

9
28j

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



**COMPARACION DE DOS METODOS ANALITICOS PARA LA
DETERMINACION DE CLOROBUTANOL EN INYECTABLES**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
RAFAEL BARAJAS LOPEZ

México, D. F.

1988



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.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE GRAFICOS.....	vii
OTROS MATERIALES ILUSTRATIVOS.....	viii
RESUMEN.....	ix
 Capítulo	
I. OBJETIVOS.....	1
II. INTRODUCCION.....	2
<p>Importancia del conservador en una preparación farmacéutica. Clasificación de los errores en química analítica. Evaluación de precisión y exactitud. Comparación de dos procedimientos de análisis. Métodos utilizados para la determinación de clorobutanol. Selección de métodos para un estudio comparativo. Fundamento de la determinación de clorobutanol por el método de valoración argentométrico por retroceso. Fundamento de la técnica de cromatografía de gases. Principio de las mediciones en cromatografía de gases.</p>	
III. GENERALIDADES.....	35
<p>Descripción Farmacopeica. Estabilidad de clorobutanol. Farmacología.</p>	
IV. PARTE EXPERIMENTAL.....	53
<p>Procedimiento general para la determinación de clorobutanol por cromatografía de gases. Sistema de recuperación con muestra. Estudio de linealidad. Estudio de repetibilidad en el método cromatográfico. Procedimiento para la determinación de clorobutanol en soluciones inyectables oleosas por el método titulométrico.</p>	

Estudio de repetibilidad del método titulométrico.

V.	RESULTADOS.....	67
	Resultados del estudio de linealidad por el método cromatográfico. Resultados de estudio de recuperación por el método cromatográfico. Resultados de estudio de repetibilidad por el método cromatográfico. Resultados de estudio de repetibilidad por el método titulométrico. Estudio comparativo de métodos.	
VI.	CONCLUSIONES.....	90
	BIBLIOGRAFIA.....	92

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Por ciento de pérdida de clorobutanol debida al tapón.....	44
2. Influencia de la diferencia de composición de tapones en el porcentaje residual de la concentración de soluciones de clorobutanol envasadas en frascos viales después de su almacenamiento.....	45
3. Efecto del ciclo de esterilización por auto-clave en el contenido del conservador en soluciones en frasco vial con tapón de hule de diferente composición.....	46
4. Diluciones de clorobutanol para el estudio de recuperación.....	58
5. Diluciones de clorobutanol sustancia de referencia preparadas para el estudio de linealidad.....	63
6. Resultados del estudio de linealidad por el método cromatográfico.....	67
7. Análisis estadístico de regresión lineal de los resultados del estudio de linealidad usando clorobutanol sustancia de referencia.....	71
8. Resultados del estudio de recuperación de clorobutanol por el método de cromatografía de gases.....	72
9. Análisis estadístico de los resultados del estudio de recuperación de clorobutanol por cromatografía de gases aplicando el criterio de t de Student.....	75
10. Análisis estadístico de regresión lineal de los resultados del estudio de recuperación de clorobutanol por cromatografía de gases...	76
11. Comparación de análisis de regresión lineal	

	aplicado a los resultados obtenidos en los estudios de recuperación y linealidad en clorobutanol por el método de cromatografía de gases.....	76
12.	Resultados del estudio de repetibilidad para la determinación de clorobutanol por el método de cromatografía de gases.....	80
13.	Resultados del estudio de repetibilidad para la determinación de clorobutanol por el método titulométrico.....	81

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica	Página
1. Estudio de linealidad aplicado a los resultados obtenidos en el estudio de recuperación de clorobutanol por cromatografía de gases....	78
2. Estudio de linealidad usando clorobutanol sustancia de referencia.....	79

OTROS MATERIALES ILUSTRATIVOS

1.	Espectro de absorción infrarrojo de clorobutanol del Catálogo de espectrogramas infrarrojo del Sadtler Research Laboratories.....	85
2.	Espectro de absorción infrarrojo de clorobutanol sustancia de referencia U.S.P.....	86
3.	Espectro de absorción infrarrojo de muestra problema.....	87
4.	Cromatograma de clorobutanol sustancia de referencia U.S.P.....	88
5.	Cromatograma de clorobutanol en muestra problema.....	89

RESUMEN

El objetivo fundamental del presente trabajo, es comparar dos técnicas analíticas para la determinación de clorobutanol como conservador en preparaciones farmacéuticas inyectables de tipo oleoso.

La técnica analítica titulométrica para determinación de clorobutanol, es empleada como método de rutina para la determinación de este conservador en las preparaciones farmacéuticas que lo contienen. Dicho método consiste en la separación del clorobutanol de una preparación farmacéutica inyectable, mediante destilación por arrastre de vapor. El clorobutanol así obtenido se trata con un álcali y un exceso de solución 0.1 N de nitrato de plata, determinándose el clorobutanol por la cantidad de cloruro de plata formado, al titularse por retroceso con solución 0.1 N de tiocianato de amonio, el nitrato de plata residual, utilizando como indicador sulfato férrico amónico.

La técnica analítica de cromatografía de gases, es el método oficial propuesto por las principales farmacopeas internacionales para la determinación de clorobutanol en preparaciones farmacéuticas inyectables. Sin embargo este método sólo puede ser empleado en aquellas preparaciones farmacéuticas cuyo vehículo es acuoso. El método cromatográfico presentado en este estudio, permite la determinación de clorobutanol en pre

paraciones farmacéuticas inyectables de tipo oleoso.

El propósito de la comparación de las dos técnicas analíticas anteriores, está en seleccionar la más apropiada en cuanto a sus características de ejecución y la que resulte más favorable para resolver un problema particular.

Este trabajo propone reemplazar al método titulométrico, empleado como método rutinario de análisis en la determinación de clorobutanol, por un método de cromatografía de gases; considerado más ventajoso respecto al método anterior, por ser más rápido y porque proporciona por lo menos, según se estima, resultados tan precisos y exactos como los del método titulométrico.

El procedimiento empleado para la comparación de estos dos métodos de análisis fueron los siguientes:

- 1) Estudio de linealidad de respuesta del método cromatográfico en la determinación de clorobutanol.
- 2) Estudio de reproductibilidad del método cromatográfico en la determinación de clorobutanol, en una preparación farmacéutica de tipo oleoso.
- 3) Estudio de recuperación con muestra, empleando la técnica de adición de estándar o sustancia patrón, por el método cromatográfico. A los resultados del estudio de recuperación obtenidos, se les aplicó una prueba de hipótesis para demostrar si los resultados obtenidos no difieren de una recuperación cuantitativa. Esto se logró mediante la aplicación de la prueba t de Student.

- 4) Estudio de renetibilidad del método titulométrico en la determinación de clorobutanol, en una preparación farmacéutica de tipo oleoso.
- 5) Con los resultados obtenidos descritos en los puntos 2 y 4 se investigó:
 - a) Si las diferencias obtenidas entre los datos encontrados por los dos métodos de análisis son estadísticamente significativas o no, mediante la aplicación de la Prueba estadística t de Student.
 - b) Se calculó la desviación estándar en los datos obtenidos por los dos métodos de análisis y se les aplicó la prueba estadística F para comparar la precisión de dos series de medidas y comprobar si existe una diferencia significativa entre las varianzas obtenidas de los datos provenientes de los dos métodos de análisis.

Los resultados obtenidos del procedimiento de comparación de los dos métodos de análisis descritos anteriormente, muestran que:

- 1) El estudio de linealidad de respuesta del método cromatográfico en la determinación de clorobutanol, proporciona una respuesta lineal en el intervalo de concentraciones de 0.3 a 0.7 mg/ml.
- 2) El estudio de recuperación con muestra por la técnica de adición de estándar por el método cromatográfico, indica una recuperación cuantitativa en el intervalo de concentraciones de 0.50 a 0.75 mg/ml.

- 3) La aplicación de la prueba t de Student a los resultados obtenidos por los dos métodos de análisis, demuestran que no se observa una diferencia estadísticamente significativa entre ellos y que los datos pueden considerarse procedentes de una misma población estadística.
- 4) La aplicación de la prueba de F a los resultados obtenidos por los dos métodos de análisis demuestran que existe una diferencia significativa entre las varianzas obtenidas de los datos provenientes de los dos métodos de análisis y que por lo tanto la precisión de los dos métodos de análisis no son idénticos; encontrándose una desviación estándar mayor para el método titulométrico respecto al método cromatográfico.

Por todo lo anterior y como conclusión final, se sugiere que el método de cromatografía de gases puede emplearse como método rutinario de análisis en la determinación de clorobutanol en preparaciones farmacéuticas inyectables de tipo oleoso, en lugar del método titulométrico.

CAPITULO I

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es comparar dos técnicas analíticas para la determinación de clorobutanol en preparaciones farmacéuticas inyectables de tipo oleoso.

Estas técnicas son:

- 1.- Determinación de clorobutanol por procedimiento titulométrico previa destilación por arrastre de vapor, utilizado como procedimiento rutinario de análisis para el control de calidad en los productos farmacéuticos que lo contienen.
- 2.- Determinación de clorobutanol por la técnica analítica de cromatografía de gases con el propósito de reducir tiempos de análisis y obtención de resultados con precisión y exactitud adecuados.

CAPITULO II

INTRODUCCION

La importancia de la adecuada preservación microbiológica de las preparaciones farmacéuticas, consiste evidentemente en eliminar las complicaciones clínicas por contaminación microbiológica de productos inyectables, tópicos y orales que puedan ser ocasionados por su administración.

El crecimiento microbiológico, además de representar un peligro para la salud en el usuario, puede producir marcados efectos sobre la estabilidad del producto.

Las fuentes de contaminación que pueden afectar la preservación adecuada de un medicamento son numerosas, entre ellas están: las materias primas, los contenedores, el equipo y ambiente de manufactura, los operadores, los materiales de empaque y el inadecuado manejo y/o administración por parte del usuario. Las características ideales para la selección de un agente antimicrobiano destinado para una preparación farmacéutica son:

- 1) Efectividad bacteriostática contra un amplio espectro de microorganismos.
- 2) Estabilidad física, química y microbiológica durante el tiempo de caducidad del medicamento.
- 3) Atóxico, no sensibilizante, suficientemente soluble y compatible química y físicamente con los componentes de la for -

mulación y de sabor y olor aceptables a la concentración empleada.

Ningún agente bacteriostático reúne todas estas características, sino que la elección del agente antimicrobiano más adecuado para cada preparación particular se obtiene partiendo de una base individual, complementada por información publicada y por estudios experimentales efectuados por laboratorios farmacéuticos.

Debido a la toxicidad potencial de los agentes antimicrobianos empleados como conservadores, debe tenerse cuidado en la concentración empleada en la formulación del medicamento.

Esto es particularmente importante en las preparaciones que se administran parenteralmente en volúmenes mayores de 5 ml. La Farmacopea de los Estados Unidos, edición vigésima, (1), especifica un límite máximo para ciertos conservadores. Por ejemplo, para compuestos catiónicos tensoactivos, como el cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, miristil-gamma-picolino y compuestos que contienen mercurio, tales como nitrato fenilmercurio y etilmercuriotiosalicilato de sodio, el límite es de 0.1%; para fenol, cresol y clorobutanol el límite es de 0.5%. No se sugieren límites máximos para parabenos y alcohol benílico, el metil y propil parabeno se usan frecuentemente combinados a una concentración de 0.18% y 0.02% respectivamente.

Aunque los informes sobre agentes antimicrobianos son numerosos en la literatura, es difícil evaluar el compromiso requerido entre su actividad como antimicrobiano y la estabilidad del producto en el que se encuentra incorporado.

L. Lachman (2), menciona la dependencia del pH de algunos conservadores para su actividad eficaz, así como su inestabilidad química y su interacción física y química, con los componentes de empaque del producto.

El clorobutanol es compatible con un gran número de sustancias químicas y farmacéuticas, por lo que se usa ampliamente como agente bacteriostático en soluciones parenterales. En la literatura (5), se encuentra que el clorobutanol en una solución acuosa saturada (al 0.8%) puede considerarse como un agente bacteriostático completo, con un coeficiente de fenol de 1.2, así mismo se reporta que a una concentración de 0.5% ejerce actividad bacteriostática contra microorganismos no esporulados, específicamente *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus mesentericus* y *Bacillus megatherium*.

Por otra parte, Briggs y Jallow (3), mencionan que el clorobutanol al 0.5% es bacteriostático para las formas no esporuladas; Taub y Luckey (4), reportan que el clorobutanol a una concentración de 0.8% es bacteriostática para *Staphylococcus typhosa*.

Clasificación de los errores en química analítica (6), (18).

El propósito principal de una metodología analítica, debe centrarse en proporcionar información suficiente acerca de la composición de muestras específicas, al resolver un problema particular.

Cuando se considera el criterio de acuerdo con el cual un procedimiento analítico será seleccionado, la precisión y la exactitud

titud son usualmente los primeros parámetros que se evalúan. El término error, E, puede definirse como la diferencia entre el valor observado o medido, O, y el valor verdadero (más probable), T. O sea,

$$E = O - T$$

Es evidente que el error de una medición no puede establecerse si el valor verdadero de la cantidad, es desconocido; y puesto que el valor verdadero se establece por medición, parece imposible encontrar el error asociado con alguna medición, esto es verdad en el sentido estricto del término. Sin embargo esto no es insuperable, como se describe a continuación.

El error de una medición, E, es una medida de la exactitud de la medición. Los errores no se expresan comúnmente en valores absolutos (como en la fórmula anterior), sino en valores relativos, p. ej. con respecto al valor verdadero, T, porque el valor E sin considerar al valor T carece de importancia práctica. Por lo tanto el valor que interesa es E/T. Esta es la expresión para el error relativo. Es conveniente expresar el error relativo en términos de porcentaje, $(E/T) \times 100$, o en partes por mil, $(E/T) \times 1000$. La exactitud de una medición se mide por su error relativo.

En los casos en los que el valor verdadero de una cantidad no se conoce con cierto grado de exactitud, es necesario expresar la exactitud de una medición de alguna manera que no considere el conocimiento del error. Esto puede lograrse obteniendo la media aritmética de un número de mediciones y encontrando la diferencia entre el valor de una medida dada y el valor

promedio. Esta diferencia puede llamarse, desviación de un valor medido particular:

$$D = O - M$$

Donde D = Desviación absoluta

O = Valor de la medición

M = Media aritmética de las mediciones

La magnitud de las desviaciones de una serie de mediciones es una medida de la precisión de la medición. Para que tenga un sentido práctico, el valor de las desviaciones puede expresarse de manera relativa con respecto a M.

La precisión de una observación individual es entonces $(D/M) \times 100$, expresada en porcentaje, o $(D/M) \times 1000$, en partes por mil.

Es evidente, que la exactitud expresa la certeza de una medición, y la precisión la reproducibilidad de la medición. La exactitud sin la precisión es obviamente imposible, pero la precisión de ninguna forma significa exactitud.

En los procedimientos de análisis químicos se pueden encontrar varios tipos de errores, los cuales pueden clasificarse en las siguientes categorías:

Errores determinados. Los errores determinados son los que pueden ser evitados o corregidos después de determinarse su magnitud. Las fuentes de error determinados más comunes son:

- a) Los errores causados por el equipo utilizado incluyen el uso de aparatos sin calibrar, construcción defectuosa de la balanza de medición y contaminación de las disoluciones por

- el ataque químico de los recipientes que los contienen.
- b) Los errores debido a los reactivos químicos derivan de que los reactivos pueden contener impurezas que interfieren con el método de análisis.
 - c) Los errores personales debido a la falta de habilidad del analista para distinguir o juzgar observaciones con certeza.
 - d) Los errores proporcionales tienen su origen en la inexperiencia o falta de habilidad del analista.
 - e) Los errores del método son inherentes a las propiedades físicas y/o químicas del sistema objeto de análisis. Estos errores son importantes porque su magnitud y signo son constantes cuando se verifican análisis repetidos en condiciones análogas. Pueden ponerse de manifiesto modificando las condiciones de trabajo o realizando el análisis por otro método completamente diferente.

