_2$

Estadígrafo de contraste ($19 \cdot 21$).

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}$$

Para los grados de libertad tenemos la siguiente ecuación.

$$\text{grados de libertad} = \frac{(S_1^2/n_1 + S_2^2/n_2)^2}{\frac{(S_1^2/n_1)^2}{n_1 + 1} + \frac{(S_2^2/n_2)^2}{n_2 + 1}} - 2$$

3. REPETIBILIDAD.

Contraste de hipótesis.

$$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$$

$$H_1: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$$

Estadígrafo de contraste ($19 \cdot 21$).

$$F_{\text{calculada}} = S_1^2 / S_2^2$$

Criterio para rechazar H_0 .

$$F > F_{1-\alpha/2} ; n_1-1, n_2-1, \text{ o si } F < F_{\alpha/2}; n_1-1, n_2-1.$$

Donde:

$$S_1^2 = \text{Varianza de los resultados del porcentaje de recobro del método 1.}$$

$$S_2^2 = \text{Varianza de los resultados del porcentaje de recobro}$$

del método 2.

n_1 y n_2 = número de recobros independientes de los métodos 1 y 2 respectivamente.

F = Valor mínimo del estadígrafo para rechazar H_0 .

Para el intervalo de confianza del 95 % tenemos:

$$\frac{S_1^2 / S_2^2}{F_{1-\alpha/2}} < \frac{\sigma_1^2}{\sigma_1^2} < \frac{S_1^2 / S_2^2}{F_{\alpha/2}}$$

4. REPRODUCIBILIDAD.

Contraste de hipótesis.

$$H_0: CM_{E1} = CM_{E2}$$

$$H1: CM_{E1} \neq CM_{E2}$$

Estadígrafo de contraste.

$$F_{calculada} = CM_{E1} / CM_{E2}$$

Criterio:

$F_{calculada} > F_{1-\alpha/2}$ con F ab(c-1)1, ab(c-1) 2 grados de libertad.

$F_{calculada} < F_{\alpha/2}$ con F ab(c-1)1, ab(c-1) 2 grados de libertad.

Donde:

CM_{E1} = Cuadrado medio del error del método 1, obtenido del análisis de varianza.

CM_{E2} = Cuadrado medio del error del método 2, obtenido del análisis de varianza.

F = Valor teórico del estadígrafo de contraste asociado a una confianza del 95 %.

5. ESPECIFICIDAD.

Se puede llevar a cabo evaluando la degradación con peróxido de hidrógeno, debido a que la Ranitidina es muy sensible a la oxidación.

2.12. METODOS DE ANALISIS REPORTADOS.

Se llevo a cabo una investigación bibliográfica (ver punto 11), de los métodos reportados para evaluar Clorhidrato de Ranitidina en forma cuantitativa, así como de las propiedades fisicoquímicas, encontrándose que la mayoría de los métodos de análisis son para fluidos biológicos.

2.12.1 CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

Fundamento:

Esta basada en la distribución de una mezcla de sustancias entre dos fases, donde una de ellas es un líquido que pasa a través de una fase estacionaria que permite separar a los componentes dependiendo de sus características fisicoquímicas, al salir del sistema de separación son detectadas registradas y cuantificadas (7-8-9-10).

Ventajas:

Es un método altamente selectivo en el cual se utilizan cantidades de muestra muy pequeñas, es rápido y versátil.

Desventajas:

Es un método costoso, además que no todos los laboratorios cuentan con el equipo necesario.

2.12.2. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.**Fundamento:**

Se basa en la diferencia de migración por interacciones fisicoquímicas de una mezcla de componentes a través de un soporte, de tal manera que cada componente queda separado debido a su afinidad por el sistema fase móvil-fase estacionaria, posteriormente se cuantifica por medio de otra técnica. (5⁶).

Ventajas:

Permite separar a los compuestos de interés de sus posibles productos de degradación o bien de excipientes que puedan interferir en la cuantificación del fármaco.

Desventajas:

Es un método que consume demasiado tiempo.

2.12.3. ESPECTROFOTOMETRIA.**Fundamento:**

Esta basado en la absorción al ultravioleta a una longitud de onda de 320 nm del sistema cromoforo producido por el doble enlace conjugado del grupo diaminonitroetano.

Ventajas:

Es un método que no requiere equipo especial, es acce-

sible en cuanto a costo y ademas es relativamente rapido.

Desventajas:

Existe la posibilidad de que los excipientes interfieran en la cuantificación de la Ranitidina.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En la industria farmacéutica el número de fármacos es cada vez mayor, con lo cual se requieren métodos de análisis apropiados. De ahí la necesidad de contar con el equipo y métodos confiables que permitan resolver los problemas de análisis que se presenten cuando sea elegida una técnica adecuada.

Al llevar a cabo la selección y desarrollo de un método analítico debemos tener en cuenta el fin para el que va a ser empleado, ya sea en estudios de estabilidad, para producto terminado o bien para evaluar materias primas, es necesario que tales métodos de análisis sean accesibles, rápidos y debieran de cumplir los siguientes requisitos: ser precisos, exactos, específicos y reproducibles.

Dado que las técnicas cromatográficas, en especial la de líquidos de alta resolución ha cobrado auge en los últimos años debido a que presenta dos grandes ventajas: rapidez y confiabilidad. Se plantean 3 métodos de análisis por cromatografía, 2 de los cuales son de líquidos de alta resolución y 1 por capa fina. La finalidad de contar con 3 métodos de análisis radica en que se tengan dos métodos opcionales que cumplan con los requisitos anteriormente señalados, en casos de tener fallas en el equipo y poder aplicar con seguridad cualquiera de las dos opciones restantes. En ello radica la importancia de este trabajo.

4. OBJETIVOS .

- 4.1. Desarrollar 2 métodos de análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución para evaluar cuantitativamente Clorhidrato de Ranitidina.
- 4.2. Desarrollar 1 método de análisis por cromatografía en capa fina para evaluar al Clorhidrato de Ranitidina.
- 4.3. Llevar a cabo la validación de los métodos desarrollados, determinando precisión, exactitud, linealidad, especificidad y sensibilidad.
- 4.4. Comparar estadísticamente los métodos desarrollados para conocer su equivalencia.

5. HIPOTESIS DE TRABAJO.

- 5.1. Considerando las características fisicoquímicas inherentes a cada sustancia (solubilidad, absorbancia al ultravioleta, polaridad, etc) es posible llevar a cabo la evaluación cuantitativa del Clorhidrato de Ranitidina en la forma farmacéutica jarabe, en base a métodos cromatográficos. Los cuales reunirán las características de confiabilidad para ser empleados como métodos de análisis rutinario.

6. MATERIALES.

6.1. REACTIVOS.

Hemisuccinato de Metronidazol	QUIMSI	
Metronidazol	INFORMA	
Clorhídrido de Ranitidina	PROSALES EXPORT	
Acido 1-Hexensulfónico	Reactivo analítico	WATERS
Acetato de etilo	Reactivo analítico	J.T.Baker.
Acetonitrilo	H.P.L.C.	J.T.Baker.
Metanol	H.P.L.C.	J.T.Baker.
Acido fosfórico	Reactivo analítico	J.T.Baker.
Fosfato monobásico de potasio	Reactivo analítico	J.T.Baker.
Metanol	Reactivo analítico	J.T.Baker.
Hidróxido de amonio	Reactivo analítico	J.T.Baker.
Placas de sílica gel 60F254	0.2 mm de espesor	Merck.

