

Nº 130
2ES.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

OPTIMIZACION Y VALIDACION DE METODOS ANALITICOS
POR CROMATOGRAFIA DE GASES Y CROMATOGRAFIA DE
LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION PARA LA CUANTIFICACION
DE MALEATO DE CLOROFENIRAMINA, CLORHIDRATO DE
FENILPROPANOLAMINA, CAFEINA Y ASPIRINA EN TABLETAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MARIA DE LOS ANGELES DE LOS REYES GARCIA ROJAS

MEXICO, D. F.,

1992

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

I N D I C E

CAPITULO	PAGINA
1. INTRODUCCION	1
2. GENERALIDADES	
2.1. MONOGRAFIAS	4
2.1.1. ACIDO ACETILSALICILICO	4
2.1.2. CAFEINA	7
2.1.3. MALEATO DE CLOROFENIRAMINA	9
2.1.4. CLORHIDRATO DE FENILPROPANOLAMINA	11
2.2. TABLETAS	13
2.3. CROMATOGRAFIA.-FUNDAMENTOS	15
2.3.1. CROMATOGRAFIA DE GASES	27
2.3.2. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS	34
2.4. EVALUACION ESTADISTICA DE RESULTADOS	42
2.5. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS	49
3. PARTE EXPERIMENTAL	
3.1. OPTIMIZACION DE METODOS ANALITICOS	55
3.2. METODO DE TRABAJO	56
3.3. METODO ANALITICO PARA CUANTIFICACION DE ASPIRINA	58
3.3.1. RESULTADOS DE LA REVALIDACION DEL METODO PARA CUANTIFICACION DE ASPIRINA	60
3.4. METODO ANALITICO PARA CUANTIFICACION DE CAFEINA	74
3.4.1. RESULTADOS DE LA VALIDACION DEL METODO PARA CUANTIFICACION DE CAFEINA	76

CAPITULO		PAGINA
3.5.	METODOS ANALITICOS PARA CUANTIFICACION DE MALEATO DE CLORFENIRAMINA Y CLORHIDRATO DE FENILPROPANOLAMINA	94
3.5.1.	RESULTADOS DE LA REVALIDACION DEL METODO PARA CUANTIFICACION DE MALEATO DE CLORFENIRAMINA	97
3.5.2.	RESULTADOS DE LA REVALIDACION DEL METODO PARA CUANTIFICACION DE CLORHIDRATO DE FENILPROPANOLAMINA	108
4.	CONCLUSIONES	119
5.	BIBLIOGRAFIA	120

CAPITULO UNO

INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

Los cambios en formulaciones requieren en el aspecto analítico, asegurar que las técnicas de análisis originalmente empleadas sean válidas para el nuevo producto.

En este trabajo, se presenta la optimización y validación de diferentes técnicas analíticas ya existentes, para cuantificar los principios activos contenidos en unas tabletas antigripales, en las cuales, por reducción de costos, se sustituyó un fármaco, (clorhidrato de fenilefrina) por otro de acción farmacológica similar, (clorhidrato de fenilpropanolamina).

El maleato de clorfeniramina y el clorhidrato de fenilpropanolamina se cuantificaron por cromatografía de gases, haciendo transformaciones ácido-base para obtener ambos principios activos como bases libres. Se utilizó cloroformo como medio de extracción.

La determinación del ácido acetilsalicílico, (AAS), se hizo por cromatografía de líquidos de alta resolución, (CLAR), en fase normal, utilizando un disolvente y una fase móvil de naturaleza orgánica, para evitar en lo posible la hidrólisis de AAS.

La cafeína se cuantificó por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa. Se hizo una extracción directa, utilizando como disolvente y fase móvil una mezcla orgánico/acuosa.

Para validar los métodos analíticos se efectuaron las siguientes determinaciones:

1. Tolerancia, especificidad y linealidad del sistema.
2. Exactitud y reproducibilidad del método.
3. Linealidad y estabilidad de la muestra

Los datos recabados se trataron estadísticamente para demostrar la confiabilidad y reproducibilidad de los métodos, haciéndose análisis de regresión para demostrar la linealidad del sistema y la exactitud del método.

Se efectuaron pruebas de "T" con el fin de establecer los límites de confianza de los porcentajes recuperados y el límite de confianza para la pendiente y la ordenada al origen.