Errores constantes. Son los que se manifiestan cuando en el análisis de muestras repetidas aparece un error del mismo signo y magnitud, y este error no puede ponerse de manifiesto en forma de falta de precisión; estos errores son difíciles de descubrir y pueden incluso pasar inadvertidos.

Errores sistemáticos. Estos errores pueden atribuirse a errores determinados variables, pueden diferir no sólo en magnitud, sino también en signo al variar las condiciones. En algunos casos puede conocerse la ley de variación y con ello aplicar correcciones.

Errores indeterminados. Son pequeñas variaciones, cuyas causas, magnitud y signo no pueden predecirse ni calcularse. Estos errores siguen la ley de probabilidad y constituyen errores fortuitos (al azar).

Evaluación de precisión y exactitud. Comparación de dos procedimientos de análisis. (6).

Una de las formas más simples de optimizar un problema analítico en particular consiste en comparar distintos métodos de análisis de acuerdo con sus características de ejecución y seleccionar el que reúna las más favorables.

En ocasiones se pretende reemplazar un método de análisis de aplicación rutinaria por otro procedimiento más barato o más rápido, o en general por un procedimiento de características más deseables. Cada análisis tiene una variabilidad proveniente de las pequeñas e inevitables variaciones usuales de manipulación, medio ambiente y medida.

La definición de precisión dada por Analytical Chemistry (7), se refiere a la reproducibilidad de una medida dentro de un conjunto de mediciones, esto es, a la dispersión de un conjunto de valores alrededor de un valor central. El término conjunto se refiere a un número (n) de réplicas de medidas independientes de alguna propiedad.

Otra definición propuesta es la de "Organization for Standardization" (8), que indica:

Reproducibilidad. Es la concordancia aproximada entre resultados obtenidos por el mismo método o con materiales de prueba idénticos pero bajo condiciones diferentes (diferente

operador, diferente aparato, diferente laboratorio y/o tiempo diferente).

Repetibilidad. Es la concordancia aproximada entre resultados sucesivos obtenidos con el mismo método o materiales idénticos y bajo las mismas condiciones (mismo operador, mismo aparato, mismo laboratorio y mismo tiempo).

Analytical Chemistry propone como medidas de precisión los siguientes parámetros estadísticos:

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

Donde:

x_i = Medida independiente

\bar{x} = Promedio

n = Número de mediciones

La desviación estándar tiene las mismas unidades que la propiedad a medir. Llega a ser la expresión más formal de la precisión cuando el valor de n es mayor. Cuando las medidas son independientes y se distribuyen normalmente, los parámetros estadísticos más usuales son la media para el valor central, y la desviación estándar para la dispersión de datos.

La varianza, S^2 , es el cuadrado de la desviación estándar.

La desviación estándar relativa es la desviación estándar expresada como una fracción de la media, S/\bar{x} . Se multiplica algunas veces por cien y se expresa como un porcentaje.

La desviación estándar relativa para un método de análisis que se emplea ampliamente, no debe ser mayor de 2%.

Otras dos cantidades, que no son siempre recomendables como medidas de precisión, excepto cuando el conjunto consiste de unas pocas mediciones son:

La desviación media (o promedio), dado por:

$$D.M. = \sqrt{\frac{(X_i - \bar{X})^2}{n}}$$

y el Rango, dado por la diferencia de magnitud entre el resultado mayor y menor en un conjunto de mediciones.

Otra medida de precisión de la media es el Error Estándar y se define por:

$$E = S / \sqrt{n}$$

Este valor no es de interés para evaluar la precisión de un procedimiento; pero sí como una medida de la confianza en un resultado obtenido.

Respecto a la definición de exactitud, cuando se efectúan ieterminaciones analíticas se obtienen diferentes resultados, X_1 . Un resultado puede diferir del valor verdadero, μ , el cual se desconoce y, en la terminología estadística, esta diferencia se refiere al error:

$$e_1 = X_1 - \mu.$$

Si se efectúan suficientes mediciones, se obtiene una media constante \bar{X} , donde \bar{X} es un estimador de la media μ , de un número de determinaciones ilimitado. La diferencia absoluta entre μ representado por \bar{X} y el valor verdadero, μ , es una medida de la exactitud del procedimiento, es decir, que la diferencia entre el resultado obtenido por el método y el resul

tado real o verdadero es una medida de exactitud. La manera más sencilla de obtener alguna estimación de la exactitud del método, es usándolo para analizar un estándar o material de referencia para el cual la concentración del analito es conocida con alta precisión y exactitud. La diferencia entre el valor conocido verdadero y la media de réplica se determina con el método de prueba, se debe a la suma de errores sistemáticos y aleatorios. Es por lo tanto necesario estimar la importancia relativa de cada tipo de error y la estrategia usada para este propósito es investigar si la desviación puede explicarse debido a errores aleatorios solamente, en cuyo caso se efectúa una Prueba t de Student. Si el resultado es que las desviaciones pueden atribuirse a errores aleatorios, se considera que el método es exacto. De lo contrario se considera que la desviación es una medida del error sistemático. Este procedimiento de investigación de la exactitud tiene la desventaja de que el resultado sea válido sólo para el material de referencia. Frecuentemente no se dispone de un material estándar de concentración conocida. En ese caso se compara el Método a Investigar o "Método de Prueba" con el método existente llamado "Método de Referencia", el cual se presume que no involucra errores sistemáticos. Esta suposición se debe a que este método para dicha determinación se toma frecuentemente de la literatura como "Método de Referencia". Una vez que se cuenta con un "Método de Referencia" exacto, los métodos de referencia y de prueba se aplican para efectuar

un número de determinaciones en el material a analizar.

Los resultados obtenidos pueden utilizarse de varias maneras:

(1) Aplicar un cálculo de regresión lineal a los datos obtenidos por los métodos de prueba y de referencia, el coeficiente de correlación (r), deberá idealmente ser igual a la unidad; sin embargo el coeficiente de correlación servirá como un indicador preliminar de la exactitud del método y no como un criterio definitivo.

(2) Investigar si las diferencias obtenidas entre los datos de los métodos son estadísticamente significativas o no. Esto se logra mediante la aplicación de la Prueba t de Student.

(3) El cálculo de la desviación estándar para el análisis de réplicas de determinaciones de muestras por dos métodos diferentes utilizando la Prueba estadística F .

La Prueba estadística F se utiliza para comparar la precisión de dos series de medidas y comprobar si existe una diferencia significativa entre las varianzas obtenidos de los datos provenientes de dos métodos o sistemas de análisis.

(4) La aplicación de la técnica de experimentos de recuperación (técnica de adición de substancia patrón) y técnica de "Spiking/Placebo".

En el método de recuperación, "Spiking/Placebo", el ingrediente activo puro se adiciona en una cantidad conocida a una mezcla de excipientes del producto (placebo), teniendo cuidado de no incluir excipientes que tengan una actividad semejante a la del fármaco, y la mezcla resultante se analiza y compara con los resultados esperados.

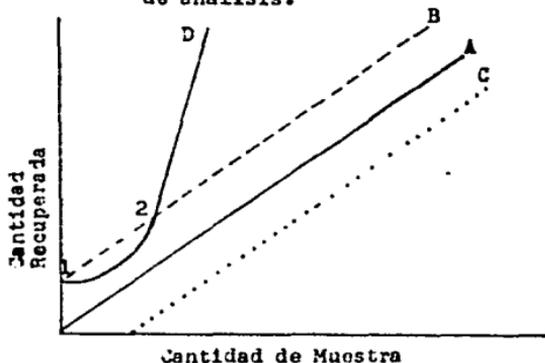
En el método de adición de substancia patrón, se analiza una

mezcla que consiste en el ingrediente activo y los excipientes que componen el producto a la cual se le añade una cantidad adicional conocida de sustancia patrón. La diferencia entre la muestra así preparada y los resultados esperados es una medida de la cantidad de sustancia patrón recuperada por el análisis. En ambos métodos, la recuperación se define como la relación de la cantidad de sustancia patrón obtenida en el análisis a la cantidad de sustancia patrón adicionada. La exactitud de un método puede medirse a lo largo de un intervalo de concentraciones posibles. Esto significa que la exactitud está determinada a través de un intervalo que puede extenderse desde un 80% hasta un 120% del valor esperado de concentración de la sustancia que se analiza. Se emplean procedimientos estadísticos para comprobar la linealidad del método. Esta se define como la variación en la cantidad del fármaco recuperada por el análisis como una función de la cantidad original del fármaco en la muestra. Cualquier desviación de la linealidad indica que el método no es apropiado para la muestra problema a esa concentración del fármaco. En tales casos deberán realizarse algunas modificaciones y revalidar el método en cuestión o cambiarlo por otro.

La Figura No. 1 ilustra algunos resultados experimentales posibles. En esta figura, la línea A representa una situación ideal, en la cual el método es lineal y tiene una ordenada al origen igual a cero. La línea B muestra la misma situación, pero con el estudio de recuperación con placebo. En este caso la ordenada al origen debe corresponder a la cantidad añadida

de sustancia patrón.

Figura No.1 Resultados experimentales posibles en el estudio de linealidad de un método de análisis.



La línea C muestra que un método puede presentar linealidad pero no ser adecuado para análisis a concentraciones muy bajas. La línea D es un ejemplo típico de un modelo no lineal. Si se efectúa la recuperación solamente en un punto (punto 1 o punto 2), el método puede parecer satisfactorio, el problema se hace evidente sólo cuando el laboratorio de prueba utiliza el método en muestras a otras concentraciones. Los resultados de estos análisis serán incorrectos debido a que el método no es exacto para todas las concentraciones.

Para considerar un método adecuado para uso de rutina por un laboratorio de análisis, debe diseñarse por evaluación estadística a un nivel de confianza del 95%.

Los métodos de análisis para fármacos puros pueden evaluarse examinando la linealidad del procedimiento utilizando una sustancia patrón. Si no se dispone de una sustancia patrón,

el método puede comprobarse comparando los resultados obtenidos por éste método contra los obtenidos por otro. El método alterno debe emplear una técnica analítica diferente de la que haya sido validada, (9).

Métodos utilizados para la determinación de clorobutanol

Existe una amplia variedad de métodos analíticos para la determinación de clorobutanol. Algunos métodos de valoración se basan en la determinación de algún grupo funcional y otros se fundamentan en la composición íntegra de la molécula de clorobutanol. Entre los métodos químicos más conocidos destacan los siguientes:

Métodos titulométricos. Los métodos de valoración titulométricos son los más sencillos y que implican el uso de material y equipo accesible a la mayoría de los laboratorios de control analítico. Estos métodos consisten en la destilación por arrastre de vapor del clorobutanol en las preparaciones farmacéuticas, seguido de descomposición del clorobutanol por calentamiento con álcali y titulación del residuo alcalino por retroceso, o bien una vez separado el clorobutanol de la preparación farmacéutica; éste puede ser determinado titulométricamente de diferentes maneras:

a) Método iodométrico (10), (11). Este método se basa en la determinación de acetona proveniente de la descomposición de clorobutanol en medio fuertemente alcalino por un método iodométrico.

b) Valoración argentométrica (12). Por este método al cloro

butanol recién destilado, se adiciona álcali y un exceso de solución 0.1 N de nitrato de plata. El clorobutanol se determina indirectamente por la cantidad de cloruro de plata formado, al titularse por retroceso con solución 0.1 N de tiocianato de amonio, el nitrato de plata residual, utilizando como indicador una solución de sulfato férrico amónico.

Esta técnica analítica para determinación de clorobutanol se emplea como método analítico rutinario para la determinación de este conservador en las preparaciones farmacéuticas que lo contienen.

c) Titulación amperométrica. (10). Este método consiste en el tratamiento alcalino de las preparaciones farmacéuticas que contienen clorobutanol y la determinación argentométrica del ion cloruro por un procedimiento amperométrico. En este método se utiliza un electrodo de plata como electrodo indicador. A continuación a otra muestra igual pero sin tratamiento alcalino se le determina el cloro de la misma manera. La diferencia en el contenido de cloro de las dos determinaciones corresponde a la concentración de cloro proveniente del clorobutanol en la preparación farmacéutica y elimina cualquier otra fuente de ion cloruro externa. La concentración de clorobutanol en la formulación se determina así indirectamente, calculándose del contenido de cloro encontrado y utilizando un factor gravimétrico conveniente.

Métodos colorimétricos para la determinación de clorobutanol.

Otras técnicas para la determinación de clorobutanol se basan en los métodos colorimétricos, los más conocidos son:

a) Formación del derivado del ácido hidroxámico del clorobutanol. (13), (14).

Este método permite la determinación rápida del clorobutanol como materia prima y como conservador en preparaciones farmacéuticas parenterales. Se fundamenta en la formación del ácido hidroxámico del clorobutanol producto de la reacción entre el clorobutanol con la hidroxilamina en solución alcalina. El producto forma un complejo colorido al hacerse reaccionar con el ion férrico; la intensidad del color obedece la ley de Lambert-Beer en el rango de 0.1 a 0.8 mg de clorobutanol por mililitro de muestra en solución.

El espectro de absorción del complejo colorido formado entre el ion férrico y el ácido hidroxámico en solución ácida se caracteriza por un máximo a 500 nm.

Las interferencias detectables por este método incluyen compuestos tales como ésteres, imidas, cloruros de ácidos, anhídridos de ácidos, los cuales forman hidroxamatos. La presencia de aniones tales como tartratos o citratos que complejan al ion férrico, o de sales tales como fosfatos y ftalatos - los cuales forman precipitados con éste mismo, también interfieren con el método.

Método de ensayo turbidimétrico. (15), (16).

Este método microbiológico de valoración de clorobutanol presenta grandes ventajas sobre otros métodos indirectos de determinación del mismo, cuando se emplea como conservador en preparaciones farmacéuticas.

Este método ofrece un alto grado de especificidad puesto que

determina exclusivamente al conservador y los resultados no se encuentran afectados por los productos de degradación del mismo. El método consiste en la adición de cantidades crecientes de clorobutanol sustancia patrón, a una serie de tubos de ensayo que contienen caldo nutritivo inoculado con *Escherichia coli*. Después de una incubación de 3.5 horas se mide la turbidez de cada tubo a una longitud de onda de 530 nm por medio de un colorímetro fotoeléctrico provisto de un filtro de color apropiado. La concentración de clorobutanol en la muestra se establece por comparación de la respuesta del microorganismo de prueba en la muestra por analizar con la observada en la serie de patrones de referencia de clorobutanol tratados de la misma manera. Debido a la rapidez de la prueba y a que las técnicas de esterilidad no necesitan ser estrictamente observadas, este método resulta ser apropiado para la valoración del clorobutanol en preparaciones farmacéuticas en el intervalo de concentración de 0.05% a 0.5%.

Análisis de clorobutanol por Cromatografía Líquida Alta Presión. (16).

La técnica de cromatografía líquida desarrollada para la determinación de clorobutanol tiene como principio la separación cromatográfica por fase inversa del clorobutanol presente en preparaciones inyectables oleosas y acuosas. En esta técnica analítica se utiliza una columna de octadecilsilano de 25 cm. de longitud, 4.0 mm. de diámetro interno y 10 micrones de tamaño de partículas.

El detector empleado es una lámpara ultravioleta y la región

de detección para el clorobutanol es de 210 nm.

La fase móvil empleada es una mezcla de metanol-agua (1:1).

Se recomienda una velocidad de flujo de 1.8 ml/min.

Este sistema cromatográfico permite la elución del clorobutanol a los 6 minutos.

La muestra se extrae previamente en un sistema de hexano-metanol (75:25), recobrándose el clorobutanol en la fase metanólica y finalmente el extracto se lleva a una concentración de 0.38 mg/ml.

El intervalo de respuesta lineal para el clorobutanol por cromatografía de líquidos se extiende en el intervalo de concentración de 0.28 a 0.48 mg/ml.

Análisis de clorobutanol por Cromatografía de Gases.