6.2. EQUIPO.

Espectrofotómetro	marca: HITACHI
	modelo: 100-60
Agitador supermixer	marca: TERMOLYNE
	modelo: M-16715
Microjeringa de 25 mcl	marca: HAMILTON
	modelo: 72
Balanza analítica	marca: METTLER
	modelo: s/n

Lámpara de luz ultravioleta	marca: ULTRAVIOLET PRODUCTS
	modelo: GL-15
Potenciómetro digital	marca: BECKMAN
	modelo: ϕ 41
Cámaras para cromatografía en capa fina.	
Cromatógrafo de líquidos de alta resolución equipado con:	
Detector de longitud de onda variable	marca: SPECTRA-PHYSICS
	modelo: SP 8440
Bomba de disolventes	marca: SPECTRA-PHYSICS
	modelo: SP 8750
Programador de disolventes	marca: SPECTRA-PHYSICS
	modelo: SP 8700
Procesador de datos	marca: SPECTRA-PHYSICS
	modelo: SP 4100
Columna CN, de tamaño de partícula de 5 micras, 15 cm de longitud, 3.9 mm de diámetro interno.	WATERS ASS
Columna μ -Bondapak C ₁₈ , de tamaño de partícula de partícula de 5 micras, 15 cm de longitud, 3.9 mm de diámetro interno.	WATERS ASS
Vasos de precipitados de 50, 100, 250 y 500 ml	PYREX
Matraces volumétricos de 10, 25, 100 y 1000 ml	PYREX
Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4 y 5 ml	PYREX

Equipo de filtración.	MILLIPORE
Membranas tipo HA y HVLP de 0.45 micras y de 47 mm de diametro.	MILLIPORE
Embudos de filtración rápida de 5 cm de diametro.	PYREX
Papel filtro número 3, de 5 cm de diametro.	WHATMAN
Tubos de ensaye de 10 ml.	PYREX
Probetas de 25,50,100 y 500 ml	PYREX
Cronómetro.	

7. DESARROLLO.

7.1. METODO PARA DETERMINAR CUANTITATIVAMENTE CLORHIDRATO DE RANITIDINA EN JARABE POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (FORMACION DEL PAR IONICO).

Preparación de la fase móvil.

Acetonitrilo	= 270 ml.
Reactivo Pic B-6	= 1 ml.
Agua destilada	= 729 ml.

Se homogeneizo, se filtro por membrana durapore HVLP de 0.45 micras y se desasifico al vacio durante 15 minutos.

Solución de referencia interna.

Se peso con exactitud cerca de 28 mg de metronidazol sustancia de referencia, se colocaron en un matraz volumétrico de 50 ml, se adicionaron 30 ml de metanol (reactivo analítico), se agito mecánicamente hasta disolución, se llevo al aforo con metanol y se homogeneizo (concentración del metronidazol=560 mcg/ml).

Solución de referencia de Clorhidrato de Ranitidina.

se peso exactamente alrededor de 24 mg de Clorhidrato de Ranitidina sustancia de referencia, se colocaron en un matraz volumétrico de 25 ml, se adicionaron 15 ml de metanol (reactivo analítico), se agito mecánicamente hasta disolución, se llevo al aforo con metanol y se homogeneizo (concentración del Clorhidrato

de Ranitidina= 960 mcg/ml). De la solución anterior se colocó una alícuota de 2 ml en un matraz volumétrico de 25 ml, se adicionó una alícuota de 2 ml de la solución de referencia interna, se llevó al aforo con fase móvil y se homogeneizó (concentración del Clorhidrato de Ranitidina= 76.80 mcg/ml; concentración del metronidazol= 44.80 mcg/ml).

Preparación de la solución problema.

Se colocó un ml del jarabe (equivalente a 9.59994 mg de Clorhidrato de Ranitidina en un matraz volumétrico de 25 ml, se adicionaron 15 ml de metanol (reactivo analítico), se agitó mecánicamente durante 5 minutos, se llevó al aforo con metanol y se homogeneizó (concentración del Clorhidrato de Ranitidina=383.9976 mcg/ml). De la solución anterior se colocó una alícuota de 5 ml en un matraz volumétrico de 25 ml, se adicionó una alícuota de 2 ml de la solución de referencia interna, se llevó al aforo con fase móvil y se homogeneizó (concentración del Clorhidrato de Ranitidina= 76.79952 mcg/ml; concentración del metronidazol= 44.80 mc/ml).

Se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución, tanto la solución problema, como la solución de referencia, bajo las siguientes condiciones cromatográficas.

Columna:	CN de 15 cm de longitud
Velocidad de flujo:	1.2 ml/min.
Longitud de onda:	310 nm.

Sensibilidad: 0.16 AUFS.
 Atenuación: 8.
 Velocidad de carta: 0.5 cm/min.
 Volumen de inyección: 10 mcl.

Cálculos:

% de Clorhidrato de Ranitidina $\frac{F1}{F2} \times \frac{Cst}{Cpb} \times Pot\ st.$

Donde:

$F1 = \frac{\text{AREA BAJO LA CURVA DEL CLORHIDRATO DE RANITIDINA EN LA SOLUCION PROBLEMA.}}{\text{AREA BAJO LA CURVA DEL METRONIDAZOL EN LA SOLUCION PROBLEMA.}}$

$F2 = \frac{\text{AREA BAJO LA CURVA DEL CLORHIDRATO DE RANITIDINA EN LA SOLUCION DE REF.}}{\text{AREA BAJO LA CURVA DEL METRONIDAZOL EN LA SOLUCION DE REFERENCIA.}}$

Cst= CONCENTRACION DEL CLORHIDRATO DE RANITIDINA EN LA SOLUCION DE REF.

Cpb= CONCENTRACION DEL CLORHIDRATO DE RANITIDINA EN LA SOLUCION PROBLEMA.

Pot st= POTENCIA DEL ESTANDAR EMPLEADO.

7.2. METODO PARA DETERMINAR CUANTITATIVAMENTE CLORHIDRATO DE RANITIDINA EN JARABE POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (SUPRESION IONICA).

Preparación de la fase móvil.

Fosfato monobasico de potasio	= 5.6780 g.
Acetonitrilo H.P.L.C.	= 80 ml.
Metanol H.P.L.C.	= 100 ml.
Agua destilada	= 820 ml.

Se homogeneizo, se ajusto el pH a 3.50 ± 0.05 unidades con ácido fosfórico al 10 %, se filtro por membrana durapore HVLP de 0.45 micras y se degasifico al vacio durante 15 minutos.

Solución de referencia interna.

Se peso con exactitud cerca de 34 mg de Hemisuccinato de Metronidazol, se colocaron en un matraz volumétrico de 25 ml, se adicionaron 15 ml de metanol (reactivo análitico), se agito mecánicamente hasta disolución, se llevo al aforo con metanol y se homogeneizo (concentración del hemisuccinato de metronidazol = 1360 mcg/ml).

Solución de referencia del Clorhídtrato de Ranitidina.

