

30
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

Facultad de Química

DISEÑO Y VALIDACION DE UN METODO INDICADOR DE
ESTABILIDAD PARA SULFAMETOXAZOL Y PARA
TRIMETOPRIM POR CROMATOGRAFIA DE
LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

Que para obtener el Título de
Químico Farmacéutico Biólogo
p r e s e n t a

Teresita del Niño Jesús Costales González

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1991



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.
Capitulo 1. Introducción.....	1
Capitulo 2. Generalidades.....	2
2.1 Monografía de los Fármacos.....	2
2.1.1 Sulfametoxazol.....	2
2.1.2 Trimetoprim.....	7
2.2 Métodos Analíticos.....	12
2.2.1 Sulfametoxazol.....	12
2.2.2 Trimetoprim.....	14
2.3 Farmacología.....	16
2.3.1 Espectro Antibacteriano.....	16
2.3.2 Mecanismo de Acción.....	16
2.3.3 Resistencia Bacteriana.....	17
2.3.4 Absorción, distribución y excreción.....	17
2.3.5 Efectos Indeseables.....	17
2.3.6 Usos Terapéuticos.....	18
2.4 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	19
2.4.1 Principios Básicos y Terminología.....	19
2.4.1.1 Tiempo de Retención.....	19
2.4.1.2 Número de Platos Teóricos.....	20
2.4.1.3 Altura Equivalente a un Plato Teórico.....	21
2.4.1.4 Coeficiente de Distribución o Reparto.....	21
2.4.1.5 Factor de Simetría.....	21
2.4.1.6 Resolución.....	22
2.4.1.7 Selectividad.....	22
2.4.1.8 Factor de Capacidad.....	22
2.4.2 Equipo.....	23
2.4.2.1 Fase Móvil.....	24
2.4.2.2 Reservorio.....	25
2.4.2.3 Sistema de Bombeo.....	25
2.4.2.4 Inyector.....	27
2.4.2.5 Detectores.....	27
2.4.2.6 Columna.....	30
2.4.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en Fase Inversa.....	31

2.5 Criterios de Validación.....	37
2.5.1 Evaluación del Sistema.....	37
2.5.1.1 Precisión.....	37
2.5.1.2 Linealidad.....	37
2.5.2 Evaluación del Método.....	40
2.5.2.1 Especificidad.....	40
2.5.2.2 Exactitud.....	41
2.5.2.3 Linealidad.....	42
2.5.2.4 Precisión.....	44
2.5.2.5 Estabilidad de la Muestra.....	47
2.5.2.6 Tolerancia del Sistema.....	47
Capítulo 3. Parte Experimental.....	48
3.1 Equipo, Material y Reactivos.....	48
3.1.1 Equipo.....	48
3.1.2 Material.....	48
3.1.3 Reactivos.....	48
3.2 Desarrollo de los Métodos.....	49
3.3 Validación de los Métodos.....	53
3.3.1 Linealidad del Sistema.....	53
3.3.2 Precisión del Sistema.....	53
3.3.3 Especificidad del Método.....	54
3.3.4 Linealidad del Método.....	58
3.3.5 Exactitud del Método.....	58
3.3.6 Precisión.....	58
3.3.7 Estabilidad de la Solución de la Muestra.....	59
3.3.8 Tolerancia del Sistema.....	59
Capítulo 4. Resultados.....	60
Capítulo 5. Conclusiones.....	89
Ventajas, Desventajas, y Propuestas.....	90
Bibliografía.....	91

CAPITULO 1

INTRODUCCION

Siempre que una nueva forma farmacéutica va a ser introducida en el mercado; debe estar respaldada, entre otras cosas, por un estudio de estabilidad. Dicho estudio de estabilidad debe asegurar que la formulación es estable, es decir, que el medicamento contenido en un determinado material de empaque mantiene, dentro de los límites especificados durante el tiempo de almacenamiento y uso, las características físicas, químicas, microbiológicas, terapéuticas y tóxicas que tenía en el momento de ser fabricado.

Para poder efectuar adecuadamente un estudio de estabilidad de una forma farmacéutica es necesario contar con métodos analíticos para los principios activos, que sean capaces de cuantificarlos sin que interfieran los excipientes, los productos de degradación y las sustancias producidas por la interacción de los componentes.

Debido a esto, es necesario contar con técnicas de análisis que estén adecuadamente validadas. La validación de un método analítico es un proceso por medio del cual se asegura la utilidad y confiabilidad de los datos obtenidos. Por lo general esta incluye una evaluación de la linealidad, precisión, exactitud, especificidad, estabilidad de la muestra y tolerancia del sistema.

El desarrollo de una nueva formulación de comprimidos conteniendo Sulfametoxazol y Trimetoprim hace necesario implementar una técnica de cuantificación de los principios activos para estudios de estabilidad. Con este trabajo se desarrolla y valida un método indicador de estabilidad para cuantificar los principios activos, por cromatografía de líquidos de alta resolución.

CAPITULO 2

GENERALIDADES

2.1 MONOGRAFIAS DE LOS FARMACOS:

2.1.1 SULFAMETOXAZOL (11. 20)

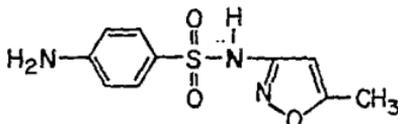
NOMBRE GENERICO: Sulfametoxazol.

NOMBRES QUIMICOS Y SINONIMOS:

- 1.- N'-(5-metil-3-isoxazolil) sulfanilamida
- 2.- 4-Amino-N-(5-metil-3-isoxazolil) bencensulfonamida.
- 3.- 5-metil-3-sulfanilamida isoxazol
- 4.- 3-(p-amino fenil sulfonamida)-5-metilisoxazol.
- 5.- Sulfisomezol.
- 6.- Sulfametil isoxazol.
- 7.- Sulfametoxazol.
- 8.- Gantanol.
- 9.- Sinomin.

FORMULA CONDENSADA: $C_{10}H_{12}N_2O_3S$

FORMULA DESARROLLADA:



PESO MOLECULAR: 153.28

DESCRIPCION: Polvo cristalino, blanco, prácticamente inodoro.

PROPIEDADES FISICAS:

a) Espectro Infrarrojo: (14) El espectro infrarrojo de una sustancia patrón de referencia de Sulfametoxazol se muestra en la figura 2.1.

Bandas Características: (11)

Frecuencia (cm ⁻¹)	Banda característica
3469 y 3379	NH ₂ (estrecha)
3300	NH (estrecha)
1616	Combinación de la deformación de NH ₂ y el anillo isoxazol (estrecha).
1595 y 1500.	C=C Aromatico (estrecha).
1313-1303	SO ₂ Asimétrico (estrecha).
1155-1303	SO ₂ Simétrico (estrecha).
828	2 H's adyacentes al anillo bencénico.

b) Espectro de Resonancia Magnética Nuclear: El espectro de RMN de ¹H de una sustancia patrón de referencia de Sulfametoxazol se muestra en la figura 2.2 (11).

c) Espectro de ultravioleta: (24) El espectro UV de una sustancia patrón de referencia de Sulfametoxazol se muestra en la figura 2.3.

d) Intervalo de Fusión: 170-175°C. (11)

e) Análisis Termogravimétrico (ATG): No presenta pérdida de peso cuando es calentado a 105°C a una velocidad de 10°C/ min de calentamiento. (4)

f) Solubilidad a 25°C: (11)

Disolvente	Solubilidad mg/ml
Aqua	0.5
Alcohol	30.0
Benceno	0.5
Cloroformo	2.3
Etanol 95%	37.8
Eter de petróleo	0.2
Eter etílico	2.7
Isopropanol	8.8
Metanol	96.3
NaOH 0.1N	10.0

g) Constante de Disociación: El pKa del Sulfametoxazol determinado espectrofotométricamente es de 5.55 y por valoración con un exceso de solución 0.1 N de ácido clorhídrico es 5.63 (11). Nakaaki, Iida y Terada (6) reportan un valor de pKa a 25°C de 5.6.

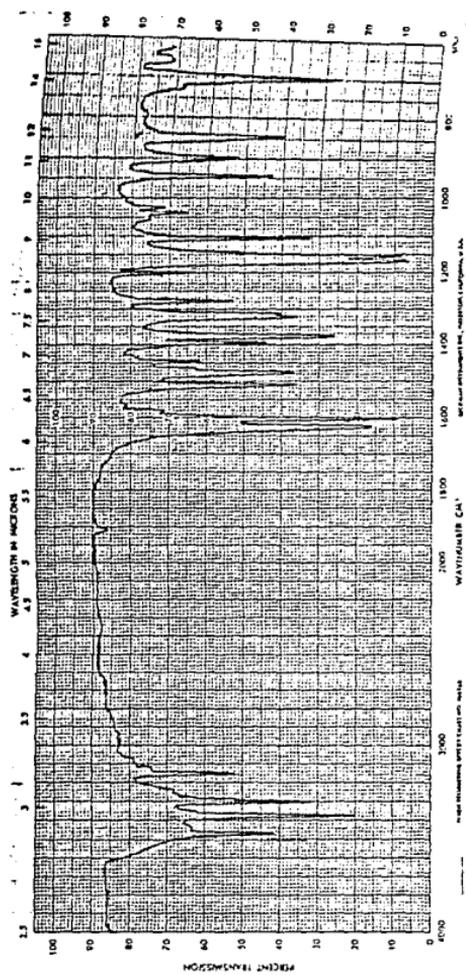


Figura 2.1 - Espectro IR de Sulfametoxazol.

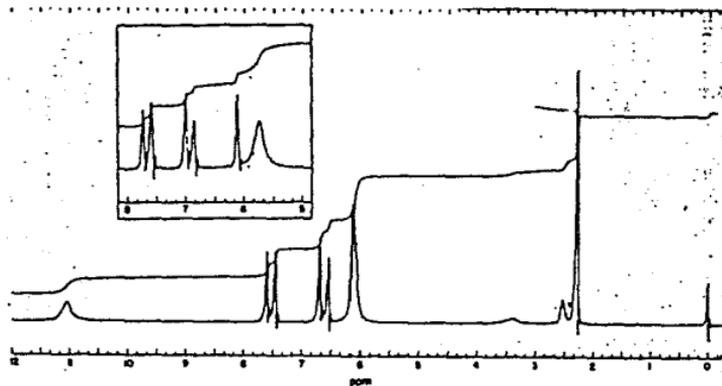


Figura 2.2 - Espectro RMN de Sulfametoxazol.

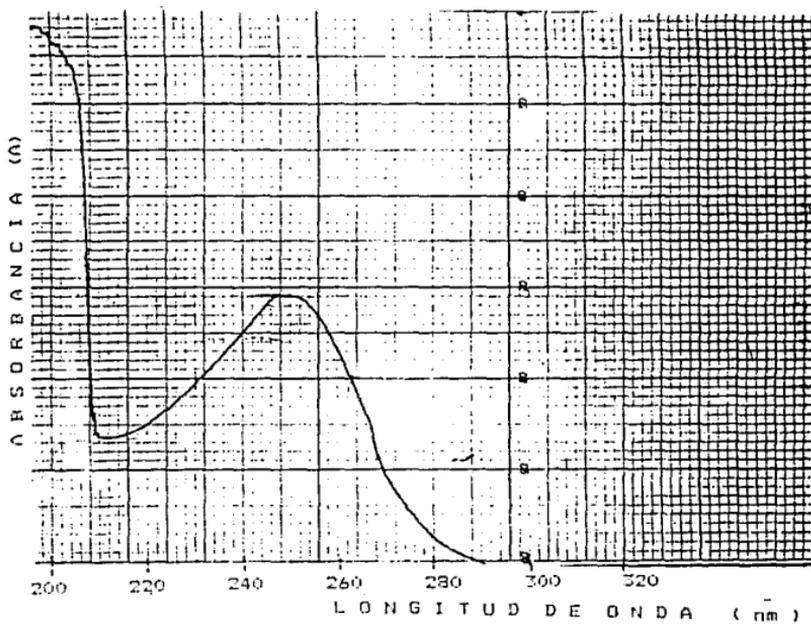


Figura 2.3 - Espectro UV de Sulfametoxazol.

b) Polimorfismo: Se han identificado tres formas polimórficas de Sulfametoxazol I, II y III. Mezclas de la forma I y II se obtienen de la recristalización con n-butanol, acetona, metanol, agua y hielo acetona.

La forma II produce una endoterma de transición aproximadamente a 166°C; la temperatura está relacionada íntimamente con la temperatura de fusión y el calor de transición no puede ser determinado independientemente por calorimetría diferencial. La proporción aproximada entre el área del pico de transición y el pico de fusión es (1:6) estimado del termograma. Así pues la energía total medida incluye el calor de transición, aproximadamente 1 kcal/mol, y el calor de fusión aproximadamente 5 kcal/mol.

Después de que la forma II se calienta aproximadamente a 164°C el espectro IR se observa idéntico al de la forma I. La difracción de rayos X de las dos formas son similares. Aparentemente la forma II puede transformarse en la forma I, pero esta transformación requiere de energía. El calor de fusión estimado para la forma II es aproximadamente de 5 cal/mol. (26)

SINTESIS: El Sulfametoxazol se prepara por una reacción química entre el 5-metil-3-aminoisoxazol con cloruro de N-acetil-p-aminobencensulfonilo. El grupo acetilo se desprende de la molécula para dar Sulfametoxazol. (11) Figura 2.4.

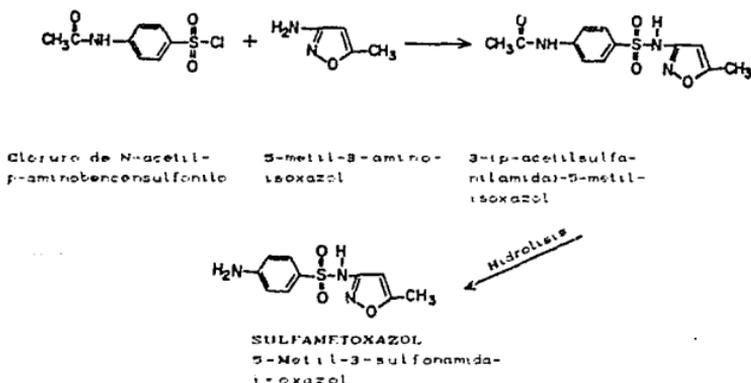


figura 2.4 - Principal Síntesis del Sulfametoxazol

DEGRADACION: Cuando una solución de Sulfametoxazol se coloca a reflujo en solución 0.4 N de NaOH no se observa descomposición por cromatografía en placa fina (CPF). Cuando el Sulfametoxazol se pone a reflujo en solución 0.4 N de HCl la molécula se parte para formar ácido sulfanílico y 5-metil-3-amino isoxazol y si se extiende el calentamiento, se detectan 3 productos diazocables por cromatografía en papel. El Sulfametoxazol es estable a 110°C por 5 días. (11)

2.1.2 TRIMETOPRIM: (11, 20)

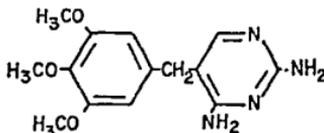
NOMBRE GENERICO: Trimetoprim

NOMBRES QUIMICOS Y SINONIMOS:

- 1.- 5-[(3'4'5'- trimetoxifenil)metil]-2,4-pirimidinadiazina.
- 2.- 2,4-diamino-5-(3'4'5'-trimetoxibencil)pirimidina.
- 3.- Monotrim.
- 4.- Prolourim.
- 5.- Trimex.
- 6.- Syraprim.
- 7.- Wellcoprim.

FORMULA CONDENSADA: $C_{14}H_{18}N_4O_3$

FORMULA DESARROLLADA:



PESO MOLECULAR: 270.32

DESCRIPCION: Polvo cristalino, blanco o amarillo pálido, inodoro.

PROPIEDADES FISICAS:

a) Espectro Infrarrojo: (24) El espectro infrarrojo de una dispersión de Trimetoprim sustancia patrón de referencia en KBr se muestra en la figura 2.5.

Bandas Características: (11)

Frecuencia (cm ⁻¹)	Banda característica
3516	NH ₂ asimétrico (estrecha).
3414	NH ₂ simétrico (estrecha).
3010	CH aromático (estrecha).
2966, 2940 v 2840	CH alifático (estrecha).
1616 v 1593	deformación del NH ₂ trasladada con el anillo aromático.
1506	Anillo Aromático.
1452	Deformación del CH.
1236 v 1129	Metoxido aromático.

b) Espectro de Resonancia Magnética Nuclear: El espectro de RMN de ¹H de una sustancia patrón de referencia de Trimetoprim se observa en la figura 2.6. (11).

c) Espectro de Ultravioleta: (24) El espectro de una sustancia patrón de referencia de Trimetoprim se muestra en la figura 2.7.

d) Intervalo de Fusión: El Trimetoprim funde aproximadamente de 199 a 203°C. (24)

e) Análisis Termogravimétrico (ATG): El Trimetoprim presenta una pérdida de peso de acuerdo a la siguiente tabla (11):

T ^o C	145	225	285	325	500
% Pérdida	0	2.4	36.0	69.0	80.0

f) Solubilidad a 25°C: (11, 24)

Disolvente	Solubilidad g/100ml
Acetona	0.23
Aqua	0.04
Alcohol Bencílico	7.29
Benceno	0.002
Cloroformo	1.82
Dimetilacetamida	13.86
Etanol 95%	0.81
Eter de Petróleo	0.02
Eter etílico	0.003
Isopropanol	0.12
Metanol	1.21
Propilenglicol	2.57
Tetracloruro de carbono	0.002

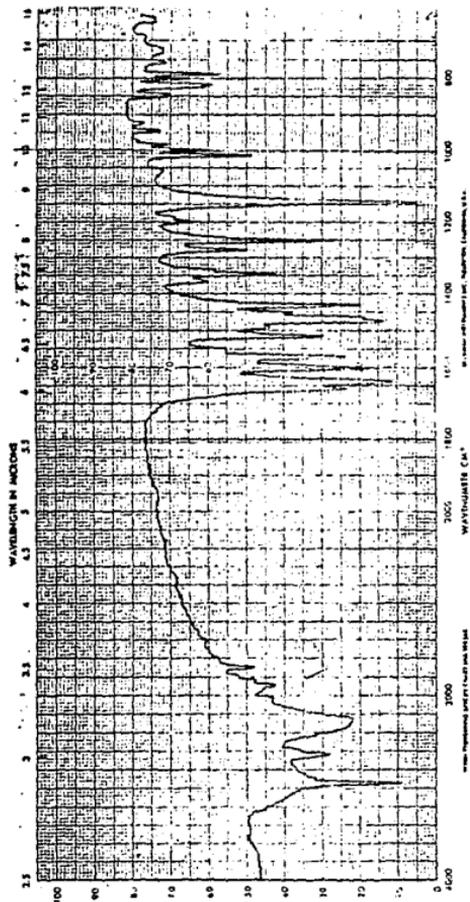


Figura 2.5 - Espectro IR de Trimetoprim

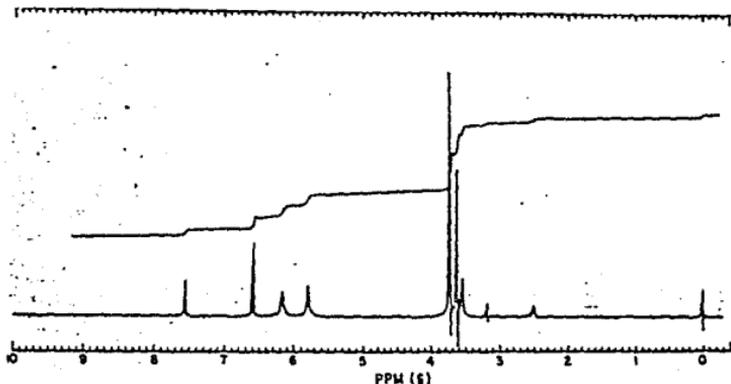


Figura 2.6 - Espectro RMN de Trimetoprim.

