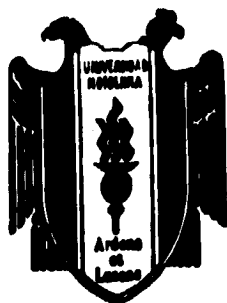


302827  
25  
2ij



UNIVERSIDAD MOTOLINIA A.C.

ESCUELA DE QUIMICA  
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

**OPTIMIZACION Y VALIDACION DEL METODO POR  
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA  
RESOLUCION DEL CLORHIDRATO DE DIFENIDOL  
EN UNA SOLUCION INYECTABLE**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A :**

**MARIA DEL CARMEN OCAMPO REYES**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.

**EL PRESENTE TRABAJO FORMA PARTE DEL APOYO A  
PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN PARA INTEGRARSE AL  
PROGRAMA DE NORMAS IMES; REALIZADO EN EL  
LABORATORIO DE FISIQUIMICA DE LA UNIDAD DE  
CONTROL TÉCNICO DE INSUMO DEL IMES, BAJO LA  
DIRECCIÓN DEL Q.F.B. FRANCISCO LEÓN UBBEA.**

**JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE :** Q.F.B. GRACIELA SOSA GARCÍA  
**VOCAL :** M en C. RICARDO ALEJANDRE AGUILAR.  
**SECRETARIO :** Q.F.B. FRANCISCO LÓPEZ NARANJO.  
**SUPLENTE :** Q.B.P. LUIS ESTIA TORNELL.  
**SUPLENTE :** Q.F.B. GUADALUPE ANGÉLICA LÓPEZ SOTELO  
**ASESOR DEL TEMA:** Q.F.B. FRANCISCO LEÓN URREA.

**A MI MADRE:**

DESDE PEQUEÑA , ME ACOMPAÑASTE Y ESTUVISTE CONMIGO BRINDÁNDOME TU AMOR Y TERNURA DE TI SIEMPRE HAY ALGO QUE APRENDER; COMO TU GRAN CALIDAD HUMANA, GENEROSIDAD Y LEALTAD ERES MI GRAN AMIGA, CONTIIGO NUNCA ME SENTÍ SOCA , GRACIAS PORQUE CON TU COMPRENSIÓN ESTE LO QUE ERA UN SUEÑO AHORA ES UNA REALIDAD.

**A MI PADRE:**

TU ME ENSEÑASTE TU GRAN FORTALEZA, JUSTICIA, ORDEN Y EL DESEO DE SUPERARME POR SOBRE TODOS LOS OBSTÁCULOS. RECUERDAS ... CUANDO YA NO PODÍA MAS TU ME MOTIVASTE EN LOS MOMENTOS MAS DIFÍCILES PARA MI , NO PERMITISTE QUE YO DESISTIERA Y NO DUDASTE DE TU HIJA EN NINGÚN MOMENTO. GRACIAS POR MOSTRARME EL CAMINO QUE DEBÍA DE SEGUIR.

GRACIAS A DIOS POR DARNME UNOS PADRES EJEMPLARES Y POR BRINDARME LA OPORTUNIDAD DE SER SU HIJA, Y LES DIGO QUE ES SOLO EL COMIENZO DE LO QUE USTEDES ASESARON SIEMPRE PARA MI: SUPERACIÓN, FELICIDAD Y ÉXITOS PROFESIONALES.

EN ESPECIAL A FRANCISCO L. V.

PORQUE FUISTE Y ERES MI INSPIRACION PARA  
QUE YO REALICE MIS PROYECTOS PORQUE  
SIEMPRE ESTUVISTE DISPUESTO A ESCUCHARME  
Y A ENTENDERME EN MIS PROBLEMAS POR  
TRANSMITIRME TUS CONOCIMIENTOS Y  
BRINDARME TODO TU TIEMPO GRACIAS POR  
CREER EN MI PORQUE SIN TU AYUDA NO  
HUBIERA LLEGADO A LA CULMINACION DE  
ESTA META POR SER MI COMPACTE DIA CON DIA  
Y POR TU AMOR INCONDICIONAL.

**A LA MEMORIA DE ALICE, POR TU AMISTAD Y TU PRESENCIA SIEMPRE ALEGRE.**

## INDICE

<b>CAPITULO 1</b>	<b>INTRODUCCION</b>	<b>Página</b>
1.1.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.2.	OBJETIVOS	2
1.3.	HIPOTESIS	3
<b>CAPITULO II</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	
2.	MONOGRAFIA DEL CLORHIDRATO DE DIFENIDOL	4
2.1.	ESTABILIDAD EN SOLUCION	8
2.1.2.	FARMACOLOGIA Y DOSIS	8
2.1.3.	FARMACOCINETICA	9
2.1.4.	TOXICOLOGIA	10
2.2.	METODOS ANALITICOS	11
2.3.	CROMATOGRAFIA	12
2.3.1.	CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION	12
2.3.2.	BASES DE LA CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION	15
2.3.3.	COMPONENTES DE UN CROMATOGRFO DE LIQUIDOS	17
2.3.4.	SIEMAS DE BOMBEO	18
2.3.5.	SIEMAS DE INYECCION	19
2.3.6.	COLUMNAS	21
2.3.7.	DETECTORES	24
2.3.8.	REGISTRADOR DE SEÑALES	28



<b>2.4.</b>	<b>PROPIEDADES DE FASES ESTACIONARIAS PARA CROMATOGRAFIA EN FASE REVERSA</b>	<b>31</b>
<b>2.4.1.</b>	<b>TAMAÑO Y FORMA DE PARTICULA</b>	<b>32</b>
<b>2.4.2.</b>	<b>DIAMETRO DE PORO</b>	<b>32</b>
<b>2.4.3.</b>	<b>POROSIDAD</b>	<b>32</b>
<b>2.4.4.</b>	<b>FASE ENLAZADA</b>	<b>33</b>
<b>2.4.5.</b>	<b>CANTIDAD DE CARBON</b>	<b>35</b>
<b>2.4.6.</b>	<b>RECUBRIMIENTO FINAL O END CAPPING</b>	<b>35</b>
<b>2.5.</b>	<b>VALIDACION</b>	<b>36</b>
<b>2.5.1.</b>	<b>ESPECIFICIDAD</b>	<b>37</b>
<b>2.5.2.</b>	<b>LINEALIDAD DEL SISTEMA</b>	<b>37</b>
<b>2.5.3.</b>	<b>PRECISION DEL SISTEMA</b>	<b>38</b>
<b>2.5.4.</b>	<b>LINEALIDAD DEL METODO</b>	<b>38</b>
<b>2.5.5.</b>	<b>PRECISION DEL METODO</b>	<b>38</b>
<b>2.5.6.</b>	<b>EXACTITUD DEL METODO</b>	<b>38</b>
<b>2.5.7.</b>	<b>TOLERANCIA</b>	<b>39</b>
<b>2.5.8.</b>	<b>ADECUABILIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO</b>	<b>39</b>

**CAPITULO III      PARTE EXPERIMENTAL**

<b>3.1.</b>	<b>DIAGRAMA DE FLUJO. CUANTIFICACION DE DEFENIDOL POR CLAR.</b>	<b>42</b>
<b>3.1.1.</b>	<b>DIAGRAMA DE FLUJO. VALIDACION DE UN METODO ANALITICO.</b>	<b>43</b>
<b>3.2.</b>	<b>REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPO</b>	<b>44</b>
<b>3.2.1.</b>	<b>MATERIAL DE LABORATORIO</b>	<b>44</b>
<b>3.2.2.</b>	<b>REACTIVOS</b>	<b>45</b>
<b>3.2.3.</b>	<b>EQUIPO</b>	<b>46</b>
<b>3.3.</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>47</b>
<b>3.4.</b>	<b>EVALUACION DEL SISTEMA</b>	<b>50</b>
<b>3.4.1.</b>	<b>LINEALIDAD DEL SISTEMA</b>	<b>50</b>

3.4.2.	PRECISION DEL SISTEMA	50
3.5.	EVALUACION DEL METODO	51
3.5.1	LINEALIDAD DEL METODO	51
3.5.2.	EXACTITUD AL 100%	52
3.5.3.	PRECISION DEL METODO	52
3.6.	REPRODUCIBILIDAD	52
3.7.	ESPECIFICIDAD PARA METODOS INDICADORES DE ESTABILIDAD.	53
3.8.	TOLERANCIA	54
3.9.	ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA	54

**CAPITULO IV            RESULTADOS Y DISCUSION**

4.1.	RESULTADOS	55
4.1.1.	ESPECIFICIDAD PARA METODOS INDICADORES DE ESTABILIDAD	55
4.1.2	PRECISION DEL SISTEMA	58
4.1.3.	LINEALIDAD DEL SISTEMA	59
4.1.4.	LINEALIDAD DEL METODO	63
4.1.5.	EXACTITUD AL 100%	68
4.1.6.	PRECISION DEL METODO	69
4.1.7.	TOLERANCIA	71
4.1.8.	ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA	73
4.2.	DISCUSION	74

**CAPITULO V CONCLUSIONES**

**BIBLIOGRAFIA**

## **CAPITULO I**

## INTRODUCCION

### 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años, la validación de los procesos de manufactura de los productos farmacéuticos así como las técnicas analíticas para la determinación de los principios activos de dichos productos, elaborados en la Industria Farmacéutica se ha convertido en una exigencia de las Autoridades Sanitarias en nuestro país. Por lo que validar todas las técnicas utilizadas en el control analítico de cualquier preparado farmacéutico forma parte del aseguramiento de la Calidad Total de un producto.(23)

El Difénidol es un antiemético y antiveriginoso está indicado para la prevención y control de náuseas y vómito causado por enfermedades que afectan riñones, hígado, vesícula biliar, tracto gastrointestinal, radioterapia, cuidados posquirúrgicos y enfermedades del movimiento.(27).

Este medicamento se encuentra incluido dentro del Cuadro Básico de Medicamentos del Sector Salud y en el Cuadro Básico Institucional del I.M.S.S. con la clave 3112 y 010 000 3112 , respectivamente. Se presenta en forma de tabletas , solución inyectable y supositorios .

En la cuantificación de Difénidol, el método oficial propuesto por la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos y en la Norma I.M.S.S. con fecha 16-01-92 se basa en el análisis espectrofotométrico en la región ultravioleta, pero no contempla interferencias por excipientes, productos de degradación ó sustancias relacionadas existentes en cualquiera de las formas farmacéuticas ( tabletas, supositorios e inyectables ).

Por esta razón se llevó a cabo la Optimización y Validación de un Método Analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (C.L.A.R.) para la cuantificación de Difenhidol en una solución inyectable; en esta forma farmacéutica el Difenhidol se emplea como Clorhidrato.

## **1.2. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Optimizar y Validar un método analítico para la cuantificación de Clorhidrato de Difenhidol en solución inyectable, por C.L.A.R., en diferentes proveedores del I.M.S.S.

### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- 1.- Proponer como método oficial para la valoración de Difenhidol por C.L.A.R. en la Norma I.M.S.S. Clave 3112 y en la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos**
- 2.- Comprobar que la validación fundamenta el método y reúne las condiciones necesarias para la aplicación en el análisis fisicoquímico de la solución inyectable de Difenhidol**

### **1.3. HIPOTESIS**

**Si el método propuesto es exacto, lineal y preciso (repetible y reproducible) entonces se podrá establecerse como técnica de valoración por C.I.A.R. en la Norma I.M.S.S. 010. Medicinas.**

## **CAPITULO II**



## ANTECEDENTES

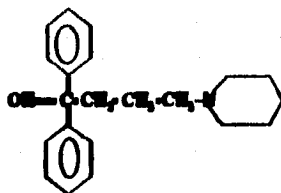
### 2. MONOGRAFIA DEL CLORHIDRATO DE DIFENIDOL

Nombre químico del Difénidol:  $\alpha, \alpha$  - difenil-1-piperidinobutanol (22)  
1,1-difenil-4-piperidinobutan-1-ol(22)  
Difenil-[ 3-(1-piperidil)propil] carbinol.(22)

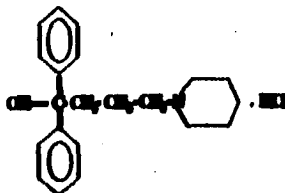
Nombre genérico: Difénidol (22)

Formula condensada: Clorhidrato  $C_{21}H_{25}NOHCl$  (22)

Formula química



Difénidol



**Clorhidrato de Etidolol**

**Peso molecular:** Clorhidrato 345.9 (22)

**Descripción:** Polvo cristalino blanco, inodoro, se oscurece lentamente por exposición a la luz. (22)

**Punto de fusión:** 214 a 215 °C (22)

**Solubilidad:** Soluble en alcohol, ligeramente soluble en acetona, prácticamente insoluble en éter.

**Pérdida por secado:** Secar 4 horas en vacío a 60 °C (4), Pérdida no más de 0.5% de su peso

Identificación:

A) ESPECTRO DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA:

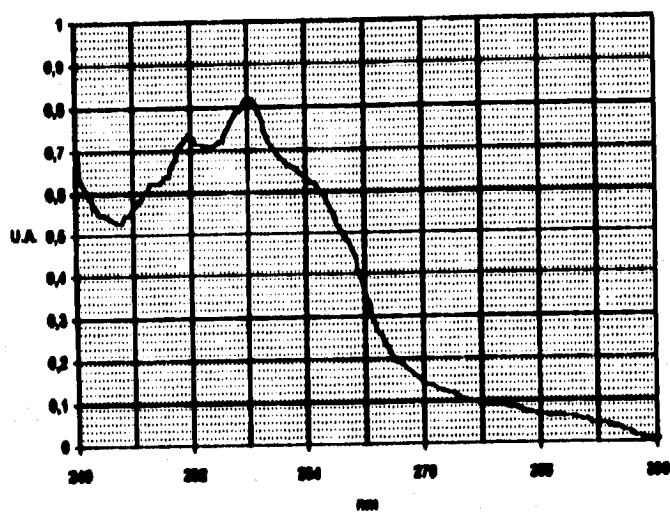
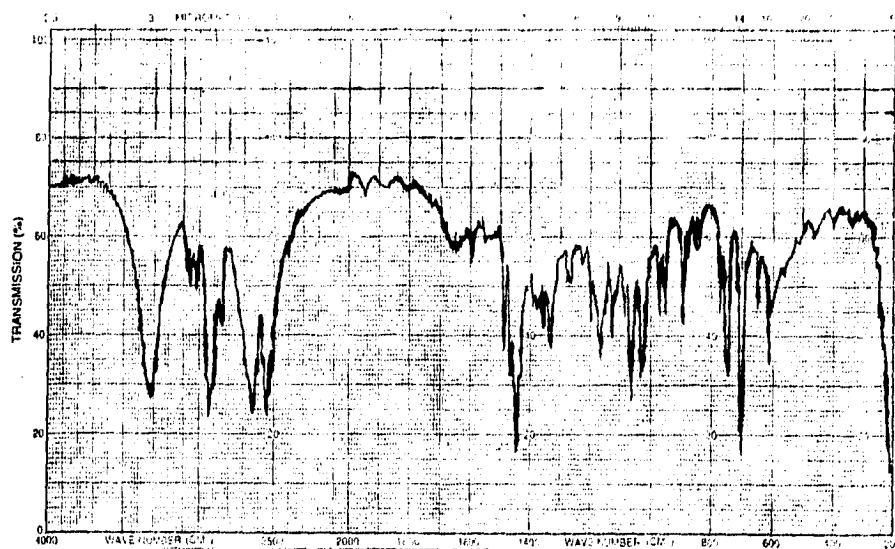


Fig. No. 1. Espectro de Absorción Ultravioleta del Difinidol en medio ácido.

