

27.33

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
Z A R A G O Z A

DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO POR CLAR PARA
LA CUANTIFICACION DE ACIDO DIATRIZOICO EN
PREPARACIONES FARMACEUTICAS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
FRANCISCO SANCHEZ GALLEGOS



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

C O N T E N I D O .

1. Introducción .

2. Monografía .
 - 2.1. Nombre genérico .
 - 2.2. Nombre químico .
 - 2.3. Fórmula estructural .
 - 2.4. Fórmula condensada .
 - 2.5. Propiedades fisicoquímicas .
 - 2.5.1. Peso molecular .
 - 2.5.2. Descripción .
 - 2.5.3. Empaque y almacenaje .
 - 2.5.4. Identificación .
 - 2.5.5. Humedad .
 - 2.5.6. Residuo de ignición .
 - 2.5.7. Amina aromática libre .
 - 2.5.8. Iodo y ioduro .
 - 2.5.9. Metales pesados .
 - 2.5.10. Ensayo .
 - 2.6. Propiedades farmacológicas .
 - 2.6.1. Metabolismo .

2.6.2. Toxicidad .

3. Antecedentes de la Cromatografía .

3.1. Definición general de cromatografía .

3.2. Clasificación general de cromatografía .

4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución .

4.1. Ventajas de CLAR .

4.2. Proceso cromatográfico .

4.2.1. Migración diferencial .

4.2.2. Distribución molecular .

4.3. Definiciones básicas en CLAR .

4.3.1. Factor de capacidad (K') .

4.3.2. Factor de selectividad (α) .

4.3.3. Número de platos teóricos (N) .

4.3.4. Resolución (R_s) .

4.3.5. Medidas requeridas para el cálculo de los parámetros básicos .

4.4. Mecanismos de separación de diferentes formas de CLAR .

4.4.1. Cromatografía líquido - líquido .

4.4.2. Cromatografía de gel ó exclusión .

4.4.3. Cromatografía de intercambio iónico .

4.4.4. Cromatografía líquido - sólido .

4.5. Instrumentación .

- 4.5.1. Componentes de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución .

5. Análisis Cuantitativo .

5.1. Fuentes de error .

- 5.1.1. Picos asimétricos .
- 5.1.2. Detección .
- 5.1.3. Medida de los picos .

5.2. Cuantificación .

- 5.2.1. Estándar externo .
- 5.2.2. Estándar interno .

6. Validación Estadística .

6.1. Generalidades .

6.2. Definición de validación .

6.3. Tipos de errores .

- 6.3.1. Errores sistemáticos .
- 6.3.2. Errores aleatorios .

6.4. Conceptos básicos (Validación) .

- 6.4.1. Exactitud .
- 6.4.2. Linealidad .
- 6.4.3. Precisión .
- 6.4.4. Sensibilidad .

6.4.5. Especificidad .

6.5. Criterios aplicados a los ensayos de validación de métodos analíticos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución .

7. Parte Experimental .

7.1. Equipo .

7.2. Material .

7.3. Reactivos .

7.4. Método .

7.4.1. Preparación de solución de referencia .

7.4.2. Preparación de la solución problema .

7.4.3. Determinación de Acido Diatrizoico por CLAR .

7.4.4. Forma de cálculo .

7.5. Validación estadística .

7.5.1. Especificidad .

7.5.2.. Exactitud y Repetibilidad .

7.5.3. Linealidad .

7.5.4. Reproducibilidad .

8. Resultados .

8.1. Especificidad .

8.2. Evaluación estadística .

8.2.1. Exactitud .

8.2.2. Repetibilidad .

8.2.3. Linealidad .

8.2.3.1. Inferencias acerca de a
(ordenada al origen) .

8.2.3.2. Inferencias acerca de b
(pendiente) .

8.2.4. Reproducibilidad .

9. Conclusiones .

10. Bibliografía .

11. Apéndices de fórmulas aplicadas a la evaluación
estadística .

11.1. Apéndice I (Exactitud) .

11.2. Apéndice II (Repetibilidad) .

11.3. Apéndice III (Linealidad) .

11.4. Apéndice IV (Reproducibilidad) .

1. INTRODUCCION.

El interés en los agentes de radiocontraste para la producción de radiopacidad en tejidos suaves comienza después del anuncio del descubrimiento de los rayos X en 1895. El desarrollo de agentes para producir radiocontraste en organos específicos se inicia durante la década de 1920 con la introducción de la tetraiodofenolftaleína para la visualización de la vesícula biliar.

En un agente de contraste, es el todo el que provee la opacidad a los rayos X; por lo que, la estructura de estos compuestos debe - proveer estabilidad a los átomos de Iodo, no toxicidad, solubilidad - en agua y concentración en los organos deseados. La estabilidad de los átomos de Iodo en la molécula es llevada a cabo en la mayoría de los compuestos uniéndolos a un nucleo aromático, y la solubilidad en agua es obtenida por la incorporación de una función ácida tal como ($-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$), de la cual sales solubles pueden ser preparadas. Así, los agentes de contraste para los rayos X exhiben una absorción de radiación ultravioleta relativamente fuerte; como se - puede observar, esta última propiedad permite la detección de estos componentes a bajos niveles por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR). (1)

Las mezclas de diatrizoatos, disponibles como sales de sodio-

y meglumina, son los medios de contraste, mejor tolerados y menos tóxicos. Sin embargo, del mismo modo que otros medios de contraste, inyecciones de los diatrizoatos han causado muertes. (2)

Por esto, es importante el desarrollo de métodos analíticos que ya exactitud, precisión y especificidad nos permitan llevar a cabo una valoración cuantitativa adecuada de el ó los activos, aún en presencia de posibles interferencias debidas a otras sustancias contenidas en el mismo medicamento y al mismo tiempo nos indique el grado de degradación alcanzada durante el periodo de almacenaje, ya que alguno de los productos de degradación puede ser tóxico.

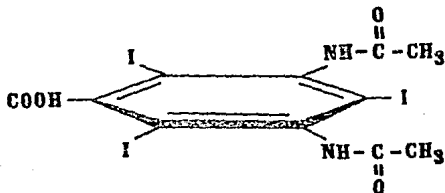
La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) - es sin duda alguna, el recurso analítico más valioso con el que la industria Químico - Farmacéutica cuenta hoy en día para la identificación, separación y cuantificación de sustancias. Sin embargo, no ha sido utilizada en la cuantificación de agentes de radiocontraste (Acido Diatrizoico); por lo que, el objetivo de este trabajo fué desarrollar y validar por medio de análisis estadístico un método analítico por CLAR para la separación y cuantificación de Acido Diatrizoico en preparaciones farmacéuticas.

2. MONOGRAFIA.

2.1 Nombre Générico: Acido Diatrizoico.

2.2 Nombre Químico: Acido 3,5-bis-(acetilamino)-2,4,6,-triodo benzoico ; Acido 3,5,-diacetamido-2,4,6-triodo benzoico.

2.3 Fórmula Estructural:



2.4 Fórmula Condensada: $C_{11}H_9I_3N_2O_4$

2.5. Propiedades Fisicoquímicas.

2.5.1. Peso Molecular: (anhidro) 613.92
(dihidratado) 649.95

2.5.2. Descripción: El ácido diatrizoico es anhídrido

ó contiene 2 moléculas de agua de hidratación; es un polvo blanco - cristalino, inodoro e insaboro (3).

2.5.3. Empaque y Almacenaje : Conservar en envases bien cerrados.

2.5.4. Identificación :
A) Responde a la prueba cromatográfica; según USP XXI (4).
B) Calentar 500 mg. en un crisol adecuado; se desarrollan vapores violetas (4).

2.5.5. Humedad : No más del 1 % forma anhidra y entre 4.5 y 7.0 % forma hidratada. Método I. (4)

2.5.6. Residuo de Ignición : No más de 0.1 % . (4)

2.5.7. Amina Aromática Libre : No debe ser mayor de 0.05 % .
Determinada mediante la formación de color con hidróxido de N-(1-naftil)-etilendiamina; leyendo las absorbancias tanto de la muestra como del estándar en un espectrofotómetro adecuado a 465 nm. (4)

2.5.8. Iodo y Ioduro : No debe ser mayor de 0.02 %. (4)

2.5.9. Metales Pesados : No más de 0.002 % . (4)

2.5.10. Ensayo : El ácido diatrizoico contiene no menos del 98.0 % y no más del 102 % de $C_{11}H_9I_3N_2O_4$, calculado sobre la base anhidra. Determinado por titulación con $AgNO_3$ 0.05 N. (4)

2.6. Propiedades Farmacológicas .

2.6.1. Metabolismo : El ácido diatrizoico es excretado rápidamente, inalterado, a través de los riñones por filtración glomerular. Existen reportes de que el 50 % de diatrizoato se une a proteínas, pero esta unión es fácilmente reversible. (5 , 6) . No existen reportes su-
giriendo metabolitos de ácido diatri-
zoico en otros órganos humanos, excepto en los riñones. (7)

2.6.2. Toxicidad :

El ácido diatrizoico es usado en - dosis bastante abajo del I.V. LD₅₀ presumido en el hombre, el cual se asume a ser similar a aquel de otros mamíferos : 10 a 20 g/kg de peso corporal. (8)

Después de la administración del ácido diatrizoico pueden existir reacciones menores tales como urticaria, acoloramiento, vómito, prurito, náusea, mareos y algunas veces reacciones mayores tales como convulsiones, shock y muerte. Estas reacciones mayores son a menudo impredecibles. (9)

3. ANTECEDENTES DE LA CROMATOGRAFIA.

La práctica de la cromatografía ha presenciado durante los últimos 40 años un crecimiento continuo en casi todos los aspectos: el número de cromatógrafos, la cantidad de trabajos publicados, la variedad y complejidad de las muestras que están siendo separadas, la velocidad de separación, etc. Sin embargo, este crecimiento no ha sido continuo de año en año.

La historia de la cromatografía está llena de periodos de crecimiento repentinos que han seguido a alguna innovación mayor como por ejemplo: la cromatografía de partición y papel en la década de 1940, la cromatografía de gases y en capa fina en la década de 1950, y los diferentes métodos de gel o exclusión de tamaño en la década de 1960. Unos cuantos años después se realizó otro de estos avances mayores que revolucionaría la práctica de la cromatografía: una técnica que fue llamada, Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR). (10)

3.1. DEFINICION GENERAL DE CROMATOGRAFIA.

El término cromatografía se refiere a una variedad de técnicas altamente eficientes para la separación de una gran cantidad de sustancias desde iones inorgánicos hasta biopolímeros complejos.