Se peso exactamente alrededor de 27.4 mg de Clorhídtrato de Ranitidina sustancia de referencia, se colocaron en un matraz volumétrico de 25 ml, se adicionaron 15 ml de metanol (reactivo análitico), se agito mecánicamente hasta disolución y se homogeneizo (concentración del Clorhídtrato de Ranitidina= 1090 mcg/ml). De la solución anterior se coloco una alícuota de 1 ml en un matraz volumétrico de 25 ml, se adiciono una alícuota de 2 ml de la solución de referencia interna y se llevo al aforo con agua destilada (concentración del Clorhídtrato de Ranitidina= 43.84 mcg/ml:concentración del hemisuccinato de metronidazol = 108.80 mcg/ml).

Preparación de la solución problema.

Se coloco 1 ml del jarabe (equivalente a 9.14 28 mg de

Clorhidrato de Ranitidina en un matraz volumétrico de 25 ml, se adiciono 15 ml de metanol (reactivo analítico), se agito mecánicamente durante 5 minutos, se llevo al aforo con metanol y se homogeneizo (concentración del Clorhidrato de Ranitidina=362.712 mcg/ml). De la solución anterior, se coloco una alícuota de 3 ml en un matraz volumétrico de 25 ml, se adiciono una alícuota de 2 ml de la solución de referencia interna y se llevo al aforo con agua destilada (concentración del Clorhidrato de Ranitidina = 43.88544 mcg/ml; concentración del Hemisuccinato de Metronidazol =108.80 mcg/ml).

Tanto la solución problema como la de referencia se pasaron a través de filtro Millex tipo HA de 0.45 micras.

Se inyectó en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución tanto la solución problema, como la solución de referencia, bajo las siguientes condiciones cromatográficas.

Columna:	Nova pak C ₁₈ de 15 cm de long.
Velocidad de flujo:	1.5 ml/min.
Longitud de onda:	310 nm.
Sensibilidad:	0.16 AUFS.
Atenuación:	8.0
Velocidad de la carta:	0.5 cm/min.
Volumen de inyección:	10 µl.

Cálculos.

$$\% \text{ de Clorhidrato de Ranitidina} = \frac{F1}{F2} \times \frac{Cst}{Cpb} \times \text{Pot st.}$$

Donde:

F1= AREA BAJO LA CURVA DEL CLORHIDRATO DE RANITIDINA EN LA SOLUCION PROBLEMA.

AREA BAJO LA CURVA DEL HEMISUCCINATO DE METRONIDAZOL EN LA SOL. PROB.

F2= AREA BAJO LA CURVA DEL CLORHIDRATO DE RANITIDINA EN LA SOL. DE REF.

AREA BAJO LA CURVA DEL HEMISUCCINATO DE METRONIDAZOL EN LA SOL. DE REF.

Cst = CONCENTRACION DEL CLORHIDRATO DE RANITIDINA EN LA SOL. DE REFERENCIA.

Cpb = CONCENTRACION DEL CLORHIDRATO DE REANITIDINA EN LA SOL PROBLEMA.

Pot st = POTENCIA DEL ESTANDAR EMPLEADO.

7.3. METODO PARA DETERMINAR CUANTITATIVAMENTE CLORHIDRATO DE RANITIDINA EN JARABE POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA-CUANTIFICACION FINAL POR ESPECTROFOTOMETRIA.

Solución de referencia de Clorhidrato de Ranitidina.

Se peso con exactitud cerca de 80 mg de Clorhidrato de Ranitidina sustancia de referencia, se colocaron en un matraz volumétrico de 10 ml, se adicionaron 5 ml de metanol (reactivo analítico), se agito mecánicamente hasta disolución y se llevo al aforo con metanol (concentración del Clorhidrato de Ranitidina = 8000.00 mcg/ml). De la solución anterior se coloco una alícuota de 1 ml en un matraz volumétrico de 10 ml, se llevo al aforo con metanol y se homogeneizo (concentración del Clorhidrato de Ranitidina= 800 mcg/ml).

Sistema cromatográfico.

Acetato de etilo:Metanol:Hidróxido de amonio (25%) (1:5:1).

Preparación de la solución problema.

Se colocó 1 ml de jarabe (equivalente a 9.1428 mg de Clorhidrato de Ranitidina), en un matraz volumétrico de 10 ml, se adicionaron 5 ml de metanol (reactivo analítico), se agitó mecánicamente por 5 min y se llevó al aforo con metanol (concentración del Clorhidrato de Ranitidina = 914.28 mcg/ml).

Aplicación de la solución de referencia del Clorhidrato de Ranitidina.

Se emplearon cromatofolios de sílica gel 60F₂₅₄ de 0.2 mm de espesor.

Metodología.

1. Se dividió la cromatoplaca en carriles de 5 cm.
2. Se aplicaron en banda 125 µl de la solución de referencia (equivalente a 100 mcg de Clorhidrato de Ranitidina).
3. Se introdujo la cromatoplaca en la cámara cromatográfica.
4. Se sacó la cromatoplaca y se dejó secar a temperatura ambiente.
5. Se observó bajo luz UV, se delimitaron las manchas y se determinaron los valores de R_f.
6. Se raspó la zona correspondiente a Clorhidrato de Ranitidina y se colocó en tubos de ensayo.
7. Se adicionaron 10 ml de metanol con pipeta volumétrica.
8. Se introdujeron los tubos en baño maría a 35-40°C durante 10

minutos.

9. Se agito en el super mixer durante 5 minutos.
- 10 Se filtro a través de papel whatman del #3.
11. Se determino la absorbancia a 310 nm en en espectrofómeto adecuado, utilizando un blanco de silica gel tratado de la misma manera. (concentración del Clorhídtrato de Ranitidina = 10 mcg/ml).

Aplicación de la solución problema.

Se utilizaron cromatoplacas de silica gel 60 F 254 de 0,2mm de espesor.

Metodología

1. Se dividio la cromatoplaca en carriles de 5 cm.
2. Se aplico en banda 110 mcl de la solución problema (equivalente a 100.5708 mcg de Clorhídtrato de Ranitidina).
Continuar con la misma metodología empleada para la aplicación de la solución de referencia a partir del punto 3.
11. Se determino la absorbancia a 310 nm en un espectrofotómetro adecuado, utilizando un blanco de silica gel tratado de la misma manera. (concentración del Clorhídtrato de Ranitidina= 10.15708 mcg/ml).

Calculos:

$$\% \text{ de Clorhídtrato de Ranitidina} = \frac{\text{Absprob}}{\text{Abs st}} \times \frac{\text{Cst}}{\text{Cpb}} \times \text{Pot st}$$

Donde:

Abs prob = Absorbancia de la solución problema.

Abs sst = Absorbancia de la solución de referencia.

Cst = Concentración del Clorhidrato de Ranitidina en la solución de referencia.

Cpb = Concentración del Clorhidrato de Ranitidina en la solución problema.

Pot st = Potencia del estándar empleado.

7.4. VALIDACION DEL SISTEMA (LINEARIDAD).

Para llevar a cabo la validación del sistema fue necesario evaluarlo con placebos cargados.

Formulación del jarabe.

Clorhidrato de Ranitidina 914.28 mg (al 100 %), 959.994 mg (al 105 %).

Sacarosa.

Sacarina.

Sorbitol.

Fosfato dibásico de potasio.

Fosfato monobásico de potasio.