**B) ESPECTRO DE ABSORCIÓN INFRARROJO:**



**Fig. No. 2. Espectro de Absorción Infrarrojo del Clorhidrato de Difenilol en disco de KBr.**

El espectro de absorción en la región infrarrojo de una dispersión de la muestra en nujol, exhibe máximos solamente en las mismas longitudes de onda que una preparación similar de Clorhidrato de Difenilol.(22)

## **2.1. ESTABILIDAD EN SOLUCION**

El Clorhidrato de Difenhidramina en solución inyectable es estable a temperatura menores de 40 °C preferiblemente alrededor de 15 a 30 °C. Debe ser almacenado en ampollas color ámbar. ( 1 )

## **2.1.2. FARMACOLOGIA Y Dosis**

El Difenhidramina es usado para el tratamiento del vértigo y el control de náusea y vómito . El control del vértigo aparentemente, proviene de un efecto específico antivértigo en el aparato vestibular. El control de la náusea y vómito es el resultado de una inhibición de la zona modular quimio-receptora (zona "güello")

El Difenhidramina no está indicado para el uso y el tratamiento de náusea y vómito en recién nacidos. No se recomienda la administración intravenosa o subcutánea en niños de cualquier edad. El Difenhidramina no está indicado en caso de náusea y vómito del embarazo ya que no se ha establecido el valor terapéutico y la seguridad en esta indicación. Absorbido por tracto intestinal, la concentración plasmática máxima es de 1.5 a 3 horas. Esto es excretado en orina y heces.

En un estudio en pacientes con arritmias ventriculares inducidas con glucósidos cardíacos el difenhidramina administrado 0.5 mg/Kg via intravenosa (I.V.), decreció el tiempo de conducción prolongada, del atrioventricular y suprimiendo el incremento ventricular automáticamente. (1)

El Difenhidramina es administrado vía oral, intramuscular, intravenosa y rectal. El clorhidrato soluble en agua es usado en todas las presentaciones excepto en supositorios, como el difenhidramina base. La dosis usual oral para adultos, que padecen de vértigo o náusea y vómito es de 25 mg, cada 4 horas si es necesario, algunos pacientes pueden requerir 50 mg. Para un rápido control de los síntomas, de 20 a 40 mg pueden ser

administrados vía inyección intramuscular, si se requiere 20 mg más pueden ser inyectados después de 1 hora.

Para el control de los ataques en pacientes hospitalizados administrar 20 mg directamente vía intravenosa.

Cuando se administra rectalmente la dosis para adultos es de 50 mg en un supositorio, repetir la dosis cada 4 horas si es necesario.

La dosis para niños se calcula por medio de 0.4 mg por peso vía oral o rectal, o 0.2 mg por peso vía intramuscular. (29)

### **2.1.3. FARMACOCINETICA**

#### **ABSORCION**

Seguido de una administración oral, el clorhidrato de difenidol es bien absorbido por tracto gastrointestinal y la concentración plasmática máxima generalmente ocurre en 1.5 -3.0 horas. (1)

#### **DISTRIBUCIÓN**

La distribución de Difendol en humanos no está caracterizado. En ratas el Difendol atraviesa la placenta.(1)

#### **ELIMINACION**

La vida media biológica del Difendol reportada es de 4 horas. Seguido de una administración oral de C<sup>14</sup> en un número limitado en humanos, el 84% de la radioactividad fue excretado en orina en 2-3 días . El 5-10% de la radioactividad fue excretada como un medicamento inalterable .

En relación a su metabolismo se sabe que existe un metabolito principal y varios metabolitos secundarios cuya estructura química no ha sido aún determinada. Y con lo referente a su liberación no se tiene información reportada.

### **2.3 TOXICOLOGIA**

En un estudio toxicológico realizado a ratas macho administrando Difonidol por vía subcutánea y vía oral se encontró que la LD<sub>50</sub> fue de 50 mg/Kg y 816 mg/Kg respectivamente. En cuanto a su liberación y metabolismo no se cuenta con información.

## 2.2. METODOS ANALITICOS

### VALORACION POR ABSORCION ULTRAVIOLETA

Existe una técnica para la valoración de Difendol, solución inyectable, citada en la Farmacopea Nacional 6a. Edición . En la cual se realizan extracciones empleando cloroformo, solución 1 N de Hidróxido de Sodio y solución 0.1 N de Ácido Sulfúrico . El procedimiento para correr el espectro de absorción en la región ultravioleta se hace por medio de un barrido de 300 a 240 nm. Y registrando el barrido dos veces más de 265 a 250 nm. Una vez obtenido los anteriores se procede a trazar una línea base y una línea perpendicular con el fin de unir los mínimos y los máximos de absorción; continuando y con la ayuda de la fórmula :

$$(D C / V) (-A_m / -A_{ref.})$$

donde:

C = Concentración por mililitro de Difendol en la preparación de referencia.

D = Es el factor de dilución de la muestra.

V = Volumen en mililitros de muestra tomada

-A<sub>m</sub> = Promedio de los valores de absorción obtenidos con la preparación de la muestra.

-A<sub>ref.</sub> = Promedio de los 3 valores de absorción obtenidos con la preparación de referencia.

De esta manera se calcula las cantidades de C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>NO por mililitro en la muestra. (11)



## **2.3. CROMATOGRAFIA**

### **DEFINICION**

Es un método físico de separación en el cual los componentes de una muestra a separar se distribuyen entre dos fases; una de ellas es un lecho estacionario, mientras la otra se mueve por percolación a través de este lecho. Los procesos cromatográficos tienen lugar como resultado de repetidas adsorciones y desorciones durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo del lecho estacionario, alcanzándose la separación gracias a la diferencia en los coeficientes de distribución de los distintos componentes de la muestra. (36)

### **2.3.1. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION**

La cromatografía de líquidos de alta resolución también es conocida como cromatografía de líquidos de alta presión (C.L.A.P.) o cromatografía líquida moderna. La migración diferencial en cromatografía líquida es resultado del equilibrio de distribución de los diferentes constituyentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil. Dichos componentes se separan en la columna y al salir de ésta, son conducidos por la fase móvil y en el orden en que emergieron hacia un detector donde se registran sus concentraciones y sus tiempos de retención en la columna.

Un registrador, ya sea un graficador o un integrador nos da el cromatograma resultante donde muestra cada compuesto que sale de la columna en forma de picos simétricos con un tiempo de retención característico por lo que este tiempo puede utilizarse para identificar al compuesto.

Este tiempo de retención,  $t_r$  se mide desde el momento de la inyección de la muestra hasta el momento en que aparece el máximo del pico en el cromatograma.(36)

Los mecanismos o procesos de separación que dan como resultado la retención de las moléculas de una muestra por parte de la fase estacionaria dan lugar a los diferentes métodos de cromatografía líquida.

Esto es:

Cromatografía líquido-líquido o de partición que consta de una fase estacionaria líquida de composición diferente al de la fase móvil e inmiscible en ella. Las moléculas de la muestra se distribuyen entre ambas fases como sucedería en una extracción líquido-líquido.

Cromatografía líquido-sólido o de adsorción incluye partículas de gran área superficial donde las moléculas son atraídas, y por lo tanto, retenidas.

Cromatografía de intercambio iónico en donde la fase estacionaria contiene grupos iónicos fijos como trifenilo de azufre junto con iones con carga opuesta.(36) Estos últimos están presentes en la fase móvil en forma de sales. De esta manera las moléculas iónicas son retenidas en la columna por el intercambio iónico, de acuerdo a la siguiente expresión:



- Por último, la cromatografía de exclusión molecular, en la cual el empaque es un material poroso, donde el tamaño del poro está bien definido. De esta manera, las moléculas que son demasiado grandes

para el poro salen rápidamente de la columna mientras que las pequeñas penetran en los poros, prolongando su tiempo de elución. Este tipo de cromatografía es muy empleada para separar compuestos por su tamaño molecular.

-Existen modificaciones a los tipos de cromatografía mencionados como en la cromatografía de fases enlazadas.

Esta variante se puede llevar a cabo en fase normal o fase inversa.

La fase normal está constituida por una fase estacionaria polar, generalmente sílica, cuyas propiedades de superficie son: SiO<sub>2</sub> (silanos libres), amorfa y que tenga un alto potencial de hidratación (esto facilita que se humecten fácilmente con la fase móvil), y una fase móvil no polar.

La fase inversa involucra una fase estacionaria no polar como cadenas de hidrocarburos de 8 a 18 carbonos unidos a los grupos silano de soporte y se utiliza por lo general con fases móviles muy polares para separar componentes poco polares. (36)

### 2.3.2. BASES DE LA CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION

Los parámetros que hay que considerar para que se lleven acabo una buena separación:

- Factor de capacidad  $k'$  ( retención )

$$k' = \frac{t_1 - t_0}{t_0}$$

Donde

$t_0$  = tiempo de elución de un compuesto sin retener

$t_1$  = tiempo de retención del compuesto de interés

-Eficiencia o número de platos teóricos que están relacionados directamente con la columna .

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

Donde :  $N$  = número de platos teóricos

$W$  = ancho de la base del pico

$t_r$  = tiempo de retención del compuesto de interés

16 = esta constante depende del método de medición del ancho del pico.(36)

**Selectividad es la relación de las retenciones**

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{v_2 - v_0}{v_1 - v_0}$$

**Donde:**

$k'_2, k'_1$  = son los factores de capacidad de la muestra 2 y 1  
respectivamente

$v_2, v_1$  = son los volúmenes de elución de la muestra 2 y 1 respectivamente

$v_0$  = es el volumen de elución de una muestra sin retener

**-Resolución es la capacidad que tiene la columna de separar completamente una muestra de la otra. Se recomienda que el resultado de la resolución este por arriba del 1.5, ya que a mayor valor de R la separación será mejor.**

$$R = 2 \left( \frac{t_2 - t_1}{W_1 + W_2} \right)$$

**Donde:**

$R$  = es la resolución entre los picos

$t_2, t_1$  = son los tiempos de retención de las muestra 2 y 1 respectivamente

$W_1, W_2$  = son los anchos de las bases de los picos 2 y 1 respectivamente

### 2.3.3. COMPONENTES DE UN CROMATOGRAFO DE LIQUIDOS

Un sistema de Cromatografía líquida de alta resolución está constituido por los siguientes componentes :

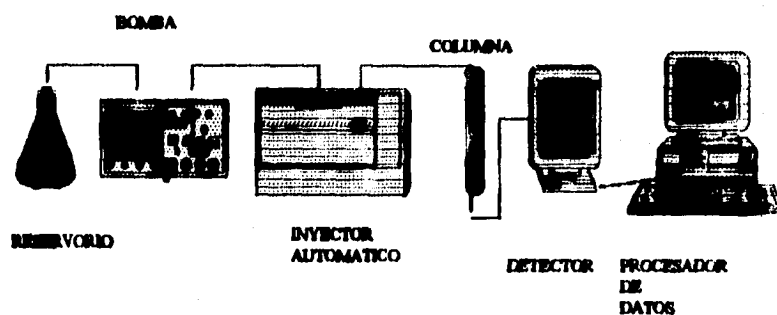


Figura No. 3. Esquema funcional de un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución

Una **bomba** sirve para impulsar la fase móvil a través de la columna ; un inyector es un mecanismo para **introducción de la muestra**, en la columna que contiene la fase estacionaria; un **detector** que proporciona señales que permitan una evaluación cualitativa y cuantitativa de los resultados. Esto puede conseguirse por simple registro de la respuesta del detector en forma de **cromatograma** (curva de respuesta contra

tiempo) o bien puede utilizarse, además, un equipo de tratamiento de datos. Los distintos componentes de la muestra separados en la columna también puede recogerse.(36)

#### **2.3.4. SISTEMAS DE BOMBEO**

Tienen por objeto impulsar la fase móvil a través de la columna .

