



6
29
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"**

**DETERMINACION CUANTITATIVA DE
ACETAZOLAMIDA POR CROMATOGRAFIA
DE LIQUIDOS A ALTA PRESION.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

MANUEL M. CALDERON MARTINEZ



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

JULIO, 1990



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.

INDICE

	Pag.
<u>INTRODUCCION.</u>	1
I. <u>GENERALIDADES.</u>	3
A. <u>ASPECTOS BASICOS SOBRE CLAP.</u>	
1. Marco histórico.	3
2. Cromatografía de líquidos clásica-CLAP.	4
3. Ventajas y limitaciones de la CLAP.	6
4. Tipos de CLAP.	7
5. Proceso cromatográfico.	9
6. Definiciones.	13
7. Instrumental.	15
8. Análisis cualitativo y cuantitativo.	25
B. <u>VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.</u>	29
C. <u>MONOGRAFIA.</u>	37
II. <u>PARTE EXPERIMENTAL.</u>	41
A. <u>DETERMINACION DE ACETAZOLAMIDA EN TABLETAS.</u>	41
B. <u>VALIDACION ESTADISTICA DEL METODO.</u>	45
III. <u>RESULTADOS.</u>	47
IV. <u>DISCUSION.</u>	65
V. <u>CONCLUSIONES.</u>	66
<u>BIBLIOGRAFIA.</u>	67

INTRODUCCION

El objetivo principal en la industria farmacéutica es presentar al público un producto en óptimas condiciones, y que éste se mantenga así durante un periodo de tiempo determinado; con ello puede asegurarse que la dosis efectiva del fármaco se mantendrá, que no se produzcan reacciones degradativas que traigan como consecuencia el peligro de formación de compuestos tóxicos, que la apariencia del producto se conservará; y sobre todo, que el producto cumplirá con el efecto terapéutico esperado.

Para conseguir este objetivo, es fundamental el contar con métodos analíticos específicos que permitan determinar que le sucede al medicamento al ser sometido a condiciones fisicoquímicas que aceleren la degradación, tanto del fármaco como de los excipientes de la formulación, durante un estudio de estabilidad.

De esta manera, surge como una necesidad el desarrollar nuevas técnicas y métodos analíticos capaces de eliminar las posibles interferencias analíticas ocasionadas por los excipientes y productos de degradación, del fármaco o de los excipientes. Una de las alternativas más viables es la cromatografía de líquidos a alta presión, CLAP, ya que con esta técnica pueden desarrollarse métodos analíticos muy sensibles, específicos, reproducibles y rápidos.

Las ventajas que ofrece actualmente la cromatografía de líquidos a alta presión pueden ser aplicadas para la cuantificación del compuesto Acetazolamida, diurético inhibidor de la enzima anhidraza carbónica utilizado en el tratamiento de glaucoma, enfermedad caracterizada por alta presión intraocular. Oficialmente, la determinación de acetazolamida en soluciones parenterales y tabletas se realiza por espectroscopia ultravioleta¹ y polarografía² respectivamente.

Actualmente, existen publicados varias técnicas para su determinación por cromatografía de gases y de líquidos a alta presión en fluidos biológicos^{3,4,5,6,7,8,9}, sin embargo, no ha sido comprobada su especificidad frente a productos de degradación y tampoco han sido aplicados a formas farmacéuticas. Por ello, que la finalidad de este trabajo sea el desarrollar y validar estadísticamente un método analítico que sea específico para la cuantificación de acetazolamida en tabletas por cromatografía de líquidos a alta presión.

I. GENERALIDADES

A. ASPECTOS BASICOS SOBRE CLAP

1. MARCO HISTORICO^{10,11,12.}

La cromatografía tuvo sus inicios en 1850 con la separación de anilinas por F.F. Runge¹⁰. En el proceso utilizó papel filtro y un solvente para lograr la separación de varios colorantes.

En 1905, Ramsey¹¹ utilizó técnicas cromatográficas para separar mezclas de gases y vapores. Al año siguiente el botánico ruso Tswett^{10,11} empleó la cromatografía de elución para la separación de extractos vegetales. A este proceso lo llamó separación de tintas, de ahí el origen de la palabra cromatografía que, literalmente, significa escritura de color. Esta técnica permaneció ignorada hasta 1930 cuando el sueco Tselius¹¹ y sus colaboradores introdujeron dos técnicas de elución, el "análisis frontal" y el "análisis por desplazamiento".

En 1941, Martin y Synge^{10,11} sugirieron la posibilidad de utilizar un gas como fase móvil, pero esto solo quedó en un proyecto. En ese mismo año, ellos introdujeron la cromatografía de reparto, técnica que

evolucionó llegando a ser lo que ahora se conoce como cromatografía en papel.

Para 1952, Martín y James^{10,11} son los primeros en describir un cromatógrafo de gases; técnica analítica que a la postre se ha convertido en una de las más útiles para el análisis de gases y compuestos orgánicos volátiles. Pero el verdadero potencial de este logro se alcanzó hasta 1954 cuando Ray¹⁰ describe el primer cromatograma.

Fue hasta 1967-1969 cuando se produjeron avances considerables en la cromatografía de líquidos, los dos más relevantes fueron; la introducción de altas presiones y el desarrollo de sistemas de detección continua. Otro suceso de importancia fue, la descripción del primer cromatograma para cromatografía de líquidos a alta presión realizado por Kickland, Huber, Preiss y Lispk¹².

A partir de entonces, esta técnica ha evolucionado rápidamente dentro del campo farmacéutico debido a la versatilidad de su aplicación, el aumento considerable de instrumentos para realizarla y la gran cantidad de publicaciones que aparecen día a día. En la actualidad esta técnica constituye una herramienta indispensable en el área de control de calidad, desarrollo farmacéutico, control de procesos y química clínica.

2. CROMATOGRAFIA CLASICA - CLAP ^{11,13,14}.

Cuando hablamos de cromatografía de líquidos nos referimos a todos los procedimientos en los cuales la fase móvil es un líquido. La cromatografía en columna tradicional (adsorción, partición, intercambio iónico) consiste básicamente en un sistema compuesto por una columna de vidrio

de diámetro variable, rellena de un material cuyo tamaño de partícula es cercano a los 200 μm .

La muestra se disuelve en la fase móvil o un solvente apropiado adicionándose por medio de una pipeta o gotero, luego se agrega fase móvil para que la muestra eluya a través de la columna, la cantidad de muestra es variable. La fase móvil fluye a lo largo de la columna por efecto de la gravedad produciéndose una débil presión ejercida por el volumen adicionado a la columna. Los componentes de la muestra que eluyen de la columna son recolectados en fracciones de volumen para luego ser identificados y cuantificados por alguna técnica auxiliar como espectrofotometría, análisis químico etc.

En contraste en CLAP se utilizan columnas de longitud y diámetro muy reducidos, rellenas de materiales especiales cuyas partículas tienen un tamaño que con frecuencia es de 3 a 10 μm . Este tipo de materiales proporciona una gran superficie de contacto traduciéndose esto en mayor eficiencia, sin embargo, ofrece una gran resistencia al flujo de la fase móvil. Por ello, es necesario emplear sistemas de bombeo a alta presión que hagan fluir la fase móvil a una velocidad razonable para un análisis de rutina.

La cantidad de fase estacionaria dentro de la columna es pequeña, por lo que se requiere que la muestra también sea pequeña, generalmente no mayor a 50 μg . La muestra se introduce al sistema a través de una válvula de inyección mediante una jeringa; un detector colocado a la salida de la columna proporciona un registro continuo de la composición del líquido permitiendo identificar y cuantificar los componentes de la muestra.

Las diferencias en cuanto a instrumental utilizado dan como resultado las ventajas que esta técnica tiene en comparación con la cromatografía clásica.

3. VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LA CLAP^{11,13}.

A continuación son señaladas las ventajas que han llevado a la CLAP a ser una de las técnicas más utilizadas hoy en día.

a. Diversidad de aplicación. Existen dos requerimientos básicos en cromatografía de líquidos; que la muestra sea soluble en la fase móvil y, encontrar la fase estacionaria adecuada que separe selectivamente los compuestos de la muestra. Esto en teoría siempre es posible, por ello, que la CLAP muestra una amplia versatilidad en su aplicación; con esta técnica pueden analizarse compuestos orgánicos como inorgánicos, sustancias sólidas o líquidas, iónicas o covalentes, muestras de peso molecular bajo o alto.

b. Velocidad de análisis. En CLAP se utilizan columnas de alta eficiencia y sistemas de bombeo a alta presión que originan flujos rápidos y continuos, ésto se traduce en separaciones rápidas. Con esta técnica es común obtener separaciones en término de minutos.

c. Poder de resolución. Otra ventaja es la alta resolución que es posible obtener y que permite la separación de mezclas muy complejas. Por ejemplo, la separación de compuestos con estructuras muy parecidas obtenidos de extractos vegetales; o bien, la identificación y cuantificación de fármacos en fluidos biológicos.

d. Alta sensibilidad. La sensibilidad es un parámetro que nos da una idea clara de la cantidad mínima detectable. Los detectores comúnmente empleados en CLAP proporcionan una alta sensibilidad ya que son capaces de detectar nanogramos (10^{-9} g).

e. Automatización. Hoy en día es posible automatizar los instrumentos empleados en CLAP de manera que realicen progresivamente varios análisis completos desde el momento en que se introduce la muestra hasta la impresión de los resultados. La identificación de cada señal se realiza comparando sus tiempos de retención con valores previamente determinados para soluciones estándar; la cuantificación por medio de la integración de las señales. La automatización ha sido posible gracias a la introducción de automuestreadores y microprocesadores electrónicos .

Al igual que toda técnica analítica, la CLAP tiene algunas limitaciones; el instrumental es costoso, no existiendo un detector que al mismo tiempo sea sensible y universal. El detector de índice de refracción proporciona una respuesta universal pero su sensibilidad es limitada, por otro lado, el detector de luz UV es más sensible pero de respuesta selectiva.

Otra limitante importante, es que el personal cuenta con el adiestramiento necesario para el manejo del instrumento , además de experiencia en la aplicación de esta técnica analítica.