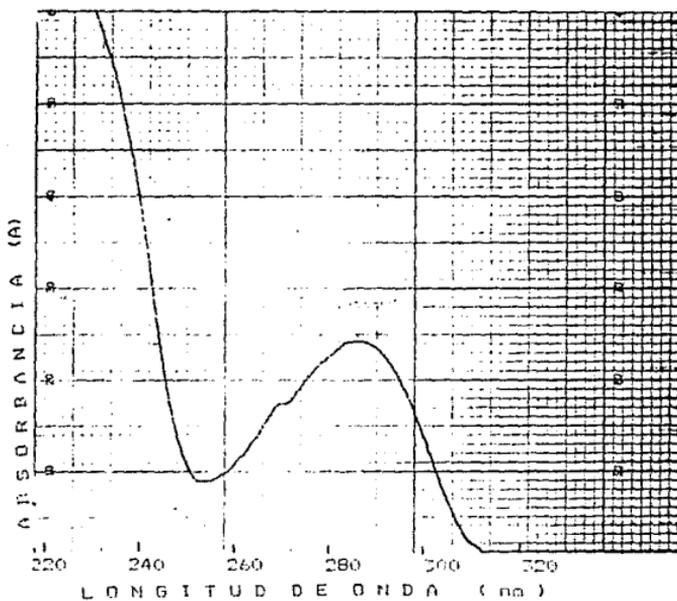


Figura 2.7 - Espectro UV de Trimetoprim

g) Constante de Disociación: Debido a que es poco soluble en agua el pKa del Trimetoprim se ha determinado preparando una solución con una mezcla de etanol-agua a varias concentraciones y después titulando con solución de NaOH. El pKa encontrado fue de 6.6. (11)

h) Polimorfismo: Se ha investigado mucho acerca de las formas polimórficas del Trimetoprim, el cual ha sido recrystalizado de varios disolventes y las formas cristalinicas han sido investigadas por espectrofotometria IR, y difracción de rayos X. El cristal mas frecuentemente encontrado del Trimetoprim se ha obtenido de varios disolventes orgánicos y se denota como forma I, es triclinico. Se reporta la existencia de un segundo polimorfo, la forma II, que fue recrystalizado de tolueno, el cristal es monoclinico. La forma II pasa a la forma I con calentamiento a 170°C y consecuentemente tendrá el mismo punto de fusión: 200°C. Existen diferencias significativas entre los espectros IR y difracción de rayos X de la forma I y II. (5)

SINTESIS: El Trimetoprim se prepara de acuerdo a la reaccion de la figura 2.8. Una mezcla de metanol, sodio, 3,4,5-trimetoxibenzaldehido y β -metoxipropionitrilo se coloca a reflujo durante 7 horas. El producto 3,4,5-trimetoxi-2-metoximetilcinamonitrilo se pone a reflujo durante toda la noche con metanol en presencia de sodio. El producto obtenido se extrae con tolueno y se recrystaliza para formar el dimetilacetal. El Trimetoprim se produce al poner a reflujo el dimetilacetal con guanidina en una solución de metanol. Los cristales secos son solubilizados con metanol, filtrados y recrystalizados. (11)

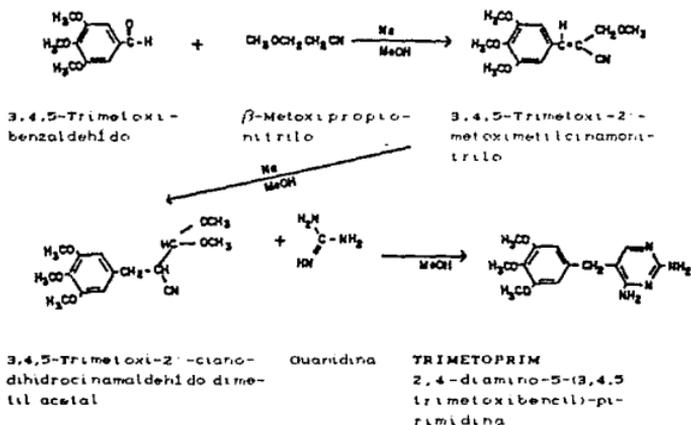
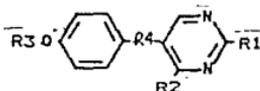


Figura 2.8 - Principal Síntesis de Trimetoprim.

DEGRADACION: Se produce por calentamiento de la materia prima bajo reflujo con acidez media o exponiendo una suspensión de Trimetoprim con varias soluciones reguladoras a la luz directa, 5 productos de degradación se han detectado por RMN y por espectrometría de masas.



	R1	R2	R3	R4
I	NH ₂	NH ₂	CH ₃	-CH ₂ -
II	OH	NH ₂	CH ₃	-CH ₂ -
III	NH ₂	OH	H	-CH ₂ -
IV	NH ₂	OH	CH ₃	-CH ₂ -
V	NH ₂	NH ₂	CH ₃	>C=O
VI	OH	OH	CH ₃	-CH ₂ -

Comprimidos de Trimetoprim empaquetados en frascos de vidrio ámbar y frascos de polietileno opacos de alta densidad con tapas metálicas fueron almacenados a temperatura ambiente durante 58 meses. No se detectó ningún cambio físico en su apariencia, no se detectaron productos de degradación por cromatografía en placa fina. (4)

2.2. METODOS ANALITICOS

2.2.1 SULFAMETOXAZOL

2.2.1.1 Análisis Elemental: (11)

Elemento	%Teorico
C	47.43
H	4.38
N	16.60
S	12.65

2.2.1.2 Cromatografía en Placa Fina: Se utiliza para separar al Sulfametoxazol del ácido sulfanílico y de la sulfanilamida. Se utilizan cromatoplaques de sílica del G y comp fase móvil alcohol: n-heptano: cloroformo y ácido acético dilacial (25:25:25:7); la muestra de

Sulfametoxazol se disuelve en metanol amoniacal, se aplica y se deja ascender por la cromatolaca hasta que la fase móvil alcanza las 3/4 partes de esta, se retira, se seca y se rocía con el reactivo de Erlich. (24)

Rf's aproximados:	Acido sulfanilico	0.1
	Sulfanilamida	0.5
	Sulfametoxazol	0.7

2.2.2.3 Analisis Espectrofotometrico: Se lleva a cabo usando solución 0.1N de NaOH como disolvente. En estas condiciones la Lev de Beer se cumple entre 0.26 mcg/ml a 26 mcg/ml. (11)

2.2.1.4 Analisis Colorimetrico: Se lleva a cabo mediante la diazocación con cloruro de N-(1-naftiletilendiamina) El color rojo resultante absorbe a 540 nm. (11)

2.2.1.5 Analisis Volumetrico: La valoración potenciométrica con NaNO_2 es el método de selección. La muestra seca se disuelve en ácido acético glacial diluido (1:2). Se adiciona HCl, la solución se enfría a 15°C e inmediatamente se valora con solución 0.1M de NaNO_2 . El punto final se detecta potenciométricamente usando un electrodo de calomel/Pt. Cada ml de solución 0.01M de NaNO_2 equivale a 25.33 mc de Sulfametoxazol. (24)

Se puede valorar también con solución 0.1N de LiOCH_3 en dimetilformamida usando azul de timol como indicador. El protón de la Sulfanilamida es reemplazado por el ion Li^+ . Cada ml de solución 0.1N de LiOCH_3 equivale a 25.33 mc de Sulfametoxazol. (11)

2.2.1.6 Analisis por CLAR: Un método indicador de estabilidad para Sulfametoxazol utiliza una columna de sílica de 10 micras de tamaño de partícula, una fase móvil de isooctano: cloruro de metileno: 2 propanol: acetonitrilo: ácido acético glacial (70:25:5:5:0.5) y un detector UV de 254 nm. El método puede incluso usarse para detectar la presencia de Sulfanilamida incrementando la proporción de acetonitrilo e isopropanol en la fase móvil. (17)

Otro método utiliza una columna LiChrosorb-NH₂, una fase móvil de hidróxido de amonio concentrado: agua: metanol: éter etílico (0.1:4:12.5:83.4) y un detector a 254 nm. Con esta técnica se puede cuantificar Sulfonamidas en combinación con Trimetoprim en comprimidos, suspensiones y supositorios. (3)

Otro método para cuantificar Sulfametoxazol es el que utiliza una columna G₁₈ µBondapak, detector UV a 254 nm, una fase móvil de acetonitrilo: ácido acético: agua (22.5:1:76.5) usando como patrón interno sulfabenzamida. Con este método se pueden detectar otras sulfonamidas y es indicador de estabilidad. (23)

Un método para análisis de rutina por CLAR utiliza una

columna μ Bondapak C₁₈ con una fase móvil que consiste en acetonitrilo y una solución 0.005M de fosfato de potasio dibásico con un detector a 214 ó 254 nm. (2)

2.2.2 TRIMETOPRIM

2.2.2.1 Análisis Elemental:

Elemento	%Teórico
C	57.92
H	6.25
N	19.30

2.2.2.2 Cromatografía en Capa Fina: El Trimetoprim y su precursor inmediato 3,4,5-trimetoxi-2'-ciano-dihidrocinamaldehído dimetil acetal se separan bajo las siguientes condiciones (4):

FASE ESTACIONARIA: Sílica Gel
FASE MOVIL: Benceno: éter etílico: metanol:
NH₄OH conc. (50:50:10:1).
MUESTRA: Trimetoprim en metanol. Aplicar
0.05 ml.

Dejar ascender la fase móvil 15 cm a través de la cromatoplaca. La detección se puede hacer de 3 formas:

1.- Luz UV de baja longitud
2.- Rociar la cromatoplaca con una mezcla de 5 ml de una solución de 0.8 g de nitrato de bismuto en 10 ml de ácido acético glacial y 5 ml de una solución de mercurio en veduro de potasio en 10 ml de agua. Colocarlos en un matraz volumétrico de 50 ml llevándolo a volumen con ácido sulfúrico al 10% .

3.-Rociar la cromatoplaca con solución al 10% de H₂SO₄ y posteriormente con una mezcla 1:1 de solución al 10% de cloruro férrico 10% y solución al 5% o/v de ferricianuro de potasio.

2.2.2.3 Analisis por CLAR : Un método de análisis por CLAR para Trimetoprim se lleva a cabo bajo las siguientes condiciones (11):

COLUMNA: Acero 0.5 m. 3 mm de diámetro interno.
EMPAQUE: Merckosorb S1 60; tamaño de partícula 5 micras.
FASE MOVIL: Metanol: cloroformo: etanol: NH₄OH concentrado (10:89.9:0.6-1:0.1).
VELOCIDAD DE FLUJO: 0.6 ml/min.
DETECTOR: UV 270 nm.
SUSTANCIA PATRON DE REFERENCIA INTERNA (SPRI):

2-amino-pirimidina.
VOLUMEN DE INYECCION: 2 mcl de una solución metanólica que contenga 1 a 2 mcg de Trimetoprim y de la SPRI.

Primero eluye la SPRI seguido del Trimetoprim a un tiempo de retención aproximado de unos 10 min.

Otro método para analizar Trimetoprim requiere de lo siguiente:

COLUMNA: Acero Inoxidable 25 cm x 4.6 mm de diámetro interno.
EMPAQUE: Zorbax TMS; tamaño de partícula 7 micras.
FASE MOVIL: Acetonitrilo: 1-propano: metanol : tetrahidrofurano: ácido acético: agua. (5:20:15:25:1:34).
VELOCIDAD DE FLUJO: 2 ml/min.
DETECTOR: UV 291 nm.
VOLUMEN DE INYECCION: 20 mcl de una solución etanólica que contenga 10 mcg/ml de Trimetoprim.

La bibliografía comenta que este método es adecuado para cuantificar Trimetoprim en presencia de productos de degradación en su forma farmacéutica y bajo sus condiciones de análisis.

Un método de cuantificación de Trimetoprim en suero y orina sugiere el siguiente sistema:

COLUMNA: C 18 25 cm x 4.6 mm de diámetro interno
FASE MOVIL: Metanol: Ácido fosfórico 0.05 M: Lauril Sulfato de Sodio. (LSNa) (70:30:0.1%)
VELOCIDAD DE FLUJO: 2 ml/min.
DETECTOR: UV 230 ó 290 nm.
VOLUMEN DE INYECCION: 20 mcl.

2.2.2.4 Análisis Espectrofotométrico: Un método espectrofotométrico directo para el análisis de Trimetoprim requiere de la formación de un par-iónico con verde de bromocresol midiéndose la absorbancia de la amina primaria a 415 nm. Este método se ha utilizado para comprimidos de Trimetoprim y para comprimidos en combinación con Sulfametoxazol. (11)

2.2.2.5 Análisis Volumétrico: Puede ser analizado potenciométricamente pesando de 0.8-0.9 g de Trimetoprim disolviendo en 100 ml de anhídrido acético: ácido acético (90:10) y valorando con solución 0.1N de ácido perclórico en ácido acético glacial. Cada ml de la solución 0.1N de ácido perclórico en ácido acético equivale a 29.03 mg de Trimetoprim. (11, 24)

2.3 FARMACOLOGIA: (9. 12)

La introducción de Trimetoprim combinado con Sulfametoxazol constituyó un progreso importante en el desarrollo de agentes antimicrobianos clínicamente efectivos y representa la aplicación práctica de una consideración teórica, es decir, que si dos fármacos actúan sobre pasos secuenciales de la vía de una reacción enzimática obligada en las bacterias, el resultado de su combinación es sinérgico. Amplios estudios bioquímicos del mecanismo de acción de esta combinación de compuestos indican claramente que así ocurre en realidad. Los detalles de los mecanismos de acción de esta combinación estuvieron definidos mucho antes de establecer su gama de efectividad clínica.

2.3.1 Espectro Antibacteriano: El espectro antibacteriano del Trimetoprim es similar al del Sulfametoxazol, aunque el primero, es generalmente de 20 a 100 veces más potente que el segundo. Los datos presentados aquí se refieren a la actividad antimicrobiana de la combinación de ambos agentes.

Son inhibidas todas las cepas de S. pneumoniae, C. difteriae y N. meningitidis son sensibles al Trimetoprim-Sulfametoxazol. Del 50 al 95 % de las cepas de S. aureus, S. epidermidis, S. pyogenes, el grupo Viridans de estreptococos S. faecalis, E. coli, P. mirabilis, P. moroanii, P. rettgeri, Enterobacter sp., Salmonella sp., Shigella sp., P. pseudomallei, Serratia sp. y especies de Alcaligenes. También son sensibles especies de Klebsiella, Brucella Abortus, Pasteurella haemolytica, Yersinia pseudotuberculosis y enterocolitica y Nocardia asteroides. Muy pocas cepas de P. aeruginosa son sensibles. Las cepas meticilina-resistentes de S. aureus, aunque también resistentes a Trimetoprim o Sulfametoxazol por sí solos, son generalmente susceptibles a la combinación. Es evidente una interacción sinérgica entre los componentes de la preparación, incluso cuando los microorganismos son resistentes a la Sulfonamida, o resistentes al Trimetoprim. Sin embargo, el grado máximo de sinérgismo se produce cuando los microorganismos son sensibles a ambos componentes.

2.3.2. Mecanismo de Acción: La actividad antimicrobiana de la combinación del Trimetoprim y el Sulfametoxazol resulta de sus acciones sobre dos pasos de la vía enzimática para la síntesis del ácido tetrahidrofólico. La sulfonamida inhibe la incorporación de ácido p-amino benzoico (PABA) al ácido fólico, y el Trimetoprim previene la reducción de dihidrofolato a tetrahidrofolato por la enzima dihidrofolato reductasa. El tetrahidrofolato es la forma del folato esencial para las reacciones de transferencia de un carbono, por ejemplo, la síntesis de timidilato a partir de desoxiuridilato. La toxicidad selectiva para los microorganismos se logra de dos formas: las células de los mamíferos utilizan folatos preformados de la dieta y no sintetizan el compuesto. Además el Trimetoprim es un inhibidor muy selectivo de la dihidrofolato reductasa de los organismos inferiores. Esto es de vital importancia, porque

esta función enzimática es fundamental en todas las especies.

Existe una relación óptima entre las concentraciones de los 2 agentes para el sinergismo, y la misma es igual a la relación entre las concentraciones inhibitorias mínimas de los fármacos que actúan en forma independiente. Aunque esta relación varía en las diferentes bacterias, la más efectiva para el mayor número de microorganismos es igual a 5 partes de Sulfametoxazol por 1 parte de Trimetoprim. En esta proporción y debido a la potenciación producida, la asociación citada llega a ser bactericida en concentraciones terapéuticas en el hombre. Debe señalarse que la citada potenciación se produce con todas las sulfonamidas pero se ha elegido el Sulfametoxazol por dos circunstancias: a) el Sulfametoxazol es una sulfonamida potente; b) la vida media de ambos fármacos es muy semejante, de manera que su administración puede realizarse conjuntamente a intervalos convenientes.

2.3.3 Resistencia Bacteriana: La frecuencia de desarrollo de resistencia bacteriana a Trimetoprim-Sulfametoxazol es menor que para cualquiera de ellos por sí solo, y esto es lógico porque un microorganismo que ha adquirido resistencia a uno de los componentes puede ser destruido por el otro. Microorganismos resistentes a Trimetoprim pueden surgir por mutación. La resistencia de las bacterias G(-) se asocia a menudo con la presencia de factores R que pueden transferirse a microorganismos susceptibles por conjugación.

2.3.4 Absorción, distribución y excreción: Después de una sola dosis oral del preparado combinado, el Trimetoprim se absorbe más rápidamente que el Sulfametoxazol. La administración simultánea de los fármacos parece hacer más lenta la absorción del Sulfametoxazol. Las concentraciones sanguíneas máximas del Trimetoprim se alcanzan generalmente a las 2 hrs en casi todos los pacientes. La vida media del Trimetoprim y Sulfametoxazol es de unas 10 y 9 hrs respectivamente.

Cuando se administran 800 mg de Sulfametoxazol con 160 mg de Trimetoprim dos veces por día, las concentraciones plasmáticas máximas de los dos fármacos son aproximadamente 40 y 2 mcg/ml, la relación óptima que se busca.

El Trimetoprim se distribuye rápidamente en los tejidos, y aproximadamente el 70 % se une a las proteínas del plasma en presencia de Sulfametoxazol. El volumen de distribución del Trimetoprim es unas 6 veces mayor al del Sulfametoxazol. El fármaco entra fácilmente en el líquido cefalorraquídeo y el esputo. Altas concentraciones de cada componente de la mezcla se encuentran también en la bilis. Aproximadamente el 65 % del Sulfametoxazol se une a la proteína del plasma.

De un 25 a 50 % de Sulfametoxazol y hasta el 50 % del Trimetoprim se excretan por la orina en 24 hrs.

2.3.5 Efectos Indeseables: No hay indicios de que la combinación Trimetoprim-Sulfametoxazol administrada en

personas normales en las dosis recomendadas induzcan deficiencias de folato; pero si puede ser tóxico cuando las células del paciente son deficientes en folato; en estos casos el Trimetoprim-Sulfametoxazol puede ocasionar megaloblastosis, leucopenia o trombocitopenia. Aproximadamente el 75 % de los efectos desfavorables afectan a la piel. Son raros la dermatitis exfoliativa, el síndrome de Stevens-Johnson y la necrolisis epidérmica tóxica y aparecen principalmente en individuos mayores. Náuseas y vómitos constituyen las principales reacciones gastrointestinales; la diarrea es rara. Glositis y estomatitis son relativamente comunes. Cefalea, depresión y alucinaciones son las reacciones del SNC. Se llegan a presentar también reacciones hematológicas como anemia, y trastornos de la coagulación.

La administración previa o simultánea de diuréticos puede ocasionar mayor riesgo de trombocitopenia, especialmente en pacientes ancianos con insuficiencia cardíaca; puede provocar la muerte. En pacientes con enfermedad renal puede ocasionar deterioro permanente de la función renal.

2.3.6 Usos Terapéuticos:

- Infecciones del tracto urinario: infecciones crónicas y recurrentes del tracto urinario. Util para eliminar o reducir marcadamente las enterobacterias que rodean el orificio uretral. El Trimetoprim es a menudo efectivo para el tratamiento de prostatitis bacteriana. Util para reducir infecciones del tracto urinario de la mujer así como el número de enterobacterias que habitan el introito vaginal.

- Infecciones bacterianas de las vías respiratorias: Efectivo para las exacerbaciones agudas de la bronquitis crónica. No debe utilizarse en caso de faringitis estreptocócica pues no elimina al microorganismo. Es eficaz para la otitis media aguda en niños y para la sinusitis maxilar aguda en adultos, causada por cepas susceptibles de H. influenzae y S. pneumoniae.

- Infecciones gastrointestinales: Util en el tratamiento de shigellosis, fiebre tifoidea aunque el cloranfenicol es el fármaco de elección para esta enfermedad.

- Infecciones genitales: Efectiva para el tratamiento de uretritis gonocócica aguda en hombres y mujeres. La combinación no es capaz de prevenir la incubación de sífilis ni de curar la enfermedad ya establecida.

- Infección por Pneumocystis carinii.

- Otras Infecciones: Se ha sugerido que Trimetoprim-Sulfametoxazol puede ser efectivo en la terapéutica de la brucelosis, incluso en presencia de lesiones localizadas como artritis, endocarditis u orquiepidemitis.

2.4 CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION:

2.4.1 PRINCIPIOS BASICOS Y TERMINOLOGIA: (15, 24)

El termino "Cromatografia" se ha adoptado universalmente para cubrir a la "ciencia de las separaciones". El termino abarca las tecnicas capaces de hacer que mezclas de compuestos puedan ser separados tomando en cuenta sus diferentes propiedades fisicas y quimicas. Estas diferencias estan gobernadas por el grado de migración de los componentes de una mezcla que pasan a través de una fase estacionaria por influencia de un fluido en movimiento.

La columna cromatografica es importantisima en la separación de los componentes de una mezcla, al igual que el establecer las condiciones bajo las cuales los componentes individuales fluyen a través de la columna a velocidades diferentes debido a la influencia de movimiento de la fase móvil o acarreador.

Los diferentes grados de elución son debidos a la interacción entre los solutos de la muestra y los componentes de la fase estacionaria. Hay 4 principales mecanismos en cromatografia de liquidos por los cuales los componentes de una mezcla son retenidos selectivamente:

1) Cromatografia Liquido-Liquido: Donde el factor determinante son los diferentes coeficientes de particion.

2) Cromatografia Liquida-Solida: En el cual el efecto predominante es la adsorción en superficies como la sílica gel.

3) Cromatografia de Intercambio Iónico: En donde existe una disociación de electrolitos fuertes y débiles.

4) Cromatografia de Exclusión Molecular: En donde el factor más importante es el tamaño y forma molecular de los solutos.

2.4.1.1 TIEMPO DE RETENCION (t)

Es el tiempo que la muestra permanece dentro de la columna y se mide desde el momento en que la muestra se introduce en el sistema hasta que se obtiene el punto máximo de la señal o pico. El tiempo de retención es característico de la muestra, la columna, la fase móvil y la temperatura.