Las características más importantes en las cuales debe constar un sistema de bombeo para C.L.A.R. son :

- a).- Reproducibilidad
- b).- Velocidad de la fase móvil
- c).- Presión media adecuada

Existen básicamente dos sistemas de bombeo y cada uno tiene sus ventajas y desventajas. Estos tipos son:

Bombas de presión constante, que tienen la desventaja de que es necesario mantener la viscosidad del solvente , la temperatura de la columna y la presión constante. La ventaja es que si estos parámetros se mantienen, se controlan totalmente las pulsaciones. La forma más sencilla de estas bombas emplea presión de un gas inerte para presurizar el solvente. El problema es que parte del gas se disuelve en el solvente , y esto forma burbujas en el sistema .

Otro sistema para estas bombas emplea un amplificador neumático que reduce el efecto del gas utilizando un pistón , reduciendo de esta manera el contacto del solvente con el gas comprimido.

Estos normalmente son sistemas isocráticos, es decir que mantienen constante la proporción de los solventes en la fase móvil, sin embargo, estos sistemas generalmente no son aplicables a separaciones en mezclas de solutos con valores muy variables de  $k'$ , en donde es necesario utilizar sistemas de elución con gradiente. Estos sistemas utilizan dos bombas que son programables para modificar, en forma lineal o exponencial, las proporciones iniciales de los solventes.

En estos casos los solventes que componen la fase móvil se encuentran separados y alimentando cada uno a su respectiva bomba.

Los solventes se mezclan en la proporción deseada en una cámara que se encuentra antes de la columna. El inconveniente del gradiente es que su uso es muy difícil con ciertos detectores como los refractómetros.(36)

### **2.3.5. SISTEMAS DE INYECCION**

Se conocen dos métodos para la introducción de la muestra en el sistema cromatográfico:

a).- Por medio de una válvula de inyección

b).- Por métodos de detención de flujo

Los métodos de detención de flujo requieren que el flujo de la fase móvil hacia la columna sea detenido o desviado mientras la muestra es introducida en la columna. Luego se reinicia el flujo y el proceso de separación comienza.

El método más común para introducir la muestra es empleando una válvula de inyección.

El "loop" de la muestra se saca del flujo cambiando la válvula a la posición de carga. En esta posición el flujo de la fase móvil pasa a través de la válvula directamente a la columna.



Ahora es cuando se introduce la muestra al "loop" de la válvula, usando una jeringa. El "loop" se puede llenar parcial o totalmente, pero si se requiere precisión se recomienda llenarlo totalmente. Cuando se cambia la válvula con la muestra a la posición de inyectar, la fase móvil ahora viaja por el "loop" y lleva a la muestra hacia la entrada de la columna. El flujo de la columna sólo se interrumpió momentáneamente por el cambio de posición de la válvula.

En la actualidad la inyección de la muestra se puede hacer en forma automática. Primordialmente los inyectoros automáticos consisten en una válvula de inyección automática, un sistema de llenado de la válvula y un control electrónico que sirve para controlar funciones tales como: tiempos de inyección, tiempos de corrida, velocidades de llenado, número de inyecciones por muestra, volumen de inyección, identificación de muestra, lavado de válvula y jeringa, inicio de inyección para registro, así como la operación de programadores de gradientes o controladores de sistema.(36)

Existen principalmente 3 métodos por medio de los cuales los inyectoros automáticos llenan la válvula de inyección:

1. Desplazamiento positivo.
2. Succión
3. Con jeringa

Si se utiliza el método de desplazamiento positivo es necesario sellar el vial que contiene la muestra. Cuando se lleva a cabo la carga de la muestra, una aguja doble pasa a través del sello y el aire penetra por uno de los conductos de la aguja. Este aire presuriza el vial y obliga a la muestra a salir por el segundo conducto de la aguja, hacia la válvula. Cuando la introducción de la muestra por succión se utiliza ya sea

un sistema de vacío o una jeringa de mayor volumen y los viales que contienen la muestra normalmente no están sellados.

El tercer método de introducción utiliza una jeringa especial para C.L.A.R. . La microjeringa es automática y generalmente puede ajustarse para dar varios volúmenes sin cambiar ya sea la jeringa o el "loop" de la válvula. Los viales de la muestra pueden estar sellados o abiertos para este método de introducción.

La aguja de la jeringa entra en el vial de la muestra y desplaza el volumen requerido de muestra. Luego la jeringa carga la muestra en la válvula de inyección, de la misma manera como si se usara la válvula en forma manual; finalmente la válvula es accionada y la muestra se introduce en la columna.

Los sistemas de inyección automáticos obviamente permiten una operación sin atención pero también tienen un beneficio adicional. Estos inyectores eliminan algunos de los errores que se presentan en el análisis cuantitativo ocasionados por el manejo de las técnicas de inyección. (36)

### 2.3.6. COLUMNAS

La columna se considera la parte más importante, ya que es en donde se lleva a cabo la separación y depende de ello en gran parte la eficacia de la técnica.

Las columnas empleadas tienen diámetros internos de 2 y 5 mm. La elección del diámetro adecuado depende de varios factores. Con diámetros de columna pequeños, se utiliza menor cantidad de fase móvil y se logra la detección de menores concentraciones en la muestra, a pesar de que la capacidad total de carga de muestra en estas columnas es menor. Las columnas con mayor consumo son normalmente

de 25 cm de longitud. Si se requiere un número de platos teóricos mayor de que los que puedan proporcionar se conectan en series dos ó más de ellas. En la actualidad las columnas suelen ser de acero inoxidable del tipo 316, elegido una vez más porque ofrece el mayor beneficio entre costo, mecanizabilidad y resistencia a la corrosión .

Hoy en día se disponen de rellenos de partículas pequeñas y uniformes con un diámetro de 10  $\mu\text{m}$  y en algunos casos , incluso de 5  $\mu\text{m}$  . De acuerdo con la teoría cromatográfica al disminuir el tamaño aumenta la velocidad de intercambio entre las fases móviles y estacionaria de manera que se pueden conseguir eficacias suficientemente buenas a velocidades lineales de flujo relativamente altas. (36)

Las partículas de soporte totalmente poroso son, en general , de gel de sílice de gran superficie .Los soportes particulares están formados por un núcleo sólido , generalmente bolas de vidrio recubiertas por una fina capa porosa, normalmente de sílice.

A continuación se presenta una lista de los empaques empleados en cromatografía de líquidos de alta resolución.

- Octadecil-silano unido químicamente a sílice porosa o micropartículas de cerámica de 5 o 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Octadecil-silano unido químicamente a gel de sílice con una superficie de porosidad controlada y que a su vez ha sido unida a un núcleo sólido esférico de 30 a 50  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Partículas de sílice porosa de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro .

- Gel de sílice con una superficie de porosidad controlada unida a un núcleo sólido esférico de 30 a 50  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Albúmina con una superficie de porosidad controlada unida a un núcleo sólido esférico de 30 a 50  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Empaques de intercambio catiónico fuertes : Polímero de fluoro carbón sulfonado cubriendo un núcleo sólido esférico de 30 a 50  $\mu\text{m}$  de diámetro. (36)
- Octililano enlazado químicamente a partículas de sílice totalmente porosa de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Capa monomolecular de aminopropilano enlazada químicamente a un soporte de gel de sílice porosa de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro. (36)
- Gel de sílice totalmente porosa e irregular de 10  $\mu\text{m}$  con una cubierta enlazada químicamente de un intercambiador catiónico fuertemente ácido .
- Grupos nitrilo químicamente enlazados a partículas de sílice porosa de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Grupos fenilo químicamente enlazados a partículas de sílice porosa de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Empaques de intercambio aniónico fuertemente formado por una amina cuaternaria enlazada químicamente a un núcleo esférico de sílice de 30 a 50  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Trimetililano enlazado químicamente a partículas de sílice porosa , de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Gel de sílice de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro con un intercambiador aniónico de amonio cuaternario fuertemente básico.
- Hexililano químicamente enlazado a sílice totalmente porosa de 3 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.(36)

### **2.3.7. DETECTORES**

El fin de un detector de C.L.A.R. es el monitorear la composición del líquido que eluye de una columna de cromatografía y por lo tanto hacer posible un registro de como la composición varia con el tiempo . Existen varios tipos de detectores, los cuales tienen aplicaciones diferentes, según el tipo de moléculas que se separen .Conociendo como trabaja un detector en términos generales, es posible, determinar que detector cubre mejor las necesidades particulares.

La siguiente lista se describe algunos de los detectores más utilizados en cromatografía líquida :

- Detector espectrofotométrico (UV/VIS)
- Detector de índices de refracción
- Detector de fluorescencia
- Detector electroquímico
- Detector infrarrojo
- Detector de conductividad
- Detector de radioactividad
- Detector de espectrometría de masa.

Antes de discutir la operación de los detectores será de ayuda explicar algunos términos que se usan para describir y comparar los mismos. Estos términos incluyen el ruido , la deriva y la linealidad . El ruido se refiere a la inestabilidad de la línea basal y normalmente se mide en desviaciones porcentuales de una

escala establecida. El ruido también se puede medir en unidades absolutas considerando las oscilaciones del registro de un pico a otro. Causas múltiples como impurezas en la fase móvil, solventes inmiscibles y fallas electrónicas entre otras, pueden ocasionar el ruido.

La linealidad se expresa como una desviación porcentual y se define para un rango establecido de detección. El rango dinámico de linealidad es otro número sin unidades que proporciona información acerca del rango de masa en el cual el detector es lineal. Además de tener poco ruido de fondo, que es una característica del detector observable en un tiempo corto, el detector debe satisfacer otro requisito: la línea base debe derivarse lo mínimo posible respecto a una línea horizontal. Esta desviación se denomina deriva.

Los detectores pueden ser clasificados en forma gruesa en dos tipos: Los detectores de propiedades generales los cuales funcionan midiendo alguna propiedad física general del eluyente de la columna, por ejemplo la constante dieléctrica o el índice de refracción. Estos detectores responden a una gran suma de sustancias casi con la misma sensibilidad, por lo que son conocidos como detectores universales o no específicos.(36)

El segundo tipo de detectores son aquellos selectivos en su respuesta. Estos son detectores de propiedades de soluto y funcionan midiendo una propiedad física ó química del mismo soluto, como la absorción ultravioleta.

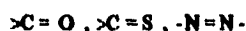
Las características que debe tener un detector ideal se enumeran a continuación:

- a).- Tener un diseño tal que los componentes de la muestra, no se mezclen al pasar por el detector.

- b).- Tener una señal de ruido y de deriva baja de tal manera que los componentes que cluyen en pequeña cantidad, puedan ser distinguidos.
- c).- Tenga un tiempo de respuesta rápido, para no distorsionar los picos que cluyen rápido
- d).- Tenga un rango dinámico lineal amplio para que el análisis cuantitativo se pueda llevar a cabo.
- e).- Sea relativamente insensible a cambios en la velocidad de la fase móvil, temperatura o composición.
- f).- Responda de la misma manera a todas las sustancias o bien si es selectivo, se pueda ajustar fácilmente para que la respuesta a cada sustancia sea óptima.
- g).- Debe ser fácil de manejar y confiable.

#### **Detector de Absorción (UV/VIS)**

Estos detectores son los de más uso en C.L.A.R. y responden a aquellas sustancias que absorben luz visible ó ultravioleta. Una gran cantidad de compuestos caen en esta categoría, incluyendo sustancias que tienen electrones sin compartir como las cetonas, así como todos los aromáticos y compuestos que tiene enlaces del tipo:



A la salida de la columna el haz de luz es enfocado a través de la celda de flujo hacia el sistema de fotodetección. Cuando los solutos que absorben luz se encuentran en la fase móvil la intensidad de luz que llega a la fotocelda se reduce, produciendo un cambio en la señal eléctrica, la cual puede ser amplificada e introducida a un registro o sistema de datos.(36)

La relación entre la absorción de luz en la celda de flujo y la concentración del soluto esta dada por la ley de Beer, donde:

$$A = \epsilon l c$$

A = absorbancia

$\epsilon$  = coeficiente de extinción del soluto a una longitud de onda

l = paso de luz de la celda de flujo

c = concentración del soluto en la celda

La sensibilidad del detector será directamente proporcional al valor del coeficiente de extinción y al paso de luz de la celda, la mayoría de las celdas tienen entre 1 y 10 mm y varían en volumen de 0.5 a 20 ml.

Detectores de barrido(UV/VIS). La característica principal de este detector es que pueden barrer rápidamente por varias longitudes de onda durante la elución de un pico de cromatografía. Esto permite obtener un espectro de absorción para identificar la longitud de onda óptima. Con los detectores de barrido se pueden realizar varias funciones en forma simultánea tales como cromatogramas a dos o más longitudes de onda, gráficas de relación y barridos rápidos. También es posible programar cambios en la longitud de onda mientras se realiza una corrida, lo cual permite optimizar aún más la longitud de onda.(36)



### **2.3.8. REGISTRADOR DE SEÑALES**

Al emerger un compuesto ya separado en la columna, la señal de muchos detectores es un voltaje proporcional a la cantidad instantánea de la muestra eluida a través del detector.

La gráfica de la señal del detector como una función del tiempo es llamado cromatograma. La cuantificación de los picos y el procesamiento de los datos se lleva a cabo por medio de un sistema de cómputo y puede hacerse de la siguiente manera.

#### **1) Estándar Externo**

En el método del estándar externo, con inyecciones separadas de muestra y estándar, permiten la cuantificación mediante la comparación de las áreas de los picos; esto es, comparando el área del pico obtenido para la muestra con el área del pico obtenido para la muestra con el área del pico obtenido para el estándar. Es fundamental el control preciso del volumen de inyección cuando se usa el estándar externo.