4. TIPOS DE CLAP^{11,13,16.}

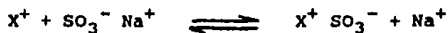
Los mecanismos o procesos de separación que originan la retención de las moléculas de la muestra en la fase estacionaria dan lugar a los diferentes tipos o formas en que puede realizarse la CLAP.

a. Cromatografía líquido-líquido o de partición. Su mecanismo de separación se basa en la distinta solubilidad

que presentan las moléculas entre la fase móvil y estacionaria.

b. Cromatografía líquido-sólido o de adsorción. En este caso, la separación se debe a la competencia efectuada entre las moléculas de la muestra y las de la fase móvil por ocupar los sitios activos de una partícula con gran área de superficie.

c. Cromatografía de intercambio iónico. En ella, la fase estacionaria contiene grupos iónicos fijos como SO_3^- ; por otro lado, la fase móvil contiene iones de carga opuesta en forma de sales. De esta manera, se establece una competencia entre las moléculas de muestras iónicas y la fase móvil, por los grupos activos de una resina intercambiadora de iones. Esto puede expresarse de la siguiente manera:



d. Cromatografía de exclusión molecular. En esta ocasión la fase estacionaria es un material poroso cuyo tamaño de poro está definido. Así, las moléculas que son demasiado grandes para el poro salen rápidamente de la columna mientras que las pequeñas permanecen en los poros prolongando su tiempo de elución, es decir, la separación se realiza por diferencias en el tamaño molecular.

Existe una modificación a los tipos de cromatografía mencionados, en esta variante la fase estacionaria se encuentra químicamente unida a un soporte. Si se modifica la naturaleza de los grupos funcionales en la fase estacionaria, esta variante adopta dos modalidades; la cromatografía en fase normal y la cromatografía en fase inversa. En la primera, se utilizan empaques con grupos funcionales polares como el grupo amino $-\text{NH}_2$ y el nitrilo $-\text{CN}$, siendo la fase móvil no polar.

En cambio, la cromatografía en fase inversa implica una fase estacionaria poco polar como cadenas de hidrocarburos de 8 y 18 carbonos, grupo octilo y octadecilo, unidas a los grupos silano del soporte. La fase móvil está compuesta muy a menudo por mezclas de solventes polares y agua.

5. PROCESO CROMATOGRÁFICO^{13,14,16.}

La cromatografía de líquidos es una técnica de separación basada en la distribución de los compuestos de una muestra entre dos fases, una estacionaria con gran área de superficie y otra móvil líquida que fluye a través de la estacionaria. Cuando la mezcla de compuestos se adiciona a la fase móvil, cada uno de ellos establece equilibrios entre ambas fases reteniéndose selectivamente en la estacionaria. Esto origina que el grado de movimiento de cada compuesto sea diferente, como resultado, los compuestos de la mezcla son separados.

Hay dos factores que determinan la eficiencia en la separación de los compuestos; la migración diferencial y la dispersión molecular.

La migración diferencial o movimiento individual de los compuestos, depende del equilibrio de distribución de cada uno de los compuestos entre la fase móvil y estacionaria. De tal manera que la migración diferencial está determinada por todas aquellas variables que afecten el equilibrio de distribución; la composición de la fase móvil, la composición de la fase estacionaria y la temperatura de separación.

La figura 1 muestra el resultado de los equilibrios de distribución para los compuestos A y B entre fase móvil y estacionaria. En ella se ilustra como el compuesto B presenta un equilibrio desplazado hacia la fase estacionaria con una pequeña fracción de moléculas en la fase móvil, caso contrario de lo observado para el compuesto A. Esto traerá como consecuencia que el compuesto A migre más rápidamente separándose paulatinamente del compuesto B.

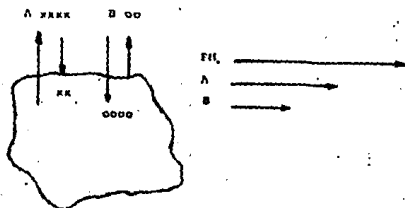


Fig. 1 Migración Diferencial.

El segundo factor determinante en el proceso cromatográfico, la dispersión molecular, es el resultado de los siguientes procesos físicos.

a. Difusión de Eddy. Es originada por los diferentes flujos microscópicos que la fase móvil sigue entre las partículas empacadas en la columna, como resultado, las moléculas de la muestra toman diferentes caminos entre el empaque, la difusión aumenta progresivamente a medida que la fase móvil atraviesa la columna.

En la figura 2 (a), se ilustra por medio de flechas el efecto de la difusión de Eddy sobre las moléculas de una muestra.

b. Transferencia de masa en la fase móvil. Este proceso físico se da por las diferencias originadas en el flujo al pasar éste entre dos partículas vecinas. En la figura 2 (b), se muestra el flujo entre dos partículas, se advierte que la fase móvil adyacente a las partículas se mueve lentamente. En consecuencia, las moléculas cercanas a las partículas de fase estacionaria se desplazan distancias cortas, mientras las moléculas en el centro del flujo lo hacen a una mayor distancia.

c. Transferencia de masa en la fase móvil estancada. Las partículas empleadas para el empaque de la columna presentan poros, la fase móvil contenida en ellos se encuentra casi sin movimiento y por ello se denomina fase móvil estancada. En la figura 2 (c), se representa esquemáticamente lo que ocurre en el poro de una partícula; las moléculas de la muestra se mueven hacia dentro y fuera del poro por difusión. Las primeras moléculas difunden una gran distancia dentro del poro y cuando retornan a la fase móvil lo hacen lentamente trasladándose una cierta distancia dentro de la columna; las moléculas que difunden posteriormente dentro del poro emplean menor tiempo dentro de él al encontrarlo saturado, por consiguiente retornan rápidamente a la fase móvil teniendo un desplazamiento diferente.

d. Transferencia de masa en la fase estacionaria. Después que las moléculas de la muestra difunden dentro del poro, establecen interacciones con la fase estacionaria; cuando las interacciones son muy fuertes las moléculas se retendrán una gran cantidad de tiempo retornando lentamente a la fase móvil, de tal manera que viajarán una distancia corta

en la columna. En contraste, las moléculas que interaccionan en menor grado alcanzarán una distancia mayor, figura 2 (d).

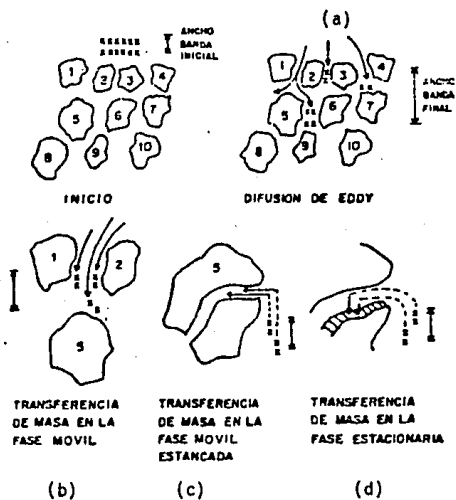


Fig. 2 Contribuciones a la dispersión molecular.

c. Tiempo de retención ajustado (tr'). Es la diferencia entre el tiempo de retención y el tiempo muerto, es una medida del tiempo que la muestra permanece retenida en el empaque de la columna. Dicho de otra manera, el tr es el tiempo total de permanencia en la columna, t_0 el tiempo que la muestra permanece en la fase móvil y , tr' el tiempo que la muestra permanece retenida en la fase estacionaria.

$$tr' = tr - t_0$$

d. Número de platos teóricos (N). Un plato teórico representa un equilibrio de distribución de la muestra entre fase móvil y estacionaria. El número de platos teóricos expresa, la habilidad que la columna tiene para estrechar bandas de elución, dicho de otra manera, es una medida de la eficiencia de la columna. Su valor puede determinarse de la siguiente manera:

$$N = 16 \left(\frac{tr}{W} \right)^2 \qquad N = 5.54 \left(\frac{tr}{W_{1/2}} \right)^2$$

donde: tr = tiempo de retención.

W = amplitud de la base del pico

$W_{1/2}$ = ancho del pico a la mitad de su altura.

e. Altura equivalente a un plato teórico (AEPT). Es la longitud de la columna requerida para obtener un plato teórico o equilibrio de distribución. Se determina por:

$$AEPT = L/N$$

donde: L = longitud de la columna.

N = número de platos teóricos.

f. Resolución (R). Es una medida cuantitativa del grado de separación obtenido entre las señales de dos compuestos:

$$R = \frac{(tr\ a - tr\ b)}{0.5 (W\ a + W\ b)}$$

dende: tr a = tiempo de retención para el pico a
 tr b = tiempo de retención para el pico b
 W a = amplitud de la base para el pico a
 W b = amplitud de la base para el pico b

f. Selectividad (α). Es una medida de la solubilidad diferencial de dos compuestos en la fase estacionaria, es por ello que también se le conoce como retención relativa. Mientras mayor sea el valor de α mejor se separarán dos picos adyacentes, es determinada por:

$$\alpha = \frac{tr'a}{tr'b}$$

7. INSTRUMENTAL^{11,14.15.16.}

Las ventajas significativas que se han alcanzado con esta técnica, se deben a las características muy especiales que el equipo de CLAP posee. A continuación se presenta el esquema básico de un equipo de CLAP, figura 4, seguido de un análisis de los aspectos más importantes sobre cada una de las partes que lo constituyen.

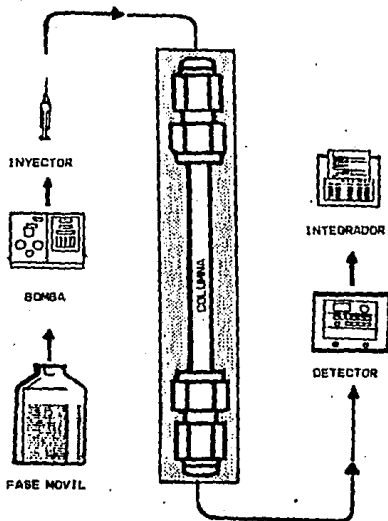


Fig. 4 Sistema cromatográfico.

a. Deposito para la fase móvil. Se podía pensar a priori que cualquier recipiente es adecuado para servir como reservorio de la fase móvil, sin embargo, en CLAP es conveniente que éste reúna ciertas características:

- Es recomendable el utilizar un recipiente cerrado para evitar la evaporación de solventes volátiles.