Cuando la muestra no experimenta ninguna interacción con la fase estacionaria, esta pasa sin ninguna retención y entonces se dice que eluye en el volumen vacío o tiempo muerto de la columna. Fisicamente este volumen representa el espacio intersticial entre las partículas del empaque de la columna y cualquier poro del empaque mismo que pueda ser ocupado por la fase móvil.

2.4.1.2 NUMERO DE PLATOS TEORICOS (N).

Un plato teórico es el equilibrio de distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. Se determina de acuerdo con la fórmula:

$$N = 16 \left[\frac{t}{w} \right]^2$$

donde:

N = número de platos teóricos.

t = tiempo de retención del soluto.

w = ancho del pico extrapolando los lados del pico a la línea base.

La habilidad de una columna para minimizar la extensión de un pico se refiere a la eficiencia de la columna: lograr alta eficiencia en una columna es uno de los objetivos primordiales en el desarrollo de la moderna cromatografía de líquidos.

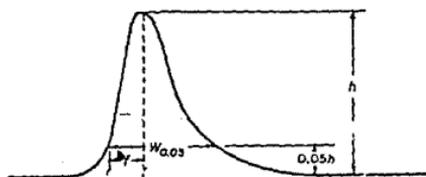
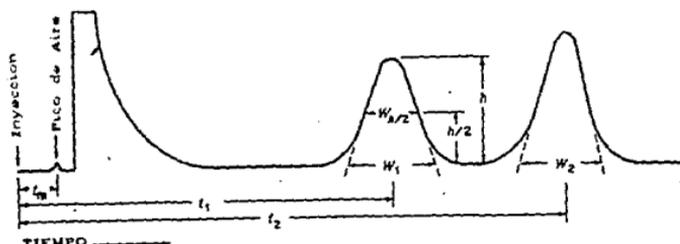


Figura 2.9 - Representación de un Cromatograma.

2.4.1.3 ALTURA EQUIVALENTE A UN PLATO TEORICO (AEPT)

Es la longitud de la columna requerida para obtener un equilibrio de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. Se calcula como:

$$AEPT = \frac{L}{N}$$

donde:

AEPT = Altura Equivalente a un Plato Teorico
L = Longitud de la columna
N = Número de platos teoricos.

2.4.1.4 COEFICIENTE DE DISTRIBUCION O REPARTO (K)

Es la relación de la cantidad de masa del soluto en la fase móvil y la fase estacionaria. Se representa por:

$$K = \frac{\text{Cantidad de muestra/mililitro de fase estacionaria}}{\text{Cantidad de muestra/mililitro de fase móvil}}$$

Es una propiedad física característica de cada muestra y del sistema cromatografico.

2.4.1.5 FACTOR DE SIMETRIA (T)

Se refiere a la simetría del pico. para un pico simétrico, el factor de simetría tiene un valor igual a 1, por lo que a medida que aumenta este valor, la asimetría comienza a ser más pronunciada.

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

donde:

$W_{0.05}$ = ancho de pico al 5% de la altura del pico en centímetros.

f = trazando una línea perpendicular a la línea base desde el vertice del pico, f es el ancho desde esa línea hasta el lado izquierdo del pico, al 5% de la altura de este, en centímetros.

2.4.1.6 RESOLUCION (R)

La resolución es una medida cuantitativa del grado de separación obtenida entre dos compuestos, es decir, la separación máxima de los picos eluidos. Se expresa como el cociente entre la distancia de los máximos de los dos picos y el valor medio de la anchura del pico en la base:

$$R = \frac{2 (t_2 - t_1)}{w_2 + w_1}$$

donde:

R = Resolución.

t_1 y t_2 = tiempo de retención del soluto 1 y 2 en minutos.

w_1 y w_2 = ancho de los picos en minutos.

Una completa separación de picos se considera a partir de una R = 1.5.

2.4.1.7 SELECTIVIDAD (α)

En términos cromatográficos la selectividad es una medida de la solubilidad diferencial de dos compuestos en la fase estacionaria. Su valor debe encontrarse entre un intervalo de 1.1 a 2.0. Se expresa como:

$$\alpha = \frac{t_2 - t_m}{t_1 - t_m}$$

donde:

t_1 y t_2 = tiempo de retención del soluto 1 y 2.

t_m = tiempo muerto.

Para que una separación sea posible no es necesario que la selectividad sea igual a 1 pero sí que la elución de los picos sea tal que no se traslapen. Esto depende de lo ancho de los picos y de que tan larga es la columna para que se lleve acabo la separación.

2.4.1.8 FACTOR DE CAPACIDAD (k')

El factor de capacidad es el tiempo que se retiene cada componente en la columna. La fase estacionaria retarda al soluto en un tiempo t , mientras t_m representa el tiempo que permanece en la fase móvil; por lo tanto el cociente entre ambos nos dará el valor de k' . Este factor depende de la naturaleza química y temperatura de las fases líquidas que

conforman el sistema. El valor de k' generalmente esta entre 0 y 10; k' mayores implican tiempos excesivos para completar la separación. Se calcula:

$$k' = \frac{t}{t_m} - 1$$

donde:

k' = factor de capacidad.
 t = tiempo de retención del compuesto.
 t_m = tiempo muerto.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) es un tipo de cromatografía líquida que se lleva a cabo en columnas de diámetro muy pequeño, rellenas de materiales pulverulentos cuyas partículas tienen un tamaño entre 5 a 40 micras con una distribución de tamaños no mayor a ± 2 micras. Este tipo de columnas tienen una alta eficiencia pero también una resistencia al flujo elevada, por lo que es necesario emplear sistemas de bombeo de alta presión (hasta 5000 psi) que hagan fluir la fase móvil a una velocidad constante a través de la columna. La cantidad de fase estacionaria dentro de la columna es pequeña por lo que se requiere que la cantidad de muestra también sea pequeña (entre 1 y 100 microlitros), la cual se introduce a la columna a través de válvulas de inyección especiales que proporcionan precisión y repetibilidad en la introducción de la muestra.

Otra de las características de la CLAR es que las columnas son reutilizables por bastante tiempo y además se cuenta con equipo de detección altamente especializado que proporciona un registro continuo de la composición del líquido que sale de la columna.

Estos detectores pueden ser del tipo de detectores ultravioleta, ya sea de longitud de onda fija o variable; de índice de refracción; electroquímicos; de arreglo de fotodiodos o de fluorescencia. Esto aunado a un apropiado sistema de registro permite obtener un cromatograma que se utiliza para identificar y cuantificar los componentes de una muestra. Una de las ventajas es que se puede trabajar con gradientes y controlar la temperatura del sistema.

2.4.2 EQUIPO (7)

Se cuenta hoy en día con una amplia gama de equipo en cuanto a costo, complejidad y tipo de instrumental, pero deben cumplir con una serie de características con fines de adquisición de acuerdo a las necesidades y a la utilidad que pueden prestar. Dichas características son:

a) Versatilidad: El instrumento debe ser adecuado para trabajar con muestras de diferente tipo, debe adaptarse a las diferentes técnicas cromatográficas y debe realizar el

máximo de operaciones. Para ello el instrumento debe estar equipado con los siguientes aditamentos:

- Sistema de bombeo de alta presión.
- Diversos detectores.
- Columna.
- Inyector.
- Integrador.

Opcionales:

- Sistema para recolectar fracciones a la salida de la columna.
- Programadores de fase móvil o disolvente (generadores de gradiente).
- Controles de temperatura para la columna y el detector.

b) Reproducibilidad y Estabilidad: Son características esenciales si se quiere obtener del instrumento un funcionamiento efectivo a largo plazo. El instrumento debe proveer un control adecuado sobre los parámetros de operación, tales como el flujo de la fase móvil, la temperatura, presión, composición de la fase móvil, etc. y para ello debe estar provisto de controles de temperatura y flujo, sistema de bombeo de alta presión, programadores de fase móvil, detectores, etc.; para así poder garantizar los resultados obtenidos.

c) Sensibilidad: Un buen instrumento, además de trabajar con pequeñas cantidades de muestra, debe generar señales de intensidad apreciables. La sensibilidad de todo cromatograma de líquidos depende del sistema de detección que utiliza. Con los detectores más recientes es posible detectar componentes de la muestra en el intervalo de los nanogramos.

2.4.2.1 FASE MOVIL: No es propiamente dicha parte del equipo pero el control de la presión, el flujo y la composición de la misma, son muy importantes. Las características que debe reunir toda fase móvil para poder ser empleada en cromatografía líquida son:

- Compatibilidad con la muestra.
- No degradar ni disolver la fase estacionaria.
- Tener baja viscosidad.
- Ser compatible con el tipo de detector utilizado.
- Tener la polaridad adecuada para permitir una retención conveniente de la muestra en la columna.

Es esencial que la muestra sea compatible con la fase móvil para que pueda ser transportada a través de la columna evitando que se precipite dentro de la cámara de inyección o dentro de la columna, ya que puede tapar el sistema, dañar la columna y en algunos casos se puede propiciar la pérdida de la resolución en la separación.

Se puede dar el caso que la fase móvil disuelva la fase estacionaria, para esto se recomienda saturar a la fase móvil con la fase estacionaria, ya sea con anterioridad a su

introducción al instrumento o mediante el uso de una precolumna, que por lo general consiste en una sección corta de tubo, relleno de algún soporte sólido poroso. A través de esta guardacolumna se hace pasar la fase móvil antes de que entre a la columna y así se evita la pérdida de fase estacionaria.

La baja viscosidad de la fase móvil es muy importante en la eficiencia de la separación, ya que la viscosidad influye en el efecto de transferencia de masa entre la fase móvil y la fase estacionaria. Los disolventes más comúnmente empleados son: hexano, cloruro de metileno, cloroformo, tetrahidrofuran, acetonitrilo, isopropanol, metanol y agua. Dichos disolventes deben ser de alta pureza, usualmente grado espectroscópico o bien grado cromatográfico lo cual es muy importante cuando se desea realizar análisis de alta sensibilidad con detectores como el de luz ultravioleta, el de fluorescencia ó electroquímico.

2.4.2.2 RESERVORIO: Se pueden utilizar recipientes de vidrio, acero inoxidable o plásticos inertes, de una capacidad entre 1 y 3 litros suficiente para todo un día de operación. La toma de la muestra se hace a través de un filtro, con el objeto de remover pequeñas partículas que puedan obstruir y dañar el sistema de bombeo y la columna. Es recomendable filtrar las fases móviles antes de emplearlas en el cromatógrafo pasándolas por un filtro de por lo menos 2 micras de diámetro. También es necesario degasificarlas ya que algunos gases como el oxígeno tienden a disolverse en el líquido produciendo burbujas que pueden afectar el funcionamiento del equipo. Esto se puede lograr con agitación magnética con vacío o con vibración ultrasónica.

2.4.2.3 SISTEMA DE BOMBEO: Las columnas utilizadas en la moderna cromatografía líquida están rellenas de materiales especiales de tamaño de partícula muy pequeña, lo cual hace que la resistencia al flujo de la fase móvil sea muy elevada. Por esta razón, se requiere un sistema de bombeo que haga fluir la fase móvil a un flujo razonable, pues de lo contrario los análisis serían excesivamente lentos.

Los aspectos más importantes de todo sistema de bombeo son:

- Presión máxima de operación (usualmente hasta 5000 psi).
- Intervalo de flujo entre 0.5 y 10 ml/min.
- Reproducibilidad y constancia de flujo (aprox. 1%).
- Característica del flujo continuo y libre de pulsaciones.
- Resistente a líquidos corrosivos.
- Facilidad para el cambio de fases móviles.
- Facilidad de limpieza del sistema.

Bombas de flujo constante. - Mantienen la velocidad constante de la fase móvil. De este tipo se tienen las de pistones que impulsan al disolvente que entra a cámaras con una capacidad de volumen pequeña generando pequeñas

pulsaciones de la fase móvil.

Bombas de presión constante.- Deben mantener la viscosidad del disolvente, la temperatura de la columna y la presión constantes. La ventaja es que si estos parámetros se controlan, las pulsaciones también. Emplea un gas inerte para presurizar el disolvente.

Para sistemas isocráticos, es decir, donde se mantiene constante la composición de la fase móvil, se utiliza solo una bomba. En aquellas donde es necesario utilizar gradientes se utilizan dos o más bombas que se programan para modificar la proporción inicial de los disolventes. También hay bombas que tienen entradas para 1, 2 y 3 disolventes y que hacen las veces de 1, 2 y 3 bombas.

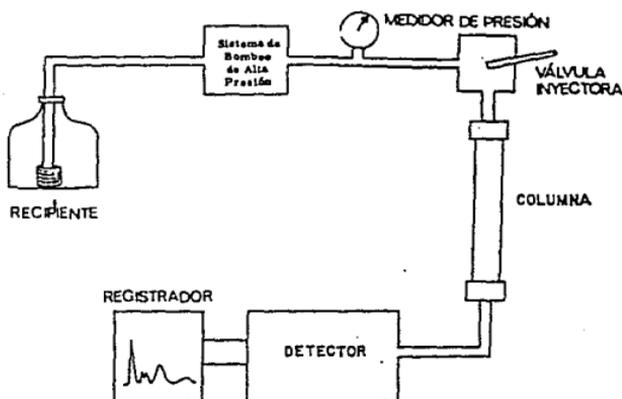


Figura 2.10 - Esquema de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

2.4.2.4 INYECTOR: La obtención de picos adecuadamente resueltos es reflejo, entre otras cosas, de una introducción adecuada de la muestra en el sistema. La mejor manera de introducirla es en forma de paquete pequeño ya que ayuda a obtener picos anchos y simétricos.

Inyectores manuales. - Lo más sencillo es introducir la muestra con una jeringa, donde por medio de un abrir y cerrar de valvulas manualmente se desvía el flujo mientras se aplica la muestra en la cámara de carga (loop) y luego se reanuda a través de él completandose la inyección.

Inyector automatico. - Inyecta por sí solo las muestras disminuyendo el error en la medición del volumen a inyectar y aumentando la reproducibilidad de las inyecciones.

2.4.2.5 DETECTORES: (21) Un detector ideal sería el que cumple con los siguientes requisitos:

- Altamente sensible.
- Estable.
- De lectura continua y de respuesta universal.

Hoy en día no existe un detector ideal y los que hay disponibles sólo son aplicables para casos particulares. Al considerar un detector en términos de su aplicación a un cierto problema, o al evaluar las cualidades de un cierto diseño, deben tenerse en cuenta propiedades generales como:

Respuesta. - Puede ser universal o selectiva, según la capacidad que tenga el detector de trabajar con todo tipo de muestras o sólo con uno específico.

Sensibilidad. - Se refiere a la relación entre la señal generada y la cantidad de muestra que produce dicha señal.

Ruido. - Es la variación en la señal del instrumento que no es atribuida a la muestra y que puede ser producida por fallas electrónicas, variaciones de flujo o temperatura, fluctuaciones en el voltaje, burbujas de aire atrapadas en el detector, etc.

Se llama cantidad mínima detectable a la cantidad de muestra que produce una señal igual al doble del nivel del ruido del instrumento.

Linealidad. - Para utilizar la señal generada por el detector como una medida cuantitativa, debe guardar una relación lineal con la concentración de la muestra; esta proporción se conoce como linealidad. El intervalo lineal de un detector se puede definir como la relación entre las concentraciones máximas y mínimas respecto a las cuales la respuesta del detector es lineal.

Estabilidad. - Un buen detector no debe generar respuesta a los cambios de temperatura y a la variación del flujo y al mismo tiempo ser compatible con diferentes composiciones de la fase móvil.

-Detector de Índice de Refracción: Mide la diferencia de los índices de refracción del disolvente puro y de la solución de la muestra que sale de la columna; de esta manera

se detecta cualquier cambio en la composición de la fase móvil. La respuesta es universal y su sensibilidad moderada, por lo general del orden de microgramos o partes por millón.

-Detector de Ultravioleta: Su funcionamiento se basa en la absorción de la luz por parte de la muestra al pasar a través de ella un haz de luz monocromática ultravioleta. Los hay de longitud de onda fija y de onda variable. Utilizan generalmente como fuente de luz una lámpara de mercurio de baja presión. El haz de luz, proveniente de la lámpara, es primeramente colimado y después se hace pasar a través de dos celdas, una de ellas de referencia o compensación: los rayos de luz emergentes se hacen pasar por filtros específicos con el objeto de obtener la longitud de onda requerida. La intensidad es medida por una fotocelda doble que genera una señal, que después de amplificarse, es representada gráficamente en el registrador.

-Detector de Fluorescencia: Es el más sensible del que se dispone, posee alta selectividad de respuesta. Aprovecha las propiedades fluorescentes de los compuestos o de sus derivados para generar una respuesta.

-Detector de Arreglo de Fotodiodos: (18, 22, 25) Es el principio de detección más moderno que existe para cromatografía de líquidos. Cubre un intervalo de longitud de onda desde UV hasta cerca del IR. Obtiene absorciones UV/VIS simultáneamente por lo que se pueden construir cromatogramas en tres dimensiones (absorbancia vs. tiempo vs. longitud de onda), figura 2.11.

Utiliza una lámpara de deuterio, la cual emite una luz que pasa a través de un lente y de una abertura, (la cual limita la cantidad de luz que penetra al sistema proveniente de la lámpara) y luego entra en la celda. Toda la luz proveniente de la lámpara pasa a través de la celda, y viaja hasta el monocromador de óptica inversa donde es dispersada en todas sus longitudes de onda y es así como llega hasta el arreglo de fotodiodos. Cuando la luz incide sobre los fotodiodos, la energía luminosa para cada longitud de onda no llega a un fotodiodo en particular, sino que estos están dispuestos en tal forma que sólo reciben la energía luminosa correspondiente a un intervalo pequeño de longitud de onda del total del espectro. Los fotodiodos al recibir la señal luminosa se descargan en una cierta medida, la descarga de los fotodiodos es directamente proporcional a la cantidad de muestra y por consiguiente a la absorbancia.

Este tipo de detectores aunados a una computadora, son capaces de almacenar todos los datos que genera el estudio, de acuerdo a las especificaciones que se establezcan para el análisis.

Cada fotodiodo produce una señal analógica, la cual es directamente proporcional a la cantidad de luz que recibe.

La longitud de onda de la luz que recibe un fotodiodo en particular es determinada por la posición relativa del diodo respecto a la posición del monocromador de difracción.

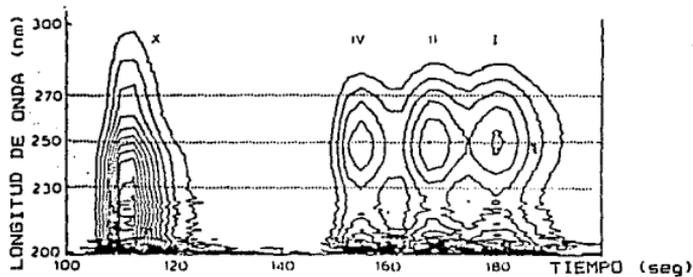
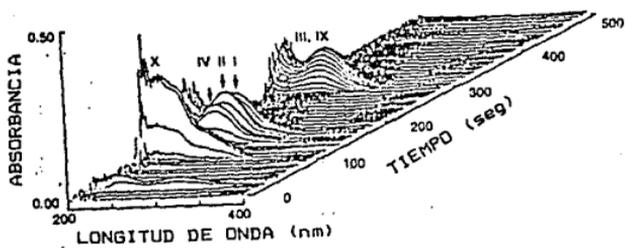
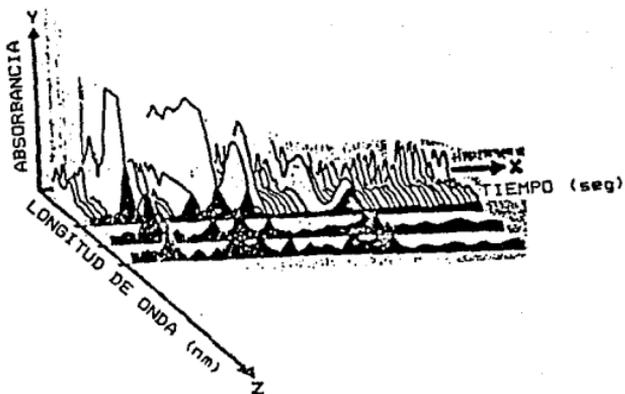


Figura 2.11 - Espectro UV con detector de fotodiodos.

2.4.2.6 COLUMNA: Es la parte más importante del cromatógrafo, pues es en ella donde se va a llevar a cabo la separación. Las características de la columna, como el material de empaque, las dimensiones, etc., dependerán del tipo de separación que se quiera hacer. Las más comunes son las de acero inoxidable, aunque también las hay de vidrio, las más comunes tienen una longitud de 25 - 50 cm y están rellenas de partículas de diámetro muy pequeño (5 - 15 μm). El diámetro interno de las columnas está comprendido generalmente entre 2 y 5 mm. El material de empaque consiste en partículas de tamaño muy reducido y de diámetro constante. En CLAR se dispone de gel de sílice en forma de partículas completamente porosas o de bolas de vidrio esféricas que están recubiertas por una delgada capa de gel de sílice distribuida irregularmente. La superficie del gel de sílice de cualquier tipo está recubierta de grupos Si-OH y Si-O-Si que pueden interaccionar con las moléculas de la muestra. Los grupos hidroxilo son los más importantes, de los cuales existen de dos tipos: los libres y los reactivos; estos últimos constituyen agentes enlazantes muy fuertes que pueden adsorber permanentemente los compuestos polares de la muestra y que adsorben el agua en la gel. Esta actividad suele ser responsable del ensanchamiento de los picos, así como de la falta de reproducibilidad de los resultados. Los hidroxilos reactivos pueden desactivarse por adición de agua o de un alcohol o por medio de reacciones químicas.