Las ventajas de usar el estándar externo son:

- 1) Simplicidad en la preparación de las soluciones a analizar.
- 2) Eliminación de buscar un estándar interno.
- 3) Se evita problemas causados por una coelución del estándar interno y de productos de degradación desconocidos.
- 4) Almacenamiento y pesada de un estándar interno no necesario.

La solución de un estándar externo debe ser de una concentración cercana a la esperada en la solución de la muestra. Se debe asegurar que el área del pico podrá ser comparable, de esta manera se evita cancelar errores en la medidas. Después cromatografiando ambas soluciones ( muestra y estándar ), la cantidad contenida se puede calcular con la siguiente fórmula:

$$C_m = \frac{A_m \times P_s \times D_m \times P_p}{A_s \times D_s \times P_m}$$

en donde :

**C<sub>x</sub>** = Concentración del activo en la muestra.

**A<sub>m</sub>** = Área del pico de la muestra

**A<sub>s</sub>** = Área del pico del estándar

**P<sub>m</sub>** = Cantidad en mg de la muestra

**P<sub>s</sub>** = Cantidad en mg del estándar

**D<sub>m</sub>** = Dilución de la muestra en ml

**D<sub>s</sub>** = Dilución del estándar en ml

**P<sub>p</sub>** = Peso promedio de la muestra

## 2) Estándar Interno

Un estándar interno es una sustancia adicionada a la solución prueba. El ratio del área del pico de las especies de interés así como del estándar interno son comparados de un cromatograma a otro.

Renumerados estándares internos para muchos aparatos provocan errores. Así el uso del estándar interno puede ocasionar desventajas en análisis de estabilidad en muestras. Cada muestra puede desarrollar sus productos de degradación los cuales pueden coeluir con el estándar interno, en cuyo caso la aparición de una pequeña cantidad de degradación podría cambiar sólo muy poco.

Un estándar interno debe cumplir con los siguientes requerimientos:

- 1) Debe ser completamente separado de los otros picos en el cromatograma.
- 2) Debe estar libre de los solutos que serán cuantificados.

- 3) Preferiblemente su estructura y el área del pico debe ser parecida al de la muestra a analizar.
- 4) No debe estar presente en la muestra a analizar, no debe potencializar ni ser producto de degradación de la muestra ni degradarla.
- 5) Debe ser químicamente inerte bajo las condiciones de trabajo ( cromatográficas ).
- 6) Debe ser fácilmente disponible, razonablemente de alta pureza o ser una sustancia fácil de purificar.

Existen dos variaciones en las técnicas para el uso del estándar interno. Una involucra la determinación de factores de respuesta, y la segunda, una relación entre respuestas. Los factores de respuesta son calculados dividiendo el peso de la muestra entre el correspondiente área del pico. El factor de respuesta es usado para calcular la concentración de la muestra. De la siguiente manera se puede calcular el factor de respuesta:

$$FR = \frac{A_{sr} \times P_{ei} \times D_r}{A_{ei} \times D_{ei} \times P_{sr}}$$

en donde:

**Fr** = Factor de respuesta

**A<sub>sr</sub>** = Área del pico del estándar de referencia

**A<sub>ei</sub>** = Área del pico del estándar interno

**P<sub>sr</sub>** = Cantidad en mg del estándar de referencia

**P<sub>ei</sub>** = Cantidad en mg del estándar interno

**D<sub>r</sub>** = Dilución del estándar de referencia

**D<sub>ei</sub>** = Dilución del estándar interno.

Instrumentos alternativos al registrador en papel son desde un simple integrador de canales múltiples o sistema de manejo de datos hasta computadoras de alta capacidad con software específico.(36)

#### **2.4. PROPIEDADES DE FASES ESTACIONARIAS PARA CROMATOGRAFIA EN FASE REVERSA**

El número ilimitado de combinaciones de fase estacionaria y móvil, proporciona amplias posibilidades para la selección de solutos con diferentes características y propiedades.

En la etapa de desarrollo de la separación, la selección de la fase estacionaria define en gran medida el éxito de ésta.

Existen algunas características para los empaques de fase reversa que en ocasiones son desconocidas o ignoradas y que se relacionan directamente con el comportamiento de los solutos en el sistema. La forma más sencilla de comprender el comportamiento de las fases estacionarias es conociendo sus propiedades físicas. En forma intuitiva sabemos que son empaques de fase reversa (C18) de diferentes proveedores y con características supuestamente equivalentes, los resultados no serían exactamente los mismos: también sabemos que de lote a lote podemos encontrar variaciones en su comportamiento.

Esto nos indica que el procedimiento de manufactura define las propiedades de la fase estacionaria y por lo tanto su comportamiento. Dentro de estas propiedades físicas se destacan el tamaño de partícula, diámetro y volumen de los poros, la cantidad de carbón y el proceso de recubrimiento final o "end capping". Cada una de ellas afecta importantemente el desempeño del material de empaque y en forma definitiva a la separación cromatográfica. (36)

#### **2.4.1. TAMAÑO Y FORMA DE PARTICULA**

Para fines analíticos se pueden encontrar materiales de empaques con tamaños que van de 4 a 10  $\mu\text{m}$ . El valor es nominal, pues en realidad se presenta una distribución de tamaños de partícula. Esta distribución tiene un papel importante en parámetros como la precisión y eficacia. En forma teórica, mientras menor sea el tamaño de partícula y más homogénea sea su distribución, mayor será la eficiencia y precisión del sistema. (14)

#### **2.4.2. DIAMETRO DE PORO**

Ya que los empaques o soportes de fases estacionarias son materiales poliméricos (sílica para la mayoría de las fases enlazadas a C 18 ), en el proceso de manufactura se controlan parámetros como temperatura, velocidad de reacción, cantidad de agua residual, etc; con la finalidad de regular el proceso de polimerización y definir de esta forma el tamaño y volumen de los poros del mismo. Por lo tanto, es difícil suponer que el diámetro del poro es un número singular, de nuevo, se trata de una distribución de diámetros de poro que pueden tener un efecto sutil en la selectividad de la columna.

#### **2.4.3. POROSIDAD**

El volumen del poro es indicativo de la porosidad de la sílica o material de soporte. Volúmenes de poros grandes indican que el material de empaques tienen baja densidad y bajo ciertas condiciones será más susceptible a la fractura. Los primeros empaques de fase reversa con poros grandes fueron hechos incrementando el tamaño de los poros de los empaques convencionales, al grado de hacer las paredes de

éstos muy delgadas y las partículas muy frágiles generando columnas inestables. En la actualidad la tecnología se ha mejorado y los empaques con poros de 300 Å son resistentes y de uso común.(36)

#### **2.4.4. FASE ENLAZADA**

Existen rellenos de columnas en los que la fase estacionaria está permanentemente unida al soporte por medio de enlaces químicos. Estos materiales se denominan rellenos de fase enlazada.

En la fig. No. 4 , se representa la estructura de varios tipos de fases enlazadas . Se preparan por reacción de los grupos Si-OH situadas en la superficie de las partículas del soporte con diversos reactivos.

GRUPOS ORIGINALES SOBRE LAS PARTICULAS DEL SOPORTE	GRUPOS FINALES EN LAS FASES ESTACIONARIAS ENLAZADAS
$\begin{array}{c}   \\ -\text{Si}-\text{OH} \\   \end{array}$	$\begin{array}{c}   \\ -\text{Si}-\text{OR} \\   \end{array}$
$\begin{array}{c}   \\ -\text{Si}-\text{OH} \\   \end{array}$	$\begin{array}{c}   \\ -\text{Si}-\text{C}_6\text{H}_5 \\   \end{array}$ $\begin{array}{c}   \\ -\text{Si}-\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \\   \end{array}$
$\begin{array}{c}   \\ -\text{Si}-\text{OH} \\   \end{array}$	$\begin{array}{l} \text{Si}-\text{O}-\text{Si} \begin{array}{l} / \text{R} \\ \backslash \text{R} \end{array} \\ \text{Si}-\text{O} \begin{array}{l} / \text{Si} \backslash \text{R} \\ \backslash \text{R} \end{array} \\ \text{Si}-\text{O} \begin{array}{l} / \text{Si} \backslash \text{R} \\ \backslash \text{R} \end{array} \\ \text{Si}-\text{O} \begin{array}{l} / \text{Si}-\text{R} \\ \backslash \text{X} \end{array} \\ \text{Si}-\text{O} \end{array}$

Fig. No. 4 Estructura típica de diversas fases enlazadas

Algunas fases enlazadas, como las que tienen el grupo amino-ciano o hidroxilo, son de naturaleza polar y pueden utilizarse de la misma manera que el gel de sílice y otros adsorbentes o fases estacionarias líquidas polares con fases móviles de baja polaridad (36)

Por otra parte, las fases enlazadas de alquileño o fenilo se utilizan normalmente en la cromatografía de fase inversa con una fase móvil muy polar.

#### 2.4.5. CANTIDAD DE CARBÓN

Existen diversas técnicas para determinar la cantidad de carbón: una de ellas involucra el calentamiento del material de empaque al punto que la cadena hidrocarbonada se elimina; la cantidad de carbón se conoce ya sea por pérdida de peso o por determinación de la cantidad de dióxido de carbono formado. Esta se reporta como porcentaje de carbón, el cual es la fracción en peso de este respecto al material de empaque. En forma teórica se sabe que al incrementarse la cantidad de carbón por un aumento en la longitud de la cadena o por incremento en la densidad de enlace, la retención de las columnas es mayor (26)

#### 2.4.6. RECUBRIMIENTO FINAL (END CAPPING)

Los reactivos de silanización C18 son moléculas grandes de aproximadamente 20Å de longitud, que pueden causar impedimento estérico sobre otras moléculas de reactivos que intentan enlazarse a un grupo silanol próximo, o en regiones de los poros que están estéricamente restringidos, los que inducen a la presencia de grupos silanoles residuales en la superficie. Estos grupos silanoles polares interactúan con solutos básicos bajo ciertas condiciones provocando el coloco de los picos, lo que ocasiona problemas en la cuantificación de la cromatografía analítica y la carga en las aplicaciones preparativas.(36)

Estos inconvenientes pueden ser solucionados realizando un recubrimiento final del empaque. El proceso llamado "End Capping" es una reacción separada y seguida que se realiza sobre la fase enlazada para ajustar el número de grupos silanoles sobre la superficie. Se emplean moléculas pequeñas tal como el trimetililano y menos impedidas estéricamente como las moléculas de C18.



## **2.5. VALIDACION**

Validación es el proceso por el cual queda establecido por escrito y a través de estudios de laboratorio que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

Existen 2 tipos de validación: validación retrospectiva y validación prospectiva

Validación retrospectiva es la evidencia documentada basada en los datos acumulados de producción, análisis y control de que un producto ya en distribución, está siendo fabricado con efectividad. La validación retrospectiva no se puede aplicar a equipos de proceso.

Validación prospectiva es la evidencia documentada que demuestre que las operaciones se encuentran bajo control antes de que el producto salga al mercado. Esta validación es aplicable a nuevos productos, formulaciones o cambios de equipo de proceso.

En un programa de validación los resultados obtenidos deben registrarse adecuadamente (documentarse) y evaluarse estadísticamente. El seguimiento de una validación, dependerá de la aplicación de que se dará a la misma (control de calidad y/o estudios de estabilidad), disposiciones gubernamentales, lineamientos internos del laboratorio donde se efectúan, y del criterio de el (los) analista(s).

Dentro de la validación de técnicas analíticas existen diversas variables involucradas, tales como:

- Material que se analizará
- Materiales y reactivos utilizados en los análisis
- Equipo, instrumentos o material para calibración.
- Químicos analistas
- Factores ambientales
- Instrumentos o aparatos en sí

Por lo que es necesario organizar correctamente la validación, tomando en cuenta las variables, parámetros, disposición de reactivos, etc; antes de iniciar los análisis. (6)

#### **2.5.1. ESPECIFICIDAD**

Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida a la sustancia de interés y no a otros componentes que puedan estar presentes en el material a analizar, tales como productos de degradación, excipientes u otros activos (12).

#### **2.5.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA**

Es la habilidad para asegurar que los resultados analíticos, que pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia de interés dentro de un intervalo de concentraciones del principio activo, dicho intervalo depende del propósito del método; para control de calidad y de seguimiento de la estabilidad de un fármaco en una forma farmacéutica deberá estar incluida la concentración seleccionada como 100% de la cantidad a cuantificar. (12)

### **2.5.3. PRECISION DEL SISTEMA**

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestras, esto es, que la capacidad del método analítico para cuantificar la misma cantidad de la sustancia a analizar con la mínima variación posible cuando se analiza varias veces bajo las condiciones normales de operación, también llamadas repetibilidad.(12)

### **2.5.4. LINEALIDAD DEL METODO**

Al igual que la linealidad del sistema es la habilidad para asegurar que los resultados analíticos son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.(5)

### **2.5.5. PRECISION DEL METODO**

Como se mencionó en la precisión del sistema es la capacidad del método analítico para cuantificar la misma cantidad de la sustancia a analizar con la mínima variación posible cuando se analiza varias veces.(6)

### **2.5.6. EXACTITUD DEL METODO**

La exactitud del método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como un porcentaje de recobro obtenido de análisis de muestra a la que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia. (6)

### **2.5.7. TOLERANCIA**

La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos por el análisis de la misma bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, sistemas de elución, tipos de empaque ( soporte ,fases estacionarias) condiciones ambientales ,estabilidad de la muestra analítica.(6)

### **2.5.8. ADECUABILIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO**

Cuando se utilizan técnicas cromatográficas, como la Cromatografía de Gases, es recomendable verificar la adecuabilidad y eficacia del sistema en uso.

