UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"

DESARROLLO DE UNA METODOLOGIA POR CROMATOGRAFIA DE GASES PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE DINITRATO DE ISOSORBIDE EN TABLETAS, VALIDACION Y COMPARACION CON LA TECNICA COLORIMETRICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

JAVIER PEREZ BAEZ

EN COLABORACION CON

MARIA DEL ROCIO CADENA CORONA

DIRECTOR DE TESIS:

Q. F. B. NORMA TRINIDAD GONZALEZ M.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO 1985

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

I	Introducción y objetivos.	1
II	Generalidades.	
	2.1 Monografía del fármaco	8
	2.2 Farmacología	13
	2.3 Cromatografía de gases.	18
	2.4 Validación de métodos analíticos.	30
III	Parte Experimental.	
	3.1 Equipo y sustancias.	35
	3.2 Desarrollo de la metodología por Cromatografía de gases.	36
	3.3 Validación del método desarrollado.	52
	3.4 Análisis Espectrofotométrico de Dinitrato de Isosorbide en tabletas.	60
	3.5 Estudio Estadístico comparativo.	61
IV	Resultados	
	4.1 Metodología desarrollada por C.G.	63
	4.2 Validación del método.	105
	4.3 Análisis Espectrofotométrico y estudio Estadístico comparativo.	123
V	Discusión y Conclusiones.	
	5.1 Discusión del método desarrollado.	125
	5.2 Conclusiones.	130
	Bibliografía.	131

I.- INTRODUCCION Y OBJETIVOS

1.1 I N T R O D U C C I O N

Dentro de las necesidades del Laboratorio de Análisis - de Medicamentos del IMSS, está la investigación de una metodología rápida y sensible para la cuantificación de Dinitrato de Isosorbide (DNI) en tabletas, que se emplea en pa - cientes con angina de pecho e insuficiencia coronaria.

Se ha reportado[23] que la frecuencia de ataques anginales y la necesidad de nitroglicerina, son reducidos con dosis orales diarias de DNI; aunque ésto último no ha sido plenamente establecido.

La cromatografía en fase gaseosa (C.G.) proporciona - alta sensibilidad, rapidéz y buenos resultados cuantitativos en el análisis de medicamentos, es por ello que canalizamos la investigación hacia éste método.

La necesidad de desarrollar una tecnología propia y adecuada para el análisis de éste fármaco, está en función de - que la mayor parte de la información para la cuantificación de DNI está enfocada a fluídos biológicos; la información relacionada a medicamentos no se ha reportado por tratarse de informes privados y/o patentados, excepto la publicada por - Prue y colaboradores[19].

Por otra parte, la USP XX (1980)[26] reporta una metodología polarográfica, y éste Laboratorio carece del equipo necesario, a saber: polarógrafo, celdas, electrodos, etc., - pero sí dispone de suficiente equipo cromatográfico de gases.

Otra edición del mencionado compendio[25] dicta un método colorimétrico, pero en la práctica se ha comprobado que es - experimentalmente laborioso, riesgoso y puede ser interferido por sustancias con grupos nitro, lo que indica poca especificidad[19].

Considerando lo anterior, y que éste fármaco pertenece al cuadro básico de medicamentos del Sector Salud, podemos - justificar la búsqueda de la metodología mencionada como - tal, o como una alternativa en caso de equipo espectrofotométrico saturado o descompuesto, carencia de reactivos para su ejecución por el método colorimétrico.

El método polarográfico requiere de equipo especial con el que no cuenta el Laboratorio, además de ser interferido - por radicales nitro orgánicos e inorgánicos.

Por otro lado, existen referencias bibliográficas que - mencionan los parámetros ó condiciones más importantes para desarrollar métodos de análisis, por C.G., las cuales los reportan desde 1971 con el trabajo de Davidson y Dicarlo[6] donde se proponen dos tipos de fases estacionarias, la SE-30 (goma de dimetilpolisiloxano ó dimetil silicona) y Dexsil - 300 GC (carboranesiloxano[15,18]). Se obtuvieron buenos resultados en separaciones de compuestos como el tetranitrato de-eritritol, Dinitrato de Isosorbide y di, tri y tetranitrato de pentaeritritol, seleccionando dos temperaturas de trabajo para cada columna, o bien empleando temperatura programada. El procedimiento permitió sensibilidades de nanogramos y no hubo interferencias; se emplearon detectores de ionización - de flama y captura de electrones.

Posteriormente en 1972, Rossel y colaboradores[20] deter -

minaron nitratos de isosorbide, glicerol e isomanide por - C.G. empleando fase XE-60 (goma de nitrilosilicona GE[15]) - al 3% y fase QF-1 (trifluoropropilmetilpolisiloxano[18]) al - 3.5% trabajando isotérmicamente y empleando detector de captura de electrones e ionización de flama. Se obtuvieron mejores resultados con la fase QF-1; en ambos casos se utilizó - columna de vidrio de 6 pies de largo por 2 mm de diámetro interno, aunque los tiempos de retención fueron de aproximadamente 30 minutos. Para el detector de ionización de flama se empleó un flujo de H_2 de 18 ml/min y de aire, de 370 ml/min, en todos los casos se empleó acetato de etilo como disolvente.

Al año siguiente, estos mismos investigadores[21], determinaron DNI y nitroglicerina en plasma humano. Aquí nuevamente emplearon fase líquida QF-1 al 3.5% sobre Chromosorb Q - de 60-80 mallas en una columna de vidrio de 6 pies de largo por 2 mm de diámetro interno y emplearon un detector de captura de electrones. La cuantificación se llevó a cabo usando estándar interno, obteniendo finalmente una sensibilidad alrededor de 0.5 ng/ml isotérmicamente, para ambas sustancias.

En 1977, Chin A. y colaboradores[4] determinaron cuantitativamente DNI y dos nitratos en plasma, para lo cual utili - zaron fase SE-30 al 30% sobre chromosorb GQ2 de 60-80 mallas en una columna de vidrio silanizada de 1.83m por 2 mm de diámetro interno, se utilizó detector de captura de electrones, se empleó el método de estandarización externa ó curva de calibración. Se trabajó isotérmicamente; recomiendan empacar - muy bien la columna para asegurar muy buenos resultados, detectando hasta nanogramos.

De los métodos descritos anteriormente, ninguno tenía -

la sensibilidad deseada para las tres sustancias relacionadas, DNI, 2-mononitrato de isosorbide (2-MNI) y 5-mononitrato de isosorbide (5-MNI), aparentemente debido a la interacción de éstas sustancias con el soporte sólido parcialmente expuesto. La sensibilidad deseada se obtuvo cuando los sitios activos en el soporte se redujeron por medio del uso de un empaque del 30% de fase SE-30, un porciento no usual - de fase líquida.

Ese mismo año, Malbica J. y colaboradores[13] determinaron nanogramos y picogramos de DNI en plasma; describen un - método rápido, explícito, sensitivo y reproducible para determinaciones de rutina. Emplearon fase QF-1 al 3% en chromosorb Q en una columna de vidrio de 120 cm de largo por 4 mm de diámetro interno y utilizando un detector de captura de - electrones a 175°C, obteniendo sensibilidad de nanogramos - programando la temperatura. Para conseguir alta sensibilidad se inyectaron varias cantidades de solución estándar de DNI hasta que la altura del pico es constante y la más grande. El DNI se extrae del plasma con benceno, resuspendiendo en - acetato de etilo para la inyección.

También en 1977, Prue B. y colaboradores[19] describieron un método para determinar DNI en tabletas, empleando fase - OV-210 (idéntica a la fase QF-1[18]) al 3% sobre chromosorb, en proceso isotérmico; como estándar interno utilizaron gliceril tributirato. Las condiciones cromatográficas son las - siguientes:

Temperatura de la columna = 140°C.
Temperatura del inyector = 140°C.
Temperatura del detector = 175°C.

(detector de ionización de flama)

Flujo de gas portador N_2 = 20 ml/min

Columna de vidrio de 0.9 m de largo por 4 mm de diáme - tro interno.

Encontraron que no hay interferencia de los dos productos de degradación (2-MNI y 5-MNI) y que el procedimiento es específico en comparación con el método polarográfico descrito por la USP XX[26], que carece de especificidad.

Este reporte describe : El método colorimétrico para - la determinación de DNI en tabletas está descrito en la USP XIX[25], pero recientemente ha sido reemplazado por un método polarográfico; éste es sensitivo y relativamente rápido pero como el método colorimétrico al cual reemplaza, carece de especificidad, la presencia de dos posibles productos de degradación mencionados anteriormente interfieren en la cuantificación de DNI.

Se emplea un sistema de extracción de dos fases: éter - etílico/agua en un recipiente hermético y adecuado, agitándose mediante un agitador mecánico durante una hora; después - de ligero reposo se inyectan dos microlitros de la fase orgánica en el cromatógrafo ya acondicionado (se hace lo mismo con el estándar de referencia).

Adicionalmente en 1979, Rossel y colaboradores[22] determinaron DNI y sus dos mononitratos por C.G. Este método determina simultáneamente DNI, 2-MNI y 5-MNI, en una columna - capilar empacada con fase OV-17 (50% fenil-50% metilpolisiloxano[18]) de 25 m de largo. Se obtiene sensibilidad de fracciones de nanogramos en plasma humano con un detector de captura de electrones.

Una recopilación de referencias similares a lo anterior fué publicada en 1978 por Kiyushi[11] y al igual que Florey en 1975[8] proporcionan buena información adicional.

Así, con las investigaciones reportadas como base, se puede iniciar el desarrollo de la metodología por C.G. apoyándose también en bases teóricas y prácticas sobre el tema, y requerimientos mínimos aceptados para la validación.

1.2 O B J E T I V O S

a) Desarrollar una metodología específica para el análisis cuantitativo del fármaco Dinitrato de Isosorbide en tabletas, por Cromatografía de Gases.

b) Validar la metodología desarrollada mediante la evaluación de la especificidad, linearidad, precisión, exactitud del método y la comparación con el método colorimétrico oficial reportado en la USP.

II.- G E N E R A L I D A D E S

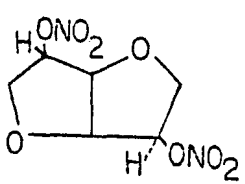
2.1 MONOGRAFIA DEL FARMACO

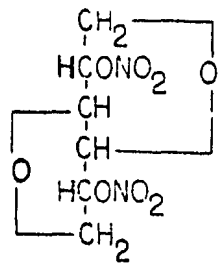
2.1.1 Nombre: Dinitrato de Isosorbide; 1,4:3,6-Dianhídro-d-glucitol dinitrato; 1,4:3,6 Dianhídrosorbitol 2,5-dinitrato; Dinitrosorbide. En el Chemical Abstract: Glucitol : 1,4:3,6-dianhídro, ("dinitrato,D"). 87-33-2.

2.1.2 Nombres comúnes: Isordil, Isorbid, Vascardin, - Carvanil.

2.1.3 Fórmula y peso molecular (PM) :

$C_6H_8N_2O_2$





PM = 236.14 g/mol.

2.1.4 Apariencia, color y olor: Polvo cristalino blanco sin olor. Diluído es una mezcla seca de Dinitrato de Isosorbide con lactosa, manitol, u otro excipiente inerte que - permite manejo seguro, debido a que es explosivo por percusión o calentamiento. La mezcla usualmente contiene aproximadamente 25% de DNI.

2.1.5 Intervalo de fusión: De 70-71°C, otros reportan - 50.5-52.0°C, probablemente debido a polimorfismo; el rango - de temperatura de fusión no cambia significativamente con variaciones en el índice de calentamiento de 1 a 5 °C/min.

2.1.6 Solubilidad : Las siguientes solubilidades han sido determinadas para el DNI a temperatura ambiente:

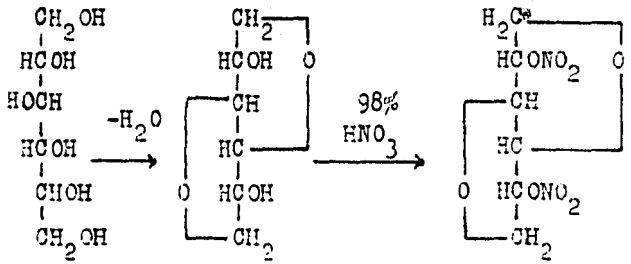
SOLVENTE		Index Merck[17]	U.S.P.[26]
Agua	0.5 mg/ml	poco soluble	muy poco soluble
Acetona	1.0 g/ml	libremente soluble	muy soluble
Alcohol	24.0 mg/ml	libremente soluble	poco soluble
Eter	43.0 mg/ml	libremente soluble	-
Cloroformo	330.0 mg/ml	-	libremente sol.
Hexano	1.0 mg/ml	-	-

T A B L A N° I
Solubilidad del DNI

2.1.7 Espectro UV: El DNI no da pico máximo en la región de longitud de onda de 400 nm a 220 nm, pero absorbe luz U.V. La absorción empieza aproximadamente a 290 nm y continuamente se incrementa como disminuye la longitud de onda.

En alcohol USP a una concentración aproximada de 0.1 mg/ml se obtiene una absorbancia de 0.1 a 250 nm, y una absorbancia de 1.5 a 220 nm.

2.1.8 Síntesis: Se ha sintetizado a partir de L-sorbosa y D-glucitol (Sorbitol). Se hidrogena la L-sorbosa seguida por la deshidratación para obtener isosorbide. Entonces se prepara el éster nitrato de isosorbide por nitración en mezcla ácida de ácido acético-ácido nítrico-anhídrido acético. Con un rendimiento del 85-90%. En otra síntesis de Isosorbide, se preparó por deshidratación del glucitol, posteriormente se obtiene el dinitrato por tratamiento del isosorbide con diferentes agentes nitrantes ácido HNO_3 al 98%, con un rendimiento del 83%; una mezcla de HNO_3 y H_2SO_4 de 30 y 60% respectivamente da un rendimiento del 65%, ver fig. N° 1



D-Glucitol Isosorbide Dinitrato de isosorbide

F I G U R A N° 1
Síntesis del DNI

2.1.9 Degradación y estabilidad. En el estado sólido el DNI demostró ser estable a temperatura de 45°C por un período de 12 meses, y a temperatura ambiente por un período de 60 meses.

En un medio ácido bajo condiciones fuertemente hidrolíticas, el DNI se degrada en un paso formando el 2-mononitrato y el 5-mononitrato de isosorbide como intermediarios y siendo el producto final el Isosorbide y nitratos inorgánicos, por ejemplo, una descomposición del 25% resulta del DNI con HCl 1.0 N a 100°C durante una hora. La descomposición en medio básico a veces es más rápida, por ejemplo, en NaOH 1 N calentado a 100°C durante una hora, la descomposición es aproximadamente del 45%.

2.1.10 Ensayo.

a) Análisis infrarojo.

Los procedimientos de espectrometría infrarroja usados -

para la estimación de ésteres de nitrato, han sido adaptadas para la determinación de DNI en tabletas ó inyectables. El método consiste en la simple extracción de DNI de su forma farmacéutica con $HCCl_3$ el cual puede ser sustituído por tetracloruro de carbono en estos procedimientos.

b) Análisis espectrofotométrico.

Se ha reportado el análisis espectrofotométrico del DNI por reacciones de coloración, diazotación y complejación. También se determina con ácido fenoldisulfónico con técnica detallada por la USP XIX[25], para formas farmacéuticas, y otras técnicas adecuadas para nitratos y ésteres de nitrato.

c) Análisis cromatográfico gas-líquido.

Los métodos colorimétricos e infrarojos mencionados anteriormente son virtualmente no específicos. Esto es una desventaja, especialmente en casos donde mezclas de ésteres están presentes debido a desnitración parcial de las moléculas del DNI. Los métodos cromatográficos gas-líquido no presentan ésta dificultad, presentan separación adecuada, y al mismo tiempo mantienen sensibilidad en la detección.

Estos métodos han sido reportados desde 1972, con resultados satisfactorios[4,6,8,11,13,19,20,21 y 22].

d) Análisis polarográfico.

Se ha reportado un método polarográfico en la USP[26], el cual es sensitivo y relativamente rápido, pero como el método colorimétrico al cual reemplazó, carece de especificidad; la presencia de los dos posibles productos de descomposición interfieren en la cuantificación de DNI. Esto fué determinado con mezclas sintéticas de DNI, 2-mononitrato de isosorbide, 5-mononitrato de isosorbide y nitrato inorgánico[19], obte

niéndose que los productos de descomposición y el nitrato - inorgánico son cuantificados como DNI.

2.2 F A R M A C O L O G I A

Existen muchos fármacos[9,12] que se han utilizado como - drogas antianginosas, pero son pocas las que realmente son - útiles; generalmente se clasifican como vasodilatadores coronarios y drogas antianginosas. De los vasodilatadores coronarios se consideran los siguientes:

a) Los nitritos
b) Los alcaloides bencilisoquinolínicos del opio
c) Las xantinas
d) El alcohol

De las drogas antianginosas (recientes):

a) Los bloqueadores adrenérgicos beta.

b) Vasodilatadores no nitritos como las pirimidopirimidinas y los benzofuranos, derivados de la dehidropiridina, de la piperazina, oxidiazolinas y derivados de la piperidina.

De acuerdo con lo expresado, el grupo más importante es el de los nitritos, que también son los más utilizados. Comprenden una serie de compuestos de origen sintético, algunos inorgánicos, pero la mayoría son orgánicos alifáticos. Pueden clasificarse en tres subgrupos:

a) Nitritos orgánicos o ésteres nitrosos: Nitrito de amilo (líquido volátil).

b) Nitritos inorgánicos: Nitrito de sodio (sólido soluble).

c) Nitratos orgánicos: Esteres nítricos como la Nitroglicerina, trinitrato de glicerilo, tetranitrato de pentaeritri -

tol y dinitrato de isosorbide (sólido poco soluble).

Acción Farmacológica: La acción farmacológica fundamental de los nitritos es la relajación del músculo liso, en especial de pequeños vasos. Dentro del sistema cardiovascular, en el corazón, pueden provocar taquicardia en animales y hombre cuando se produce un descenso en la presión arterial esto ocurre especialmente con los nitritos que producen una rápida caída de presión. A las dosis comúnes y aún algo mayores, el miocardio no es afectado directamente por los nitritos; en el hombre hay disminución discreta del volumen minuto cardíaco debido a vasodilatación venosa con estancamiento sanguíneo, disminución del retorno venoso y del volúmen sistólico; el trabajo cardíaco se reduce, así como el volúmen cardíaco.

La acción vasodilatadora es la más importante y puede observarse en varios territorios vasculares como : piel, área esplácnica, circulación periférica y cerebral, retina.

En la presión arterial, por acción de los nitritos, se disminuye, lo que puede verse en animales en forma manifiesta y en el hombre normal e hipertenso. En éste último caso, la respuesta es algo mayor en valores absolutos, pero el % de reducción de la presión arterial es igual que los normotensos. El descenso de la presión arterial se compensa parcialmente por una vasoconstricción refleja a partir de los baroreceptores.

En las arterias coronarias, los nitritos poseen una potente acción vasodilatadora, que da lugar a un aumento pronunciado del caudal sanguíneo coronario. En el hombre, en especial el DNI, aumenta el flujo coronario debido a vasodila-

tación comprobada por arteriografía coronaria. Además, los - nitritos son drogas antianginosas que por absorción sublin - gual provocan rápidamente la terminación del ataque anginoso además son capaces de prevenir las manifestaciones isquemio- cárdicas producidas por el esfuerzo en pacientes anginosos ; son capaces de aumentar la tolerancia al ejercicio en todos los casos y disminuir la izquemia.

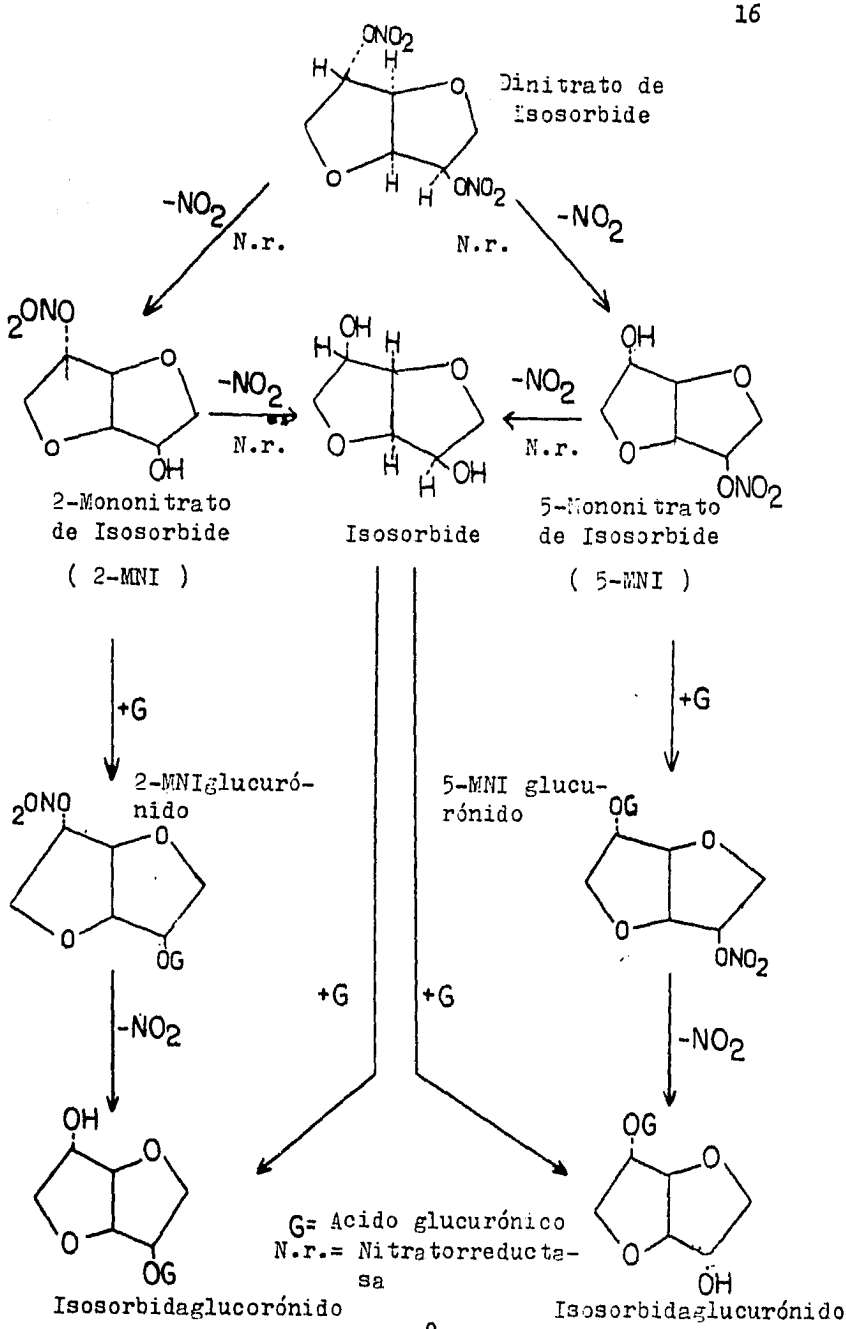
Farmacocinética

a) Absorción (vía sublingual): Se absorbe fácilmente el Dinitrato de Isosorbide -sólido poco soluble- , no pasa por el hígado -donde se degrada- por lo que es bien activo.

b) Absorción (vía bucal): La absorción del Dinitrato de Isosorbide es lenta ya que es un sólido poco soluble. Se absorbe lenta y parcialmente en el intestino cuando se administra en forma de tabletas. En caso de tabletas de acción sostenida, de lenta desintegración, sus efectos pueden ser más prolongados que con las tabletas comúnes, pero poco potentes

c) Destino y Excresión: Una vez absorvidas las drogas pasan a la sangre, luego a todos los tejidos especialmente el corazón, vasos, pulmón, riñón e hígado y sufre la biotransformación en el hígado. El proceso fundamental es la desnitración ó deesterificación por acción de una enzima, la nitrato reductasa hepática. El DNI se transforma en mononitrato de isosorbide y luego en isosorbide, metabolitos que se - unen al ácido glucorónico formando glucorónidos, todos estos metabolitos se excretan en la orina.

El destino ulterior del ión nitrito formado no se conoce exactamente, pero se presume que es transformado en amonía co que a su vez es metabolizado.