- Ser de vidrio, plástico inerte o cualquier otro material que no sea atacado por solventes orgánicos.

- Estar acondicionado de tal manera que pueda degasificarse la fase móvil y luego, succionarla a través de un filtro que evite el paso de pequeñas partículas que puedan dañar el sistema de bombeo o la columna.

b. Sistema de bombeo. En la actualidad, los avances tecnológicos han propiciado la manufactura de bombas que reúnen las características necesarias para trabajar en óptimas condiciones. Las propiedades más importantes que todo sistema de bombeo debe reunir son las siguientes:

- Proporcionar un flujo preciso y constante.
- Capacidad para trabajar a presiones altas (usualmente 6000 psi).
- Intervalo de volumen amplio (generalmente entre 0.1 y 9.9 ml).
- Resistencia a solventes orgánicos y soluciones con un valor de p^H en el rango de 2 a 10.
- Facilidad para limpiar el sistema.

Por otro lado, de acuerdo a las características de funcionamiento y diseño las bombas para CLAP pueden clasificarse en:

- | | | |
|---|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - bombas mecánicas | } | <ul style="list-style-type: none"> recíprocas desplazamiento continuo |
| <ul style="list-style-type: none"> - bombas neumáticas | | |

La figura 5 a, b y c ilustra estos tres tipos de bombas.

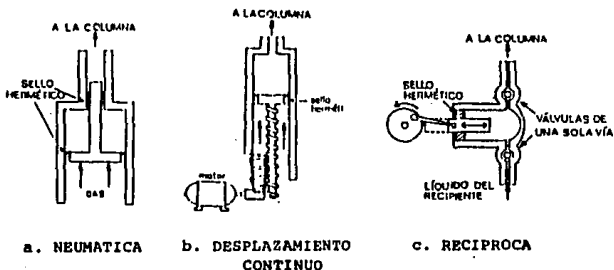


fig. 5 Tipos de Bombas.

c. Injector. El método más común para introducir la muestra al sistema cromatográfico es la inyección directa sobre el flujo, se puede efectuar mediante un inyector con septa o bien utilizando una válvula muestreadora.

El inyector con septa es poco utilizado debido a que la presión y el efecto corrosivo de los solventes implica el uso de una septa especial y aún así, presiones elevadas pueden producir fugas.

En el caso de la válvula muestreadora, la muestra se introduce con una jeringa en una pequeña porción de tubo de acero inoxidable o teflón; accionando la válvula de tal manera que la posición de entrada y salida se invierta, la muestra es disuelta y arrastrada por la fase móvil "inyectándola" a la columna, figura 6.

d. Columna. En todo sistema cromatográfico, la columna es el "corazón" del sistema puesto que en ella se lleva a cabo la separación de los compuestos en cuestión.

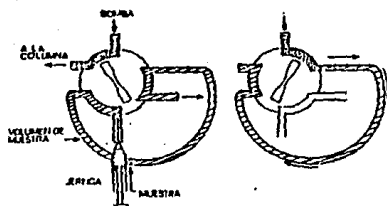


fig. 6 Válvula Muestreadora.

La columna está constituida por un tubo de acero inoxidable de diámetro reducido con paredes finamente pulidas, su forma es recta evitando cualquier doblés que disminuya su eficiencia, su longitud es variable. Las conexiones en la columna, así como entre la columna y el detector o inyector deben ser herméticas y de volumen muy pequeño. Las uniones tipo Swagelock son utilizadas en muchos instrumentos por reducir el volumen muerto; sobre todo a la salida de la columna, evitándose, el mezclado de compuestos entre columna y detector.

En ambos extremos de la columna, suelen colocarse filtros de acero inoxidable o teflón de poros muy pequeños (aproximadamente $2 \mu\text{m}$) para retener las partículas de fase estacionaria y evitar que el empaque se afloje. La figura 7 muestra lo anterior.

En cuanto al empaque; las dimensiones de las partículas utilizadas son muy pequeñas (3 a $10 \mu\text{m}$) pudiendo ser de forma regular o irregular.

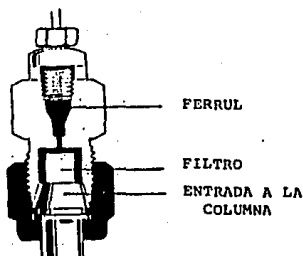


fig. 7 Extremo de una Columna.

Hoy en día, existe una gran variedad de materiales que son empleados como fase estacionaria en CLAP, sus características varían de acuerdo a su naturaleza ya que pueden encontrarse partículas de material poroso, adsorventes peliculares, fases químicamente unidas, resinas de intercambio iónico etc.

e. Detectores. El detector es una parte crítica del sistema cromatográfico ya que debe estar diseñado de tal manera, que mida en forma continua alguna propiedad fisicoquímica de los componentes de la muestra y además, generar una señal proporcional a la concentración de la muestra a medida que ésta sale de la columna.

Existen numerosos detectores que responden a diversas propiedades de los solutos como son: la absorción de luz visible o ultravioleta, la fluorescencia, el índice de refracción etc. Por desgracia, la mayoría de las propiedades anteriores llegan a ser comunes tanto para los compuestos de la muestra como para la fase móvil, esto dificulta el proceso de detección.

Las características principales que un detector debe reunir son las siguientes:

- Respuesta. Puede ser universal o selectiva de acuerdo a la capacidad que tenga el detector de responder a todo tipo de muestras o alguna específica.

- Sensibilidad. Se define como la razón entre la señal generada y la cantidad de muestra que produzca dicha señal. La sensibilidad no da una idea clara de la cantidad mínima detectable ya que ésta puede estar fuertemente afectada por el nivel de ruido del instrumento.

- Ruido. Es la señal del instrumento que no es atribuible a la muestra, puede ser ocasionada por pequeñas variaciones en el flujo o temperatura, fluctuaciones en el voltaje, burbujas de aire en el sistema etc.

- Cantidad mínima detectable. También llamado límite de detección, es la cantidad de muestra que produce una señal equivalente al doble del nivel de ruido del instrumento.

- Linealidad. Para utilizar la señal generada por el detector como una medida cuantitativa, dicha señal debe guardar una relación lineal con la concentración de la muestra.

- Volumen muerto. El volumen de la celda del detector debe ser muy pequeño para evitar la pérdida de eficiencia, de preferencia debe ser menor a 10 μ l. Por otro lado, existe una cierta longitud de tubo capilar antes de la celda que permite que el eluyente equilibre su temperatura con el detector, el volumen de este tubo generalmente es superior

al de la celda, sin embargo, su diámetro interno debe ser muy reducido para evitar el remezclado de los compuestos. Esto último, recordando que la difusión radial de los solutos es proporcional al radio del capilar que los contenga.

A continuación se describen brevemente los detectores de uso más frecuente en sistemas de CLAP.

1) Detector de luz UV. Su funcionamiento se basa en la absorción de luz por parte de la muestra al pasar a través de ella un haz de luz monocromática ultravioleta. Existen dos tipos de detectores de luz UV:

- Detector de longitud de onda fija. Funciona a una sola longitud de onda que generalmente es de 254 nm aunque la mayoría de instrumentos presentan la posibilidad de operar a 4 o 5 longitudes de onda mediante el uso de otros filtros.

Es un equipo de operación sencilla, económico ; además, el 60% de los compuestos orgánicos presentan alguna absorción a los 254 nm.

- Detector de longitud de onda variable. Estos detectores utilizan monocromadores o rejillas de difracción que les permite operar de los 200 nm (UV) hasta los 800 nm (visible) y por ello, permiten la detección del 90% de los compuestos orgánicos, figura 8.

Los detectores de absorción UV-visible se encuentran entre los más sensibles llegando a detectar nanogramos del soluto; presentan además, baja susceptibilidad a las variaciones de temperatura y flujo ocasionadas por las pulsaciones del sistema de bombeo.

Cuando el solvente utilizado en la fase móvil no absorbe apreciablemente en la longitud de onda en la que se opera, pueden realizarse gradientes de elución. Prácticamente su única desventaja consiste en que su respuesta es selectiva.

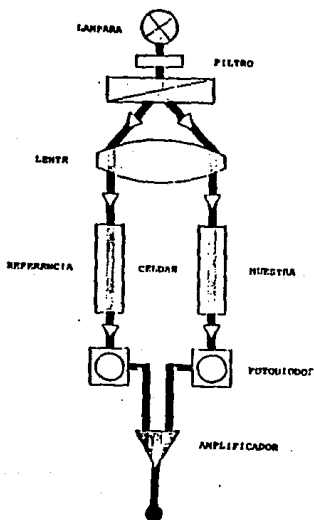


fig. 8 Detector UV, longitud variable.

2) Detector de índice de refracción. Mide la diferencia entre los índices de refracción de la fase móvil y los componentes de la muestra. Una doble celda permite comparar continuamente la fase móvil pura, referencia, con el eluyente de la columna que contiene la muestra disuelta, figura 9.

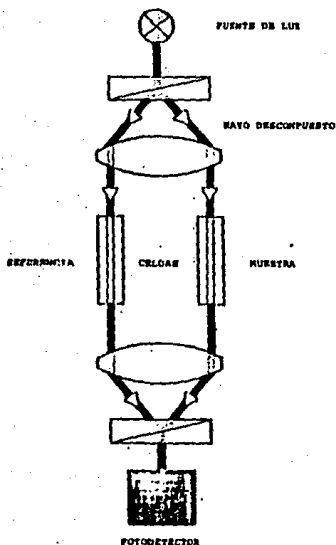


fig. 9 Detector de índice de refracción.

Al estarse comparando las señales provenientes de celdas diferentes resulta muy difícil realizar gradientes de elución, siendo necesario el cambiar en la celda de referencia la fase móvil cada vez que se efectúe el más mínimo cambio en su composición.

Se considera que su respuesta es de tipo universal ya que cada compuesto tiene su índice de refracción propio, sin embargo, su sensibilidad depende de la diferencia entre el índice de refracción del soluto y el índice de refracción de la fase móvil.