En la literatura (17), para la implementación de este procedimiento de análisis, se utilizaron inicialmente varias columnas de cromatografía para lograr una adecuada resolución del clorobutanol, las cuales se eligieron tomando en cuenta las características del clorobutanol el cual es un compuesto altamente polar por sus grupos funcionales hidróxilo y cloruro. Se utilizó un detector de ionización de flama y como soporte de las columnas de cromatografía se empleó Cromosorb W silanizado de tamaño de malla 70-80, las velocidades de flujo de los gases helio, hidrógeno y aire fueron de 60, 60 y 300 ml/min., respectivamente.

Para la determinación de clorobutanol en preparaciones farmacéuticas se utilizaron diferentes tipos de solventes: agua, petrolato y propilenglicol. La fase estacionaria de la columna

cromatográfica fue diisodecil ftalato y la fase líquida fue propilenglicol.

Los resultados indican la recuperación cuantitativa del clorobutanol en el intervalo de concentraciones que se extiende de 0.15 a 1.50% en los tres sistemas de solventes.

Además del benzaldehído, los estándares internos propuestos fueron el alcanfor, mentol y ciclohexanol.

Cabe mencionar que esta técnica analítica permite la separación del clorobutanol de sus productos de degradación primarios, cloroformo y acetona.

Es conveniente destacar que el uso de benzaldehído como estándar interno en el método cromatográfico presenta serios problemas de estabilidad, debido a su fácil oxidación a ácido benzoico por exposición a la luz o algunas sustancias presentes en el vehículo de la muestra por analizar que pudieran oxidarlo. Experimentalmente se ha encontrado que al determinarse el clorobutanol en preparaciones farmacéuticas por cromatografía de gases, en donde se utiliza benzaldehído como estándar interno, se observan resultados más altos que los esperados, los cuales se incrementan a medida que transcurre el tiempo entre la preparación de la muestra y su determinación. La evidencia indica que el benzaldehído puede reaccionar lentamente con el vehículo de la preparación farmacéutica o efectuarse una oxidación del mismo, y la variación de la concentración del estándar interno, provoca irreproducibilidad de resultados.

Selección de métodos para un estudio comparativo.

Los métodos considerados para efectuar el estudio comparativo de determinación de clorobutanol en soluciones inyectables de tipo oleoso para este trabajo son: a) El método de valoración argentométrico por retroceso y b) El método de determinación de clorobutanol por cromatografía de gases. Estos dos métodos fueron seleccionados como se explicó anteriormente debido a que cuando se pretende implementar un nuevo método de análisis químico, en este caso el método cromatográfico, se debe demostrar que el nuevo método es exacto y está exento de errores sistemáticos; esto puede demostrarse comparando los resultados obtenidos por éste método contra los obtenidos por otro método alterno aplicado al mismo problema. El método alterno debe emplear una técnica analítica diferente, validada.

En este trabajo se seleccionó el método de análisis titulométrico como "Método de Referencia" por ser un procedimiento de análisis validado y empleado como método de análisis rutinario para la determinación de clorobutanol para el control de calidad de los productos farmacéuticos que lo contienen.

Fundamento de la determinación de clorobutanol por el método de valoración argentométrico por retroceso. (18).

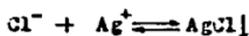
La determinación argentométrica se fundamenta en el método de Volhard para la determinación de plata en presencia de ácido nítrico concentrado, con solución valorada de tiosulfato de potasio o de amonio 0.1 N, utilizando como indicador

una disolución de nitrato férrico amónico.

El método original de Volhard demostró ser de gran valor no sólo para la determinación de plata, sino también en numerosos análisis indirectos como en la determinación de halógenos.

La plata puede determinarse con una alta precisión en medio ácido con solución 0.1 N de tiocianato de potasio o de amonio como precipitante; el tiocianato de plata es una sal escasamente soluble, posee un producto de solubilidad de 10^{-12} . Un exceso de solución de tiocianato puede detectarse instantáneamente con una sal férrica; ésta última forma complejos rojos intensamente coloridos de tiocianato férrico, en medio ácido.

En la determinación de cloruro de acuerdo al método anterior, se presenta una dificultad en la titulación por retroceso del exceso de plata:

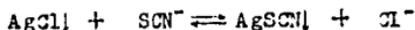


Se tiene ahí dos sales escasamente solubles AgCl y AgSCN , en equilibrio con la solución. Así se tiene la siguiente relación:

$$\frac{[\text{Cl}^-]}{[\text{SCN}^-]} = \frac{(K_{ps})_{\text{AgCl}}}{(K_{ps})_{\text{AgSCN}}} \quad 10^{-2.3}$$

Después de que se ha titulado todo el exceso de plata por retroceso, un exceso de tiocianato puede reaccionar con el AgCl , puesto que el tiocianato de plata es menos soluble -

que el AgCl:



El equilibrio se establece cuando $[\text{Cl}^-] / [\text{SCN}^-]$ ha sido igual a $10^{2.3}$, después que prácticamente todo el exceso de tiocianato ha reaccionado; el punto final por lo tanto no se detecta con precisión.

La reacción entre el AgCl y un exceso de tiocianato es relativamente lenta, se recomienda que la suspensión acuosa se cubra con una capa de nitrobenzono, ligroína o algún otro solvente orgánico inmiscible con el agua, el cloruro de plata se colora en la interfase agua-solvente orgánico y así se separa de la acción del tiocianato; se logran resultados excelentes si se añade aproximadamente 1 ml de nitrobenzono en la suspensión acuosa antes de titular por retroceso el exceso de plata; de esta manera se logra un punto final nítido y permanente.

Fundamento de la técnica de cromatografía de gases. (19).

El fundamento de esta técnica analítica es la separación física de dos o más componentes, basada en la diferente distribución de los gases, una de las cuales es la fase estacionaria y la otra móvil. Cuando se utiliza un gas como fase móvil, la técnica se llama cromatografía de gases.

En la cromatografía gas-líquido, la fase estacionaria es un líquido y el proceso de separación se llama partición; en la cromatografía gas-sólido, una superficie sólida es la fase estacionaria y el proceso de separación es de adsorción.

En esta técnica analítica el proceso que se lleva a cabo es el siguiente; la fase móvil o gas acarreador bajo presión mueve una muestra en forma de vapor del puerto de inyección a través de la fase estacionaria (columna) donde se efectúa la separación de dos o más componentes que constituyen la muestra; cada componente se desplaza por la columna a velocidades determinadas por sus afinidades con ella; luego cada componente pasa al detector donde su combustión en una flama de hidrógeno produce iones. Un potencial DC (corriente continua) aplicado entre el colector y la trampa del jet, que constituyen el detector, genera una corriente eléctrica que después se convierte en voltaje, se amplifica y aparece en el graficador como un pico.

Principio de las mediciones en cromatografía de gases. (19).

En cromatografía la mayor parte de los análisis se realizan con el fin de determinar la concentración o la cantidad de materia del, o los componentes presentes en la muestra. Puesto que el cromatógrafo no presenta los resultados en forma numérica, excepto el caso de los integradores electrónicos digitales, sino como variaciones de voltaje de salida en función del tiempo, es necesario transformar dichas variaciones en un número y luego convertirlo a la información deseada. La manera de conversión del pico obtenido en el cromatograma en un dato numérico, puede lograrse de diversas maneras:

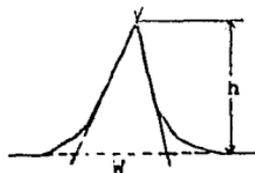
a) Midiendo la altura del pico. Lo más fácil es medir la máxima distancia a la cual el pico sale de la línea base. Las

ventajas son velocidad y facilidad; sin embargo está sujeto a muchas fuentes de error, entre las que se cuentan las diferencias de operador a operador en la técnica de inyección, las condiciones de operación del sistema cromatográfico como temperatura y las velocidades de flujo de los gases, que deben mantenerse constantes etc.

b) Midiendo el área del pico. Este método de medición se prefiere al método de medición de altura del pico, por ser más reproducible ya que el área del pico obtenido no depende de su forma y por lo tanto no se ve afectado por las condiciones de variación del método anterior.

Se han desarrollado una gran variedad de métodos: Manuales, mecánicos y electrónicos.

Métodos manuales. Varios de los métodos manuales dependen de la construcción de un triángulo de la misma área que el pico. El triángulo se construye por medio de rectas tangentes a los lados del pico y extrapolando la línea base debajo del pico.

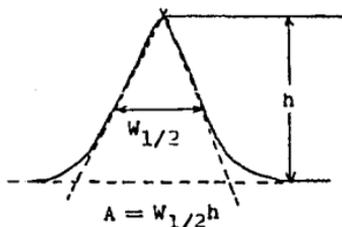


$$A = 1/2 Wh$$

Sin embargo esta metodología es sumamente subjetiva en cuanto a la apreciación de las líneas tangenciales que deben trazarse.

se, con lo que el área del triángulo es una buena aproximación del área del pico. Hay una área en la cima la cual no debería ser incluida, y dos pequeñas áreas a los lados que deberían incluirse. Siendo muy optimistas puede pensarse que los errores se cancelan.

Una variación de la metodología anterior consiste en usar la altura y el ancho a la media altura, lo que evita el problema del dibujo real del triángulo (ya que elimina el factor de juicio), pero siempre sobreestima el área pues el triángulo esta completamente dentro del pico real.



Estos dos métodos muestran un problema común. El pico ideal, para el cromatografista, es alto y estrecho. La altura puede medirse con bastante exactitud, pero la medida del ancho por el contrario puede tener un error grande. El ancho de la línea de tinta es también un factor a considerar.

Otro método que se encuentra en ocasiones es el de las figuras de papel, el cual consiste en cortar con unas tijeras el pico y luego pesarlo. Los problemas, además del de destruir el registro, se deben más que nada al papel. La densidad del

papel no es uniforme, como se asume, y es además higroscópico por lo que los factores de respuesta variarían con la humedad, situación ésta que no es recomendable; por otra parte es laborioso cuando se hacen muchos análisis.

Métodos mecánicos. a) El planímetro es un dispositivo que consta de una cabeza trazadora, la cual se mueve desde algún punto de partida arbitrario alrededor de todo el pico y regresa al punto de partida; la cabeza del integrador con un trazador en la parte inferior, un contador en la superior y un peso fijo o punto de partida. Se anota la lectura del contador, se traza la curva, y se vuelve a anotar la lectura. La diferencia entre estas medidas es el área del pico. Los precios de estos planímetros son bajos, lo que los hace atractivos; pero principalmente proporcionan satisfactoria exactitud de medida a pesar de la forma del pico.

b) El integrador de disco es un dispositivo mecánico acoplado directamente al mecanismo de la pluma del registrador; tiene su plumilla independiente y dibuja un trazo fino a lo largo del papel del registrador. La unión es tal que la distancia total desplazada por la plumilla del integrador es proporcional al área del pico del trazo principal que causo el desplazamiento.

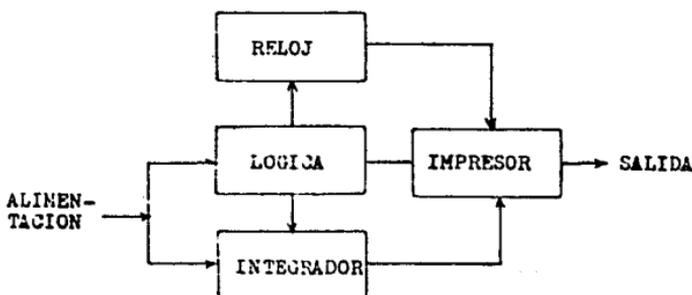
Las ventajas del integrador de disco son: bajo costo, operación automática, independiente de la forma del pico y el registro directo en el mismo papel donde está el cromatograma.

Las desventajas son que los picos cromatográficos deben permanecer en el papel de la carta del registrador para ser me-

didos por el integrador, por lo que debe conocerse perfectamente la señal cromatográfica para cada pico, de modo de prever una respuesta apreciablemente grande en el tamaño del pico para cambiar la atenuación de manera de integrar los picos exactamente, y luego incluir el factor de atenuación en el cálculo del área.

Métodos electrónicos. La gran ventaja de los integradores electrónicos digitales es su capacidad de funcionar --- solos sin ninguna atención por parte del operador. Una vez que se ha inyectado la muestra y presionando el botón de partida, mide los tiempos de retención y las áreas de los picos que corresponden, produciendo luego un registro impreso de los datos.

El esquema general del integrador electrónico es el mismo para todos los fabricantes:



CALCULOS

Asumiendo que se tiene una separación cromatográfica buena, o al menos tan buena como la muestra lo permita, y habiendo decidido el método para convertir los picos a números discretos, deben relacionarse estos números con la composición de la muestra. Hay muchas formas posibles de cómputo; la selección de uno en particular depende de la exactitud deseada y de la cantidad de trabajo que se quiera realizar. Los métodos básicos de cálculo son, en orden creciente de complejidad (y de exactitud), los siguientes:

Normalización de áreas.

Normalización de factores de respuesta.

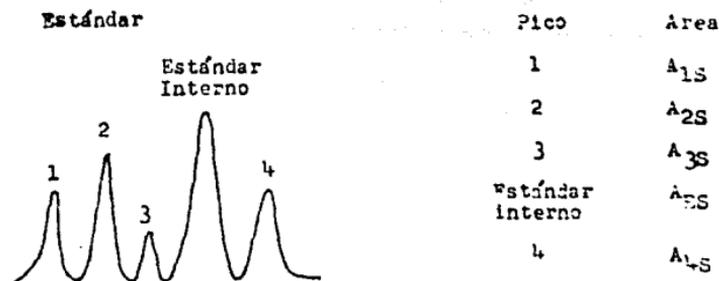
Estandarización externa.

Estandarización interna.

En este trabajo el método de cálculo usado fue el de Estandarización interna, por ser el método más exacto y por contar con los recursos necesarios para efectuarlo. Por lo tanto será el único método de cálculo que se discutirá aquí.

Método de cálculo por Estandarización interna. Para el empleo de este método de cálculo debe contarse con una mezcla de calibración que contiene cantidades conocidas de cada uno de los componentes a ser analizados, más un componente añadido que no esté presente en las muestras analíticas, conocido como estándar interno, y que se emplea como material de referencia.

Las etapas de cálculo para el patrón de calibración son:



- 1) Para cada pico, dividir el área medida entre la cantidad de ese componente para obtener el factor de respuesta.
La "cantidad" puede tomarse en unidades de concentración o peso absoluto, como se desee, ya que son sólo las cantidades relativas las que nos interesan.
- 2) Dividir cada uno de los factores de respuesta entre la del estándar interno para obtener los factores de respuesta relativos.

Pico	Area	Concen- tración	Factor de Respuesta	Factor de Respuesta Relativo
1	A_{1S}	C_{1S}	FR_{1S}	FRR_{1S}
2	A_{2S}	C_{2S}	FR_{2S}	FRR_{2S}
3	A_{3S}	C_{3S}	FR_{3S}	FRR_{3S}
Estándar Interno	A_{ES}	C_{ES}	FR_{ES}	FRR_{ES}
4	A_{4S}	C_{4S}	FR_{4S}	FRR_{4S}
.
.
.
1	A_{1S}	C_{1S}	FR_{1S}	FRR_{1S}

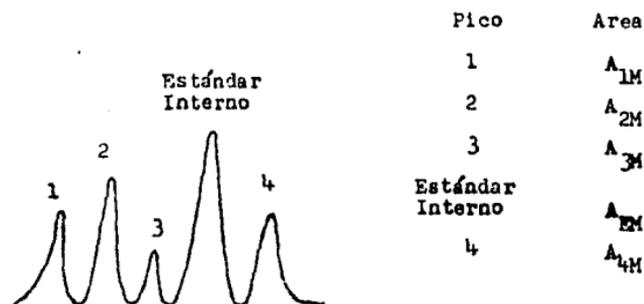
La tercera columna merece un comentario adicional:

Este procedimiento de calibración está dirigido a obtener factores de respuesta relativos; no se está calibrando en el sentido absoluto. Por consiguiente en la tercera columna se pueden expresar concentraciones, cantidades inyectadas, cantidades pesadas en una balanza analítica y luego diluidas en una cantidad de solvente. El único requisito es que estos números representen las cantidades relativas de los diferentes componentes.