F I G U R A N° 2
Biotransformación del DNI

Farmacodinamia

a) Acción Farmacológica del DNI. Su acción fundamental es la relajación del músculo liso, en especial de los pequeños vasos; es decir, la vasodilatación arteriolar y capilar es - la más importante. Esta vasodilatación es más potente en las arterias coronarias; aumenta el flujo coronario y termina el ataque de angina de pecho, y es capaz de prevenir manifestaciones isquémicas miocárdicas, al mejorar la circulación del miocardio isquémico desaparece la anoxia responsable del dolor. Con el DNI los efectos anteriores duran hasta 4 horas - por vía bucal, más que con otros nitratos.

b) Modo de acción antianginosa.

- Incrementa el flujo coronario por vasodilatación, especialmente de las arterias colaterales a la zona isquémica.

- La vasodilatación es de origen periférico y se debe a una acción directa músculotrópica sobre los vasos por relajación de las fibras musculares lisas (que también ocurre - en otros órganos).

- Disminuye el trabajo cardíaco y restablece el equilibrio entre el consumo y el suministro de oxígeno, con lo que se alivia el dolor isquémico. En consecuencia el consumo de oxígeno es lo más importante.

c) Mecanismo de acción.

Se ha postulado la existencia de un receptor para los - nitratos orgánicos a nivel del músculo liso de los vasos, - que contiene al grupo sulfhidrilo, capaz de reducir el nitrato a ión nitrito activo (relajación muscular), mientras - que el receptor toma la forma disulfuro (receptor inactivo).

2.3 CROMATOGRAFIA DE GASES

Definición de Cromatografía: La Cromatografía[14] es un método físico de separación basado en la distribución de la muestra entre dos fases. Una de ellas es la estacionaria, de extensa superficie, empacada dentro de una columna ó dispositivo apropiado. Esta puede ser un sólido (mineral u orgánico) ó una delgada película líquida que recubre al sólido. La otra fase consiste en un gas ó líquido que percola ó circula sobre la fase estacionaria y alrededor de la misma; ésta se denomina fase móvil. Las bases[15,24] para la separación cromatográfica son la distribución ó reparto de una muestra ó soluto entre dos fases en contacto.

Sistema Cromatográfico de gases: En la Cromatografía de gases, la fase móvil se denomina gas portador, ya que es un gas inerte cuya finalidad es transportar las moléculas de la muestra a través de la columna. Los soportes, tales como carbón vegetal, gel de sílice, y tamices moleculares (Zeolitas sintéticas) son las fases estacionarias en la cromatografía gas-sólido.

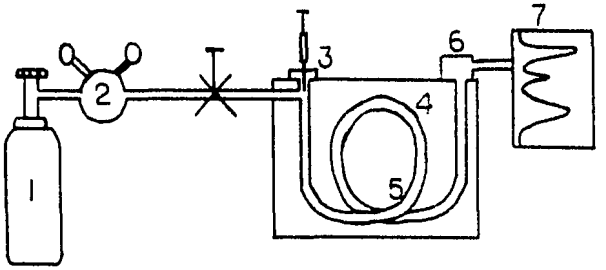
Algunos líquidos orgánicos de alto punto de ebullición, constituyen la fase estacionaria en la cromatografía gas-líquido. La fase líquida se extiende como una película delgada sobre un sólido inerte llamado soporte sólido. La base para la separación es el reparto de la muestra dentro ó fuera de esta película líquida.

En el proceso cromatográfico[14] la fase estacionaria está empacada dentro de una columna; el gas portador fluye con

tinuamente a través de la columna. Las moléculas de la muestra se distribuyen ó equilibran entre el gas portador y la fase orgánica líquida. Las muestras que son más solubles en la fase líquida permanecen menos tiempo en el gas portador en movimiento y, por tanto se desplazan con más lentitud, a través de la culumna.

Las partes básicas de un sistema cromatográfico de gases son : (ver figura Nº 3)

a) Tanque de gas portador.
b) Controlador de flujo y regulador de presión.
c) Puerta de inyección (entrada de la muestra).
d) Columna (sitio donde se lleva a cabo la separación) y horno.
e) Detector (con los componentes electrónicos necesarios)
f) Registrador (cartas).
g) Termostatos para inyector, horno y detector.



F I G U R A Nº 3
Sistema Cromatográfico de gases

1.- Tanque de gas
2.- Válvula de dos pasos
3.- Puerta de inyección
4.- Horno
5.- Columna
6.- Detector
7.- Registrador

Los resultados que se obtienen en un análisis por cro - matografía de gases constituyen un cromatograma, el cual es el registro gráfico donde se indican los componentes y el - grado ó magnitud de concentración en que estaban presentes - inicialmente en la muestra.

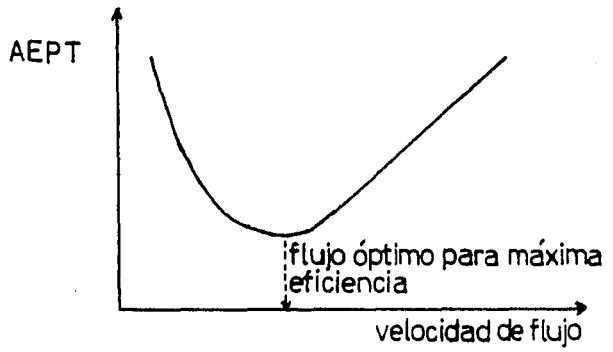
Cuando se eluyen las bandas de la muestra, se dibuja el perfil de su concentración (como un pico) y así se obtie - nen dos importantes parámetros de información : el tiempo de retención y el área del pico.

El área del pico dibujado permite determinar la concentración de cada componente separado en la columna. Si se duplica la concentración de la muestra se obtendrá un pico con el doble de área.

El tiempo de retención (t_r) es el tiempo transcurrido desde la inyección de la muestra hasta que se obtiene el máximo del pico (mayor altura). Este tiempo, es característico del soluto, la fase líquida, de la temperatura de la co - lumna, y del flujo de gas portador. Los tiempos de retención pueden usarse para identificar picos, ya que en condiciones controladas son reproducibles.

Por otra parte, la velocidad de flujo de gas portador - óptima, puede ser fácilmente determinada por la confección - de un gráfico tipo Van Deemter simple[15], AEPT vs Velocidad - de flujo (ml/min.). Ver figura N° 4.

El flujo más eficiente es el de la mínima AEPT ó de máximo número de platos teóricos. La manera más simple de me - dir el flujo de gas es con un flujómetro de burbuja de ja - bón y un cronómetro. Es importante que el gas portador sea - de alta pureza.



F I G U R A N° 4
Gráfico AEPT vs Flujo

Por otro lado, la temperatura de la columna deberá ser lo suficientemente alta para que el análisis se efectúe en un plazo razonable y suficientemente bajo para lograr la separación deseada.

A medida que la temperatura aumente, disminuye el tiempo de retención en la columna. Las temperaturas más bajas implican un tiempo de análisis más largo para una mejor separación.

La manera más adecuada para determinar la temperatura de separación óptima, es experimentalmente, mediante el ensayo a diferentes temperaturas y la construcción de un gráfico tipo AEPT vs temperatura[14](°C). Así se obtiene una sola temperatura de trabajo, lo que constituye un análisis isotérmico, mientras que el análisis a temperatura programada se refiere a un aumento lineal de la temperatura de la columna con el tiempo; lo anterior es muy útil para mezclas con puntos de ebullición muy diferentes.

La fase líquida es la que debe exhibir la capacidad co-

mo disolvente diferencial, necesaria para lograr la separación de los componentes de una mezcla. Esta selectividad es una propiedad termodinámica y puede calcularse en base a un coeficiente de reparto; debido a que hay muy pocos datos termodinámicos, es mejor determinar experimentalmente el tipo de fase líquida.

Para seleccionar una fase líquida existen publicaciones hechas por autores que han ensayado las fases líquidas más comúnes[10,15 y 18], lo que permite decir en base al tipo de componentes de la muestra (estructura y grupos funcionales) si vale la pena ensayar una determinada fase líquida; es igualmente importante que en dicha publicación se identifican fases líquidas muy parecidas.

También es importante la limitación de temperatura máxima que aparece en las publicaciones señaladas, el costo y la disponibilidad.

Los componentes de la muestra deberán presentar en la fase líquida diferentes coeficientes de distribución, deberá tener una mínima presión de vapor a la temperatura de operación.

Otro dispositivo importante es el detector, el cual proporciona los perfiles de los cursos de elución de los componentes, a la salida de la columna[24] genera una señal ó respuesta eléctrica proporcional a las concentraciones de cada uno de los componentes de la muestra.

El fundamento del detector de ionización de flama se basa en el principio de que la conductividad eléctrica de un gas es directamente proporcional a la concentración de las partículas cargadas dentro del gas.

El gas portador fluye desde la columna hasta la llama, la cual ioniza algunas de las moléculas orgánicas presentes en la corriente gaseosa. La presencia de partículas cargadas (iones positivos, iones negativos y electrones) en el espacio entre los electrodos origina una corriente que fluye en éste a través de una resistencia que la mide; la disminución de potencial resultante se modifica por un electrómetro y alimenta a un registrador.

Este detector responde a los compuestos orgánicos y no al aire, agua, gases inertes, CO_2, CO, CS_2, NO y H_2S. Por no responder al aire y al agua, el detector de ionización de flama es particularmente apropiado para el análisis de trazas de materia orgánica en el aire ó en agua ó de muestras acuosas tales como bebidas alcohólicas, materiales biológicos, etcétera.

El comportamiento del DIF depende de la selección apropiada de la velocidad de flujo gaseoso. Por regla general se usa una relación relativa de flujo de 1:1:10 de H_2/gas portador/aire.

Por su alta sensibilidad, combinada con su extenso recorrido lineal, el DIF es excelente para el análisis cuantitativo de trazas. Este no cambia su respuesta cuando hay variacion de temperatura, flujo, gas portador ya que es independiente de éstas variables.

Teoría de la Cromatografía de gases:

La teoría básica del proceso cromatográfico fué desarrollada por Van Deemter[14] para explicar la forma y localización de los picos del soluto que han sido eluídos dentro de una columna de separación. Esta teoría llamada del tanto por

ciento, se desarrolló al examinar las fuerzas que influyen - la altura equivalente a un plato teórico (AEPT), esto es, la eficiencia de la columna.

a) La ecuación de Van Deemter relaciona los parámetros operacionales de la columna, con su eficiencia. En la forma más simplificada, la ecuación es: $H = A + B/\bar{\mu} + C.\bar{\mu}$

Donde:

H = AEPT = Altura equivalente a un plato teórico

A = Difusión parásita ó efecto del paso múltiple.

B = Efecto de la difusión molecular.

C = Factor relacionado a la resistencia a la transferencia de masa.

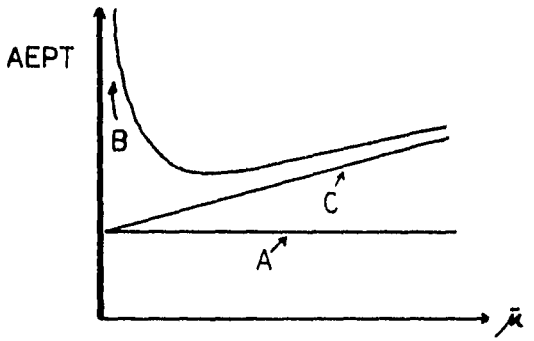
$\bar{\mu}$ = Factor relacionado con la velocidad media lineal - del gas.

Estos tres parámetros (A, B y C) identifican los principales aportes a la dispersión del pico ó banda del soluto. La velocidad lineal media del gas ($\bar{\mu}$) se puede determinar - de la siguiente manera:

$$\bar{\mu} = \frac{\text{L (longitud de la columna en cm.)}}{\text{tiempo de retención del aire en seg.}}$$

Supóngase que hacemos un gráfico de la ecuación de Van Deemter, graficando AEPT contra $\bar{\mu}$ y tomando A, B y C como - constantes. Graficando cada término separadamente, podemos - ver fácilmente el efecto de cada término sobre la gráfica total; en la gráfica, el primer término A, es una constante - con respecto a $\bar{\mu}$ y está representada por la línea recta horizontal (A). El segundo término. $B/\bar{\mu}$, disminuye al aumentar la velocidad del flujo y está representado por una línea

de pendiente decreciente (B). El tercer término, C.$\bar{\mu}$, - aumenta al aumentar la velocidad de flujo y forma una línea de pendiente creciente (C). Combinando estas tres líneas - nos lleva a la relación hiperbólica mostrada en la fig. Nº 5



F I G U R A Nº 5
Grafico de la Ec. de Van Deemter

Realmente la ecuación de Van Deemter establece que para cualquier columna existe una velocidad particular de flujo - del gas acarreador, donde AEPT es minimizada ($\bar{\mu}$ óptima), y si aumentamos ó disminuímos el flujo de gas del nivel óptimo la eficiencia disminuye. Desafortunadamente el valor de - $\bar{\mu}$ óptimo no puede fácilmente ser visto o calculado; así las condiciones óptimas para cualquier separación son a menudo - encontradas experimentalmente.

Para obtener mayor eficiencia se deberán seguir las siguientes recomendaciones[14]:

- Diámetro de partícula. Pequeño y uniforme, generalmente

tierra de diatomeas (Kieselguhr), malla 100/120.

- Velocidad del flujo. Se obtiene la óptima graficando - AEPT contra velocidad de flujo.
- Gas acarreador. Un gas inerte de alto peso molecular, N_2 ó Ar más que He.
- Fase líquida. Viscosidad baja, baja presión de vapor en la cual los solutos deseados son poco solubles ó regularmente solubles.
- Cantidad de fase líquida. Una película delgada (de 1 a- 5% en peso) no permitirá alta capacidad, pero sí más - eficiencia.
- Temperatura. Una temperatura baja alarga el tiempo de - análisis, pero en cierto punto produce mejores separaciones. También se determina graficando AEPT contra velocidad de flujo.
- Diámetro de la columna. Pequeños diámetros producen alta eficiencia, las mejores columnas son las capilares.

Por otra parte es importante saber que, como en una destilación ó extracción , un plato teórico, es un concepto artificial. El número de platos teóricos es muy útil para comparar columnas similares; puede ser evaluado fácilmente del cromatograma de interés por medio de la siguiente ecuación:[15]

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_b}\right)^2 \quad - - - - - - - - - - - - - (1)$$

Esta ecuación es una de las más importantes para la cromatografía de gases. Es la medida más directa (y sencilla) de calcular ó determinar la eficiencia de la columna a par -

tir de una solución de la muestra.

Donde:

N = número de platos teóricos.

t_r = tiempo de retención del pico.

W_b = longitud de la base del pico, limitada por las tangentes a los extremos del mismo.

Resolución. La resolución (R) está basada tanto en la eficiencia de la columna (dependiente de la AEPT) y la eficiencia de partición de las fases estacionarias, así como - también al soluto. Así, R mide la separación verdadera de dos picos concecutivos[15]. Ver ecuación (2).

La resolución está determinada por dos factores. Δt y - W, donde Δt es la medida de la separación de los máximos de los dos picos; puede incrementarse ya sea reduciendo la temperatura ó escogiendo la fase líquida más selectiva (mayor valor de α). Si $R > 1$, existe buena separación ó resolución.

W_b' es la velocidad de ensanchamiento de banda, en la columna y puede medirse por el número de platos teóricos (N) ó AEPT; es también la anchura de la base de los dos picos, - en unidades de longitud ;

$$R = \frac{\Delta t}{1/2\ (W_1 + W_2)} \qquad \text{- - - - - - - - - - (2)}$$

Donde:

$W_1 + W_2 = W_b'$ es una medida de la eficiencia de la columna.

W_1 = Longitud de la línea base interceptada por las tangentes de los extremos del pico número 1.

Δt = Longitud que separa los máximos de los dos picos.

W_2 = Longitud de la linea base interceptada por las tangentes de los extremos del pico 2.

W_b' llega a ser menor conforme el número de platos teóricos aumenta. Este es un modo de aumentar R. La otra forma, si vemos la ecuación, es aumentar t, esto es, realizarlo seleccionando fases estacionarias más discriminantes para los solutos de interés particular.

Estandarización interna.

Este método también es conocido como método de calibración relativa ó indirecta. Es un método de cálculo empleado para fines cuantitativos, donde se preparan muestras de peso conocido y de un patrón, y se separan en el cromatógrafo. Se mide el área de los picos. Se presenta la relación de áreas de los picos en función de la relación de peso.

Después de añadir a la muestra desconocida una cantidad exactamente conocida del patrón interno, ésta mezcla se cromatografía; se mide la relación de áreas y a partir de la gráfica de calibración, se leen las relaciones de peso de la sustancia desconocida con respecto al patrón. Como se conoce la cantidad de patrón añadido, con un cálculo sencillo, se determina la cantidad de compuesto desconocido presente.

Este método de calibración tiene ventaja[5] de que no es necesario medir exactamente las cantidades inyectadas, ni conocer la respuesta del detector ni que ésta permanezca constante, ya que ningún cambio en la respuesta alterará la relación de áreas. La principal desventaja del método es la de encontrar un estándar o patrón que no interfiera con algún componente de la muestra.

Integración.

La medición de la altura de los picos es más rápida que la de su área; sin embargo las gráficas de altura de los picos en función del tamaño de la muestra tienen un intervalo lineal más limitado que las correspondientes gráficas para - área de los picos. Frecuentemente las alturas y anchuras de los picos dependen del tamaño de la muestra y el volúmen de la muestra inyectado; sin embargo no es así para el área de los picos.

2.4 V A L I D A C I O N

Una vez que se desarrolla una técnica analítica, es común que el analista fundamente la linearidad, precisión y exactitud del método, por medio de reglas o condiciones establecidas para asegurar la garantía de los resultados que se obtengan con el mencionado método, es decir, debe validarse.

Sin embargo, no hay un conjunto bien definido de reglas ó condiciones de validación. Numerosos laboratorios privados ó instituciones de investigación determinan sus propias reglas y límites, basándose en los principios generales de la estadística.

Tomaremos los siguientes puntos de validación como los más adecuados y mínimos aceptables para la validación de un método analítico para medicamentos, por Cromatografía en fase gaseosa.

Especificidad.

Es el grado al cual la medición es debida sólo a la sustancia a ser determinada y no a otra u otras sustancias que pueden estar presentes en el material a ser analizado, como productos de degradación, sustancias relacionadas ó excipientes.

De otra manera se puede decir que el método debe estar libre de interferencias significantes por sustancias que son conocidas por estar presentes en el producto, o porque también estén relacionados con el proceso de fabricación.

Si los componentes adicionales están para ser cuantificados por C.G. , la especificidad debe ser la adecuada entre

el componente para ser cuantificado, y los otros posibles - componentes interferentes .

Esto puede determinarse observando que en los cromatogramas se diferencíen perfectamente los picos correspondientes a la sustancia por analizar y los posibles productos de degradación, excipientes y sustancias relacionadas.

Linearidad de la muestra.

Esta determinación se hace con el fin de garantizar que los excipientes no influirán en la determinación analítica, y que la medición es debida sólo a la sustancia a ser determinada y no a otras.

La linearidad de la muestra es otra medida de la especificidad, esto es, el método debe dar resultados que presenten un comportamiento lineal cuando se realice con la sustancia problema. Es una medida del grado al cual la curva de - los resultados obtenidos se aproxima a una línea recta, aplicando el método que se está validando.

La estimación de la linearidad[18] se obtiene haciendo un gráfico de cantidad determinada contra cantidad adicionada - de principio activo procedente de una muestra del medicamento, y calculando de éste, los siguientes conceptos:

1.- Pendiente. La recta de regresión de los datos obtenidos debe tener pendiente de 1.0 .

2.- Ordenada al origen. La misma recta anterior debe tener su ordenada al origen en 0.00 ó el más cercano posible (documentar en caso necesario).

3.- Factor de correlación. La misma recta de regresión anterior, debe tener un factor de correlación de - 1.0 .

4.- Cada grupo de datos (ó cada nivel de concentra - ción) deberá tener un coeficiente de variación de no más de 1.5% .

5.- Si se toman valores de concentración intermedios en tre los valores del 80 y 120% de la cantidad etique tada, deberán cumplir también con lo estipulado en el punto anterior, para que se incluyan en la re - gresión al graficar.

Nota:

$$\text{Coeficiente de variación} = \frac{\text{Desv. Std.}}{\bar{X}} \times 100 \quad (3)$$

Se construye esta gráfica con los datos obtenidos con - el método que se está validando. Debe incluír al menos del - 80% al 120% de la cantidad etiquetada de principio activo, - con al menos tres niveles de concentración, realizando al me nos dos veces la prueba . En caso de no contar con un place- bo, es factible emplear el método de adición de estándar.

Linearidad del estándar.

El método debe dar como resultado datos que presenten - un comportamiento lineal cuando se realiza con una sustancia de referencia (estandarizada). Se obtiene su estimación ha- ciendo un gráfico cantidad recuperada contra cantidad adicio nada, y calculando de allí los mismos conceptos señalados pa ra la linearidad de la muestra.

Precisión del método (reproducibilidad).

Es el grado de concordancia mutua entre los resultados individuales; se expresa principalmente como la desviación - estándar de los resultados del ensayo, ó bien, como la des -

viación estándar relativa, ó C.V. que no deberá ser mayor del 2% .

Será determinada con no menos de seis análisis por día, al nivel del 100% de la cantidad etiquetada de principio activo, por duplicado, durante dos días al menos empleando el método con dos analistas, con una muestra representativa.

Deberá determinarse el límite de confianza superior e inferior, el error estándar total con un 95% de confianza y graficarlos adecuadamente.

Precisión del sistema (repetibilidad)[18].

Esta se determina realizando seis análisis en un día, por duplicado, empleando una sustancia de referencia (estandarizada). Es una evaluación de que los resultados del método, no variarán bajo las mismas condiciones y equipo.

El coeficiente de variación de los resultados obtenidos al nivel del 100% de la cantidad etiquetada, no debe ser mayor de 1.5% .

Exactitud.

Es una medida de la concordancia promedio entre un determinado valor experimental y el valor de referencia (muy próximo al 100%), obtenido al aplicar el método sobre muestras del fármaco en presencia de excipientes adecuados. Se acostumbra determinar la exactitud aplicando el método en muestras del fármaco a niveles del 80, 100 y 120% de la cantidad etiquetada , seis veces cada nivel, y cada una de ellas por duplicado. Cada conjunto de datos de cada nivel, debe presentar un coeficiente de variación de no más del 2%. Según publicaciones acreditadas[18], el intervalo de aceptación

es del 98 al 102% de la cantidad etiquetada , por cada ni - vel, y un error estadístico estándar de no más del 1.5%.

Consideraciones.

Son la evaluación de las condiciones de operación del - método para determinar cuáles son críticas. Se presenta a manera de información adicional al reporte de validación, donde se incluyen los factores determinantes ó delicados que pueden influír en el resultado del método. O bien pueden ser advertencias, cuidados especiales, etcétera, que es importante saber para el buen empleo del método.

Por otro lado, se acostumbra presentar en una valida - ción, una evaluación de la reproducibilidad y repetibilidad del método. El primero representa la determinación confiable de si el método es reproducible en otros laboratorios, con otro equipo, otras fuentes de reactivos y analistas. Y la repetibilidad, asegura que no habrá variaciones significativas al aplicar repetitivamente el método en un laboratorio y a las mismas condiciones. Lo anterior se acostumbra - evaluar como presición.

Comparación de métodos.

Cuando se proponen métodos para reemplazar los ya establecidos, se lleva a cabo la comparación estadística de los mismos.

El método propuesto no necesita ser estadísticamente idéntico al método establecido; mientras que el método pro - puesto cumpla con los requerimientos de validación antes - mencionados, será aceptado.

III.- P A R T E E X P E R I M E N T A L

3.1 E Q U I P O Y S U S T A N C I A S

3.1.1 Equipo:

- Cromatógrafo de gases H.P. mod. 5880A equipado con detector de ionización de flama, y capacidad para columnas metálicas y de vidrio de diámetro comercial, inyector automático-neumático opcional, y accesorios.
- Balanza analítica Sartorius modelo 2842.
- Medidor de punto de fusión Büchi modelo 510 (0 a 300°C)
- Termómetro de 0 a 420°C.
- Espectrofotómetro Beckman modelo DU-7 (UV-visible) - equipado con graficador y celdas de cuarzo de 1 cm.
- Espectrofotómetro Beckman UV-5270 (Deuterio-Tungsteno)
- Espectrofotómetro Infrarrojo Perkin-Elmer modelo 283B - con accesorios.
- Agitadores magnéticos Solbat.
- Agitadores por ultrasonido Mettler electronics, modelo - ME2-1.
- Fibra de vidrio silanizada grado C.G.
- Papel filtro Watman N° 40 sin cenizas.