Otro inconveniente es la susceptibilidad del índice de refracción a la temperatura y las variaciones de flujo.

3) Detector de Fluorescencia. Aproximadamente 20% de los compuestos orgánicos fluorescen, es decir, emiten luz de cierta longitud de onda al encontrarse en estado excitado. Esto, como resultado de la absorción de algún tipo de energía radiante; luz visible, UV, IR, otro tipo de energía electromagnética.

8. ANALISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO¹⁰.

a. Análisis cualitativo. La cromatografía es en esencia una técnica de separación no de identificación, por sí sola no es capaz de identificar un compuesto ya que solo proporciona un parámetro de comparación, el tiempo de retención. Este parámetro es característico para un compuesto dado pero solo bajo condiciones cromatográficas establecidas.

En general, para la identificación certera de un compuesto se requiere de otras técnicas no cromatográficas como el análisis por IR, la absorción UV, resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas.

b. Análisis Cuantitativo. En CLAP la mayoría de los análisis se realizan con el fin de determinar la concentración o el peso del, o los compuestos de una muestra.

Ya que el cromatógrafo no presenta los resultados en forma numérica, sino como variaciones de voltaje en función del tiempo, es necesario transformar dichas variaciones en un valor numérico y luego convertirlo en la información deseada. Para lograr lo anterior se han desarrollado diferentes métodos que pueden ser clasificados como: manuales, mecánicos y, electrónicos.

El método manual más sencillo consiste en la construcción de un triángulo de la misma área que el pico, y luego calcular el área del pico. El triángulo se construye por medio de rectas tangentes a los lados del pico y extrapolando la línea base bajo el picó, figura 10 a.

Este método introduce dos fuentes de error; en primer lugar no puede definirse exactamente donde deben dibujarse las tangentes. En segundo lugar, ya construido el triángulo hay una área por encima que no debería ser incluida y, dos pequeñas áreas a los lados que deberían incluirse; este método supone que ambos errores se compensan.

Una variación a lo anterior es usar la altura y el ancho del pico a la mitad de su altura, figura 10 b. El triángulo es construido dentro del pico real, esto evita el problema del dibujo real del triángulo ya que se elimina el factor juicio, sin embargo, se sobrestima el área.

Otro método manual es el de la figura de papel, figura 10 c; consiste en cortar el pico y luego pesarlo. Los

problemas que acarrea este método, además de destruir el registro, se deben al papel.

La densidad del papel no es uniforme, además es higroscópico por lo que los factores de respuesta varían con la humedad. Por otra parte, cuando se realizan muchos análisis el método resulta muy laborioso.

Un método que evita la aproximación del triángulo y pretende medir el área verdadera es el conteo de cuadros o rectángulos, figura 10 d. Un registrador traza el pico sobre una carta con divisiones, se cuenta el número total de rectángulos completos dentro del pico y luego se suman las fracciones hasta obtener el área total. Esto es laborioso y además se introducen elementos subjetivos al medir las fracciones, por ello en el trabajo de rutina no es adecuado.

Para mejorar el proceso de medición puede recurrirse a medios mecánicos que proporcionen un valor del área mucho más exacto.

El planimetro es un dispositivo que consiste en una cabeza trazadora la cual se mueve desde un punto de partida arbitrario alrededor de todo el pico regresando al punto de partida. El método es lento y depende mucho de la habilidad personal, figura 10 e.

El próximo método a considerar es el integrador de disco, consiste de un dispositivo mecánico acoplado directamente al mecanismo de la pluma del integrador, tiene una plúmilla independiente que dibuja un trazo fino a lo largo de la carta. La unión es tal, que la distancia total desplazada por la plúmilla es proporcional al área del pico. La precisión es muy buena y solo ofrece dificultades en casos de

picos no resueltos completamente o que presentan alguna desviación de la línea base, figura 10 f.

Por ultimo, tenemos al integrador electrónico; instrumento de alta precisión que transforma la señal recibida en unidades arbitrarias de área. Su gran ventaja radica en la habilidad de funcionar solo sin ninguna atención por parte del operador. Una vez que se ha inyectado la muestra y presionado el botón de partida; mide los tiempos de retención y las áreas de los picos proporcionando luego un registro impreso de los datos.

Si se utiliza un inyector de muestras automático, éste puede conectarse con el dispositivo de arranque del integrador, de tal modo que el operador solo necesita colocar las condiciones iniciales en el instrumento, colocar las muestras en el automuestreador e iniciar la secuencia.

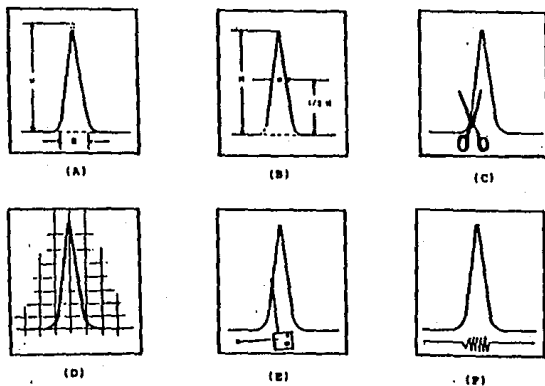


fig. 10 Técnicas para la Medición del Area en un Pico.

B. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS^{21, 24}.

La industria farmacéutica está especialmente interesada en la validación de métodos analíticos, primeramente, porque su objetivo principal es la salud; y en segundo lugar, porque el desarrollo de nuevas moléculas activas y la aparición excipientes novedosos han incrementado los problemas analíticos. Es por ello, que al desarrollar un método analítico su validación debe considerarse como parte integral de él, es decir, el método debe probarse para determinar su efectividad.

La validación de un método analítico puede definirse como el proceso mediante el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad de un método es apropiada para ser usado en una aplicación analítica específica. Dicha capacidad se expresa en términos de parámetros analíticos.

Los parámetros analíticos que deben considerarse en la validación de un método analítico son los siguientes:

- Precisión.
- Exactitud.
- Linealidad.
- Rango lineal.
- Límite de detección.
- Límite de cuantificación.
- Especificidad.
- Tolerancia.

1. PRECISION.

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados individuales. cuando el procedimiento es aplicado repetidamente a diferentes alícuotas de una muestra homogénea. Usualmente se expresa por la desviación estándar o la desviación estándar relativa.

La precisión es una medida del grado de repetibilidad y reproducibilidad del método analítico bajo condiciones normales de operación.

a. Repetibilidad. Expresa la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista usando los mismos reactivos y equipo.

b. Reproducibilidad. Expresa la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo o diferente laboratorio utilizando reactivos y equipos iguales o diferentes.

Determinación. La precisión de un método analítico puede ser determinada por el ensayo de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea, de la cual pueda ser calculada estadísticamente la desviación estándar y el coeficiente de variación.

2. EXACTITUD.

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre los resultados obtenidos experimentalmente y los valores verdaderos. Se expresa en términos del % de recobro obtenido de muestras a las cuales se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia de interés.

Determinación. La exactitud de un método analítico puede ser determinada, aplicando el método a muestras preparadas con mezclas de los excipientes a los cuales se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia de interés por arriba y abajo de la concentración normal esperada en la muestra.

3. LINEALIDAD.

La linealidad de un método analítico puede definirse como la facultad de obtener resultados, que pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, que sean proporcionales a la concentración de la sustancia de interés en un rango determinado. Se expresa en términos de la variación alrededor de la pendiente calculada por regresión lineal.

4. INTERVALO LINEAL.

El rango lineal de un método analítico es el intervalo entre los niveles superior e inferior de sustancia de interés (incluyendo éstos), en el cual se ha demostrado que las determinaciones son precisas, exactas y lineales

usando el método propuesto. Se expresa en las mismas unidades que los resultados del análisis; mg/g, mg/ml, % etc.

Determinación (linealidad-intervalo). La linealidad de un método analítico puede determinarse por el tratamiento matemático de los resultados obtenidos para el análisis de muestras de concentraciones a lo largo del rango pretendido por el método. El tratamiento es normalmente el cálculo de regresión lineal por mínimos cuadrados de los resultados obtenidos en función de la concentración.

La pendiente de la regresión y su variación proporcionan una estimación matemática de la linealidad; el intercepto con respecto a Y, es una medida potencial de la inclinación encontrada.

El rango del método es validado verificando que el método analítico proporcione resultados aceptables en cuanto a precisión, exactitud y linealidad cuando es aplicado a muestras cuyas concentraciones se encuentran en los extremos del rango lineal.

5. LIMITE DE DETECCION.

Es la concentración mínima de sustancia de interés en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo condiciones experimentales establecidas. Esta prueba límite, sólo establece que concentración se encuentra por abajo o por arriba de un cierto nivel. Se expresa por la concentración de sustancia de interés presente en la muestra; mg/ml, mg/g, % etc.

Determinación. La determinación del límite de detección de un método analítico varía si se trata de un procedimiento instrumental o no instrumental.

Para procedimientos instrumentales pueden utilizarse diferentes técnicas. Algunos investigadores determinan la razón entre la señal y el ruido, comparando los resultados de muestras de concentración conocida con resultados de muestras blanco establecen la cantidad mínima que puede ser detectada con certeza. Una razón entre señal/ruido de 2:1 o de 3:1 generalmente es aceptable.

Otros investigadores miden la magnitud de la señal analítica de fondo, analizan muestras blanco y calculan la desviación estándar de las respuestas. La desviación estándar multiplicada por un factor, generalmente 2 o 3, proporciona una estimación del límite de detección.

Para métodos no instrumentales, el límite de detección es calculado por el análisis de muestras de concentraciones conocidas estableciendo el nivel mínimo al cual la sustancia de interés puede ser detectada con certeza.

6. LIMITE DE CUANTIFICACION.

Es la menor concentración de sustancia de interés en una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo condiciones experimentales establecidas. Es un parámetro cuantitativo para muestras que contienen niveles bajos de otras sustancias, tales como, impurezas en materias primas y productos de degradación en productos farmacéuticos. Se expresa por la concentración de sustancia de interés presente en la muestra; mg/ml, mg/g, % etc.

Determinación. La determinación del límite de cuantificación de un método analítico varía si se trata de un procedimiento instrumental o no instrumental.