Para corroborar la eficacia del sistema de operación, éste se debe someter a una prueba de adecuabilidad cada vez que se realiza un análisis, esto originalmente se debe a modificaciones, tanto en las condiciones de operación o en los cromatogramas.

La citada prueba comprende conceptos de electrónica, equipo utilizado, elaboración de muestras y operaciones analíticas, constituyendo con esto una prueba global en función del sistema.

La adecuabilidad del sistema puede comprobarse por medio de 3 parámetros que son muy importantes, como:

- a) Reproducibilidad de inyecciones repetidas
- b) Coliso
- c) Resolución entre los picos

a) Reproducibilidad de inyecciones repetidas: se realizan 5 inyecciones con la solución analítica los resultados obtenidos se expresan como la desviación estándar relativa (DER).

Los cálculos se expresan por medio de la siguiente ecuación

$$D.E.R. = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \cdot \frac{100}{\bar{X}}$$

Donde:

D.E.R.= Desviación Estándar Relativa en 100 %

$\bar{X}$ = Medía de n medidas

$X_i$ = Medía de la relación de las respuestas del pico =R<sub>i</sub>(cuando se usa estándar interno).

Los resultados de los cinco cromatogramas repetidos, usados para realizar los cálculos, a menos que en la monografía individual se cite lo contrario: deben indicar que se encuentran dentro del límite de la Desviación Estándar Relativa que es de 2%(DER ≤2%). En el caso de que la DER sobrepase dicho límite; se emplean los datos de 6 cromatogramas y el límite será mayor al 2%(DER > 2%).

Coleo.- Es el límite máximo permisible de asimetría del pico. Para un pico simétrico, el factor de coleo, T es la unidad (T=1); pero sólo que este valor aumenta cuando el coleo llega a ser más pronunciado (T > 1).

Este coeficiente se define como la relación que existe entre el ancho del pico al 5% de la altura del mismo partiendo de la línea base ( $W_{0.05}$ ), y el doble de la distancia,  $f$  medida en la base del pico.

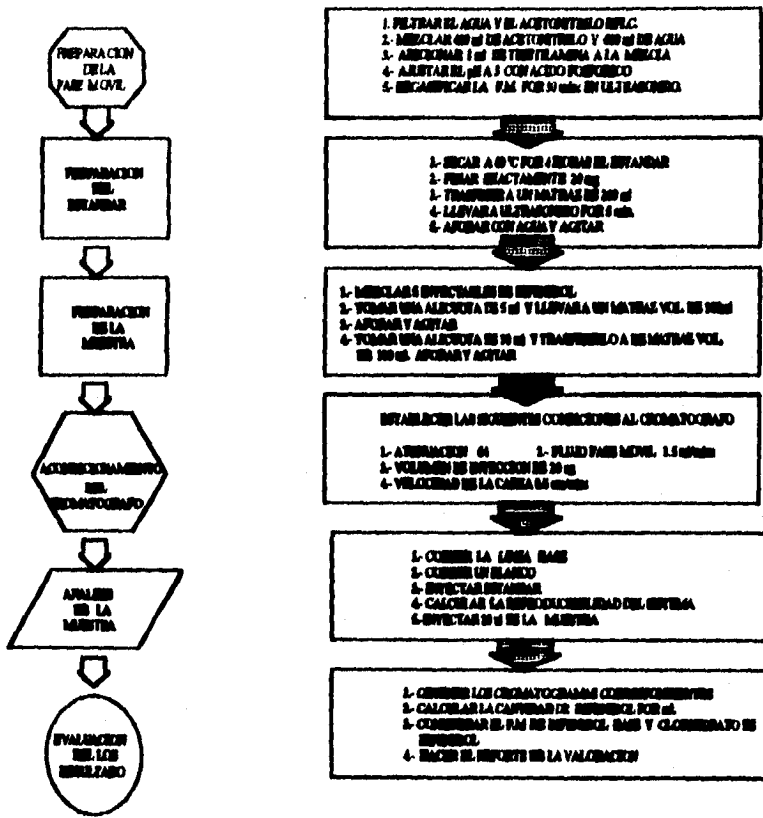
$$T = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

Resolución R.- Asegura la separación de los componentes que eluyen cerca, estableciendo así la eficiencia general de la separación del sistema, o cuando un estándar interno es usado.

### **CAPITULO III**

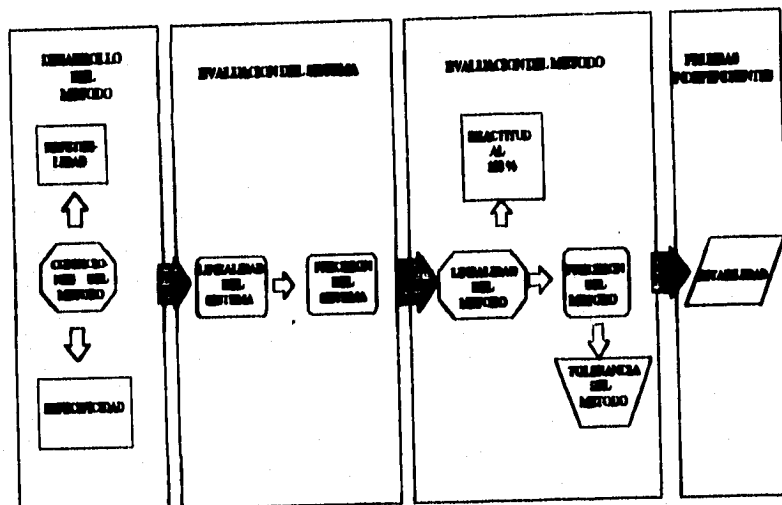
**PART E EXPERIMENTAL**

**3.1. DIAGRAMA DE FLUJO. CUANTIFICACION DE DIFENIDOL POR CLAR**





3.1.1. DIAGRAMA DE FLUJO. VALIDACION DEL METODO ANALITICO.



## **3.2. MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO**

### **3.2.1. MATERIAL DE LABORATORIO**

- Matraz Erlenmeyer de 500, 1000 y 2000 ml.
- Matraz volumétrico de 5, 10, 50 y 100 ml.
- Probeta de 100 y 250 ml.
- Vasos de precipitado de 30, 50, 100 y 250 ml.
- Embudo de separación de 250 ml.
- Embudo de filtración rápida
- Cajas de petri 8.5 cm. de diámetro
- Frascos viales para Cromatografía de Líquidos de Alta Presión con empaque
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 ml.
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, 5, 10 y 15 ml.
- Tubos de ensayo de 13 X100
- Pipetas Pasteur
- Espátula
- Agitador magnético
- Placa de 500 ml.
- Perla
- Microjeringas de 10 y 100 ul.
- Parafilm
- Jeringa de cristal con boca de metal de 10 ml. con émbolo de plástico

### 3.2.2. REACTIVOS

- Trinitratina para nitro:  $(\text{NO}_2)_3\text{N}$  (Merck)
- Acido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (J.T. Baker)
- Acetonitrilo Grado Cromatográfico  $\text{CH}_3\text{CN}$  (Merck)
- Tartrato de Sodio Grado Reactivo ( $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ) ( $\text{H}_2\text{O}$ )<sub>2</sub> (T. J. Baker)
- Fenol Grado Q.P. ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ ) (Merck)
- Acido d-Tartárico Grado Reactivo  $\text{HOOC}(\text{CHOH})_2\text{COOH}$  (J.T. Baker)
- Propilenglicol (1,2-Propanodiol) Grado Reactivo  $\text{C}_3\text{H}_8(\text{OH})_2$  (J.T. Baker)
- Alcohol Benzílico Grado Reactivo ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OH}$ ) (J.T. Baker)
- Acido Clorhídrico Grado Reactivo ( $\text{HCl}$ ) (J.T. Baker)
- Peróxido de hidrógeno 30% ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Sigma Quimical Co.)
- Hidróxido de Sodio Grado Reactivo ( $\text{NaOH}$ ) (Técnica Química)
- Solución pH=7 Reactivo para diagnóstico clínico. Basada en los "Buffers Certificados" de la National Bureau of Standards. (Beckman Instruments)
- Solución pH=4 Grado Reactivo para volumetría (Merck)
- Alcohol Metílico Grado Espectroscópico ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) (Merck)
- Estándar DMBS 34F3 Estándar Secundario. Difinidol clorhidrato ( $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO HCl}$ )
- Agua Destilada

### 3.2.3. EQUIPO

- Campana de Extracción Square de México
- Estufa de Secado con vacío J.M. Ortiz. Aparatos Eléctricos para Bacteriología y Química.
- Balanza Analítica Digital Mettler AE 160
- Equipo MILLIPORE para filtración (vidrio) para uso exclusivo con HA
- Membranas filtración para agua
- Equipo MILLIPORE para filtración de solventes orgánicos, uso membrana HF
- Cámaras con luz ultravioleta, larga y corta con adaptador visual
- Cromatógrafo de Líquidos LC: Módulo 1. Digital con funciones en pantalla Waters (Modelo 746)
- Columna LichroCART 250-4 HPLC-Cartridge. Lichrospher 100 RP-18(10 um) Merck
- Baño ultrasónico Branson 8200
- Espectrofotómetro DU-7 Beckman
- Agitador de Tubos Lab-Line Instruments, INC

### **3.3. METODOLOGIA**

#### **TECNICA ANALITICA**

La técnica analítica para cuantificar el clorhidrato de difenidol por CLAR involucra diversos factores que hay que considerar.

#### **Condiciones Químicas y Físicas**

##### **Instrumento**

- Bomba: Capaz de operar a 6000 psi
- Inyector: Adecuado con bajo volumen muerto
- Detector: Ultravioleta (225 nm) con un registrador adecuado
- Columna: Lichrocart 250-4 HPLC-cartridge, Lichrospher 100 RP-18 (10µm)

##### **Condiciones de Operación**

- Absorción: 64
- Flujo de trabajo: 1.5 ml/min
- Presión de la columna: 1000 psi
- Temperatura de la columna: T. Ambiente

-Volumen de inyección: 20 µl

-Fase móvil: Acetonitrilo : Agua : Tricloroacético 40:60:0.1 pH = 3.

(degasificar la fase móvil por 30 min. en ultrasonido)

-AUPS.0.16\*\*(24)

\*Algunos de los parámetros de operación quizá deban ajustarse para obtener un cromatograma satisfactorio. (como la atenuación, velocidad de carta, volumen de inyección)

\*\*Según optimización hecha a la técnica de MIKAMI, EICHI

#### **Preparación del Estándar de Referencia y la Muestra**

##### **Preparación del Estándar de Referencia:**

Transferir 20 mg de Clorhidrato de Difendol USP Estándar de Referencia exactamente pesado en un matraz de 200 ml (volumétrico). Adicionar agua y colocarlo en un baño ultrasónico por 5 minutos, añadir con agua y agitar. Esta solución contiene una concentración de 100 mcg/ml, de clorhidrato de difendol.

##### **Preparación de la Muestra:**

En un matraz de 100 ml alfeado agregar 5 mililitros de la muestra de Difendol, solución inyectable; adicionar agua, y agitar. Tomar 10 ml de la solución anterior y transferirlo a un matraz de 100 ml, adicionar agua; agitar y agitar. Esta solución contiene 100 mcg/ml de clorhidrato de difendol.

**Procedimiento:**

inyectar al cromatógrafo por separado, volúmenes iguales de 20 ul aproximadamente de la preparación del patrón de referencia y calcular el coeficiente de variación el cual no debe ser mayor del 2%, el factor de colmo no debe ser mayor de 2.0 y la eficiencia de la columna no debe ser menor de 1000 platos teóricos.

Una vez ajustados los parámetros de operación, inyectar al cromatógrafo por separado, volúmenes iguales(20 ul aproximadamente) de la preparación del patrón de referencia y de la preparación de la muestra. Obtener sus cromatogramas correspondientes y medir las respuestas de los picos principales.

Calcular la cantidad de Difendol por ml. de la solución inyectable por medio de la siguiente fórmula:

**Miligramos de Difendol por mililitro**

$$\frac{\text{AREA MUESTRA} \times \text{PESO DEL ESTANDAR} \times \text{CONCENTRACION NUMEROS}}{\text{AREA ESTANDAR} \times \text{AFORO} \times 100} = \frac{\text{SOLUCION} \times \text{SOLUCION} \times \text{P.M. DIFENDOL}}{\text{VOL. MUEST. ALIQUOTA} \times \text{P.M. MOL DIFEN.}}$$

### **3.4. EVALUACION DEL SISTEMA**

#### **3.4.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA**

La linealidad del sistema se determino construyendo una curva de calibración que comprendía las concentraciones de 60%,80%,100%,120% y 160% ; utilizando para su preparación la misma solución stock.Cada punto de la curva fue analizado por sextuplicado, además de que la linealidad del sistema fue analizada en 3 días .

**Criterio de aceptación de la gráfica respuesta vs. concentración**

$$r \leq 0.99$$

$$r \leq 0.98$$

$$C.V. \leq 1.5$$

#### **3.4.2. PRECISION DEL SISTEMA**

Esta prueba se efectuó analizando por sextuplicado una misma solución estándar correspondiente a el 100% empleado en la linealidad del sistema.