3.1.2 Sustancias.

- Cloroformo grado C.G. (anhídro).
- 3-Dinitro benceno purificado (anhídro).
- Dinitrato de Isosorbide estándar de referencia.
- Dinitrato de Isosorbide estándar primario (USP).
- Lactosa USP, Avicel USP, Almidón USP, Estearato de Mg.
- Fase líquida OV-101 para C.G.

3.2 D E S A R R O L L O D E L A M E T O D O L O G I A P O R C R O M A T O G R A F I A D E G A S E S

PLAN DE TRABAJO:

Para desarrollar el método cromatográfico de análisis, es necesario organizar el trabajo partiendo de la información investigada. Para esto se siguió el siguiente orden:

1. Elección de la fase estacionaria (de acuerdo a estructura química, grupos funcionales, e informes publicados) longitud de la columna y soporte.

Elección del tipo de columna.

2. Elección del detector, gas portador y disolvente.
3. Determinación de parámetros operacionales:
   a) Temperatura de trabajo del horno.
   b) Temperatura de trabajo del detector e inyector.
   c) Elección del flujo de gas portador.
   d) Elección de otros factores operacionales del cromatógrafo.
   e) Elección del sistema de calibración ó método de cálculo cuantitativo; determinación de la resolución y eficiencia con los parámetros seleccionados.
4. Extracción del principio activo de la forma farmacéutica, preparación de la muestra. Identificación del DNI.
5. Técnica desarrollada, aplicación del método de tabletas, ajuste del mismo (cambio de atenuación a un tiempo x, de flujos y temperatura).

6 . Determinación cuantitativa del DNI.

1. Elección de la fase estacionaria.

La estructura química de la molécula de Dinitrato de - Isosorbide se puede considerar desde dos puntos de vista:

- Como éster-nitrato ó como nitrato orgánico.
- Por su solubilidad es considerada como molécula no polar

Algunos autores[13,19,20 y 21] concuerdan en manejar a la molécula del DNI como un polialcohol ó éster, para seleccionar la fase estacionaria.

Según esto, las tablas de fases estacionarias recomendadas por Zweig[10] son las siguientes entre otras:

QF-1 OV-17

OV-101

SE-30

OV-25

En general son la mayoría metil-siliconas sintéticas, - aceites ó derivados de aceites de silicona, usadas desde el 3 al 4% en peso sobre el soporte adecuado.

Del grupo anterior y en base a su disponibilidad en el laboratorio, se eligió la fase OV-101 que es de polaridad media[14] a una concentración de 2.5% sobre Chromosorb de alta - pureza, lavado con ácido y de comportamiento excelente según referencias[14]. El tamaño de partícula se determinó en base - a recomendaciones del fabricante, para éste tipo de fase líquida, que fué de 100-120 mallas.

Según estos mismos autores[13,20 y 21], se recomienda una longitud de columna de no menos de 6 pies (180 cm.) y 1/8 de pulgada de diámetro interno, para obtener tiempos de re -

tención adecuados. El nombre químico de la fase OV-101, es - Dimetilpolisiloxano (aceite)[15,18], y su estructura condensada es la siguiente:

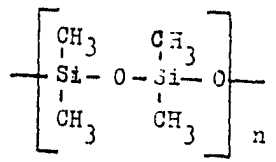


FIGURA Nº 6
Estructura de la fase OV-101

Elección de la columna.

Con las especificaciones anteriores para la columna, - queda la selección del tubo, su naturaleza ó material.Esta - elección debe responder a los requerimientos de resistencia disponibilidad y lo inerte del material. El cobre no es costoso pero se oxida a bajas temperaturas, es blando y se de - forma si el diámetro es pequeño.

En cuanto al vidrio, es muy comercial[24] y en su fabricación, el diámetro no varia con más del 5% y permite observar el llenado de la columna. Aunque es frágil, es sumamente inerte y puede ser usado para la mayoría de las fases líquidas.

El acero inoxidable es más costoso[24], pero menos frágil que el vidrio, y presenta una superficie interna no polar - con mejor conductividad térmica; es el más utilizado, ya que presenta la misma tolerancia que el vidrio en cuanto a la - uniformidad del diámetro interno.

En el presente trabajo se eligió columna de vidrio por ser de menor costo, más disponible y por presentar facilidades para un empacado completo y más uniforme. Presenta mayor facilidad para desempacar y cambiar de relleno, características que no presentan las columnas metálicas.

2. Elección del detector, gas portador y disolvente.

a) elección del detector.

El DNI es una molécula orgánica sumamente explosiva, por lo que al quemarse en la flama del detector de ionización de flama (DIF), proporcionará una buena cantidad de iones rápidamente. Por lo anterior se eligió el DIF para el método.

Para éste detector es necesario el uso de N_2 puro como gas portador, dado lo inerte y pesado que es. Para la flama se requiere H_2 y aire puros. El flujo de H_2 se recomienda mayor de 30 y menor de 60 ml/minuto y el flujo de aire debe ser 20 veces mayor que el flujo de gas portador. (Según manual de operación del cromatógrafo). De cualquier modo, la elección de estos flujos se determina más específicamente de una manera experimental.

b) Elección del solvente para el análisis.

En base a una tabla de solubilidades del principio activo[8], se decidió tomar al cloroformo como solvente[15], debido a que el DNI se solubiliza adecuadamente.

El cloroformo presenta buen comportamiento como solvente ya que es el recomendado para aplicar la fase líquida[15] sobre el soporte inerte y porque al momento de las inyecciones no se evapora instantáneamente, como la acetona.

3. Determinación de los parámetros operacionales.

Antes de iniciar la determinación de éstos parámetros, se preparó una columna de separación bajo las siguientes condiciones:

- Columna: De vidrio, de 6 pies de longitud y 1/8" de diámetro interno, enrrollada a 20 cm. de diámetro.
- Fase estacionaria: OV-101 (aceite) al 2.5% sobre soporte sólido Chromosorb WHP.
- Disolvente: Cloroformo grado reactivo.
- Soporte sólido: Chromosorb WHP de 100-120 mallas (USP)

Se preparó de la siguiente manera: se pesaron 250 mg. del aceite OV-101 en un vaso de precipitados adecuado. Por separado se pesaron 9.750 g. de soporte Chromosorb WHP, y se colocaron en un vaso de precipitados grande, se adicionó suficiente cloroformo para cubrir el soporte evitando un exceso.

La fase líquida se disolvió en la mínima cantidad de cloroformo y se adicionó cuantitativamente al vaso conteniendo el soporte sólido. El vaso que contenía la fase líquida disuelta, se lavó con un poco de cloroformo y se adicionó al vaso con el soporte. Se agitó muy suavemente a modo de incorporar la fase estacionaria en el soporte. Se dejó reposar por espacio de 24 horas y se evaporó el cloroformo a sequedad con movimiento muy suave y en baño maría.

Una vez seco el preparado anterior, se empacó la columna de vidrio con ayuda de vacío y sin empacar demasiado apretada para obtener buen flujo a través de la misma.

Se dejó equilibrar la columna por 24 horas a 200°C (la máxima permisible es 300°C)[18,24] a un flujo de N_2 de aproxi

madamente 20 ml/min., con un extremo abierto. Posteriormente, se consideró equilibrada cuando al colocarla en el horno del cromatógrafo y encendido éste, solo apareció una línea - base estable (recta).

a) Determinación de la temperatura del horno ó temperatura de trabajo de la columna.

Para lograr ésto, se fijó arbitrariamente un flujo de - gas portador N_2 de 30 ml/minuto (basándose en referencias[19] y [20] y en el manual de operación HP 5880A), medidos con flujómetro y considerando:

- Detector: Flujo de H_2 = 60 ml/min. a 20°C.
  Flujo de aire= 360 ml/min. a 20°C.
- Velocidad de la carta = 0.5 cm/minuto.
- Atenuación de la señal = x4.
- Temperatura del inyector = Temperatura del horno +20°C
- Temperatura del detector = Temperatura del horno +20°C
- Margen de la carta = al 15%.

Antes de inyectar se dejó estabilizar la columna por 30 minutos, a estas condiciones con un extremo abierto. La determinación se realizó inyectando tres microlitros de una solución 0.5 mg/ml de DNI estándar de referencia (en cloroformo) por triplicado, a cada una de las siguientes temperaturas del horno :

100°C	150°C
110°C	160°C
120°C	
130°C	
140°C	

Pero antes se inyectó cloroformo puro para obtener su - tiempo de retención y observar que no genera ruido ó problemas.

En cada temperatura ensayada se obtuvo el cromatograma respectivo y de ahí se registró:

- Tiempo de retención del DNI.
- Tiempo de retención del disolvente.
- Tiempo que dura la elución completa.
- La resolución de ambos picos.
- Número de platos teóricos.

La temperatura que se eligió cumplió los siguientes conceptos:

- Generar el pico del DNI más grande en altura, y agudo - (según Malbica et. al.[13])
- Tener forma correcta, definida y no presentar coleo.
- No presentar aberración, desviación o ruido en la línea base.
- Presentar la mejor respuesta del detector (uso de una - atenuación alta).
- Que estas condiciones sean constantes en cada uno de los tres registros que se obtuvieron.
- Presentar el mayor número de platos teóricos.

Si dos o más de las temperaturas ensayadas presentan - las mismas observaciones, se eligirá la que sea menor. Es - conveniente construír un gráfico de temperatura, T (^{o}C) contra número de platos teóricos, para elegir la temperatura óptima.

El estándar de DNI se preparó de la siguiente manera:

Se pesó el polvo equivalente a 25 mg de DNI estándar de referencia, y se transfirió a un matráz volumétrico de 50 ml Se adicionaron 25 ml de cloroformo anhídro, y se agitó durante 15 minutos con ultrasonido. Posteriormente se agitó magnéticamente durante 15 minutos, se filtró con papel Whatman - Nº 40, recibiendo los filtrados en otro matráz de igual capacidad; el material de filtración se lavó con pequeñas porciones de cloroformo anhídro, hasta llevar el volúmen al aforo. El líquido filtrado se tapó herméticamente; éste se - conservó en refrigeración.

b) Elección de la temperatura de trabajo del detector e inyector.

Esta elección se hizo de manera práctica, siguiendo el principio de funcionamiento del cromatógrafo. Así, las temperaturas del detector e inyector se tomaron 20°C arriba de la temperatura de trabajo de la columna (u horno) en cada ensayo ó determinación, tanto para volatilizar como para asegurar la combustión más completa de los eluatos, en el inyector y detector respectivamente.

c) Elección del flujo del gas portador.

Se inyecta por triplicado una solución estándar, utilizando los mismos parámetros de trabajo que se utilizaron para encontrar la temperatura de la columna, exceptuando ésta, que en éste caso es constante. A cada flujo ensayado se aplicaron inyecciones por triplicado.

Estas inyecciones se efectuaron en cada uno de los siguientes flujos de N_2 :

15 ml./min.

20 ml/min.

30 ml/min.
40 ml/min.
50 ml/min.
60 ml/min.

De los cromatogramas resultantes del ensayo de cada flujo, se registró :

- Tiempo de retención del DNI.
- Número de platos teóricos.

Adicionalmente, el flujo elegido presentó las siguientes características :

- Que proporcione el pico más agudo.
- Registro definido y de forma correcta sin coleo.
- Que permita la elución rápida y sin aberración de la línea base.
- Que presente éstas observaciones en los tres ensayos ó inyecciones.
- Que genere el mayor número de platos teóricos.

Se grafica AEPT contra Flujo, para encontrar el flujo óptimo (donde AEPT es mínima) y el registro sea bueno.

d) Elección de otros factores de operación.

Estas determinaciones se refieren a los controles de sensibilidad y graficado del aparato, que es necesario ajustar para lograr buenos registros (picos). A saber, los principales son :

- Margen de la carta.
- Velocidad de la carta.
- Sensibilidad a la señal ó tamaño del pico (atenuación).

El margen de la carta del registro es el ajuste del i -

nicio del trazo sobre el papel.

La velocidad de la carta se ajustó según el tamaño de - los registros que se querían, y de la economía de papel buscada.

La sensibilidad a la señal ó atenuación, se refiere al tamaño del registro que se quiere ó cabe en la carta. El registrador tiene la capacidad de ser sensible a cantidades - muy pequeñas de soluto y de amplificar ó reducir ésta res - puesta como se deseé. Este mando puede programarse a que cam bie de valor a un tiempo preseleccionado para ampliar ó re - ducir señales (picos) automáticamente según convenga.

e) Elección del sistema de calibración ó método de cálculo cuantitativo. Determinación de la resolución y eficiencia con los parámetros seleccionados.

El método empleado fué el de estandarización interna[5, 14]; en éste método es posible conocer la concentración del - estándar interno, el área de éste en el cromatograma y un - factor de corrección que arbitrariamente se le da un valor - de 1 . Se establece la siguiente igualdad :

$$\frac{F_1 \times A_1}{C_1} = \frac{F_2 \times A_2}{C_2} \qquad \text{- - - - - - - - - (4)}$$

Donde :

F_1 = Factor de corrección (estándar interno) = 1 .

A_1 = Area del estándar interno.

C_1 = Concentración del estándar interno (mg/ml).

F_2 = Factor de respuesta del estándar de referencia.

C_2 = Concentración del estándar de referencia.

A_2 = Area del estándar de referencia.

Esta igualdad se establece debido a que se da por hecho

que la respuesta del detector es igual tanto para el estándar interno como para el DNI (o sustancia a ser cuantificada), y dado que ésto lógicamente no es estrictamente cierto se debe justificar y corregir el error que esto origina; se da arbitrariamente el valor de la unidad a un factor de corrección[5], se conoce perfectamente su concentración y su área en el cromatograma, además este valor no altera los otros valores conocidos. No existe alguna escala u otros parámetros que señalen valores para éste factor.

Teniendo establecido lo anterior, se tiene una base para calcular el factor de respuesta del DNI, sin tener error de cálculo.

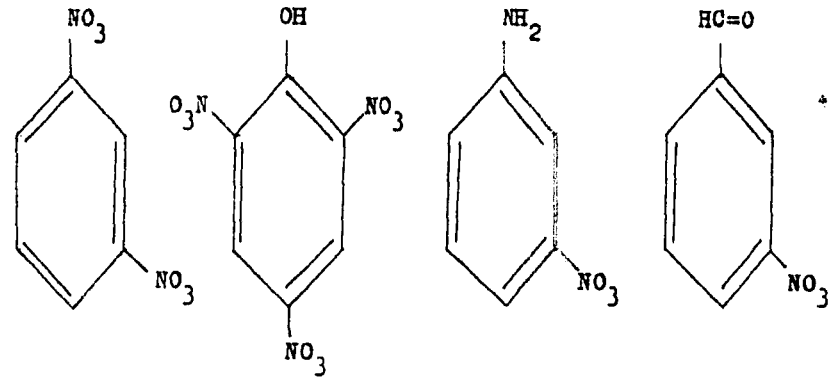
Este cálculo permite obtener las concentraciones de muestras desconocidas a partir de un estándar de referencia con la ecuación (4) y adicionando iguales cantidades de estándar interno a la muestra desconocida y al estándar, para calcular el factor de respuesta y la concentración desconocida. Asimismo se puede ver que calculando un promedio de F_2 no es necesario construír una curva de calibración.

- Determinación del Estándar Interno.

Para esto se buscaron compuestos que tuvieran grupos nitro en su molécula, que fueran semejantes ó iguales a los mencionados en la bibliografía como estándar interno[3,11] y que fueran solubles en cloroformo. Así, se ensayaron los siguientes compuestos :

3-Dinitrobenceno	3-Nitroanilina
Acido pícrico	3-Nitrobenzaldehído

Ver figura N° 7 .



3-Dinitro-benceno | Acido pícrico | 3-Nitro-anilina | 3-Nitro-benzaldehído.

F I G U R A N° 7

Estructuras de los compuestos ensayados para la elección del estándar interno.

Los ensayos realizados fueron los siguientes:

1) Se prepararon muestras de éstas sustancias, a una concentración de 0.5 mg/ml en cloroformo.
2) Se inyectaron cada una de las muestras anteriores a las condiciones cromatográficas elegidas, por triplicado, cuidando de inyectar siempre el mismo volúmen.
3) Según lo obtenido en el punto (2) se seleccionó el estándar interno dependiendo de si cumplía con las siguientes indicaciones:

- No presentar retención irreversible ó degradación térmica ni descomposición.
- Buena respuesta del detector.
- Tiempos de retención adecuados.
- Que presente picos grandes, agudos y de forma correcta.

- No presentar aberraciones en la línea base.
- Que no presente interferencias de elución en el disolvente.

4) Se preparó una mezcla adecuada del estándar interno seleccionado y DNI estándar de referencia, se inyectó por triplicado, y del cromatograma resultante se observó - que presentara buena resolución, aproximadamente mayor de 1.0 respecto al pico del DNI, además de :

- Presentar el factor de corrección ó relación de áreas - respecto al DNI, reproducible y constante.
- Que no reaccione ó interactúe con el DNI en la columna.
- Que presente las observaciones anteriores constantes y - reproducibles en los tres ensayos.

Determinación de la resolución y eficiencia con los parámetros seleccionados.

El cálculo de la resolución es factible de realizar con los cromatogramas obtenidos del ensayo del estándar interno con DNI estándar de referencia. Obviamente se inyectó una solución con ambos solutos a concentraciones conocidas bajo - las condiciones señaladas de antemano y de éstos cromatogramas se obtiene la resolución, aplicando la ecuación (2), - donde W_1 y W_2 corresponden a los picos del estándar interno y DNI estándar de referencia respectivamente. Si $R > 1$, se - tiene buena resolución y eficiencia separativa.[15]

Otra evaluación de la eficiencia, es la evaluación de la

relación de áreas, que ésta permanezca constante en la determinación del estándar interno; y evaluar el número de platos teóricos (N) generados por el sistema mediante la ecuación (1).

4. Extracción del principio activo de la forma farmacéutica. Preparación de la muestra e identificación del Dinitrato de Isosorbide.

Se pesaron 20 tabletas de DNI de 10 mg, se transfirieron a un mortero de tamaño adecuado, se trituraron hata obtener un polvo fino; éste polvo se pesó exactamente el equivalente alrededor de 25 mg. de DNI, posteriormente se transfirió éste polvo a un matráz volumétrico de 50 ml y se llevó al volúmen con cloroformo, se tapó y se agitó por ultrasonido por 15 minutos, se continuó la agitación con un agitador magnético otros 15 minutos y finalmente se filtró con papel Whatman Nº 40; los filtrados se recibieron en otro matráz volumétrico el cual se rotuló perfectamente y se tapó herméticamente.

De la solución obtenida se tomaron con la jeringa 3 microlitros y se inyectaron, por duplicado; de los cromatogramas resultantes se identificó el pico correspondiente al DNI mediante la comparación de un cromatograma de una solución de DNI estándar de referencia. Se observó que no existiera interferencia en la elución de los picos de disolvente y DNI debido a excipientes ó posibles degradaciones.

5. Técnica desarrollada, aplicación del método en tabletas y ajuste de la misma.

TECNICA :

- Preparación del estándar interno:

Se pesaron exactamente 2.500 g de polvo de 3-Dinitro - benceno puro y seco, se transfirieron a un matráz volumétrico de 500 ml y se llevó hasta el aforo con cloroformo anhí - dro, se homogeneizó hasta obtener una solución clara.

Se prepararon muestras de tabletas para su análisis tal como se indica en el punto Nº 5 y se inyectaron tres microlitros varias veces, alternando al azar inyecciones de solución de DNI estándar de referencia para observar alguna posible diferencia ó interferencia.

De la repetibilidad resultante, en función de las áreas registradas, se determinaron los factores posibles de modificar para mejorar la metodología desarrollada sin que se cambien los parámetros operacionales que determinan la eficiencia de la separación, a saber : flujo de gas portador y las temperaturas del horno e inyector, columna, soporte y solvente.

6. Determinación cuantitativa del DNI.

Teniendo preparada la muestra de tabletas de DNI, además de haber preparado una solución de DNI estándar de referencia de la misma manera como se trata la muestra, se prepara el cromatógrafo con detector de ionización de flama a las condiciones determinadas anteriormente.

Se inyectaron tres microlitros de la preparación del estándar de DNI + estándar interno, por duplicado; luego se inyectan tres microlitros de la solución de muestra de tabletas, por duplicado.

De los cromatogramas resultantes, tanto de DNI estándar

de referencia, como de muestra de tabletas de DNI, se obtu - vieron las áreas correspondientes. A partir de éstas áreas - y con la ecuación (3), se obtiene el factor de respuesta, F_2 del DNI, y luego, se calcula C_2, o sea la concentración del DNI en la muestra de tabletas :

$$F_2 = \frac{A_1 \, F_1 \, C_2}{C_1 \, A_2} \quad - - - - - - - - - - - - \quad (4)$$

$$C_2 = \frac{F_2 \, C_1 \, A_2}{A_1 \, F_1} \quad - - - - - - - - - - - - \quad (5)$$

Se hizo un promedio de C_2 de las dos determinaciones - con la muestra de tabletas y se calculó el contenido de DNI con la siguiente fórmula:

$$mg/tableta = C_2 \times 25 \quad - - - - - - - - \quad (6)$$

3.3 V A L I D A C I O N D E L M E T O D O D E S A R R O L L A D O

a) Especificidad
b) Linearidad de la muestra.
c) Linearidad del estándar.
d) Precisión del método (reproducibilidad y repetibilidad).
e) Exactitud del método.
f) Consideraciones generales.

a) Especificidad.

Para determinarla, se corrieron muestras de DNI degradada , tratando de obtener los dos principales productos de degradación 2-mononitrato de Isosorbide y el 5-mononitrato de Isosorbide y de buscar algún otro interferente. Conociendo los tiempos de retención de los nuevos productos y aunque no se identifiquen, se puede saber si el análisis es específico ó no, comparándose éstos tiempos con el del DNI estándar de referencia, sin degradar.

Además de éstos productos de degradación, se trata de buscar algún otro compuesto que pueda presentarse durante el ensayo, que no sean los anteriores, como excipientes, contaminantes, etcétera.

Se pesaron muestras de aproximadamente 10 mg de DNI estándar de referencia y se prepararon como se indica a continuación :

MUESTRA	CONDICIONES	TIEMPO
(1)	DNI + 50ml de HCl 1.0N, homogeneizar	2 hrs a 100°C
(2)	DNI + 50ml de NaOH 1.0N "	" "
(3)	DNI + 50ml de H_2O destilada "	" "
(4)	DNI sólo, seco, homogeneizar	48 hrs a 60°C

T A B L A N° 2
Degradaciones del DNI para especificidad

Posteriormente las muestras 1, 2 y 3 se extrajeron con 20 ml. de cloroformo puro, agitando el embudo de separación durante 3 minutos. Se separó la fase orgánica, se filtró adecuadamente y posteriormente se aforó a 25 ml. Este filtrado se inyectó por duplicado en el cromatógrafo a las condiciones ya establecidas y se analizaron los cromatogramas obtenidos.

La muestra número (4) se preparó como una muestra ordinaria para analizar DNI en tabletas, con la diferencia de que no se adicionó solución de 3-DNB (estándar interno), y únicamente se agitó por ultrasonido. Se inyectó tal y como se indica; se analizaron los cromatogramas resultantes para evaluar la especificidad por comparación con el estándar de referencia.

b) Linearidad de la muestra.

Para determinarla se empleó el método de adición de estándar a un excipiente adecuado formulado, debido a la carencia de la formulación completa del medicamento. La pureza del estándar de referencia es 38.68% en lactosa.

Los niveles de concentración empleados y la composición del excipiente preparado aparecen en las tablas (3) y (4)

MUESTRA ó PREPARACION	% DE PRINCIPIO ACTIVO.	mg. de DNI	Nº DE PREPARACIONES	Nº DE INYECCIONES
1	60%	6	2	2
2	60%	6	2	2
3	80%	8	2	2
4	80%	8	2	2
5	100%	10	2	2
6	100%	10	2	2
7	120%	12	2	2
8	120%	12	2	2
9	140%	14	2	2
10	140%	14	2	2

T A B L A Nº 3

Preparación de la Linearidad de la muestra

Composición del excipiente con principio activo:				
Principio activo	17.24%	=	25.86 mg.	
Estearato de magnesio	2.00%	=	3.00 mg.	
Avicel	26.92%	=	40.38 mg.	
Lactosa	26.92%	=	40.38 mg.	
Almidón	26.92%	=	40.38 mg.	
	100.00%		150.00	

T A B L A Nº 4

Pureza del estándar = 38.68%

Peso promedio de la tableta = 150 mg.

Contenido de principio activo = 10 mg. de DNI

= 25.86 mg. de estándar

Para cada preparación, se pesó la cantidad respectiva - de estándar de DNI y se mezcló perfectamente con la cantidad correspondiente de excipientes, evitando cualquier pérdida.