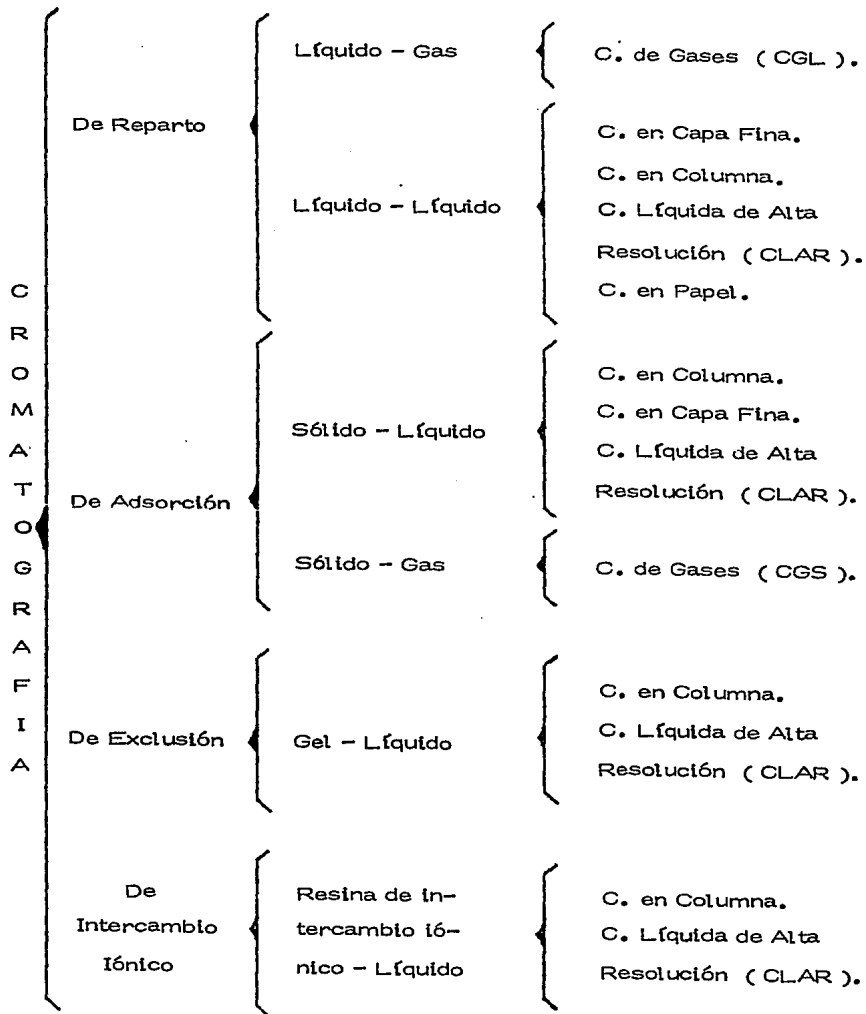
" La cromatografía es un proceso de separación basado en la distribución diferencial o solubilidad de los componentes individuales de una mezcla entre dos fases, una de las cuales es percolada a través de la otra ".

Esta distribución debe ser reversible y las sustancias en la mezcla deben ser de dimensiones moleculares, este último requisito es cumplido colocando la muestra en solución o vaporizándola. (9)

Las diferentes velocidades de elución de cada compuesto dependen de la distribución relativa de dicho soluto entre las dos fases; esta distribución es debida a diferencias en adsorción, partición, presión de vapor, tamaño molecular ó carga iónica entre el soluto y las dos fases.

Una de estas fases es denominada la fase estacionaria y la otra la fase móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido poroso, un sólido finamente dividido, ó un líquido que ha sido enlazado a algún material de soporte inerte. La fase móvil puede ser una solución, gas ó líquido. (11)

3.2 CLASIFICACION GENERAL DE CROMATOGRAFIA.



4. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION.

4.1. VENTAJAS DE CLAR.

El desarrollo de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), hace posible los análisis de compuestos no volátiles, iónicos y termolábiles que anteriormente era casi imposible separar.

La CLAR es un método que ofrece grandes ventajas tales como alta sensibilidad, exactitud, rapidez y gran poder de resolución, el tiempo de retención es reproducible, el tiempo de separación muy corto y la instrumentación necesaria es versátil y fácil de manejar.

La principal dificultad de la cromatografía líquida era la lentitud; y la forma de superar este problema fue aumentar la velocidad de elución, forzando al líquido (fase móvil) por medio de una bomba de desplazamiento positivo ó por la presión de un gas, a través de la columna, que es un cilindro rígido, dentro del cual, se encuentra el material de empaque formado por pequeñas partículas (fase estacionaria). (11)

Los sistemas de cromatografía líquida funcionan de acuerdo a los mismos principios, pero en este caso las separaciones rápidas y reproducibles distinguen a un sistema de Cromatografía Líquida de

Alta Resolución (CLAR) de un sistema de Cromatografía de Columna Abierta. (11)

4.2. PROCESO CROMATOGRAFICO. (10)

El éxito del uso de CLAR para un problema dado requiere la correcta combinación de las condiciones de operación; el tipo de empaque de la columna y la fase móvil, el largo y diámetro de la columna, la velocidad de flujo de la fase móvil, temperatura de la separación, tamaño de la muestra y demás.

La selección de las mejores condiciones en torno requiere un entendimiento básico de los factores que controlan la separación en CLAR.

Existen dos características principales de la separación cromatográfica :

4.2.1. MIGRACION DIFERENCIAL.

Se refiere a la variación en la velocidad de movimiento de diferentes compuestos a través de una columna. La migración diferencial es la base de la separación en cromatografía; sin una diferencia en velocidad de migración para dos compuestos, la separación no es posible.

La migración diferencial ó el movimiento individual de los compuestos a través de la columna depende del equilibrio de la distribución de cada uno de los compuestos entre la fase estacionaria y la fase móvil. Por lo tanto, la migración diferencial esta determinada por aquéllas variables experimentales que afectan esta distribución como son: la composición de la fase móvil, la composición de la fase estacionaria y la temperatura de separación.

4.2.2. DISTRIBUCION MOLECULAR.

La segunda característica de la separación cromatográfica es - la distribución de moléculas a lo largo de la columna para un compuesto dado. Esta distribución de moléculas a través de la columna - es causada por procesos físicos. Los más importantes de estos - procesos son : (ver figura núm. 1)

Longitud de Trayectoria ó Difusión de Eddy : diferentes moléculas, pueden tener diferentes trayectorias de diferentes longitudes a través del lecho de la columna.

Transferencia de Masa en la Fase Móvil : esto se refiere a las diferentes velocidades de flujo para diferentes partes de una sola vía de flujo entre partículas circundantes.

Estancamiento de la Transferencia de Masa en la Fase Móvil :

con partículas de empaque poroso la fase móvil contenida dentro de los poros de la partícula está estancada ó inmóvil, y las moléculas de muestra se mueven dentro y fuera de estos poros por difusión.

Transferencia de Masa en la Fase Estacionaria: después de que las moléculas de muestra difunden dentro de un poro, ellas penetran la fase estacionaria o se adhieren a ella de alguna forma.

Difusión Longitudinal : ya sea que la fase móvil dentro de la columna este en movimiento ó reposo las moléculas de muestra tienden a difundir al azar en todas direcciones. Esta contribución adicional a la distribución molecular, no se encuentra ilustrada en la figura núm. 1.

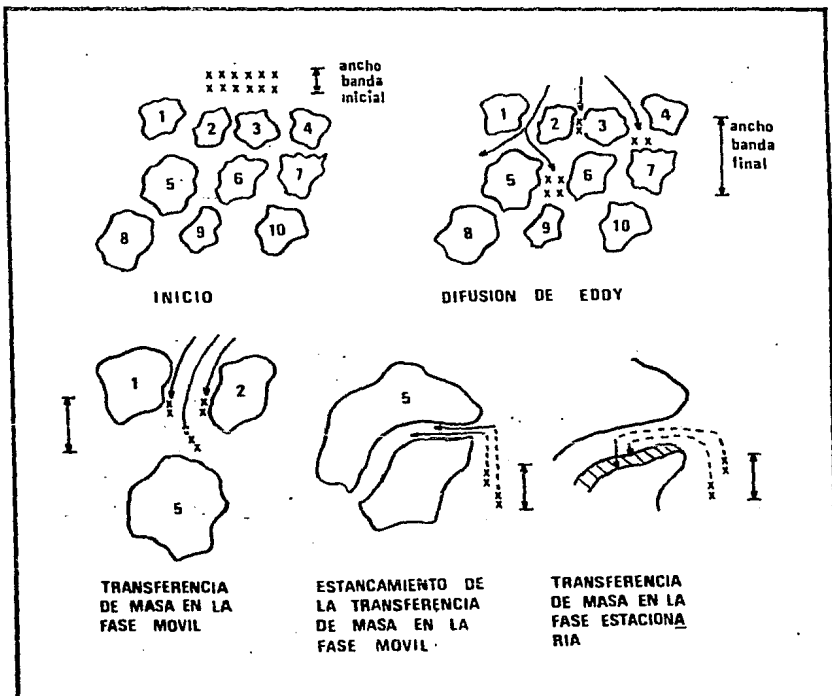


FIGURA N° 1

Procesos físicos que contribuyen a la distribución de moléculas a lo largo de la columna.

4.3. DEFINICIONES BASICAS EN CLAR.

Eventualmente los diferentes compuestos alcanzan el final de la columna y son llevados hacia el detector, donde sus concentraciones son registradas como una función del tiempo de separación.

Un cromatograma puede ser caracterizado por cuatro rasgos - que son importantes en la descripción de la separación resultante.

Primero, cada uno de los compuestos deja la columna en la forma de una banda simétrica en forma de campana ó pico (una curva de Gauss ó error estándar). Segundo, cada una de las bandas emerge de la columna a un tiempo característico que puede ser usado para identificar el compuesto. Este tiempo de retención t_r es medido desde el momento de la inyección de la muestra hasta el tiempo en que el máximo de la banda sale de la columna. Un tercer rasgo característico es la diferencia en tiempo de retención - entre bandas adyacentes. Finalmente, cada banda esta caracterizada por un ancho de banda W .

4.3.1. FACTOR DE CAPACIDAD (K'). (11)

Un pico es generalmente identificado, usando la medida de re--

tención. El término universal más frecuentemente usado para -- identificar o localizar un pico, es el factor de capacidad (K').

El factor de capacidad de un componente dado es definido como sigue :

$$K' = \frac{V_1 - V_0}{V_0} \quad (1)$$

Donde V_1 y V_0 estarán medidos en términos de las mismas -- unidades, V_0 es llamado volúmen muerto y es una medida de la retención (en términos de volúmen, tiempo o distancia) para un componente no retenido. El volúmen muerto de un sistema, es la medición del volúmen del sistema desde el inyector hasta el detector.

Por tanto K' será fácilmente calculado usando los incrementos del volúmen muerto. Los valores de K' , indican cuando las bandas eluyen relativamente en el volúmen muerto. Estos valores no son afectados por factores como flujo y dimensiones de la columna.