**Criterio de aceptación**

$$\text{Coeficiente de variación } C.V. \leq 1.5\%$$



### **3.5. EVALUACION DEL METODO**

#### **3.5.1. LINEALIDAD DEL METODO**

Se determinó analizando placebo al cual se le adicionó de manera independiente cantidades necesarias de clorhidrato de difenidol para obtener las concentraciones de 60%,80%,100%,120%, y 160% . Cada concentración fue analizada por sextuplicado y además fue analizada en tres días, bajo las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

**Criterio de aceptación de la gráfica cantidad adicionada vs. cantidad recuperada**

$$a \approx 1$$

$$b \approx 0$$

$$r \leq 0.99$$

$$r^2 \leq 0.98$$

**Promedio de recobro 98-102%**

**Coefficiente de variación C.V.  $\leq$  2%**

### **3.5.2. EXACTITUD AL 100%**

Se determinó por el análisis de 6 placebo cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de clorhidrato de difenidol para obtener la concentración de 100%.

Los placebo se analizaron por triplicado, bajo las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

**Criterio de aceptación:**

**Promedio de recobro 98 -102%**

**Coefficiente de variación C.V.  $\leq$  2%**

**Con un intervalo de confianza al 95%**

### **3.5.3. PRECISION DEL METODO**

#### **3.6. REPRODUCIBILIDAD**

Se analizó una muestra comercial de Difendol solución inyectable en la cual fue determinado por dos analistas, dos días distintos, y con el mismo sistema cromatográfico.

**Criterio de aceptación:**

**El coeficiente de variación total debe cumplir con los siguientes criterios . C.V.  $\leq$  2%**

### 3.7. ESPECIFICIDAD PARA METODOS INDICADORES DE ESTABILIDAD

- Se expuso el placebo y clorhidrato de difenidol a las siguientes condiciones:

MUESTRA	CONDICIONES	PERIODO
PLACENO CARGADO	LUE ULTRAVIOLETA	30 DIAS
RELACION INVERTIBLE	LUE ULTRAVIOLETA	30 DIAS
PLACENO CARGADO	pH DE 1 a 3 / 60°C	30 DIAS
	pH DE 10 a 13 / 60°C	30 DIAS
	en: 10% / 60°C	30 DIAS

Tabla No. 1 Especificidad para placebo y muestra.

Criterio:

Verificar que los productos de degradación y /o sustancias relacionadas no interfieran con la cuantificación del Clorhidrato de Difendol utilizando el método desarrollado. Ajustar las condiciones de operación para obtener la máxima resolución.

### **3.8. 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 pH y proporción de la fase móvil.

Las modificaciones hechas a las condiciones normales de operación fueron:

- Variación de pH de la fase móvil de pH 2.5 y 3.5
- Cambio en la proporción de fase móvil acetonitrilo: agua 50:50 y 70:30

### **3.9. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA**

Se determinó la estabilidad de la muestra realizando la muestra como indica la técnica analítica; y las condiciones fueron:

- Los análisis fueron efectuados por el mismo analista
- Las condiciones de operación y cromatográficas fueron las mismas
- La variable que se consideró para este análisis fue la temperatura ambiente y en refrigeración, por lo que las muestras se almacenaron a las condiciones indicadas, durante 24 horas, para posteriormente ser analizadas.

## **CAPTULO IV**

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1. RESULTADOS

#### 4.1.1. Especificidad para método indicado de estabilidad.

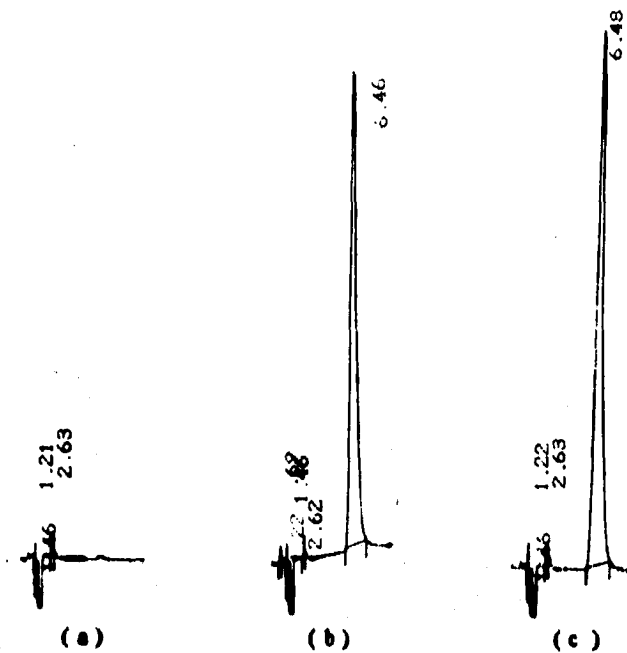
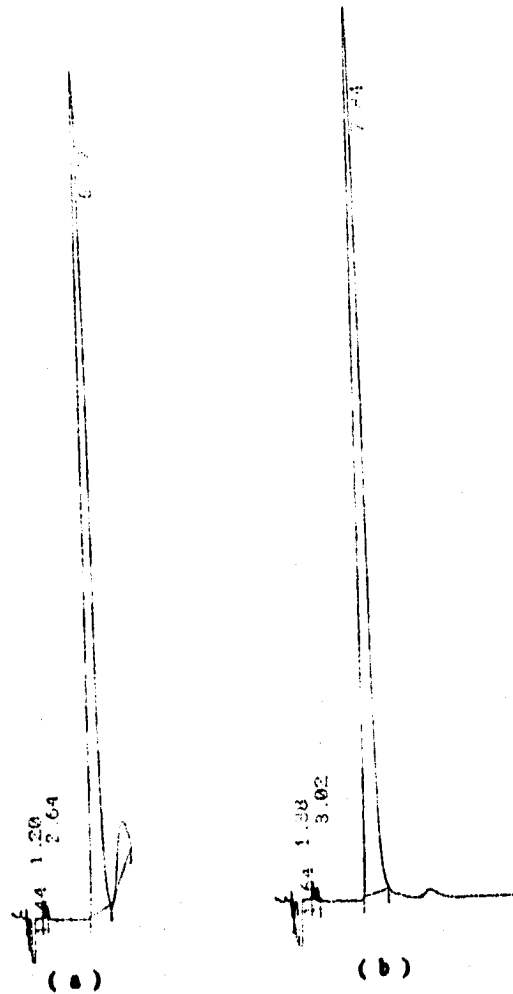
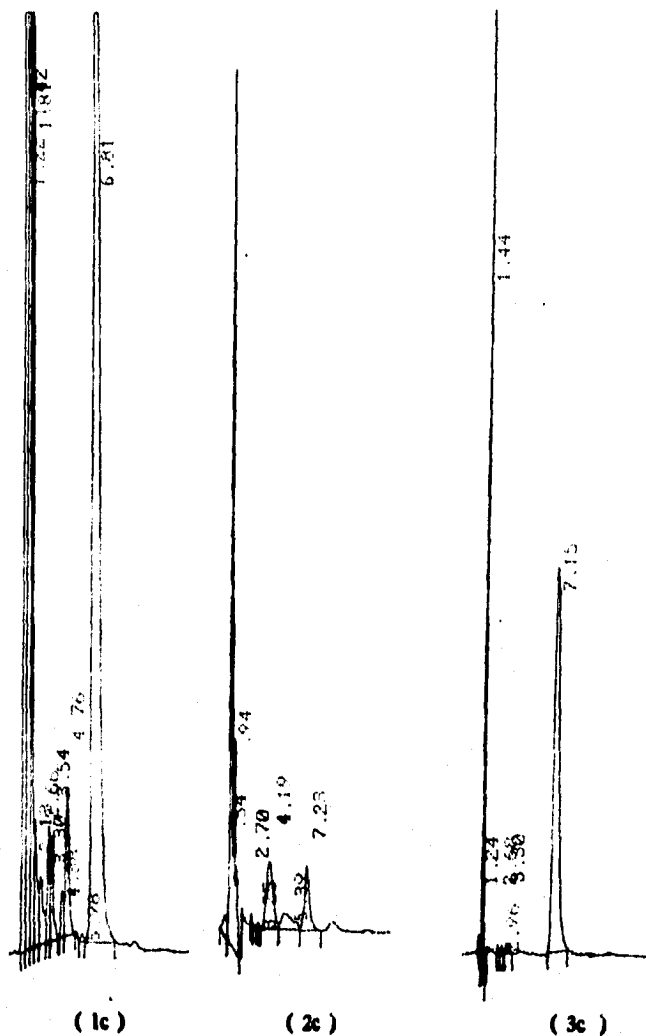


Fig. No. V Cromatograma típico del método a) blanco del Disolvente b) estándar de clorhidrato de Difenidol c) muestra



**Fig. No. VI Especificidad del clorhidrato de Difluidol**  
**a).- cromatogramas de pincocho cargado . Luz ultravioleta tiempo 20 días**  
**b).- cromatogramas de soluciones inyectable . Luz ultravioleta**



**Fig. No. VII** c) Cromatogramas de placebo cargado. 1c) pH de 1 a 2 / 60°C,  
 2c) pH de 10 a 12 / 60°C ,  
 3c) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / 60°C durante 20 días



#### 4.1.2. PRECISION DEL SISTEMA

Se analizó por sextuplicado 5 soluciones estándares de clorhidrato de difenidol. Se calculó el coeficiente de variación de las áreas bajo la curva.

CONCENTRACION	AREAS	C.V.	n
ESTABLECIDO	PROMEDIO		
40	1279918	0.48	6
80	1737168	0.52	6
100	215387.87	0.10	6
120	2640871.5	0.33	6
140	348488.5	0.21	6

n = el número de inyecciones

C.V. = es el coeficiente de variación

Tabla No. II Precisión del sistema cromatográfico: Análisis sextuplicado de 5 soluciones estándares

#### 4.1.3. LINEALIDAD DEL SISTEMA

Se determinó la linealidad del sistema para el Carhidrato de Difénidol, analizando soluciones correspondientes al 60%,80%,100%,120% y 160% del principio activo. Se determinó el coeficiente de regresión y de determinación. El análisis se realizó en 3 días diferentes. Los resultados obtenidos son los siguientes:

CONCENTRACION	MA	MA	MA
61.00	1190832.67	117880.67	1201376.33
	(1.87)	(1.83)	(1.23)
81.00	1189804.17	108601.17	1200407.87
	(0.85)	(0.16)	(0.96)
101.00	1907750	2041994.03	2005707.5
	(0.11)	(0.44)	(0.30)
121.00	2410041.25	247402.25	2003023.25
	(0.18)	(0.19)	(0.14)
162.00	3219549.33	3247996.67	3407844.33
	(0.07)	(1.04)	(0.08)

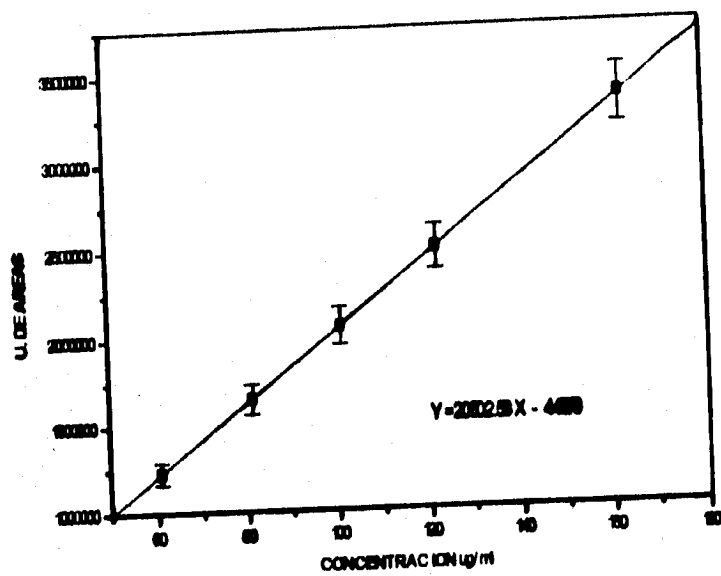
( ) es el coeficiente de variación de 6 inyecciones

Tabla. No. III Linealidad del Sistema Areas promedio y su respectivo coeficiente de variación en diferentes días

CONCENTRACION	AREA	PRODUCCION
68.97	1230076	1207722
81.30	1483824	1425184
101.00	2064015	2042587
121.00	2888518	2440019
162.60	3347479	3294884

Tabla No.IV. Promedio total de los 3 días y sus valores predictivos mediante la regresión lineal

**GRAFICA DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA EL CLORHIDRATO DE  
DIFENIDOL.**



**Gráfica No. 1. Linealidad del sistema del Clorhidrato de Difenídol en 3 diferentes días.**

PARAMETRO	UNIDAD	VALOR	INTERVALO		t-cal
			DE CONFIANZA AL	1- $\alpha$	
MODELO		95%			
PENDIENTE	m	20502.58	19586.49	a 21418.66	48.39
INTERCEPTO	b	-44576	-106734.5	a 57982.54	0.943
FACTOR DE CORRELACION	r	0.9969			
FACTOR DE DETERMINACION	r <sup>2</sup>	0.994			

Tabla No. V Datos estadísticos de los parámetros de la linealidad del sistema para el Clorhidrato de Difenhidramina

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SEMA DE CUADRADO	SEMA DE CUADRADO	F-calculada	F(F <sub>0.05</sub> )
REGRESION	1	$7.736 \times 10^{11}$	$7.736 \times 10^{11}$	2337.826	$7.9 \times 10^{-4}$
ERRORES DE REGRESION	13	$4.360 \times 10^8$	$3.350 \times 10^8$		
FALTA DE AJUSTE	3	$1.9230 \times 10^9$	$6.410 \times 10^8$	0.156	0.923
TOTAL PURO	18	$4.1286 \times 10^9$	$4.128 \times 10^9$		

Tabla No. VI Analisis de Varianza para la Linealidad del sistema del Clorhidrato de Difenhidramina.