Una vez preparados los polvos se procedió como se indica en el ensayo de DNI en tabletas.

Las inyecciones de las muestras se alternaron con otras de una solución de DNI estándar de referencia preparado de - la manera usual, para fines de cálculo.

Las cantidades correspondientes de principio activo y excipientes necesarios para los diferentes niveles de concentración ensayados (para una preparación ó tableta), aparecen en la tabla (5).

Las cantidades respectivas de polvos requeridos para - las preparaciones necesarias a los niveles marcados en la - tabla (3), se obtienen a partir de lo señalado en la tabla (5), simplemente multiplicando tales cantidades por el número de preparaciones requeridas.

% de activo	mg de DNI puro	mg de std. DNI(33.63%)	mg de excipiente
0	0	0	150.00
60	6	15.51	134.49
80	8	20.68	129.32
90	9	23.26	126.74
100	10	25.85	124.15
120	12	31.02	118.98
140	14	36.19	113.81

T A B L A N° 5

Cantidades de excipiente y principio activo diluído requeridas en cada nivel de concentración (para una tableta de 150 mg) para la linearidad de la muestra

c) Linearidad del estándar.

Se preparó con un estándar de pureza de 38.68%. Los niveles de concentración empleados fueron los siguientes:

muestra ó preparación	% de p. activo	mg de DNI	Nº de inyecciones	Nº de preparaciones
1	80%	8	3	2
2	90	9	3	2
3	100	10	6	2
4	105	10.5	3	2
5	110	11.0	6	2
6	115	11.5	3	2
7	120	12.0	6	2
8	125	12.5	3	2
9	130	13.0	3	2

T A B L A Nº 6
Preparación de la Linearidad del estándar

La preparación de éstas muestras se realizó de la misma manera que en el ensayo de DNI en tabletas. Con la diferencia de que aquí el polvo ya se tiene como tal.

Las inyecciones se alternaron con otras de solución de DNI estándar de referencia USP preparado de la manera usual.

A partir de los cromatogramas resultantes se hicieron los cálculos y determinaciones necesarias.

d) Precisión.

- Precisión del método.

Se realizó haciendo seis determinaciones por duplicado, del ensayo de DNI en muestras de niveles del 100% del contenido de principio activo. Esto se realizó con dos analistas en dos días diferentes, con el mismo equipo pero cada uno de ellos lo acondicionó y preparó adecuadamente e independientemente uno de otro.

Las muestras se prepararon y pesaron de la siguiente - manera :

Principio activo = 25.84 mg
Excipiente = 124.16 mg
150.00 mg

El excipiente se preparó con la composición empleada - anteriormente. Estas cantidades se pesaron exactamente en - balanza analítica y se mezclaron perfectamente.

Las muestras se prepararon de la misma manera que en el ensayo de DNI en tabletas. Las inyecciones se alternaron con otras de DNI estándar de referencia. De los cromatogramas resultantes se hicieron los cálculos y determinaciones necesarias.

- Precisión del sistema.

Se realizó evaluando la desviación estándar de los resultados obtenidos de al menos seis inyecciones de una preparación de estándar de DNI (la concentración recomendada es del nivel del 100%).

Se midió así, la repetibilidad de la separación dentro de la columna (es decir, del sistema cromatográfico) cuyo resultado final del coeficiente de variación no debe ser mayor del 1.5% . De los cromatogramas resultantes se hicieron los cálculos y determinaciones necesarias.

e) Exactitud.

Esta determinación se hizo ensayando muestras compuestas de la mezcla de excipientes formulada anteriormente, y - un estándar de DNI; de tal manera que proporcionaran niveles de concentración del 80%, 100% y 120% de la cantidad etique-

tada.

Cada nivel se ensayó seis veces, por duplicado y las - muestras se prepararon como sigue:

NIVEL DE CON CENTRACION.	NUMERO DE MUES TRAS.	NUMERO DE PRE PARACIONES POR MUESTRA.	NUMERO TOTAL - DE ENSAYOS ó - PREPARACIONES
80%	4	2	8
100%	4	2	8
120%	4	2	8

T A B L A N° 7
Preparación de la exactitud

Se prepararon sólo cuatro muestras de cada nivel de concentración debido a que en la parte de la linearidad de la - muestra, se ensayaron dos veces cada uno de estos mismos niveles, tratando la muestra de la misma manera. De esta manera se completaron los seis ensayos de cada nivel y cada uno por duplicado.

El excipiente se preparó con la composición empleada anteriormente.

En cada preparación se pesó la cantidad respectiva de - excipiente y principio activo para cada nivel de concentra - ción, en balanza analítica.

Una vez mezcladas las muestras se prepararon de la misma manera como se indica para el ensayo del DNI en tabletas, con la diferencia de que aquí el polvo ya se tiene como tal.

Las inyecciones de las muestras se alternaron con otras de una solución estándar de referencia USP preparado de la -

manera usual para fines de cálculo.

De los cromatogramas resultantes se hicieron los cálculos y determinaciones necesarias.

f) Consideraciones.

Se hizo de la manera indicada en la parte correspondiente a la teoría.

3.4 ANALISIS ESPECTROFOTOMETRICO DEL DNI EN TABLETAS

Para fines comparativos, se aplicó el método espectrofotométrico reportado en la USP XIX[25] para determinar DNI en tabletas de 10 mg.

Esto se hizo como sigue:

1) Se obtuvo el peso promedio de 20 tabletas de un mismo lote.
2) Se aplicó el método de análisis al menos 10 veces.
3) Lo anterior se llevó a cabo en un sólo día.

3.5 E S T U D I O E S T A D I S T I C O C O M P A R A T I V O

Para nuestros fines, el estudio estadístico realizado - fué la comparación de las precisiones de ambos métodos, por lo que se empleó la prueba de F ó razón de varianzas[2].

Para poder hacer la comparación de precisiones por la - prueba F, fué necesario calcular la media de la muestra $\bar{X}$, - la desviación estándar de la muestra s, Varianza s^2, y buscar un valor F de tablas para n-1 grados de libertad, todo lo anterior se calculó para cada método.

Para esta comparación se emplearon los resultados de 10 ensayos por cromatografía de gases y 10 por espectrofotometría, con tabletas de un mismo lote. Estos datos se trataron por separado, y se calculó $\bar{X}$, s, y s^2 y se buscó F de tablas respectivamente.

Posteriormente se formularon las siguientes hipótesis:

Ho = Hipótesis nula.

H_1 = Hipótesis alternativa

Donde:

Ho = El método cromatográfico presenta igual precisión que el método colorimétrico.

ó

Ho = $s_1^2 = s_2^2$, y:

H_1 = El método cromatográfico es más presiso que el método colorimétrico.

ó

$$H_1 = s_1^2 > s_2^2$$

Posteriormente se buscó $F_{crítica}$ de tablas al 95% de - confianza, y se calculó $F_{experimental}$ con las desviaciones - estándar de cada método por medio de la siguiente ecuación:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad \text{- - - - - - - - - - - - - - - (7)}$$

Adicionalmente, se calculó el error estadístico obtenido en cada uno de los métodos comparados, por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Error estadístico ó estándar} = \frac{\text{Desviación estándar}}{\sqrt{n}} \quad (8)$$

Donde:

n = Número de determinaciones.

IV.- RESULTADOS

4.1 METODOLOGIA DESARROLLADA POR C. G.

4.1.1 Elección de la fase estacionaria, longitud de la columna y soporte.

a) Fase líquida.

OV-101 (Dimetilpolisiloxano) al 2.5% sobre soporte - Chromosorb WHP de 100-120 mallas.

b) Columna.

Se eligió una longitud de 6 pies (180 cm) con un diámetro interno de 1/8" (2 mm), de vidrio.

4.1.2 Elección del gas portador, disolvente y detector.

a) Gas portador.

N_2 filtrado, de pureza 99.99%.

b) Disolvente.

Cloroformo grado GLC ó grado UV.

c) Detector.

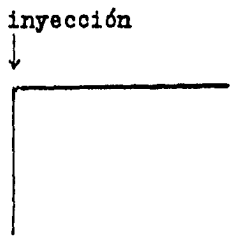
De ionización de flama (H_2/ aire).

4.1.3 Determinación de los parámetros operacionales.

a) Temperatura de trabajo de la columna (horno).

La columna preparada para ésta determinación se equilibró como se indicó en la parte experimental correspondiente, obteniendo como resultado el cromatograma de la línea base - que aparece en la figura Nº 8.

Para los demás resultados de las temperaturas ensayadas, ver más adelante.



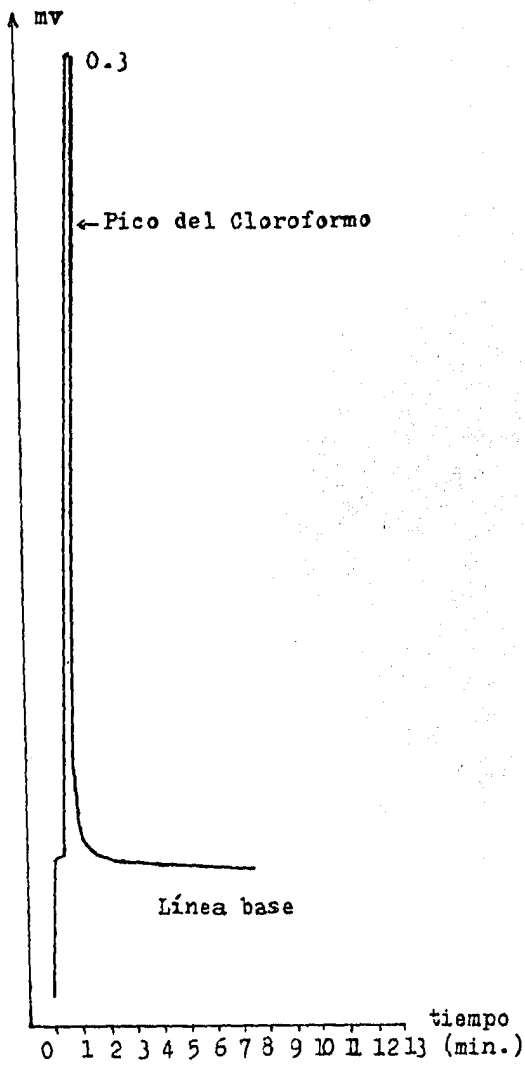
F I G U R A N° 8
Línea base obtenida al equilibrar la columna

De la inyección de cloroformo puro se obtiene el cromatograma de la figura N° 9, sin ruido y sin interferencias.

Los cromatogramas representativos de las temperaturas ensayadas se presentan en las figuras N° 10, 11, 12, 13, 14 15 y 16 respectivamente.

Sólo se obtuvo un cromatograma definido a 100°C, con una alta retención como se puede ver en la figura N° 10.

En todos los casos la resolución esta dada respecto al pico del DMI y del disolvente (ver tabla N° 8), y los tiempos de retención están dados en minutos.



F I G U R A N° 9

Pico del solvente puro

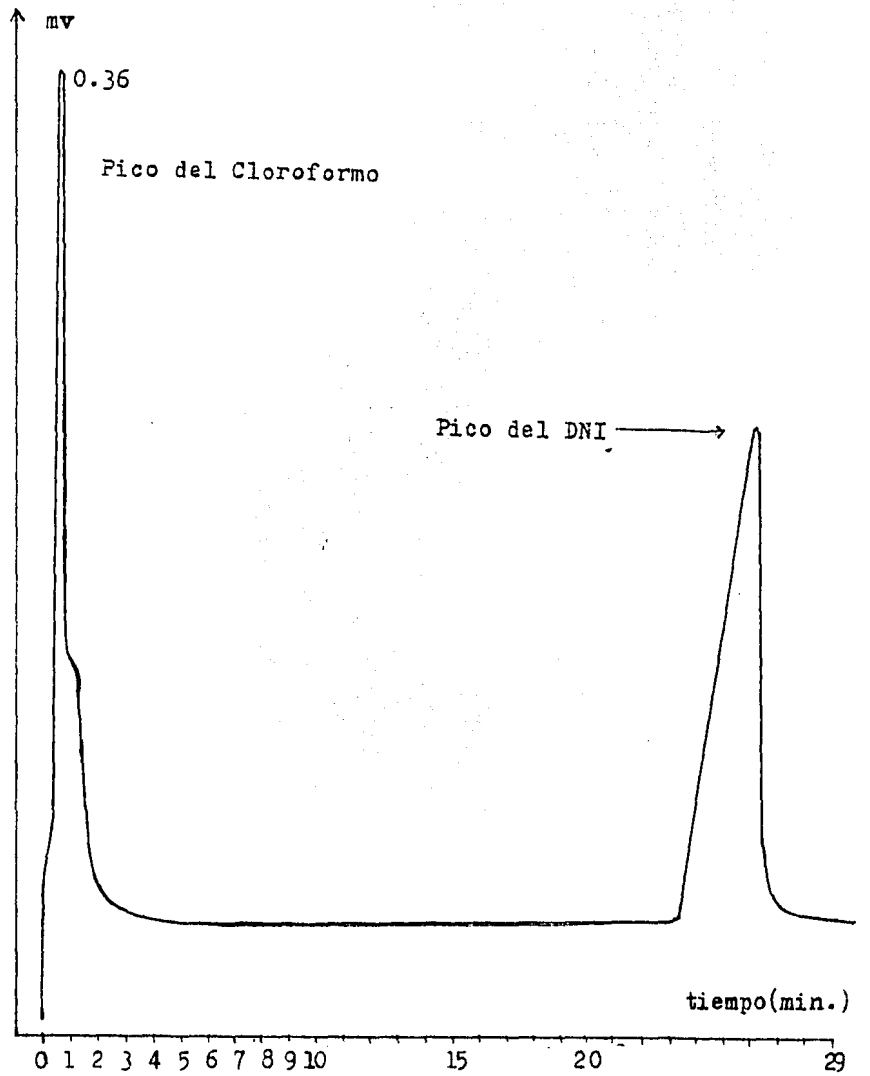


FIGURA Nº 10
Temperatura de la columna = 100°C

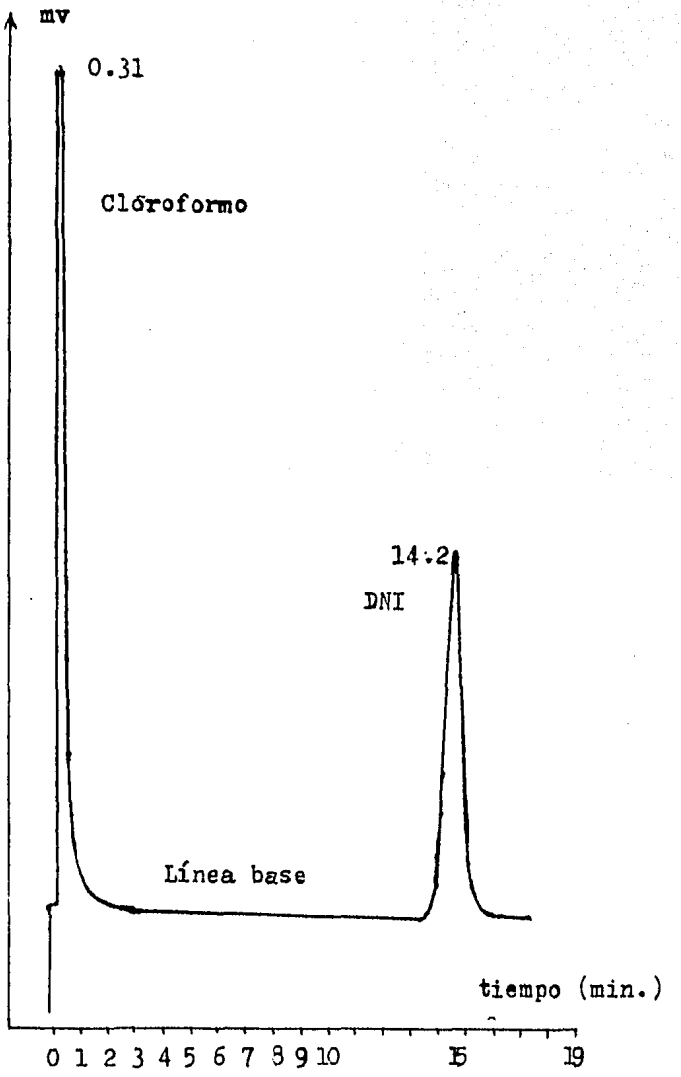
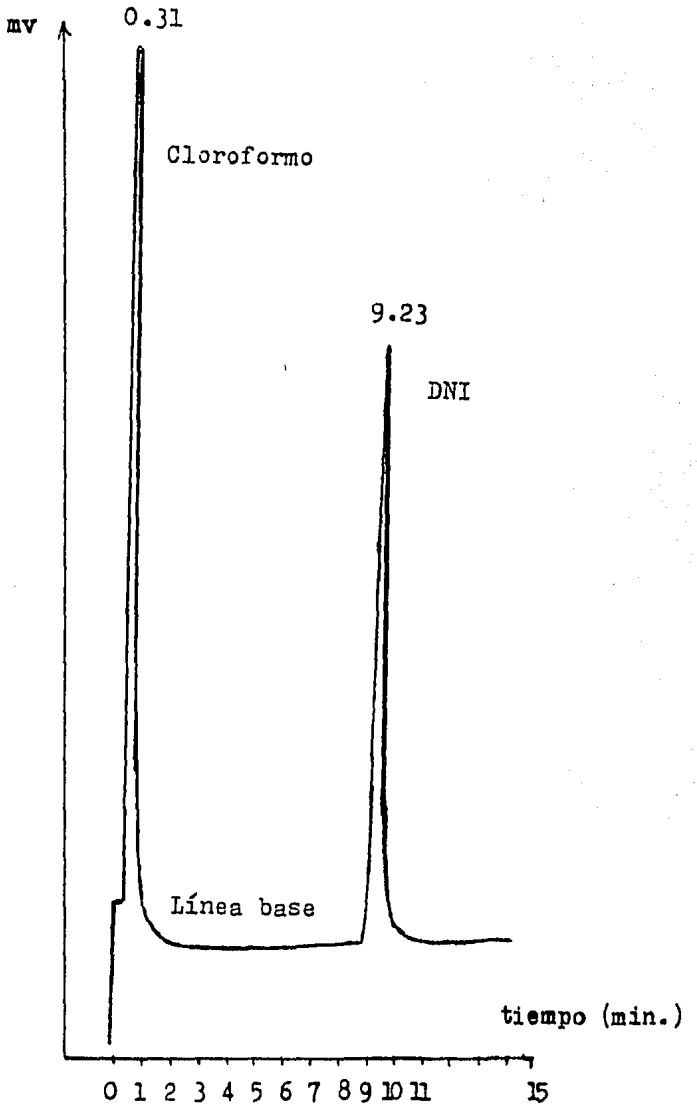
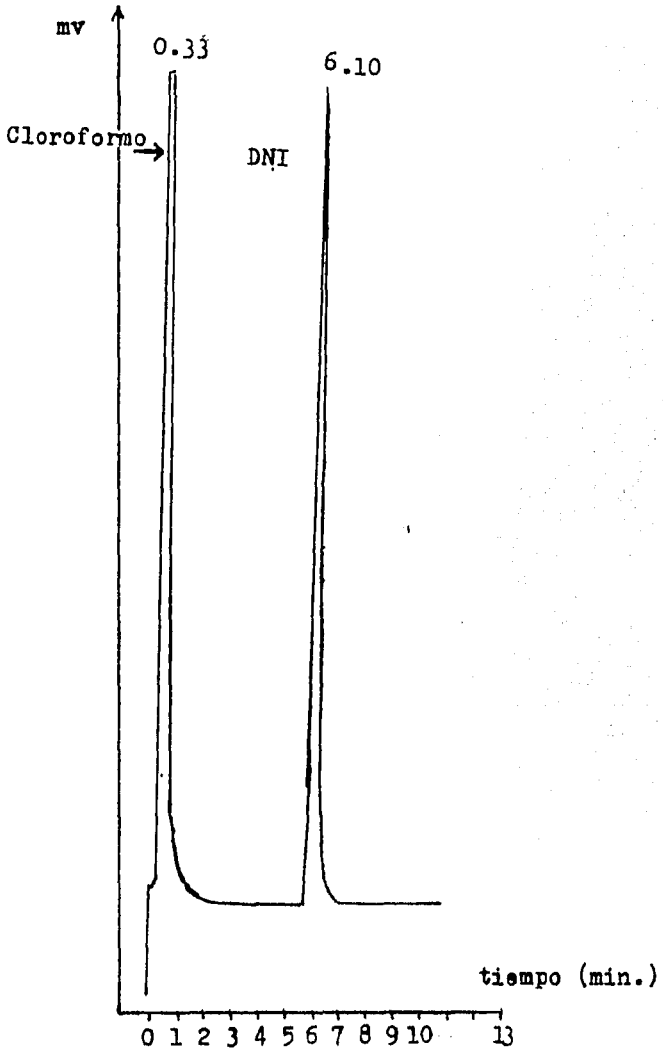


FIGURA Nº 11
Temperatura de la columna = 110°C

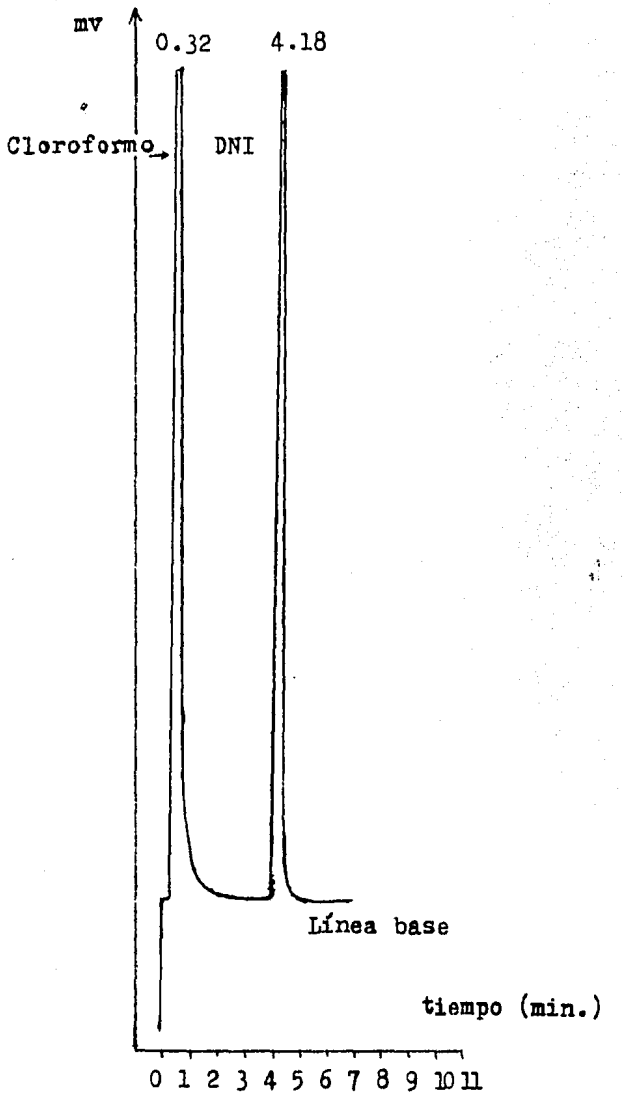


F I G U R A N° 12

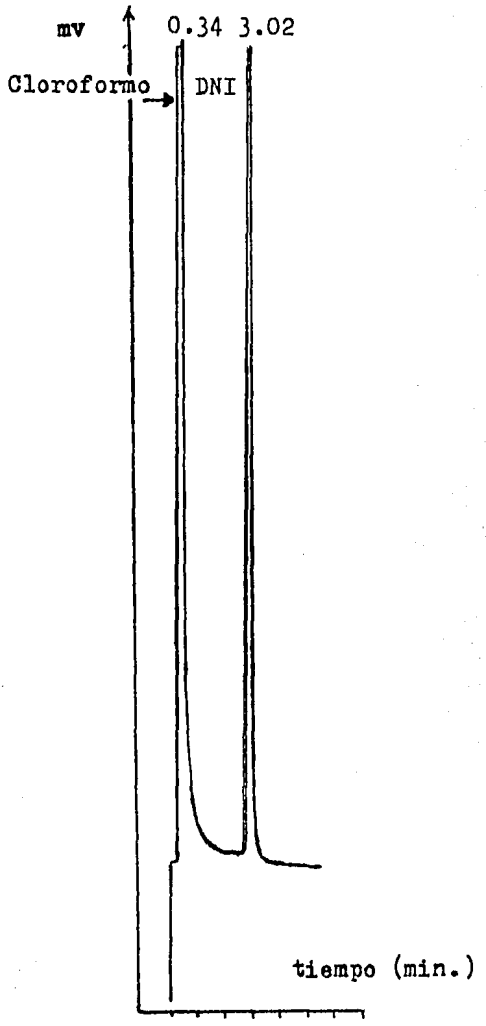
Temperatura de la columna = 120°C



F I G U R A N° 13
Temperatura de la columna = 130°C

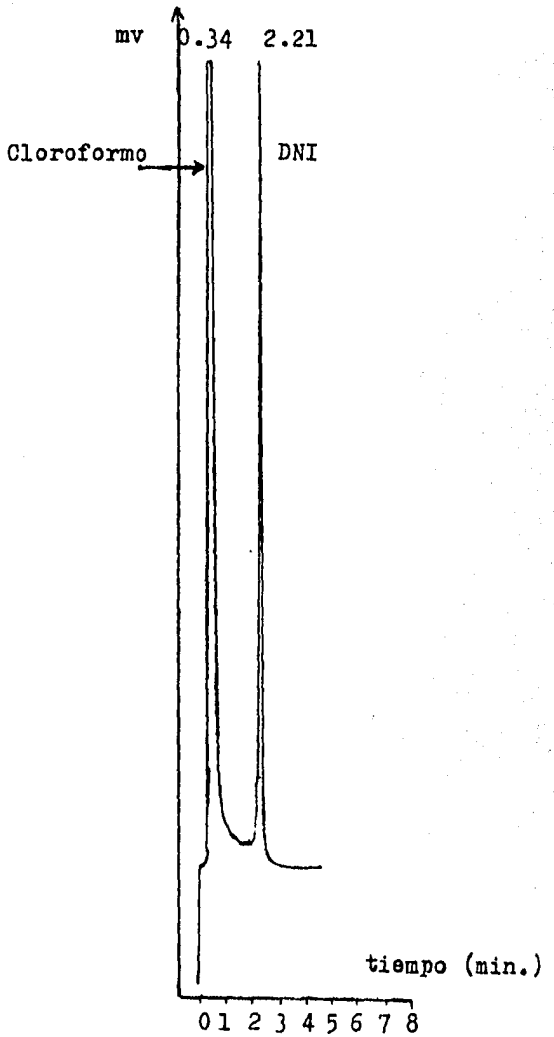


F I G U R A Nº 14
Temperatura de la columna = 140°C



F I G U R A N° 15

Temperatura de la columna = 150°C



F I G U R A N° 16
Temperatura de la columna = 160°C

T°C	t_r DNI min.	t_r solv. min.	tiempo de elución completa min.	R	Nº de platos teóricos N	promedio de N	AEPT cm
100	23.8	0.32	27.0	1	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-	-
110	14.66	0.33	16.6	1	13754.6		
110	14.20	0.31	16.2	1	10665.2	10778.4	0.017
110	14.53	0.32	16.5	1	11166.7		
120	9.18	0.31	11.2	1	11007.0		
120	9.23	0.31	11.2	1	9517.9	10843.4	0.016
120	9.23	0.32	11.2	1	11127.2		
130	6.10	0.33	7.1	1	6615.1		
130	6.12	0.33	7.1	1	6658.5	6555.0	0.027
130	6.10	0.32	7.1	1	4860.0		
140	4.18	0.32	5.1	1	6988.9		
140	4.18	0.32	5.1	1	6988.9	6875.5	0.026
140	4.17	0.32	5.1	1	6955.6		
150	3.02	0.34	4.0	1	14592.6		
150	3.02	0.33	4.0	1	6485.6	6485.6	0.028
150	3.02	0.33	4.0	1	6485.6		
160	2.24	0.32	3.2	1	3568.0		
160	2.25	0.34	3.2	1	4132.6	3765.7	0.047
160	2.25	0.34	3.2	1	8100.0		