4.3.2. FACTOR DE SELECTIVIDAD () . (12)

El valor de , nos dice cuando un pico eluye relativamente de otro. Esto se referirá al factor de selectividad o factor de separación.

El factor de selectividad es definido solo por dos bandas, y es igual, al cociente de los valores altos de K' en el numerador y los valores bajos en el denominador por lo tanto $\alpha \geq 1$.

Si dos compuestos eluyen con $\alpha = 1.0$ cada valor de K' es idéntico al otro y un solo pico es observado en el cromatograma.

Cuando la ecuación de K' es sustituida en la definición de α se encuentra la expresión para la estimación de α .

$$\alpha = \frac{K'_{2}}{K'_{1}} = \frac{V_{2} - V_{0}}{V_{1} - V_{0}} \quad (2)$$

Los valores de α indican cuando las bandas eluyen cerca unas de otras. Esto es, indica la posición relativa de los picos adyacentes.

4.3.3. NUMERO DE PLATOS TEORICOS (N). (13)

El número de platos teóricos, se utiliza para medir la eficiencia de la columna o para medir el deterioro de esta, de acuerdo con la apertura de la banda. Cuando se utiliza el número de platos teóricos, para estos fines, debe tenerse en mente que este es un término relativo. Esto es, el número de platos teóricos no es neces-

sariamente el mismo para todos los sistemas donde el solvente, columna, flujo u otras variables son cambiadas.

El número de platos teóricos (N) de un sistema describe la desviación de la banda en relación a su centro.

$$N = 16 \left(\frac{d}{W} \right)^2 \quad (3)$$

Donde d es la distancia desde el inicio del cromatograma hasta el máximo del pico. El ancho del pico es definido en términos de unidades de desviación estandar, y es convencional definir el ancho (W) como cuatro desviaciones estandar, esto es, $\sigma \pm 2$ el cual incluye aproximadamente el 95 % del área bajo la curva, donde W tiene las mismas unidades que d (volumen eluido, tiempo ó simplemente distancia en papel carta).

Otra forma de medir la eficiencia de la columna es por medio de la altura equivalente de un plato teórico (AEPT = H).

$$H = \frac{L}{N} \quad (4)$$

Donde : L = longitud de la columna

N = número de platos teóricos.

4.3.4. RESOLUCION (R_s). (14)

Resolución, es definida para dos componentes de una muestra, como la diferencia de los volúmenes de elución, dividida por el promedio de los anchos de banda.

$$R_s = \frac{V_2 - V_1}{1/2 (W_1 + W_2)} \quad (5)$$

El término Resolución, describe el grado o la magnitud de la separación. Por tanto, hablamos de qué tanto un componente es separado de otro. El cálculo de R_s de datos experimentales puede ser hecho en unidades de distancia, tiempo ó volumen en tanto que V_1 y W_1 sean expresadas en las mismas unidades.

Resolución deberá ser visualizada, como el grado, en el cual un pico se distingue de otro en el cromatograma.

El parámetro R_s de la ecuación (5) sirve para definir la separación. Para controlar la separación ó resolución debemos conocer como varía R_s con los parametros experimentales.

$$R_s = (\alpha - 1) \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{K'}{1 + K'} \right) \quad (6)$$

(i)
(ii)
(iii)

La ecuación (6) es una relación fundamental en CLAR que nos permite controlar la resolución variando α , N ó K' .

Los tres términos (i - iii) de la ecuación (6) son independientes, así que se puede optimizar primero un término y después otro (ver figura núm. 2).

La selectividad de la separación que es medida por α (término i, de la ecuación 6) puede ser variada cambiando la composición de la fase móvil y/o fase estacionaria. La eficiencia de la separación que es medida por N (término ii) puede modificarse cambiando el largo de la columna (L), ó la velocidad del solvente (u). El término iii, que envuelve al factor de capacidad K' , se modifica cambiando la fuerza del solvente.

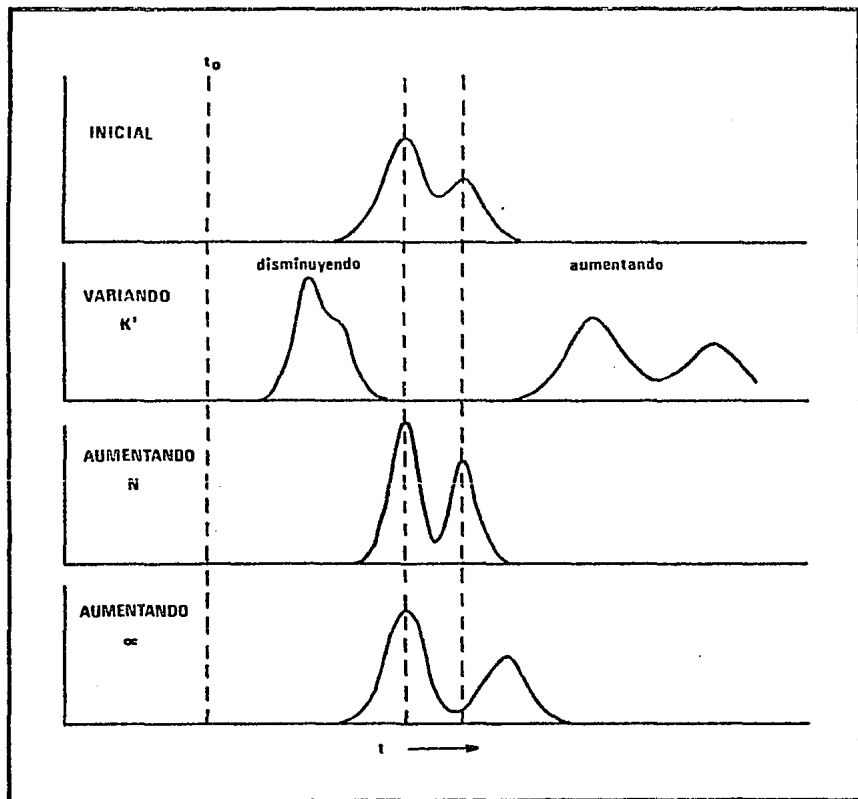


FIGURA N° 2 Variación de resolución para un par de picos con cambios en K' , N ó α .

4.3.5. MEDIDAS REQUERIDAS PARA EL CALCULO DE LOS PARAMETROS BASICOS .

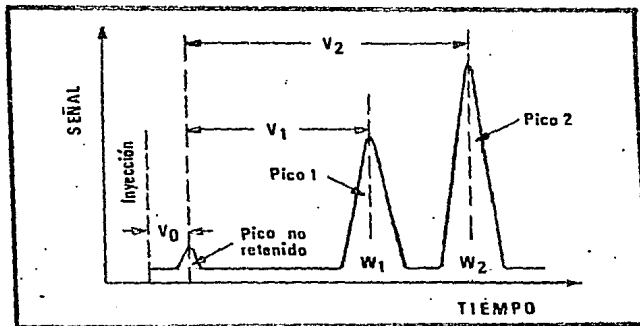


FIGURA N° 3 Cromatograma que muestra las medidas para el cálculo de los parámetros básicos.

RETENCION :
$$K'_1 = \frac{V_1 - V_0}{V_0}$$

SELECTIVIDAD :
$$\alpha = \frac{K'_2}{K'_1} = \frac{V_2 - V_0}{V_1 - V_0}$$

No. DE PLATOS :
$$N = 16 \left(\frac{V_1}{W_1} \right)^2$$

RESOLUCION :
$$R_s = \frac{V_2 - V_1}{1/2 (W_1 + W_2)}$$

4.4. MECANISMOS DE SEPARACION DE DIFERENTES FORMAS DE CLAR.

Existen cuatro métodos de Cromatografía Líquida de Alta Resolución, basados en diferentes mecanismos de separación. (10)

Es posible utilizar cada uno de ellos mediante un cambio de columna.

4.4.1. CROMATOGRAFIA LIQUIDO - LIQUIDO.

Envuelve una fase estacionaria líquida cuya composición es diferente de aquella de la fase móvil líquida. El mecanismo de separación esta basado en las diferentes solubilidades que presentan las moléculas de una muestra en la fase móvil y en la fase estacionaria.

Los líquidos de la fase móvil y la fase estacionaria deben ser inmiscibles.

4.4.2. CROMATOGRAFIA DE GEL O EXCLUSION.

Conocida también como Cromatografía de Permeación, efectúa la separación de acuerdo con el tamaño de las moléculas.

Este tipo de cromatografía se utiliza para sustancias cuyo peso molecular varía desde 2000 hasta varios millones, por ejemplo : proteínas, polisacáridos, polímeros.

4.4.3. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.

Se basa en la competencia entre la fase móvil y la muestra iónica que se analiza, por los sitios o grupos activos de una resina intercambiadora de iones. Es muy útil para separar proteínas y analizar fluidos biológicos. La naturaleza del eluyente es un factor decisivo en este tipo de determinaciones cromatográficas.

4.4.4. CROMATOGRAFIA LIQUIDO - SOLIDO.

Su mecanismo de separación se basa en la competencia que existe entre las moléculas de la muestra y las de la fase móvil, por ocupar los sitios activos de la superficie de un sólido.

En base a la polaridad de las fases esta se divide en :

Cromatografía en Fase Normal, aquí el lecho estacionario es fuertemente polar y la fase móvil es no polar, de esta forma las muestras polares son fuertemente retenidas en la columna. (15)

Cromatografía en Fase Inversa, el lecho estacionario es por

definición, menos polar que la fase móvil. Típicamente, la fase estacionaria es de naturaleza hidrocarbonada (octadecil u octil) y la fase móvil es una solución de agua y un modificador orgánico que no absorbe al U.V. tales como metanol ó acetónitrilo. Por este motivo las muestras no polares son mayormente retenidas. (16)

4.5. INSTRUMENTACION.

El equipo para CLAR debe ser diseñado y producido con cuidas especificaciones, para obtener separaciones con alta eficiencia y datos cuantitativos precisos.

4.5.1. COMPONENTES DE UN CROMATOGRAFO DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

El cromatografo de líquidos consta de un sistema de liberación de solvente (bomba), inyector, columna, detector y registrador.