Nipagin sodico.

Nipasol sodico.

Glicerina.

Propilenglicol.

Color cafe

Sabor Chocolate.

Agua c.b.p. 100 ml.

7.4.1. LINEARIDAD CON PLACEBOS CARGADOS, PARA EL METODO POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (FORMACION DEL PAR IONICO).

Nota: En este caso se considero al jarabe al 105 % y como punto central a 76.80 mcg/ml de los cuáles se inyectaron en el cromatógrafo 10 mcl (esta concentración representa el 100 %).

Se prepararon los siguientes placebos cargados (concentración en mcg/ml).

61.44	Represento el 80. % de 76.80.
69.12	Represento el 90 % de 76.80.
76.80	Represento el 100 %.
84.48	Represento el 110 % de 76.80.
92.16	Represento el 120 % de 76.80.

Se llevaron a cabo diluciones adecuadas y se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución como se menciona en el punto 7.1. Se obtuvo el factor F1 y se gráfico de la siguiente manera: F1 contra concentración, se calcularon los siguientes parámetros: pendiente, ordenada al origen y el coeficiente de correlación, el cual debe ser cercano o aproximadamente igual a 1.

7.4.2. LINEARIDAD CON PLACEBOS CARGADOS, PARA EL METODO POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (SUPRESION

IONICA).

Nota: En este caso se considero al jarabe al 100 % como punto central a 43.84 mcg/ml) de los cuáles se inyectaron en el cromatógrafo 10 mcl (esta concentración representa el 100 %).

Se prepararon los siguientes placebos cargados (concentración en mcg/ml).

35.04	Represento al 80 % de 43.84.
39.52	Represento al 90 % de 43.84.
43.84	Represento al 100 %.
48.16	Represento al 110 % de 43.84.
52.64	Represento al 120 % de 43.84.

Se llevaron a cabo diluciones adecuadas y se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución como se mencióno en el punto 7.2. se obtuvo el factor F1 y se gráfico F1 contra concentración, se calcularon los siguientes parámetros: pendiente ordenada al origen y el coeficiente de correlación el cual debe ser cercano o aproximadamente igual a 1).

7.4.3. LINEARIDAD CON PLACEBUS CARGADOS, PARA EL METODO POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA-EVALUACION FINAL POR ESPECTROFOTOMETRIA.

Nota: En este caso se considero al jarabe al 100 % y como punto central a 10.05708 mcg/ml (esto representa el 100 %).

Se prepararon los siguientes placebos cargados (concentración en mcg/ml).

8.046	Represento el 80 % de 10.057.
9.052	Represento el 90 % de 10.057.
10.057	Represento el 100 %.
11.063	Represento el 110 % de 10.057.
12.069	Represento el 120 % de 10.057.

Se llevaron a cabo diluciones adecuadas y se aplicaron en la cromatoplaaca como se mencióno en el punto 7.3. Se obtiene la absorbancia, se gráfica la absorbancia obtenida contra la concentración y se calculan los siguientes parámetros: pendiente, ordenada al origen y el coeficiente de correlación (el cual debe ser cercano o aproximadamente igual a 1).

7.5. VALIDACION DE LOS METODOS ANALITICOS DESARROLLADOS.

Para llevar a cabo la validación de los métodos analíticos desarrollados es necesario, preparar placebos cargados como se indica a continuación.

7.5.1. PLACEBOS CARGADOS PARA LA VALIDACION DEL METODO POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (FORMACION DEL PAR IONICO).

Se prepararon muestras como se mencióno en el punto 7.4.1. y se inyectaron por separado, 5 veces cada una en el cro -

matográfico de líquidos de alta resolución como se mencióno en el punto 7.1.. Se cálculo el porcentaje de microgramos recuperados y se llevo a cabo la evaluaci6n estadística como se mencióno en el punto (2.2.10.).

7.5.2. PLACEBOS CARGADOS PARA LA VALIDACION DEL METODO POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (SUPRESION IONICA).

Se prepararon muestras como se mencióno en el punto 7.4.2. y se inyectaron por separado, 5 veces cada una en el cromat6grafo de líquidos de alta resolución como se mencióno en el punto 7.2. Se calculo el porcentaje de microgramos recuperados y se llevo a cabo la evaluaci6n estadística como se mencióno en el punto (2.2.10.).

8. RESULTADOS Y DISCUSION.

8.1. VALIDACION DEL SISTEMA (LINEARIDAD).

8.1.1. METODO POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (METODO POR FORMACION DEL PAR IONICO).

Concentración en mcg/ml.	Factor de respuesta.
61.44	1.24765
69.12	1.34795
75.80	1.52680
84.48	1.66605
92.16	1.80730

Donde: La concentración se considera en eje de las "x" y el factor de respuesta se considera en eje de las "y" (los resultados son el promedio de dos inyecciones).

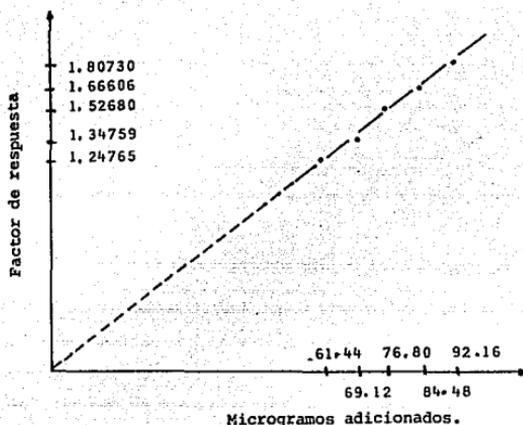
Resultados estadísticos.

Pendiente= 0.01871; ordenada al origen= 0.08175; coeficiente de correlación=0.9974.

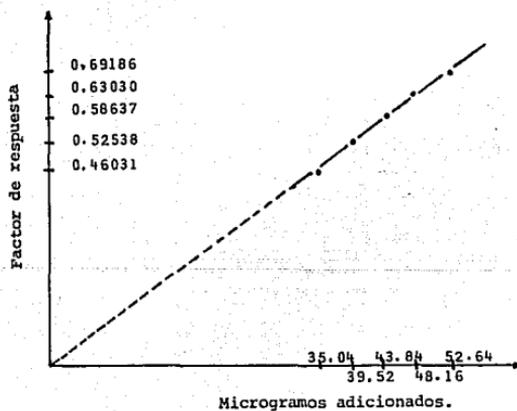
Debido a que el coeficiente de correlación es cercano a 1 se considera que la respuesta con respecto a la concentración es lineal. (ver grafica 8.1.).

8.1.2. METODO POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (METODO POR SUPRESION IONICA).

Concentración en mcg/ml	Factor de respuesta
35.04	0.46031



Gráfica 8.1. Linearidad del sistema (par iónico).



Gráfica 8.2. Linearidad del sistema (supresión iónica).

39.52	0.52358
43.84	0.58637
48.16	0.63030
52.64	0.69186

Donde: La concentración se considera en eje de las "x" y el factor de respuesta en el eje de las "y" (los resultados son el promedio de dos inyecciones).

Resultados estadísticos:

pendiente=0.01071; ordenada al origen=0.01295; coeficiente de correlación= 0.99840.

Debido a que el coeficiente de correlación es cercano a 1 se considera que la respuesta con respecto a la concentración es lineal (ver gráfica 8.2.).