T A B L A Nº 3

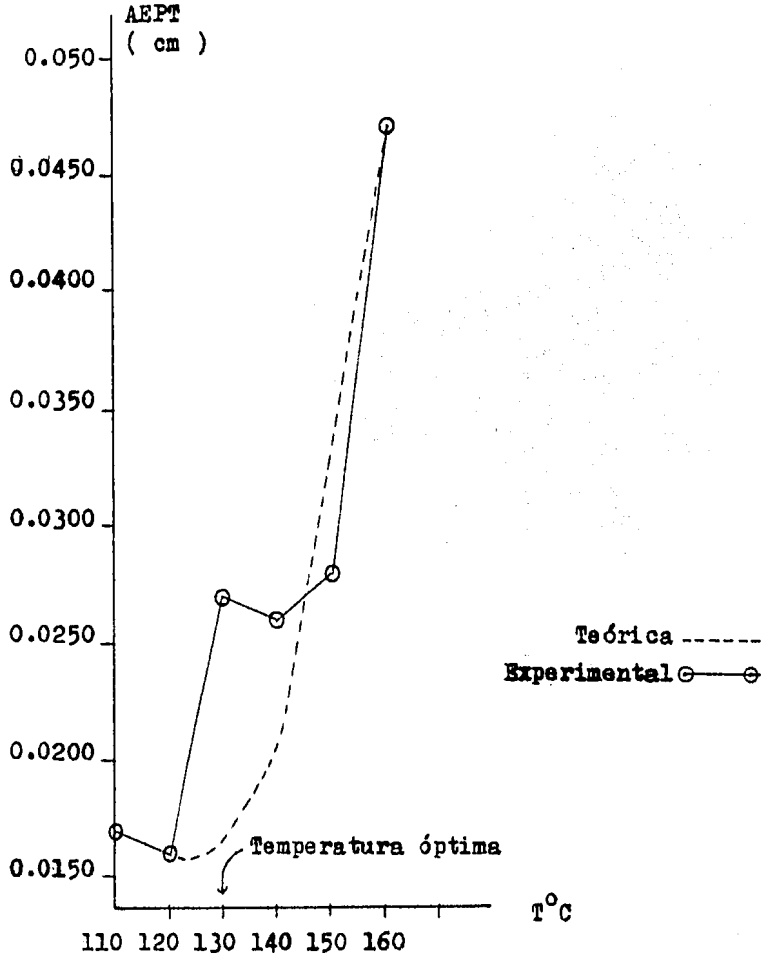
Determinación de la temperatura de trabajo de la columna

R = Resolución

N = número de platos teóricos

AEPT = Altura equivalente a un plato teórico

De la tabla N° 8 se tomaron los datos promediados de - AEPT y se graficaron contra Temperatura (T°C) y éste gráfico muestra la temperatura óptima para realizar el ensayo del DNI (ver Discusión); así : T°C óptima = 130° C (ver figura N° 17).



F I G U R A N° 17
Gráfica AEPT contra Temperatura °C

b) Elección de la temperatura del Detector e Inyector.

Con base en la temperatura del horno seleccionada anteriormente (130°C), las temperaturas del detector e inyector elegidas fueron 150°C respectivamente (ver parte de teoría).

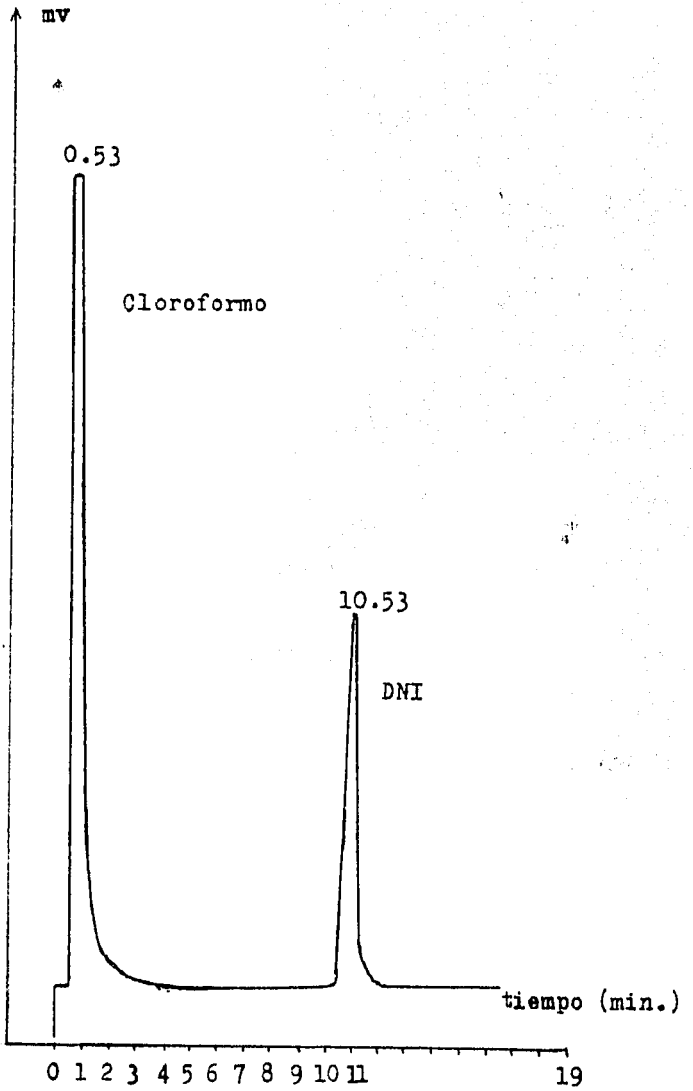
c) Elección del flujo de gas portador (N_2).

Un cromatograma representativo de cada flujo ensayado se presentan en las figuras Nº 18, 19, 20, 21, 22, 23, y los datos agrupados obtenidos aparecen en la tabla Nº 9.

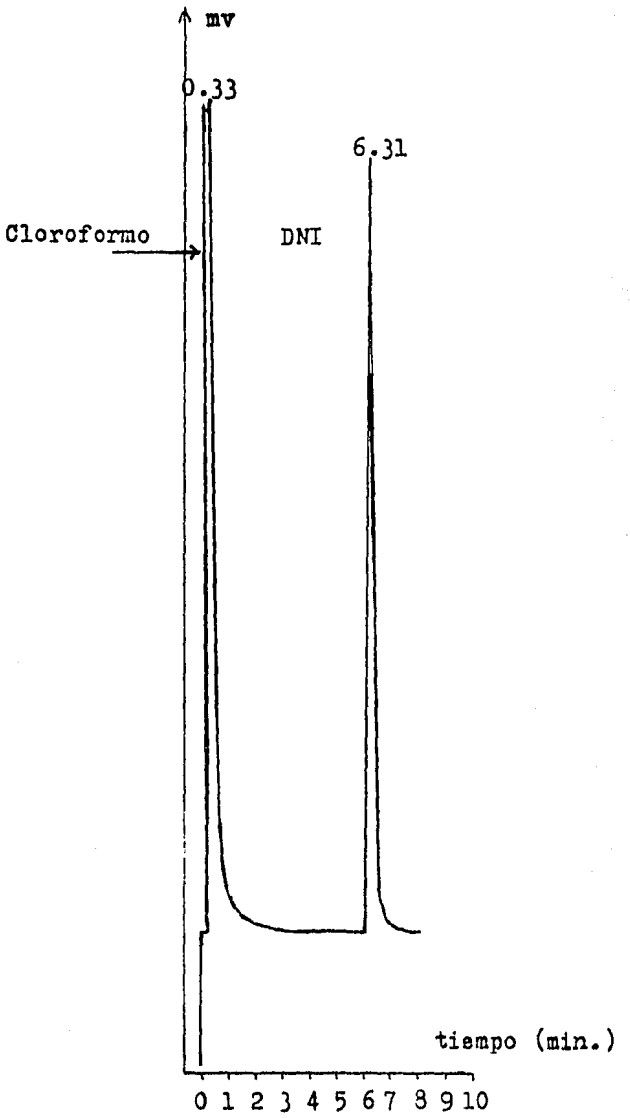
A partir de la misma, se obtuvo un gráfico AEPT contra Flujo (ml/minuto), para determinar el flujo óptimo de operación a la temperatura de trabajo[14 y 15]. Del mismo se obtuvo:

Flujo óptimo = 20 ml/min.

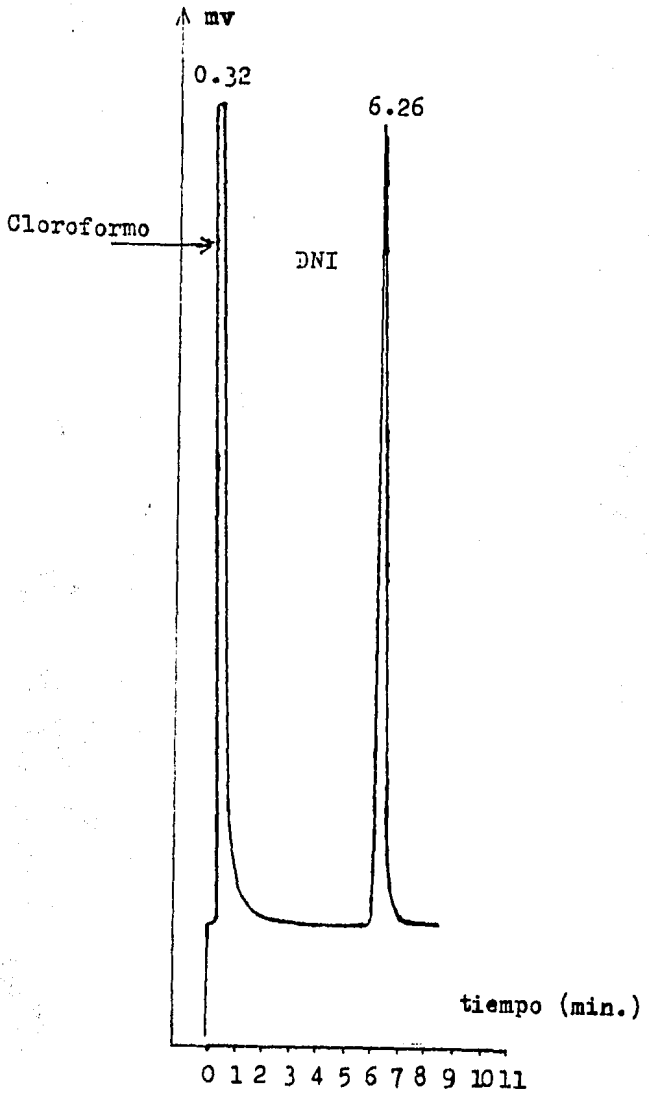
Ver figura Nº 24.



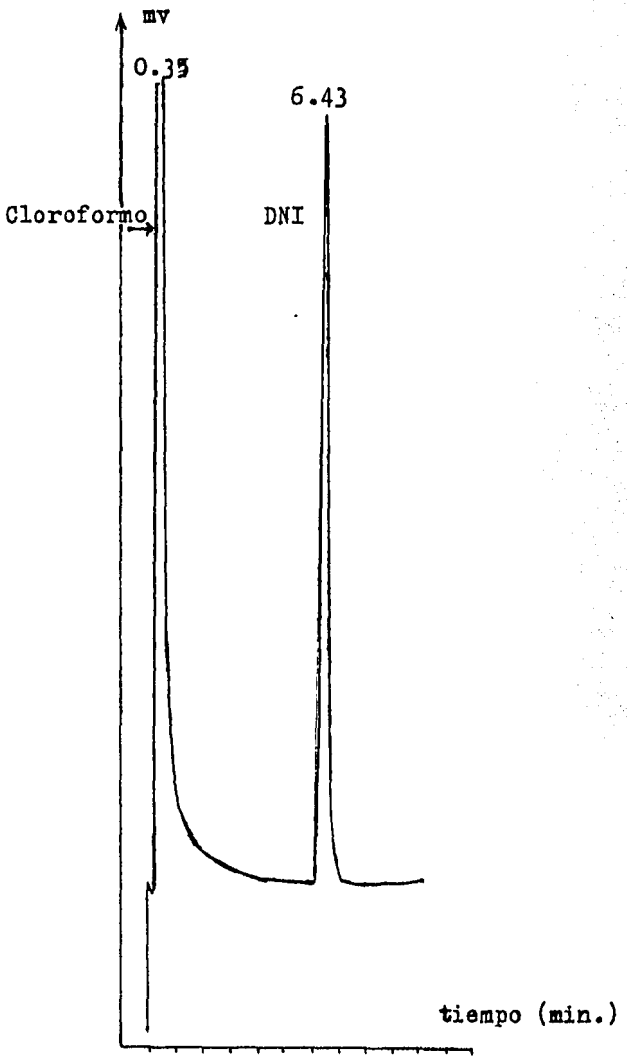
F I G U R A N° 18
Flujo de N_2 = 15 ml/min.



F I G U R A Nº 19
Flujo de N_2 = 20 ml/min.

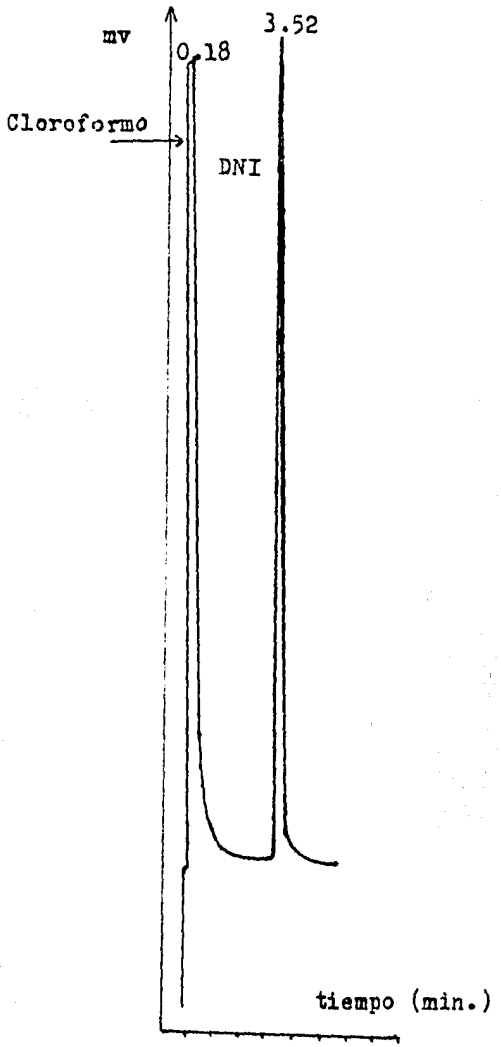


F I G U R A N° 20
Flujo de N_2 = 30 ml/min.



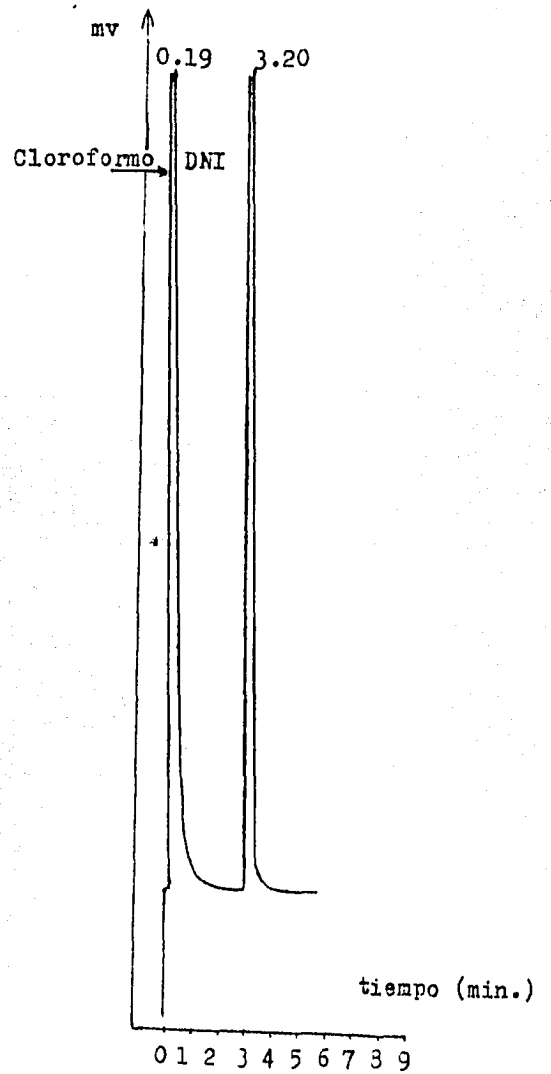
F I G U R A Nº 21

Flujo de N_2 = 40 ml/min.



F I G U R A N° 22

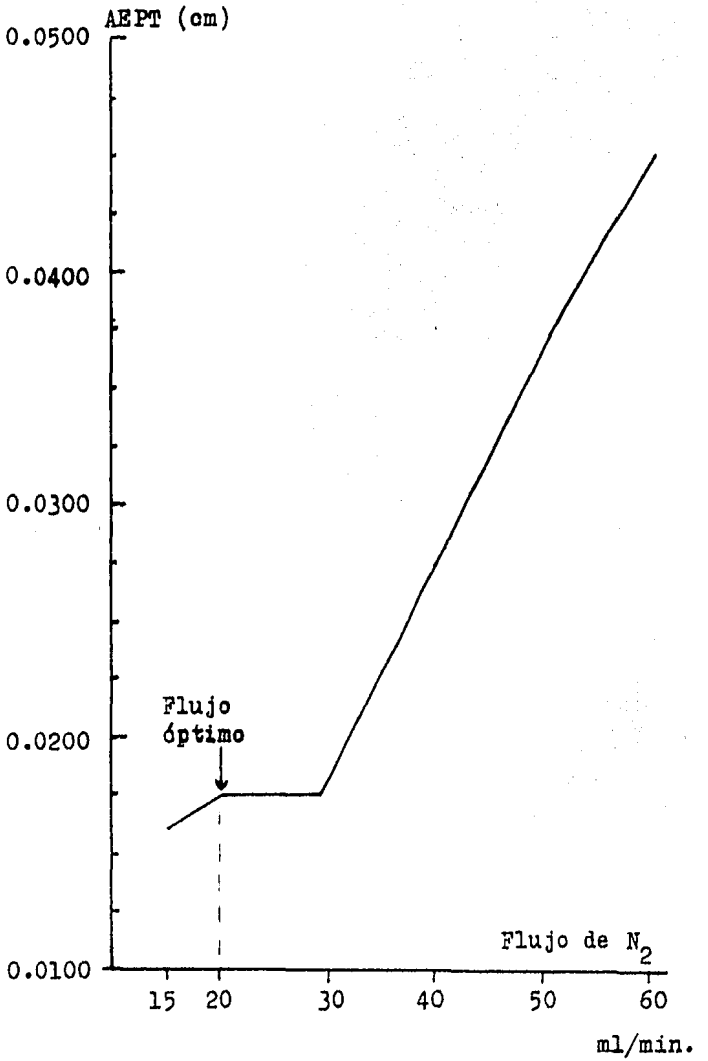
Flujo de N_2 = 50 ml/min.



F I G U R A N° 23
Flujo de N_2 = 60 ml/min.

Flujo ml/min N_2	t_r DNI min.	AEPT (cm)	AEPT (cm) promedio	N
15	10.50	0.125		
15	10.50	0.0164	0.0164	11151.2
15	10.50	0.0164		
20	6.35	0.0179		
20	6.35	0.0178	0.0178	10193.97
20	6.35	0.0173		
30	5.05	0.0181		
30	5.05	0.0179	0.01794	10193.97
30	5.05	0.0178		
40	4.15	0.0265		
40	4.15	0.0265	0.0265	5901.14
40	4.15	0.0264		
50	5.35	0.0367		
50	5.35	0.0367	0.0365	5010.41
50	5.35	0.0364		
60	3.20	0.0446		
60	3.20	0.0446	0.0446	4100.44
60	3.20	0.0450		

T A B L A N° 9
Determinación del flujo óptimo



F I G U R A N° 24
Gráfica AEPT contra flujo N_2

d) Elección de otros factores operacionales del cromatógrafo.

Estos factores se determinaron inicialmente siguiendo recomendaciones reportadas y las indicaciones del manual de operación del cromatógrafo. Estos fueron los siguientes:

- Margen de la carta = 15% de su anchura.
- Velocidad de la carta = 0.5 cm/minuto.
- Sensibilidad = Mando de atenuación de señal x4 (ATTN - x4) y un valor de 2 para el mando de THESHOLD .