La figura núm. 4 muestra un diagrama general del equipo usado para CLAR. (17)

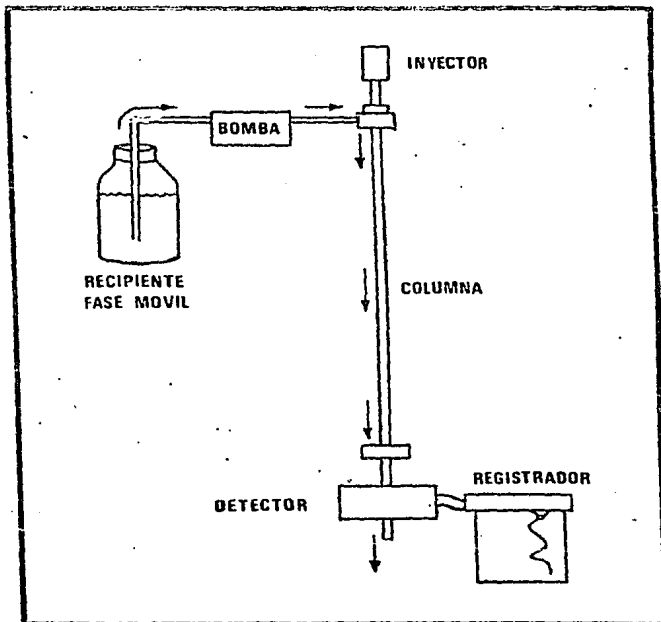


FIGURA N° 4 Diagrama de un sistema típico de Clar

La bomba libera solvente a una velocidad de flujo constante, pulsaciones de flujo suaves es un requisito importante. El inyector permite la introducción de la muestra en el flujo del solvente a alta - presión. La inyección de la muestra debe causar un mínimo disturbio de la velocidad de flujo.

La selección de una columna es dependiente de muchos parámetros, el más importante, es la clase de compuestos a ser analizados.

Varias columnas de diferentes polaridades y naturaleza química están disponibles. En general, la columna analítica ideal debe combinar alta eficiencia, selectividad y durabilidad. Alta eficiencia es llevada a cabo a través del uso de pequeñas partículas con una distribución de tamaño estrecha.

Los detectores para CLAR más comunes incluyen U.V., fluorescencia, índice de refracción y electroquímico. Idealmente se debe elegir un detector que tenga máxima sensibilidad y especificidad para los compuestos de interés.

Las características deseables en un detector incluyen linealidad, estabilidad, especificidad y alta sensibilidad. El detector debe estar conectado a un registrador. (18)

5. ANALISIS CUANTITATIVO.

La capacidad para analizar cuantitativamente una amplia variedad de materiales es probablemente el aspecto más importante de la CLAR. La precisión de resultados obtenidos por CLAR es ahora comparable ó superior a aquél provisto por la Cromatografía de Gases y excede a aquéllos obtenidos por otros métodos de separación de alta resolución (por ejemplo : C.C.F. , electroforesis).

5.1. FUENTES DE ERROR. (10)

En el análisis cuantitativo por CLAR , existen varias fuentes de error.

5.1.1. PICOS ASIMETRICOS.

Errores potenciales en cuantificación debido a picos asimétricos son comunes y es mejor eliminarlos, seleccionando otra columna ó un sistema de separación que produzca picos simétricos, es particularmente importante no usar picos cercanos a V_0 para la cuantificación porque la resolución insuficiente puede resultar en grandes errores. Generalmente, los análisis cuantitativos son llevados a cabo

solamente con picos de $k' = 0.5$.

5.1.2. DETECCION.

Errores en los análisis pueden originarse de variaciones en la señal del detector. La sensibilidad, estabilidad de la línea base y la linealidad del detector son especificaciones importantes para el análisis cuantitativo, y estos parámetros deben mantenerse estables para una mejor precisión analítica.

5.1.3. MEDIDA DE LOS PICOS.

Errores en análisis cuantitativos pueden originarse durante el manejo de datos del detector, por ejemplo, errores significativos, pueden resultar si el registrador no está correctamente ajustado.

El método de cuantificación, esto es, la forma de medir también afecta la exactitud y precisión del análisis. Dos caminos son usados para medir el tamaño del pico; el primero es simplemente medir la altura del pico; el segundo envuelve la medida del área del pico con uno de varios métodos. La integración electrónica o por computadora es el camino más rápido y preferido para medir las áreas de los picos, ya que permiten medidas más exactas para picos fusionados y mejor manejo de líneas base inestables. La técnica $H \times 1/2 W$, es el método manual preferido para medir el área cuando los picos son simétricos.

El integrador de bala y disco, planímetro y el método de cortar y pesar, en orden decreciente de preferencia, son aplicables para picos no simétricos.

5.2. CUANTIFICACION. (19)

La cuantificación objetiva de un material utilizado en CLAR, no es diferente a la cuantificación utilizando otro tipo de método.

Los métodos para determinar la exactitud y precisión están sujetos a la comparación con un estándar de pureza y concentración conocidas. Cuando se cuantifica una muestra, el pico de interés, se asume como el compuesto puro que ha eluido de la columna.

La cantidad del componente presente en la muestra, será equivalente al área ó altura del pico.

Normalmente se trabaja utilizando dos métodos :

5.2.1. ESTANDAR EXTERNO.

En este método se cuantifica simplemente comparando altura ó área del pico de la muestra con la altura ó área del pico del estándar externo, este último de peso y pureza conocida. Cuando se utiliza un estándar externo un control preciso del volumen de inyección es

obligatorio. La disponibilidad de inyectores precisos (loop), permite el uso rutinario de este método.

5.2.2. ESTANDAR INTERNO.

Consiste en añadir tanto a la muestra como al estándar externo, una cantidad conocida de una sustancia química similar, de estructura parecida al compuesto que se está analizando, de manera que su tiempo de retención no este muy lejano del tiempo de retención del compuesto de interés, es decir, que no exista una gran diferencia en la polaridad. La cuantificación por estándar interno debe ser considerada si el pretratamiento (ó derivatización) resulta con recorros variables ó incompletos de los componentes de interés.

Utilizando un estándar interno, se tendrá una mayor reproducibilidad y exactitud en el análisis. Puesto que, aquellos errores debidos al volúmen de inyección se cancelan.

Debido a la exactitud del método, es muy conveniente sobre todo cuando se preparan tablas de calibración.

6. VALIDACION ESTADISTICA.

6.1. GENERALIDADES. (20)

En las últimas décadas, los métodos estadísticos han sido intensamente introducidos en las investigaciones y prácticas farmacéuticas y figuran en las farmacopeas modernas. Constituyen un importante recurso en el trabajo, que permite ordenar numerosos datos de investigación y caracterizarlos racionalmente mediante un reducido número de parámetros (valor medio, distribución de la magnitud), - así como, la zona de aplicación (límites de confianza) de estas magnitudes. Son imprescindibles, además, cuando se trata de averiguar si los resultados de observación ó experimentación se diferencian de una manera estadísticamente segura (diferencia significativa) ó si tales diferencias son fortuitas, ó bien, si existe ó no dependencia - entre dos magnitudes y, en caso positivo, si esta dependencia es más ó menos marcada (procedimientos de correlación y regresión).

La estadística adquiere una importancia especial en la vigilancia de los procesos de producción y el control de calidad de los productos terminados.

6.2. DEFINICION DE VALIDACION. (21)

El proceso de validación es un programa documentado, el cual provee un alto grado de seguridad (certeza) de que un proceso específico producirá consistentemente un producto que cumple con las especificaciones predeterminadas y atributos de calidad.

Un método analítico válido es aquel para el cual la exactitud es conocida y la variabilidad del método esta establecida. Esto significa que las desviaciones del método son conocidas, las posibles interferencias han sido identificadas, la especificidad es conocida , la precisión esta establecida y la sensibilidad (límite de detección ó la capacidad para detectar cambios relativos) es adecuada.

6.3. TIPOS DE ERRORES. (22)

Cualquier proceso de medición está sujeto a error, aún cuando, las equivocaciones en los cálculos o la técnica sean eliminados, el error permanece. El analista debe reducir la magnitud del error a un nivel aceptable, ya que nunca se podrán eliminar del todo.

Los errores son de dos tipos :

6.3.1. ERRORES SISTEMATICOS.

Los errores sistemáticos ó determinados, son originados por fallas en el mismo proceso de medición, mala calibración de equipos, falta de experiencia del analista, errores personales, resultados tendenciosos, etc. Estos dan origen a desviaciones y afectan la exactitud de la medida.

El error sistemático se divide en error constante ó absoluto, el cual es independiente de la concentración del fármaco en el medicamento; y en error proporcional ó relativo el cual depende de la concentración del fármaco en el medicamento.

6.3.2. ERRORES ALEATORIOS.

Los errores aleatorios ó indeterminados, son originados por efectos acumulativos de fluctuaciones aleatorias en el proceso de me di da; estos afectan la precisión de las medidas.

6.4. CONCEPTOS BASICOS (VALIDACION).

6.4.1. EXACTITUD. (23)

La exactitud es la concordancia absoluta entre el valor de una propiedad medida experimentalmente (estimador) y su valor real de referencia. La exactitud de un método analítico puede ser determinada por dos métodos ; recobro de placebo agregado ó adición de estándar.

En el método de recobro de placebo agregado, el principio activo puro es agregado a la mezcla de excipientes del producto, la mezcla resultante es ensayada, y los resultados obtenidos son comparados con el resultado esperado.

En el método de adición de estándar, una muestra es ensayada y una cantidad de principio activo le es agregada, siendo la muestra nuevamente ensayada. La diferencia entre los resultados de los ensayos es comparada con la respuesta esperada.

En ambos métodos, el recobro es definido como el cociente del resultado obtenido entre el resultado correcto.

6.4.2. LINEARIDAD. (23)

La exactitud de un método puede variar a través del intervalo de los posibles valores del ensayo. Por esto, es necesario determinar la exactitud a diferentes valores. El criterio desarrollado recomienda que la exactitud sea determinada a través de un intervalo que incluya desde el 80 % hasta el 120 % del valor esperado para el ensayo. Métodos estadísticos deben ser empleados para verificar la linealidad del método y las posibles desviaciones. Los tipos de posibles desviaciones son mostradas en la figura núm. 5 (una gráfica de cantidad agregada contra cantidad recuperada).

Un método que es lineal y sin desviaciones tiene una pendiente de uno ; una ordenada al origen igual a cero (no es cero para el método de adición de estándar), y un coeficiente de correlación de 0.95 ó mejor. (24)

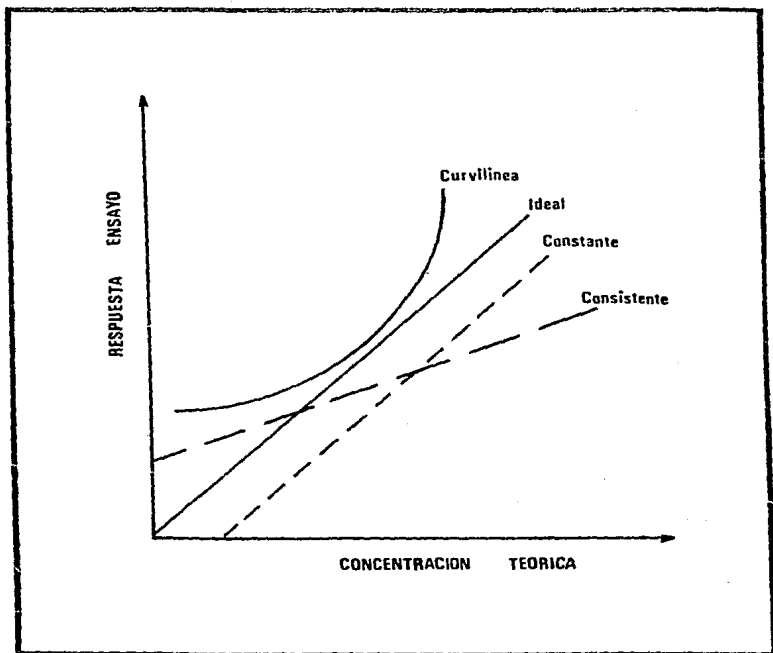


FIGURA N° 5 Ilustración de los tipos de desviaciones encontradas en los ensayos de validación.