La cantidad inyectada no es crítica. Todo aumenta o disminuye proporcionalmente con la cantidad inyectada (siempre y cuando se permanezca en el rango lineal), pero los factores de respuesta relativos permanecen constantes. Es sin embargo, una buena idea elegir el tamaño de inyección comparable al que será usado con las muestras.

Esta es una muestra a la cual se le ha añadido una cantidad conocida de estándar interno antes de cromatografiarla.

Muestra:



Este pico se usa para la calibración absoluta, y se obtienen las cantidades reales de los demás picos de la muestra relacionándolos con dicho pico.

Las etapas de cálculo para la muestra son:

- 1) Para cada pico, dividir el área medida entre su factor de respuesta relativa para obtener el área corregida. Esta etapa elimina el efecto de la no uniformidad del detector.
- 2) Dividir cada una de estas áreas corregidas entre la del estándar interno para obtener la cantidad de cada componente relativa a la del estándar interno.
- 3) Multiplicar cada una de las cantidades relativas por la cantidad real del estándar interno para obtener las cantidades reales de cada componente.

Pico	Area	Factor	Area Corregida	Cantidad Relativa	Cantidad Real
1	A_{1M}	FRR_{1S}	AC_{1M}	CR_{1M}	R_{1M}
2	A_{2M}	FRR_{2S}	AC_{2M}	CR_{1M}	R_{1M}
3	A_{3M}	FRR_{3S}	AC_{3M}	CR_{3M}	R_{3M}
Estándar Interno	A_{EM}	FRR_{EM}	AC_{EM}	CR_{EM}	R_{EM}
4	A_{4M}	FRR_{4M}	AC_{4M}	CR_{4M}	R_{4M}
.
.
1	A_{1M}	FRR_{1S}	AC_{1M}	CR_{1M}	R_{1M}

Resumiendo algebraicamente el cálculo de cada uno de los términos anteriormente señalados, para el componente i de las preparaciones patrón y muestra:

1) Factor de Respuesta:

$$FR = \frac{A_{IS}}{C_{IS}}$$

2) Factor de respuesta relativo:

$$FRR_1 = \frac{FR_1}{FR_{ES}} = \frac{A_{IS}/C_{IS}}{A_{ES}/C_{ES}}$$

3) Area Corregida:

$$AC_{IM} = \frac{A_{IM}}{FRR_1} = \frac{A_{IM}}{(A_{IS}/C_{IS}) \div (A_{ES}/C_{ES})}$$

4) Cantidad Relativa

$$CR_{IM} = \frac{AC_{IM}}{A_{EM}} = \left(\frac{A_{IM}}{(A_{IS}/C_{IS}) \div (A_{ES}/C_{ES})} \right) \div A_{EM}$$

5) Cantidad Real:

$$R_{IM} = CR_{IM} \times C_{EM} = \left(\left(\frac{A_{IM}}{(A_{IS}/C_{IS}) \div (A_{ES}/C_{ES})} \right) \div A_{EM} \right) C_{EM}$$

Rearreglando los términos; para el cálculo de R_{IM} :

$$R_{IM} = \frac{(A_{IM}/A_{EM})}{(A_{IS}/A_{ES})} \times \frac{C_{IS}}{C_{ES}} \times C_{EM}$$

Quando la concentración del estándar interno es la misma tanto en la preparación muestra como en la preparación patrón de calibración, es decir, cuando

$$C_{EM} = C_{ES}$$

La expresión anterior queda así:

$$R_{1M} = \frac{(A_{1M}/A_{EM})}{(A_{1S}/A_{ES})} \times C_{1S}$$

Además, si los factores (A_{1M}/A_{EM}) y (A_{1S}/A_{ES}) los identificamos como R_M y R_S , la última expresión puede representarse así:

$$R_{1M} = \frac{R_M}{R_S} \times C_S$$

Que es la fórmula de cálculo final empleada para la determinación de uno, dos o i componentes en una muestra por cromatografía de gases cuando se calcula por el método de estandarización interna.

CAPITULO III
GENERALIDADES

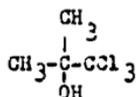
Nombre químico. (20).

Clorobutanol

Sinónimos

2-propanol 1,1,1-tricloro-2-metil, clorbutol; 1,1,1-tricloro-2-metilpropan-2-ol; Alcohol tricloroisobutílico; cloroton; 2,2,2-tricloro-tertbutílico; Metaform, Sedaform.

Fórmula



P.M. 177.46 g/mol

Síntesis

El clorobutanol se prepara por la oxidación de una mezcla de hidróxido de potasio o óxido de potasio en cloroformo y acetona.

Propiedades Físicas

Se presenta en forma de cristales incoloros de sabor y olor a alcanfor. Sublima fácilmente, la forma anhidra tiene un P.f. de 97 °C, la forma hemihidrato tiene un P.f. de 78 °C el punto de ebullición es de 167 °C a una atmósfera de 760 mmHg y de 135 °C a 246 mmHg.

Solubilidad

El clorobutanol se solubiliza fácilmente en agua caliente, un gramo se disuelve en 1 ml de alcohol, 10 ml de glicerol; soluble en cloroformo, acetona, éter de petróleo, ácido acético glacial.

Descripción Farmacopeica

El clorobutanol es anhidro o contiene no más de la mitad de una molécula de agua de hidratación. Contiene no menos de -- 98.0% y no más de 100.5% de $C_4H_7OCl_3$, calculado con base en el compuesto anhidro.

Identificación

A. El espectro de absorción I.R., determinado en una celda de 1 mm, de una solución 1 en 50 de disulfuro de carbono exhibe un máximo a la misma longitud de onda que una preparación similar de Clorobutanol Substancia de Referencia U.S.P.

B. A 5 ml de una solución (1 en 200) preparada recientemente, añadir 1 ml de solución 1 N de hidróxido de sodio, añadir lentamente 3 ml de solución reactivo de iodo, se observa un precipitado amarillo de iodoformo, característico por su olor (21).

C. A 0.1 g de clorobutanol en 1 ml de alcohol, se añaden 5 ml de solución reactivo de hidróxido de amonio, 1 ml de solución reactivo de nitrato de plata y 2 a 3 gotas de solución reactivo de hidróxido de sodio, calentando la solución hasta obtener un color café, se aprecia la formación de plata metálica; al enfriar, filtrar y acidificar el filtrado claro con

solución reactivo de ácido nítrico, se aprecia la formación de un precipitado blanco.

D. Mezclar aproximadamente 20 mg de clorobutanol con 2 ml de solución 10 N de hidróxido de sodio y 1 ml de piridina; calentar en baño de vapor, y agitar; la capa de piridina se observa de color rojo.

Determinación de agua

Se utiliza el Método de Karl Fisher. Debe contener no más de 1.0% en la forma anhidra y no más de 6.0% en la forma hidratada.

Determinación de cloruros

Una solución de 0.5 g de clorobutanol en una mezcla de 25 ml de alcohol diluido y 1 ml de ácido nítrico debe presentar no más cloruros que los correspondientes a 0.50 ml de una solución de ácido clorhídrico 0.02 N.

Reacción

Agitar vigorosamente 0.5 g de clorobutanol con 25 ml de agua; el agua debe permanecer neutra al papel litmus.

Acondicionamiento y empaque

El clorobutanol debe conservarse en contenedores herméticos.

Marbete

El marbete debe caracterizar al clorobutanol como anhidro o hidratado.

Usos

El clorobutanol tiene propiedades antibacteriales y antifúngicas y se emplea a una concentración de 0.5% como conservador en inyectables y soluciones oftálmicas, óticas y nasales.

El clorobutanol es un sedante y analgésico local con una acción similar a la del hidrato de cloral, pero menos potente e irritante para el estómago, (22), aun cuando la FDA (Federal Drug Administration) no considera al clorobutanol como un ingrediente activo dentro del panel de Misceláneos Externos, el Dr. Joel Hertz (Director de Servicios Técnicos de Whitehall) propuso a la FDA una monografía considerando al clorobutanol como analgésico externo, (23). El Dr. Hertz comenta que: "Recientemente se propusieron nuevos datos consistentes de resultados de prueba de inducción de dolor en cola de ratón, para considerar al clorobutanol ingrediente activo dentro del Panel de Misceláneos Externos de la FDA".

El Dr. Hertz preparó una formulación con clorobutanol al 5%, ácido tánico al 25% en alcohol isopropílico, y otra formulación con clorobutanol al 5% en alcohol isopropílico.

La primera se empleó con éxito en el tratamiento de uñas enterradas, la segunda formulación se encontró que prolonga significativamente el tiempo por el cual el ratón puede tolerar un estímulo de dolor inducido.

El Dr. Hertz concluye: "Estas dos muestras actúan por un efecto de analgésico local para reducir la reacción normal al dolor; añade que por sí solo el alcohol isopropílico no incrementa la tolerancia al dolor".

El clorobutanol en pequeñas dosis se utiliza contra mareos, pero es menos efectivo para este propósito que la hioscina y los fármacos antihistamínicos, (22).

En polvo al 1 y 2% externamente, se emplea para aliviar el prurito y otras condiciones irritantes de la piel; una solución al 1% en parafina líquida se usa principalmente en el alivio de las reacciones del catarro.

En odontología, se utiliza una solución al 25% en aceites volátiles, tales como el aceite de acacia y el ajo, como cubiertas para pulpas infectadas o expuestas.

El clorobutanol se emplea también como plasticida en ésteres y éteres de celulosa, (20).

Categoría terapéutica humana. (20).

Principalmente como agente antimicrobiano y analgésico dental.

Categoría terapéutica veterinaria

Se emplea como sedante mediano, antiprurítico y antiséptico.

Efectos tóxicos. (22).

El envenenamiento agudo puede producir estupor profundo, hipotensión, disnea y cianosis.

Tratamiento de efectos tóxicos

Por vaciado estomacal, por aspiración y por lavado. Debe proporcionarse respiración artificial hasta que ésta se restablezca totalmente.

Incompatibilidades

a) El clorobutanol se utiliza en preparaciones farmacéuticas a una concentración de 0.5%; esta concentración se aproxima

a su punto de saturación a bajas temperaturas y puede presentarse cristalización.

b) El polisorbato 20 y el laurmacrogol 1000 reducen la velocidad de hidrólisis del clorobutanol a pH 9.2, pero el macrogol 4000 no tiene ese efecto.

c) En presencia de trisilicato de magnesio al 1%, el clorobutanol al 0.5% no tiene actividad antibacterial contra *Staphylococcus aureus*.

d) La bentonita al 1% y la carboximetilcelulosa al 1% reducen la actividad del clorobutanol entre un 20 y un 30%.

e) El clorobutanol difunde de una solución acuosa al 0.5% almacenada en contenedores de polietileno, la pérdida se incrementa con el tiempo, temperatura de almacenamiento y área de polietileno en contacto con la solución, después de 10 semanas la solución de clorobutanol al 0.5% almacenada a aproximadamente 20 °C en contenedores de polietileno de 15 y 60 ml de capacidad no tuvieron actividad bactericida contra *Pseudomonas aeruginosa*; pero almacenada a temperatura de 6 a 8 °C mantuvo su actividad bactericida en contenedores de 15 a 120 ml, (22).

f) La pérdida de clorobutanol como conservador de las soluciones parenterales acondicionadas en frasco vial para cultivos por interacción con tapones de hule, puede llevar a la contaminación de la preparación inyectable por introducción de bacterias ocasionalmente.

Dicha pérdida del conservador en el inyectable se explica de diversas maneras: Masucci y Moffat (23), la explican debido

En la vaporización del conservador del frasco vial; Weiner (24), la explica debido a la composición diferente de los tapones de hule; Siddell (25), atribuye el problema a la falta de uniformidad de contenido de los tapones a causa de una inadecuada calidad de los patrones estándares y al deficiente control de los métodos de manufactura.

Con el propósito de determinar los factores que influyen en la pérdida del conservador en las soluciones inyectables acondicionadas en frasco vial multidosis, Lachman (31), efectuó un experimento donde se evaluaron los conservadores: alcohol bencílico, alcohol feniletílico, alcohol p-cloro- β -feniletílico, clorobutanol y metilparabeno.

Los elastómeros usados en este estudio fueron los más comúnmente utilizados en la industria farmacéutica como son el hule natural, el neopreno y el butilo.

Se estudió además la dependencia de la temperatura en la degradación y el proceso de difusión.

El experimento consistió en preparar soluciones inyectables con diferentes conservadores a las concentraciones adecuadas: Alcohol p-cloro- β -feniletílico 0.3%, alcohol feniletílico 0.5%, alcohol bencílico 1.0%, metilparabeno 0.2% y clorobutanol anhidro 0.5%. Se prepararon con agua para inyectable y solución amortiguadora de pH 4, se acondicionaron en frasco vial multidosis y ampollitas, se envasaron y sellaron respectivamente. En el caso del frasco vial se probaron los tres diferentes tipos de elastómeros mencionados anteriormente y fueron almacenados la mitad en posición vertical y la otra mitad en posición invertida y almacenados

en estufas a temperatura constante de 25 °C, 40 °C, 50 °C y 60 °C \pm 1.5 °C.

También se preparó una solución inyectable constituida de solución amortiguadora de pH 4 y tratada de la misma manera que las soluciones con conservador.

Se efectuó un estudio de estabilidad acelerada del conservador con las soluciones antes mencionadas, así como un análisis de actividad microbiológica, pH, cambios químicos y físicos que hubieran ocurrido con el tapón como dureza, forma y color.

Las soluciones control con solución amortiguadora en ampollita y frascos viales se determinaron de forma rutinaria.

Posteriormente se determinó la pérdida de conservador de las soluciones antes mencionadas evaluando su contenido residual después de efectuarse un ciclo de esterilización por autoclave.

Los resultados encontrados en este experimento indican, que la disminución del clorobutanol fue hasta de un 90% de una solución de clorobutanol a pH 4 contenida en frasco vial y almacenada a 60 °C por 12 semanas; además el fenómeno de interacción de la naturaleza del tapón-concentración del clorobutanol sigue una cinética de degradación de primer orden. En la tabla No. 1 se presenta una comparación de la pérdida de clorobutanol en frascos viales con tapones de diferente composición; se comprobó que los tapones tienen un marcado efecto sobre la deteriorización en la concentración del conservador a todas las temperaturas. Esta puede atribuirse a:

- a) Adsorción y absorción del conservador en el tapón.
- b) Difusión y después volatilización del conservador del tapón de hule, y
- c) Interacción del conservador con el material extraído del tapón.

La tabla No. 2 muestra el porcentaje de clorobutanol perdido de la solución, debido a la influencia del tapón de hule; este valor se estableció restando el porcentaje de conservador residual determinado en la solución envasada en frascos viales de la determinada en la solución envasada en ampollitas, bajo las mismas condiciones de almacenamiento. Se observa que el mayor grado de degradación ocurre en las dos primeras semanas y después el cambio es menos significativo; lo que demuestra que existe un equilibrio entre la concentración del conservador y el tapón. También se determinó que la mayor pérdida de concentración de conservador se presenta en frascos viales almacenados en posición invertida. El manejo de frascos viales de esta manera no es común; sólo se pretendió acentuar el efecto del contacto de la solución con el tapón en el frasco vial para determinar su efecto.

La tabla No. 3 muestra la dependencia en el contenido del conservador residual con la naturaleza del tapón en frascos viales multidosis después de su almacenamiento. Los datos demuestran que el tapón de neopreno es el mayor responsable de la disminución del clorobutanol de la solución, esto está de acuerdo con las características de este material, más poroso que el hule natural y el butilo lo cual se traduce en mayor

Tabla No. 1 Porcentaje de pérdida de clorobutanol debida al tapón. (31).