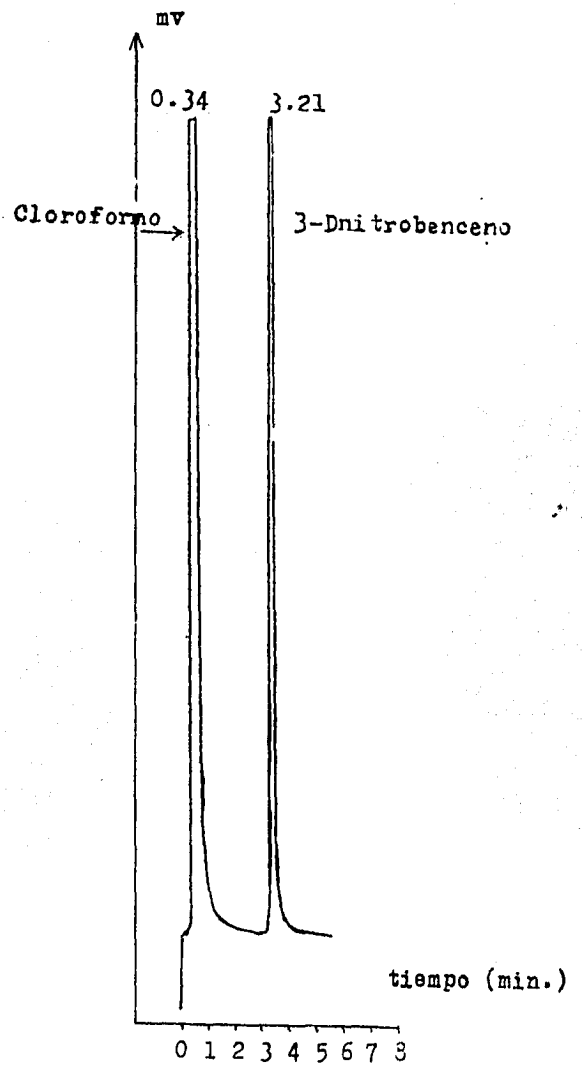
e) Elección del sistema de calibración ó de cálculo cuantitativo. Determinación de la resolución y eficiencia.

Se eligió el método de calibración por estandarización interna por lo expuesto en la parte correspondiente a la teoría.

Determinación del estándar interno.

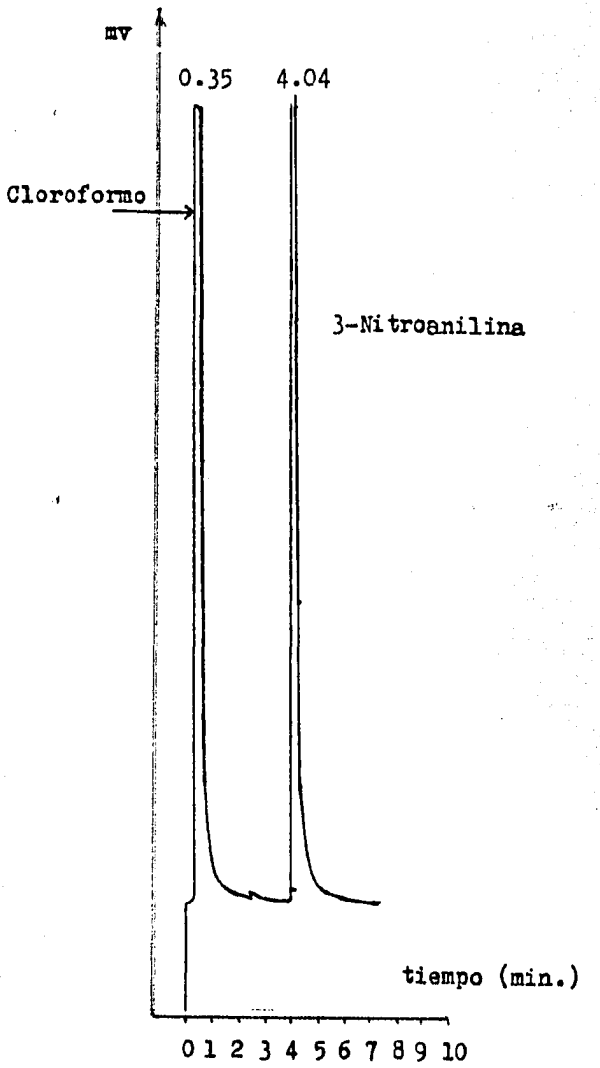
- Se probaron compuestos, en cloroformo GLC a una concentración de 0.5 mg/ml:
  - 3-Dinitrobenceno
  - Acido pícrico
  - 3-Nitroanilina
  - 3-Nitrobenzaldehído

Un cromatograma representativo del análisis de cada una de éstas sustancias se presenta a continuación en las figuras Nº 25, 26, 27 y 28.

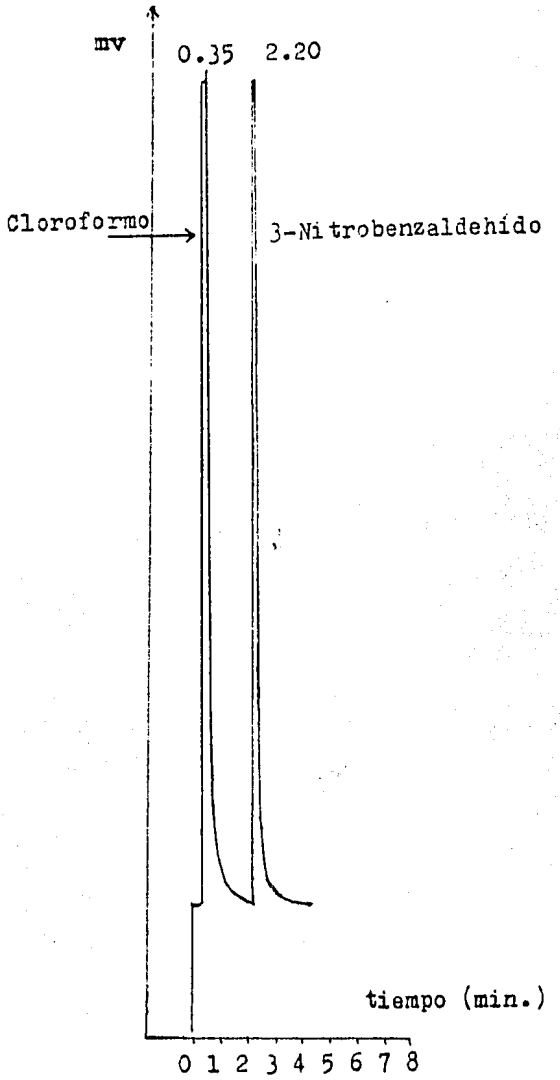


F I G U R A N° 25
Determinadión del estándar interno
(3-Dinitrobenceno)

F I G U R A Nº 26
Determinación del estándar interno
(Acido pícrico)



F I G U R A Nº 27
Determinación del estándar interno
(3-Nitroanilina)



F I G U R A Nº 28
Determinación del estándar interno
(3-Nitrobenzaldehído)

SUSTANCIA	Tiempo de retención (minutos)	Tiempo de retención del DNI (minutos)	Interferencias
3-Dinitrobenceno	3.22	6.15	No
"	3.21	6.15	No
"	3.21	6.15	No
3-Nitroanilina	4.03	6.15	sí
"	4.03	6.15	sí
"	4.04	6.15	sí
Acido pícrico	-	6.15	-
"	-	6.15	-
"	-	6.15	-
3-Nitrobenzaldehido	2.20	6.15	No
"	2.20	6.15	No
"	2.21	6.15	No

T A B L A N° 10
Resultados para la determinación del estándar interno

Según los cromatogramas anteriores, se eligió el 3-Dinitrobenceno (DNB) como estándar interno, debido a que presentó:

- Muy buena respuesta del detector.
- Tiempo de retención = 3.2 minutos, no presentando interferencias con el DNI.
- Los picos generados son grandes, agudos y de forma correcta.

- No presenta desviaciones en la línea base.
- No presenta interferencias con el disolvente, ni picos o señales extrañas.
- No hay evidencia de reacción de degradación u otras interferencias.
- La resolución promedio entre los picos de DNI/DNB es 6.4 >> 1, como se muestra en la tabla Nº 11 obtenida a partir de tres inyecciones de una mezcla DNI/DNB.

Relación de áreas DNI / DNB	Resolución $R = \frac{2\Delta t}{w_1 + w_2}$
$\frac{2435.11}{2013.98} = 0.30793 \sim 0.309$	R = 6.4
$\frac{2467.42}{3062.41} = 0.30573 \sim 0.306$	R = 6.4
$\frac{2438.39}{3083.39} = 0.30056 \sim 0.306$	R = 6.4

TABLA Nº 11
Determinación de la Resolución

- Determinación de la resolución y eficiencia con los parámetros seleccionados.

De los cromatogramas del punto anterior se tiene:

- Resolución promedio = 6.4 >> 1
- Platos teóricos = 1377.77

4.1.4 Extracción del principio activo y de la forma farmaceútica. Preparación de la muestra e identificación del DNI.

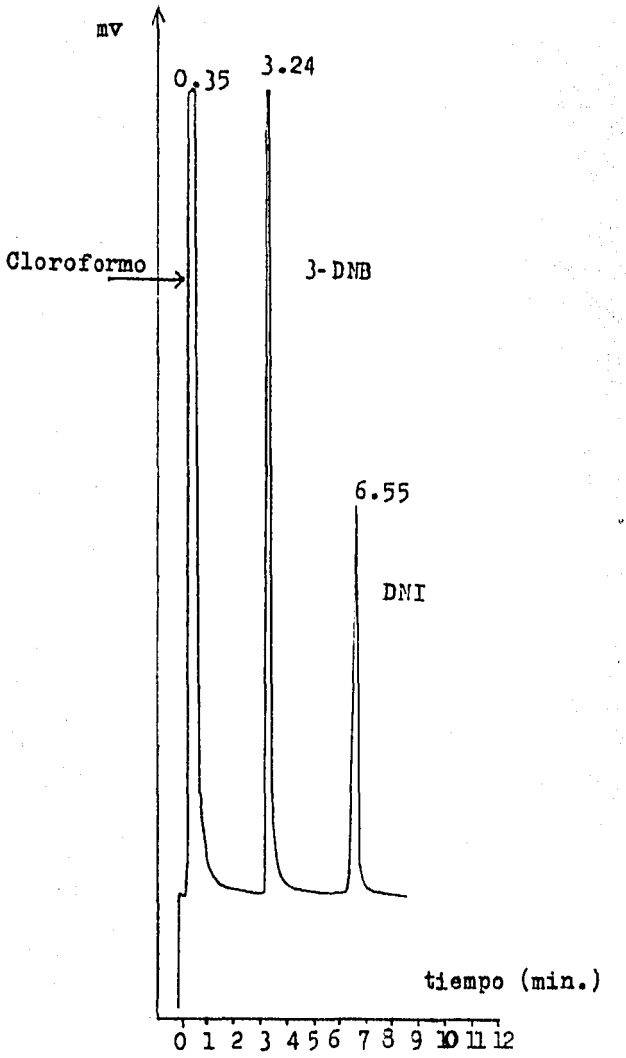
De los ensayos descritos en la parte experimental se obtuvieron los cromatogramas de las figuras Nº 29 y 30.

Las condiciones del equipo utilizadas para lo anterior fueron las siguientes:

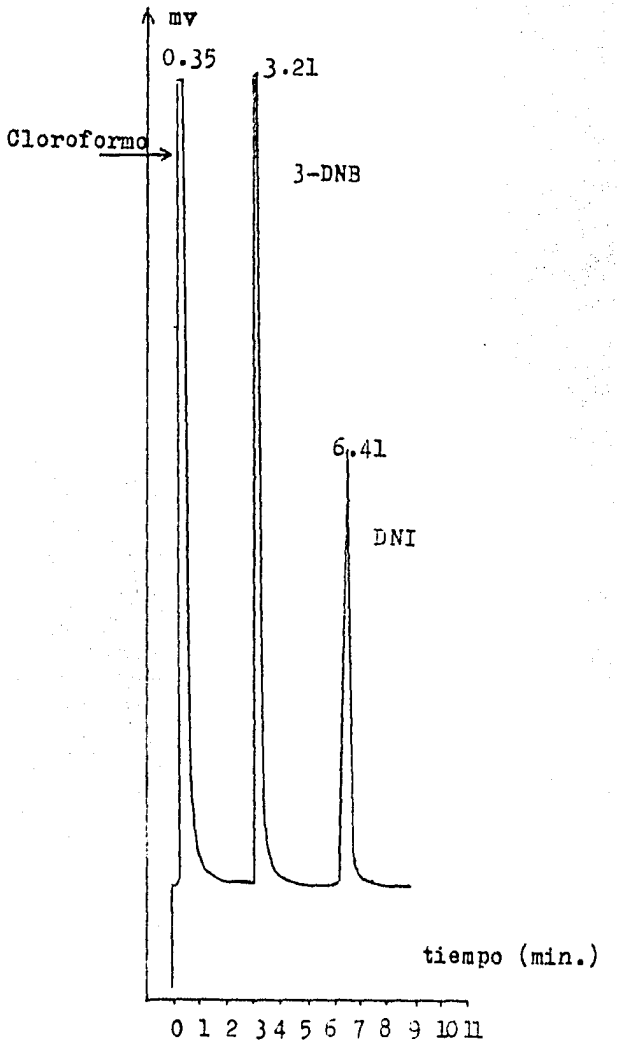
Columna y fase: De vidrio de 1/8" de diámetro interno por 6 pies de largo, empacada con fase OV-101 al 2.5% sobre Chromosorb WHP.

Temperatura del horno = 130°C.
Temperatura del inyector= 150°C.
Temperatura del detector= 150°C.
Flujo de gas portador = 20 ml/min.
Presión del H_2 del detector = 4.1 Kg/cm^2 (a 20°C).
Presión del aire del detector = 4.1 Kg/cm^2 (a 20°C).
Atenuación de la señal = x4
Velocidad de la carta = 0.5 cm/min.
Margen = al 15%
Volúmen de aforo de la muestra = 50 ml
Concentración del DNI en la preparación = 0.5 mg/ml

Los cromatogramas muestran que no existen interferencias de los excipientes, ni evidencia de degradación.



F I G U R A Nº 29
Cromatograma de la preparación de tabletas



F I G U R A Nº 30
Cromatograma de la preparación Std. DNI/DNB

4.1.5 Técnica desarrollada, aplicación del método en tabletas y ajuste de la misma.

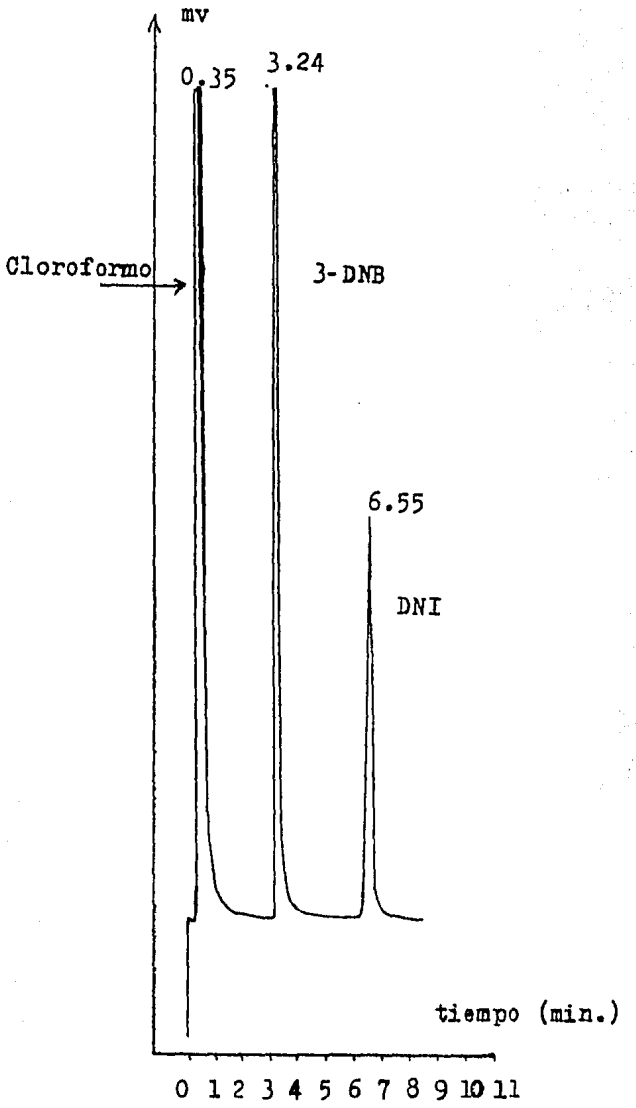
- Peso promedio. El peso de las tabletas empleadas fué: 0.1493 g = 150 mg/tableta.
- Polvo de tableta equivalente a 25 mg de DNI = 375 mg
- Solución del estándar interno. Se obtuvo una solución clara de color amarillo paja y transparente. Su concentración fué de 0.5 mg/ml en la preparación de la muestra
- Solo se preparó una muestra de tabletas como se indicó en la parte correspondiente, y solo una preparación de DNI estándar cuya concentración fué 0.5 mg/ml, y 0.5 mg por ml de estándar interno (3-DNB). Los cromatogramas obtenidos de las preparaciones anteriores se presentan en las figuras Nº 31 y 32, y las áreas y resultados obtenidos de los mismos se presentan en la tabla Nº 12.

Como se ve en la tabla anterior, existe variación significativa entre una inyección y otra a las mismas condiciones, por lo que fué necesario hacer cambios en la operación del cromatógrafo.

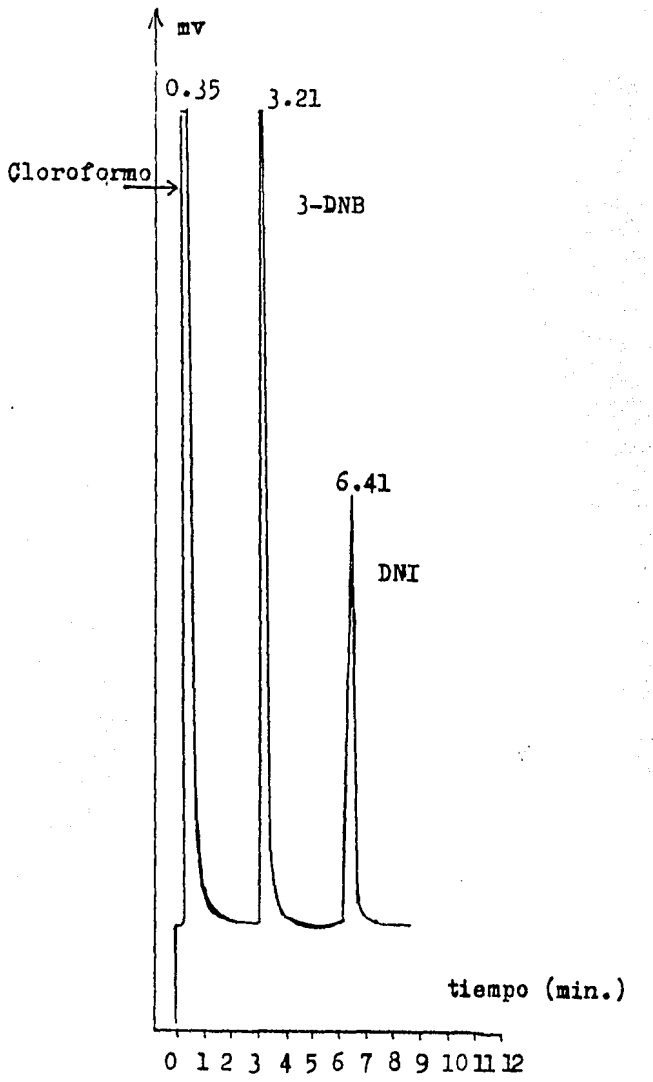
Ajustes a la metodología.

Debido a las buenas eluciones obtenidas con las condiciones operacionales encontradas, no se modificó ninguno de los parámetros básicos anteriores; se hicieron ajustes a manera de prueba de lo siguiente:

- Empleo de temperatura más alta en el detector.
- Limpieza oportuna del conducto de escape y quemador en el detector.



F I G U R A N° 31
Preparación de tabletas



F I G U R A N° 32
Preparación Std. DNI/DNB
para comparación con la preparación de tabletas

Inyecciones de muestra	Areas	Contenido de DNI recuperado por tbta.	Contenido teórico de DNI en muestra.
1º Std. int.	3966.02	9.23 mg	9.91 mg
DNI	1537.96		
2º Std. int.	3949.94	9.23 mg	9.91 mg
DNI	1579.18		
3º Std. int.	3925.05	8.84 mg	9.91 mg
DNI	1503.59		
Std. int.	3987.41	F_c = 2.2865	
Std. DNI	1743.87		

T A B L A Nº 12
Resultados de la técnica sin ajustar aplicada a tabletas

De los ajustes se obtuvo:

a) Se aumentó la temperatura del detector a 200°C, y se encontró mayor reproducibilidad y sensibilidad. La limpieza del detector eliminó completamente las señales de ruido excesivo que se presentó frecuentemente; la optimización de la hermeticidad eliminó coleos que también se presentaron frecuentemente.

b) Se encontró que considerando globalmente los ajustes del detector, la causa de la variabilidad fué la combustión de los eluatos, por lo que se ajustó la flama. Se mantuvo la presión de aire y se redujo la presión del hidrógeno (manual de operación del cromatógrafo) de la siguiente manera:

Gas	Presión inicial	Presión ajustada	Flujo final ajustado(20°C)
H_2	4.1 Kg/cm^2	3.6 Kg/cm^2	70 ml/min.
Aire	4.1 Kg/cm^2	4.0 Kg/cm^2	415 ml/min.

T A B L A N° 13
Ajustes de presión y flujo en el detector

En la tabla N° 13 se muestran los cambios realizados en el detector.

c) Se redujo la concentración del estándar interno en la preparación de la muestra, de tal manera que su valor final es 0.25 mg/ml obteniendo magnífica respuesta.

d) Se cambió la cantidad de polvo de tableta a pesar en cada preparación, a la cantidad de polvo equivalente a 10 mg de DNI (igual al contenido de una tableta). También se cambió el volúmen de la preparación (aforo) a 25 ml.

e) Se optimizó el trazo gráfico, haciendo que cambiara la atenuación automáticamente luego de eluírse y registrarse el estándar interno; el valor inicial de ésta se cambió de x4 a x5 y luego el cambio automático aparece a los 5.5 minutos de la inyección a un valor final de x4, para ampliar el pico del DNI y mejorar el registro.
Se programó el cromatógrafo a parar automáticamente a los 9 minutos de la inyección.

f) Todo lo anterior se comprobó con inyecciones sucesivas de un estándar de DNI adicionado de estándar interno y

preparado como se indica en el ensayo para tabletas, - cuya pureza es 38.69%, obteniendose los siguientes re - sultados (con estándar de referencia USP):

Ensayo	Pureza
1	38.739 %
2	38.693 %
3	38.682 %
4	38.667 %

Pureza promedio = 38.69%

Posteriormente se ensayó otra muestra de tabletas prepa rada análogamente, obteniendo los siguientes resultados (con estándar de referencia USP):

Inyección	Area DNI	Area DNB	Contenido de DNI por tbta.
1	3922.48	7668.00	9.22 mg
2	3866.60	7600.95	9.22 mg
3	3819.00	7437.84	9.25 mg

T A B L A N° 14
Repetibilidad del ensayo ajustado con una muestra de tabletas

Como se puede ver en la tabla N° 14 se mejoró la detección de solutos así como la repetibilidad.

g) Condiciones de trabajo para la metodología ajustada.

- Temperatura de la columna = 130°C
- Temperatura del inyector = 150°C
- Temperatura del detector = 200°C

- Flujo de gas portador = 20 ml/min.
- Presión del H_2 del detector = 3.6 Kg/cm^2 a 20°C.
- Presión de aire del detector = 4.0 Kg/cm^2 a 20°C.
- Flujo de H_2 del detector = 70 ml/min. a 20°C.
- Flujo de aire del detector = 415 ml/min. a 20°C
- Atenuación de la señal = x5
- Cambio de atenuación = automático a los 5.5 minutos - de la inyección a un valor de x4.
- Velocidad de la carta = 0.5 cm/min.
- Margen = al 15%
- Volumen de aforo = 25 ml

Ver cromatograma obtenido con las condiciones anterio - res en la figura Nº 33.

4.1.6 Determinación cuantitativa del DNI (descripción completa del ensayo).

REACTIVOS

Patrón de referencia de Dinitrato de Isosorbide USP.
Patrón interno 3-Dinitrobenceno purificado.
Cloroformo grado reactivo.