La precisión (variabilidad) es la concordancia relativa de mediciones repetidas independientes de una misma propiedad, bajo las mismas condiciones (repetibilidad) y/ó diferentes condiciones (reproducibilidad) .

La precisión óptima del método debe ser caracterizada por el estudio de recobro; este normalmente consiste de la ejecución del método en un día por un analista, en placebos agregados (repetibilidad) .

El estudio de reproducibilidad será caracterizado al menos por la ejecución del método por un analista, en un día, segundo analista, segundo día, seis determinaciones por analista por día en muestras reales o agregadas. Una caracterización más completa del estudio de reproducibilidad incluye dos o más analistas, dos ó más días, seis ó más muestras por día. El primer día del estudio de reproducibilidad será utilizado para evaluar la homogeneidad de la muestra y la bondad del método cuando es aplicado a muestras reales.

Si la variabilidad del método en muestras reales es mucho mayor que aquélla del estudio de precisión óptima, la validación será suspendida. Deberá determinarse si la falta de precisión es debida a que la muestra es no homogénea o debido al método. Si la muestra es no homogénea y no puede hacerse homogénea, muestras agregadas serán utilizadas y la validación se repetirá .

Si el método es la falla, modificaciones al método y revalidación serán necesarios.

6.4.4. SENSIBILIDAD. (24)

Límite de detección. Menor cantidad detectable del compuesto por analizar. La sensibilidad de un método analítico puede ser determinada como la cantidad ó concentración de sustancia por analizar que dé una señal de referencia del rango de " ruido " para el método; en algunas ocasiones la sensibilidad puede escribirse en términos de intervalo de confianza.

6.4.5. ESPECIFICIDAD. (23)

En procedimientos analíticos específicos, la medida usada para la determinación de un componente no es influenciada por la presencia de otros materiales. Idealmente esto significa que el compuesto que se está midiendo está libre de interferencias de todos los materiales conocidos. La documentación de este hecho, sin embargo, no es realista ni práctica, ya que no posee valor numérico. Por lo tanto, la prueba ó ensayo es considerada válida bajo ciertos criterios:

- a) No debe existir interferencia de los excipientes del producto con el ensayo de potencia (no existe efecto de placebo).

- b) El ensayo no debe mostrar interferencias de productos de degradación conocidos.
- c) Los ensayos de materia prima no deben tener interferencias atribuibles a productos de degradación conocidos ni de impurezas del proceso.

La especificidad del ensayo puede también ser mostrada estableciendo experimentalmente que compuestos similares (moléculas con los mismos grupos funcionales y aproximadamente el mismo peso molecular) no interfieren con el procedimiento analítico para el componente en cuestión.

La especificidad del método analítico empleado es un auxiliar valioso en un estudio de estabilidad ya que ayudará a conocer el comportamiento de los principios activos de una formulación determinada al ser almacenada bajo diferentes condiciones.

6.5. CRITERIOS APLICADOS A LOS ENSAYOS DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION. (20) .

	OPTIMO	ACEPTABLE	CONDICIONALMENTE ACEPTABLE
Exactitud	98 - 102 %	97 - 103 %	96 - 104 %
Reproducibilidad	1.0 %	2.0 %	3.0 %
Precisión Total	1.5 %	2.0 %	3.0 %
Sensibilidad	S U F I C I E N T E P A R A S U U S O .		
Especificidad (interferencia de prod. de degradación ó impurezas) .	NINGUNA	1.0 %	2.0 %

7. PARTE EXPERIMENTAL .

7.1. EQUIPO.

Balanza analítica Mettler H35AR .

Agitador mecánico super mixer.

Espectrofotómetro U.V. - VIS Perkin - Elmer Mod. 552 .

Bomba de vacío Koblenz Mod. CGP 134 .

Equipo para filtración ; Solvent Clarification Kits Millipore.

Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Waters Ass.

equipado con :

- Bomba para Cromatografía ; Waters Ass. Mod. 6000 - A
Solvent Delivery System.

- Inyector : Waters Ass. Mod. U - 6 K .

- Columna : Módulo de Compresión Radial Z - Module TM
Cartucho Radial Pack C₁₈ (10 cm x 8 mm)
de Waters Ass.

- Detector : U.V. de onda variable Lambda Max Mod. 481
Waters Ass.

- Procesador de Datos : Waters Ass. 730 Data Module.

- Jeringa : Hamilton de 25 mcl. de capacidad.

7.2. MATERIAL.

Matraces volumétricos	25	ml.
Matraces volumétricos	50	ml.
Matraces volumétricos	250	ml.
Pipetas serológicas	1	ml.
Pipetas serológicas	2	ml.
Pipetas volumétricas	1	ml.
Probeta	250	ml.
Matraz Erlenmeyer	125	ml.

Todo el material de vidrio utilizado fué Pyrex.

Membranas de filtración acuosas 0.45 micras Millipore.

Membranas de filtración orgánicas 0.50 micras Millipore.

7.3. REACTIVOS.

Metanol Lichrosolv Grado cromatográfico (Merck).

Acido Fosfórico Grado reactivo (J.T. Baker).

Agua Bidestilada.

Acido Diatrizolco Estándar.

Meglumina.

Hidróxido de Calcio.

Hidróxido de Sodio 0,1 N.

Acido Clorhídrico 0,1 N.

7.4. METODO.

7.4.1. PREPARACION DE SOLUCION DE REFERENCIA.

Transferir 25 mg. de ácido diatrizoico de referencia a un matraz volumétrico de 25 ml., adicionar 1,7 ml. de hidróxido de sodio 0,1 N para su solubilización y llevar a volumen con agua; tomar - 1 ml. de esta solución y transferir a un matraz volumétrico de 50 ml. llevar a volumen con agua destilada para obtener una solución con una concentración de 0,02 mg/ml.

7.4.2. PREPARACION DE LA SOLUCION PROBLEMA.

La formulación contiene :

1. Diatrizoato de Sodio	19.07 g.
2. Diatrizoato de Meglumina	9.67 g.

3. Diatrizoato de Calcio	0.94 g.
Vehículo c.b.p.	100 ml.

Equivalente a :

1. Acido Diatrizoico	18.41026 g.
2. Acido Diatrizoico	7.33729 g.
3. Acido Diatrizoico	0.91000 g.
	<hr/>
	26.65755 g/100 ml

Tomar 1 ml. de la formulación y transferirlo a un matraz volu métrico de 50 ml. llevar a volúmen con agua destilada. Tomar 1 ml. de esta solución y colocarlo en un matraz volumétrico de 250 ml., llevar a volúmen con agua destilada para obtener una concentra ción de 0.021326 mg/ml de ácido diatrizoico.

7.4.3. DETERMINACION DE ACIDO DIATRIZOICO POR CLAR.

Injectar 10 mcl. de la solución de referencia y 10 mcl. de la solución problema bajo las siguientes condiciones :

Columna : Radial Pack C₁₈ (10 cm x 8 mm),
tamaño de partícula de 5 micras.

Longitud de Onda : U.V. a 240 nm.

Sensibilidad : 0.05 AUFS.
 Fase Móvil : Agua : Metanol : Acido Fosfórico
 (60 : 40 : 0.04).
 Velocidad de Flujo : 1.0 ml / min.
 Presión : 600 psi.
 Velocidad de Carta : 0.5 cm / min.

7.4.4. FORMA DE CALCULO.

Para efectuar la cuantificación se decidió utilizar el método del estándar externo, esto es, realizar inyecciones separadas de la muestra y el estándar, comparando la respuesta entre ambos.

Después de cromatografiar las soluciones de la muestra y el estándar, la cantidad de ácido diatrizoico contenido en la muestra puede ser calculado como sigue :

$$\frac{\text{ARP}}{\text{ARS}} \times \text{CS} = \text{CEP}$$

$$\frac{\text{CEP}}{\text{CTP}} \times 100 = \% \text{ Acido Diatrizoico}$$

Donde :

ARP = Area Relativa del Problema.

ARS = Area Relativa del Estandar.

CS = Concentración del Estandar.

CEP = Concentración Experimental del Problema.

CTP = Concentración Teórica del Problema.

7.5. VALIDACION ESTADISTICA.

7.5.1. ESPECIFICIDAD.

Con el fin de demostrar la especificidad del método analítico de CLAR, propuesto para el análisis del Acido Diatrizoico, se analizaron de acuerdo a este, muestras de la formulación y placebo conservadas bajo diferentes condiciones :

- A. Muestras conservadas en condiciones normales a temperatura ambiente.
- B. Muestras sometidas a la acción de la luz solar (30 días).
- C. Muestras sometidas a una temperatura de 60°C (30 días)
- D. Muestras sometidas a condiciones de oxidación, con peróxido de hidrógeno.

xido de hidrógeno al 5 % (15 días) .

- E. Muestras sometidas a condiciones de hidrólisis alcalina con NaOH 3 N , a 60 °C (7 días) .

7.5.2. EXACTITUD Y REPETIBILIDAD .

Con el objeto de evaluar la exactitud y repetibilidad del método propuesto, se analizarán de acuerdo a este, 10 muestras adicionales con una cantidad conocida de Acido Diatrizoico (0,020 mg/ml), utilizando para ello un placebo cargado.

7.5.3. LINEARIDAD .

Para comprobar que existe una relación lineal entre los mg. de Acido Diatrizoico adicionados y los mg. recuperados ; se analizarán de acuerdo al método propuesto muestras adicionadas con cinco diferentes concentraciones de Acido Diatrizoico (placebo cargado), que se muestran a continuación :

mg / ml de Acido Diatrizoico	% de acuerdo al valor ópti- mo para el análisis.
0.010	50
0.015	75
0.020	100
0.025	125
0.030	150

7.5.4. REPRODUCIBILIDAD .

El estudio de reproducibilidad se llevó a cabo sobre muestras - reales de la formulación de Acido Diatrizoico por dos analistas, ha- ciendo cada uno seis análisis del mismo lote (85 H 73) en dos días, realizando los análisis de acuerdo al método propuesto.