8.1.3. METODO POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA-EVALUACION FINAL POR ESPECTROFOTOMETRIA.

Al llevar a cabo la evaluación de los placebos cargados se encontró que existe una gran variación en cuanto a la respuesta, debido a ello, el método ya no se continuó evaluando, y por tal motivo se descarta como un método cuantitativo de análisis de laboratorio.

8.2. VALIDACION DE LOS METODOS ANALITICOS.

8.2.1. METODO POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (METODO POR FORMACION DEL PAR IONICO).

Mcg adicionados	Mcg recuperados	% de recuperación
61.44	61.42	99.967
61.44	61.49	100.081
61.44	61.58	100.228
61.44	61.46	100.035
61.44	61.44	100.000
69.12	69.10	100.029
69.12	69.15	100.053
69.12	69.30	100.260
69.12	69.20	100.116
69.12	69.12	100.000
76.80	76.80	100.000
76.80	77.30	100.651
76.80	76.73	99.908
76.70	77.30	100.651
76.80	76.61	99.753
84.48	83.92	99.337
84.48	84.35	99.846
84.48	84.13	99.586
84.48	83.80	99.195
84.48	84.10	99.550
92.16	92.15	99.989
92.16	92.21	100.054
92.16	92.30	100.152
92.16	92.16	100.000
92.16	92.13	99.967

Considerando microgramos adicionados en el eje de las "x" y microgramos recuperados en el eje de las "y", llevando a cabo la evaluación estadística se obtienen los siguientes resultados.

Pendiente (B) = 0.9940

Ordenada al origen (A) = 0.46

Coefficiente de correlación (r) = 0.9997

1. LINEARIDAD.

Error típico de estimación modificado:

$S_{y/x} = 0.4230$; $\hat{S}_{y/x} = 0.4598$; Sensitividad (δ) = 2.1618.

Inferencias a cerca de A (ordenada al origen).

$t_{A_0} = 0.3132$; t de tablas = 2.0687.

Región de aceptación $2.0687 > 0.3132 > -2.0687$.

Lo cual indica que esta dentro del intervalo, se acepta H_0 y $A_0 = 0$.

El intervalo de confianza al 95 % es de la siguiente manera.

Límite superior = 3.4976; Límite inferior = -2.5776.

Inferencias a cerca de B (pendiente).

$t_{B_0} = -0.7558$; t de tablas = 2.0687, con 23 g.l.

Región de aceptación: $2.0687 > -0.7558 > -2.0687$.

Lo cual indica que esta dentro del intervalo, se acepta H_0 y $B_0 = 1.00$

El intervalo de confianza al 95 % es de la siguiente manera.

Límite superior = 1.0113; límite inferior = 0.9766.

ECUACION DE LA RECTA AJUSTADA.

$$Y = 0.9940x + 0.46$$

Para los siguientes valores de X, \hat{Y} toma los valores de:

(X)	(\hat{Y})
61.44	61.508
69.12	69.139
76.80	76.770
84.48	84.401
92.16	92.032

Debido a que el error experimental = 0, la ecuación de la recta ajustada es:

$$Y = 0.9940 x + 0.46$$

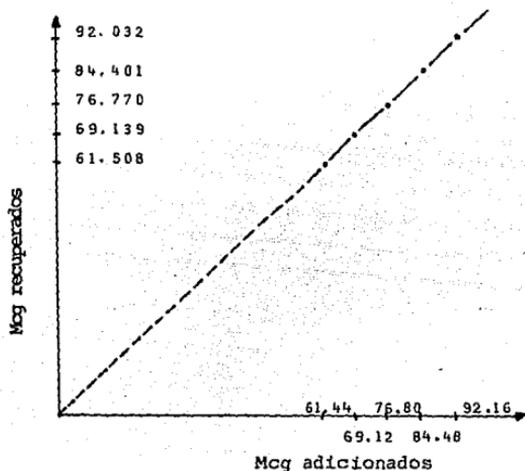
El coeficiente de correlación es: 0.9997

El coeficiente de determinación es: 0.9994

$$y 1-r^2 = 0.0006$$

Lo cual indica que el 0.000006 % de la variabilidad de la respuesta de regresión no puede ser explicada por el modelo.

GRAFICA DE LINEARIDAD DEL METODO ANALITICO POR CROMATOGRAFIA
DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (FORMACION DEL PAR IONICO).



$N=25$; $r=0.9997$; ecuación de la recta ajustada: $y=0.9940x+0.46$.

2. EXACTITUD.

t calculada = -0.49409 ; t de tablas = 2.0639 con 24 g.l.

Rango de aceptación: $-2.0639 \leq -0.49409 \leq 2.0639$.

Lo cual indica que está dentro del intervalo, se acepta H_0 , indicando que el método es exacto.

El intervalo de confianza al 95 % es de la siguiente manera.

Límite inferior = 99.8354 ; límite superior = 100.101 .

3. REPETIBILIDAD.

$S^2=0.10355$; $\chi^2=0.6213$; χ^2 de tablas =36.415 con 24 g.l.

Intervalo de aceptación: $0.6213 < 36.415$.

Lo cual indica que esta dentro del intervalo, se acepta H_0 y por lo tanto el método es repetible.

El intervalo de confianza al 95 % es de la siguiente manera.

$\chi^2_{0.975}$ de tablas= 39.364; $\chi^2_{0.025}$ de tablas= 12.401.

S es del porcentaje de recobro.

$S = 0.3218$; $\sigma=0.3153$; $S^2 = 0.10355$.

Por lo tanto el intervalo es: $0.007945 < 0.3153 < 0.44766$.

4. REPRODUCIBILIDAD.

	Analista 1	Analista 2
Día 1	99.5302	99.0523
	99.8823	99.2118
	100.1132	99.0481
Día 2	99.9988	100.3226
	100.7459	101.2391
	99.7542	99.8008

TABLA DE ANADEV A (DOS FACTORES ALEATORIOS).

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	F 0.95 DE TABS.
ANALISTA	1	0.1518	0.1518	0.1924	161.40
DIA	1	2.1030	2.1030	2.6654	161.40
ANALISTA-DIA	1	0.789	0.789	3.5350	5.32
ERROR	8	1.7852	0.2232	---	---

Toma de decisión.

F cal/ analísta = 0.1924 161.40.

F cal/día = 2.6654 161.40.

F cal/ analísta-día = 3.5350 5.32.

Lo cual implica que no existe interacción por analísta, día y por analísta-día, por lo tanto el método es reproducible.

5. ESPECIFICIDAD.

Debido a que la Ranitidina es muy inestable a la oxidación se degradaron tanto muestra como placebo a 60 °C durante 3 horas.

La figura 8.1. muestra los resultados de la degradación, teniendo como tiempos de retención a 1.80 (metronidazol); 4.56 (producto de degradación de la Ranitidina) y 6.02 min. respectivamente Ranitidina sin degradar.



Figura 8.1

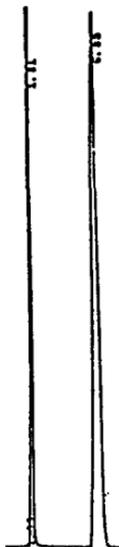


Figura 8.2



Figura 8.3

La figura 8.2. Corresponde a Ranitidina referencia teniendo los tiempos de retención de 1.81 min (estandar interno:Metronidazol) y 6.05 min (Ranitidina referencia).