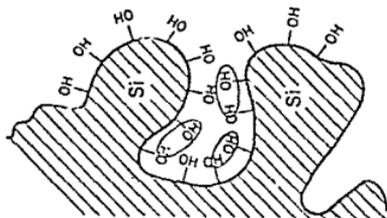


Figura 2.12 - Grupos hidroxilo libres y reactivos sobre la superficie del gel de sílice.

El relleno, idealmente, debe producir la máxima resolución en el menor tiempo, debe tener la máxima capacidad de muestra, ser fácilmente empacable, producir pequeñas caídas de presión y ser barato. Las partículas son de materiales porosos que sirven propiamente como fases estacionarias, o bien de soportes para las mismas. La variedad de fases estacionarias es amplia siendo su naturaleza, función de la separación a la que se pretenda aplicar.

En general las columnas para cromatografía de líquidos tienen una gran duración y cabe esperar una larga vida de

servicio útil, a menos que se utilicen en condiciones intrínsecamente destructivas, como por ejemplo, con eluyentes extremadamente ácidos o básicos, o bien con inyecciones continuas de muestras crudas o biológicas "sucias".

Cuando no se utilice una columna y estando desconectada, es prudente colocar tapones en los extremos para evitar que se seque. Las columnas deben guardarse alejadas de las fuentes de calor y de vibración. Si la columna se utiliza a temperaturas elevadas, es aconsejable enfriarla hasta temperatura ambiente antes de desconectarla.

Después de usar una columna durante periodos largos, puede aparecer una deriva de la línea base, cuya causa puede ser la gradual elución de compuestos retenidos fuertemente que proceden de inyecciones anteriores. Pueden eliminarse de la columna pasando una fase móvil suficientemente fuerte como para eliminar cualquier compuesto.

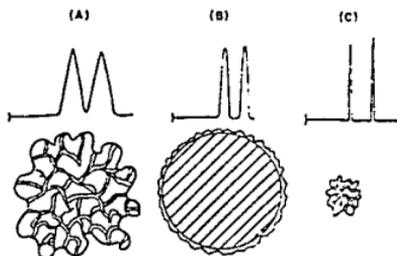


Figura 2.13 - Diversos tipos de empaque de columna usados en CLAR. (A) Cuerpo poroso, (B) Pellicular, (C) Micropartícula de cuerpo poroso. Los cromatogramas muestran las respectivas anchuras de los picos.

2.4.3 CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION EN FASE REVERSA (15)

Frecuentemente las sustancias inorgánicas y los compuestos orgánicos polares presentan problemas especiales durante su análisis cromatográfico concernientes a tiempos de retención inadecuados, separaciones ineficientes y picos asimétricos. Hace algún tiempo los compuestos ionizables eran comúnmente separados por cromatografía de intercambio iónico, utilizando geles de celulosa químicamente modificados o copolímeros de poliestirenodivinilbenceno los cuales no eran generalmente adecuados para una rápida separación de solutos con velocidades de flujo altas.

Desde la década pasada la cromatografía de líquidos de alta resolución está basada en el uso de micropartículas no polares y polares. En particular la CLAR en fase reversa con empaques químicos de sílicas alquílicas es un método

operacionalmente simple y flexible, con tiempos de análisis rápidos, con una habilidad de separación simultánea de una gran variedad de compuestos relacionados en estructura, así como compuestos poco similares y lo más importante con una gran resolución.

En CLAR es muy importante tener en cuenta el equilibrio que debe de existir entre la fase móvil y la fase estacionaria o la interfase, como consecuencia de esto, la naturaleza de la fase móvil induce cambios significativos en el comportamiento de un grupo de analitos que responden a cambios en el estado de ionización, solvatación, agregación y otros. Por lo tanto en este tipo de cromatografía es esencial la selección del par iónico, la fase móvil, la composición de la misma, la fuerza iónica, etc., para que el sistema tenga buena eficiencia y se obtengan picos óptimos. La cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa involucra una separación de partición, teniendo como características principales el utilizar una fase estacionaria no polar y una fase móvil de naturaleza polar, a diferencia de la cromatografía en fase normal que emplea una fase estacionaria polar y una fase móvil de naturaleza no polar. Tanto la cromatografía líquido-líquido como la cromatografía de fase químicamente enlazada se pueden trabajar en fase reversa. Esta última surgió como resultado de los problemas técnicos de la cromatografía líquido-líquido y es actualmente el tipo de cromatografía más ampliamente utilizada. En sí la fase estacionaria está químicamente unida a la superficie del soporte, es por esto que la fase móvil difícilmente puede ocasionar deterioro en la columna. Si se varía la naturaleza de los grupos funcionales de la fase estacionaria es posible obtener diferentes tipos de selectividad. Dichos grupos pueden ser de naturaleza polar, como el grupo amino ($-NH_2$) y el grupo ciano ($-CN$) en el caso de cromatografía en fase normal, o bien no polar como el grupo octilo ($-C_8H_{17}$), octadecilo ($-C_{18}H_{37}$), fenilo ($-C_6H_5$), etc. en el caso de la cromatografía en fase reversa.

Por desgracia la cantidad de fase estacionaria que es posible unir a la superficie de un soporte (generalmente partículas de sílice) es limitada y como consecuencia el tamaño de la muestra separada en estas columnas es reducido, por lo común menor de 1 mg.

2.4.4 CROMATOGRAFIA DE PAR IONICO (14, 15)

La cromatografía de par iónico es considerada como un derivado de la cromatografía de intercambio iónico y partición líquido-líquido. Los compuestos iónicos normalmente son solubles en fases acuosas y son poco retenidos en fases estacionarias hidrofóbicas. La formación de un "par-iónico" hidrofóbico en una solución que contenga el "contraión" adecuado, aumenta la solubilidad de éste en disolventes orgánicos y por consiguiente su afinidad por la fase estacionaria, aumentando su tiempo de retención. El par

iónico es entonces una forma de partición en una solución orgánica y acuosa de compuestos en forma de moléculas neutras.

La naturaleza del contraion es muy importante para alcanzar una selectividad cromatográfica óptima; de esta forma se puede seleccionar un contraion con fuerte absorbancia al UV con el fin de hacer que compuestos iónicos invisibles a este tipo de detección, puedan ser cuantificados.

La formación de los pares iónicos en la actualidad se efectúa preferentemente sobre columnas de fase inversa, con fases enlazadas permanentemente. En general, estas columnas son las de mayor eficacia para la separación de compuestos no iónicos, puesto que el mecanismo primario de la separación depende de las diferencias de solubilidad, y por tanto de la partición entre la fase móvil hidrófila y la fase estacionaria lipófila. La presencia en estos sistemas de grupos iónicos normalmente interfiere con esta solubilidad. En el caso de ácidos y bases débiles con valores de pKa comprendidos entre 2 y 8 puede suprimirse la actividad iónica tamponando la fase móvil para suprimir esta ionización. En los ácidos y bases fuertes, con valores de pKa fuera del intervalo anterior, no puede suprimirse fácilmente. La finalidad de la formación de pares iónicos es añadir un segundo ion al eluyente que se combine con los iones de la muestra, enlazándose fuertemente a ellos por formación de un par iónico neutro que sufrirá los procesos normales de distribución por reparto adsorción, etc., entre las fases estacionarias y la fase móvil.

La formación de pares iónicos puede emplearse también para modificar los iones de la muestra de modo que los pares iónicos así formados participen en el proceso de intercambio iónico. Por último, la tercera variante de la técnica consiste en utilizar la cromatografía de pares iónicos para modificar la fase estacionaria. En este caso, el contraion se adsorbe en el relleno de la columna, y a continuación los iones de la muestra de signo contrario se unirá al nuevo contraion superficial. Se necesita un exceso de contraiones en la fase móvil para mantener una concentración constante de contraiones en la superficie de la fase estacionaria y para que contribuyan al proceso de distribución.

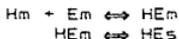
En todas estas variantes, los parámetros que se pueden ajustar para conseguir un amplio margen de selectividad son: el tipo y la concentración del contraion, el pH, la temperatura de la columna y el tipo y la composición de la fase móvil.

Modelos de Retención:

Existe un debate concerniente al modelo exacto que describe el fenómeno de par iónico. Se proponen varios modelos de los cuales tres son los comúnmente más aceptados

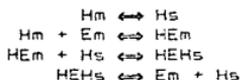
para explicar la retención cromatográfica:

1.- Modelo del Par Iónico.- Establece que la formación del par iónico se lleva a cabo en la fase móvil y es en forma de agregado o especie neutra como viaja a través de la columna para experimentar un equilibrio de partición. La retención es controlada por el grado de atracción lipofílica del par iónico neutro hacia las cadenas alifáticas de la fase estacionaria.



- o donde: H = Contraión.
E = Soluta.
s = Fase estacionaria.
m = Fase móvil.

2.- Modelo de Interacción Iónica.- El modelo describe al sistema como una bicapa alrededor de la fase estacionaria. La primera posee carga como resultado de la adsorción del reactivo sobre la fase estacionaria. Adyacentemente se encuentra la otra fase, de carga opuesta consistente en iones inorgánicos. Más lejana a las anteriores se encuentra el grueso de los eluentes, conteniendo una mezcla en número igual de iones positivos y negativos. La retención se puede explicar por medio de etapas. En la primera, el soluto de la muestra trata de tener acceso a la fase secundaria compitiendo para ello con los iones inorgánicos de la misma capa. Una vez que ha ingresado hasta esta posición, el soluto experimenta atracción electrostática hacia la primaria. Una atracción lipofílica entre la cadena de carbonos del soluto y la superficie no polar de la fase estacionaria constituye una fuerza adicional que sujeta al soluto dentro de esta fase. En este momento una carga extra se encuentra presente y para mantener la neutralidad eléctrica, un ión adicional del reactivo debe entrar en la capa primaria. Esta misma secuencia pero en sentido inverso sucede para dar la resorción de un par de iones, que no necesariamente son los mismos que se adsorben.



3.- Modelo Dinámico de Intercambio Iónico.- Indica que los reactivos de par iónico se adsorben sobre la fase estacionaria. El reactivo lipofílico forma una superficie cargada sobre la que antiguamente correspondía a la fase estacionaria. De esta manera la retención es controlada simplemente por intercambio iónico de las especies presentes en el eluente y el contraión respectivo unido al reactivo de

par iónico.



donde: A^+ es la especie catiónica originada de la muestra.
 B^- es el contraión.
y juntos forman el par iónico hidrofóbico.

Como en otros procesos reversibles, la viabilidad de esta reacción se expresa cuantitativamente usando el coeficiente de distribución, K:

$$K = \frac{[AB_{org}]}{[A^+_{aq}] + [B^-_{aq}]}$$

Se sugiere que el mecanismo de separación involucra normalmente:

- a) Empaque para fase reversa.
- b) Tensioactivo iónico creado in situ.

Cualquier fase reversa puede utilizarse para par-iónico. Comúnmente se utiliza más la fase estacionaria altamente alquil sustituida. La estabilidad de la columna es una consideración muy importante en cromatografía de par-iónico, dado que la composición de las fases móviles utilizadas son particularmente agresivas para el empaque de la columna, por esto en la mayoría de los casos es conveniente utilizar columnas con empaques alquil sustituidos C_{18} ó C_{16} que son las más estables.

La mayoría de los disolventes miscibles con agua pueden utilizarse en este tipo de cromatografía. La naturaleza del disolvente orgánico influencia la selectividad del sistema, así como la concentración es determinante en el grado de retención del soluto.

Hay que tener algunas otras consideraciones como por ejemplo, que el acetonitrilo precipita las sales de una solución reguladora pudiendo bloquear la columna. El metanol y el n-propanol son los disolventes más utilizados.

Es claro que el contraión tensioactivo posee siempre carga opuesta al soluto en estudio. El contraión más utilizado es el de tetrabutilamonio y los alquilsulfonatos o percloratos para retener ácidos y bases respectivamente. Las concentraciones de los tensioactivos van de acuerdo a la fase estacionaria, la fase móvil y el tamaño de la cadena

alquímica del tensoactivo. Por lo general la concentración es menor al 1% (p/v).

El tiempo de retención del soluto se debe a la capacidad del tensoactivo para ser atraído por el empaque de la columna. En el desarrollo de un método, es conveniente que un volumen adecuado de fase móvil fresca pase a través de la columna hasta equilibrarla, este mecanismo es dinámico en un principio, reversible si la columna se encuentra en buenas condiciones. Es recomendable que las columnas que se utilizan para este tipo de cromatografía sean reemplazadas después de un tiempo razonable de uso.

La selectividad del contraíon es el resultado de la habilidad que tiene este para discriminar iones de carga similar. Los factores que influyen la selectividad incluyen la magnitud de la carga iónica, el grado de solvatación del ion y las interacciones con el soporte.

Frecuentemente, cuando se requiere separar por fase reversa iones básicos en presencia o ausencia de iones ácidos se obtienen tiempos de retención grandes, o picos coleados; es por esto que la retención del soluto no siempre responde a los cambios de la composición de la fase móvil en la forma anticipada. Esta conducta se observa especialmente con sustancias que son escasamente solubles en agua debido a la interacción que presentan los solutos con los grupos silanoles residuales en la fase estacionaria. Dichos grupos silanoles son ácidos y se presentan en todos los empaques de sílica. El llamado "end-capping" (tratamiento de recubrimiento final que se hace a la fase estacionaria de una columna con trimetilclorosilano al final de su fabricación con el fin de reducir el mayor número posible de silanoles residuales en los empaques de sílica) reduce esta concentración pero no los elimina totalmente. Este problema de separación se reduce con la adición de un modificador iónico básico que compita por los grupos silanoles libres permitiendo así que el soluto que se prueba eluya más rápido. Esta técnica se denomina también par-iónico, que es una forma de competencia por la superficie del empaque para disminuir el tiempo de retención del soluto.

Haciendo una elección juiciosa de los modificadores tensoactivos y contraiones es posible aumentar el grado de selectividad entre componentes ácidos y básicos dentro de un mismo sistema cromatográfico.

2.5. CRITERIOS DE VALIDACION (10, 19)

La validación de un método analítico es el proceso por el cual queda establecido la confiabilidad de una metodología mediante los estudios de laboratorio. Generalmente la validación incluye una evaluación de la linealidad, precisión, exactitud, especificidad, estabilidad de la muestra y tolerancia del sistema.

La validación incluye dos partes:

- 1) Sistema
 - Precisión.
 - Linealidad.
- 2) Método
 - Especificidad.
 - Exactitud.
 - Linealidad.
 - Precisión.
 - Estabilidad de la Muestra.
 - Tolerancia del Sistema.

2.5.1. EVALUACION DEL SISTEMA

2.5.1.1 PRECISION

Es el grado de concordancia de medidas individuales de un proceso. Se determina evaluando 6 replicaciones de la solución del principio activo a la concentración del 100 % de lo que indica el método, preparadas a partir de una misma solución concentrada y analizándolas bajo las condiciones cromatográficas preestablecidas.

a) Criterios:

- 1.- Coeficiente de Variación $\leq 2.0 \%$

b) Cálculos:

$$CV = \left(\frac{S}{x} \right) 100$$

2.5.1.2 LINEALIDAD

La linealidad de un sistema es la habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de

un intervalo. Se establece comprobando que la grafica obtenida de la concentración, (diferentes niveles de concentración del principio activo preparadas a partir de una misma solución concentrada), contra la respuesta del equipo (área, absorbancia, etc.) tenga un comportamiento de $y = mx+b$ donde la pendiente relativa (PR) y el intercepto (b) no sean estadísticamente diferente de 1 y de 0 respectivamente.

a) Criterios:

1.- Intercepto.

$$b = \text{Intercepto.}$$

$$t_{b \text{ cal}} \leq t_{05\% \ n-2 \text{ gl}}$$

$$H_0: \text{Intercepto} = 0$$

$$H_a: \text{Intercepto} \neq 0$$

$$LIIC \leq 0 \leq LSIC$$

LIIC: Límite Inferior del Intervalo de Confianza.

2.- Pendiente.

$$m = \text{Pendiente.}$$

LSIC: Límite Superior del Intervalo de Confianza.

3.- Pendiente Relativa (PR).

$$0.98 \leq PR \leq 1.02$$

4.- Coeficiente de Determinación (r^2)

$$r^2 \geq 0.98$$

5.- Desviación Estándar de Regresión Relativo (DERR)

$$DERR \leq 0.03$$

b) Cálculos:

1.- Pendiente (B)

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

2.- Intercepto (A)

$$A = \bar{y} - B \bar{x}$$

3.- Pendiente Relativa (PR)

$$PR = B \frac{\bar{x}}{\bar{y}}$$

4.- Coeficiente de Determinación (r^2)

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

5.- Desviación Estándar de la Recta de Regresión ($S_{y/x}$)

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

6.- Desviación Estándar de la Recta de Regresión Relativa (DERR).

$$DERR = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}}$$

7.- Límites de Confianza 95% para el Intercepto

$$LCA = A \pm t_{05\% n-2} \text{ gl } S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x^2}{n \sum (\bar{x} - x)^2}}$$

8.- t cal para el Intercepto

$$A_0 = 0$$

$$t_{cal} = \frac{A - A_0}{S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x^2}{n \sum (\bar{x} - x)^2}}}$$

donde: n = número de replicaciones hechas a cada nivel.

x = cantidad adicionado. (concentración ó mg agregados)

\bar{x} = promedio de la cantidad adicionada en x.

y = propiedad medida. (respuesta ó mg recuperados)

\bar{y} = promedio de la propiedad medida.

S_x = desviación estándar de las "x" n - 1 grados de libertad.

Σx = Sumatoria de la cantidad adicionada.

Σx^2 = Sumatoria de los cuadrados de la cantidad adicionada.

S_y = Sumatoria de la propiedad medida.

Σy^2 = Sumatoria de los cuadrados de la propiedad medida.

Σxy = Sumatoria del producto de la cantidad adicionada y la propiedad medida.

$t_{0.95, n-2}$ = t de Student a una probabilidad acumulada de 0.95 y n - 2 grados de libertad.

2.5.2 EVALUACION DEL METODO

2.5.2.1 ESPECIFICIDAD

Es la habilidad de un método analítico para determinar solamente el (los) componente (s) que se va (n) a analizar. Se demuestra estableciendo experimentalmente que el excipiente y sustancias relacionadas al principio activo, como precursores de síntesis, productos de degradación o de formación, no interfieran con la medición, es decir, que el método sea capaz de separar y cuantificar sólo lo que se desea.

La especificidad es una medida de la interferencia o carencia de la misma al analizar una muestra compleja. La especificidad de un método analítico se demuestra al comparar los resultados del análisis de muestras que contienen impurezas, placebo, o productos de deoradación o formación, con muestras que carecen de lo anterior. Cuando las impurezas o productos de degradación o de formación no son conocidas, la especificidad se demuestra obteniendo los primeros y más importantes productos de degradación a través de reacciones simuladas y controladas de degradación. Para esto se someten a deoradación, por las vías más comunes (hidrolisis ácida y básica, oxidación y fotólisis) a:

- a.- Principios Activos.
- b.- Placebo.
- c.- Formulación o Placebo Cargado.

a) Criterios:

1.- Se seleccionan las condiciones adecuadas de degradación hasta obtener una descomposición de la molécula del 10 al 30 %, con lo cual se asegura que los productos de degradación obtenidos se encuentran en una concentración tal que pueda ser detectada por el método analítico.

2.- Reproducibilidad de los porcentajes de degradación: Al repetir la degradación, la diferencia entre los porcentajes degradados, no debe ser más de 2%, para asegurar que el porcentaje de descomposición de la molécula obtenido, no es obra de la casualidad si no que se debe a la ruta de degradación elegida.

3.- Análisis Espectral de las muestras degradadas, utilizando un sistema computarizado adaptado a un detector de arreglo de fotodiodos. Dado que los espectros de absorción son particulares para cada compuesto, la sobreposición y comparación automática a todas las longitudes de onda, permite detectar las diferencias entre éstos por el enmascaramiento de impurezas debido a la absorbancia del compuesto de interés.

4.- Comparación del espectro de absorción del compuesto de interés, con el espectro de absorción de la sustancia patrón de referencia primaria (USP) correspondiente. Para determinar si los espectros corresponden a un mismo compuesto, se confía a un valor de semejanza interespectral no menor de 950. (Las especificaciones del programa utilizado indican que puede asumirse total identidad a valores mayores de 940).