Temp. °C	Tiempo de Almacena- miento (semanas)	Hule Natural		Hule Neopreno		Hule Butilo	
		Vertical	Invertido	Vertical	Invertido	Vertical	Invertido
25	2						
	8	12.8	17.0			25.6	36.2
	12	19.1	21.3	12.8	19.1	31.9	36.2
40	2	23.4	36.2	38.4	40.0	31.9	38.4
	8	23.4	36.2	42.6	49.0	31.9	38.4
	12	23.4	40.0	44.7	51.1	31.9	31.9
50	2	38.4	40.0	40.0	51.1	31.9	36.2
	8	36.2	----	34.0	46.8	27.7	34.0
	12	34.0	49.0	44.7	53.2	31.9	34.0
60	2	38.4	42.6	44.7	49.0	44.7	46.8
	8	21.3	29.8	27.7	38.4	29.8	31.9
	12	14.9	29.8	42.6	63.8	25.6	25.6

Tabla No. 2 Influencia de la diferencia de composición de tapones en el porcentaje residual de la concentración de soluciones de clorobutanol envasadas en frasco viales después de su almacenamiento. (31).

Temp. °C	Tiempo de Almacenamiento (semanas)	Ampollita Control	Composición del tapón					
			Hule Natural		Neopreno		Butilo	
			Vertical	Invertido	Vertical	Invertido	Vertical	Invertido
25	2							
	8	100	87.3	83.0			74.5	63.8
	12	100	81.0	78.7	87.3	81.0	68.1	63.8
40	2	100	76.7	63.8	61.7	59.6	68.1	61.7
	8	100	76.6	63.8	57.5	51.0	68.1	61.7
	12	97.9	74.5	57.5	53.2	46.8	66.0	66.0
50	2	97.9	59.6	57.5	57.5	46.8	66.0	61.7
	8	93.6	57.5	----	59.6	46.8	66.0	59.6
	12	91.5	57.5	42.5	46.8	38.3	59.6	57.5
60	2	95.8	57.5	53.2	51.0	46.8	51.0	48.9
	8	81.0	59.6	51.0	53.2	42.5	51.0	48.9
	12	72.4	57.5	42.5	29.8	8.5	46.8	46.8

grado de difusión con menos impedimento.

En cuanto al efecto del ciclo de esterilización por autoclave de soluciones inyectables con conservador en solución -- amortiguadora de pH 4 y contenidas en frasco vial utilizando los tres tipos de tapones antes mencionados, la tabla No. 3 muestra que el conservador más afectado es el alcohol p-cloro- β -feniletílico respecto a la concentración residual del conservador; además se observa que el tapón menos reactivo es el hule natural.

Tabla No. 3 Efecto del ciclo de esterilización por autoclave en el contenido del conservador en soluciones en frasco vial con tapón de hule de diferente composición.

% Residual de conservador				
Conservador	Ampolleta Control	Hule Natural	Hule Neopreno	Hule Butilo
Alcohol p-cloro- β -feniletílico	100	91	88	88
Alcohol feniletílico	100	100	96	98
Clorobutanol	95	92	92	92
Alcohol Benéfico	100	100	90	100
Metilparabeno	100	100	100	100

Espectro bactericida del clorobutanol

El clorobutanol es compatible con un gran número de sustancias químicas y fármacos, se usa ampliamente como agente bacteriostático en soluciones parenterales. En la

temperatura (5), se encuentra que el clorobutanol es un agente bacteriostático completo, en una solución saturada al 0.8% contra microorganismos no esporulados, específicamente *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus megatherium* y *Bacillus subtilis*.

Por otra parte Briggs y Callow (3), indican que el clorobutanol en una dilución 1:200 es bacteriostático para las formas no esporuladas. Taub y Luckey (4), reportan que el clorobutanol en una dilución 1:125 es bactericida contra *Staphylococcus typhosa*.

Estabilidad del clorobutanol

Se ha demostrado que el clorobutanol usado como agente bacteriostático en medicamentos sufre descomposición en solución acuosa, así como por el calentamiento de su solución, durante el ciclo de esterilización en autoclave a 121 °C por 20 min. o por calentamiento a 100 °C por 30 min. durante tres días consecutivos, (5). Murphy (26), estimó el porcentaje de hidrólisis de soluciones acuosas de clorobutanol a diferentes valores de pH después de esterilizarse en autoclave por periodos de 5 a 20 min. y estableció que la hidrólisis del clorobutanol es ligera a valores de pH menores de 5, y se incrementa notablemente en soluciones menos ácidas. También demostró que cuando las soluciones alcalinas o neutras de suficiente capacidad amortiguadora que contienen clorobutanol, se esterilizan por autoclave, el efecto antibacterial disminuye notablemente.

Los resultados del estudio de la cinética de degradación de

clorobutanol (27), demuestran que:

1.- La degradación del clorobutanol en soluciones acuosas es una reacción específica catalizada por el ion hidróxilo.

Con respecto al ion hidróxilo siguen una cinética de orden uno las soluciones de clorobutanol a pH entre 5 y 7.5, y de orden cero entre pH 2 a 4.

2.- La energía de activación aparente, E_a , para la degradación del clorobutanol en soluciones acuosas de pH 2 a 7.5 es de 30.7 Kcal. Puesto que esta energía de activación aparente incluye el calor de ionización del agua (aproximadamente 12 Kcal) la E_a de la reacción alcalina debe ser de 18.7 Kcal, un valor razonable para una reacción hidrolítica de este tipo.

3.- Se determinó el tiempo de vida media a 25 °C para el clorobutanol en solución acuosa del cálculo de las constantes de reacción específica a varios valores de pH y a 25 °C. El tiempo de vida media del clorobutanol en solución amortiguada a pH 3 se calculó en 90 años a 25 °C, mientras que su tiempo de vida media en condiciones similares a pH de 7.5 fue de 0.23 años. Similarmente la descomposición del clorobutanol en solución acuosa a 115 °C durante 30 min. a pH 7.5 y 6.0 se calculó en 13 y 58% respectivamente.

4.- Se encontró que la pérdida de clorobutanol en medicamentos se debe no sólo a la descomposición química sino también a la volatilización durante la preparación y almacenamiento a través de contenedores porosos, tapones, etc.

5.- Los productos de degradación principal del clorobutanol

en soluciones acuosas son acetona, monóxido de carbono, ácido clorhídrico y trazas de ácido α -hidroxilisobutílico.

6.- Debido a la producción de iones H^+ durante la hidrólisis, el pH del medio, si no está amortiguado, disminuye.

Debido a esta disminución del pH y a la velocidad de degradación que es muy lenta a pH bajo, la hidrólisis debe ser un tanto limitada en soluciones no amortiguadas.

7.- El clorobutanol es inadecuado en soluciones débilmente alcalinas debido a que el calentamiento lo descompone con pérdida de actividad antibacterial. Es adecuado en soluciones ácidas.

El clorobutanol finamente pulverizado debe incorporarse en el agua a una temperatura entre 60 y 65 °C y debe agitarse a intervalos hasta completar la disolución; temperaturas mayores incrementan la pérdida por volatilidad o retardan la disolución.

Farmacología

El clorobutanol tiene actividad biológica de vasodilatación y relajante del músculo liso, (28).

La actividad biológica del clorobutanol en diferentes sistemas farmacéuticos no es la misma. El clorobutanol al usarse como conservador en preparaciones farmacéuticas de péptidos neurohipofisarios se encuentra en una proporción variable respecto al péptido activo. Por lo tanto los efectos del conservador deben de ser casi dominantes en preparaciones diluidas del péptido de baja actividad.

Los péptidos neurohipofisarios (p. ej. oxitocina y vasopre-

sina) libre de conservador tienen efecto de vasodilatador, de varios grados en algunas especies. En el hombre la oxitocina libre de conservador tiene efecto de hipotensor, aunque no tan pronunciado como en aves, (29).

Para la demostración de este efecto de vasodilatación y relajación de músculo liso debido al clorobutanol en preparaciones farmacéuticas de péptidos neurohipofisarios conteniendo clorobutanol como conservador se utilizaron segmentos aislados de tráquea de conejo; los segmentos se suspendieron en solución de Krebs y se equilibraron a una tensión de 5.0 g por 2 hrs. El segmento se llevó primero a un estado de contracción con la adición de 50 mcg/ml de acetilcolina en un baño de agua. Después de alcanzarse un estado de contracción estable, se añadió por separado una dosis de oxitocina comercial (Syntocinon) de 1.0 U/ml, el mismo volumen de diluyente con conservador (clorobutanol) y 1.0 ml de oxitocina libre de conservador. El Syntocinon y su diluyente provocaron relajación inmediata de los segmentos de tráquea precontractiles, pero la oxitocina sin conservador no presentó ningún efecto demostrable; puesto que el clorobutanol también tiene efecto vasodepresor en gato intacto, el clorobutanol no puede ser considerado como sustancia inerte.

Estudios experimentales han demostrado que el clorobutanol en concentración de 500 mg/ml produce una disminución de 30% en la amplitud de contracción y un 20% de incremento en la duración de acción potencial, (30). El clorobutanol disminuye la velocidad de conducción inducida y la automaticidad no

se manifiestan dentro del músculo ventricular aislado.

El efecto inotrópico negativo se encuentra en varias formulaciones con epinefrina y algunos otros péptidos semejantes que contienen como conservador clorobutanol en concentraciones suficientemente altas (mayores de 500 mcg/ml).

Este efecto inotrópico negativo se observó en miocardio aislado de sapo el cual se puso en contacto con una formulación proporcionada por los Laboratorios Sandoz Pharmaceutical cuyo principio activo es Bradykinin y contiene clorobutanol como conservador.

Probando soluciones del principio activo puro de Bradykinin se observó que el efecto no era debido al principio activo sino por el contrario, el Bradykinin ejerce un efecto inotrópico positivo cuando se inyecta sistémicamente. Esto fue demostrado sometiendo miocardio aislado de sapo en solución de Ringer oxigenada de pH 7.4 a 37 °C a una tensión de 2 K dinas y conectando el miocardio a un electrodo de Ag:AgCl y éste a un osciloscopio; a este sistema se añadieron 0.1 mg de Bradykinin y 500 mg de clorobutanol diluidos en solución salina fisiológica, encontrándose reducción en la tensión isométrica del órgano aislado.

El único caso de intoxicación fatal por clorobutanol reportado, (23), ocurrió en una mujer de 45 años aproximadamente, intoxicada intencionalmente con un frasco de una onza de Degtalone fabricado por Parke Davis. El marbete indicaba 175 - granos de clorobutanol por onza de producto, los resultados de distribución en flúidos y tejidos se muestran a continua-

ción:

Medio	Concentración (mg/100 ml)
Sangre entera	6.4
Plasma	6.5
Orina	3.1
Contenido estomacal	3.2 X 10 ³
Cerebro	16.1 ^b
Hígado	14.1 ^b
Bilis	12.3
Bazo	12.0
Riñón	8.7 ^b

^b Conc. en mg/100 g.

CAPITULO IV

PARTS EXPERIMENTAL

Para el estudio de comparación de métodos de análisis en la determinación de clorobutanol en preparaciones farmacéuticas oleosas, se consideró inicialmente el Método de Determinación de Clorobutanol por Cromatografía de Gases, considerado como "Método de Prueba" frente al Método Titulométrico considerado como "Método de Referencia". Para la evaluación del Método Cromatográfico se realizaron los siguientes estudios:

- 1) Estudio de Linealidad de Respuesta;
- 2) Estudio de Repetibilidad;
- 3) Estudio de Recuperación con Muestra.

Se realizó un Estudio de Repetibilidad utilizando el Método Titulométrico de análisis de clorobutanol aplicado a la misma muestra empleada para el Estudio de Repetibilidad por el Método Cromatográfico.

Se efectuó un análisis comparativo estadístico con los datos obtenidos por ambos métodos para seleccionar el más apropiado para su uso.

Método de Cromatografía de Gases para la determinación de clorobutanol en preparaciones farmacéuticas inyectables oleosas.

Este método utiliza benzaldehído como estándar interno y clorobutanol sustancia de referencia. Bajo las condiciones propuestas el benzaldehído exhibe un tiempo de retención de aproximadamente 2.79 min. y el clorobutanol de 4.10 min.

Equipo y condiciones del sistema cromatográfico:

Equipo.- Cromatógrafo de gases Perkin-Elmer Sigma 1B con detector de ionización de flama e integrador electrónico digital.

Columna.- De 6 pies de longitud por 3 mm de diámetro interno, empacada con Carbowax 20 M al 10% con tamaño de partícula de malla 60-80 y soporte Gas Chrom Q.

Temperatura de la columna.- 85 °C.

Temperatura del inyector.- 140 °C.

Temperatura del detector.- 180 °C.

Flujo de gas acarreador (helio).- 60 ml/min.

Atenuación.- 5

Volumen de inyección.- 1.2 microlitros.

Procedimiento General para la determinación de clorobutanol por Cromatografía de Gases

Preparación de muestra y sustancia de referencia

A) Preparación del estándar interno. Se transfirieron 0.35 ml de benzaldehído R.A. a un matríz volumétrico de

250 ml; se disolvieron y aforaron con disulfuro de carbono y se homogenizó perfectamente. Esta solución se emplea tanto para la preparación de las muestras, como para la de clorobutanol sustancia de referencia.

3) Preparación de la solución de clorobutanol sustancia de referencia. Se pesó aproximadamente 125 mg de clorobutanol USP sustancia de referencia; se transfirieron a un matraz volumétrico de 25 ml, se disolvió y aforó con disulfuro de carbono; se homogenizó perfectamente y se transfirieron 5 ml de esta solución a un frasco vial de 100 ml, se añadieron 5.0 ml de estándar interno y 40 ml de disulfuro de carbono R.A.; se mezcló perfectamente. La solución así obtenida corresponde a una concentración de 0.50 mg/ml.

3) Preparación de la Muestra (*). Se transfirió una cantidad equivalente de 24 a 25 mg de clorobutanol (5.0 ml de muestra medida con una pipeta volumétrica) a un frasco vial de 100 ml. Se añadieron 5.0 ml de la preparación de estándar interno y 40 ml de disulfuro de carbono R.A.; se homogenizó y centrifugó la muestra.

Se inyectaron 1.2 microlitros de la preparación de clorobutanol sustancia de referencia y muestra al cromatógrafo, utilizando las condiciones para el equipo antes mencionadas.

(*) NOTA: La muestra usada corresponde a una preparación farmacéutica oleosa comercial de "Neo Sec Forte", Lote MY-543 que contiene clorobutanol como conservador, proporcionada por Laboratorios Upjohn, S.A. de C.V.

c) Cálculos. Calcular el contenido de clorobutanol expresado en mg/ml con la siguiente fórmula:

$$\frac{R_m}{R_s} \times C_s \times \frac{V_1}{V_2}$$

Donde:

- R_s Relación del área integrada del pico de clorobutanol de la preparación sustancia de referencia al área integrada del pico de benzaldehído de la preparación sustancia de referencia.
- R_m Relación del área integrada del pico de clorobutanol en la muestra al área integrada del pico de benzaldehído en la muestra.
- C_s Concentración de la preparación de clorobutanol sustancia de referencia, expresada en mg/ml.
- V_1 Volumen total empleado en la preparación de la muestra expresado en mililitros.
- V_2 Volumen de la preparación farmacéutica oleosa empleada en la preparación de la muestra, expresado en mililitros.

Sistema de Recuperación con Muestra

Para la realización de este estudio se analizaron muestras consistentes de la muestra problema a las que se les - adicionó solución de clorobutanol sustancia de referencia en diferentes proporciones para obtener 100, 110, 120, 130 140 y 150% de la concentración normal del conservador en el ensayo.

Procedimiento para el estudio de recuperación

A) Preparación del estándar interno: Como se describió en el Procedimiento General para Determinación de Clorobutanol por Cromatografía de Gases.

B) Preparación de Clorobutanol Sustancia de Referencia: Se pesó aproximadamente 125 mg de clorobutanol USP sustancia de referencia; se transfirieron a un matraz volumétrico de 50 ml, se disolvieron y aforaron con disulfuro de carbono: lo que constituyó la Solución A; se transfirieron 10 ml de la Solución A a un matraz volumétrico de 50 ml; se añadieron 5 ml de la preparación de estándar interno y se agregó disulfuro de carbono hasta el aforo; se homogenizó perfectamente.