8. RESULTADOS .

8.1. ESPECIFICIDAD .

Para verificar la especificidad del método se probarón diferentes proporciones del sistema Metanol : Agua , conservando la misma proporción de Acido Fosfórico , siendo estas :

Metanol : Agua : Ac. Fosfórico (30 : 70 : 0.04)

Metanol : Agua : Ac. Fosfórico (20 : 80 : 0.04)

Metanol : Agua : Ac. Fosfórico (50 : 50 : 0.04)

Con las cuales no se obtuvo algún pico adicional.

Probándose también diferentes longitudes de onda que fueron - 260, 290, y 320 nm. , para ver si algún producto de degradación absorbía a diferente longitud de onda, y tampoco bajo estas condiciones se observaron picos adicionales.

Los resultados obtenidos indican que no existe ningún compuesto adicional que presente el mismo tiempo de retención ($t_r = \text{min.}$) que el Acido Diatrizoico. Por lo tanto, se concluye que el método de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, es específico para la determinación de Acido Diatrizoico.

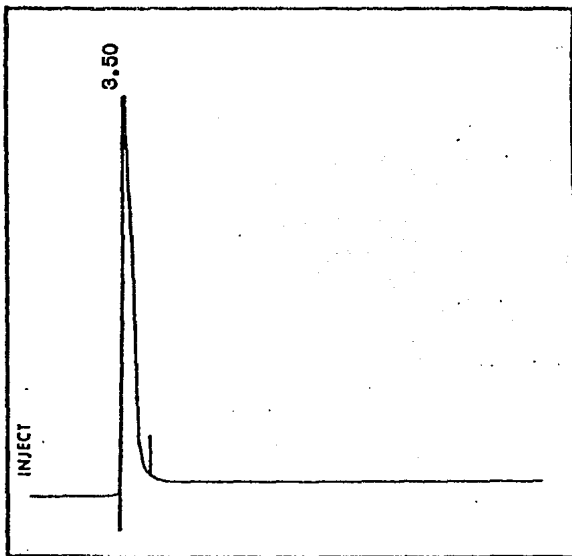


FIGURA No. 6

Cromatograma que muestra el pico obtenido para el Acido Diatrizoico estándar.

($t_r = 3.50$).

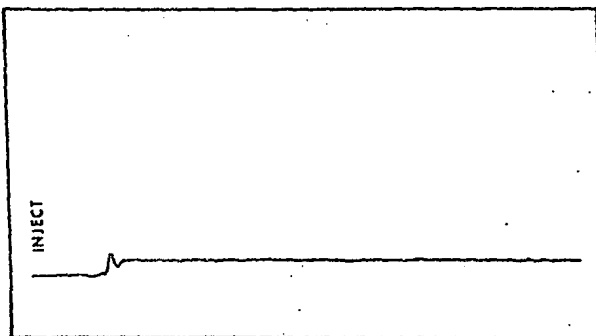


FIGURA No. 7

Cromatograma obtenido para el placebo de la formulación, bajo condiciones normales. Demuestra que no existen interferencias por parte de los excipientes de la formulación en la cuantificación del Acido Diatrizolco.

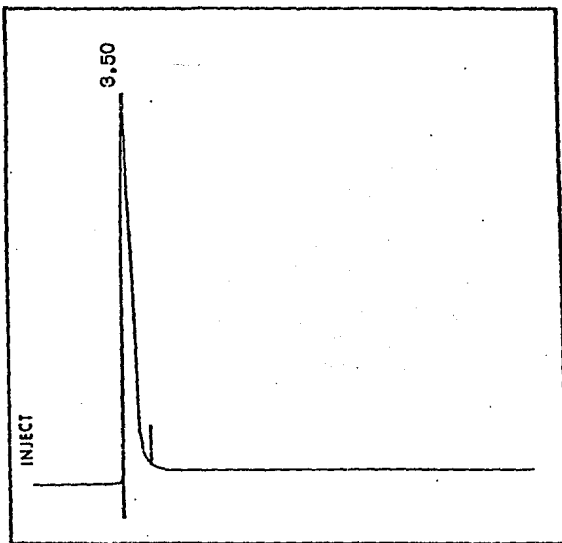


FIGURA No. 8

Cromatograma obtenido para la formulación, bajo condiciones normales, en el cual se nota un solo pico correspondiente al Acido Diatrizoico ($t_r = 3.50$).

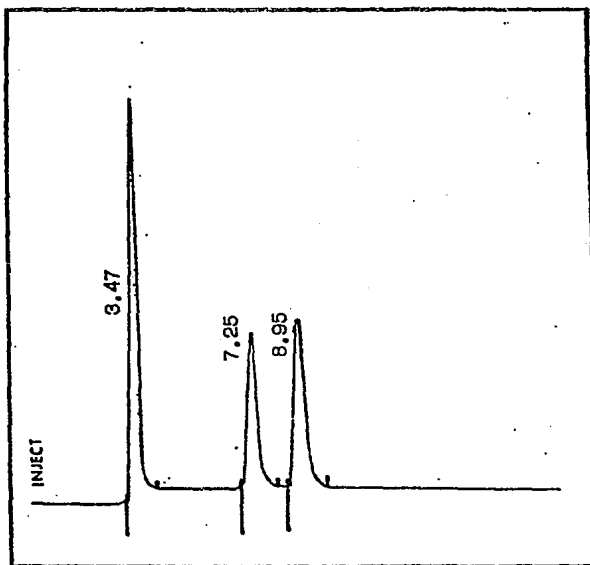


FIGURA No. 9

Cromatograma que muestra la separación entre el Acido Diatrizoico ($t_r = 3.47$) y sus precursores de síntesis: Acido 3,5-diamino-2,4,6-triflido benzoico ($t_r = 7.25$) y Acido 3,5-diamino-2,6-diflido benzoico ($t_r = 8.95$). En el que se demuestra que no hay interferencia por parte de estos en la cuantificación del Acido Diatrizoico.

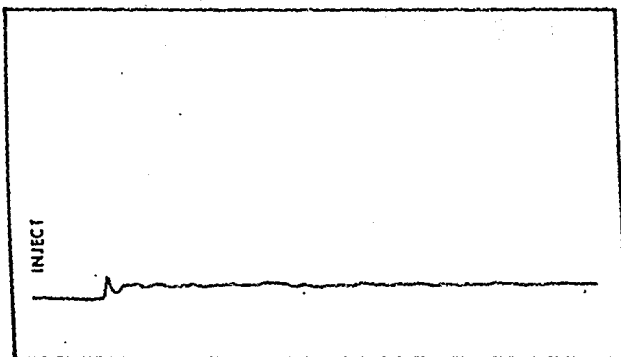


FIGURA No. 10

Cromatograma obtenido para el placebo sometido a la acción de la luz solar (30 días).

No muestra ningún pico adicional.

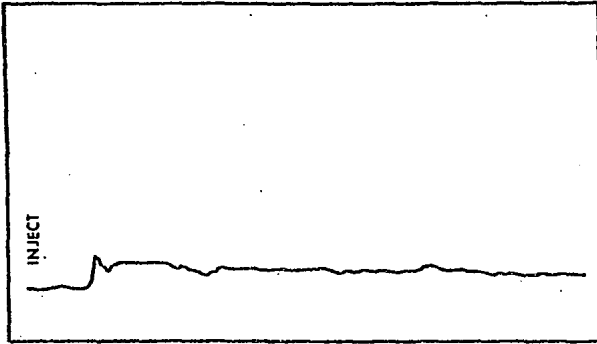


FIGURA No. 11

Cromatograma obtenido para el placebo sometido a una temperatura de 60 °C (30 días).

No muestra ningún pico adicional.

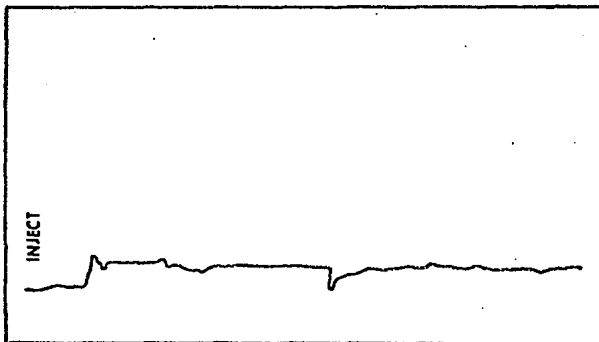


FIGURA No. 12

Cromatograma obtenido para el placebo sometido a condiciones de hidrólisis alcalina a 60 °C (7 días). No muestra ningún pico adicional .

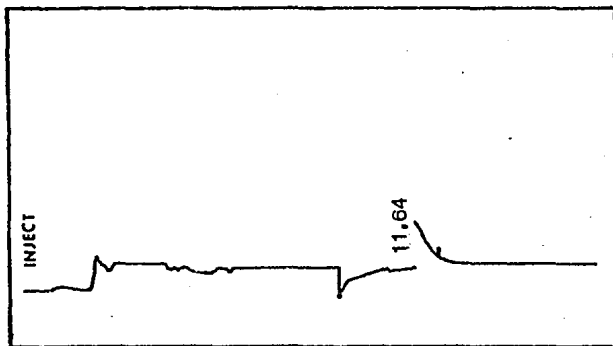


FIGURA No. 13

Cromatograma obtenido para el placebo sometido a condiciones de oxidación (15 días).
El cual presenta un pico adicional ($t_r = 11.64$)
que no interfiere con la cuantificación del Acido
Diatrízico.

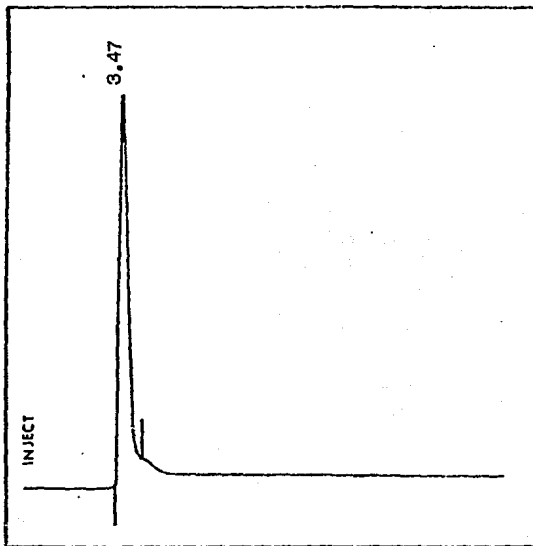


FIGURA No. 14

Cromatograma obtenido para la formulación sometida a la acción de la luz solar (30 días) en el que se observa un pico que corresponde al Acido Diatrizoico ($t_r = 3.47$).