El procedimiento más común para métodos instrumentales es, determinar la magnitud de la respuesta de fondo analizando muestras blanco y calcular la desviación estándar de las respuestas. La desviación estándar multiplicada por un factor, usualmente 10, proporciona una estimación del límite de cuantificación.

Para métodos no instrumentales el límite de cuantificación se determina, analizando muestras de concentración conocida y estableciendo el nivel mínimo al cual la sustancia de interés puede ser cuantificada con aceptable precisión y exactitud.

7. ESPECIFICIDAD.

La especificidad de un método analítico puede considerarse como la habilidad de medir con exactitud la sustancia de interés en presencia de compuestos que se supone puedan estar presentes en la muestra. La especificidad es una medida del grado de interferencias (o ausencia de estas) en el análisis de muestras complejas.

Determinación. La especificidad de un método analítico puede determinarse comparando los resultados obtenidos de muestras conteniendo impurezas, productos de degradación, compuestos químicos relacionados o los ingredientes del placebo; con los obtenidos de muestras que no contienen estas posibles interferencias. La tendencia debe ser la diferencia de los resultados entre ambos grupos de muestras.

8. TOLERANCIA.

La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos para análisis de la misma muestra bajo alguna modificación a las condiciones normales de operación; como, diferentes laboratorios, analistas, instrumentos, lotes de reactivos, columnas (soporte, fase estacionaria), condiciones ambientales (temperatura) etc.

Determinación. La tolerancia de un método analítico puede ser determinada analizando alicuotas de lotes homogéneos en diferentes laboratorios, por analistas diferentes; usando condiciones operacionales y de medio ambiente diferentes entre sí, pero acordes con las especificadas en el método.

Esta reproducibilidad puede ser comparada con la precisión del método bajo condiciones normales para obtener una medida de la tolerancia.

Considerando la variedad de ensayos es lógico que los diferentes métodos analíticos requieran diferente esquema de validación. Las categorías de métodos analíticos más comunes que requieren ser validados son:

CATEGORIA I. Métodos analíticos para cuantificar los componentes principales de sustancias a granel o ingredientes activos (incluyendo conservadores) en productos farmacéuticos terminados.

CATEGORIA II. Métodos analíticos para determinar impurezas en sustancias a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados.

- Análisis cuantitativos.
- Pruebas límite.

CATEGORIA III. Métodos analíticos para determinar características físicas (por ej. disolución, liberación del principio activo).

Para cada una de las categorías se requiere diferente información analítica, la tabla I enlista los datos elementales que son requeridos para cada categoría.

TABLA I.
DATOS ELEMENTALES REQUERIDOS EN ENSAYOS DE VALUACION.

PARAMETRO ANALITICO	CATEGORIA II			CATEGORIA III
	CATEGORIA I	Análisis cuantitativos	pruebas límite	
presión	si	si	no	si
exactitud	si	si	"	"
lím. de detección	no	no	si	"
lím. de cuantificación	no	si	no	"
especificidad	si	si	si	"
rango	si	si	"	"
linealidad	si	si	no	"
tolerancia	si	si	si	si

* puede ser requerido, dependiendo de la naturaleza de un ensayo en específico.

5. SOLUBILIDAD. 1 en 1400 de agua, 1 en 400 de alcohol, 1 en 100 de acetona; insoluble en cloroformo, tetracloruro de carbono y éter. Soluble en soluciones de hidróxidos alcalinos.

6. p^H. Agitar 1 g con 50 ml de agua destilada durante 5 minutos, el p^H de la suspensión va de 4 a 6; su pKa es de 7.4

7. PUNTO DE FUSION. 260° con descomposición.

8. ENSAYOS DE IDENTIDAD:

- Espectro de absorción UV. Acetazolamida en HCl 0.1 N presenta una absorción máxima a 265 nm (E1%, 1cm 474).

- Espectro de absorción IR. Una dispersión de acetazolamida en bromuro de potasio exhibe los siguientes picos característicos; A 1167 , B 1363 , C 1316 cm⁻¹.

- Disolver 100 mg de acetazolamida en 5ml de hidróxido de sodio 1N. Adicionar 5 ml de una solución preparada al disolver 100 mg de clorhidrato de hidroxilamina y 80 mg de sulfato cúprico en 100 ml de agua. Mezclar perfectamente la solución amarillo pálido resultante sobre un baño de vapor por 5 minutos. Una solución amarilla clara se produce. Después de calentarse o mezclarse, no debe formarse algún precipitado o tomar una coloración oscura.

9. ENSAYO DE PUREZA. No debe contener menos del 98% y no más del 102% de C₄H₆N₄O₃S₂ , calculada en base a la sustancia anhidra.

En un matraz volumétrico de 10 ml disolver 200 mg de acetazolamida con piridina, llevar a volumen con el mismo solvente. De la misma forma, preparar una solución de estándar de referencia, de manera que las concentraciones sean de 20 mg/ml aproximadamente. Determinar la absorbancia de ambas soluciones en una celda de 0.1 cm a la longitud de onda de máxima absorbancia, que está cercana a los 7.38 μm , en un espectrofotómetro infrarrojo usando piridina como referencia.

10. DETERMINACION DE ACETAZOLAMIDA EN TABLETAS. Determinar el peso promedio de 20 tabletas y pulverizarlas, pesar con exactitud una porción de polvo equivalente a 50 mg de acetazolamida y transferirla a un vaso de precipitados de 100 ml. Adicionar 40 ml de agua hirviendo y calentar sobre un baño de vapor por 15 minutos; enfriar y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 ml, diluir a volumen con agua. Tomar una alícuota de 3 ml de la solución sobrenadante y transferirla a un matraz volumétrico de 25 ml, adicionar 2 ml de ácido clorhídrico 1N y diluir a volumen con agua. Colocar una porción de esta solución en una celda polarográfica sumergida en un baño de agua a $25\text{ C}^{\circ} \pm 0.5\text{ C}^{\circ}$ y deaerear durante 10 minutos burbujeando nitrógeno. Insertar el electrodo de gota de mercurio y correr el polarograma de -0.2 a -0.75 volt, usando un electrodo de calomel saturado como referencia. Determinar la corriente de difusión a -0.70 volt. Calcular el contenido de acetazolamida en la porción de polvo comparando el polarograma obtenido con el de una solución estándar de acetazolamida de concentración aproximadamente igual.

11. CONTENIDO DE HUMEDAD. No debe ser mayor al 0.5% determinado por el método de Karl Fischer.

12. CLORUROS. Disolver 1.5 g de acetazolamida en 75 ml de agua a temperatura cercana a los 70°C durante 5 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y filtrar; una alícuota de 25 ml del filtrado no debe mostrar una cantidad mayor de cloruros que los encontrados en 0.1 ml de HCl 0.020 N (0.014%).

13. SULFATOS. Una alícuota de 25 ml del filtrado preparado según lo descrito en el ensayo de cloruros, no debe mostrar un contenido mayor en sulfatos que los encontrados en 0.2 ml de H_2SO_4 0.020 N (0.04%).

14. FARMACOCINETICA^{19,21}. Acetazolamida es un poderoso inhibidor de la enzima anhidraza carbónica, por ello se utiliza como diurético y en el tratamiento de glaucoma, enfermedad caracterizada por una alta presión intraocular.

Su absorción es muy rápida a través del tracto gastrointestinal, después de una dosis de 20 mg/kg de peso, la concentración terapéutica en plasma se alcanza en 2 horas, persistiendo como concentración efectiva 12 horas.

Al inhibirse las reacciones catalizadas por la anhidraza carbónica en tubulo renal, se ve aumentada la excreción de bicarbonato y cationes, principalmente sodio y potasio; de ahí que cause diuresis alcalina. Además, la inhibición de esta enzima provoca un decaimiento en la presión intraocular, por ello su aplicación en el tratamiento de glaucoma.

La principal ruta para su excreción es la orina, eliminándose a través de ella el 70% de la dosis administrada sin cambios. Su tiempo de vida media es de 8 horas.

II. PARTE EXPERIMENTAL.

A. DETERMINACION DE ACETAZOLAMIDA EN TABLETAS.

1. CROMATOGRAFO DE LIQUIDOS A ALTA PRESION.

- Bomba	Waters Ass.	6000-A
- Detector, UV	Waters Ass.	440
- Automuestreador Wisp	Waters Ass.	712-D
- Integrador	Hewlett Packard	3390-A
- Columna	Merck Co.	*
* Lichrospher 100 C ₁₈ 5 µm, 4 x 12.5 cm.		

2. EQUIPO DE LABORATORIO.

- Balanza analítica	Sartorius	1712
- Centrifuga	Int. Eq. Co.	IEC/K
- Equipo de filtración	Millipore Co.	DM-39
- Baño de ultrasonido	Branson	B-52

3. MATERIAL.

- Matraz volumétrico	50 ml
- Pipeta volumétrica	1 y 2 ml
- Tubos de ensayo	1.5 x 15 cm
- Membrana de filtración acuosa	HA 0.45 µm
- Membrana de filtración orgánica	GVWP 0.22 µm

3. REACTIVOS.

- Acetato de sodio 0.01 M
- Metanol (grado cromatográfico)
- Metanol RA

4. SOLUCION DEL ESTANDAR INTERNO.

Pesar con exactitud alrededor de 10 mg de cafeína y transferirlos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 ml, adicionar 30 ml de fase móvil y llevar al ultrasonido por 3 minutos; dejar que la solución recobre temperatura ambiente y diluir a volumen con fase móvil.

5. SOLUCIONES DEL ESTANDAR DE REFERENCIA.

Pesar con exactitud y por separado 8, 10 y 12 mg de acetazolamida, estándar de referencia, transferirlos cuantitativamente a matraces volumétricos de 50 ml. Adicionar 30 ml de fase móvil y colocarlos al ultrasonido por 3 minutos, dejar que la soluciones recobren temperatura ambiente y llevar a volumen con fase móvil.

6. SOLUCIONES ESTANDAR DE CALIBRACION.

Transferir 1 ml de cada una de las soluciones preparadas en el punto anterior a matraces volumétricos de 10 ml, adicionar 2 ml de la solución del estándar interno y llevar a volumen con fase móvil. Concentraciones finales; Acetazolamida 16, 20 y 24 µg/ml, cafeína 40 µg/ml.