2.5.2.2 EXACTITUD

Es el grado de concordancia de medidas individuales con un nivel aceptado de referencia. Se determina por el estudio de placebos cargados al 100% de la cantidad a analizar.

a) Criterios:

1.- $CV \leq 2\%$

2.- $t_{cal} \leq t_{95\% n-2 gl}$

$H_0 : \mu = 100\%$

$H_a : \mu \neq 100\%$

3.- $LIIC \leq 100 \leq LSIC$

4.- $102\% > \bar{x} > 98\%$

b) Cálculos:

1.- Porcentaje Recuperado para cada recobro (x)

$$x = \left(\frac{y}{\bar{x}} \right) 100$$

2.- Media del porcentaje recuperado (\bar{x})

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

3.- Desviación Estándar del porcentaje recuperado (S)

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

4.- Coeficiente de Variación (CV)

$$CV = \left(\frac{S}{\bar{x}} \right) 100$$

5.- t de Student

$$t_{cal} = \frac{\bar{x} - \mu}{S / \sqrt{n}} \quad \mu = 100 \%$$

6.- Intervalo de Confianza para la Media

$$IC = \bar{x} \pm t_{95\% \ n-2 \ gl} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

donde: n = número de recobros independientes

x = cantidad adicionada

y = cantidad recuperada

t_{95% n-2 gl} = t Student a una probabilidad acumulada de 0.95 y n-1 grados de libertad

2.5.2.3 LINEALIDAD

Se establece comprobando que la gráfica obtenida de la cantidad adicionada, (cantidad conocida de principio activo que se adiciona a la matriz de la formulación), contra cantidad recuperada, (cantidad de principio activo cuantificado con el método de análisis que se propone), tenga un comportamiento de $y = mx + b$, donde la pendiente (m) y el intercepto (b) no son estadísticamente diferentes de 1 y 0 respectivamente.

a) Criterios:

- 1.- Coeficiente de Determinación (r^2)

$$r^2 \geq 0.98$$

- 2.- $b =$ Intercepto

$$t_b \text{ cal} \leq t_{0.05} n-2 \text{ gl}$$

$$H_0 : \text{Intercepto} = 0$$

$$H_a : \text{Intercepto} \neq 0$$

$$LIIC \leq 0 \leq LSIC$$

- 3.- $m =$ Pendiente

$$t_m \text{ cal} \leq t_{0.05} n-2 \text{ gl}$$

$$H_0 = \text{Pendiente} = 1$$

$$H_a = \text{Pendiente} \neq 1$$

$$LIIC \leq 1 \leq LSIC$$

- 4.- $DERR \leq 0.03$

b) Cálculos:

- 1.- Pendiente (B). *
- 2.- Intercepto (A). *
- 3.- Coeficiente de Determinación. *
- 4.- Desviación Estándar de la Recta de Regresión. *
- 5.- Desviación Estándar de "la Recta de Regresión Relativa. *
- 6.- Límites de Confianza 95% para la Pendiente.

$$LCb = B \pm t_{0.05} n-2 \text{ gl} \frac{S_{y/x}}{(S_x) (\sqrt{n})}$$

- 7.- Límites de Confianza 95% para el Intercepto. *

- 8.- t cal para la Pendiente

$$t_{cal} = \frac{(B - B_0) (S_x) (\sqrt{n})}{S_{y/x}} \quad R_0 = 1$$

9.- t cal para el Intercepto. *

* Calcular de acuerdo a las fórmulas indicadas en la evaluación de la linealidad del sistema.

2.5.2.4 PRECISION

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o coeficiente de variación. Se puede medir de la siguiente manera:

I) Repetibilidad.- Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos aparatos y técnicas.

El estudio está evaluado por el coeficiente de variación de los estudios de exactitud tanto para el 100% como para la linealidad del método; el criterio establecido es que el coeficiente de variación $\leq 2\%$

Se analizan al menos 6 muestras de un misma muestra homogénea utilizando el método propuesto y se calcula el porcentaje recuperado.

a) Criterios:

$$C.V. \leq 2\%$$

b) Cálculos:

- 1.- Calcular la Media del Porcentaje Recuperado. **
- 2.- Calcular la Desviación Estándar del Porcentaje Recuperado. **
- 3.- Calcular el Coeficiente de Variación. **

** Ver cálculos de Exactitud

II) Reproducibilidad.- Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes aparatos.

Se analiza una muestra homogénea por triplicado por cada uno de dos analistas en dos días diferentes, utilizando un modelo anidado, de efectos aleatorios de dos factores (A:analista, D:día), el cual se representa con la siguiente ecuación:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_j + E_{kij}$$

donde:

Y_{ijk} = Porcentaje cuantificado asociado a la k ésima repetición en el j ésimo día para el i ésimo analista.

μ = Cantidad de principio activo en la muestra.

A_i = Efecto del analista en el porcentaje cuantificado.

$D_j(\cdot)$ = Efecto del j ésimo día en el i ésimo analista sobre el porcentaje cuantificado.

$E_k(i, j)$ = Error Experimental.

Se tabulan los resultados de la siguiente manera:

A N A L I S T A

	1	2
D	y 111	y 211
	y 112	y 212
	y 113	y 213
I	y 121	y 221
	y 122	y 222
	y 123	y 223
A	y 121	y 221
	y 122	y 222
	y 123	y 223

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA (TABLA DE ANADEVIA)

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F cal	F teo
ANALISTA	$g_{1a} = a-1$	$SCa = \frac{SY^2_{1..} - SY^2_{...}}{dr} - \frac{SY^2_{...}}{adr}$	$MCa = \frac{SCa}{g_{1a}}$	$Fa = \frac{MCa}{MCd}$	18.51
DIA	$g_{1d} = a(d-1)$	$SCd/a = \frac{SY^2_{.j} - SY^2_{...}}{r} - \frac{SY^2_{...}}{dr}$	$Mcd = \frac{SCd}{g_{1d}}$	$Fd = \frac{Mcd}{Mce}$	4.46
ERROR	$g_{1e} = ad(r-1)$	$SCe = SY^2_{ijk} - \frac{SY^2_{ij}}{r}$	$Mce = \frac{SCe}{g_{1e}}$		

a) Criterios: $CV \leq 2 \%$

$Fa \text{ cal} \leq Fa \text{ teo}$

$Fd \text{ cal} \leq Fd \text{ teo}$

b) Cálculos:

$$SY^2... = (y_{111} + y_{112} + y_{113} + y_{121} + y_{122} + y_{123} + \dots + y_{223})^2$$

$$SY^2_{ijk} = y^2_{111} + y^2_{112} + y^2_{113} + y^2_{121} + y^2_{122} + \dots + y^2_{223}$$

$$SY^2_{.j.} = (y_{111} + y_{112} + y_{113} + y_{121} + y_{122} + y_{123})^2 + (y_{211} + y_{212} + y_{213} + y_{221} + y_{222} + y_{223})^2$$

$$SY^2_{ij.} = (y_{111} + y_{112} + y_{113})^2 + (y_{121} + y_{122} + y_{123})^2 + (y_{211} + y_{212} + y_{213})^2 + (y_{221} + y_{222} + y_{223})^2$$

$$SY^2_{i..} = (y_{111} + y_{112} + y_{113} + y_{211} + y_{212} + y_{213})^2 + (y_{121} + y_{122} + y_{123} + y_{221} + y_{222} + y_{223})^2$$

donde: a = Número de analistas.

b = Número de días.

r = Número de replicaciones por día y por analista.

Y = Porcentaje del principio activo cuantificado.

$SY^2...$ = Suma total de los porcentajes cuantificados por los analistas al cuadrado.

$SY^2_{.j.}$ = Suma total de los porcentajes cuantificados en un día.

$SY^2_{ij.}$ = Suma total de los cuadrados de los porcentajes cuantificados por un analista.

SY^2_{ijk} = Suma total de los cuadrados de los porcentajes cuantificados por los analistas.

$SY^2_{i..}$ = Suma total de los cuadrados de los porcentajes cuantificados por un analista en un día.

F_a = Valor de F de Fisher a un nivel acumulado de 0.95 con g_{1a} grados de libertad en el numerador y g_{2a} grados de libertad en el denominador.

F_d = Valor de F de Fisher a un nivel acumulado de 0.95 con g_{1d} grados de libertad en el numerador y g_{2d} grados de libertad en el denominador.

2.5.2.5 ESTABILIDAD DE LA SOLUCION DE LA MUESTRA

Es el tiempo mediante el cual una muestra lista para su análisis permanece sin cambio bajo condiciones dadas. Se determina cuantificando una sola muestra preparada para su análisis después de un tiempo razonable, almacenada a diferentes condiciones. Se establece en cuanto tiempo y bajo que condiciones los resultados analíticos no difieren de los originales.

a) Criterios:

No más del 2 % de diferencia en la cuantificación de cada una de las muestras, a las condiciones probadas, con respecto al análisis inicial.

2.5.2.6. TOLERANCIA DEL SISTEMA

Es la determinación de los factores que afectan al sistema de medición. Se establece cuantificando una misma muestra modificando ciertas condiciones del sistema y viendo en que manera se alteran los resultados, esto para determinar los puntos críticos del sistema de análisis.

a) Criterios:

No existe un criterio definido para esto, por lo que el criterio tomado fue una variación menor de $\pm 1\%$ de los porcentajes cuantificados promedio de las 3 muestras en cada una de las condiciones probadas con respecto al promedio de las mismas cuantificadas bajo condiciones normales, y que no comprometa la resolución del principio activo de los demás componentes.

CAPITULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

3.1. EQUIPO, MATERIAL, Y REACTIVOS

3.1.1 EQUIPO

- Bomba Waters mod. 6000A, 510 y 610 para cromatógrafo de líquidos.
- Bomba Beckman mod.110B para cromatógrafo de líquidos.
- Inyector manual Beckman con loop de 20 mcl.
- Inyector manual Waters mod. U6K para cromatógrafo de líquidos.
- Inyector automático WISP mod. 712.
- Inyector automático WISP mod. 700.
- Detector Beckman mod. 160 de longitud de onda fija para cromatógrafo de líquidos.
- Detector Beckman mod. 163 de longitud de onda variable para cromatógrafo de líquidos.
- Detector Waters mod. 440 de longitud de onda fija para cromatógrafo de líquidos.
- Detector Waters 990 de arreglo de fotodiodos para cromatógrafo de líquidos.
- Integrador Beckman mod. 427.
- Integrador Waters mod. 740.
- Integrador Waters mod.745.
- Integrador HP mod. 3390A y 3396A.
- Printer Plotter Waters mod. 5200.
- Balanza analítica Mettler AE 100.
- Baño de Ultrasonido Cole-Palmer mod.8851.
- Agitador magnético Thermolyner mod. SP 18425.
- Columna Ultrasphere octyl de 15 cm de largo, 4.6 mm de diametro interno y 5 micras tamaño de particula.
- Columna Lichrosphere Cis 15 cm de largo, y 5 micras de tamaño de particula.
- Columna μ Bondapak de acero inoxidable Cis de 3.9 mm x 30 cm para cromatografía de líquidos.
- Columna Ultrasphere DDS, de 4.4 mm x 25 y 5 mcm.
- Precolumna Cis de 1 cm.

3.1.2 MATERIAL

- Microjeringa de 25, 50 y 100 mcl Hamilton.
- Equipo de filtracion Millipore.
- Membranas de filtracion Millipore tipo GVWP de 0.22 mcm.

3.1.3 REACTIVOS

- Aqua HPLC.
- Metanol HPLC.
- Metanol R.A.

- Acetonitrilo HPLC.
- Trietilamina HPLC.
- Isopropanol HPLC.
- Lauril Sulfato de Sodio R.A.
- Acido Acetico al 15%.
- Acido Fosforico 0.05M.
- Sustancias Patrón de Referencia USP: Sulfametoxazol Lote G-1 y Trimetoprim Lote G.
- Materias Primas: Sulfametoxazol, Trimetoprim, Diazepam, Fenacetina.

3.2 DESARROLLO DE LOS METODOS

En primer lugar es necesario certificar los principios activos de la formulación, para contar con patrones de referencia secundarios plenamente identificados y de pureza conocida, mismos que van a servir para el desarrollo de los metodos y su validacion. Lo anterior se llevo a cabo realizando todas las pruebas de analisis concernientes a Sulfametoxazol y Trimetoprim como materias primas de acuerdo a la USP XXII.

En segundo lugar, se procedió a retar la especificidad el método USP XXII para la cuantificación de Sulfametoxazol y Trimetoprim en comprimidos, con la idea de partir de una base y no partir precisamente de cero. El sistema cromatografico que recomienda la USP XXII es el siguiente:

FASE MOVIL: Agua: acetonitrilo: trietilamina (79.9:20:0.1)
pH = 5.9.

COLUMNA: Cis de 30 cm de longitud, 3.9 mm de Diámetro Interno y 5-10 micras de Tamaño de Partícula. Se utilizó μ Bondapak Cis.

DETECTOR : UV.

LONGITUD DE ONDA: 254 nm.

FLUJO : 2 ml/min.

VOLUMEN DE INYECCION : 20 μ l.

Sin embargo en los estudios preliminares de la especificidad, se vio que el metodo no era capaz de separar un producto de la degradación del Sulfametoxazol del Trimetoprim, siendo que para este ultimo fue perfectamente especifico. En base a lo anterior empezó a verse la posibilidad de variar la fase movil y en si las características del sistema cromatografico, tratando de separar la interferencia del Trimetoprim.

Se utilizaron muestras metanólicas de Sulfametoxazol y Trimetoprim a una concentración aproximada de 160 mcg/ml y 32 mcg/ml que es la que recomienda la USP XXII para la preparación de las muestras, así como muestras degradadas de formulación. Se probaron las siguientes condiciones cromatograficas USP XXI utilizando las columnas con que se contaba en ese momento y cuyas características fueran similares a las recomendadas por la USP XXI.

FASE MOVIL: Acido acetico 1%; Acetonitrilo (84:15)

COLUMNA: a-Ultrasphere octyl de 15 cm de largo, 4.6 mm de diámetro interno (DI) y 5 micras de tamaño de partícula (TP).

b-Lichrosphere C18 de 15 cm de largo y 5 micras de TP.

c-μBondapak C18 30 cm de largo, 3.9 mm de DI y 10 micras de TP.

LONGITUD DE ONDA: 254 nm.

FLUJO: 1 ml/min.

VOLUMEN DE INYECCION: 20 μcl.

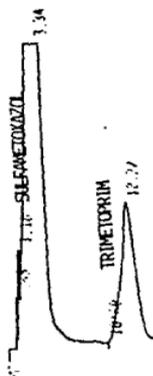
SENSIBILIDAD: 0.02 A.U.F.S.

Columna a:

Como se muestra en la figura 3.1 no hay resolución de los productos de degradación. El Sulfametoxazol presenta un pico muy grueso y cooleado que no se separa del frente del disolvente.

Columna b y c:

No se resuelven los picos ni los productos de degradación como se puede observar en la figura 3.2.



Ninguna de las columnas utilizadas dio la selectividad necesaria para separar los activos entre sí y de sus productos de degradación, bajo esas condiciones cromatográficas, hecho por el cual se adicionaron otros modificadores orgánicos como Metanol, Isopropilamina, etc. a la fase móvil anteriormente probada, tratando así de encontrar la resolución adecuada entre activos y productos de degradación.

FASE MOVIL: Acido Acético al 1%: Acetonitrilo: Metanol. (80:13:7).

COLUMNA: Ultrasphere octyl, 15 cm de longitud, 4.6 mm de DI 5 micras de tamaño de partícula (TP).

LONGITUD DE ONDA: 254 nm.

FLUJO: 1.5 ml/min.

VOLUMEN DE INYECCION: 20 μ l.
SENSIBILIDAD: 0.02 AUFs.

El Trimetoprim presenta un pico bien definido, delgado y simétrico a un tiempo de retención (t_r) aproximado de 3.9 min., el Sulfametoxazol presenta un pico muy irregular y con fuerte cabeceo que se presenta con un tiempo de retención aproximado de 8.2 min. No se separan los productos de degradación como se puede observar en la figura 3.3.



Figura 3.3

FASE MOVIL: Acido Acético 1%: Acetonitrilo: Isopropilamina
(80:16:4).

COLUMNA : a-Ultasphere octyl, 15 cm de largo, 4.6 mm de DI
y 5 micras de TP.

b- μ Bondapak C₁₈, de 30 cm de largo x 3.9 mm de
DI y 10 micras de TP.

LONGITUD DE ONDA: 254 nm.

FLUJO: 1.5 ml/min.

VOLUMEN DE INYECCION: 20 μ l.

SENSIBILIDAD: 0.02 AUFs

No hay resolución de productos de degradación con respecto al Sulfametoxazol y al Trimetoprim.

La siguiente fase móvil está basada en la referencia (4), cuyas características son muy similares a las de las fases móviles hasta ahora empleadas, se menciona en la referencia que el sistema es específico para Trimetoprim.

FASE MOVIL: Acetonitrilo: 1-Propanol: Metanol: THF: Acido
acético : Agua (5:20:15:25:1:34)

COLUMNA: μ Bondapak C₁₈ de 30 cm de longitud , 3.9 mm de DI y
10 micras de DI.

LONGITUD DE ONDA: 271 nm.

FLUJO: 1 ml/min.

VOLUMEN DE INYECCION: 20 μ l.

SENSIBILIDAD: 0.02 AUFs.

El Trimetoprim presenta un pico bien definido, cerca del tiempo muerto. Sin embargo el Sulfametoxazol no se retiene en la columna sale con el frente del disolvente, como se puede apreciar en la figura 3.4.

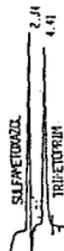


Figura 3.4

Hasta aquí no se habían encontrado las condiciones cromatográficas que hicieran selectivo el método hacia la cuantificación de los activos. Dado que en la bibliografía revisada no se encontró un método específico para ambos compuestos, se decidió emplear el método USP XIII para cuantificar Sulfametoxazol como método específico y buscar uno diferente para cuantificar Trimetoprim.

Dada la afinidad de los activos por el metanol se procedió a utilizar una fase móvil cuya composición es en mayor parte de metanol, esto con el fin de facilitar la salida del Sulfametoxazol y de sus productos de degradación con el frente del disolvente que son estos a final de cuentas los que interfieren con el Trimetoprim. Este último se trató de retardar en su salida utilizando un par iónico. Se sugirió la siguiente fase móvil, basada en la bibliografía (27)

FASE MOVIL: Metanol: Acido fosforico 0.05 M: Lauril sulfato de sodio (LSNa) (70:30:0.1g)
COLUMNA: Ultrasphere ODS de 25 cm de longitud x 4.6 mm de DI y 5 micras de TP.
DETECTOR : UV.
LONGITUD DE ONDA: 230 nm.
FLUJO: 1 ml/min.
VOLUMEN DE INYECCION: 20 µl.
SENSIBILIDAD: 0.02 AUFS.

El Trimetoprim sale con un tiempo de retención aproximado de 40 min, mientras que el Sulfametoxazol sale con el frente del disolvente. Dado que 40 min es un tiempo de retención muy grande, lo cual provoca un análisis extremadamente lento, se trató de modificar la fase móvil de tal manera que disminuyera el tiempo de retención, ya sea disminuyendo la concentración del par iónico, el tamaño de este o en última instancia la composición de la fase móvil. Se probó la siguiente fase móvil:

FASE MOVIL: Metanol: Acido fosforico 0.05 M: Lauril sulfato de sodio (LSNa) (70:30:0.01g)

El tiempo de retención del Trimetoprim disminuyó a 20 min aproximadamente, por lo que se fue disminuyendo la concentración del formador de par iónico hasta alcanzar un tiempo de retención óptimo.

Finalmente la fase móvil con la cual se obtuvieron mejores resultados fue la siguiente:

FASE MOVIL: Metanol: Acido fosforico 0.05 M: Lauril sulfato de sodio (LSNa) (70:30:0.002g)

Teniendo un tiempo de retención de aproximadamente 10 min y que además pasa las pruebas preliminares de especificidad.

Hasta este punto se cuenta ya con los dos métodos necesarios para cuantificar Sulfametoxazol y Trimetoprim en presencia de productos de degradación. Sin embargo había que

ultimar detalles con la fase móvil del Sulfametoxazol (USP) ya que con mucha facilidad se pierde resolución entre los principios activos, hecho de vital importancia, si se toma en cuenta que en medio de ambos se presenta un producto de degradación que podría llegar a interferir con el Sulfametoxazol. Se trató de modificar el método de tal forma que no se sacrifique la especificidad y que mantenga una buena resolución con respecto al Trimetoprim y con respecto al producto de degradación. Para corregir lo anterior se aumentó la concentración del formador de par iónico y se ajustó el pH a 5.8 con la idea de aumentar la resolución, y de hecho se logró un poco más de resolución pero lo más importante es que la resolución se mantiene constante aun durante prolongados tiempos de análisis que es lo que finalmente se pretendía. La especificidad del método se mantuvo intacta.

3.3 VALIDACION DE LOS METODOS

3.3.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA:

A. SULFAMETOXAZOL

Se llevó a cabo preparando una solución de Sulfametoxazol en metanol y realizando las diluciones adecuadas para obtener soluciones de 40, 80, 120, 160, 200 y 240 mcg/ml, que equivalen a 25%, 50%, 75%, 100%, 125% y 150 % de la concentración elegida como 100% (160 mcg/ml). A cada solución se le adicionó Trimetoprim a la concentración elegida al 100% (32 mcg/ml). Se analizó cada solución por triplicado excepto la de 100% que se analizó por sextuplicado; se consideró la solución que contenía Trimetoprim pero no Sulfametoxazol como el 0%.

B. -TRIMETOPRIM

Se llevó a cabo preparando una solución de Trimetoprim en metanol y realizando las diluciones adecuadas para obtener soluciones de 8, 16, 24, 32, 40 y 48 mcg/ml, que equivalen a 25%, 50%, 75%, 100%, 125% y 150 % de la concentración elegida como 100% (32 mcg/ml). A cada solución se le adicionó Sulfametoxazol a la concentración elegida al 100% (160 mcg/ml). Se analizó cada solución por triplicado excepto la de 100% que se analizó por sextuplicado; se consideraron la solución que contenían Sulfametoxazol pero no Trimetoprim como el 0%.