#### 4.1.4. LINEALIDAD DEL METODO

Utilizando el método del placebo añadido, se determinó la linealidad del método para determinar Clorhidrato de Difendol, al cual se le adicionó de manera independiente cantidades necesarias del principio activo para obtener, las concentraciones del 60%, 80%, 100%, 120% y 160%, se tabularon los promedios de la cantidad adicionada contra la cantidad encontrada. El resultado obtenido fue el siguiente:

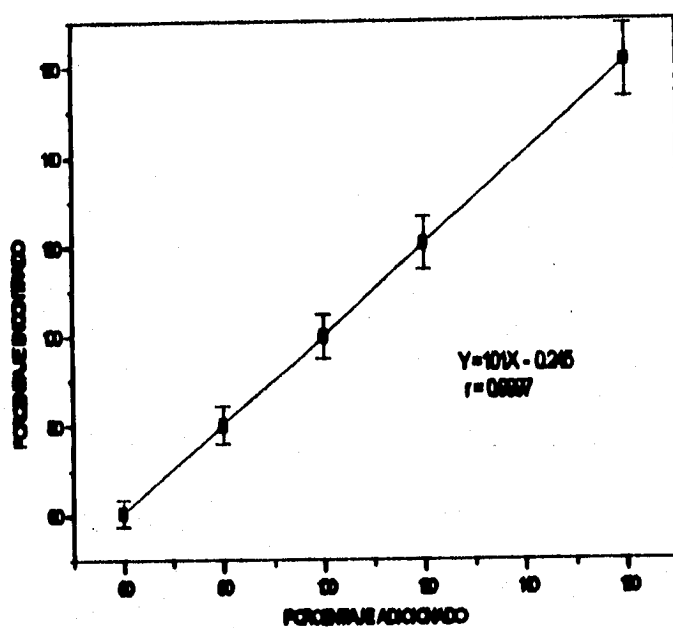
PORCENTAJE ADICIONADO	DIA 1	DIA 2	DIA 3
60	60.13 (1.02)	59.96 (0.17)	61.57 (1.08)
80	79.81 (1.02)	80.59 (0.11)	79.97 (0.21)
100	99.63 (0.87)	98.89 (1.09)	100.81 (0.82)
120	120.19 (2.74)	121.44 (0.10)	120.31 (0.83)
160	161.65 (4.10)	161.19 (0.20)	160.05 (0.21)

Tabla No. VII Areas promedio y su respectivo coeficiente de variación en 3 días diferentes.

CONCENTRACION	AREA	PREDICION
mg/l	PROMEDIO	
60	60.55	60.13
80	80.12	80.26
100	99.77	100.39
120	120.68	120.51
160	160.96	160.77

Tabla No. VII. Promedio total de las 4 determinaciones.

**GRAFICA DE LINEALIDAD DEL METODO PARA EL CLORHIDRATO DE  
DIFENIDOL**



**Gráfica No. 8 Linealidad del método para el Clorhidrato de Difenhidol**



PARAMETRO	VALOR	INTERVALO		
		DE CONFIANZA AL 95%	± m	
PENDIENTE	m	1.006	0.994 a 1.019	1.007
INTERCEPTO	b	-0.347	-1.030 a 1.144	0.304
FACTOR DE CORRELACION	r	0.9997		
FACTOR DE DETERMINACION	r <sup>2</sup>	0.9996		

Tabla No. IX. Datos estadísticos de los parámetros de la linealidad del método

DESCRIPCION	GL	SUMA DE CUADRADOS		VARIANZA	
		DE REGRESION	DE RESIDUOS	DE REGRESION	DE RESIDUOS
REGRESION	1	17907.78	17907.78	29329.91	$3.1 \times 10^{-9}$
RESIDUOS	19	7.797	0.413		
FALTA DE AJUSTE	3	1.695	0.565	0.926	0.534
TOTAL	20	19.579	0.826		

Tabla No. X. Análisis de Varianza para la Linealidad del método.

PARAMETROS ESTADISTICO	VALOR
Nº. DE MUESTRAS	22
MEDIA ARITMETICA DEL % RECUPERADO	100.404
DESVIACION ESTANDAR DEL % RECUPERADO	0.859
COEFICIENTE DE VARIACION	0.855

Tabla No. XI. Parámetros estadísticos para de la linealidad del método

LÍMITES DE CONFIANZA AL 95%	
PRUEBA t DE STUDENT t (cal.)	1.823
LÍMITE SUPERIOR	100.82 %
LÍMITE INFERIOR	99.928 %

Tabla No. XII. Límites de Confianza al 95% para la linealidad del método

#### 4.1.5. EXACTITUD AL 100 %

Utilizando el método de placebo añadido, se determino la exactitud del método para la determinación del clorhidrato de difenidol, utilizando placebos cargados con la sustancia de interés para obtener las concentraciones de 100%. Se calcularon el coeficiente de variación y el porcentaje recuperado con un intervalo de confianza al 95%. Los resultados obtenidos son los siguientes:

RECORRIDO	1º a 6	7 a 13	14 a 20	21 a 22
	100.79	99.61	100.59	100.16
	99.66	99.33	100.93	100.39
	99.54	99.34	100.78	100.38
	99.33	99.67	100.88	100.48
	100.48	100.46	101.84	
	99.88	100.78	100.13	

Tabla No. XIII Recorrido de 22 muestras de placebos cargados con Clorhidrato de difenidol al 100%

PARAMETROS ESTADISTICOS	
No. DE MUESTRAS	22
MEDIA ARITMETICA	100.24
DEVIACION ESTANDAR (D.E.)	0.828
COEFICIENTE DE VARIACION (C.V.)	0.836
CONFIDIBILIDAD	1.443

Tabla No. XIV Parametros estadisticos para la exactitud al 100%

LÍMITES DE CONFIANZA AL 95%	
ERRORES ESTÁNDAR	0.179
PRUEBA t DE STUDENT (n-1)	1.357
LÍMITE SUPERIOR	100.64 %
LÍMITE INFERIOR	99.87 %

Tabla No. XV Límites de confianza al 95% para el recobro al 100%

#### 4.1.6. PRECISION DEL METODO

##### REPRODUCIBILIDAD

Se determinó de una muestra homogénea cercana al 100% , analizada por dos analistas en dos días diferentes por triplicado , los resultados son los siguientes:

ANALISTA	VALORACION	VALORACION
DIA 1	100.5	100.79
	101.78	100.99
	100.64	100.89
DIA 2	99.99	100.56
	101.08	101.7
	100.69	101.63

Tabla No. XVI. Porcentajes de valoración de 2 analistas en 2 días diferentes en una muestra

homogénea

PARAMETROS ESTADISTICOS	VALOR
MODA ARITMETICA	100.93
DESVIACION ESTANDAR TOTAL	0.539
COEFICIENTE DE VARIACION TOTAL	0.534
REPETIBILIDAD DEL METODO	1.063 %
REPRODUCIBILIDAD	
ENTRE DIA / ANALISTA	1.063 %
REPRODUCIBILIDAD ENTRE ANALISTA	0.187 %

Tabla No. XVII Parámetros estadísticos para la reproducibilidad del método.

#### ANALISIS DE VARIANZA PARA LA REPRODUCIBILIDAD

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MODA DE CUADRADOS	F <sub>calc</sub>	F <sub>0.05 tab</sub>
ANALISTA	1	0.289	0.289	1.233	0.303
DIA/ANALISTA	2	0.469	0.234	0.768	0.5015
ERRORES	8	2.411	0.301		

Tabla No. XVIII Análisis de varianza para la reproducibilidad del método.

#### 4.1.7. TOLERANCIA

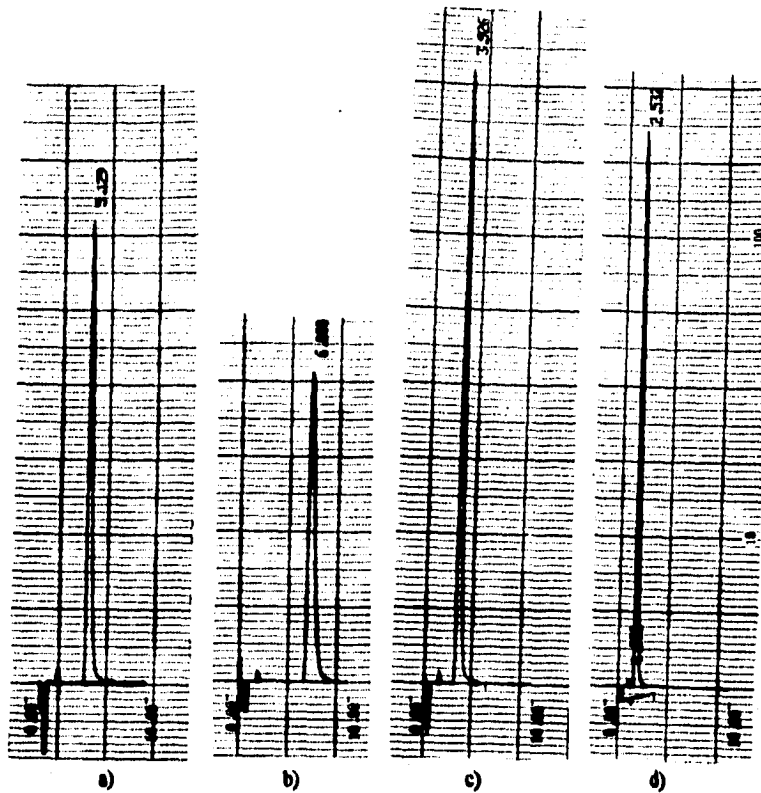
Se realizaron variaciones en pH, proporción de los componentes de la fase móvil para ver como influyen en el tiempo de retención, área del pico y el factor de colen. Los resultados son los siguientes:

VARIACIONES pH	TIEMPO DE RETENCION	AREA	FACTOR DE COLENO	COMMENTS DE VARIACION
2.5	8.12	1997577.75	1.120	0
3.5	6.9	1911550.25	1.25	0

Tabla No. XIX Variación de pH de la fase móvil

VARIACIONES COMPONENTE	TIEMPO DE	AREA	FACTOR	COMMENTS
70:30	DE		DE	
70:30	RETENCION		COLENO	VARIACION
50:50	3.9	1943446.25	1.10	0
70:30	2.5	2168890	1.0	0

Tabla No. XX Variación de la proporción de la fase móvil



**Fig. No. VIII** Cromatogramas de Tolerancia del Sistema para el Clorhidrato de Difeniol

a).- con fase móvil a pH 2.5

c).- fase móvil 50:50 :0.1 ACN:H<sub>2</sub>O: TEA

b).- con fase móvil a pH 3.5

d).- fase móvil 70:30 :0.1 ACN:H<sub>2</sub>O: TEA

**4.1.8. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA.**

		TEMPERATURA AMBIENTE		REFRIGERACION	
--	--	----------------------	--	---------------	--

		01	02	03	04
--	--	----	----	----	----

LOTE A	1	100.00	100.00	100.00	100.00
	2	100.00	100.00	100.00	100.00
	3	100.00	100.00	100.00	100.00
LOTE B	1	99.70	99.70	99.70	99.70
	2	99.70	99.65	99.70	99.60
	3	99.70	99.70	99.60	99.60

Tabla No. XXI. Resultados en % de valoración de la estabilidad de la muestra en condiciones de temperatura ambiente y refrigeración durante 24 horas.



#### 4.3. DISCUSION

En la optimización del método se realizaron investigaciones preliminares para obtener condiciones cromatográficas óptimas, como la temperatura de la columna : cambiando la temperatura de 45 °C según Mikami ( 24 ) a temperatura ambiente , este cambio se observó en el tiempo de retención del Clorhidrato de Difinidol (10.5 min. ), para esto se ajustó la velocidad de la fase móvil de 1.0 a 1.5 ml/min. Con este cambio se evita que la relación de acetonitrilo cambie y ocasiona variaciones en el tiempo de retención y por consecuencia en la precisión del sistema. Y se podrá utilizar este método en equipos de cromatografía de líquidos de alta resolución que no cuentan con sistemas de calentamiento de la columna.

En la figura No. VI se muestra un cromatograma típico del estándar de Clorhidrato de Difinidol , y un blanco de solvente

En la determinación del Clorhidrato de Difinidol se realizó usando una curva de calibración con estándar externo ya que el uso de un estándar interno no fue necesario , debido a que tanto el sistema cromatográfico, la preparación de la muestra y los excipientes y/o placebos de la misma no tuvieron efectos significativos sobre la respuesta del detector en la curva lineal.

La precisión del sistema se evaluó en términos del coeficiente de variación de 6 inyecciones de cada una de las soluciones controlando el 60%, 80%, 100%, 120% y 160% del estándar de Clorhidrato de Difinidol, como se observa en la tabla No. II el coeficiente de variación de cada concentración es menor al 0.70 y es mayor en la concentración del 60% ( C.V. de 0.68 ).

La gráfica No. 1 presenta la linealidad del sistema, en la cual se observa una relación lineal entre las concentraciones de Clorhidrato de Difendol y las unidades de área, en el rango de concentraciones de 61.08 al 162.88 ug/ml, obteniendo una ecuación de la línea recta de  $Y = 20502.52 X - 44576$ , con coeficiente de determinación igual a 0.994.

En la tabla No. V se presentan los parámetros estadísticos de la linealidad del sistema para verificar de que la ordenada pasa por el origen, con la siguiente Hipótesis de contraste:  $H_0: \alpha = 0$ ;  $H_1: \alpha \neq 0$  donde  $\alpha$  es el estimador del intercepto, así para un nivel de confianza del 95% ( $p = 0.05$ ) con  $n-2$  grados de libertad ( $t_{0.975, n-2} = 2.16$ ) se obtiene un  $t_{cal.}$  de 0.943 por lo cual  $t_{cal.} < t_{0.975, n-2}$  entonces se acepta la Hipótesis nula, y esto es interpretado que el intercepto pasa por el origen.