7. PREPARACION DE LA SOLUCION MUESTRA.

Determinar el peso promedio de las tabletas a ensayar y triturarlas en un mortero hasta obtener un polvo homogéneo. Pesar con exactitud una cantidad de polvo equivalente a 10 mg de acetazolamida y transferirla cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 ml.

Adicionar 30 ml de fase móvil y llevar al ultrasonido 5 minutos, dejar que las muestras recobren temperatura ambiente y diluir a volumen con fase móvil.

Centrifugar una alícuota de la dispersión resultante a 3000 rpm durante 10 minutos; tomar 1 ml de la solución sobrenadante y colocarlo en un matraz volumétrico de 10 ml, adicionar 2 ml de la solución del estándar interno y diluir a volumen con fase móvil.

8. CONDICIONES CROMATOGRAFICAS.

Injectar las soluciones estándar de calibración y la solución muestra bajo las siguientes condiciones cromatográficas:

columna: Lichrospher 100 C₁₈ 5 µm, 4 x 12.5 cm.
fase móvil: acetato de sodio 0.01 M/metanol 60:40.
velocidad de flujo: 0.5 ml/min.
longitud de onda: 254 nm.
sensibilidad: 0.5 AUFS.
volumen de inyección: 10 µl.
velocidad de carta: 0.2 cm/min.
presión: 850 psi.

9. CALCULOS.

- Factor de respuesta (FR):

$$FR = (A_{ei} / A_{er}) \times P_{er} .$$

Donde: A_{ei} = área del estándar interno.

A_{er} = área del estándar de referencia.

P_{er} = peso del estándar de referencia en mg

- Factor de respuesta promedio (FRP):

Es el valor promedio de los tres FR.

- mg recuperados (mg Rec.):

$$mg \text{ Rec.} = (A_{az} / A_{ei}) \times FRP$$

Donde: A_{az} = área de acetazolamida / muestra.

A_{ei} = área del estándar interno / muestra.

- % de recobro (% Rec.):

$$\% \text{ Rec.} = \frac{A_{az} \quad FRP \quad PP}{A_{ei} \quad 250 \quad P_m} \times 100$$

Donde: PP = peso promedio de las tabletas en mg.

P_m = peso de la muestra en mg.

A_{az} = área de acetazolamida / muestra.

A_{ei} = área del estándar interno/muestra.

B. VALIDACION ESTADISTICA DEL METODO.

1. PRECISION/REPETIBILIDAD.

Para valorar la repetibilidad del método se analizaron diez muestras por separado correspondientes al 100% de acetazolamida etiquetada. Se determinó el coeficiente de variación, la desviación estándar y sus límites de confianza al 95% .

2. LINEALIDAD.

Para determinar la linealidad del método se prepararon doce soluciones a seis diferentes concentraciones de placebos cargados correspondientes al 70, 80, 90, 100, 110 y 120% de acetazolamida etiquetada (20 µg/ml equivalen al 100%). Se determinó el coeficiente de correlación, el error estándar de la regresión, la pendiente y el intercepto; así como sus límites de confianza al 95% .

3. EXACTITUD.

Para determinar la exactitud del método se utilizaron las mismas soluciones preparadas para linealidad. Se determinó para los % de recobro, la desviación estándar, y la media; así como, sus límites de confianza al 95% .

4. REPRODUCIBILIDAD.

La reproducibilidad fue evaluada por dos analistas en dos días diferentes utilizando un lote de la formulación, se analizaron un total de 12 datos. Se determinó para los porcentos de recobro, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Además, los resultados fueron evaluados por medio de un análisis de varianza siguiendo un modelo de dos factores aleatorios.

5. ESPECIFICIDAD.

Para determinar la especificidad del método se sometieron a condiciones de degradación acelerada, materia prima y placebo de la formulación bajo las siguientes condiciones:

H ⁺	(solución)	p ^H 2.3 / HCl 1 N	180 días
OH ⁻	(solución)	p ^H 12.2 / NaOH 0.1N	180 días
Ox	(solución)	H ₂ O ₂ 10%	180 días
t ^o	(sólido)	80 ^o	180 días
Luz	(sólido)	3600 Luxes	180 días

Se prepararon muestras con los compuestos degradados y se inyectaron al CLAP bajo las condiciones propuestas para el método, página 44; teniendo como variante que la determinación se realizó a cinco longitudes de onda, 230, 240, 254, 270 y 280 nm.

III. RESULTADOS.

1. PRECISION/REPETIBILIDAD.

Los resultados obtenidos de la evaluación estadística de la repetibilidad son los siguientes, tabla II. Las fórmulas empleadas para llegar a ellos se encuentran en el anexo A.

TABLA II.

REPETIBILIDAD DE ACETAZOLAMIDA EN TABLETAS.

<u>mg ADC.</u>	<u>mg REC.</u>	<u>% REC.</u>
10.10	10.29	101.92
10.59	10.89	102.83
9.880	10.15	102.72
9.980	10.16	101.75
8.930	9.240	103.38
9.030	9.170	101.54
9.920	10.29	103.69
9.970	10.27	102.99
10.60	10.97	103.46
10.03	10.40	103.69

$$s = 0.80$$

$$f = 0.76$$

$$\bar{X} = 102.79\%$$

$$\%CV = 0.78$$

- Prueba de hipótesis:

$$H_0 \quad \sigma < 1.5$$

$$H_a \quad \sigma \geq 1.5$$

- Resultado:

$$\chi^2_{cal} = 2.56$$

$$\chi^2_{(0.975, 9)} = 19.02$$

Por lo tanto, el método es preciso/repetible.

- Intervalo de confianza al 95%:

$$\text{límite superior LS} = 1.4605$$

$$\text{límite inferior LI} = 0.5502$$

2. LINEALIDAD.

La tabla III y la figura 11 muestran los resultados obtenidos de la evaluación estadística de la linealidad del método. Las fórmulas empleadas para obtener dichos resultados se encuentran en el anexo B.

TABLA III.

LINEALIDAD PARA ACETAZOLAMIDA EN TABLETAS.

<u>mg adc.</u>	<u>% ADC.</u>	<u>mg rec.</u>	<u>% REC.</u>
7.290	72.900	7.300	73.000
7.050	70.500	7.020	70.200
8.150	81.500	8.160	81.600
8.070	80.700	8.000	80.000
8.990	89.900	8.920	89.200
9.070	90.700	9.060	90.600
10.00	100.00	9.990	99.900
10.17	101.70	10.28	102.80
10.91	109.10	11.00	110.00
11.06	110.60	11.03	110.30
12.04	120.40	12.18	121.80
12.09	120.90	12.12	121.20

Ordenada al origen $a = -0.5014$

pendiente $b = 1.0070$

coeficiente de correlación $r = 0.9998$

error estándar de regresión $sy/x = 0.6495$

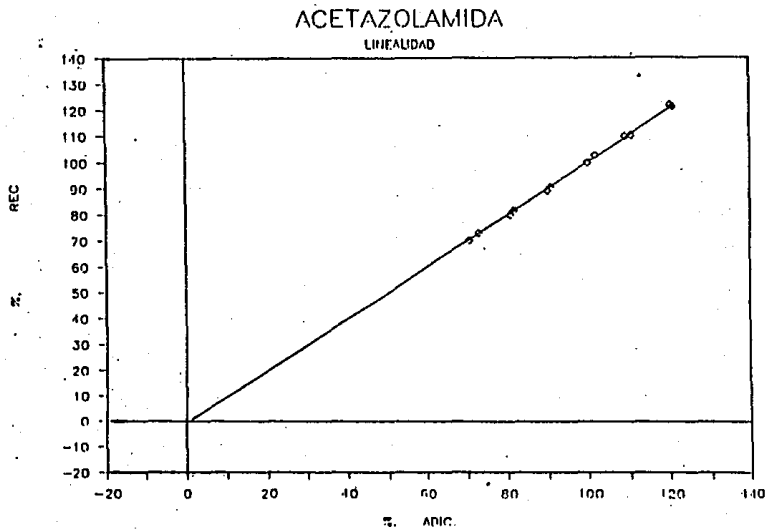


fig. 11. Linealidad para Acetazolamida en tabletas.

Inferencias sobre la ordenada al origen:

- Prueba de hipótesis:

$$H_0 \quad a = 0$$

$$H_a \quad a \neq 0$$

- Resultado:

$$t_{\text{cal}} = -0.3265$$

$$t(0.975, 10) = 2.2010$$

Por lo tanto, puede considerarse que estadísticamente $a = 0$

- Intervalo de confianza al 95%:

$$LS = 0.7276$$

$$LI = -1.7304$$

Inferencias sobre la pendiente:

- Prueba de hipótesis:

$$H_0 \quad b = 1$$

$$H_a \quad b \neq 1$$

- Resultado:

$$t \text{ cal} = 0.3746$$

$$t(0.975, 10) = 2.2010$$

Por lo tanto, puede considerarse que estadísticamente $b = 1$

Intervalo de confianza al 95%:

$$IS = 1.0201.$$

$$LI = 0.9938$$

Por lo tanto, el método es lineal.

3. EXACTITUD.

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la evaluación estadística de la exactitud del método, tabla IV. Las fórmulas empleadas para obtener dichos resultados se encuentran en el anexo C.

TABLA IV.

EXACTITUD PARA ACETAZOLAMIDA EN TABLETAS.

mg ADC.	mg REC.	% REC.
7.290	7.300	100.20
7.050	7.020	99.570
8.150	8.160	100.16
8.070	8.000	99.150
8.990	8.920	99.180
9.070	9.060	99.950
10.00	9.990	99.890
10.17	10.28	101.11
10.91	11.00	100.82
11.06	11.02	99.680
12.04	12.18	101.17
12.09	12.12	100.21

n = 12.
s = 0.6729
 \bar{X} = 100.09%

- Prueba de hipótesis:

H_0 $\mu = 100\%$
 H_a $\mu \neq 100\%$

- Resultado:

$$t_{\text{cal}} = 0.4633$$

$$t_{(0.975, 10)} = 2.2010$$

Por lo tanto, el método es exacto.