3.3.2 PRECISION DEL SISTEMA:

A. -SULFAMETOXAZOL

Se evaluó de la respuesta de 5 replicaciones de la solución de Sulfametoxazol a la concentración del 100 % de lo que indica el método preparadas a partir de una solución concentrada.

B. -TRIMETOPRIM

Se evaluó de la respuesta de 6 replicaciones de la solución de Trimetoprim a la concentración del 100 % de lo que indica el método preparadas a partir de una solución concentrada.

3.3.3 ESPECIFICIDAD DE LOS METODOS

A. -SELECCION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS DE DEGRADACION

Dado que se cuenta con un sistema cromatográfico adecuado se procedió a degradar a los principios activos, el placebo y la formulación, en condiciones:

- a) Ácidas
- b) Básicas
- c) Oxidativas
- d) Calor
- e) Luz Ultravioleta (UV).

En la TABLA 1 se muestran las condiciones y los tiempos a los cuales se sometieron a degradación las diferentes muestras.

MUESTRA	TIPO DE DEGRADACION	TIEMPO
SULFAMETOXAZOL	Ácida a reflujo	17 hrs.
	Básica (60°)	52 hrs.
	Oxidación a reflujo	7 hrs.
	Luz UV	7 días
	Calor 160°C	24 hrs.
TRIMETOPRIM	Ácida a reflujo	7 hrs.
	Básica (60°)	52 hrs.
	Oxidación a reflujo	17 hrs.
	Luz UV	13 días
	Calor 185°C	24 hrs.
FORMULACION	Ácida a reflujo	7 hrs.
	Básica (60°)	52 hrs.
	Oxidación a reflujo	17 hrs.
	Luz UV	7 días
	Calor 160°C	24 hrs.
PLACEBO	Ácida a reflujo	17 hrs.
	Básica (60°)	52 hrs.
	Oxidación a reflujo	17 hrs.
	Calor 185°C	24 hrs.

Tabla 1. Condiciones de Degradación.

Una vez que son fijadas las condiciones de degradación, se procede a repetir las, para poder decir que el porcentaje degradado de la molécula corresponde exclusivamente a la ruta

de degradación y no es obra de la casualidad o al azar.

Habiéndose establecido las condiciones de degradación, se procedió a inyectar las muestras degradadas de Sulfametoxazol y de Trimetoprim materia prima, así como la formulación y el placebo en los sistemas cromatográficos previamente elegidos, para determinar al mismo tiempo, utilizando estándares de materia prima formulación y placebo, si alguno de los excipientes interfiere con alguno de los picos de los compuestos de interés, o si alguno de los productos de degradación de los mismos o de los excipientes presenta interferencia en la respuesta de los principios activos.

Las muestras se analizaron utilizando un detector de arreglo de fotodiodos, haciéndose un análisis espectral de los compuestos de 200 a 350 nm, de tal forma que se pudiera analizar el pico de cada compuesto en tres dimensiones: Absorbancia, tiempo, y longitud de onda, con esto se podrá asegurar que detrás del pico de interés no se encuentra oculto algún producto de degradación, lo cual no sería posible en condiciones normales de detección a una sola longitud de onda, ya que su absorbancia a la longitud de onda de trabajo sería aditiva al compuesto que se cuantifica, grave problema en un método analítico para estudios de estabilidad.

El análisis espectral consiste en tomar partes del pico que interesa en el intervalo de tiempo en el cual el pico comienza y termina de salir, hacia el eje de las longitudes de onda, de tal forma que se toman secciones del pico donde cada una presenta un espectro UV en el intervalo de longitudes de onda al cual se hizo el barrido; si el pico es de un compuesto puro la superposición de cada uno de los espectros es completa, si éste está acompañado de otro compuesto, su espectro UV es aditivo al del compuesto de interés y la superposición de cada uno de los espectros no es completa, pues los espectros no son iguales. Posteriormente se compara el espectro del pico de interés contra el espectro de patrones de referencia para definir la identidad del pico.

B.-SELECCION DE LA SUSTANCIA PATRON DE REFERENCIA INTERNA (SPRI).

Una vez que los sistemas cromatográficos han sido seleccionados, y que se ha demostrado su especificidad, se trató de adecuar la preparación de las muestras de tal forma que una sola muestra pudiese inyectarse en ambos sistemas cromatográficos de lo cual se desprendieron las siguientes alternativas:

1.-La primera opción es utilizar la misma SPRI para los dos principios activos, es decir, un compuesto que inyectado en ambos sistemas cromatográficos sirva de patrón de referencia interno para ambos compuestos, que presente un tiempo de retención diferente de los productos de degradación y que se separe adecuadamente.

2.-La segunda opción es ponerle a cada compuesto su

respectiva SPR1, para lo cual, si se va a inyectar la misma muestra a los dos sistemas, se debe cumplir que:

a) La SPR1 del Sulfametoxazol, no debe interferir con su cuantificación, ni presentarse en tiempos de retención de productos de degradación, al mismo tiempo no debe interferir con el Trimetoprim en su sistema de cuantificación aunque se presente en tiempos de retención de productos de degradación.

b) La SPR1 del Trimetoprim, no debe interferir con su cuantificación, ni presentarse en tiempos de retención de productos de degradación, al mismo tiempo no debe interferir con la cuantificación del Sulfametoxazol en su sistema de cuantificación aunque se presente en tiempos de retención de productos de degradación.

3.- La tercera opción es ponerle una SPR1 a cada compuesto y hacer inyección de muestras diferentes en cada sistema.

Dado que existe una gran variedad de compuestos que se pueden probar para ver si cumplen con las características anteriores, se seguirá el siguiente criterio para escoger cuales son aquellos compuestos que puedan servir de SPR1 de los compuestos que interesan: 1) Sustancias similares en estructura a los compuestos de interés. 2) Sustancias que se tenga la referencia de que se analizan bajo condiciones de fase móvil similares.

A) Sulfametoxazol: Las sustancias que se probaron fueron la Norfloxacin, Vainillina, Minoxidil, Metronidazol, Acetónido de Fluoxinolona y Fenacetina. La SPR1 que se debía de seleccionar tenía que cumplir con los siguientes requisitos:

-Absorber significativamente a 254 nm.

-Presentar un tiempo de retención mayor de 10 minutos, y que se separara del producto de degradación que presenta el Sulfametoxazol en condiciones oxidativas.

-Ser estable cuando menos por 24 hrs en las condiciones de inyección.

Se decidió poner la SPR1 con un tiempo de retención después del Sulfametoxazol, debido a que se presentan un gran número de productos de degradación a tiempos de retención menores lo cual hace más difícil encontrar una adecuada que no interfiera con ningún producto de degradación tanto del Sulfametoxazol como del Trimetoprim.

B) Trimetoprim: Para este compuesto se probaron los siguientes compuestos: Vainillina, Fenacetina, Minoxidil, Griseofulvina, Metronidazol, Metildopa, Nicotinamida, Acetónido de Fluoxinolona, Difenilhidantoína sódica, Fenilbutazona, Trimebutina base, Ampicilina trihidrato, Piridoxina HCl, Metampicilina sódica, Glibenclamida, Dicloxacilina sódica, Cloxacilina sódica, Acido Pipemídico, Valerato de Betametazona, Cimetidina, Ibuprofen y Diazepam. La SPR1 a seleccionar debía de cumplir con los siguientes requisitos:

- Absorber significativamente a 230 nm.
- Presentar un tiempo de retención mayor de 7.5 min (los productos de degradación salen hasta los 6 minutos) ya sea antes o después de la salida del Trimetoprim, y que presente buena resolución.
- Que sea estable en las condiciones de inyección cuando menos 24 horas.

C. -SELECCION DEL METODO ANALITICO

El método analítico propuesto para la preparación de la muestra, es el USP XXII pero dado que son dos sistemas cromatográficos diferentes para cuantificar los activos cada uno por separado, se hicieron las siguientes modificaciones de tal forma que el método analítico quedó de la siguiente manera:

- Pulverizar finamente 20 comprimidos.
- Pesar una cantidad de la muestra pulverizada equivalente a 160 mg de Sulfametoxazol y 32 mg de Trimetoprim.
- Transferir a un matraz volumétrico de 100 ml y adicionar 50 ml de metanol.
- Colocar en baño de ultrasonido 5 minutos, agitando ocasionalmente.
- Enfriar y llevar a volumen con metanol.
- Filtrar a través de filtro de poro pequeño: SOLUCION A

1) Sulfametoxazol: Tomar una alícuota de la SOLUCION A, adicionar una cantidad adecuada de Fenacetina en solución metanólica y llevar a la concentración final con la fase móvil. Inyectar al sistema cromatográfico:

FASE MOVIL: Agua: acetonitrilo: trietilamina (79.8:20:0.2)
pH = 5.8

COLUMNA: C₁₈ de 30 cm de longitud, 3.9 mm de Diámetro Interno y 5-10 micras de Tamaño de Partícula. Se utilizó µBondapak C₁₈.

DETECTOR : UV.
LONGITUD DE ONDA: 254 nm.
FLUJO : 2 ml/min.
VOLUMEN DE INYECCION : 20 µcl.
SENSIBILIDAD : 0.2 AUFS

2) Trimetoprim: Tomar una alícuota de la SOLUCION A, adicionar una cantidad adecuada de Diazepam en solución metanólica y llevar a la concentración final con metanol. Inyectar al sistema cromatográfico:

FASE MOVIL: Metanol: Acido fosforico 0.05 M: Lauril sulfato de sodio (LSNa) (70:30:20 mg/1000ml).

COLUMNA: Ultrasphere ODS de 25 cm de longitud x 4.6 mm de DI y 5 micras de TP.

DETECTOR : UV.
LONGITUD DE ONDA: 230 nm.
FLUJO: 1 ml/min.
VOLUMEN DE INYECCION: 20 µcl.

SENSIBILIDAD: 0.02 AUFS.

3.3.4 LINEALIDAD DEL METODO

A. -SULFAMETOXAZOL

Se evaluó analizando placebos cargados a los niveles de 60%, 80%, 90%, 100%, 110%, y 120%, de la cantidad seleccionada, adicionando el Trimetoprim y la Fenacetina al 100%; 6 réplicas por cada nivel y considerando placebos sin Sulfametoxazol como 0%. Se determinó la pendiente, el intercepto, el coeficiente de determinación, la desviación estándar de la recta de regresión, la desviación estándar relativa de la gráfica de miligramos adicionados contra miligramos recuperado.

B. -TRIMETOPRIM

Se evaluó analizando placebos cargados a los niveles de 60%, 80%, 90%, 100%, 110%, y 120%, de la cantidad seleccionada, adicionando el Sulfametoxazol y el Diazepam al 100%; 6 réplicas por cada nivel y considerando placebos sin Trimetoprim como 0%. Se determinó la pendiente, el intercepto, el coeficiente de determinación, la desviación estándar de la recta de regresión, la desviación estándar relativa de la gráfica de miligramos adicionados contra miligramos recuperado.

3.3.5 EXACTITUD DEL METODO:

A. -SULFAMETOXAZOL

Se determinó del porcentaje recuperado de cada muestra del estudio de linealidad para obtener la exactitud en todo el intervalo de concentraciones incluyendo la exactitud al 100%.

B. -TRIMETOPRIM

Se determinó del porcentaje recuperado de cada muestra del estudio de linealidad para obtener la exactitud en todo el intervalo de concentraciones incluyendo la exactitud al 100%.

3.3.6 PRECISION

SULFAMETOXAZOL Y TRIMETOPRIM

REPETIBILIDAD: Se determinó por el coeficiente de variación de los resultados obtenidos en la exactitud al 100%.

REPRODUCIBILIDAD: Se evaluó con el estudio de determinaciones independientes de una misma muestra en dos días por dos analistas con 3 réplicas por día utilizando un análisis de varianza (ANADÉVA) de modelo anidado.

3.3.7 ESTABILIDAD DE LA SOLUCION DE LA MUESTRA:

SULFAMETOXAZOL Y TRIMETOPRIM

Se determinó analizando 3 muestras a la misma concentración inmediatamente después de su preparación y volviéndolas a analizar a las 24 y 48 horas habiéndolas almacenado bajo las siguientes condiciones:

- a) Temperatura ambiente expuestas a la luz.
- b) Temperatura ambiente en obscuridad.
- c) Refrigeración a 4°C.

3.3.8 TOLERANCIA DEL SISTEMA:

Se hizo comparando los resultados de tres análisis independientes de una misma muestra de los resultados originales al modificar la fase móvil de la manera siguiente:

A. -SULFAMETOXAZOL

Fase Móvil.- Composición*

- 1.-Agua:Acetonitrilo:Trietilamina (79.8 : 20 : 0.2) pH=5.8
- 2.-Agua:Acetonitrilo:Trietilamina (79.8 : 20 : 0.2) pH=5.75
- 3.-Agua:Acetonitrilo:Trietilamina (79.8 : 20 : 0.2) pH=5.85
- 4.-Agua:Acetonitrilo:Trietilamina (78.8 : 21 : 0.2) pH=5.8
- 5.-Agua:Acetonitrilo:Trietilamina (79.82 : 20 : 0.18) pH=5.8
- 6.-Agua:Acetonitrilo:Trietilamina (79.78 : 20 : 0.22) pH=5.8
- 7.-Agua:Acetonitrilo:Trietilamina (80.8 : 19 : 0.2) pH=5.8

B. -TRIMETOPRIM

Fase móvil.- Composición*

- 1.-Metanol:Acido fosfórico 0.05M:LSNa (70:30:0.002g)
- 2.-Metanol:Acido fosfórico 0.05M:LSNa (69.4:30.6:0.002g)
- 3.-Metanol:Acido fosfórico 0.05M:LSNa (70:30:0.0019g)
- 4.-Metanol:Acido fosfórico 0.05M:LSNa (71:29:0.002g)
- 5.-Metanol:Acido fosfórico 0.045M:LSNa (70:30:0.002g)
- 6.-Metanol:Acido fosfórico 0.055M:LSNa (70:30:0.002g)
- 7.-Metanol:Acido fosfórico 0.05M:LSNa (70:30:0.0021g)

* Se hicieron pequeñas modificaciones en las fases móviles, para determinar que tanto podrían afectar, pequeñas variaciones en su preparación, debidas al error normal del analista, los resultados de la cuantificación de las muestras.

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1 VALIDACION DE LOS METODOS

4.1.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

4.1.2 PRECISION

A. -SULFAMETOXAZOL

NIVEL %	CONCENTRACION mcg/ml	RESPUESTA AREA
0	0.0	0
0	0.0	0
0	0.0	0
25	40.0	0.020594
25	40.0	0.020632
25	40.0	0.019870
50	80.0	0.041528
50	80.0	0.041673
50	80.0	0.041665
75	120.0	0.062711
75	120.0	0.063421
75	120.0	0.060955
75	120.0	0.063448
100	160.0	0.082975
100	160.0	0.083710
100	160.0	0.083888
100	160.0	0.083502
100	160.0	0.083410
125	200.0	0.102674
125	200.0	0.102297
125	200.0	0.103667
150	240.0	0.124866
150	240.0	0.123050
150	240.0	0.122757

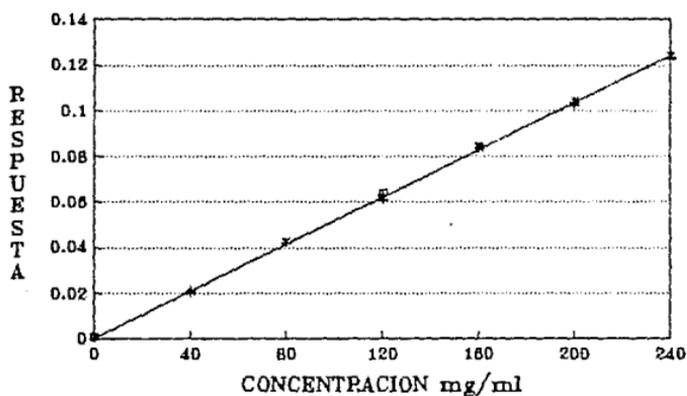
4.1.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

4.1.2 PRECISION

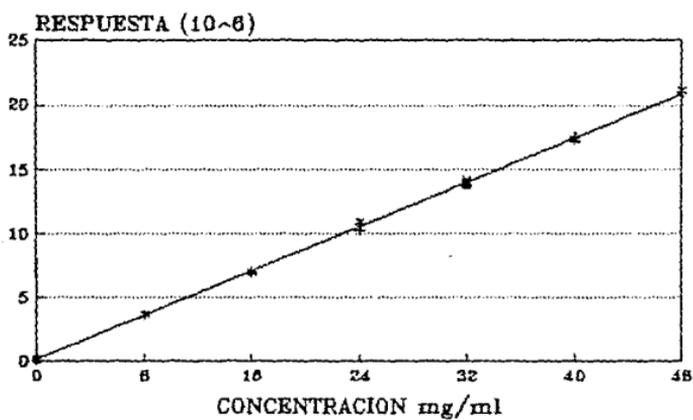
B. -TRIMETOPRIM

NIVEL %	CONCENTRACION mcg/ml	RESPUESTA AREA
0	0.0	0
0	0.0	0
0	0.0	0
25	8.0	3696192
25	8.0	3529920
25	8.0	3512093
50	16.0	6983997
50	16.0	6907495
50	16.0	6900093
75	24.0	10376776
75	24.0	10208520
75	24.0	10777280
100	32.0	14053404
100	32.0	13821264
100	32.0	13788352
100	32.0	13626848
100	32.0	14009608
100	32.0	13781424
125	40.0	17786768
125	40.0	17511312
125	40.0	17243440
150	48.0	20562496
150	48.0	21003936
150	48.0	20889424

LINEALIDAD DEL SISTEMA SULFAMETOXAZOL



LINEALIDAD DEL SISTEMA TRIMETOPRIM



Cálculos de Linealidad
del sistema para
Sulfametoxazol

$$A = 1.68 \times 10^{-4}$$

$$LSIC = 0.0008$$

$$LIIC = -0.0004$$

$$t_{cal} = 0.570$$

$$t_{95\% \text{ zc gl}} = 2.074$$

$$B = 5.17 \times 10^{-4}$$

$$PR = 0.9974$$

$$r^2 = 0.9998$$

$$S_{y/x} = 0.0007$$

$$DER = 0.012$$

Cálculos de Linealidad
del sistema para
Trimetoprim

$$A = 21892.8084$$

$$LSIC = 167026.8$$

$$LIIC = -123242.8$$

$$t_{cal} = 0.313$$

$$t_{95\% \text{ zc gl}} = 2.047$$

$$B = 434242.0242$$

$$PR = 0.9980$$

$$r^2 = 0.9993$$

$$S_{y/x} = 178097.78$$

$$DER = 0.016$$

Siendo que $t_{cal} < t_{95\% \text{ zc gl}}$ para el intercepto y que el intervalo de confianza para el mismo incluye a cero, es suficiente para afirmar que el intercepto no es significativamente diferente de cero, para ambos métodos.

Siendo que $0.98 < PR < 1.02$ para Sulfametoxazol y para Trimetoprim, se dice que existe una relación proporcional de pendiente aproximadamente igual a 1.

Siendo que $r^2 > 0.98$ para Sulfametoxazol y para Trimetoprim, se dice que el modelo representa correctamente la relación que hay entre la concentración y el área en el intervalo estudiado.

Siendo $DER < 0.03$ para Sulfametoxazol y para Trimetoprim es suficiente para aceptar la variabilidad en el intervalo estudiado.

Cálculos de Precisión
del sistema para
Sulfametoxazol

$$n = 5$$

$$\bar{x} = 5.1895 \times 10^{-4}$$

$$CV = 1.3 \%$$

Cálculos de Precisión
del sistema para
Trimetoprim

$$n = 6$$

$$\bar{x} = 435266.0089$$

$$CV = 1.92 \%$$

Siendo el coeficiente de variación $1.3 \% < 2.0 \%$ para Sulfametoxazol y $1.92 \% < 2.0 \%$ para Trimetoprim se dice que el sistema de medición es preciso para las condiciones experimentales.

4.1.2 ESPECIFICIDAD

4.1.2.1 RESULTADOS DE ESTUDIO DE DEGRADACION

Los resultados obtenidos de los estudios de degradación de acuerdo a la Tabla 1 fueron los siguientes:

	CONDICION	PORCENTAJE DEGRADADO		DIFERENCIA EN LOS % DEGRADADOS
		1a.	2a.	
SULFAMETOXAZOL MATERIA PRIMA	Acida	9.52	9.98	-0.46
	Básica	----	----	----
	Oxidación	21.40	21.98	-0.58
	Luz UV	15.93	14.47	1.46
	Calor	----	----	----
TRIMETOPRIM MATERIA PRIMA	Acida	12.83	13.45	-0.62
	Básica	----	----	----
	Oxidación	10.60	11.21	0.61
	Luz UV	----	----	----
	Calor	----	----	----
FORMULACION SULFAMETOXAZOL	Acida	9.98	10.45	-0.47
	Básica	----	----	----
	Oxidación	14.50	13.25	1.25
	Luz UV	15.76	15.21	0.55
	Calor	----	----	----
FORMULACION TRIMETOPRIM	Acida	17.08	15.93	1.15
	Básica	----	----	----
	Oxidación	21.23	22.03	-0.80
	Luz UV	----	----	----
	Calor	----	----	----

Tabla de Porcentajes de Degradación y Reproducibilidad

4.1.2.2 ANALISIS ESPECTRAL

En todos los casos se hicieron barridos de 200 a 360 nm, que son la zona en que ambos compuestos absorben y donde se presentan los máximos y mínimos de sus espectros.