La figura 8.3. Corresponde al placebo degradado.

De acuerdo a los anteriores resultados se demuestra que el método es específico.

6. SENSIBILIDAD.

Se evaluaron placebos cargados al 20,30,40,50 y 60 % de lo etiquetado para Clorhidrato de Ranitidina.

Mcg adicionados	Mcg recuperados
15.36	15.35
15.36	15.23
23.04	23.01
23.04	22.93
30.72	30.55
30.72	30.54
38.40	38.54
38.40	38.60
46.08	46.10
46.08	45.92

Unicamente se consideraron los siguientes parámetros:

$N=10$ $r=0.9999$ $A=1.0031$ $B=-0.0014$.

De acuerdo a los anteriores datos, se observa que la respuesta aun sigue una linea recta y por lo tanto es confiable.

8.2.2. METODO POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (METODO POR SUPRESION IONICA).

Mcg adicionados	Mcg recuperados	%de recuperacion
35.20	35.71	101.4488
35.20	34.55	98.1534
35.20	34.81	98.8920
35.20	34.93	99.2329
35.20	35.09	99.6875
39.36	39.59	100.5843
39.36	39.72	100.9146
39.36	39.71	100.8892
39.36	39.85	98.7042
39.36	39.94	101.4735
43.84	44.14	100.4735
43.84	44.32	101.0948
43.84	44.04	100.4562
43.84	43.35	98.8822
43.84	43.46	99.1332
48.16	48.14	99.9584
48.16	47.85	99.3563
48.16	48.62	100.9551
48.16	48.73	101.1835
48.16	48.53	100.8720
52.64	52.40	99.5440
52.64	51.96	98.7082
52.64	52.59	99.9050
52.64	53.31	101.2727
52.64	52.78	100.2659

Considerando microgramos adicionados en el eje de las "x" y microgramos recuperados en el eje de las "y" y llevando a cabo la evaluación estadística se obtienen los siguientes resultados.

Pendiente (B) = 1.0068

Ordenada al origen (A) = -0.2530

Coefficiente de correlación (r) = 0.9978.

1. LINEARIDAD.

Error típico de estimación modificado:

$S_{y/x} = 0.4428$; $\hat{S}_{y/x} = 0.4616$; $\delta = 2.2798$.

Inferencias a cerca de A (ordenada al origen).

$tA_0 = -0.1716$; t de tablas = 2.0687.

Región de aceptación: $2.0687 > -0.1716 > -2.0687$

Lo cual indica que esta dentro del intervalo, se acepta H_0 .

y $A_0 = 0$.

El intervalo de confianza al 95 % es de la siguiente manera.

Límite superior = 2.8067 Límite inferior = -3.3141

Inferencias a cerca de B (pendiente)

$tB_0 = 0.4591$; t de tablas = 2.0687, con 23 g.l.

Región de aceptación: $2.0687 > 0.4591 > -2.0687$

Lo cual indica que esta dentro del intervalo, se acepta H_0 .

y $B_0 = 1.00$

El intervalo de confianza al 95 % es de la siguiente manera:

Límite superior 1.1287; límite inferior = 0.8697.

ECUACION DE LA RECTA AJUSTADA.

$$Y = 1.0068 X - 0.2530.$$

Para los valores de X, \hat{Y} toma los siguientes valores.

(X)	(\hat{Y})
35.20	35.2675
39.36	39.4359
43.84	43.9249
48.16	48.2536
52.64	52.7426

Error experimental= 0.0167.

Por lo tanto la ecuación de la recta ajustada es:

$$Y = 1.0068 X - 0.2530 + 0.0167$$

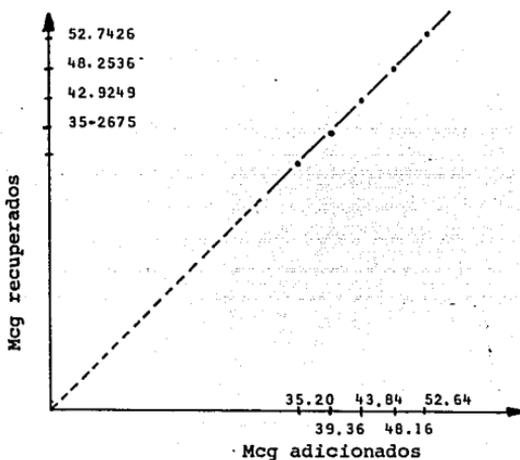
El coeficiente de correlación es $(r) = 0.9992$.

El coeficiente de determinación es $(r^2) = 0.9956$

$$1 - r^2 = 0.0044.$$

Lo cual indica que el 0.000044 % de la variabilidad de la respuesta de regresión no puede ser explicada por el modelo.

GRAFICA DE LINEARIDAD DEL METODO ANALITICO POR CROMATOGRAFIA
DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (SUPRESION IONICA).



$N=25$; $r=0.9997$; ecuación de la recta ajustada: $y=1.0068x-0.2530 + 0.0167$.

2. EXACTITUD.

t calculada = 0.4334; t de tablas = 2.0639 con 24 g.l.

Rango de aceptación $-2.0639 \leq 0.4334 \leq 2.0639$.

Lo cual indica que esta dentro del intervalo, se acepta H_0 , indicando que el método es exacto.

El intervalo de confianza al 95 % es de la siguiente manera.

Límite superior= 100.1277; límite inferior= 100.0453.

3. REPETIBILIDAD.

$S^2 = 0.9961$; χ^2 calculado= 5.9766; χ^2 de tablas = 36.415.

Región de aceptación: $5.9766 < 36.415$.

Lo cual indica que esta dentro del intervalo, se acepta H_0 y por lo tanto el método es repetible.

El intervalo de confianza al 95 % es de la siguiente manera.

$\chi^2_{0.975}$ de tablas= 39.364; $\chi^2_{0.025}$ de tablas = 12.401.

S es del porcentaje de recobro.

$S = 0.9980$; $\sigma = 0.9779$; $S^2 = 0.9961$.

Por lo tanto es intervalo es: $0.7793 < 0.9779 < 1.3884$.

4. REPRODUCIBILIDAD.

	Analísta 1	Analísta 2
Día 1	100.7278	101.5021
	99.5823	101.1383
	100.2711	99.9513
Día 2	100.7563	101.2043
	99.8781	100.2381
	99.7878	99.7537

TABLA DE ANADEVA (DOS FACTORES ALEATORIOS).

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	F 0.95 DE TABS
ANALISTA	1	0.6400	0.6400	5.0196	161.40
DIA	1	0.2014	0.2014	1.5796	161.40
ANALISTA-DIA	1	0.1275	0.1275	3.5701	5.32
ERROR	8	3.6421	0.4552	----	----

Toma de decisión.

Fcal/ analista = 5.0161 161.40

Fcal/ día = 1.5796 161.40

Fcalculada/analísta-día = 3.5701 5.32

Lo cual implica que no existe interacción por analísta,día y por analísta-día, por lo tanto el método es reproducible.

5. ESPECIFICIDAD.

Debido a que la Ranitidina es muy inestable a la oxidación se degradaron tanto muestra como placebo a 60 °C durante 3 horas.