PATRON INTERNO

Pesar exactamente 625 mg. de 3-Dinitrobenceno, aforar - y disolver a 500 ml con cloroformo evitando cualquier - tipo de pérdida, teniendo una concentración final de - 1.25 mg/ml

PATRON DE REFERENCIA

Pesar exactamente la cantidad equivalente a 10 mg de - DNI patrón de referencia. Transferir a un matráz volumétrico de 25 ml, adicionar una alícuota de 5 ml de la solución preparada de estándar interno y llevar al aforo con cloroformo grado reactivo. Agitar por ultrasonido - 15 minutos y continuar la agitación con agitador magnético por 15 minutos más. Filtrar cuidadosamente, el contenido del matráz con papel filtro Whatman Nº 40 (previamente humedecido con cloroformo) recibiendo los filtrados en un recipiente adecuado que cierre herméticamente. La concentración final del estándar es de 0.4 mg por ml).

PREPARACION DE LA MUESTRA

Obtener el peso promedio de 20 tabletas de DNI y pulverizar. Pesar exactamente una cantidad equivalente a - 10 mg de DNI (ó al equivalente al contenido de una tableta) y transferir cuantitativamente a un matráz volumétrico de 25 ml, adicionar un poco de cloroformo para humedecer el polvo. Adicionar 5 ml de la solución de estándar interno y llevar finalmente al aforo con cloroformo G.R. ; tapar el matráz perfectamente y someterlo a ultrasonido por 15 minutos, posteriormente agitar magnéticamente otros 15 minutos. Finalmente filtrar el contenido del matráz con papel Whatman Nº 40 previamente - humedecido con cloroformo, recibir los filtrados en un recipiente adecuado que cierre herméticamente.

CONDICIONES DEL EQUIPO

Son las que aparecen en el punto 4.1.5 anterior.

PROCEDIMIENTO

Inyectar al cromatógrafo, 3 veces, 3 microlitros de la solución del patrón de DNI y obtener los registros respectivos, calcular el factor de respuesta promedio. Inyectar al cromatógrafo, 3 veces, 3 microlitros de la solución de la preparación de la muestra, obtener los registros respectivos y calcular la cantidad en mg/tbta. de DNI, por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{mg DNI/tbta.} = \frac{F_2 \times A_2 \times C_1}{A_1} \times 25 \quad -- (9)$$

en donde:

$F_2 = F_c$ = Factor de corrección promedio obtenido de la solución del patrón de referencia del DNI.

A_2 = Area obtenida en el cromatógrafo, del DNI en la preparación de la muestra.

C_1 = Concentración del estándar interno en la solución de la preparación de la muestra.

A_1 = Area obtenida en el cromatograma, del estándar interno en la solución de la preparación de la muestra.

Cálculo de F_2:

$$F_2 = \frac{F_1 \times A'_1 \times C'_2}{C_1 \times A'_2} \quad ------ (10)$$

en donde:

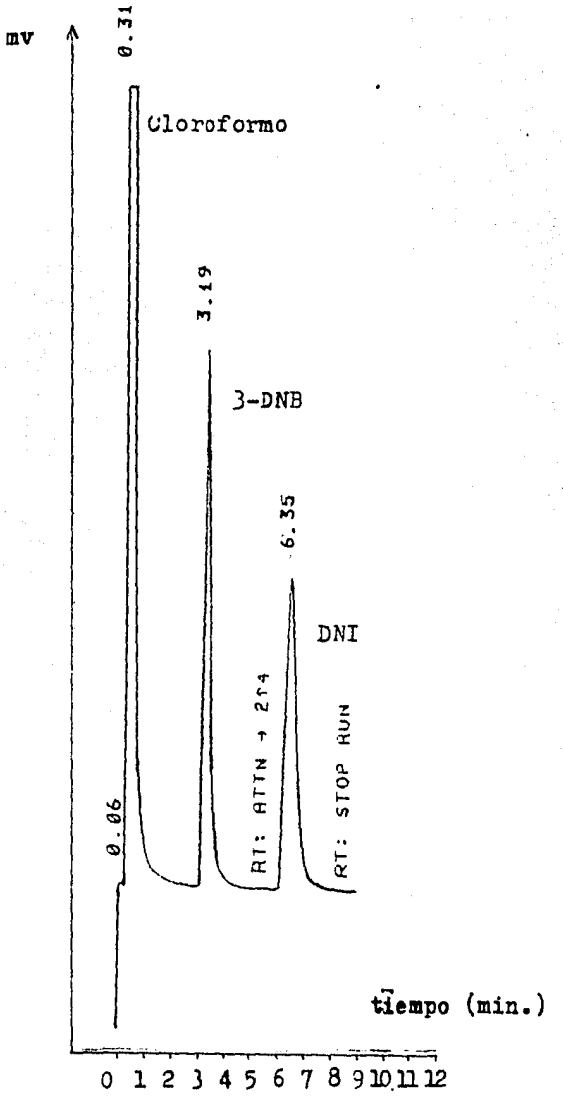
F_1 = 1.0 (factor de corrección)

A_1' = Area obtenida en el cromatograma, del estándar interno en la solución del patrón de referencia de - DNI.

C_1' = Concentración del estándar interno en la solución del patrón de referencia de DNI.

A_2' = Area obtenida en el cromatograma, del DNI en la - preparación de la solución del patrón de referen - cia de DNI.

C_2' = Concentración del DNI en la solución del patrón de referencia de DNI.



F I G U R A N° 33

Cromatograma representativo de la aplicación de la técnica ajustada; como se puede ver no hay interferencias debidas a excipientes.

4.2 V A L I D A C I O N D E L M E T O D O

a) Especificidad.

Los resultados de éstas determinaciones se presentan en las figuras Nº 34, 35, 36, 37.

Los tiempos de retención de los picos no identificados que aparecen en los cromatogramas de las figuras Nº 34 y 35, son diferentes al tiempo de retención del DNI, y por lo tanto no interfieren en su elución; en los cromatogramas de las figuras Nº 36 y 37 no hay evidencia de interferencias o de - gradaciones.

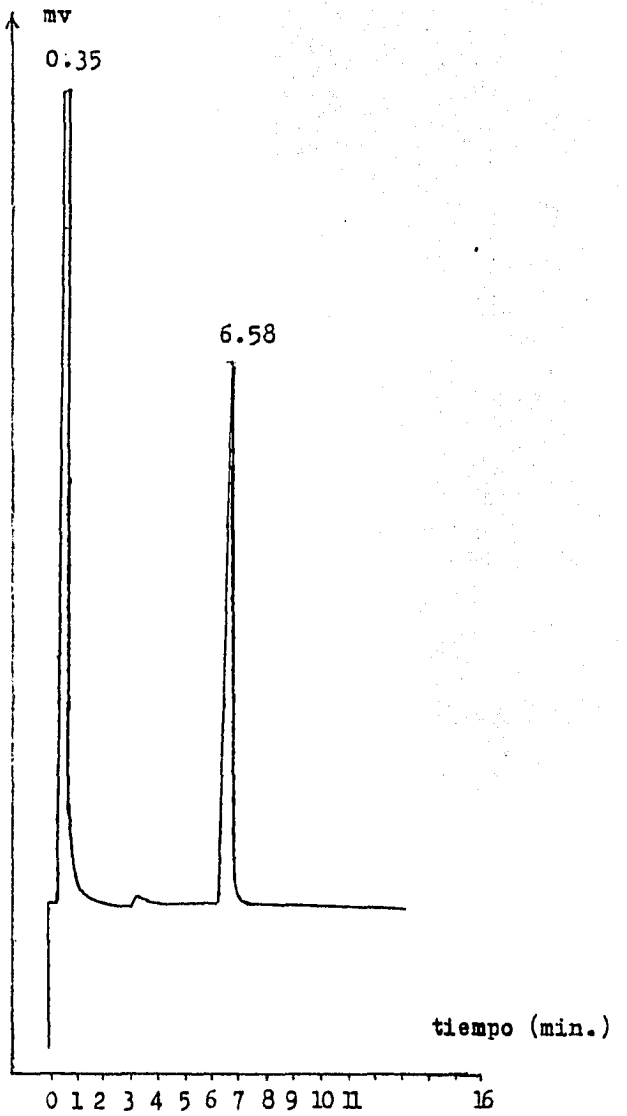
b) Linearidad de la muestra.

Las cantidades recuperadas se presentan en la tabla Nº 15 y el gráfico obtenido con éstos datos ajustados por regresión, se presentan en la figura Nº 38.

Como se puede ver en el gráfico correspondiente, los parámetros calculados caen dentro de lo establecido.

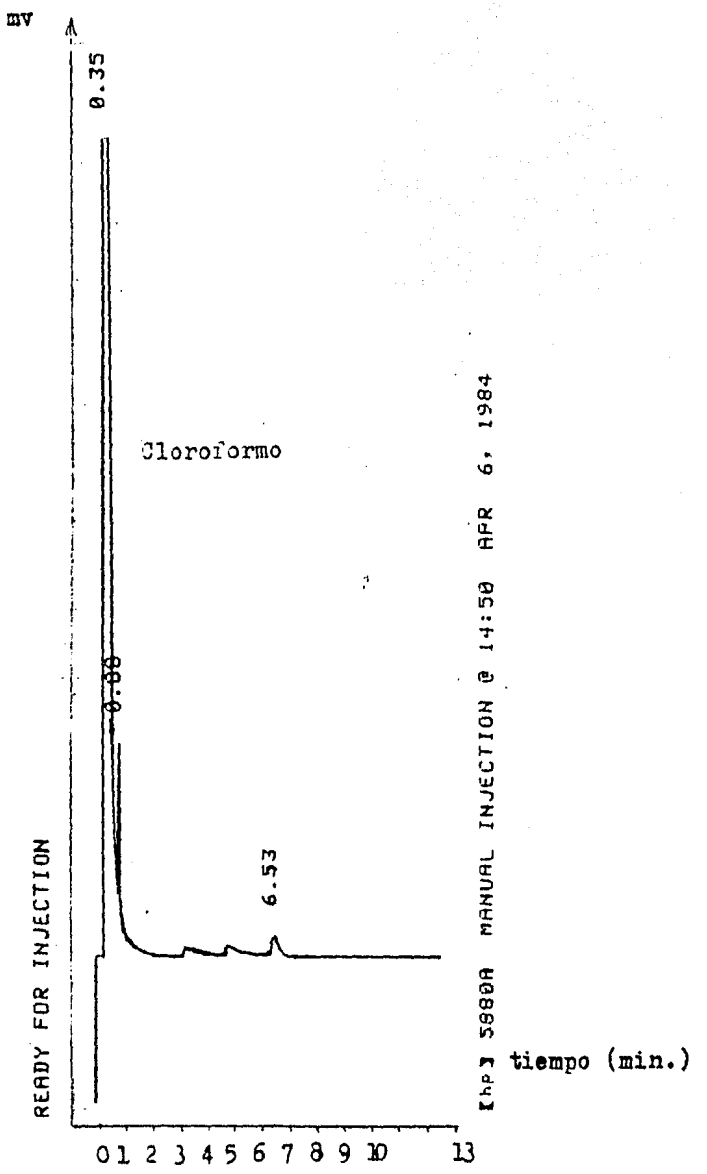
c) Linearidad del estándar.

Las cantidades registradas se presentan en la tabla Nº 16 y el gráfico obtenido con los datos ajustados por regre - sión se presentan en la figura Nº 39.



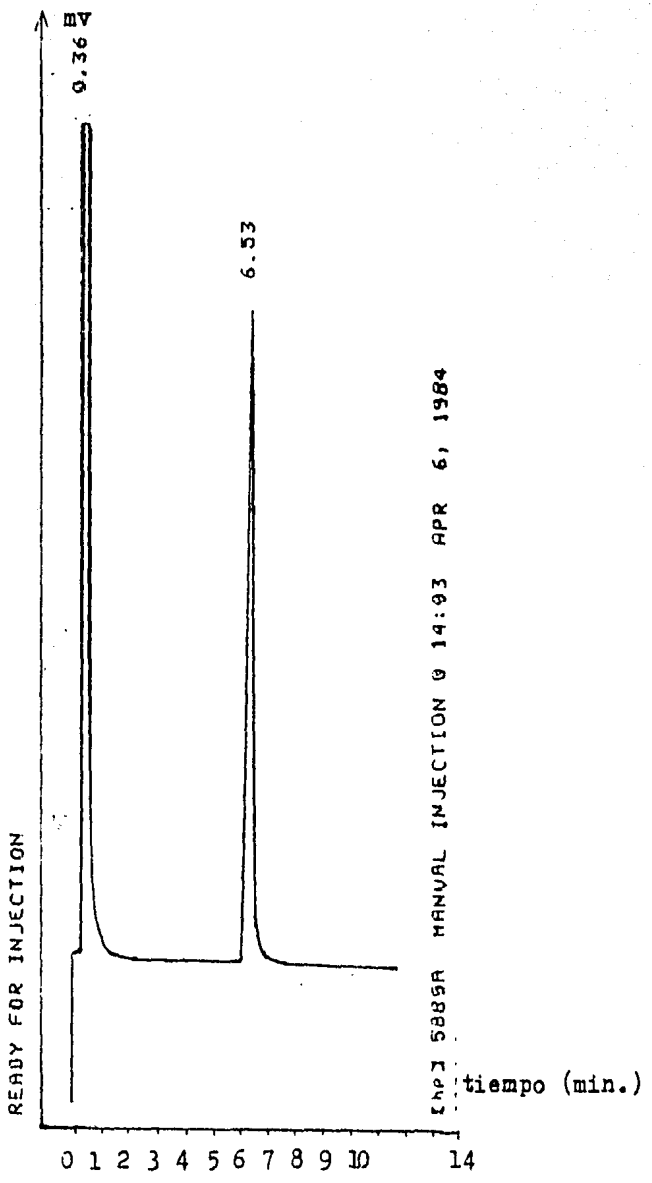
F I G U R A N° 34

Determinación de la especificidad. Muestra N° 1, hidrólisis ácida de DNI



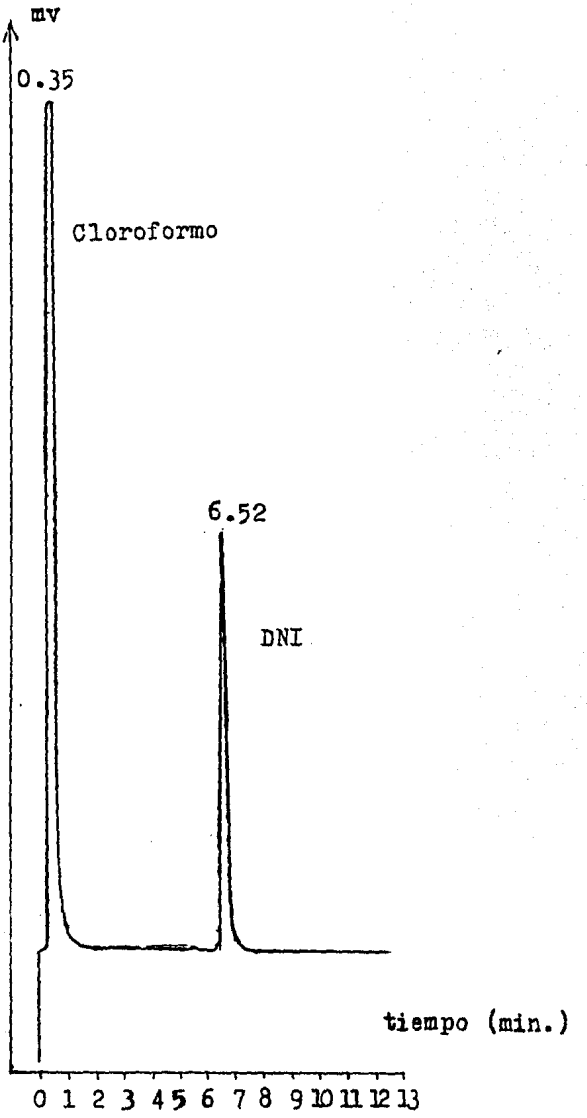
F I G U R A N° 35

Determinación de la especificidad. Muestra N° 2, hidrólisis alcalina de DNI.



F I G U R A Nº 36

Determinación de la especificidad. Muestra Nº 3, calentamiento de DNI en agua.



F I G U R A N° 37
Determinación de la especificidad. Muestra N° 4, degradación en seco de DNI.

%	mg adicionados	Prom.de mg recuperados	% recuperado	1ª preparación recup.promedio de 2 inyecciones	2ª preparación recup.promedio de 2 inyecciones
60	6.00	5.97	99.50	6.12 mg	5.83 mg
80	8.00	7.89	98.63	7.79 mg	7.99 mg
100	10.00	10.05	100.50	10.04 mg	10.05 mg
120	12.00	11.96	99.67	11.97 mg	11.95 mg
140	14.00	13.98	99.86	13.99 mg	13.96 mg

T A B L A Nº 15
Resultados de la linearidad de la muestra.

GRAFICA DE LA LINEARIDAD DE LA MUESTRA

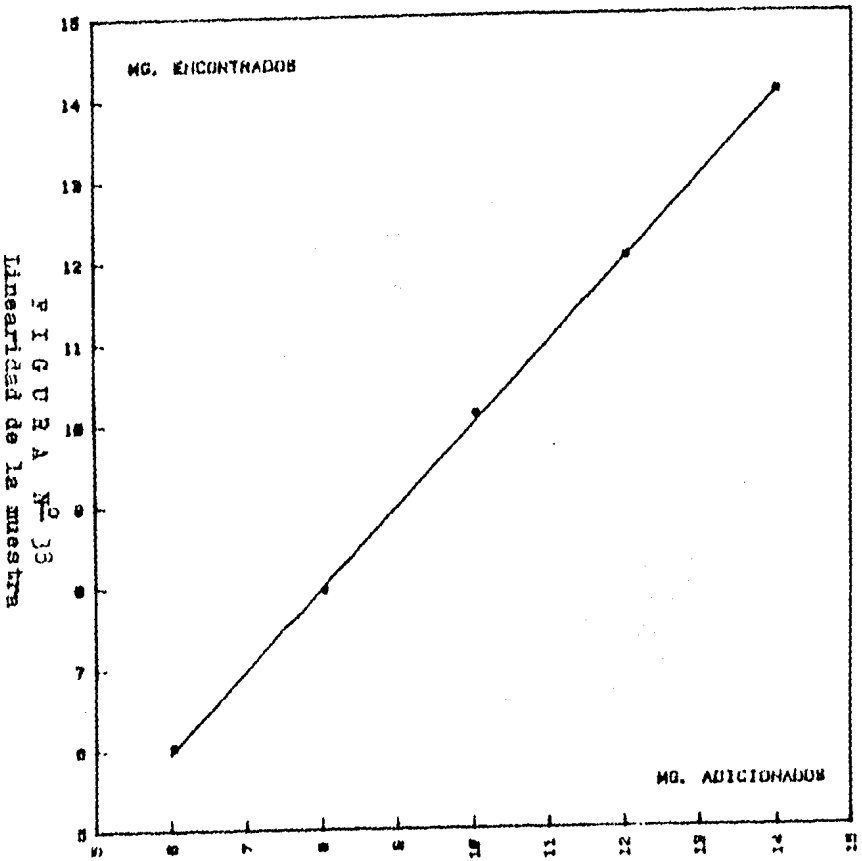


FIGURA No 13
Linearidad de la muestra

DATOS

MG. ADICIONADOS	MG. ENCONTRADOS
0.000	0.076
0.000	7.994
10.000	10.046
12.000	11.981
14.000	13.977

PENDIENTE = 1.003
INTERCEPTO = -.0037
FACTOR DE CORRELACION = .99981

Nivel	Cantidad adicionada	Cantidad recuperada	% recuperado
80%	8.00 mg	7.96 mg	99.50
90%	9.00 mg	8.99 mg	99.88
100%	10.00 mg	10.05 mg	100.50
105%	10.50 mg	10.55 mg	100.47
110%	11.00 mg	11.04 mg	100.36
115%	11.50 mg	11.54 mg	100.34
120%	12.00 mg	12.08 mg	100.66
125%	12.50 mg	12.50 mg	100.00
130%	13.00 mg	13.04 mg	100.30

T A B L A N° 16
Resultados de la linearidad del estándar

GRAFICA DE LA LINEARIDAD DEL ESTANDAR (2a VEZ)

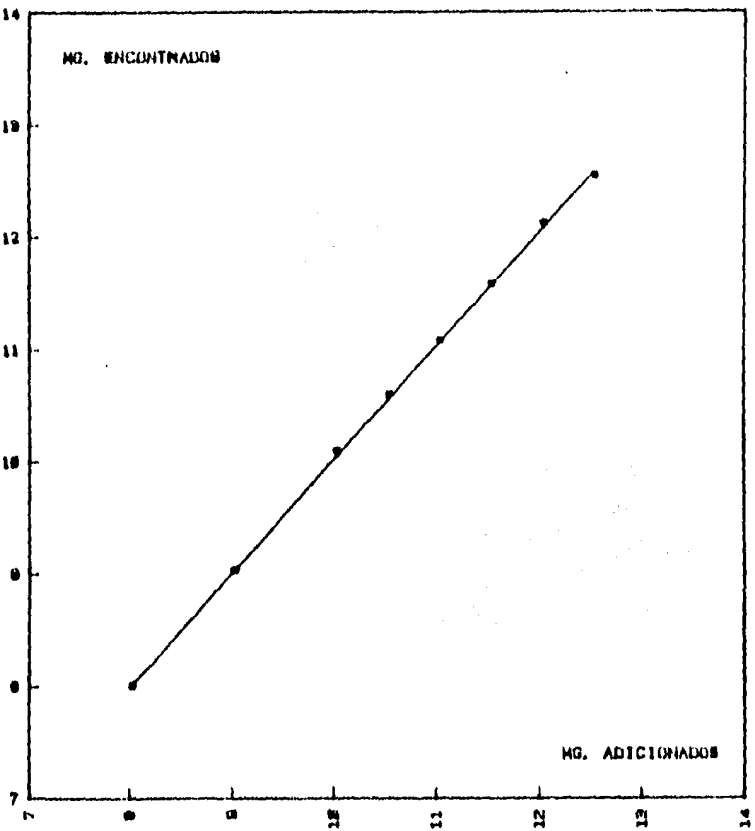


FIGURA Nº 39
Linearidad del estándar

DATOS

MG. ADICIONADOS	MG. ENCONTRADOS
8.000	7.981
9.000	8.992
10.000	10.008
10.500	10.559
11.000	11.030
11.500	11.544
12.000	12.002
12.500	12.501

PENDIENTE = 1.015
INTERCEPTO = -.13937
FACTOR DE CORRELACION = .99978

d) Precisión.

1. Precision del método (reproducibilidad).

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla Nº 17 y el gráfico correspondiente se presenta en la figura Nº 40

1º Analista			
Muestra	Recuperación - 1º día promedio	Muestra	Recuperación - 2º día promedio
1	10.04 mg	1	10.05 mg
2	10.05 mg	2	10.26 mg
3	9.87 mg	3	10.22 mg
4	9.96 mg	4	10.00 mg
5	10.05 mg	5	10.01 mg
6	9.92 mg	6	9.90 mg
$\bar{X}$	9.98 mg	$\bar{X}$	10.07 mg
SD	0.0764	SD	0.140
CV (Límite =1.5%)	0.765%	CV (Límite =1.5%)	1.383%
2º Analista			
1	10.16 mg	1	10.18 mg
2	10.05 mg	2	10.02 mg
3	9.89 mg	3	10.14 mg
4	9.93 mg	4	9.91 mg
5	10.06 mg	5	9.95 mg
6	10.03 mg	6	9.93 mg
$\bar{X}$	10.02 mg	$\bar{X}$	10.02 mg
SD	0.0965	SD	0.1135
CV	0.963%	CV	1.133%

T A B L A Nº 17
Precisión del método. Reproducibilidad

La reproducibilidad del método se evaluó por medio del coeficiente de variación (CV), obtenido de la tabla Nº 17

	1º día	2º día
1º Analista	0.7652%	1.3837%
2º Analista	0.9627%	1.1326%

Límite = 2.0%

2. Precisión del Sistema (Repetibilidad)

Nº de inyección	Cantidad adicionada.	Cantidad recuperada.
1	10 mg	10.070 mg
2	10 mg	10.085 mg
3	10 mg	10.006 mg
4	10 mg	10.020 mg
5	10 mg	10.031 mg
6	10 mg	10.108 mg
		$\bar{X}$ = 10.053 mg
		SD = 0.0403
		CV = 0.4008%

Límite de CV= 1.5%

T A B L A Nº 18

IMSS PRESICION DEL METODO (REPRODUCIBILIDAD) HOJA 1 CLAVE 503

OFNA. F.Q. GENERICO Y PRESENTACION DINITRATO DE ISOSORBIDE TAB. METODO C.G.