En todas las pruebas se determinó el promedio de las mediciones y el coeficiente de variación entre las mismas, fijándose como límite un coeficiente de variación no mayor del 2%.

Por último, se hicieron análisis de varianza para demostrar que los métodos validados son reproducibles, al comprobarse que no existen diferencias significativas entre diferentes analistas y/o entre los distintos días en que se efectuaron los análisis de las muestras.

CAPITULO DOS

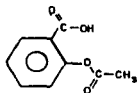
GENERALIDADES

2.1. MONOGRAFÍAS

2.1.1. ACIDO ACETILSALICILICO

Formula condensada: $C_9H_8O_4$.

Estructura:



Cristales blancos, por lo común tabulares, o agujas cristalinas, o polvo blanco, inodoro y estable en el aire seco.

Punto de fusión 135°C .; el fundido solidifica a 118°C .

Ka a 25 grados centígrados: 3.27×10^{-4} (3)

$\text{Pka} = 3.55$ (3)

Absorción en Ultravioleta: (3)

En ácido sulfúrico 0.1N	229 nm	$E_{1\%}^{1\text{cm}} = 484$
En cloroformo	277 nm	$E_{1\%}^{1\text{cm}} = 68$
En ácido tricloroacético	276 nm	$E_{1\%}^{1\text{cm}} = 65.5$

Incompatibilidades: (2)

-Incompatible con la humedad. Se hidroliza descomponiéndose en ácido acético y ácido salicílico.

-Incompatible con medios ácidos.

-Forma una pasta húmeda cuando se tritura con acetanilida, fenacetina, antipirina, aminopirina o fenilsalicilato.

-Se hidroliza al mezclarlo con sales que contienen agua de cristalización.

-Se solubiliza rápidamente en soluciones de citratos o de acetatos alcalinos, pero la solución resultante se hidroliza con mucha rapidez, formando sales de ácido acético y ácido salicílico.

-Se descompone con el agua hirviendo o cuando se disuelve en hidróxidos alcalinos, o en carbonatos, formando como en el caso anterior, sales de ácido acético y ácido salicílico.

Solubilidades: (3)

-En agua a 25 grados centígrados:	1g en 300ml.
-En agua a 37 grados centígrados:	1g en 100ml.
-En alcohol:	1g en 5ml.
-En cloroformo:	1g en 17ml.
-En tetracloruro de carbono:	1g en 1000ml.
-En benceno:	1g en 300ml.
En éter etílico:	1g en 10-15 ml.
-En éter anhidro:	poco soluble.
-En éter de petróleo:	insoluble.

Coefficientes de Partición: (3)

-En amortiguadores de pH 1 y 7:	
K=17.7 en pH 1	K=0.25 en pH=7.
-En tolueno/agua	K=0.32
-En cloroformo/agua	K=1.81

Usos: Analgésico y antipirético.

Métodos de análisis:

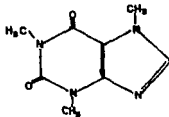
- Titulación por retroceso con hidróxido de sodio 0.5 N y ácido sulfúrico. (4)
- Absorción al UV. (2)
- Análisis colorimétrico por formación de complejos coloridos. (4)
- Cromatografía en capa fina. (3)
- Cromatografía de gases. (3)
- Cromatografía de líquidos de alta resolución. (3,4)
- Cromatografía en columna. (4)

2.1.2. CAFEINA

7

Fórmula condensada: $C_8H_{10}N_4O_2$.

Estructura:



Polvo blanco o agujas brillantes blancas, inodoras y de sabor amargo.

Peso molecular: 194.2

Punto de fusión: 238.0± C, determinado después de secado a 80± C por 4 horas.

Sublima a 178° C.

Pka= 1.

Kb a 19°C: 0.7×10^{-14} ; Ka a 25°C: menor de 1.0×10^{-14} (1)

Absorción al Ultravioleta:

-En etanol: 273 nm $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 519$. (1)

En ácido clorhídrico 0.1N: 277 nm $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 479$. (2)

Incompatibilidades: (1,2)

-Con los yoduros, sales de plata, taninos y con soluciones fuertes de ácidos cáusticos.

No forma sales estables, sus sales de ácidos fuertes se hidrolizan con facilidad en el agua. (1, 2)

Solubilidades:

-En agua: 1g en 46.0 ml.