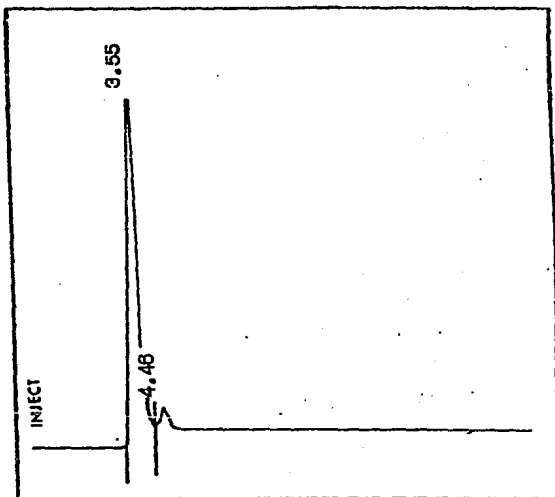


FIGURA No. 15

Cromatograma obtenido para la formulación sometida a una temperatura de 60 °C por (30 días), en el que se observan dos picos, uno correspondiente al Acido Diatrizoico - ($t_r = 3.55$) y otro que corresponde a un producto de degradación ($t_r = 4.46$).

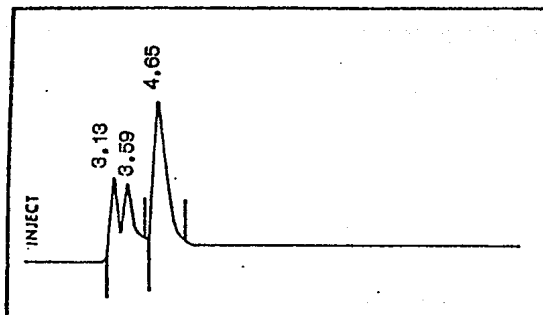


FIGURA No. 16

Cromatograma obtenido para la formulación sometida a condiciones de hidrólisis alcalina (7 días), aquí se observa una mayor degradación del Ácido Diatrizoico ($t_r = 3.59$) y la aparición de dos productos de degradación ($t_r = 3.13$ y $t_r = 4.65$).

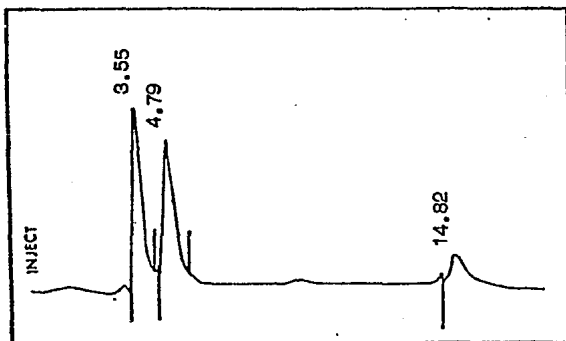


FIGURA No. 17

Cromatograma obtenido para la formulación sometida a condiciones de oxidación (15 días) en el cual se observa la aparición de dos picos adicionales correspondientes a productos de degradación ($t_r = 4.79$ y $t_r = 14.82$), así como, el pico correspondiente al Acido Diatrizoico ($t_r = 3.55$) .

8.2. EVALUACION ESTADISTICA.

Las fórmulas de cálculo para cada uno de los subíndices se encuentran en los apéndices que al final de esta tesis se incluyen.

Datos de cantidades adicionadas al placebo para la evaluación estadística de la exactitud y repetibilidad del método por CLAR para la determinación de Acido Diatrizoico.

TABLA No. I

mg. adicionados (x)	mg. recuperados (y)	% recuperado (y%)
0.02	0.01987	99.35
0.02	0.02039	101.95
0.02	0.01974	98.70
0.02	0.01975	98.75
0.02	0.01972	98.60
0.02	0.02012	100.60
0.02	0.02008	100.40
0.02	0.02034	101.70
0.02	0.01964	98.20
0.02	0.02014	100.70

Media	$\bar{y}_{\%}$	=	99.895
Desviación estándar	$S_{\%}$	=	1.352662
Número de datos	n	=	10

8.2.1. EXACTITUD.

- Prueba de Hipótesis :

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

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

- Resultado :

$$t_{\text{calc.}} = -0.245471$$

$$t_{(0.95, 9)} = 1.8331$$

$t_{(0.95, 9)} > t_{\text{calc.}} \therefore$ no se rechaza H_0 , por lo que podemos concluir que el método es exacto.

- Intervalo de Confianza (95 %).

$$98.927346 < \mu < 100.862654$$

8.2.2. REPETIBILIDAD.

- Prueba de Hipótesis :

$$H_0 : \sigma \leq 2 \%$$

$$H_1 : \sigma > 2 \%$$

- Resultado :

$$x_{i^2}^2 \text{ calc.} = 4.116813$$

$$x_{i^2}^2 (0.95, 9) = 16.919$$

$$x_{i^2}^2 (0.95, 9) > x_{i^2}^2 \text{ calc.} \quad \therefore \text{no se rechaza } H_0, \text{ y}$$

podemos concluir que el método es repetible.

- Intervalo de Confianza (95 %).

$$0.930403 < \sigma < 2.469612$$

8.2.3. LINEARIDAD.

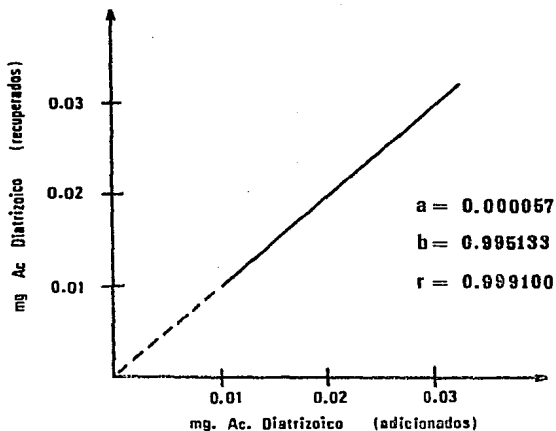
TABLA No. II - Datos de cantidades adicionadas al placebo para la evaluación estadística de la linealidad.

mg. adicionados (x)	mg. recuperados (y)	% recuperado (y%)
0.010	0.01023	102.30
0.010	0.00998	99.80
0.010	0.00991	99.10
0.015	0.01478	98.53
0.015	0.01470	98.00
0.015	0.01505	100.33
0.020	0.01991	99.55
0.020	0.02033	101.65
0.020	0.02015	100.75
0.025	0.02452	98.08
0.025	0.02480	99.20

TABLA No. II (Continuación).

mg. adicionados (x)	mg. recuperados (y)	% recuperado (y%)
0.025	0.02534	101.36
0.030	0.02940	98.00
0.030	0.03050	101.66
0.030	0.02979	99.30

En la gráfica siguiente se muestran los resultados obtenidos para la linealidad del método analítico por CLAR para la determinación de Acido Diatrizoico.



$$\bar{y} = 0.019959$$

$$S_y = 0.007290$$

$$\bar{x} = 0.020000$$

$$S_x = 0.007319$$

$$S_{y/x} = 0.000363$$

8.2.3.1. INFERENCIAS ACERCA DE a (ORDENADA AL ORIGEN).

- Prueba de Hipótesis :

$$H_0 : a = 0$$

$$H_1 : a \neq 0$$

- Resultado :

$$t_{\text{calc.}} = 0.052149$$

$$t_{(0.95, 13)} = 1.7709$$

$t_{(0.95, 13)} > t_{\text{calc.}} \therefore$ no se rechaza H_0 , y podemos concluir que $a = 0$.

- Intervalo de Confianza (95 %).

$$- 0,000550 < a < 0,000664$$

8.2.3.2. INFERENCIAS ACERCA DE b (PENDIENTE).

- Prueba de Hipótesis :

$$H_0 : b = 1$$

$$H_1 : b \neq 1$$

- Resultado :

$$t_{\text{calc.}} = - 0,367173$$

$$t_{(0,95, 13)} = 1,7709$$

$t_{(0,95, 13)} > t_{\text{calc.}}$ \therefore no se rechaza H_0 , y podemos concluir que $b = 1$.

- Intervalo de Confianza (95 %).

$$0,966496 < b < 1,023770$$

8.2.4. REPRODUCIBILIDAD.

TABLA No. III - Datos obtenidos para el estudio del efecto de analista y día para la reproducibilidad del método analítico por CLAR para la determinación de Acido Diatrzoico.

A N A L I S T A

		(j = 1)	(j = 2)
		D I A	(i = 1)
101.01	101.43		
99.59	101.08		
101.61	100.13		
100.86	100.37		
101.16	99.06		
(i = 2)	102.48		98.35
98.70	100.23		
100.82	100.42		
98.44	101.72		
100.93	101.60		
102.48	101.21		

$$\frac{\sum Y_{i..}^2}{12} = 242753.8989$$

$$\frac{\sum \sum Y_{ij.}^2}{6} = 242755.1171$$

$$\frac{\sum Y_{...}^2}{24} = 242753.8547$$

$$\frac{\sum Y_{.j.}^2}{12} = 242754.5654$$

$$\sum \sum \sum Y_{ijk}^2 = 242785.3727$$

De acuerdo a los valores de F calculada menores a los valores de F teórica ; se infiere que no existe ningún efecto de alguna de las fuentes de variación en la determinación de Acido Diatrizoico por CLAR . (Ver Tabla No. IV)

TABLA No. IV

- ANALISIS DE VARIANZA -

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Sumatoria de cuadrados	Media cuadrada	F calculada	F teórica
D_i	1	0.044200	0.044200	0.087094	161.4
A_j	1	0.710700	0.710700	1.400394	161.4
DA_{ij}	1	0.507500	0.507500	0.935475	4.95
$E_{(tj)k}$	20	30.255600	1.512780		

9. CONCLUSIONES.

- De los resultados obtenidos al realizar el análisis estadístico se puede concluir que el método desarrollado por CLAR para la cuantificación de Acido Diatrizoico es exacto y preciso - (a un 95 % de probabilidad) .

- Por otra parte la evaluación estadística demostró que la respuesta es lineal en el intervalo de concentraciones probadas .

- El método desarrollado por CLAR logra separar, identificar y cuantificar al Acido Diatrizoico de sus precursores de síntesis, así como, de sus productos de degradación. Por lo tanto, pueda ser utilizado en estudios de estabilidad.

- Las ventajas que presenta el método desarrollado por CLAR para la cuantificación del Acido Diatrizoico son :
 - Tiempo de análisis corto.
 - Empleo de cantidades pequeñas de muestra.
 - Especificidad.
 - Exactitud y Precisión.
 - Alta Sensibilidad.

- Se concluye que el método analítico desarrollado por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) es : específico, preciso (repetible y reproducible) y exacto para la cuantificación de Acido Diatrizoico en preparaciones farmacéuticas.

10. BIBLIOGRAFIA .

1. Knoefel , P. K. ,
Radiopaque Diagnostig Agents . ,
A. Rev. Pharmac. 5 : 321 - 334 , (1965) .
2. Shehadi , W. H. ,
Clinical Problems and Toxicity of Contrast Agents . ,
Amer. J. Roentg. 97 : 762 - 771 (1966) .
3. Florey , K. ,
Analitical Profiles of Drug Substances . ,
vol. 4 , Academic - Press ,
New York , U.S.A. (1975) .
4. The United States Pharmacopeia - National
Formulary U.S.P. XXI - N.F. XVI .
5. Miller , M. ,
Squib Institute , Personal Communication.
6. Martindale , The Extra Pharmacopoeia . ,
27a. ed. , The Pharmaceutical Press . ,
London , England , (1977) .