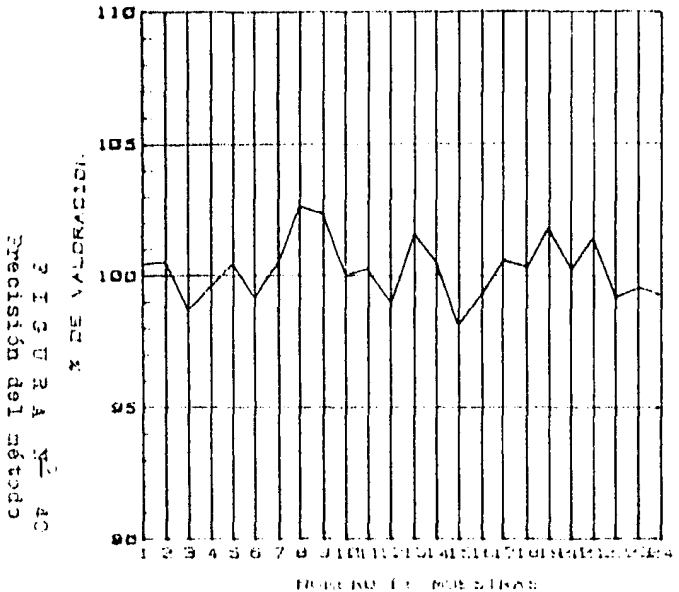


FIGURA N° 40
Precisión del método

PROVEEDOR CRYOPHARMA LOTE T 414

No. DE MTRA.	% VALORA.	FECHA	EQUIPO	LOTA.	ANALISTA
1	100.447	71384	6	2	2
2	100.402	71384	6	2	2
3	99.728	71384	6	2	2
4	99.649	71384	6	2	2
5	100.457	71384	6	2	2
6	99.164	71384	6	2	2
7	100.544	71684	6	2	2
8	102.613	71684	6	2	2
9	102.271	71684	6	2	2
10	100.021	71684	6	2	2
11	100.100	71684	6	2	2
12	99.109	71684	6	2	2
13	101.645	71784	6	2	3
14	100.494	71784	6	2	3
15	99.166	71784	6	2	3
16	99.308	71784	6	2	3
17	100.589	71784	6	2	3
18	100.526	71784	6	2	3
19	101.705	71684	6	2	3
20	100.204	71684	6	2	3
21	101.427	71684	6	2	3
22	99.148	71684	6	2	3
23	99.509	71684	6	2	3
24	99.281	71684	6	2	3

NUMERO DE MUESTRAS	24
SUMA TOTAL	2405.457
MEDIA ARITMETICA	100.227
ERROR ESTANDAR	.2[illegible]9
DESVIACION ESTANDAR RELATIVA	1.12[illegible]
% DE LIMITE DE CONFIANZA	95
LIMITE SUPERIOR	102.[illegible]57
LIMITE INFERIOR	97.097

SUPERVISION DE : Q.F.B. NORMA GONZALEZ H. FECHA [illegible]

e) Exactitud

Los resultados se presentan en la tabla Nº 19

Ensayo		80%	100%	120%
1º	1º ensayo	7.813	10.043	12.008
	2º ensayo	7.769	10.045	11.932
	Promedio	7.791	10.044	11.970
2º	1º ensayo	7.991	10.048	11.986
	2º ensayo	8.002	10.050	11.918
	Promedio	7.996	10.049	11.952
3º	1º ensayo	7.933	9.768	11.947
	2º ensayo	7.926	9.977	12.097
	Promedio	7.926	9.872	12.022
4º	1º ensayo	8.134	9.961	12.023
	2º ensayo	8.118	9.966	11.953
	Promedio	8.126	9.964	12.023
5º	1º ensayo	7.978	9.957	12.002
	2º ensayo	7.998	10.125	12.114
	Promedio	7.988	10.046	12.058
6º	1º ensayo	7.969	9.895	11.971
	2º ensayo	8.104	9.937	12.109
	Promedio	7.978	9.916	12.011
	$\bar{X}$	7.978	9.982	12.011
	SD	0.1125	0.0766	0.0412
Promedio de recuperación		99.723%	99.823%	100.092%

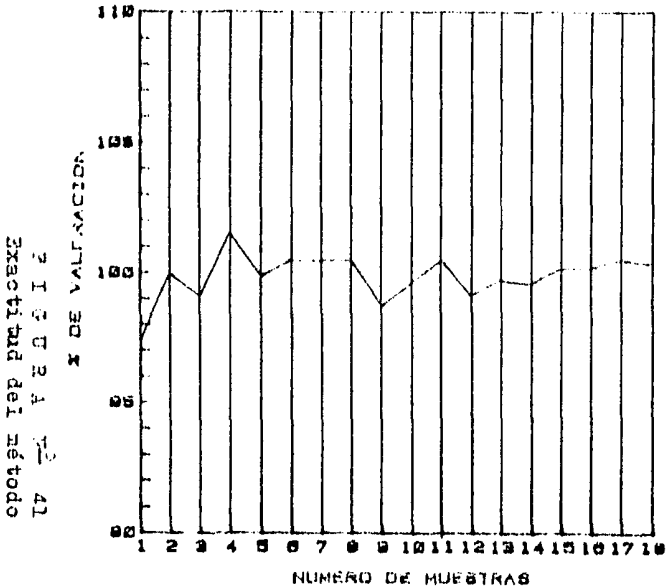
Límite = 98% - 102% (Ver gráfico de la figura Nº 41)

T A B L A Nº 19

Resultados de la Exactitud del método

IMSS EXACTITUD DEL METODO HOJA 1 CLAVE 599

OFNA. F.S. GENERICO Y PRESENTACION DINITRATO DE ISOSORBIDE TABS. METODO CG



Exactitud del método

PROVEEDOR CRYOPHARMA LOTE T 414

NO. DE MTRA.	% VALORA.	X	EQUIPO	LOTA.	ANALISTA
1	97.807	00	5	2	1
2	99.950	00	5	2	1
3	99.121	00	5	2	1
4	101.501	00	5	2	1
5	99.859	00	5	2	1
6	100.468	00	5	2	1
7	100.447	100	5	2	1
8	100.492	100	5	2	1
9	98.720	100	5	2	1
10	99.042	100	5	2	1
11	100.407	100	5	2	1
12	99.104	100	5	2	1
13	99.752	120	5	2	1
14	99.081	120	5	2	1
15	100.105	120	5	2	1
16	100.103	120	5	2	1
17	100.400	120	5	2	1
18	100.316	120	5	2	1

NUMERO DE MUESTRAS	18
SUMA TOTAL	1797.65
MEDIA ARITMETICA	99.80
ERROR ESTANDAR	.212
DESVIACION ESTANDAR RELATIVA	.002
% DE LIMITE DE CONFIANZA	95
LIMITE SUPERIOR	101.788
LIMITE INFERIOR	97.877

SUPERVISION DE : Q.F.B. NORMA GONZALEZ M. FECHA 72884

f) Consideraciones.

Las condiciones de operación que se consideran críticas para la metodología desarrollada son las siguientes:

1. Cantidad de fase líquida y longitud de la columna.
2. Estabilización de la columna.
3. Flujo de fase móvil.
4. Flujo de aire e hidrógeno en el detector.
5. Temperaturas de operación del inyector, columna y detector.
6. Características ó ajuste de los controles de impresión, registro e integración de la señal del detector.

1. Cantidad de fase líquida y longitud de la columna.

En un momento dado (no se comprobó experimentalmente) una disminución de la cantidad de fase estacionaria, puede causar una retención muy corta y deficiente de los solutos ó bien una elución no separativa; en caso contrario, el aumento de fase puede causar una retención muy alta de los solutos, la elución sería separativa pero puede ocacionar coleos pronunciados y encimamientos con la concecuente deficiencia en la integración de áreas.

Por otro lado, el empleo de columnas cortas genera encimamiento y poca eficiencia separativa y sería necesario modificar todas las otras condiciones de operación; si ésta longitud se aumenta, la eficiencia aumenta pero también el tiempo de análisis, habría que modificar el flujo y otros controles requiriéndose otra validación.

2. Estabilización de la columna.

Antes de iniciar el análisis con la columna, es necesario estabilizarla perfectamente con el fin de evitar señales de ruido, coleos y fluctuaciones drásticas en las señales amplificadas por el registrador que ocacionan registros deficientes y una línea base inestable. Esta estabilización elimina las impurezas volátiles que pudiera contener la fase líquida, así mismo las trazas de disolvente de impregnación que quedaran remanentes.[24]

3. Flujo de fase móvil.

Si se disminuye el flujo de N_2 se producirán eluciones muy lentas, coleos y análisis muy deficientes. Si ésta disminución es muy leve (2 a 4 ml/min.), respecto al flujo marcado, no habrá variación significativa en las eluciones, solo los tiempos de retención se modificarán un poco.

Si el flujo se aumenta considerablemente los picos se encimarán ó no habrá separación de los solutos; si se aumenta sólo un poco (2 a 4 ml/min.) no habrá mucha variación en las eluciones, sólo los tiempos de retención se modificarán un poco.

4. Flujo de aire e hidrógeno en el detector.

Es muy importante que los flujos de éstos gases se mantengan constantes, la relación de éstos debe ser la indicada dependiendo del flujo de gas portador (según el manual de operación); ya que si no se mantiene ésta relación la intensidad de la flama variará y ésto provocará alteraciones en las áreas resultantes por combustión deficiente, es decir, traerá como concecuencia falta de precisión en el ensayo.

Si se aumenta ó disminuye ligeramente la relación de - flujos no existirá mucha variación en la combustión de la - muestra eluída, pero si éste aumento ó disminución es apre - ciable, sí afectará la combustión debido a alteraciones en - la flama y por tanto alteraciones de los resultados.

5. Temperaturas de operación.

a) Inyector. La temperatura de operación fijada para el inyector no debe disminuírse ya que la muestra inyectada no se evaporará lo suficiente y/ó se condensará en la cámara.

Si por el contrario se aumenta sólo un poco, no habrá - problema significativo; si se aumenta mucho, la muestra volatilizada puede escapar al sacar la jeringa de inyección.

b) Columna u horno. El aumento ó disminución poco marcada de la temperatura, no modificará significativamente el análisis; si el incremento es grande (más de 10°C), los picos - tienden a encimarse y la eficiencia disminuye; si se disminuye mucho, los picos se retienen demasiado y tienden a colear aunque la eficiencia no varía mucho.

c) Detector. El decremento en la temperatura del detector es muy perjudicial para obtener buenos resultados; aparecen señales de ruido, la muestra no llega a quemarse totalmente, el tubo de escape se ensucia rápidamente y la eficiencia cae demasiado.

Si se aumenta la temperatura, los problemas anteriores tiendena desaparecer y la señal mejora. El límite a éste aumento sería la capacidad de trabajo que ofrece el instrumento, no tiene sentido práctico aumentar 50 ó 100°C más la temperatura, ya que se pueden dañar los dispositivos eléctricos

ó electrónicos por uso prolongado de ésta temperatura.

6. Características ó ajustes de los controles de impresión, registro e integración de la señal. Si éstos ajustes se cambian, la eficiencia en realidad no se modifica, pero simplemente los registros impresos no serían reproducibles de un análisis a otro, perdiéndose información cualitativa.

4.3 Comparación estadística.

Método por Cromatografía de gases	
Cantidad adicionada	Cantidad recuperada
10.0 mg	9.55 mg
10.0 mg	9.50 mg
10.0 mg	9.45 mg
10.0 mg	9.31 mg
10.0 mg	9.38 mg
10.0 mg	9.49 mg
10.0 mg	9.22 mg
10.0 mg	9.28 mg
10.0 mg	9.30 mg
10.0 mg	9.26 mg
$\bar{X}$ = 9.372 mg	
s = 0.1172	
s^2 = 0.0137	
CV = 1.25%	

Método por Espectrofotometría	
Cantidad dicionada	Cantidad recuperada
10.0 mg	8.88 mg
10.0 mg	9.12 mg
10.0 mg	9.29 mg
10.0 mg	9.55 mg
10.0 mg	9.65 mg
10.0 mg	9.59 mg
10.0 mg	9.30 mg
10.0 mg	9.26 mg
10.0 mg	9.13 mg
10.0 mg	9.68 mg
$\bar{X}$ = 9.445 mg	
s = 0.3891	
s^2 = 0.1513	
CV = 4.12%	

Hipótesis:

H_0 = El método cromatográfico presenta igual precisión que el método colorimétrico.

H_1 = El método cromatográfico es más preciso que el método colorimétrico.

- Cálculo de la razón F :

$$F_{crítica} = 3.18 \text{ (de tablas}^{2}\text{)}$$

$$F_{experimental} = \frac{0.1513}{0.0137} = 11.043$$

$F_{crítica} < F_{experimental}$ y por lo tanto se rechaza H_o, se acepta H_1, es decir, el método cromatográfico es más preciso que el colorimétrico.

V.- DISCUSION Y CONCLUSIONES

5.1 DISCUSION DEL METODO DESARROLLADO

Solamente se discute la metodología desarrollada debido a que es el objetivo principal de éste trabajo.

La técnica se desarrolló en forma práctica debido a que algunos investigadores así lo recomiendan [5,13,14 y 24], ante el díficil acceso a procedimientos de cálculo apropiados, aunque sí se aplicó la teoría básica de C.G. para el cálculo de número de platos teóricos, resolución y gráficos derivados de ellos.

La selección de la fase estacionaria se basó en reportes publicados[10], en la polaridad que presenta frente al DNI que es no polar, en la temperatura de trabajo, disponibilidad y en que no presenta retención drástica de moléculas del tipo del DNI.

Adicionalmente, Davidson et. al.[6] obtuvo, buenos resultados con una fase estacionaria muy semejante a la empleada aquí (dimetilpolisiloxano); igualmente, Chin[4] y Malbica[13] reportan el uso de fases semejantes (SE-30).

El tipo de columna y sus dimensiones se eligieron principalmente en base a lo inerte del material, ventajas prácticas y disponibilidad comercial, aunado a reportes que confirman lo anterior[24], y al costo.

Por otra parte, el detector de ionización de flama, se eligió debido a su alta sensibilidad a los compuestos orgáni

cos, por su uso en los trabajos de las referencias consultadas[4,6,11,13 y 19] y por disponibilidad en el Laboratorio.

El gas portador seleccionado (N_2), es el más indicado por la bibliografía, en el manual de operación y por lo inerte que es; el disolvente se eligió también en base a los mismos reportes y a la solubilidad del DNI y del estándar interno en el mismo.

El nitrógeno presenta una densidad adecuada para el flujo dentro de la columna empacada; un gas más ligero podría afectar la cantidad de soluto eluído por unidad de tiempo, y modificar en mucho la velocidad del análisis y por lo tanto la eficiencia[14].

No se escogió a la acetona como disolvente ya que, aunque el DNI es más soluble en ésta, se presenta el problema de que también es muy volátil y presenta problemas para conservar un valor de concentración conocido estable.

En cuanto a los parámetros de operación seleccionados, no hay duda de que la elección de éstos de manera experimental fué lo más accesible debido a que los reportes consultados[13,14 y 24] presentan el mismo procedimiento de búsqueda; ésto es, se basa la determinación en datos bibliográficos de los compuestos de interés y de allí se parte con ciertos límites, hacia experimentos de ensayo-error, que la misma bibliografía recomienda.

De lo anterior se obtuvo la temperatura del inyector y detector adecuadas a la temperatura de separación en la columna, y un flujo adecuado para buenos cromatogramas y acorde a las temperaturas empleadas.

La temperatura de trabajo del horno fué obtenida del

gráfico respectivo (Fig. Nº 17) al mayor número de platos teóricos que proporciona también buenos registros; como se puede ver en la gráfica mencionada, el punto dentro de la línea resultante que corresponde a la menor AEPT, está a 120°C y aparentemente es el más indicado para el análisis, sin embargo se descartó debido a que no generó un buen trazo gráfico, el pico resultante no fué grande y la línea base tendió a ser inestable (presentó ondulaciones), además de que, según la tendencia de los registros a las demás temperaturas, indicaron que se podía obtener mayor respuesta a una temperatura mayor. Así, se eligió entonces 130°C como la mejor temperatura, ya que sí se obtenían todas las condiciones requeridas para un buen registro; no fué necesario, ni tenía caso trabajar a mayor temperatura ya que las temperaturas bajas - (dentro de lo posible) proporcionan mejores separaciones; de allí se derivó la temperatura del inyector, que por experiencia debe de ser mayor, aproximadamente 20°C, para asegurar que la muestra penetre en forma de vapor a la columna. Por su parte, el detector debe estar aún más caliente que la columna para facilitar la combustión completa de los solutos por ello se fijó en 200°C.

Los demás parámetros de operación dependen del cromatógrafo, se determinaron según el manual y de manera que se obtuvieran cálculos cuantitativos. Esto es, los mandos del - cromatógrafo se manipularon de manera que el registro impreso fuera óptimo para su interpretación analítica posterior.

En la selección del flujo no se presentó ningún problema de interpretación de registros; el gráfico resultante proporcionó fácilmente el flujo de N_2 más adecuado.

En cuanto a la técnica en sí se empleó el 3-DNB como estándar interno debido a que cumplió con todas las condiciones requeridas. Los otros compuestos ensayados presentaron desventajas frente al 3-DNB y por lo expuesto con anterioridad, el método de cálculo seleccionado fué por estándar interno debido a las siguientes ventajas: no es necesario medir exactamente las cantidades inyectadas, ni conocer la respuesta del detector ni que ésta permanezca constante ya que ningún cambio en la respuesta alterará la relación de áreas DNI/3-DNB, ésto compensa el error debido a la volatilidad del solvente[14].

Estadísticamente se comprobó la mayor eficiencia y reproducibilidad del método desarrollado respecto al reportado en la USP XIX[25] e incluso el de Prue et. al., para el análisis de tabletas por C.G., a la vez se comprobó la validéz de la metodología desarrollada.

Respecto al método reportado por Prue[19], se puede decir que el desarrollado aquí es superior; como se reporta, la columna empleada por estos investigadores es corta y con un flujo de gas portador de 70 ml/min., que es alto, es lógico pensar que se generan pocos platos teóricos respecto a otra columna de 6 pies de largo.

Adicionalmente, el tributirato de glicerilo, de pureza adecuada para utilizarse como estándar interno, no fué accesible; el tiempo de preparación de la muestra es presumiblemente mayor, por lo que definitivamente ésta metodología no fué adaptable al laboratorio; las condiciones de trabajo se detallaron en la Introducción de éste trabajo y de allí se observa que al desarrollar ésta técnica, se crea un sistema de dos fases líquidas en contacto: fase acuosa y fase orgánica. Se-

gún las propiedades fisicoquímicas del DNI (tabla Nº 1), éste presenta una pequeña solubilidad en agua, 0.5 mg/ml, suficiente para producir error en el análisis ya que una fracción del DNI presente, puede perderse en el agua (fase inferior) por solubilidad o bien al quedar atrapado entre las partículas insolubles de los excipientes en agua. Para poder evaluar los efectos anteriores, sería necesario contar con una constante de reparto adecuada para las fases en cuestión.

El problema anterior no se presenta con la metodología desarrollada aquí, debido a la presencia de una sola fase orgánica, en la cual el DNI es libremente soluble y los excipientes son completamente insolubles.

Finalmente, en la metodología desarrollada, se obtiene un coeficiente de variación promedio de 1.25%, y en la reportada por Prue es de 1.32%. Aunque definitivamente, ambos métodos dependerán en su eficiencia, de la uniformidad de contenido de las muestras, errores de pesada, de pipetear y otros asociados al analista y equipo.

5.2 C O N C L U S I O N E S

La metodología desarrollada resultó ser mejor que el método espectrofotométrico reportado, es decir, es más específico, más sensible y menos riesgoso además de que presenta menos variabilidad estadística. La validación indica que el método es confiable y reproducible por ello es adecuado para el análisis de rutina de DNI en tabletas.

La preparación de las muestras para el análisis es bastante sencilla y el equipo, aunque costoso, es simple y no tan sofisticado como en las referencias consultadas; adicionalmente, los reactivos involucrados son bastante accesibles.

Con un poco de práctica y considerando las recomendaciones que se hacen, puede obtenerse un resultado analítico de gran presición.

B I B L I O G R A F I A

1.- Avres Gilbert. Análisis Químico Cuantitativo. Editorial Harper & Row Latinoamericana, México 1968. Páginas 459 - 467.

2.- Bayer E.L. Manual de estadística para Químicos (versión española de J. López Ruíz). Ed. Alhambra, 1ª edición, Madrid, España 1974. Páginas 13 - 104.

3.- British Pharmacopoeia 1980, Vol.II . Departament of Healt and Social Security. London Her Majesty's Stationary Office, University Press Cambridge, 1980. - Páginas 300 - 301.

4.- Chin A. David, Michelucci J. Journal of Pharmaceutical Sciences 66, (1977), 1143-1145. Cuantitative Determination of Isosorbide Dinitrate and two metabolites in plasma.

5.- Dabrio Bañuls M.V. Cromatografía de Gases. Ed. Alhambra, 1ª edición 1973. Tomo II. Página 20, 26, 29 - 36.

6.- Davidson L.W.F., Dicarlo F. J., Szabo E. T. Journal of Chromatography 57 (1971), 345 - 352. Gas Chromatographyc detection of pentaerytritol nitrates and other organic nitrate esters.

7.- Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos Dirección General de Control de Alimentos, Bebidas y Medicamentos, Oficina de Coordinación de edicio -

nes de la SSA, 4ª edición, México 1974. Páginas - 91 - 93.

8.- Florey Klauss. Analytical Profiles of Drug Sustances, Vol. 4. Academic Press Inc. New York 1975. Páginas 216 - 244.

9.- Goodman Gilman Alfred, Goodman Louis S., Gilman Alfred. Las bases farmacológicas de la terapéutica. - Ed. Panamericana, 6ª edición, México 1980. Páginas 309 - 320.

10.- Handbook of Chromatography. Gunter Zweig and Joseph Sherma Editors. Chemical Rubber Co. publisher, Ohio USA 1972. Páginas 257 - 274.

11.- Kiyushi Tsuji. GLC and HPLC determination of Therapeutic Agents. Part 2, vol. 9, Marcel Decker Inc., New York, 1978. Página 715 - 723.

12.- Litter Manuel. Farmacología. Editorial El Ateneo, - 6ª edición. Buenos Aires 1980.

13.- Malbica J. O., Monson K. Journal of Pharmaceutical Sciences 66, 3 (1977), 384 - 386. Electron-capture GLC Determination of nanogram to picogram amounts - of Isosorbide Dinitrate (in plasma).

14.- McNair H. M., Bonelli E. J. Cromatografía de Gases Monografía Nº 23, O.E.A., 1981.

15.- McNair H. M., Bonelli E. J. Basic Gas Chromatography. Varian Aerograph USA, 1969.

16.- O. R. Sammul, W.L. Bannon and A. L. Hayden. Journal of Association of Agricultural Chemists, 47 (5), (1964), 918.

17.- The Merck Index. The Merck and Co. Inc. publisher, Rahway N.J. USA 1976. Páginas 686, 701, 745, 922 y 1136.

18.- Pharmaceutical Forum. The United States pharmacopeial Convention Inc. Penn. USA. May - June, 1983. - Página 3034.

19.- Prue B. David, Johnson W. R., Kho T. Bren. Journal of the A.O.A.C. 60, Nº 6 (1977),1341 - 1344. Gas - Liquid determination of isosorbide dinitrate in tablets.

20.- Rossel M. T., Bogaert N. G. Journal of Chromatography 64, (1972), 364 - 367. Gas chromatographic of - nitrate esters of glycerol, isosorbide and isomannide.

21.- Rossel M. T., Bogaert N. G. Journal of Pharmaceutical Sciences 62 (1973), 754. GLC Determination of - Nitroglycerin and Isosorbide dinitrate in plasma.

22.- Rossel M. T., Bogaert N. G. Journal of Pharmaceutical Sciences 68, 5 (1979), 659 - 660. Determination of isosorbide dinatrate and its mononitrates in human plasma by capillary column GLC.

23.- The United States Dispensatory. J.B. Lippincott Co 27º Edition Pha. USA. 1973 pág 646

24.- Tranchant Jean Manuel. Prácticas de Cromatografía - de gases. Ed. Toray. Masson Et. Cie, Editours. Paris. 1972. (Versión Española de Delatorre Boronat Ma del Carmen, Marine Font Abel y Moreno Martín - Francisco).

25.- United States Pharmacopea XIX. The United States -

Pharmacopeial Convention. Penn. USA. 1975, Pág.275

26.- United States Pharmacopea XX. The United States - Pharmacopeial. Convention Inc. Penn. USA. 1980, - pág. 276, 434, 596, 955, 958.

27.- West M. Donald,Skoog A. Douglas. Análisis Instrumental, Ed. Interamericana, 1º Edición Española 1975 - pág. 27-67.