- Intervalo de confianza al 95%:

$$LS = 100.51\%$$

$$LI = 99.66\%$$

4. REPRODUCIBILIDAD.

Los resultados obtenidos de la evaluación del efecto del analista y día sobre la reproducibilidad del método se muestran en la tabla V y VI. Las fórmulas empleadas para obtener los resultados se encuentran en el anexo D.

TABLA V.

REPRODUCIBILIDAD PARA ACETAZOLAMIDA EN TABLETAS

		ANALISTA j	
		1	2
1		101.79	101.49
		101.99	101.61
		102.03	102.40
DIA i			
2		101.21	101.51
		102.08	102.27
		101.26	102.20
	n = 6	n = 6	
	s = 0.60	s = 0.58	
	$\bar{x} = 101.63\ddagger$	$\bar{x} = 102.12\ddagger$	
	\ddagger cv = 0.59	\ddagger cv = 0.57	
n = 12			
s = 0.62			
$\bar{x} = 101.88\ddagger$			
\ddagger cv = 0.61			

TABLA VI.

ANALISIS DE VARIANZA PARA ACETAZOLAMIDA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEIA CUADRATICA	F cal.	F teo.
D _i	1	3.6215	3.6215	2.1012	161.4
A _j	1	1.5716	1.5716	0.8043	161.4
DA _{ij}	1	1.5297	1.5297	2.2279	5.32
E _{(tj)k}	8	5.1213	0.6705	---	---

5. ESPECIFICIDAD.

Después de realizar el ensayo a cinco longitudes de onda (230, 240, 254, 270 y 280 nm), para las muestras de materia prima degradada se encontró, que bajo condiciones oxidativas acetazolamida sufre su máxima degradación ya que se encontraron 6 productos de degradación. Bajo condiciones degradativas ácidas y básicas se forma 1 y 2 productos de degradación respectivamente; mientras que a temperatura y luz acetazolamida se muestra muy estable ya que no aparece ningún producto de degradación.

Por otro lado, las muestras degradadas del placebo de la formulación no muestran la presencia de algún producto de degradación bajo ninguna de las condiciones degradativas.

El análisis a diferentes longitudes de onda también permitió eliminar la posibilidad de coelución de algún producto de degradación sobre el pico de acetazolamida.

Resumiendo, el método analítico propuesto es capaz de detectar y separar los principales productos de degradación de acetazolamida y por lo tanto, puede emplearse en estudios de estabilidad.

En la tabla VII se muestran los resultados generales encontrados durante la evaluación de la especificidad del método y los cromatogramas más representativos, figuras 12-17.

TABLA VII.

RESULTADOS GENERALES DE ESPECIFICIDAD, 254 nm.

MATERIA PRIMA

CONDICION DEGRADATIVA	No. DE PRODUCTOS DE DEGRADACION	RESOLUCION *	ESPECIFICIDAD
H+	1	1.15	+
OH-	2	2.14	+
Ox	6	0.82,0.63	+
to	-	--	+
luz	-	--	+

PLACEBO DE LA FORMULACION

No hubo formación de productos de degradación.

* respecto al pico de interés, acetazolamida.

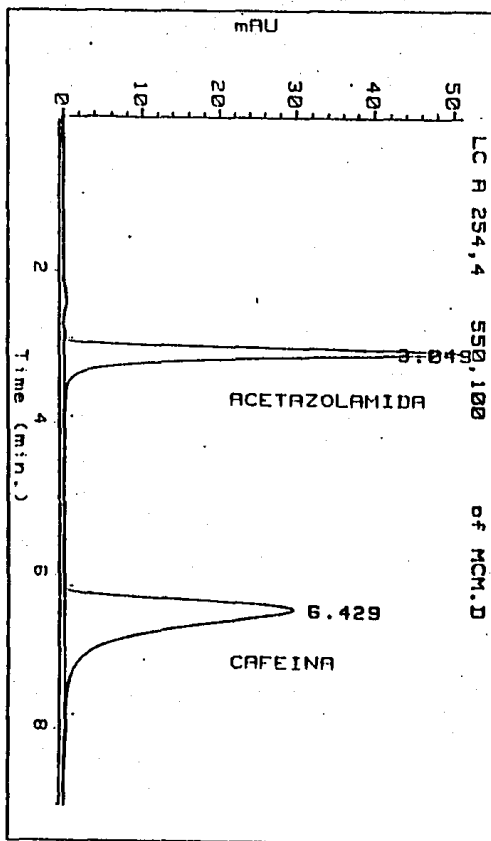


fig. 12 Solución Estándar.

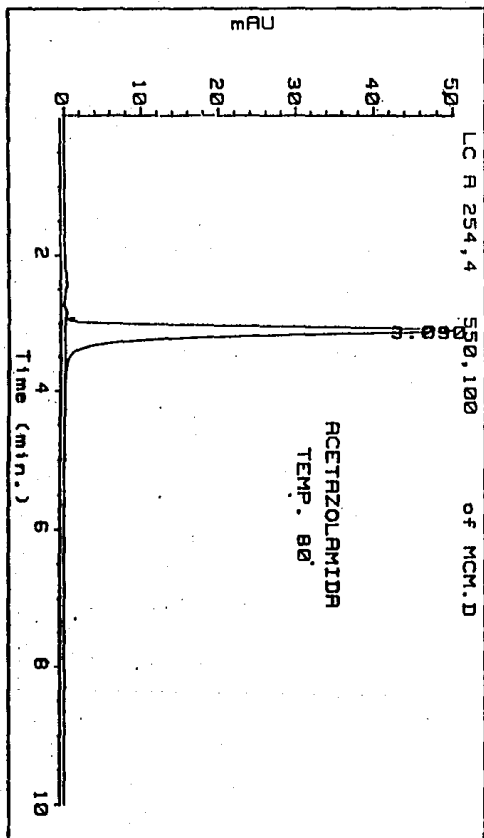


fig. 13 Degradación Térmica, materia prima.

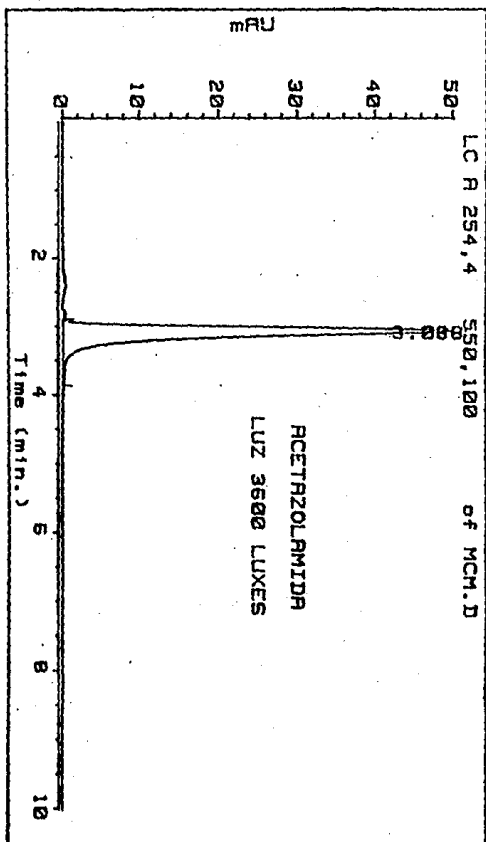


fig. 14 Degradación a la luz, materia prima.

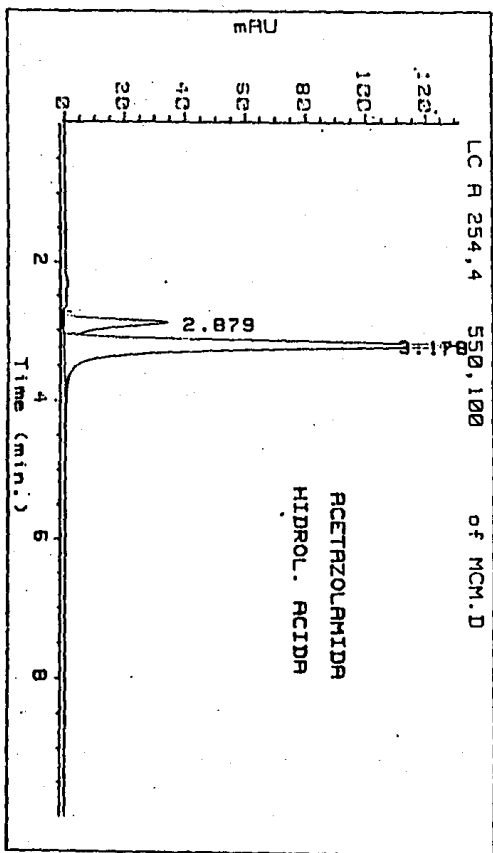


fig. 15 Degradación ácida, materia prima.

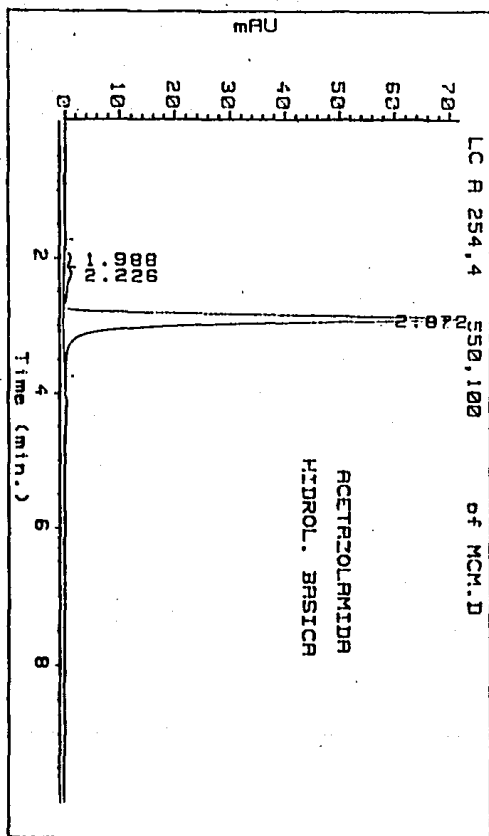


fig. 16 Degradación básica, materia prima.