La figura 8.4. muestra un cromatograma de Ranitidina referencia, teniendo como tiempos de retención a 1.61 min (Ranitidina) y 4.40 (Hemisuccinato de Metronidazol), respectivamente.



Figura 8.4.

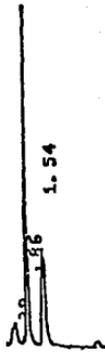


Figura 8.5.



Figura 8.6.

La figura 8.5. Muestra los resultados de la degradación de Ranitidina teniendo como tiempos de retención 0.70 y 1.06 min, a 1.54 min corresponde a Ranitidina sin degradar.

La figura 8.6. muestra los resultados de la degradación del placebo.

De acuerdo a los anteriores resultados se demuestra que el método es específico.

6. SENSIBILIDAD.

Se evaluaron placebos cargados al 20,30,40,50 y 60 % de lo etiquetado para Clorhidrato de Ranitidina.

Mcg adicionados	Mcg recuperados
8.80	8.8250
8.80	8.7976
13.12	13.0935
13.12	13.2398
17.44	17.5201
17.44	17.4701
21.92	21.9930
21.92	21.9426
26.40	27.4710
26.40	26.3972

Unicamente se consideraron los siguientes parametros:

N=10 r=0.9999 B=0.022 A=1.0010

De acuerdo a los anteriores datos, se observa que la respuesta aun sigue una línea recta y por lo tanto es confiable.

8.3. COMPARACION ENTRE METODOS ANALITICOS.

1. LINEARIDAD.

TABLA DE COMPARACION ENTRE METODOS

VARIABLES	METODO DEL PAR IONICO	METODO POR SUPRESION IONICA
N	25	25
A	0.46	-0.2530
B	0.9940	1.0068
$\hat{S}_{Y/x}$	0.4598	0.4616
Sensitividad		
(Δ)	2.1618	2.2798
Error		
Experimental	0.0000	0.0167
r	0.9997	0.9978

Región de aceptación: $-2.014 < t_{cal} < 2.014$.

t de tablas = ± 2.014 con 46 grados de libertad.

t calculada = -0.4814 , lo cual indica que esta dentro del intervalo de aceptación, por lo tanto no existe diferencia significativa entre las rectas de regresión.

2. EXACTITUD.

TABLA DE COMPARACION ENTRE METODOS

VARIABLES	METODO DEL PAR IONICO	METODO POR SUPRESION IONICA
N	25	25
\bar{X}	99.9682	100.0865
S	0.3218	0.9989
t _{cal}	0.4940	0.4334
t _{0.975}	±2.0639	±2.0639
S ²	0.1035	0.9961

t calculada = - 0.5616.

t de tablas = ±2.0452 con 29 grados de libertad.

Región de aceptación: $-2.0452 < t_{cal} < 2.0452$

Y $-2.0452 < -0.5617 < 2.0452$.

Toma de decisión:

Se acepta H_0 , lo cual indica que no existe diferencia significativa entre la exactitud de ambos métodos.

3. REPETIBILIDAD.

TABLA DE COMPARACION ENTRE METODOS

VARIABLES	METODO DEL PAR IONICO	METODO POR SUPRESION IONICA
N	25	25
\bar{X}	99.9682	100.0865
S	0.3218	0.9989
S^2	0.1035	0.9961
χ^2_{cal}	0.6213	5.9766
$\chi_{0.975}$	36.415	36.415

χ^2 calculada = 0.1040

χ^2 0.975 de tablas; 24; 24 = 2.27

χ^2 0.025 de tablas = 0.4405.

Región de aceptación: $0.4405 < \chi^2 < 2.27$

Y $0.1040 < 0.4405 < 2.27$.

Toma de decisión.

Se rechaza H_0 , con lo cual los métodos no tienen la misma repetibilidad.

4. REPRODUCIBILIDAD.

TABLA DE COMPARACION ENTRE METODOS

VARIABLES	METODO POR PAR IONICO	METODO POR SUPRESION IONICA
N	25	25
C_{ME}	0.2232	0.4552

F calculada= 0.4903.

F 0.975 de tablas; 8,8 = 4.43.

F 0.025 de tablas, 8,8 = 0.2257

Región de aceptación: $0.2257 < 0.4903 < 4.43$.

Lo cual nos indica que los métodos no tienen diferencia significativa entre la reproducibilidad.

5. ESPECIFICIDAD.

De acuerdo a los cromatogramas obtenidos, se puede observar que existe un alto grado de separación entre los picos de interés, es decir: estandar interno, Clorhídrido de Ranitidina y producto de degradación.

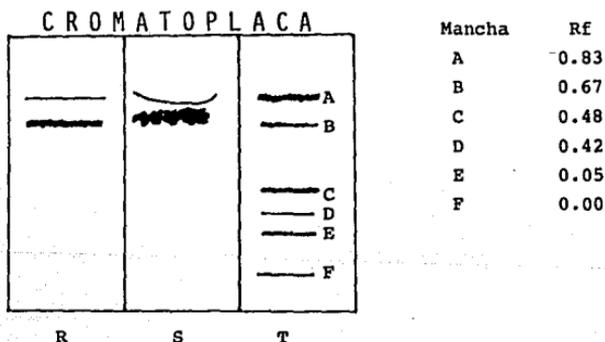
6. SENSIBILIDAD.

TABLA DE COMPARACION ENTRE METODOS

VARIABLE	METODO POR PAR IONICO	METODO POR SUPRESION IONICA
Concentración mínima evaluada	13.36	8.80

El método por supresión iónica tiene un mayor grado de respuesta, en cuanto a tamaño de pico cromatográfico.

8.4. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA A LAS MUESTRAS DEGRADADAS CON PEROXIDO DE HIDROGENO.



R= Ranitidina referencia; s= placebo cargado.

T= Ranitidina degradada con peróxido de hidrógeno.

9. CONCLUSIONES.

1. Se desarrollaron 2 métodos de análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución, los cuales demostraron su validez debido a que cumplen con: la linealidad, exactitud, repetibilidad, reproducibilidad y especificidad, con lo cual pueden ser utilizados en forma confiable de acuerdo a las necesidades del laboratorio.
2. Se desarrollo 1 método por cromatografía en capa fina, el cual no resultó ser cuantitativo, pero es un indicativo de la estabilidad del Clorhídrido de Ranitidina.
3. En los resultados de repetibilidad, al comparar los dos métodos, existe una diferencia significativa, esto es debido al fundamento de cada tipo de cromatografía y por separado han demostrado ser repetibles.
4. Con respecto a la cantidad de muestra existe una gran diferencia, esto es debido a cada tipo de cromatografía.

10. PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES:

1. Con el método por cromatografía en capa fina se tiene la posibilidad de poder identificar a los productos de degradación en condiciones de oxidación
2. Determinar la densidad del jarabe, para poder así: pesar la cantidad de muestra con respecto al volumen, esto es debido a la viscosidad del jarabe, y los problemas para poder tomar la alícuota de la muestra.
3. Someter a degradación tanta muestras, placebo y solución de referencia a condiciones de degradación tales como: luz solar, luz ultravioleta, pH ácido, pH básico, durante periodos breves, esto es debido a que se desea que se formen productos de degradación inmediatos.
4. Seleccionar otro tipo de soporte para cromatografía en capa fina, teniendo en cuenta que se forman 5 posibles productos de degradación y además que la Ranitidina se encuentra en forma de Clorhidrato.