C) Preparación de muestras: Se prepararon muestras conforme al procedimiento presentado en la Tabla No. 4. Las muestras se mezclan perfectamente, se centrifugan a 2500 RPM durante 10 min. y se inyectan 1.2 microlitros de cada muestra y sustancia de referencia al cromatógrafo.

Tabla No. 4 Diluciones de clorobutanol para el estudio de recuperación

Nivel ensayado	Solución A (ml)	Estándar Interno (ml)	Muestra (ml)	CS ₂ (ml)
100	0	5	5	40
110	1	5	5	39
120	2	5	5	38
130	3	5	5	37
140	4	5	5	36
150	5	5	5	35

D) Cálculos.

1) Calcular el contenido de clorobutanol encontrado en mg/ml, según la expresión C_1 :

$$C_1 = \frac{R_m}{R_s} \times C_s$$

2) Calcular el contenido total de clorobutanol en miligramos encontrado en la preparación, de acuerdo a la expresión B_1 , multiplicando el resultado de clorobutanol en mg/ml, obtenido, C_1 , por el volumen de la preparación original de la cual se partió, V_1 :

$$B_1 = C_1 \times V_1$$

3) Calcular el contenido de clorobutanol total ensayado en miligramos en la preparación, de acuerdo a la expresión B_2 , el cual proviene de la preparación farmacéutica oleosa, $(V_2 \times C_2)$, y de la adición de clorobutanol sustancia de referencia, $(V_3 \times C_3)$, para la preparación de la muestra:

$$B_2 = (V_2 \times C_2) + (V_3 \times C_3)$$

4) Calcular el contenido de clorobutanol sustancia de referencia añadido, en miligramos, en la preparación; de acuerdo a la expresión A_2 , la cual se obtiene multiplicando la concentración de clorobutanol en mg/ml, por el volumen de la preparación farmacéutica oleosa para la preparación de la muestra:

$$A_2 = V_3 \times C_3$$

5) Calcular el contenido de clorobutanol sustancia de referencia encontrado, en miligramos, en la preparación; de acuerdo a la expresión A_1 , el cual se obtiene restando el contenido de clorobutanol correspondiente a la preparación farmacéutica oleosa en la preparación de la muestra $(V_2 \times C_2)$, del contenido total de clorobutanol encontrado, B_1 :

$$A_1 = B_1 - (V_2 \times C_2)$$

6) Calcular el porcentaje de recuperación de clorobutanol -

substancia de referencia encontrado en la preparación, de acuerdo a la expresión R_1 , dividiendo la cantidad de clorobutanol substancia de referencia encontrado, A_1 , entre la cantidad de clorobutanol substancia de referencia ensayada, A_2 , en la muestra:

$$R_1 = A_1/A_2 \times 100$$

7) Calcular el porcentaje de recuperación de clorobutanol total encontrado en la preparación, de acuerdo a la expresión R_2 , dividiendo la cantidad de clorobutanol encontrado, B_1 , entre la cantidad de clorobutanol total ensayado, B_2 , en la muestra:

$$R_2 = B_1/B_2 \times 100$$

Donde:

- R_m Relación del área integrada del pico de clorobutanol en la muestra al área integrada del pico de benzaldehído en la muestra.
- R_s Relación del área integrada del pico de clorobutanol de la preparación substancia de referencia al área integrada del pico de benzaldehído de la preparación substancia de referencia
- V_1 Volumen total de la última dilución empleada, en mililitros, utilizados en la preparación de la muestra.

- V_2 Volumen de la preparación farmacéutica oleosa empleada en la preparación de la muestra, expresada en mililitros.
- C_3 Concentración de la preparación de clorobutanol sustancia de referencia, expresada en mg/ml.
- C_2 Concentración de clorobutanol de la preparación farmacéutica oleosa empleada, expresada en mg/ml.
- C_3 Concentración de clorobutanol de la "Solución A" empleada, expresada en mg/ml.
- V_3 Volumen de la preparación de la "Solución A" empleada, expresado en mililitros.

Estudio de Linealidad

Este estudio permite determinar si existe una relación lineal en el rango de 50 a 150% del contenido teórico del ingrediente activo cuando se analiza de acuerdo con el ensayo propuesto en el "Procedimiento General para Determinación de Clorobutanol por Cromatografía de Gases".

Procedimiento para el Estudio de Linealidad. Esta prueba se realizó usando soluciones de clorobutanol sustancia de referencia preparadas en un intervalo de concentración del 60 al 140% de la concentración teórica presente en la formulación.

Se pesaron aproximadamente 125 mg de clorobutanol USP sustancia de referencia; transferidos a un matraz volumétrico de 25 ml, se disolvió y agregó disulfuro de carbono hasta el aforo; a esta solución se le denominará "Solución B".

A partir de la Solución B se prepararon las siguientes diluciones en un frasco vial de 100 ml, de acuerdo con la Tabla No. 5. Estas diluciones se mezclan perfectamente, se centrifugan a 2500 RPM durante 10 min y se inyectan 1.2 microlitros de cada dilución al cromatógrafo de gases.

Se determina la relación de áreas del pico de clorobutanol al pico de estándar interno, para cada nivel de concentración en sayado. Los resultados se tabulan y se grafica la respuesta obtenida de relación de áreas contra cada nivel de concentración correspondiente. Los resultados se muestran en las Tablas Nos. 6 y 7 y Gráfica No. 1, en el Capítulo de Resultados.

Tabla No. 5 Diluciones de clorobutanol sustancia de referencia utilizados para el Estudio de Linealidad.

% Nivel ensayado	Estándar Interno (ml)	Solución B (ml)	CS ₂ (ml)
60	5	3	42
80	5	4	41
100	5	5	40
120	5	6	39
140	5	7	38

Estudio de Repetibilidad en el Método Cromatográfico

La precisión del ensayo puede ser medida por la desviación estándar relativa de análisis de réplica de muestras y preparación de sustancia de referencia.

Procedimiento para el Estudio de Repetibilidad del Método Cromatográfico.

La precisión del Método Cromatográfico en la determinación de clorobutanol en preparaciones farmacéuticas parenterales oleosas, se determinó preparando tres muestras con clorobutanol, como se mencionó en el "Procedimiento General para Determinación de Clorobutanol por Cromatografía de Gases" e inyectando cada muestra al cromatógrafo de gases 5 veces, se determinó el contenido de clorobutanol de cada inyección. A los resultados obtenidos, una vez tabulados, se les practica un estudio de desviación estándar. Dichos resultados se muestran en la Tabla No. 12.

Principio del método titulométrico para la determinación de clorobutanol en preparaciones farmacéuticas oleosas.

Este método consiste en la separación del clorobutanol de una preparación farmacéutica oleosa mediante destilación por arrastre de vapor. El clorobutanol así obtenido se trata con álcali y un exceso de solución 0.1N de nitrato de plata, determinándose el clorobutanol por la cantidad de cloruro de plata formado, al titularse por retroceso el nitrato de plata residual con solución 0.1 N de tiocianato de amonio, utilizándose como indicador sulfato férrico amónico.

Procedimiento para la determinación de clorobutanol en soluciones inyectables oleosas por el método titulométrico. Se transfirió una muestra de aproximadamente 100 mg de clorobutanol (20.0 ml de muestra medida con una pipeta volumétrica) a un matraz de Kjeldahl; se conectó el matraz a un condensador vertical recto y se colectó el clorobutanol en un matraz de Erlenmeyer de tapón esmerilado, cuyo contenido era de 25 ml de solución de hidróxido de potasio alcohólico al 30%. El matraz Erlenmeyer se sumergió en un baño de hielo y el tubo terminal del condensador se puso en contacto con la superficie de la solución de hidróxido de potasio. Se colocó debajo del matraz de destilación un mechero de Bunsen; la flama se reguló de manera que no quemaran más de 3-4 ml de agua en el matraz del destilado, al final de la destilación; se destiló a una velocidad moderada hasta coleccionar unos 100 ml. Se desconectó el aparato de destilación y se lavó la punta del condensador primero con alcohol y después

con agua; se tapó el matraz y se dejó reposar toda la noche a temperatura ambiente. Se añadió ácido nítrico concentrado hasta hacer la solución ácida al papel indicador, agregando 3 a 5 ml de exceso. Se dejó enfriar y se añadieron 25 ml de solución 0.1 N de nitrato de plata, 5 ml de nitrobenzono y se homogenizó perfectamente. Se tituló con solución 0.1 N de tiocianato de amonio usando solución de sulfato férrico amónico como indicador. Se preparó una solución blanco y se determinó de la misma manera.

Cálculos. Calcular el contenido de clorobutanol en mg/ml con la siguiente fórmula:

$$\frac{(V_B - V_M) \times N \times 59.14}{V_A}$$

Donde:

V_B = Volumen de tiocianato de amonio gastados en la determinación de la preparación blanco.

V_M = Volumen de la solución de tiocianato de amonio gastados en la determinación de la muestra.

V_A = Volumen de alícuota de muestra utilizada en el análisis.

N = Normalidad de la solución de tiocianato de amonio.

59.14 = Peso miliequivalente del clorobutanol

Procedimiento para el Estudio de Repetibilidad del Método Titulométrico.

La precisión del Método Titulométrico en la determinación de clorobutanol en preparaciones farmacéuticas inyectables oleosas, se determinó preparando 15 muestras con clorobutanol, conforme al "Procedimiento para la determinación de clorobutanol en soluciones oleosas por el método titulométrico", mencionado anteriormente. Al ser valoradas las muestras en su contenido de clorobutanol y tabulados los resultados, se les calculó la desviación estándar, (Tabla No. 15 en el Capítulo de Resultados).

CAPITULO V

RESULTADOS

Resultados sobre Estudio de Linealidad. Método Cromatográfico.

Los resultados del estudio de linealidad se obtuvieron de una solución de clorobutanol sustancia de referencia (Solución B) que contenía 5.302 mg/ml.

Tabla No. 6 Resultados del Estudio de Linealidad por el Método Cromatográfico.

% Nivel ensayado	Concentración Clorobutanol (mg/ml)	Respuesta	Respuesta Promedio
60	0.3182	0.6453 0.6471 0.6466	0.6470
100	0.5302	1.0533 1.0595 1.0522 1.0583	1.0609
120	0.6362	1.2550 1.2619 1.2626 1.2625	1.2632
140	0.7423	1.4641 1.4666 1.4709	1.4679

Los parámetros estadísticos manejados para el tratamiento de datos son los siguientes:

$$\bar{X} = \frac{\sum(X)}{n}$$

$$R.M. = \frac{L + H}{2}$$

$$R = H - L$$

$$D.M. = \frac{\sum(X - \bar{X})}{n - 1}$$

$$s^2 = \frac{\sum(X - \bar{X})^2}{n - 1}$$

$$s = \sqrt{s^2}$$

$$\%RSD = \frac{s}{\bar{X}} \times 100$$

$$t = \frac{\bar{X} - \mu}{s/\sqrt{n}}$$

$$\bar{X} = t(g.l., \alpha/2) \frac{s}{\sqrt{n}}$$

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

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

$$F.S. = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{n(\sum x^2) - (\sum x)^2} \cdot \sqrt{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}}$$

Donde:

\bar{X} = Media

R.M. = Rango medio

D.M. = Desviación media

H = Puntuación más alta

L = Puntuación más baja

n = Número de datos

S^2 = Varianza

S = Desviación Estándar

$\%RSD$ = % Desviación Estándar Relativa

α = Nivel de significación

g.l. = Grados de Libertad

Análisis de Regresión Lineal:

m = Pendiente de la recta de regresión

b = Ordenada al origen de la recta de regresión

F.C. = Factor de correlación de la recta de regresión.

El análisis estadístico para el Estudio de Linealidad se muestra en la Tabla No. 7

Tabla No. 7 Análisis estadístico de regresión lineal sobre los resultados del Estudio de linealidad, usando clorobutanol sustancia de referencia.					
Huestra No.	Conc. (ng/ml) Σx	Resp. Promedio Σy	Σx^2	Σy^2	Σxy
1	0.3182	0.6470	0.1013	0.4187	0.2059
2	0.5302	1.0609	0.2811	1.1255	0.5625
3	0.6362	1.2632	0.4048	1.5957	0.8036
4	<u>0.7423</u>	<u>1.4679</u>	<u>0.5510</u>	<u>2.1547</u>	<u>1.0896</u>
	2.2269	4.4390	1.3381	5.2945	2.6616

a) Ordenada al origen: $b = 0.0323$
 b) pendiente de la recta: $m = 1.9354$
 c) Factor de Correlación: $F.C. = 1.0000$

Resultados del Estudio de Recuperación. Método Cromatográfico.

Los resultados obtenidos en el estudio de Recuperación fueron logrados utilizando el Sistema de Recuperación con Muestra.

La concentración de clorobutanol sustancia de referencia fue de 0.5283 mg/ml, la concentración de clorobutanol en la "Solución A" fue de 2.6162 mg/ml, la concentración de clorobutanol en la preparación farmacéutica empleada fue de 4.9010 mg/ml, determinada en la Sección de "Resultados del Estudio de Repetibilidad del Método Cromatográfico" en el Capítulo de Resultados de este trabajo.

La respuesta cromatográfica de la preparación de clorobutanol sustancia de referencia fue de 1.0201.

Los resultados del Estudio de Recuperación de clorobutanol por el Método Cromatográfico están presentados en la Tabla No. 8; a estos resultados se les aplicó un estudio estadístico para demostrar si los resultados obtenidos, dentro del error experimental indican un porcentaje de recuperación del 100%. Para esto se aplica la Prueba t de Student y se plantean dos hipótesis, nula y alterna, H_0 y H_a respectivamente, con un nivel de significación del 5%.

$$H_0 : \bar{X} = \mu = 100$$

$$H_a : \bar{X} \neq \mu$$

El estudio estadístico Prueba t de Student se presenta en la Tabla No. 9.

Tabla No. 8 Resultados del Estudio de Recuperación de Clorobutanol por el Método de Cromatografía de gases.

Nivel ensayado	R_m	\bar{R}_m	U_1	B_1	B_2	A_2	A_1	R_1	R_2
100	0.9484 0.9472 0.9435	0.9463	0.4900	24.500	24.505	-----	-----	-----	99.98
110	1.0329 1.0379 1.0348	1.0352	0.5361	26.805	27.1200	2.6162	2.3010	87.95	98.84
120	1.1432 1.1462 1.1442 1.1430	1.1441	0.5925	29.625	29.7350	5.2324	5.1200	97.85	99.63
130	1.2475 1.2463 1.2478	1.2471	0.6459	32.295	32.3550	7.8486	7.7900	99.25	99.81
140	1.3612 1.3687 1.3629	1.3642	0.7065	35.325	34.9700	10.4648	10.820	103.39	101.10
150	1.4335 1.4291 1.4311	1.4329	0.7421	37.105	37.585	13.0810	12.600	96.32	98.81

$$R_s = 1.0201$$

$$V_2 = 5 \text{ ml}$$

$$C_2 = 4.9010 \text{ mg/ml}$$

$$U_s = 0.5283 \text{ mg/ml}$$

$$C_3 = 2.1152 \text{ mg/ml}$$

Donde:

- B_2 Masa de clorobutanol total añadida en la preparación, expresada en miligramos.
- A_2 Masa de clorobutanol sustancia de referencia añadida en la preparación, expresada en miligramos.
- B_1 Masa de clorobutanol total encontrada en la preparación, expresada en miligramos.
- A_1 Masa de clorobutanol sustancia de referencia encontrada en la preparación, expresada en miligramos.
- C_1 Concentración de clorobutanol encontrada en la preparación, expresada en mg/ml.
- R_m Relación del área integrada del pico de clorobutanol al área integrada del pico de benzaldehído en la muestra.
- \bar{R}_m Relación promedio de R_m .
- R_1 Porcentaje de recuperación de clorobutanol sustancia de referencia encontrado en la preparación.
- R_2 Porcentaje de recuperación de clorobutanol total encontrado en la preparación.

Tabla No. 9 Análisis estadístico de los resultados del Estudio de Recuperación de Clorobutanol por Cromatografía de Gasen - aplicando el criterio de t de Student.