Los resultados fueron los siguientes:

A.-SISTEMA PARA SULFAMETOXAZOL

Figura 4.1, el placebo, sin degradar (8) así como el placebo degradado en condiciones oxidativas (6), ácidas (2), básicas y con calor, según la Tabla 1 no presenta ningún producto de degradación que interfiriera con la respuesta del Sulfametoxazol y el Trimetoprim.

En condiciones de oxidación la degradación del Sulfametoxazol como materia prima presenta tres picos de degradación con un tiempos de retención aproximado de 4.45, 5.85 y 9.11 min el primero es una posible interferencia para el Trimetoprim, Figura 4.1 (5). El análisis espectral demostró que en estas condiciones el Sulfametoxazol no sufre la interferencia de sus productos de degradación.

En condiciones ácidas la degradación del Sulfametoxazol como materia prima presenta un pico de degradación con un tiempo de retención de 3.92 min, Figura 4.1 (4) el cual puede interferir con Trimetoprim, por lo demás el análisis espectral demuestra especificidad para Sulfametoxazol.

La degradación del Sulfametoxazol materia prima con luz UV produjo una señal con tiempo de retención aproximado de 9.3 min. El análisis espectral demuestra la especificidad hacia Sulfametoxazol.

Tanto en medio básico como con calor la materia prima de el Sulfametoxazol no fue posible degradar aún en condiciones drásticas, por lo que no presenta ningún producto de degradación que interfiriera.

El Trimetoprim como materia prima degradado en condiciones oxidativas no presenta ningún producto de degradación que interfiriera con su cuantificación, ni con la del Sulfametoxazol el análisis espectral demuestra especificidad para los productos de degradación en estas condiciones, Figura 4.1 (1)

El Trimetoprim en condiciones ácida presenta un pico traslapado, Figura 4.1 (3) no se observa ningún producto de degradación que pudiera interferir con el Sulfametoxazol. El análisis espectral revela la presencia de un compuesto no

identificado, por lo tanto el sistema no es específico para Trimetoprim en estas condiciones.

Figura 4.2, en medio básico (4), con calor y con luz UV el Trimetoprim no fue degradable aun en condiciones drásticas, no habiendo interferencia de ningún tipo.

Figura 4.2 el Trimetoprim en la formulación degradado en condiciones oxidativas (1) se encuentra traslapado con un posible producto de la degradación oxidativa del Sulfametoxazol y en condiciones ácidas (2) también se encuentra traslapado con un posible compuesto de su degradación. Se demuestra que el método no es específico para Trimetoprim al hacer el análisis espectral de los compuestos en la formulación degradada en condiciones ácidas (Figura 4.3 y 4.4) y en condiciones oxidativas (Figura 4.5 y 4.6). El análisis espectral para Sulfametoxazol demuestra la especificidad del sistema hacia éste, Figura 4.7.

La formulación degradada con luz UV presenta una señal con tiempo de retención de 9.4 min, pero se comprueba la especificidad hacia ambos compuestos con el análisis espectral.

En condiciones básicas, figura 4.2 (3) y con calor la formulación no fue degradable, la inyección de estas muestras no presenta ningún tipo de interferencia con los compuestos de interés.

El sistema cromatográfico resultó ser específico para el Sulfametoxazol, no así para el Trimetoprim.

SISTEMA PARA SULFAMETOXAZOL			
TR SMX = 8.5 TR TMP = 4.5	TIEMPO DE RETENCION APROXIMADO DE PRODUCTO DE DEGRADACION		
DEGRADACION	ACIDA	LUZ UV	OXIDACION
SULFAMETOXAZOL	3.9	9.3	4.4, 5.8, 9.1
TRIMETOPRIM	4.3	---	2.0
FORMULACION	3.6	9.3	5.3, 9.1

Tiempos de retención de los productos de degradación obtenidos según la Tabla 1.

Cromatogramas de la especificidad del metodo analítico para Sulfametoxazol:

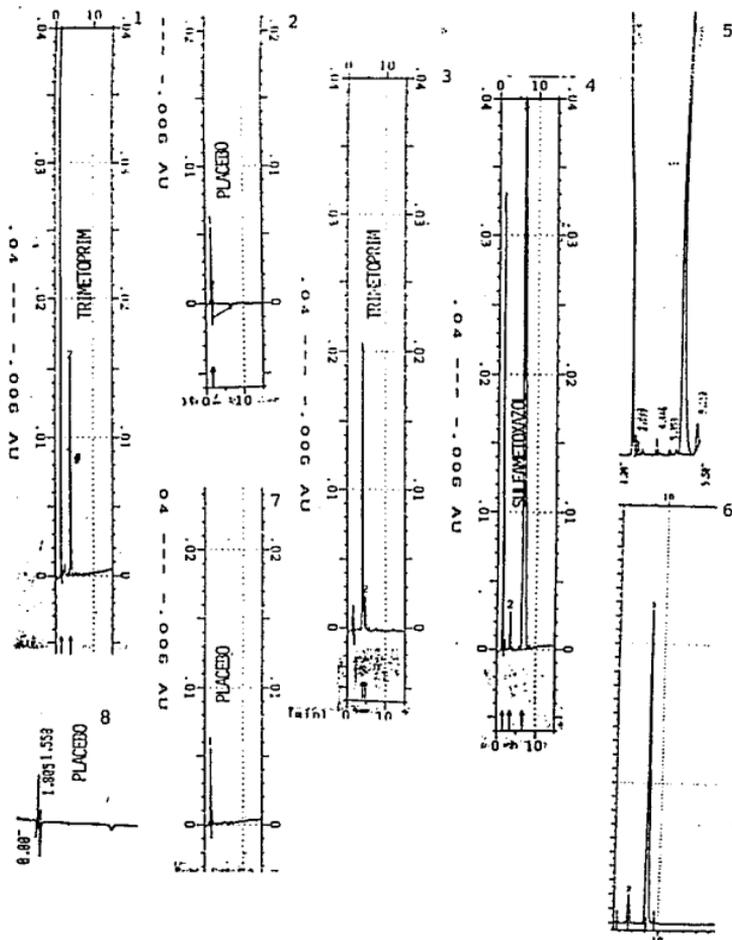


Figura 4.1.- (1) Trimetoprim degradado en condiciones oxidativas. (2) Placebo degradado con ácido. (3) Trimetoprim materia prima degradado en condiciones ácidas (4) Sulfametoxazol materia prima degradado en condiciones ácidas. (5) Sulfametoxazol materia prima degradado en condiciones de oxidación (6) Formulación degradada con luz U.V. (7) Placebo degradado en condiciones de Oxidación (8) Placebo sin degradar.

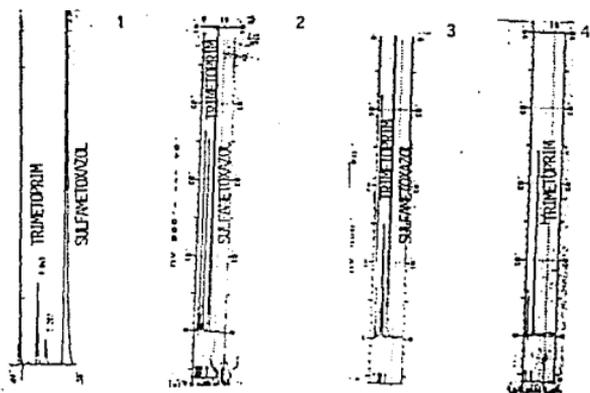


Figura 4.2.- (1) Formulación degradada en condiciones de oxidación (2) Formulación degradada en condiciones ácidas. (3) Formulación degradada en condiciones alcalinas, (4) Trimetoprim materia prima degradado en condiciones alcalinas.

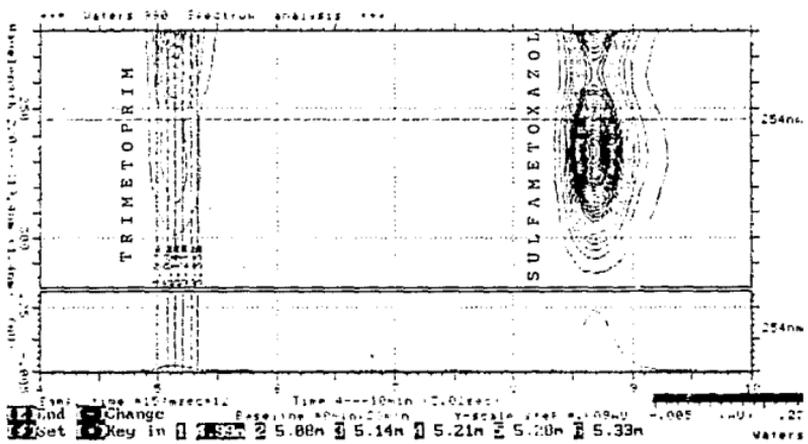


Figura 4.3.- Análisis espectral de Trimetoprim y Sulfametoaxazol en formulación degradada en condiciones ácidas.

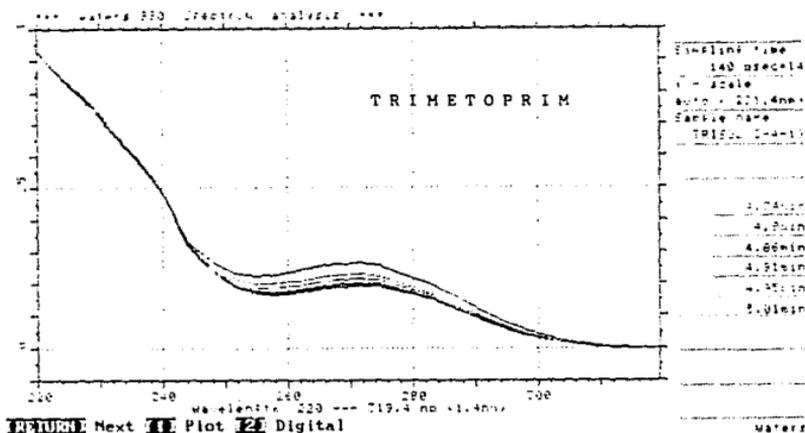


Figura 4.6.- Superposición de espectros de Trimetoprim en formulación degradada en condiciones oxidativas.

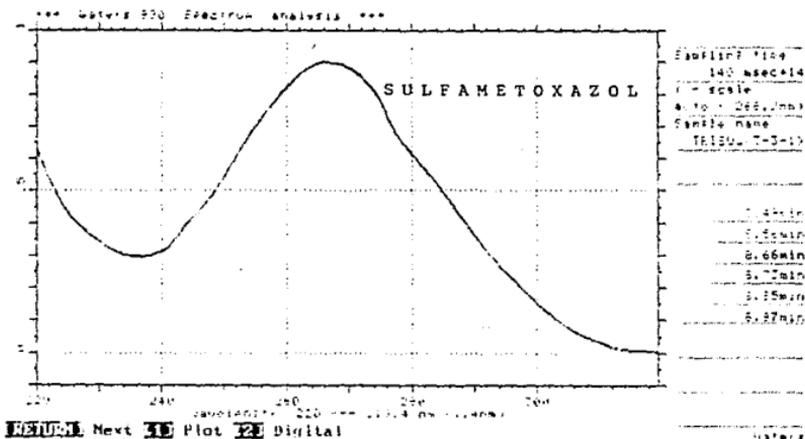


Figura 4.7.- Superposición de espectros de Sulfametoxazol en formulación degradada en condiciones ácidas.

B. --SISTEMA PARA TRIMETOPRIM

Figura 4.8 el placebo sin degradar (6) no presenta ningún pico que interfiera con la respuesta del Trimetoprim.

Figura 4.8, el placebo degradado en condiciones oxidativas (7), ácidas (8), básicas y con calor no presenta ninguna señal que interfiera con la respuesta del Trimetoprim.

El Trimetoprim degradado en formulación en condiciones oxidativas, figura 4.8 (5) y como materia prima, figura 4.9 (3) presenta productos de degradación que no interfieren con su respuesta, el análisis espectral demuestra especificidad para el Trimetoprim en estas condiciones.

En condiciones ácidas de degradación tanto para el Trimetoprim como materia prima, Figura 4.8 (4), como para el mismo pero en formulación, Figura 4.8 (3), los productos de degradación no presentan interferencia con el Trimetoprim lo cual se confirma con el análisis espectral, Figura 4.10

En condiciones básicas, figura 4.9 (1), calor y luz UV Figura 4.9 (2) el compuesto no es degradable, y no se presenta interferencia alguna, lo cual se demostró con el análisis espectral.

Figura 4.8 el Sulfametoxazol degradado en condiciones oxidativas (1), ácidas (2), básicas y luz UV no presenta ningún producto de degradación que pudiera interferir con el Trimetoprim.

Con lo anterior se demostró que el sistema cromatográfico es específico para cuantificar Trimetoprim en presencia de sus productos de degradación, los productos de degradación del Sulfametoxazol, los excipientes y sus productos de degradación.

SISTEMA PARA TRIMETOPRIM			
TR TMP = 10.5 TR SMX = 2.5	TIEMPO DE RETENCION APROXIMADO DE PRODUCTO DE DEGRADACION		
DEGRADACION	ACIDA	LUZ UV	OXIDATIVA
SULFAMETOXAZOL	2.3, 5.1	2.3	3.2, 5.1
TRIMETOPRIM	4.0	---	5.0
FORMULACION	4.0, 5.1	2.3	3.3, 4.8

Tiempos de retención de los productos de degradación obtenidos según la Tabla 1.

Cromatogramas de la Especificidad del método analítico para Trimetoprim:

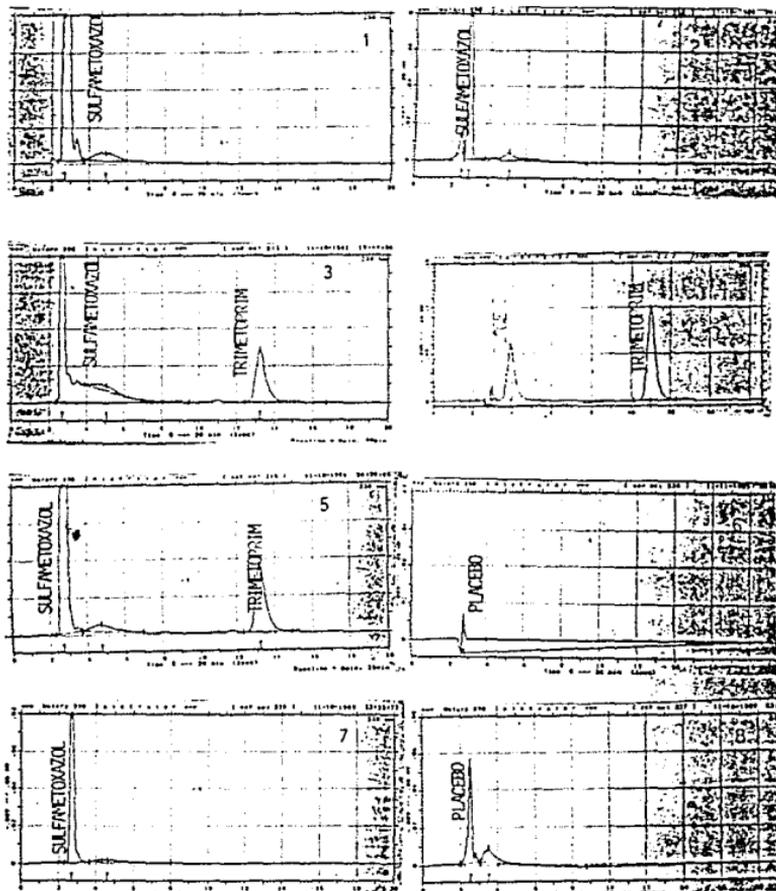


Figura 4.8.- (1) Sulfametoxazol materia prima degradado en condiciones de oxidación, (2) Sulfametoxazol materia prima degradado con ácido, (3) Formulación degradada en condiciones ácidas (4) Trimetoprim materia prima degradado con ácido, (5) Formulación degradada en condiciones oxidativas, (6) Placebo sin degradar, (7) Placebo degradado en condiciones oxidativas (8) Placebo degradado con ácido.

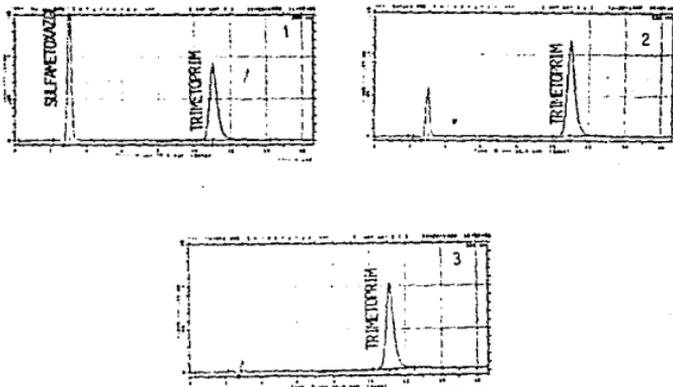


Figura 4.9.- (1) Formulación degradado en condiciones alcalinas, (2) Formulación degradada con luz UV, (3) Trimetoprim materia prima degradado en condiciones oxidativas.

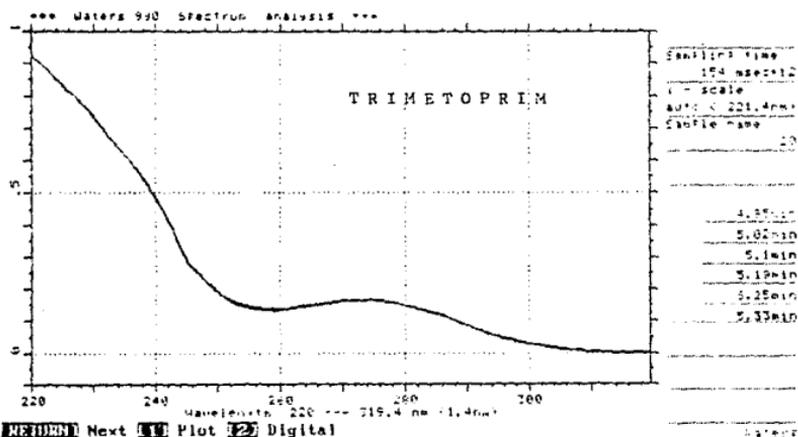


Figura 4.10.- Superposición de espectros de Trimetoprim degradado en condiciones ácidas.

4.1.2.3 SELECCION DE SUSTANCIA PATRON DE REFERENCIA INTERNA (SPRI).

No fue posible encontrar un patrón de referencia interno adecuado para los dos compuestos, debido a la diferencia que existe entre la composición de ambas fases móviles, por lo que se descartó esta posibilidad.

En la segunda opción se logró encontrar las SPRI que cumplen con los requisitos mencionados: Fenacetina para el Sulfametoxazol, y Ampicilina trihidrato para el Trimetoprim, sin embargo después de análisis posteriores se encontró que la ampicilina trihidrato era poco estable en la muestra de inyección.

En la tercera opción, para el Sulfametoxazol, la Fenacetina fue la que cumplió con todos estos requisitos. Además se probó que la Fenacetina se separaba muy bien del producto de degradación con el cual podría interferir (El que se produce debido a la degradación oxidativa del Sulfametoxazol).

Para el Trimetoprim se seleccionó al Diazepam como su patrón de referencia interno que cumplió con todos los requisitos para ser usada en un método indicador de estabilidad.

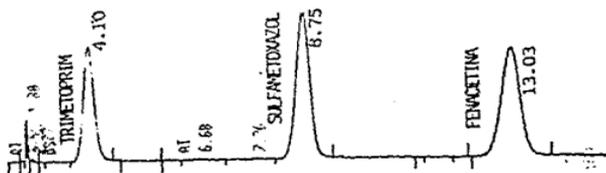


Figura 4.11.- 1) Sulfametoxazol con Fenacetina como SPRI.

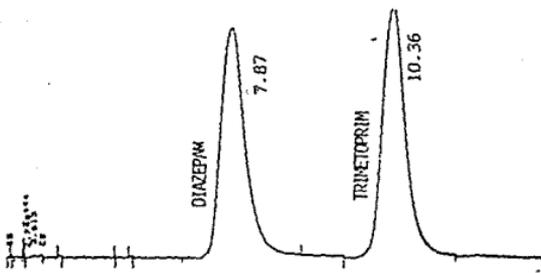


Figura 4.12.- 2) Trimetoprim con Diazepam como SPRI.