Para la verificación si el modelo de regresión es adecuado para la asociación entre la concentración del Clorhidrato de Difendol y la unidades de áreas, se utilizó el análisis de varianzas, como se muestra en la tabla No. VI, los parámetros de regresión y la falta de ajuste de la curva fueron probados con un nivel de confianza del 95% ( $p = 0.05$ ), obteniendo los siguientes resultados: Para la regresión se tiene una  $F_{cal.}$  de 2337.82, comparada esta con la  $F_{tab.} (F_{1, 13, 0.05}) = 6.4$  nos establece que  $F_{cal.} > F_{tab.}$  en la cual nos indica que existe una relación altamente significativa entre la concentración del Clorhidrato de Difendol y la respuesta como unidades de área. En el parámetro de falta de ajuste se tiene una  $F_{cal.}$  de 0.156 y una  $F_{tab.} (F_{3, 10, 0.05}) = 4.82$  en donde nos establece que  $F_{cal.} < F_{tab.}$  por lo tanto no existe la falta de ajuste en la curva lineal.

El otro estimador común para evaluar la linealidad de la curva es el factor de determinación  $r^2$  obteniendo en este caso un valor de 0.994.

En la linealidad del método donde se gráfica la cantidad adicionada de Clorhidrato de Difendol en placebo contra la cantidad de Clorhidrato de Difendol encontrado en los mismos, se obtiene los siguiente resultados: En la tabla No. X que la pendiente tiene un valor de 1.006 con sus límites de confianza al 95% de 0.994 a 1.019 y un intercepto de -0.247 con sus límites de confianza al 95% de -1.638 a 1.144 en donde podemos observar que tanto para la pendiente con un valor predictivo de 1 y el intercepto con un valor predictivo de 0 son incluidos esos valores en el intervalo de confianza al 95% como se muestra en la gráfica No. 4.5.1, la relación lineal de la cantidad adicionada contra la cantidad recuperada del Clorhidrato de Difendol y sus respectivos límites de confianza al 95% .

En la tabla No. XI, se tiene el análisis de varianza para la linealidad del método. En la regresión tenemos una Fcal. de 29329.91 y una Ftab. ( $F_{1,118,95}$ ) = 9.07 en la cual Fcal. > Ftab. y se establece que existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad encontrada, donde  $p = 0.01$ . Y en la falta de ajuste se tiene una Fcal. = 0.926 y una Ftab. ( $F_{1,118,95}$ ) = 6.55 en donde Fcal. < Ftab. por lo tanto no existe falta de ajuste a la relación lineal simple cantidad adicionada, cantidad recuperada con  $p = 0.05$ . Con respecto el factor de determinación se obtuvo un valor de 0.9995.

En la tabla No. XIII y XIV se presentan los datos estadísticos para la exactitud al 100% en 22 muestra de placebo cargados, en la cual se realizó la prueba de Hipótesis donde:  $H_0: \mu = 100\%$  y  $H_1: \mu \neq 100\%$  donde  $\mu$  = al valor real en la cual se utiliza una distribución muestral de t de Student con n-1 grados de libertad a un nivel de confianza del 95% obteniendo una t cal. de 1.357 y un t tab. ( $t_{21,95}$ ) = 2.080 donde t cal. < t tab. por lo que se acepta la Hipótesis nula interpretándose como la carencia en el método de error sistemático constante.

Para la reproducibilidad del método se presenta en la tabla No. XVIII el análisis de varianza para evaluación del efecto del analista sobre el método en dos días diferentes, como se observa para el

efecto del analista se obtiene una  $F_{cal} = 1.233$  y comparado con  $F_{tab.} (F_{1,2,0.05}) = 18.51$  donde  $F_{cal} < F_{tab.}$  implica esto que el método analítico es reproducible por los analistas.

Y con relación a efecto entre días se obtuvo una  $F_{cal} = 0.768$  con una  $F_{tab.} (F_{2,8,0.05}) = 4.46$  donde  $F_{cal} < F_{tab.}$  por lo tanto se interpreta como el método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

En la tolerancia del método en la cual se ensayo la variación en pH y la proporción de la fase móvil, en la tabla No. XIX y XX, se observa variaciones significativas tanto en el tiempo de retención como en el factor de colado indicando que estos dos parámetros deben ser bien controlados ya que una simple variación puede ocasionar una diferencia en los resultados.

En la estabilidad de la muestra como se observa en la tabla No. XXI la muestra no presenta una diferencia significativa en el tiempo de preparación y almacenado durante 24 horas a temperatura ambiente y refrigeración.

Con la realización del estudio estadístico y la evidencias presentadas para la determinación del Clorhidrato de Difendol por C.L.A.R. se establece una clara aceptación del método como el cumplimiento de su especificidad, precisión y exactitud. Por lo cual nuestra hipótesis es aceptada.

El objetivo de este trabajo fue alcanzado al optimizar y validar el método por C.L.A.R. por lo cual se sugiere como método oficial a la Norma IMSS clave 3112 y a la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos.

## **CAPTULO V**

## CONCLUSIONES

Se optimizó un método para cuantificar Clorhidrato de Difenhidol por C.L.A.R. que elimina los problemas existentes para separar e identificar los excipientes, productos de degradación y sustancias relacionadas. Por lo que:

Con base a los resultados obtenidos en cada uno de los parámetros desarrollados en la Validación y comparándolos con la bibliografía citada se concluye que la Técnica Analítica para cuantificar Clorhidrato de Difenhidol en solución inyectable por C.L.A.R. es:

- Lineal. Ya que observando los resultados obtenidos podemos constatar que se cumple con los requisitos de ordenada al origen ( b ), pendiente ( m ), coeficiente de correlación ( r ) y coeficiente de determinación (  $r^2$  ); tanto en las gráficas de linealidad del sistema como en la linealidad del método.

- Preciso. Se obtuvieron coeficientes de variación ( C.V. ) para la precisión del sistema menos de 1.5% y para la precisión del método menor al 2% con un recobro dentro de los límites establecidos del 98% - 102%.

- Exacto. Debido a que se obtuvo un coeficiente de variación ( C.V. ) menor al 2% y el porcentaje de recobro se encontró dentro de los límites de 98-102% establecidos.

- Específica. Se demostró la capacidad del método para separar el Clorhidrato de Difenhidol de diferentes productos de degradación; por lo tanto el método es específico para cuantificar al Clorhidrato de Difenhidol.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

En lo que se refiere a la tolerancia del método, los resultados indican que la muestra analítica almacenada a temperatura ambiente por 24 horas no se encontró diferencias significativas y por lo tanto la muestra es estable durante 24 horas de almacenaje a temperatura ambiente y refrigeración.

En cuanto a la Tolerancia, variando el pH y la proporción de la fase móvil, podemos observar que existe diferencia en los resultados promedio, esto son atribuidos a diversos factores como lo son el carácter polar que le confiere, al aumentar o disminuir uno de los dos disolventes constituyentes de la fase móvil o la variación en el pH de la misma como consecuencia.

Finalmente podemos concluir que la Técnica Analítica para Cuantificar Clorhidrato de Difendol en solución inyectable por C.L.A.R., es confiable ya que cumple con todos los requerimientos establecidos para la Validación.

Por lo anterior se propone incluir esta metodología en la Norma I.M.S.S. y en la Farmacopea Nacional, para la valoración de este producto, misma que puede ser utilizada en estudios de estabilidad.

## BIBLIOGRAFIA

1. AHFS. " DRUG INFORMATION " .Edited by American Hospital Formulary Service. USA.1993.
2. BLAU,K. " HANDBOOK OF ANALYTICAL DERIVATIVES FOR CHROMATOGRAPHY". Edited by Wiley. New York.1979.
3. CALVIN, J. "ADVANCES IN CHROMATOGRAPHY. Marcel Dekker, Inc. New York. 1987.
4. "CLARKE'S ISOLATION AND IDENTIFICATION OF DRUGS IN PHARMACEUTICALS, BODY FLUIDS, AND POST-MORTEM MATERIAL". 2nd. Edition.The Pharmaceuticals Press. LONDON. 1986.
5. CARDONE, J. MARIO; "DETECTION AND DETERMINATION OF ERROR IN ANALYTICAL METHODOLOGY". J.Assoc. off. Anal. Chem. 66(6):1267-1282. 1983.
6. CARDONE, J. MARIO; "DETECTION AND DETERMINATION OF ERROR IN ANALYTICAL METHODOLOGY. CORRECTIBLE SYSTEMATIC ERROR IN THE COURSE OF REAL SAMPLE ANALYSIS. I. Assoc. off. Anal. Chem.66(6):1283-1294. 1983.
7. CUADRO BASICO DE MEDICAMENTOS DEL SECTOR SALUD. MEXICO, D.F. 1989.
8. CUADRO BASICO INSTITUCIONAL. INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL. MEXICO, D.F. 1993.
9. DICCIONARIO DE ESPECIALIDADES FARMACUTICAS. 40a. Edición. MEXICO,D.F. 1994
10. EDWARDS,CM; " CHEMOTHERAPY INDUCED EMESIS MECHANISMS AND TREATMENT " . J.R. Soc. Med. 81: 658-662.1988.
11. FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS.6a. Edición.Ed. Secretaria de Salud. MEXICO, D.F. 1994.



12. GUERRA, JOHNNY; "VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS BY FDA LABORATORIES. *Pharm Tech*, 1: 74-84. 1986.
13. HAMILTON, R.F. "INTRODUCTION TO HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY". Edited by Chapman & Hall. LONDRES. 1978.
14. HORVATH, C. "HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY ADVANCES AND PERSPECTIVES". Edited by Academic Press. NEW YORK. 1980.
15. HOURN, G. "HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF ANALIZAPRIDE, A NEW ANTIEMETIC COMPOUND, AND ITS APPLICATION TO A DOSE-DEPENDENT PHARMACOKINETIC STUDY". *J. Pharm. Sci.*, 72(1):71-74. 1983.
16. KARGER, H.J. "AN INTRODUCTION TO SEPARATION SCIENCE". Edited by Interscience. NEW YORK. 1973.
17. KNAPP, D.R. "HANDBOOK OF ANALYTICAL DERIVATIZATION REAGENTS". Edited by Wiley. NEW YORK. 1973.
18. KNOX, J.H. "HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY". Edited by University Press. EDINBURGO. 1978.
19. KRULL, I.S. "DERIVATIZATION AND POST-COLUMN REACTIONS FOR IMPROVED DETECTION IN LIQUID CHROMATOGRAPHY/ELECTROCHEMISTRY". *J. Liq. Chromatogr.*, 8:2845. 1985.
20. LINGMAN, H. "FLUORESCENCE DETECTION IN HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY". *J. Liq. Chromatogr.*, 8:789. 1985.
21. MARTINDALE. "THE EXTRA PHARMACOPOEIA". Edited by The Pharmaceutical Press. LONDON, ENGLAND. 1993.
22. THE MERCK INDEX 11<sup>th</sup>. Edited by Merck and CO. Edition RAHWAY, N.J. 1989.

23. METODOS ANALITICOS DE VALIDACION. COMITE DE ELABORACION DE GUIAS OFICIALES DE VALIDACION DE LA DIRECCION GENERAL DE CONTROL DE INSUMOS PARA LA SALUD, S.R.A.
24. MIKAMI, EICHI. "RAPID DETERMINATION OF DRUGS IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY". *Jyokuhin Kenkyu*. 23:2,185-190. 1992.
25. MICHELSON, F. "PHARMACOLOGICAL AGENTS AFFECTING, EMESIS". *Drugs*. 43:295-315(part I) 445-465(part II).
26. MORTIMER, J.V. "LIQUID CHROMATOGRAPHY DISCUSSION SECTION". Edition Institute of Petroleum. LONDON. 1967.
27. OSOL, A. "THE UNITED STATES DISPENSARY". 27<sup>th</sup> Edition. Edited by J. B. Lippincott Company. PHILADELPHIA. 1960.
28. REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES. 18<sup>th</sup> Edition. Edited by Mack Publishing Company. PENNSYLVANIA. 1990.
29. ROSS, D.T. "QUANTITATION OF A NOVEL ANTIEMETIC (ADR-931) IN PLASMA AND URINE BY REVERSED-PHASE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC WITH FLOURESCENCE DETECTION". *J. Chroma. Biomed. Appl.* 566(1):257-265.
30. SHUMAKER, W.E. "LC METHODS DEVELOPMENT PROCEDURE A DESCRIPTION". Perkin-Elmer. Edited by Norwalk. 1978.
31. TAYLOR, JOHN. "VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS". *Anal. Chem.* 55(6). 1983.
32. TEWETT, M.B. "FIRST PAPER ON CHROMATOGRAPHY. Edited by Wocim. ESCHUWEGE. 1954.
33. THE UNITED STATES OF PHARMACOPEIA. "NATIONAL FORMULARY". 17<sup>th</sup> Edition. Edited by Publishing Co. PENNSYLVANIA. 1990.

34. WAYNE, W.D. "BIOESTADISTICA. BASE PARA EL ANALISIS DE LAS CIENCIAS DE LA SALUD. 3a. Edición. Editorial LIMUSA, MEXICO. 1989.

35. YOST, W.R. "INTRODUCCION A LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA PRACTICA". Ediciones Perkin-Elmer. U.S.A. 1981.

36. YOST, W.R. "THE MODEL LC-35 AS AN UNIVERSAL DETECTOR FOR LIQUID CHROMATOGRAPHY. APPLICATION STUDY-LCAS-36". The Perkin-Elmer Corp. NORWALK. 1975.

37. ROSENSTEIN, E. "DICCIONARIO DE ESPECIALIDADES FARMACEUTICAS PLM". S.A. de C.V. 3a. Edición. MEXICO. 1992.