	X	\bar{X}	$(X-\bar{X})^2$	S^2	S	t*	t(g.l., $\alpha/2$)
R ₁	484.75	36.95	129.0	32.25	5.68	1.200	4.776
R ₂	438.11	33.62	3.26	0.81	0.90	0.941	2.571

Conclusión: Puesto que el valor de t calculado, t*, es menor que el valor correspondiente obtenido de tablas, t; se acepta la hipótesis nula, es decir, podemos considerar que el porcentaje de recuperación obtenido por el Método Cromatográfico en la determinación de clorobutanol en preparaciones farmacéuticas oleosas no es significativamente diferente de 10%.

Con los resultados de recuperación de clorobutanol obtenidos se efectuó un estudio de linealidad para comparar contra los resultados del Estudio de Linealidad obtenidos empleando clorobutanol sustancia de referencia. Los resultados se muestran en las tablas Nos. 10 y 11.

Tabla No. 10 Análisis estadístico de regresión lineal de los Resultados del Estudio de Recuperación de Clorobutanol por Cromatografía de Gases.

§ Nivel ensayado	Conc. (mg/ml) X	Resp. Promedio Y	X ²	Y ²	XY
100	0.4900	0.9463	0.2401	0.8954	0.4637
110	0.5361	1.0352	0.2874	1.0716	0.5550
120	0.5325	1.1441	0.3511	1.3030	0.6779
130	0.6457	1.2471	0.4169	1.5552	0.8052
140	0.7065	1.3642	0.4991	1.8610	0.9638
150	0.7421	1.4329	0.5507	2.0532	1.0634
	<u>3.7131</u>	<u>7.1098</u>	<u>2.3456</u>	<u>6.7456</u>	<u>4.5292</u>

a) Ordenada al origen: $b = 0.0303$
 b) Pendiente de la Recta: $m = 1.9309$
 c) Factor de correlación: F.C. = 1.0000

Tabla No. 11 Comparación de Análisis de regresión lineal aplicado a los Resultados obtenidos en los estudios de recuperación y linealidad en clorobutanol por el Método de Cromatografía de gases.

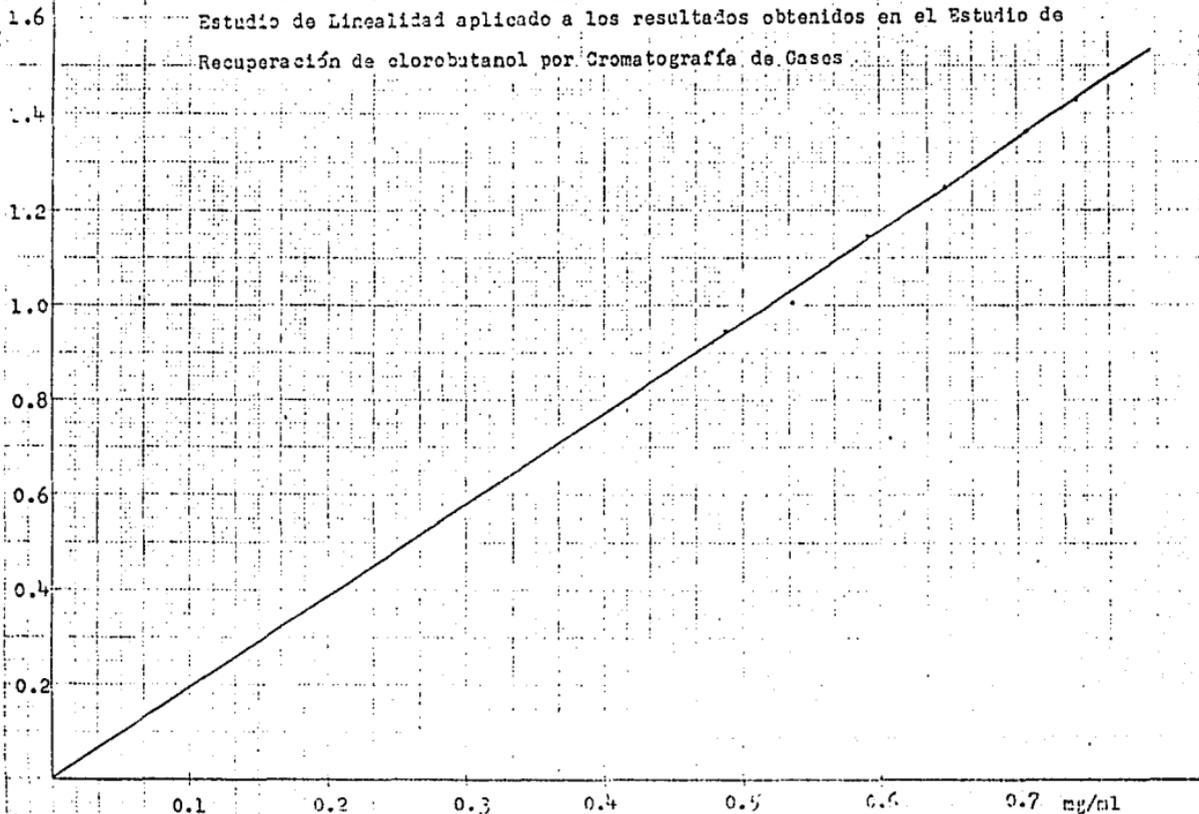
	Pendiente de la recta de regresión	Ordenada al origen de la recta de regresión	Factor de Correlación
Estudio de Linealidad	1.9354	0.0323	1.0000
Estudio de Recuperación	1.9303	0.0003	1.0000

Gráfica No. 1

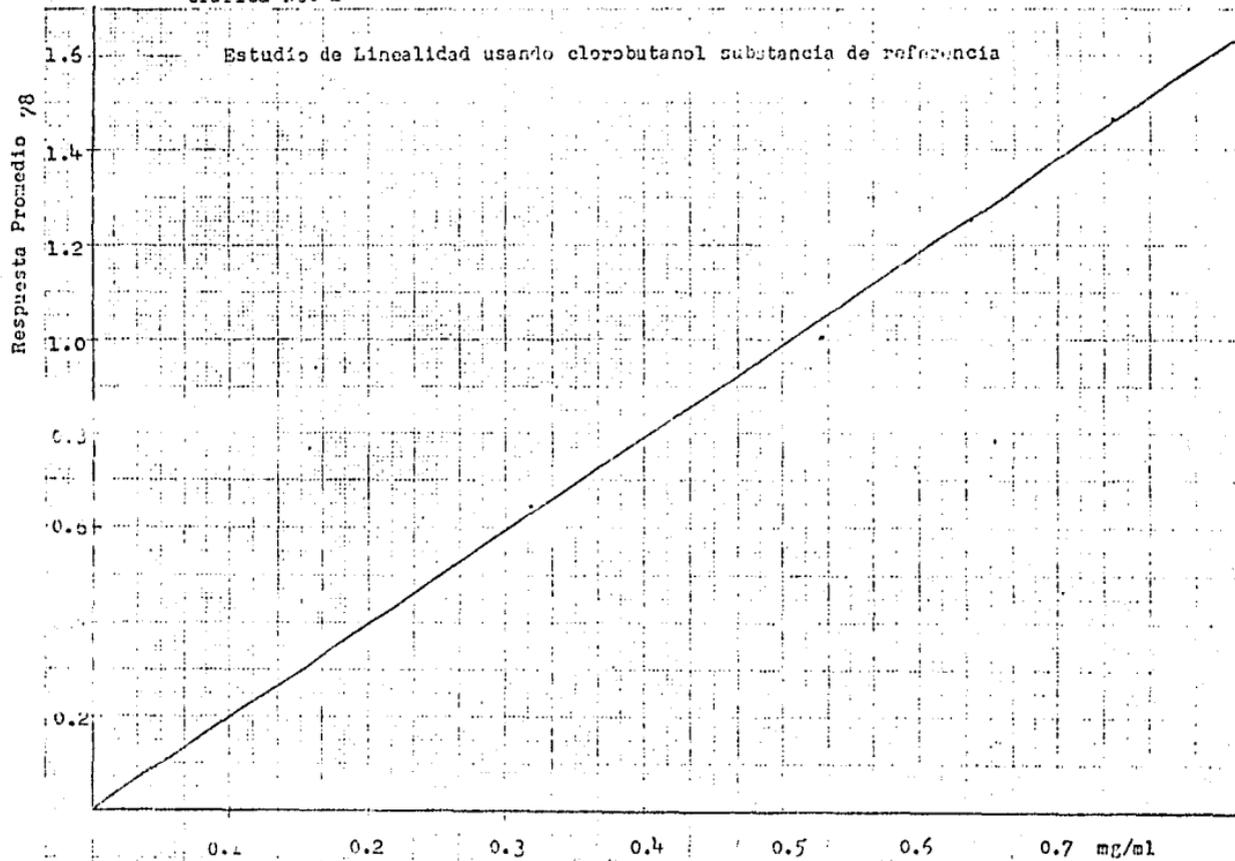
77

Respuesta Promedio

Estudio de Linealidad aplicado a los resultados obtenidos en el Estudio de
Recuperación de clorobutanol por Cromatografía de Gases



Gráfica No. 2



Resultados del Estudio de Repetibilidad. Método Cromatográfico.

Los resultados del estudio de repetibilidad por el Método Cromatográfico, se obtuvieron empleando clorobutanol sustancia de referencia a una concentración de 0.5302 mg/ml con una respuesta cromatográfica R_f de 1.0201.

Los resultados del estudio de repetibilidad del Método Cromatográfico se muestran en la Tabla No. 12.

Resultados del Estudio de Repetibilidad. Método Titulométrico.

Los resultados del Estudio de Repetibilidad para la determinación de clorobutanol en preparaciones farmacéuticas oleosas, se obtuvieron empleando solución 0.1026 N de nitrato de plata y solución 0.1073 N de tiocianato de amonio como titulante, la alícuota de muestra utilizada fue de 20 ml. Los resultados se muestran en la Tabla No. 13.

Estudio comparativo de métodos.

Para investigar la relación entre varianzas de dos poblaciones estadísticas, se emplea el concepto de la distribución F. Esta inferencia estadística permite comparar si existe una diferencia significativa entre las varianzas obtenidas de los datos provenientes de dos métodos o sistemas de análisis diferentes. De existir una diferencia significativa, esta debe provenir de una desigualdad en los promedios respectivos de estos dos métodos.

Para comprobar dicha desigualdad se aplica la Prueba t de Student.

En el caso particular de este trabajo se quiere comprobar si

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

Tabla No. 12 Resultados del Estudio de Repetibilidad para la determinación de clorobutanol por el Método de Cromatografía de Gases.

Muestra No.	Análisis No.	Respuesta R_m	Clorobutanol ($\mu\text{g/ml}$)
1	1	0.9413	4.8324
	2	0.9451	4.8122
	3	0.9444	4.8085
	4	0.9443	4.8080
	5	0.9437	4.8043
2	1	0.9449	4.8030
	2	0.9429	4.8008
	3	0.9460	4.8168
	4	0.9423	4.8076
	5	0.9405	4.8083
3	1	0.9493	4.8820
	2	0.9454	4.8137
	3	0.9445	4.8091
	4	0.9413	4.8324
	5	0.9433	4.8028
$\bar{X} = 4.9010 \text{ mg/ml}$ $R.M. = 0.0135 \text{ mg/ml}$ $R = 0.0270 \text{ mg/ml}$ $D.M. = 0.0000 \text{ mg/ml}$ $S^2 = 0.0001107$ $S = 0.0105214 \text{ mg/ml}$ $\text{M.S.D.} = 0.2146$			
Intervalo de confianza para la estimación de la media	a) Con un nivel de confianza del 95%	(4.901 ± 0.006)	
	b) Con un nivel de confianza del 99%	(4.901 ± 0.008)	
Límites de tolerancia para la estimación de la media	a) Con un nivel de confianza del 95%	(4.901 ± 0.023)	
	b) Con un nivel de confianza del 99%	(4.901 ± 0.031)	

Tabla No. 13 Resultados del Estudio de Repetibilidad para la determinación de clorobutanol por el Método Titulométrico.

Muestra No.	Vol. Eco. V_B (ml)	Vol. Mta. V_M (ml)	Clorobutanol ($\mu\text{g/ml}$)
1	23.8	8.3	4.9156
2	23.8	8.3	4.9156
3	23.8	8.2	4.9476
4	23.7	8.4	4.8522
5	23.8	8.3	4.9156
6	23.8	8.3	4.9156
7	23.8	8.3	4.9156
8	23.8	8.2	4.9474
9	23.7	8.4	4.8522
10	23.8	8.1	4.9790
11	23.8	8.4	4.8839
12	23.8	8.3	4.9156
13	23.8	8.2	4.9474
14	23.8	8.4	4.8839
15	23.8	8.3	4.9156
$\bar{X} = 4.9135 \text{ mg/ml}$ R.M. = 0.0034 mg/ml R = 0.1268 mg/ml D.M. = 0.0000 mg/ml $S^2 = 0.001217$ S = 0.03483 mg/ml $\%MSD = 0.7032$			
Intervalo de confianza para estimación de la media	a) Con un nivel de confianza del 95%	(4.914 \pm 0.019)	
	b) Con un nivel de confianza del 99%	(4.914 \pm 0.104)	
Límites de Tolerancia para la estimación de la media	a) Con un nivel de confianza del 95%	(4.914 \pm 0.075)	
	b) Con un nivel de confianza del 99%	(4.914 \pm 0.104)	

existe una diferencia significativa entre los resultados obtenidos por los los métodos de análisis (cromatográfico y titulométrico), en la determinación de clorobutanol en preparaciones farmacéuticas inyectables de tipo oleoso.

a) Aplicación de la Prueba de F a los resultados obtenidos en la determinación de clorobutanol por los métodos cromatográfico y titulométrico.

Para efectuar la Prueba de F se propone una hipótesis nula que supone que la varianza del Método Cromatográfico es igual a la del Método Titulométrico y una hipótesis alterna que supone que ambas varianzas son diferentes; además se considera un nivel de significación del 95%.

$$H_0 : S_c^2 = S_t^2 \quad S_c^2 = 0.0001$$

$$H_a : S_c^2 \neq S_t^2 \quad S_c^2 = 0.0012$$

El valor de F calculado con los datos de varianza de ambos métodos es:

$$F = \frac{0.0012}{0.0001} = 12.0000$$

El valor de F obtenido de tablas estadísticas es de:

$$F(14,14,0.025) = 2.95$$

Conclusión: Puesto que el valor de F calculado es mayor que el valor correspondiente obtenido de tablas, se rechaza la hipótesis nula; es decir, que la varianza de ambos métodos y por lo tanto la precisión, son significativamente diferentes.

b) Aplicación de la Prueba de t de Student a los resultados obtenidos en la determinación de clorobutanol por los métodos Cromatográfico y Titulométrico.