7. Burger , A. ,
Medicinal Chemistry ,
Wiley-Interscience , New York , N.Y. , (1970).
8. Hoppe , J. O. ,
Some Pharmacological Aspects of Radiopaque
Compounds .
Ann. N. Y. Acad. Sci. 73 : 727 - 739 (1959).
9. Remington's Pharmaceutical Science ,
16 th ed. , Mack Publishing Corporation ,
Easton , Pennsylvania (1980).
10. Snyder , L. R. and Kirkland , J. J. ,
Introduction to Modern Liquid Chromatography . ,
2a. ed. , Jhon Wiley and Sons , Inc. ,
New York , U.S.A. (1979).
11. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución . ,
Editado por la ESCUELA de Cromatografía Líquida . ,
Millipore Div. Waters Associates Inc. ,
México , D.F. , 1984 .
12. Glajch , J. L. and Kirkland , J. J. ,
Optimization of Selectivity in Liquid Chromatography . ,
Anal. Chem. 55 , No. 2 : 319A - 338A , (1983).

13. Connors , K. A. ,
A Textbook of Pharmaceutical Analysis . ,
2a. ed. , A Wiley - Interscience Publication . ,
New York , U.S.A. (1975) .
14. Snyder , L. R. ,
A rapid approach to Selecting the Best Experimental
Conditions for High-Speed Liquid Column Chromato -
graphy . Part. II . ,
J. Chrom. Sci. , 10 ; 246 - 254 (1972) .
15. Abbott , S. R. ,
Practical Aspects of Normal - Phase Chromatography . ,
J. Chrom. Sci. , 18 : 540 - 550 (1980) .
16. Cooke , N. H. C. and Olsen , K. ,
Reversed - Phase Liquid Chromatography on Chemica -
lly Bonded Alkyl Stationary Phases . ,
J. Chrom. Sci. , 18 ; 512 - 524 (1980) .
17. Smith , M. H. ,
The Application of High Pressure Liquid Chromatography
to Product and Raw Material Quality Assurance . ,
Int. J. Cosmetic Sci. , 2 ; 127 - 142 (1980) .

18. Dennis , R. ,
Recent Advances in HPLC Technology . ,
Pharm. Int. , June , 1984 : 142 - 146 .
19. Mitchell , W. and Rahn , D. ,
High Performance Liquid Chromatography In Cosmetic
Analysis . , D & C I , November , 1978 : 56 - 67 .
20. Stimuliti to the Revision Process . ,
Guidelines for the Analytical Validation of HPLC Methods. ,
Report of the PMA Quality Control Section . ,
Committee on Pressurized Liquid Chromatography . ,
U.S.A. (1983) .
21. Voigt , R. ,
Tratado de Tecnología Farmacéutica . ,
Cap. 6 , Editorial Acribia ,
Zaragoza , España (1979) .
22. Alperin , G. ,
Validation Considerations In Pharmaceutical Pro -
cesses and Plant Design . ,
Pharm. Engin. , 4 , No. 3 : 15 - 19 .
June , 1984 .

23. Massart , L. D. and Kaufman , L. ,
Evaluation and Optimization of Laboratory Methods
and Analytical Procedures . ,
Vol. I , Elsevier Scientific Publishing Company . ,
Amsterdam - Oxford - New York , 1978 .
24. Vanderwielen , A. J. and Hardwidge , E. A. ,
Guidelines for Assay Validation . ,
Pharm. Techn. 3 : 66 - 76 (1982) .
25. Taylor , J. K. ,
Validation of Analytical Methods . ,
Anal. Chem. 55 , No. 6 : 600A - 608A .
Mayo , 1983 .

11. APENDICES DE FORMULAS APLICADAS A LA EVALUACION ESTADISTICA.

11.1. APENDICE I.

EXACTITUD.

- Modelo Probabilístico :

$$t_{\text{calc.}} = \frac{\bar{y} - \mu}{s / \sqrt{n}}$$

- Hipótesis a contrastar :

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

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

- Inferencia :

Si $t_{\text{calc.}} \leq t_{(0,95, n-1)}$, no se rechaza H_0 y se puede concluir que el método es exacto ($\mu = 100 \%$).

- Intervalo de Confianza para el 95 % de probabilidad ,
con $n - 1$ grados de libertad :

$$\text{I.C.}_{95\%} = \bar{x} \pm E$$

- Fórmulas :

Media Aritmética :

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

Desviación Estándar :

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Error Estándar Aproximado :

$$\text{E.S.} = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Error Máximo de Estimación
para el 95 % de probabilidad con
 $n - 1$ grados de libertad :

$$E = \text{E.S.} \cdot t_{(0.975, n-1)}$$

11.2. APENDICE II.

REPETIBILIDAD.

- Modelo Probabilístico :

$$x_i^2 \text{ calc.} = \frac{(n-1) S^2}{\sigma^2}$$

- Hipótesis a contrastar :

$$H_0 : \sigma \leq 2\%$$

$$H_1 : \sigma > 2\%$$

- Inferencia :

Si $x_i^2 \text{ calc.} \leq x_i^2 (0.95, n-1)$, no se rechaza H_0

y se puede concluir que el método es repetible ($\sigma \leq 2\%$).

- Intervalo de Confianza para el 95 % de probabilidad ,
con $n - 1$ grados de libertad :

$$\frac{(n - 1) S^2}{\chi^2_{(0.975, n-1)}} \leq \sigma^2 \leq \frac{(n - 1) S^2}{\chi^2_{(0.025, n-1)}}$$

- Fórmulas :

Varianza :

$$S^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

11.3. APENDICE III.

LINEARIDAD.

Inferencias acerca de la Ordenada al Origen (a).

- Modelo Probabilístico :

$$t_{\text{calc.}} = \frac{a - A_0}{S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\sum x)^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}}}$$

- Hipótesis a contrastar :

$$H_0 : a = A_0$$

$$H_1 : a \neq A_0$$

$$\text{Donde : } A_0 = 0$$

- Inferencia :

Si $t_{\text{calc.}} < t_{(0.95, n-2)}$, no se rechaza H_0 y se puede concluir que $a = 0$.

- Intervalo de Confianza para el 95 % de probabilidad , con $n - 2$ grados de libertad :

$$a \pm t_{(0.975, n-2)} S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{(n-1) S_x^2}}$$

Inferencias acerca de la Pendiente (b) .

- Modelo Probabilístico :

$$t_{\text{calc.}} = \frac{(b - B_0) S_x \sqrt{(n-1)}}{S_{y/x}}$$

- Hipótesis a contrastar :

$$H_0 : b = B_0$$

$$H_1 : b \neq B_0$$

$$\text{Donde : } B_0 = 1$$

- Inferencia :

Si $t_{\text{calc.}} < t_{(0.95, n-2)}$, no se rechaza H_0 y se puede concluir que $b = 1$.

- Intervalo de Confianza para el 95 % de probabilidad, con $n - 2$ grados de libertad :

$$b \pm t_{(0.975, n-2)} \frac{S_{y/x}}{S_x \sqrt{(n-1)}}$$

- Fórmulas :

$$\text{Recta de Regresión : } y = a + b x$$

Ordenada al Origen :

$$a = \frac{(\sum y) (\sum x^2) - (\sum x) (\sum xy)}{n (\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

Pendiente de la Recta :

$$b = \frac{n \sum xy - (\sum x) (\sum y)}{n (\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

Coefficiente de Correlación Muestral :

$$r = \frac{n \sum xy - (\sum x) (\sum y)}{\sqrt{(n \sum x^2 - (\sum x)^2) (n \sum y^2 - (\sum y)^2)}}$$

Error Estándar de Regresión :

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{(\sum y^2) - a \sum y - b \sum (xy)}{n - 2}}$$

11.4. APENDICE IV.

REPRODUCIBILIDAD.

- Modelo Matemático (2 Factores Aleatorios) :

$$Y_{jik} = \mu + A_j + D_i + AD_{ji} + E_{(j)k}$$

- Notación :

Y_{jik} = Porcentaje cuantificado con el j-ésimo analista en el i-ésimo día en la k-ésima repetición.

A_j = Efecto del j-ésimo analista en el % cuantificado.

D_i = Efecto del i-ésimo día en el % cuantificado.

AD_{ji} = Efecto debido a la interacción analista - día.

$E_{(j)k}$ = Error experimental.

- Inferencias :

A) Efecto por Analista .

$$\text{Si } F_{\text{calc. A}} \leq F_{(0.95)} \text{ con } \frac{\text{G.L.A.}}{\text{G.L.AD.}} = \frac{(j-1)}{(l-1)(j-1)}$$

No existe efecto por analista.

B) Efecto por Día .

$$\text{Si } F_{\text{calc. D}} \leq F_{(0.95)} \text{ con } \frac{\text{G.L.D.}}{\text{G.L.AD.}} = \frac{(l-1)}{(j-1)(l-1)}$$

No existe efecto por día.

C) Efecto por Interacción Analista - Día .

$$\text{Si } F_{\text{calc. AD}} \leq F_{(0.95)} \text{ con } \frac{\text{G.L.AD.}}{\text{G.L.E.}} = \frac{(j-1)(l-1)}{(j-1)(k-1)}$$

No existe efecto por interacción analista - día.

TABLA DE ANADEV A . - ANALISIS DE VARIANZA -

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Sumatoria de Cuadrados (S.C.)	Medta Cuadrada (M.C.)	F calculada
A_j	$(j-1)$	$\frac{\sum Y_j^2}{tk} - \frac{Y^2}{jtk}$	$\frac{SC_A}{(j-1)}$	$\frac{MC_A}{MC_{AD}}$
D_t	$(t-1)$	$\frac{\sum Y_t^2}{jk} - \frac{Y^2}{jtk}$	$\frac{SC_D}{(t-1)}$	$\frac{MC_D}{MC_{AD}}$
AD_{jt}	$(j-1)(t-1)$	$\frac{\sum Y_{jt}^2}{k} - \frac{\sum Y_j^2}{tk} - \frac{\sum Y_t^2}{jk} + \frac{Y^2}{jtk}$	$\frac{SC_{AD}}{(j-1)(t-1)}$	$\frac{MC_{AD}}{MC_E}$

TABLA DE ANADEVIA (Continuación).

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Sumatoria de Cuadrados (S.C.)	Media Cuadrada (M.C.)	F calculada
$E_{(j)k}$	$(j-1) (k-1)$	$\sum Y_{jik}^2 - \frac{\sum Y_{ji}^2}{k}$	$\frac{SCE}{j1 (k-1)}$	

ESTADIGRAFO DE CONTRASTE : F (DISTRIBUCION DE FISHER).