IV. DISCUSION DE RESULTADOS.

Para considerar un método analítico como confiable éste debe reunir ciertas características; ser preciso, exacto, lineal y reproducible. En el caso de métodos analíticos para ser usados en estudios de estabilidad, además de las características anteriores, el método debe ser específico.

Oficialmente la cuantificación de acetazolamida en tabletas se realiza por polarografía, técnica analítica que en comparación con la cromatografía de líquidos a alta presión es menos sensible y sobre todo, al no ser una técnica de separación difícilmente puede ser aplicable a estudios de estabilidad.

En contraste, el método desarrollado demostró ser capaz de separar y cuantificar la acetazolamida de sus principales productos de degradación y además, cumplió con los requisitos necesarios para ser considerado un método analítico confiable.

Otra ventaja que el método desarrollado posee, es su rapidez, la preparación de las soluciones estándar y muestras consumen poco tiempo, así mismo el tiempo de corrida para el cromatograma es corto lo que hacen al método versátil.

V. CONCLUSIONES

Los resultados encontrados al evaluar la especificidad muestran que el método analítico desarrollado es específico, ya que logra separar a acetazolamida de sus principales productos de degradación .

De acuerdo a los resultados obtenidos de la evaluación estadística, puede concluirse que el objetivo planteado se cumplió, dado que el método desarrollado para cuantificar acetazolamida además de específico resultó ser preciso, exacto, lineal y reproducible.

Además de cumplir con los requisitos mínimos de una validación, el método en cuestión posee otra característica importante, el tiempo total de análisis es corto; tanto en la preparación de muestras y estándares, como en el tiempo de corrida. Por ello, este método puede ser aplicable no solo en estudios de estabilidad sino también a ensayo de rutina donde el tiempo es un factor crítico.

BIBLIOGRAFIA

1. The United States Pharmacopeia, XX ed. and National Formulary 14 th ed., 1980, pag. 15.
2. The United States Pharmacopeia, XXI ed. and National Formulary 16 th ed., 1985, pag. 16.
3. W. F. Bayne, G. Rogers and N. Crisologo, Assay for Acetazolamide in Plasma, *J. Pharm. Sci.*, **64**, 402-404, 1975.
4. F. Theeuwes and W. F. Bayne, Dosage form Index: An objective Criterion for Evaluation of Controlled Release Drug Delivery Systems, *J. Pharm. Sci.*, **66**, 1388-1392, 1977.
5. R. D. Hossie, N. Mousseau, S. Sved and R. Brien, Quantitation of Acetazolamide in Plasma by HPLC, *J. Pharm. Sci.*, **69**, 348-349, 1980.
6. D. J. Chapron and L. B. White, Determination of Acetazolamide in biological fluids by Reverse-Phase HPLC, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 985-989, 1984.
7. T. R. Philip, J. R. Lang and M. C. Meyer, HPLC Determination of Acetazolamide in human Plasm, *J. Liq. Chromatogr.*, 1985, **8**, 1465-1473.
8. R. Harthey, M. Lucock and M. Becker, Solid-Phase extraction of Acetazolamide from Fluid biological and subsequet analysis by HPLC, *J. Chromatogr.*, 1986, **377**, 295-305.
9. D. M. Chambers, M. H. White and H. B. Kostenbauder, Efficient extraction and reverse-phase HPLC-UV quantitation of Acetazolamide in serum, *J. Chromatogr.*, 1981, **225**, 231-5.

10. Fundamentos de Cromatografía de Gases, Centro educacional Analítico, Hewlett-Packard, México D. F., 1988.
11. Mc Nair, H. A. y Esquivel, B. H., Cromatografía Líquida de alta presión, Programa regional de desarrollo científico y tecnológico, OEA, 1980, pag. 2-38.
12. Yosto, R. W., Ettre, L. S. and Conlon, R. D., Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica, Perkin-Elmer Corporation, USA, 1978.
13. Snyder, L. R. and Kirkland, J. J., Introduction Modern Liquid Chromatography, 2^a ed., John Wiley & Sons. Inc., New York, 1979, pag. 542-550.
14. Hamilton, R.J. and Sewell, P.A., Introduction to High Performance Liquid chromatography, John Wile & Sons. Inc., New York, 1978, pag. 12-36.
15. Tsuji, K., Morozowich, W., CLG and HPLC Determination of Therapeutic Agents, Marcel Dekker Inc., New York, 1978, pag. 2-133.
16. High Performance Liquid Chromatography, HPLC, Centro Educacional Analítico, Hewlett-Packard, México D. F., 1988.
17. Windholz, M. et al., The Merck Index, 10^a ed., Merck Co., USA , pag. 19.
18. Clarke, E. G., Isolation and Identification of Drug, The Pharmaceutical Press, vol. II, 1974, pag 170 .
19. Martindale: The Extra Pharmacopeia, 27^a ed., The Pharmaceutical Press, 1978, pag. 541-542.

20. Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, 5^a ed., Secretaría de Salud, 1988, pag. 497.
21. The United States Pharmacopeia, XXII ed. and National Formulary 17th ed., 1990, pag. 1710-1712.
22. G. J. Yakatan, E. L. Frome, R. G. Leonard and J. T. Dolvisio, Bioavailability of Acetazolamide tablets, J. Pharm. Sci., 67, 252-256, 1978.
23. Farmacopea Internacional, 3^a ed., OMS, 1980, vol. II pag. 309.
24. Massart, L. D. and Dijkstra, A., Evaluation and Optimization of Laboratory Methods and Analytical Procedures, Elsevier Scientific Publis. Co., New York, 1978, pag. 7-22.
25. Duncan, R. C., Bioestadística, 3^a ed., Interamericana, México, 1978, pag. 119-154.

ANEXO A.

FORMULAS PARA EVALUAR LA PRECISION/REPETIBILIDAD DE
UN METODO ANALITICO.

- Hipótesis a contrastar: Ho $\sigma \leq 1.5\%$
 Ha $\sigma > 1.5\%$

- Estadígrafo de contraste: $X^2_{cal.} = \frac{(n-1) (s)^2}{\sigma^2}$

- Decisión estadística:

$$\text{Si } X^2_{cal.} \leq X^2_{\alpha} (0.975, n-1 \text{ gl})$$

El método se considera preciso en cuanto a repetibilidad

- Intervalo de confianza al 95%:

$$\frac{(n-1) (S)^2}{X^2_{\alpha} (0.975, n-1 \text{ gl})} < \sigma < \frac{(n-1) (s)^2}{X^2_{\beta} (0.025, n-1 \text{ gl})}$$

- Coeficiente de variación:

$$\% \text{ cv} \leq 1.5\%$$

$$\% \text{ cv} = (s/\bar{X}) \cdot 100$$

ANEXO B.**FORMULAS PARA EVALUAR LA LINEALIDAD DE UN METODO ANALITICO.**

INFERENCIAS RESPECTO A LA ORDENADA AL ORIGEN:

- Hipótesis a contrastar: $H_0 \quad a = A$
 $H_a \quad a \neq A$

donde $A = 0$

- Estadígrafo de contraste:

$$t \text{ cal.} = \frac{a - A}{S_y/x \sqrt{\frac{\sum X^2}{n \sum (X_i - \bar{X})^2}}}$$

- Decisión estadística:

Si $t \text{ cal.} < t(0.975, n-2 \text{ gl})$ y $t \text{ cal.} > t(0.025, n-2 \text{ gl})$ Puede considerarse que estadísticamente $a = 0$

- Intervalo de confianza al 95%:

$$a \pm t_{\alpha/2} S_y/x \sqrt{\frac{\sum X^2}{n \sum (X_i - \bar{X})^2}}$$

ANEXO D.**FORMULAS PARA EVALUAR LA REPRODUCIBILIDAD DE UN
METODO ANALITICO.**

Modelo matemático (2 factores aleatorios).

$$Y_{ij} = D_i + A_j + AD_{ij} + E_{(ij)k}$$

donde:

Y_{ijk} = porcentaje cuantificado por el i-nesimo analista en el j-nesimo día en la k-nesima repetición.

D_i = efecto de i-nesimo día sobre el porcentaje cuantificado.

A_j = efecto de j-nesimo analista sobre el porcentaje cuantificado.

AD_{ij} = efecto a la interacción analista-día.

$E_{(ij)k}$ = error experimental.

INFERENCIAS:

a. Efecto por el día (D).

Si $F_{cal D} < F_{(0.95)}$ con gl D/gl AD

No existe efecto por el día.

b. Efecto por analista (A).

Si $F_{\text{cal A}} < F(0.95)$ con gl A/glAD

No existe efecto por analista.

c. Efecto por la interacción analista-día (AD).

Si $F_{\text{cal AD}} < F(0.95)$ con gl AD/gl error

No existe efecto por la interacción analista-día.

Los tres criterios anteriores deben cumplirse para poder asegurar que un método analítico es reproducible.

TABLEA DE ANALISIS DE VARIANZA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS		MEDIA DE CUADRADOS	F cal.
Dl	i-1	$\frac{\sum x_i^2}{jk}$	$\frac{y^2}{ijk}$	$\frac{SC}{i-1}$	$\frac{MC}{MC}$ ana-dfa
Aj	j-1	$\frac{\sum x_j^2}{ik}$	$\frac{y^2}{ijk}$	$\frac{SC}{j-1}$	$\frac{MC}{MC}$ ana-dfa
ADlj	(i-1)(j-1)	$\frac{\sum x_{ij}^2}{k}$	$\frac{\sum x_i^2}{ik} + \frac{\sum x_j^2}{jk} + \frac{y^2}{ijk}$	$\frac{SC}{(i-1)(j-1)}$	$\frac{MC}{MC}$ ana-dfa error
error exp.	ij(k-1)	$\frac{\sum x_{ijk}^2}{k}$	$\frac{\sum x_{ij}^2}{k}$	$\frac{SC}{ij(k-1)}$	

ANEXO EPLACEBO DE LA FORMULACION

MATERIA PRIMA	CANTIDAD / UNIDAD	
Lactosa USP	115.98	mg
Almidón de maíz	42.02	mg
Polivinilpirrolidona	10.0	mg
Estearato de magnesio	2.0	mg
TOTAL	170.0	mg