11. BIBLIOGRAFIA.

1. Goodman G, A., Goodman, S.L., Rall, T., Goodman y Gilman las bases fármacológicas de la terapéutica. Editorial medica. septima edición, Argentina (1986).
2. Martindale., The Extrapharmacopoeia. Twenty eight edition. The pharmaceuticals press. London (1982).
3. The Merck Index. Ten edition, Merck & Co. Rahway. U.S.A. (1986).
4. Cholerton, T.J., Hunt, J.H., Klinkert, G., "Spectroscopic studies on ranitidine its structure and the influence of temperature and pH". Journal Chemical So. Perkin Trans 2 (11), 1761-1766 (1984).
5. Honhjec, M., et al., " Physical and spectroscopic data on Ranitidine". Acta Pharmaceutical Jugoslavia. 31 (3), 131-142.
6. Stahl, E., Thin layer chromatography: A laboratory handbook. Second edition. Springer Verlag. Berlin (1966).
7. Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Introduction to modern liquid Chromatography. Second Edition. John Wiley & Sons. U.S.A. (1979).
8. Schoemakers, P.J.m Optimization of chromatographic selectivity. Elsevier. Netherlands (1986).
9. Lawrence, F.J., Organic traces analysis by liquid chromatography. Academic press. U.S.A. (1981).
10. The Perkin-Elmer. Chromatography. U.S.A. (1980).

11. Peters, G.D., et al., Chemical separations and measurements Saunders golden Sunburst. U.S.A. (1974).
12. Dixon., et al., High pressure liquid chromatography in clinical chemistry. Academic press U.S.A. (1976).
13. Gloor, R., Johnson, E.L. "Practicals aspects of reverse phase ion pair chromatography". Journal of Chromatography Science. 15 (9), 413-423 (1977).
14. The μ -Bondapak series. Care and use manual Waters. (1985).
15. The United States Pharmacopoeia (1985).
16. Mikes, O., Chromatographic and allied methods. John wiley & Sons U.S.A. (1975).
17. Kirchner, G.J., Thin layer chormatography. Second edition John wiley & Sons U.S.A. (1978).
18. Validación. Asociación Farmacéutica Mexicana. (1987).
19. Remingtons D.R., Schork, A.M., Estadística biometrica y sanitaria. Editorial Prencice/Hall International. España (1977).
20. Fontani, R.M., Prelini, R., Rochi., "Criteri di convalita dei metodi d' analisi" Milan. (1986).
21. Spiegel, R.M., Estadística. Mc Graw-Hill México D.F. (1978).
22. Apffel, J., et al "Gas nebulized direct liquid introduction interface for liquid chromatography/massspectrometry". Analitical Chemical. 55 (14), 2280-2284. (1983).
23. Boutagy, J., More, D., Muriro, I., "Simultaneous analisis

- of Cimetidine and Ranitidine in human plasma by H.P.L.C.". Journal liquid Chromatography. 7 (8),1651-1664 (1984).
24. Bullock, J., et al., "Stability of Ranitidine Hydrochloride and amino acids in parenteral nutrient solutions". American Journal Hospital Pharmacy. 42 (2),2683-2687 (1985).
25. Carey, P.F., Martin, L.E., Evans, M.B., "High-performance liquid chromatographic methods for the determination of Ranitidine and its metabolites in biological fluids". Chromatographia 19,200-205 (1984).
26. Carey, P.F., Martin, L.E., Evans, M.B., "Determination of Ranitidine and its metabolites in human urine by reversed phase ion pair high performance liquid chromatography". Journal Chromatography. 225 (1),161-168 (1981).
27. Carey, P.F., Martin, L.E., "A high performance liquid chromatography method for the determination of Ranitidine in plasma". Journal Liquid Chromatography. 2 (9),1291-1303 (1979).
28. Crookes, D.L., "Crystalline Ranitidine Hydrochloride and pharmaceuticals composition containing it". Demande F.R. 2,491,067.
29. Delgado, Z., et al., "electrochemical study and polarographic determination of Ranitidine". Analytical Chemical Acta 176, 279-284 (1985).
30. Ficarra, P., Ficarra, R., Tommasini, A., "High-performance

- liquid chromatography of Ranitidine pharmaceuticals".
Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis. 2 (1),
119-123 (1984).
31. Giuseppe, M., et al., "Quantitative organic analysis I, identification of drugs by principal components analysis of standardized thin layer chromatographic data in four eluent systems". Journal Chromatography. 350 (1), 151-168 (1985).
 32. Guvener, B., "A Spectrometric determination method of Ranitidine hydrochloride". Acta Pharmaceutical Turc. 28 (1). 35-37 (1986).
 33. Haraguchi, T.K., "Ranitidine hydrochloride determination by perchloric acid in media nonaqueous". Rev. Pharma. Biochim. 21 (2), 146-150 (1985).
 34. Jane, I., Kinnon, A., "High performance liquid chromatographic analysis of basic drugs on silica columns using non aqueous ionic eluents II. Application of U.V. fluorescence and electrochemical oxidation detection". Journal Chromatography. 323 (2), 191-225 (1985).
 35. Kubo, H., Kobayashi, Y., Tokunaga, K., "Improved method for the determination of Cimetidine in human serum by high performance liquid chromatography". Anal. Lett. 18 (b-3) (1985).
 36. Iant, M.S., Martin, L.E., "Quantitative and qualitative analysis of Cimetidine and Ranitidine in human plasma by H.P.L.C.-Mass spectrometry". Journal Chromatography. 323 (1) 143-152 (1985).

37. Martin, L.E., Oxford, J., Tanner, R. J., "Use of high performance liquid chromatography-mass spectrometry for the study of the metabolism of Ranitidine in man". *Journal Chromatography*. 251 (2), 215-224 (1982).
38. Martin, L.E., Oxford, J., Dixon, D., "A comparison of the moving belt and direct liquid introduction interfaces for H.P.L.C.- M.S. of the Ranitidine and its metabolites". *Methodol. Anal. Toxicol.* 3, 169-173 (1985).
39. Mihaly, G. W., et al., " High-pressure liquid chromatography determination of Ranitidine a new H₂ receptor antagonist, in plasma and urine". *Journal of Pharmaceuticals Sciences*. 69 (10), 1155-1157 (1984).
40. Miller, R., "Pharmacokinetics and bioavailability of Ranitidine in humans". *Journal of Pharmaceuticals Sciences*. 73 (10). 1376-1379. (1984).
41. Vanderberghe, H.H., Soldin, S., "Analysis of Ranitidine by high-performance liquid chromatography". *Therapeutic Drug Monitor.* 2 (4), 379-384 (1980)
42. Vanderberghe, H.M., et al., "Analysis of Ranitidine in serum by high performance liquid chromatography". *Methodol. Anal. Tox.* 3, 169-173 (1985).
43. Jaffe H.H., Milton, O., *Theory and applications of ultraviolet spectroscopic*. John Wiley and Sons. U.S.A. (1962).

44. Silvertin, M.R., Bassler, C. G., Morrill, C.T., Spectrometric identifications of organic compounds. Third edition. John Wiley and Sons. U.S.A. (1974).