4.1.3 LINEALIDAD Y EXACTITUD DEL METODO INDICADOR DE ESTABILIDAD.

A. -SULFAMETOXAZOL

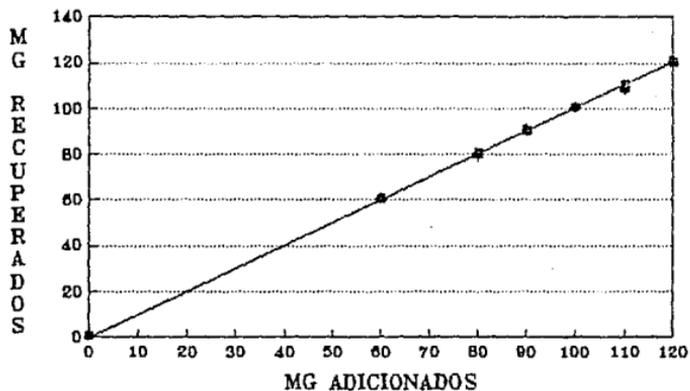
NIVEL X	MILIGRAMOS ADICIONADOS	MILIGRAMOS RECUPERADOS	% DE RECOBRO
0	0.0	0	0
0	0.0	0	0
0	0.0	0	0
0	0.0	0	0
0	0.0	0	0
0	0.0	0	0
60	60.0	60.2	100.4
60	60.0	60.8	101.3
60	60.0	60.4	100.7
60	60.0	60.0	100.1
60	60.0	59.8	99.6
60	60.0	60.0	100.1
80	80.0	79.6	99.4
80	80.0	79.0	98.8
80	80.0	79.8	99.8
80	80.0	80.0	100.0
80	80.0	79.4	99.2
80	80.0	79.9	99.9
90	90.0	89.0	98.9
90	90.0	89.8	99.8
90	90.0	90.2	100.2
90	90.0	89.9	99.9
90	90.0	89.6	99.5
90	90.0	90.9	101.0
100	100.0	99.3	99.3
100	100.0	100.4	100.4
100	100.0	99.8	99.8
100	100.0	99.9	99.9
100	100.0	99.7	99.7
100	100.0	100.3	100.3
110	110.0	110.1	100.1
110	110.0	109.7	99.7
110	110.0	108.3	98.4
110	110.0	110.2	100.2
110	110.0	109.6	99.7
110	110.0	108.4	98.6
120	120.0	121.5	101.2
120	120.0	119.8	99.9
120	120.0	120.5	100.4
120	120.0	119.9	99.9
120	120.0	119.1	99.2
120	120.0	121.0	100.8

4.1.3 LINEALIDAD Y EXACTITUD DEL METODO INDICADOR DE ESTABILIDAD

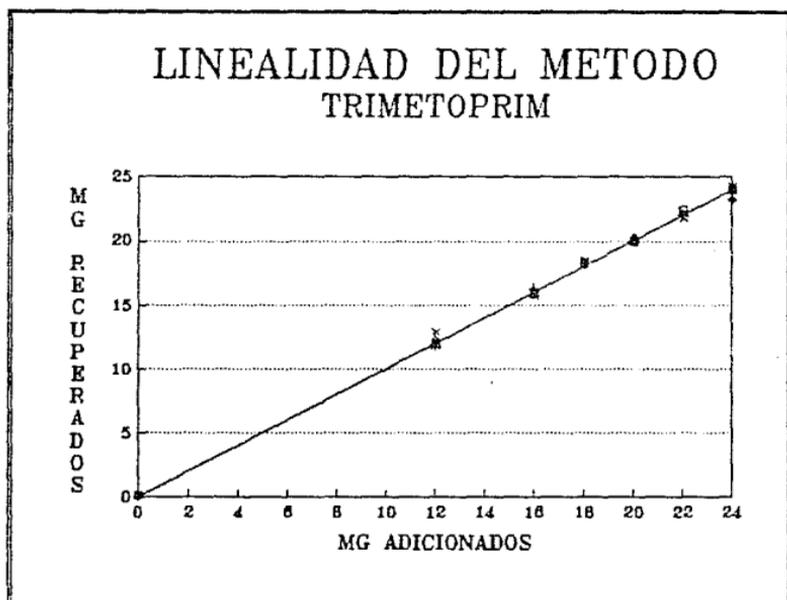
B. -TRIMETOPRIM

NIVEL %	MILIGRAMOS ADICIONADOS	MILIGRAMOS RECUPERADOS	% DE RECUBRO
0	0.0	0	0
0	0.0	0	0
0	0.0	0	0
0	0.0	0	0
0	0.0	0	0
0	0.0	0	0
60	12.0	11.9	99.5
60	12.0	11.7	97.7
60	12.0	11.7	97.2
60	12.0	11.8	98.3
60	12.0	12.7	106.3
60	12.0	12.2	101.5
80	16.0	15.8	99.0
80	16.0	16.3	101.8
80	16.0	15.8	98.9
80	16.0	15.8	98.8
80	16.0	15.6	97.6
80	16.0	16.1	100.8
90	18.0	17.9	99.3
90	18.0	18.3	101.5
90	18.0	18.2	101.2
90	18.0	18.1	100.7
90	18.0	18.4	102.1
90	18.0	18.1	100.4
100	20.0	20.3	101.6
100	20.0	20.1	100.3
100	20.0	20.0	99.8
100	20.0	19.8	99.0
100	20.0	19.8	99.2
100	20.0	20.2	101.2
110	22.0	22.0	100.0
110	22.0	21.9	99.7
110	22.0	22.1	100.4
110	22.0	22.3	101.3
110	22.0	21.6	98.3
110	22.0	22.0	100.0
120	24.0	23.8	99.3
120	24.0	23.2	96.8
120	24.0	23.9	99.5
120	24.0	23.9	99.6
120	24.0	24.1	100.4
120	24.0	23.2	96.8

LINEALIDAD DEL METODO SULFAMETOXAZOL



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



Calculos de Linealidad y Exactitud del Método para Sulfametoxazol

Linealidad del metodo	Exactitud del metodo
n = 42	n = 36
$r^2 = 0.999$	$\bar{x} = 99.9$
B = 0.999	CV = 0.67 %
LSIC _B = 1.004	LSIC _x = 100.1
LIIC _B = 0.994	LIIC _x = 99.7
tcal = -0.546	tcal = -0.970
A = 0.010	tos% 35 gl = 2.030
LSIC _A = 0.460	Exactitud al 100 %
LIIC _A = -0.440	n = 6
tcal = 0.046	$\bar{x} = 99.9$
$S_{y/x} = 0.612$	CV = 0.41 %
DER = 0.008	LSIC = 100.3
tos% 40 gl = 2.021	LIIC = 99.5
	tcal = -0.601
	tos% 5 gl = 2.571

Siendo $r^2 > 0.98$ se dice que hay una relacion entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada y que se representa por la linea recta propuesta.

Siendo tcal < t os% 40 gl para el intercepto v que en el intervalo de confianza se incluye al cero, se dice que éste no es significativamente diferente de cero.

Siendo tcal < t os% 40 gl para la pendiente v que en el intervalo de confianza incluye al 1, se dice que la pendiente no es significativamente diferente de 1.

Siendo DER < 0.03 se acepta la variabilidad en todo el intervalo estudiado.

Ya que en la exactitud al 100% y en todo el intervalo estudiado tcal < t os% n-2 gl v la media de los recobros se encuentra dentro del intervalo de 98 a 102 % se dice que el método es exacto v repetible al ser el coeficiente de variación menor al 2% en ambos casos.

Calculos de Linealidad y Exactitud del Metodo para Trimetoprim.

Linealidad del método	Exactitud del método
n = 42	
$r^2 = 0.999$	$\bar{x} = 99.9$
B = 0.994	CV = 1.79 %
LSIC _b = 1.006	LSIC \bar{x} = 100.5
LIIC _b = 0.982	LIIC \bar{x} = 99.3
t _{cal} = -0.951	t _{cal} = -0.391
A = 0.055	t _{95% 35 gl} = 2.030
LSICA = 0.263	Exactitud al 100 %
LIICA = -0.147	n = 6
t _{cal} = 0.537	$\bar{x} = 100.2$
S _{y/x} = 0.282	CV = 1.05 %
DER = 0.018	LSIC = 101.3
t _{95% 40 gl} = 2.021	LIIC = 99.1
	t _{cal} = 0.426
	t _{95% 5 gl} = 2.571

Siendo $r^2 > 0.98$ se dice que hay una relacion entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada y que se representa por la linea recta propuesta.

Siendo $t_{cal} < t_{95\% 40 gl}$ para el intercepto y que en el intervalo de confianza se incluye al cero, se dice que este no es significativamente diferente de cero.

Siendo $t_{cal} < t_{95\% 40 gl}$ para la pendiente y que en el intervalo de confianza incluye al 1, se dice que la pendiente no es significativamente diferente de 1.

Siendo DER < 0.03 se acepta la variabilidad en todo el intervalo estudiado.

Ya que en la exactitud al 100% y en todo el intervalo estudiado $t_{cal} < t_{95\% n-2 gl}$ y la media de los recobros se encuentra dentro del intervalo de 98 a 102 % se dice que el método es exacto y repetible al ser el coeficiente de variacion menor al 2% en ambos casos.

4.1.4 PRECISION

A. -SULFAMETOXAZOL

		ANALISTA	
		1	2
D	1	98.3	99.5
		98.9	99.2
		99.2	99.5
A	2	99.2	99.1
		98.4	98.6
		99.6	98.7

$$n = 12$$

$$\bar{x} = 99.02$$

$$S = 0.4366$$

$$CV = 0.44 \%$$

REPRODUCIBILIDAD

TABLA DE ANADEVIA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F cal	F teo
Analista	1	0.1172	0.1172	0.38	18.51
Dia/Anal.	2	0.6250	0.3125	1.84	4.46
Error	8	1.3574	0.1697		

Siendo la $F_{cal} < F_{teo}$ para evaluar el efecto del analista y el efecto del día, se puede decir que el método es reproducible por cualquier analista, en cualquier día.

4.1.5 PRECISION

B. - TRIMETOPRIM

		ANALISTA	
		1	2
D I A	1	97.6	97.3
		98.3	97.3
		97.7	96.5
2	97.7	97.9	
	98.6	99.8	
	98.5	97.5	

$$n = 12$$

$$\bar{x} = 97.89$$

$$S = 0.8328$$

$$CV = 0.85 \%$$

REPRODUCIBILIDAD

TABLA DE ANADEVIA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F cal	F teo
Analista	1	0.3594	0.3594	0.24	18.51
Dia/Anal.	2	3.0391	1.5195	2.87	4.46
Error	8	4.2285	0.5286		

Siendo la $F_{cal} < F_{teo}$ para evaluar el efecto del analista y el efecto del día, se puede decir que el método es reproducible por cualquier analista, en cualquier día.

4.1.6 ESTABILIDAD DE LA SOLUCION DE LA MUESTRA
A. -SULFAMETOXAZOL

a) Temperatura Ambiente

TIEMPO (HRS)		MUESTRA		
		1	2	3
0	X R E C E D O B E R O	98.7	98.6	99.1
24		98.5	98.8	99.0
48		98.5	98.7	98.4

b) Refrigeración

TIEMPO (HRS)		MUESTRA		
		1	2	3
0	X R E C E D O B E R O	98.7	98.6	99.1
24		98.6	98.4	98.9
48		98.8	98.6	98.9

c) Oscuridad a Temperatura Ambiente

TIEMPO (HRS)		MUESTRA		
		1	2	3
0	X R E C E D O B E R O	98.7	98.6	99.1
24		98.1	98.4	99.1
48		98.6	97.8	100.0

B.-TRIMETOPRIM

a) Temperatura Ambiente

TIEMPO (HRS)	% R E C D O B R O	MUESTRA		
		1	2	3
0		97.3	96.5	97.3
48		97.9	96.0	97.5

b) Refrigeración

TIEMPO (HRS)	% R E C D O B R O	MUESTRA		
		1	2	3
0		97.3	96.5	97.3
48		97.3	96.3	97.6

c) Oscuridad a Temperatura Ambiente

TIEMPO (HRS)	% R E C D O B R O	MUESTRA		
		1	2	3
0		97.3	96.5	97.3
48		96.5	97.2	96.9

En ninguno de los casos el % de recobro difiere más de 2% con respecto al % de recobro original, por lo que se dice que las muestras de Sulfametoxazol como las de Trimetoprim son estables bajo las condiciones probadas

G) TOLERANCIA DEL SISTEMA

A. -SULFAMETOXAZOL

SULFAMETOXAZOL

FASE MOVIL	N	T	α	k'	% CUANTIFICADO
1	4386.84	1.01	1.00	4.04	99.8
2	4150.16	1.01	1.00	3.97	99.8
3	4319.86	1.06	1.00	3.93	99.6
4	4075.42	1.07	1.00	3.46	99.1
5	3677.36	1.08	1.00	3.43	100.0
6	3967.43	1.05	1.00	3.51	99.7
7	4018.16	1.08	1.00	5.43	100.0

FENACETINA

FASE MOVIL	N	T	α	k'
1	5063.81	1.17	1.58	6.37
2	5103.65	1.15	1.52	6.06
3	4850.77	1.15	1.54	6.22
4	4834.29	1.16	1.58	5.47
5	4536.67	1.22	1.57	5.45
6	4940.06	1.18	1.55	4.51
7	4912.87	1.15	1.52	8.23

RESOLUCION

FASE MOVIL	R TMP/SMX	R SMX/FNC
1	9.90	6.48
2	10.00	5.90
3	9.73	6.22
4	8.88	6.18
5	9.53	5.30
6	9.18	6.16
7	9.54	6.01

donde:

TMP = Trimetoprim
 SMX = Sulfametoxazol
 FNC = Fenacetina

B. - TRIMETOPRIM

DIAZEPAM

FASE MOVIL	N	T	α	k'
1	2393.43	1.24	0.58	1.99
2	2428.31	1.10	0.58	2.02
3	2419.45	1.13	0.58	1.88
4	2636.54	1.17	0.57	1.86
5	2357.10	1.14	0.53	1.97
6	2236.73	1.11	0.51	1.74
7	2296.94	1.12	0.58	1.93

TRIMETOPRIM

FASE MOVIL	N	T	α	k'	% CUANTIFICADO
1	4383.10	1.20	1.00	3.45	98.2
2	4361.56	1.12	1.00	3.47	98.4
3	4333.14	1.10	1.00	3.36	97.6
4	4568.52	1.16	1.00	3.27	99.0
5	4156.12	1.12	1.00	3.53	99.8
6	4042.13	1.13	1.00	3.35	97.6
7	4179.03	1.16	1.00	3.35	99.1

donde:

DZP = Diazepam

TMP = Trimetoprim

RESOLUCION

FASE MOVIL	R DZP/TMP
1	5.62
2	5.63
3	5.94
4	5.93
5	6.43
6	6.56
7	5.49

Al no comprometerse los resultados, ni la resolución de los compuestos de interés, se dice que los métodos para Sulfametoxazol y para Trimetoprim son; tolerables en las

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

- 1.- Se desarrollaron dos métodos indicadores de estabilidad uno para Sulfametoxazol y otro para Trimetoprim, por cromatografía de líquidos en fase reversa por iónico.
- 2.- Los métodos desarrollados son específicos para Sulfametoxazol y para Trimetoprim dado que se demostró que lograron separar y cuantificar a los principios activos de los productos de degradación y de los excipientes.
- 3.- Las técnicas desarrolladas son muy sencillas de realizar, no presentan problema en cuanto a manejo excesivo de muestras, utiliza pocos reactivos, aunque un pequeño problema es la SPR1 del Trimetoprim que es una sustancia restringida y no se consigue fácilmente.
- 4.- Después de analizar los datos obtenidos de la validación de los métodos se encontró que los métodos son lineales en el intervalo de concentraciones estudiada, que son exactos, precisos y reproducibles.
- 5.- Los métodos desarrollados sirven para cuantificar Sulfametoxazol y Trimetoprim por separado como métodos para estudios de estabilidad de los activos en la misma forma farmacéutica. El método para Sulfametoxazol puede cuantificar los dos activos en el mismo análisis y se puede utilizar como un método de control de calidad.
- 6.- Las muestras son estables, en ambos métodos, hasta por 48 horas tanto para las muestras almacenadas en refrigeración como las almacenadas a temperatura ambiente y en obscuridad.
- 7.- Ambos métodos son tolerantes para cada una de las variaciones de la fase móvil que se probaron, obteniéndose recobros satisfactorios con respecto a la fase móvil original.

VENTAJAS, DESVENTAJAS Y PROPUESTAS

Determinar la especificidad de un método a través de un análisis espectral con un detector de arreglo de fotodiodos nos proporciona un alto grado de confiabilidad, dada la facilidad y rapidez con que éste nos da una gran cantidad de información de los picos cromatográficos eluidos en un amplio intervalo de longitudes de onda.

Se proponen dos métodos diferentes para la cuantificación por separado de Sulfametoxazol y de Trimetoprim dada la complejidad que se presentó para hacer un sólo método específico para ambos, sin embargo, cada uno de los métodos están diseñados de tal forma que las muestras se preparan simultáneamente disminuyendo tiempo, dinero y esfuerzo, algo sumamente importante.

Es muy importante mencionar que la cromatografía de líquidos de alta resolución tiene muchas ventajas entre ellas la versatilidad y sensibilidad, además, si se cuenta con un detector de fotodiodos, la comodidad y rapidez con que se puede determinar si un método es selectivo o no hacia el compuesto que interesa cuantificar, sin embargo, se considera una gran desventaja el elevado costo para la adquisición y mantenimiento de dichos equipos, los cuales no están al alcance de muchas empresas.

Por último es necesario sugerir que las columnas empleadas para cromatografía de par iónico, sólo deben ser utilizadas con este fin, dada la gran afinidad que tienen los formadores de par iónico por la fase estacionaria, llegando incluso en ocasiones a ser agresivos hacia ellas, por lo anterior se recomienda utilizar pequeñas precolumnas, que protegen y aumentan considerablemente la vida útil de estas columnas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- A. Pryde and M. T. Gilbert. Applications of High Performance Liquid Chromatography. Ed. Chapman and Hall. 1979. Pag. 13-23.
- 2.- A.S Shidu, J.M. Kennedy and S. Deebie. "General Method For The Analysis Of Pharmaceuticals Dosage Forms by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 1987, 391(1), 233-42 (Eng).
- 3.- Ballerini, R., Chiodi, M. "High - Pressure Liquid Chromatographic Determination of Some Sulfonamides In Combination with Trimethoprim". Farmacol. Ed. Prat 1980, 35(2), 84-91 (Eng).
- 4.- Bergh, J.J; Breytenbach, J.C. "Stability - indicating High-Performance Liquid Chromatographic Analysis Of Trimethoprim In Pharmaceuticals". J. Chromatogr. 1987, 387, 528-31 (Eng).
- 5.- Bettinetti, G.P., Giordano.F. "Trimethoprim Crystal Forms". J. Pharm. Pharmacol. 1976. 28(1), 87-8 (Eng).
- 6.- Clarke's "Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceutical, Body Fluids and Post Mortem Material", Segunda Edición; The Pharmaceutical Society of Great Britain.
- 7.- Esquivel B., Harold M.McNair.. "Cromatografía Líquida de Alta Presión; Segunda Edición; Secretaría General de la OEA; USA, 1980.
- 8.- F. Steiner and C. Buetter. An Automated Check for Peak Impurities Using a New Algorithm. Hewlett-Packard.
- 9.- Goodman y Gilman. "Bases Farmacológicas de la Terapéutica". Sexta Edición; Editorial Interamericana Pag. 1030-1032, 1086-1099, 1680-1684.
- 10.- Howard B. Christensen. Estadística Paso a Paso. Primera Edición. Pag. 513-608.
- 11.- Florey Klaus. Analytical Profiles Drug Substances. Academic Press Inc. Vol 2. 1973. Pag. 467-486, Vol 7. 1978. Pag. 445-475.

- 12.- Litter Manuel. "Farmacologia". Quinta edición. Editorial El Ateneo. Pag. 1646. 1657. 1663 y 1666.
- 13.- Menzl, Kurt. 2,4-Diamino-5-(3,4,5-trimethoxybenzyl) pyrimidine. Ger Offen 27 Jan :977. Appl 10 Jul 1975: 10 pp.
- 14.- Milton T. W; Hearn. Ion-Pair Chromatography. Theory and Biological and Pharmaceutical Applications. Vol 31. 1985. Pag 1-26.
- 15.- Parris N. A. Journal of Chromatography Library. Instrumental Liquid Chromatography. Vol 27. 1984. Pag. 6-21 y 244-249.
- 16.- Nakagaki, M., Koga, N., and Terada. J. Pharm. Soc. Japan, 83, 586 (1963).
- 17.- Robinson, Jhon W. "Normal Phase Liquid Chromatographic Determination Of Sulfamethoxazole In Tablets. J. Assoc off Anal. Chem. 1985, 68(1), 88-91 (Eng).
- 18.- Ross, Robert W. "High-Pressure Liquid Chromatographic Determination Of Sulfisoxazole In Pharmaceuticals And Separation Of Other Sulfonamides". J. Assoc. off Anal. Chem. 1981, 64(4), 851-4 (Eng).
- 19.- Siegal Sidney. Estadística No Paramétrica. Ed. Trillas Pag. 196-201.
- 20.- The Merck Index. Tenth edition, 1983. Merck & Co., INC. U.S.A.
- 21.- Vickerey Thomas M. Liquid Chromatography Detectors. Vol. 23. Pag. 14-18.
- 22.- Alfredson Tom and Sheehan Terry. Recent Developments in Multichannel Photodiode-Array Optical LC Detection. Walnut Creek Instrument Division 2700 Mitchell Drive.
- 23.- Tscherne, R.J. "Stability - Indicating Sulfa Drug Analysis Using High-Performance Liquid Chromatography" J. Pharm. Sci. 1979, 68(7), 922-4 (Eng).
- 24.- U.S Pharmacopeia XXII National Formulary XVII. 1989.
- 25.- Waters 990. Photodiode Array Detector Operator's Manual.
- 26.- Yang, Shio Shiang. "Polymorphism In Sulfonamides". J. Pharm. Sci. 1972, 61(1), 26-40 (Eng).
- 27.- Watson Ian D., Shennkin Alan. "Assay for Trimethoprim in Serum and Urine by Means of Ion-Pair Chromatography". Clinical Chemistry 26 (3) 1980. Pag. 1772-1795.