Para efectuar la Prueba t de Student en la comparación entre las medias de los resultados de determinación de clorobutanol por los Métodos de análisis Cromatográfico y Titulométrico, se propone una hipótesis nula que supone que los promedios obtenidos por ambos métodos de análisis son iguales y una hipótesis alterna que supone que los promedios obtenidos por ambos métodos de análisis son diferentes entre sí, considerando un nivel de significación del 5%:

$$H_0 : \mu_c = \mu_t$$

$$H_a : \mu_c \neq \mu_t$$

$$s_t^2 = 0.0012$$

$$\bar{x}_t = 4.9135$$

$$s_c^2 = 0.0001$$

$$\bar{x}_c = 4.9010$$

El valor de t obtenido con los valores correspondientes es:

$$g.l. = \left[\frac{(s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2)^2}{(s_1^2/n_1)/(n_1 + 1) + (s_2^2/n_2)/(n_2 + 1)} \right] - 2$$

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{(s_1^2/n_1) + (s_2^2/n_2)}}$$

$$g.l. = 17$$

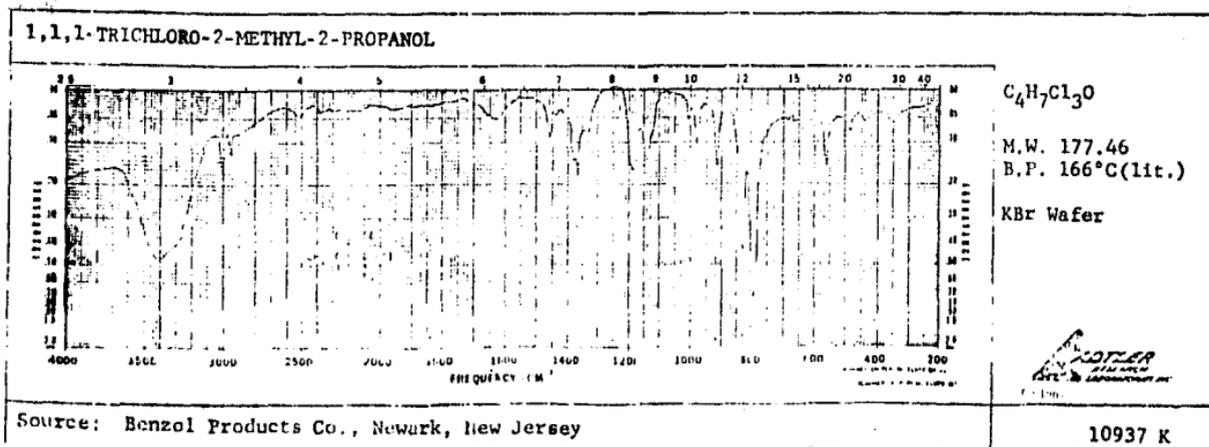
$$t = 1.3287$$

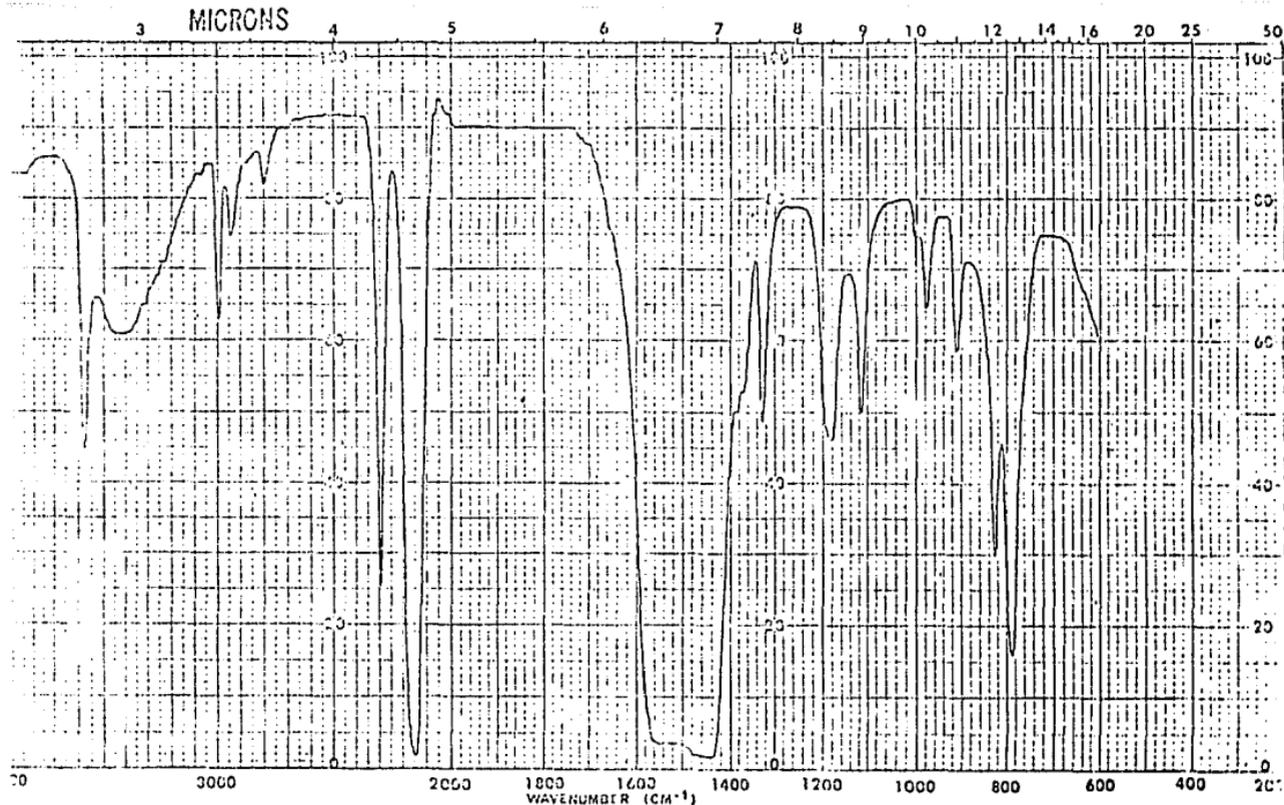
El valor de t obtenido de tablas estadísticas es de:

$$t(17, 0.025) = 2.110$$

Conclusión: Puesto que el valor de t calculado es menor que el valor correspondiente obtenido de tablas, no se rechaza la hipótesis nula; lo cual equivale a decir que las dos medias no son significativamente diferentes en ambos métodos de análisis.

Ilustración No. 1 Espectro de Absorción Infrarrojo de clorobutanol del
 Catálogo de Espectrogramas Infrarrojo del Sadtler
 Research Laboratories.





Sample No. 2
 100% m. absorbance infra-
 red spectrum
 Perkin Elmer U.S.A.

SOLVENT CS₂
 CONC. 2.0g/100ml
 CELL PATH
 REFERENCE

SCAN 3 min
 SLIT 0.16
 OPERATOR W. J. P.
 DATE 2-5-72

SINGLE II.
 T.D. SPED.
 ORD. EXP. 0.5
 T. COND.
 SCL. No. 135

REMARKS

86

PERKIN ELMER

No. 5102-1000

MICRONS

3 4 5 5 7 8 9 10 12 14 16 20 25

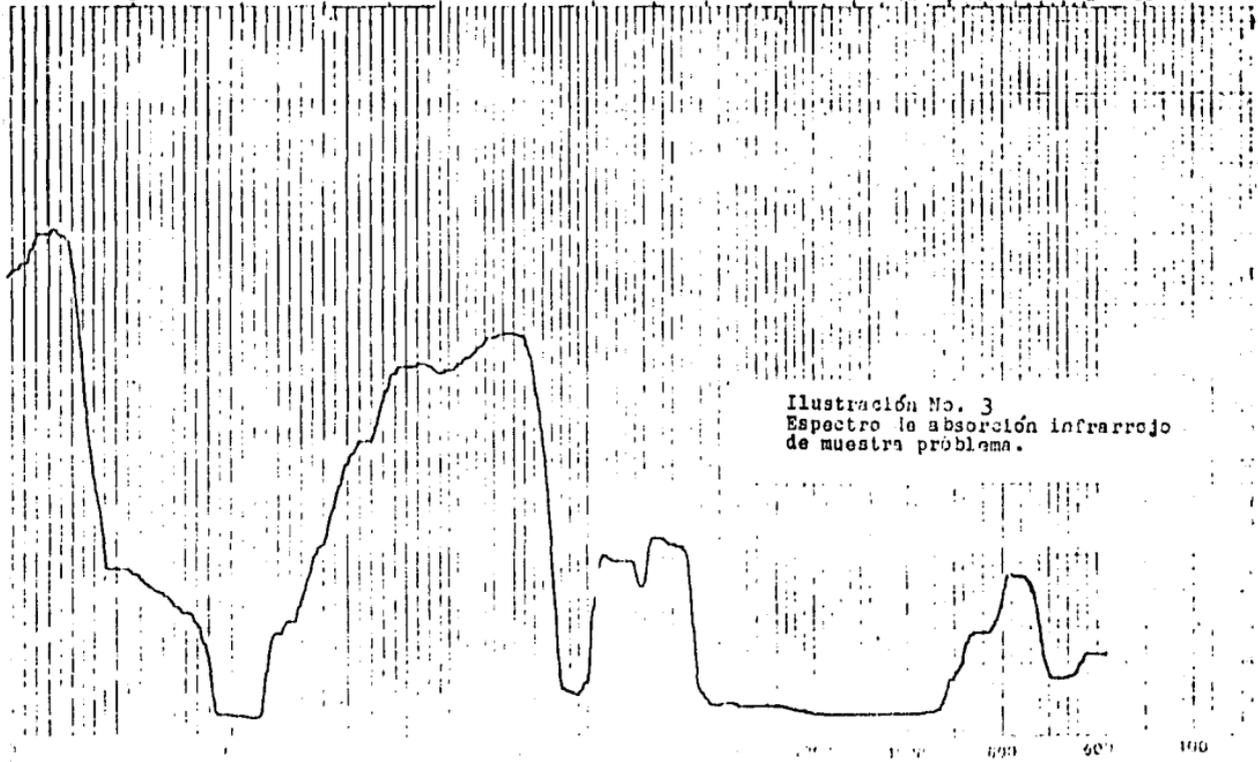


Ilustración No. 3
Espectro de absorción infrarrojo
de muestra problema.

Neo Sec Forte
Lote HY-453

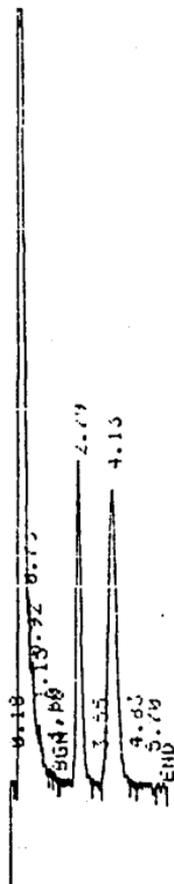
Directo
1 : 50
1 mm

Wide
RBL
8 Agosto 85

3 min.
0.5

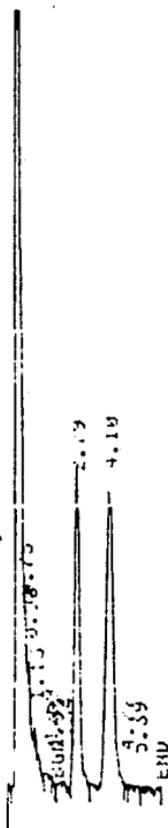
Aparato:
Perkin-Elmer
Mod. 1320

Ilustración No. 4



Cromatograma de clorobutanol Substancia de Referencia U.S.P.
determinado en Cromatógrafo de Gases Perkin-Elmer Sigma 1B.

Ilustración No. 5



Cromatograma de llorobutanol en muestra problema consistente de una preparación farmacéutica oleosa comercial de Neo Sec-Forte, Lote NY-453 (Proporcionada por Laboratorios Upjohn - S.A. de C.V.), determinado en Cromatógrafo de gases Perkin-Elmer Sigma 1B.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

Los resultados del estudio de determinación de clorobutanol en preparaciones farmacéuticas inyectables de tipo oleoso por el Método de Cromatografía de Gases demuestran que:

- 1) El intervalo de respuesta lineal para la determinación de clorobutanol por Cromatografía de Gases es de 0.3 a 0.7 mg/ml, demostrado por estudios de linealidad y recuperación.
- 2) Los resultados del estudio de recuperación demuestran una recuperación cuantitativa en el intervalo de concentraciones de 0.5 a 0.75 mg/ml.
- 3) El estudio de repetibilidad demuestra que el método es preciso, al obtenerse una desviación estándar relativa menor de 2%.
- 4) Los resultados del estudio comparativo de los métodos de determinación de clorobutanol por cromatografía de gases y titulométrico respectivamente, demuestran que el método de cromatografía de gases (Método de Prueba), es más preciso que el método titulométrico (Método de referencia), al realizarle la Prueba estadística de F, y que los resultados obtenidos por ambos métodos pueden considerarse como significativamente idénticos dentro de las variaciones propias del error experimental, al practicarles la in

ferencia estadística Prueba t de Student.

Además, la concordancia en el contenido de clorobutanol por los dos métodos de análisis, como lo demostró la Prueba estadística t de Student, comprueban que el Método de Cromatografía es exacto.

Por lo anterior, el Método de Cromatografía de Gases puede emplearse como método rutinario de análisis en la determinación de clorobutanol, en preparaciones farmacéuticas inyectables de tipo oleoso.

Bibliografía

- 1) The United States Pharmacopeia, 20 th edition, 1980, pág. 221.
- 2) Lachman L. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy, 2 nd. edition, Lea & Febiger, Philadelphia, 1976, pág. 586 - 591.
- 3) Briggs A.M. Quart. J. Pharm. Pharmacol., 14, 127, (1941)
- 4) Taub W.H., J. Am. Pharm. Assoc., 32, 28, 1943.
- 5) Gershenfeld L. Amer. Jour. Pharm. November, 1952, pág. - 362 - 366.
- 6) Desire L. Masart. Evaluation and Optimization of Laboratory Methods and Analytical Procedures. Elsevier Scientific Publishing Company, 1978, pág. 7 - 21, 39 - 57, 87 - 90.
- 7) Analytical Chemistry, Guide for use of terms in reporting data. Anal. Chem., 47, (1955), 2527.
- 8) International Organization for Standardization, ISO/TC, 69, 1966.
- 9) Guerra Johnny. Validation by FDA. Pharmaceutical Techn. Vol. 10, No. 3, pág. 76 - 84.
- 10) John L. Lach. J. of the Amer. Pharm. Assoc., Vol. XLVII, No. 1, Jan. 1958, pág. 46 - 48.
- 11) Hobbs R. J. J. Pharm. Pharmacol., 1979, 31, Suppl., 58 p.
- 12) Denney R.C. et al. Vogel's Text Book of quantitative - Inorganic Analysis, 4 th edition, Longman, 1978, pág. - 342 - 343.

- 13) Rehm R. J. J. Am. Pharm. Assoc., Vol XLVI, No. 10, Oct. 1957, pág. 621 - 623.
- 14) Chafetz L. J. of Pharm. Sci., Vol. 54, No. 12, Dec. 1965, pág. 1805 - 1808.
- 15) Eisman P.C. J. Pharm. Sci., Vol. 52, No. 2, Feb., 1963, pág. 183 - 185.
- 16) Dunn Danny L. J. Pharm. Sci., Vol. 72, No. 3, March 1983, pág. 277 - 280.
- 17) Koshy K. T. Pharm. Sci., Vol. 56, No. 2, Feb. 1967, - pág. 269 - 271.
- 18) Kolthoff I. M. Quantitative Chemical Analysis, 4 th edition, The Mac Millan Company, London, 1969, pág. 722 - 725.
- 19) Rowland F. W. La Práctica de la Cromatografía de Gases, 2a. edición, Hewlett Packard, 1977, pág. 1 - 6, 98 - 116.
- 20) Merck Index. Ninth edition, Merck & Co. Inc. Rahway N. J. USA, 1976, pág. 270.
- 21) VI Hungarian Pharmacopeia, Vol. 2, 1970, Budapest, pág. 233 - 235.
- 22) Martindale. The Extra Pharmacopeia, 26 th edition London The Pharmaceutical Press, 1972, pág. 1527 - 1529.
- 23) FDC Report ("The Pink Sheet", Vol. 42, No. 15, PT & G - 10), Publ. Yr. Apr 14, 1980.
- 24) Weiner S.J. Pharm. and Pharmacol., 7, 118, (1955).
- 25) Siddell D. F. Bull. Parenteral Drug Assoc. 8, 17, (Nov - Dec., 1954).
- 26) Murphy J.T. A.M.A. Archives of Pphtalmology, 53, 63, -

(1955).

- 27) Meir A. D. J. Pharm. Assoc. Vol. XLVIII, No. 7, Jul., 1959, pag. 390 - 395.
- 28) Somylo & Somylo. J. Pharm. Pharmacol. Suppl. 16, 124 - 126, (1964).
- 29) Somylo A. V. Am. J. Physiol. 208: 748 - 753, 1965.
- 30) Bellither Ann. Canadian Journal of Physiol. and Pharm. Vol. 47, 1969, pag. 223 - 226.
- 31) Lachmann L. J. Pharm. Sci., Vol. 51, No. 3 March 1962, pag. 224 - 232.