-En agua a 80°C: 1g en 5.5 ml.

-En agua hirviente: 1g en 1.5 ml.

- En cloroformo: 1g en 5.5 ml.
- En acetona: 1g en 50 ml.
- En éter: 1g en 600 ml.
- En acetato de etilo: soluble.
- En éter de petróleo: ligeramente soluble.
- En ácidos diluidos: soluble.
- En pirrol y tetrahidrofurano con 4% de agua: libremente soluble.
- La solubilidad de la cafeína en agua se reduce al adicionar sacarosa.

Co-solventes: benzoatos alcalinos, cinnamatos o salicilatos.

Datos para extracción: La cafeína es una base débil. se extrae de soluciones acuosas con disolventes orgánicos. (15)

Usos: Estimulante ligero del sistema nervioso central. (11)

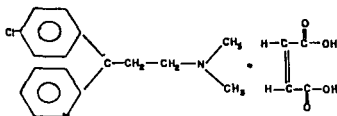
Métodos de análisis:

- Titulación con ácido perclórico. (4, 4)
- Absorción al UV. (2)
- Análisis colorimétrico por formación de complejos coloridos. (3)
- Cromatografía en papel. (5)
- Cromatografía en capa fina. (5)
- Cromatografía de gases. (5)
- Cromatografía de líquidos de alta resolución. (5)

2.1.3. MALEATO DE CLOROFENIRAMINA

Fórmula condensada: $C_{14}H_{19}ClN_2 \cdot C_4H_4O_4$.

Estructuras:



Polvo cristalino, blanco e inodoro; sus soluciones son ácidas al tornasol. (1) (2)

Peso molecular: 390.87

Punto de fusión: entre 130 y 135°C.

$pK_a = 8.9$.

- Una solución al 1% en agua tiene un pH de 4 a 5. (1)

Absorción al Ultravioleta: (2)

-En agua:	261 nm	$E = 5760$	$\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}} = 147.$
-En etanol:			261 nm $E = 5380$
-En hidróxido de sodio en alcohol, 0.1N			265 nm $E = 5630$
-En ácido clorhídrico en alcohol, 0.1N			265 nm $E = 8480$
-En hidróxido de sodio en agua, 1N			262 nm $E = 5770$
-En ácido clorhídrico 1N			265 nm $E = 8390$
-En cloroformo			263 nm $E = 5970$
-En ácido sulfúrico 0.1N	265 nm		$\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}} = 240$

Incompatibilidades: (2)

-Incompatible con cloruro de calcio, adrenalina, ácido tartárico, fenobarbital sódico, sulfato de kanamicina.

-Se ve afectado por la luz.

Solubilidades: (2)

-En agua:	1 mg en	4.0 ml.
-En alcohol:	1 mg en	10.0 ml.
-En cloroformo	1 mg en	10.0 ml.
-En acetona:	1 mg en	2.0 ml.
-En benceno:	1 mg en	60.0 ml.
-En tetracloruro de carbono:	1 mg en	400.0 ml.
-En glicerina:	1 mg en	21.0 ml.
-En metanol:	1 mg en	5.0 ml.
-En éter de petróleo:	1 mg en	1000.0 ml.
-En hidróxido de sodio 0.1N	1 mg en	5 ml.

Coefficiente de partición en agua/cloroformo, pH de 12.5:

$K = 99.6$ (7)

Usos: antihistaminico principalmente. Es uno de los anti-histaminicos más potentes, las dosis orales producen efecto durante 3 a 6 horas. Por lo general, causa sedación ligera.

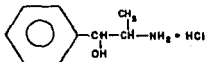
Métodos de análisis:

- Titulación con ácido perclórico. (4)
- Espectrofotometría al UV. (2-4)
- Cromatografía en papel. (4)
- Cromatografía en capa fina. (4)
- Cromatografía de gases. (4)
- Cromatografía de líquidos de alta resolución. (4)

2.1.4. CLORHIDRATO DE FENILPROPANOLAMINA

Fórmula condensada: $C_9H_{14}ClNO$.

Estructura:



Polvo cristalino blanco, con leve olor aromático. (1)

Peso molecular: 187.67

Punto de fusión: 190 -194°C. Punto de fusión de la base libre: 101-105°C.

$pK_a=9.05$; las soluciones acuosas son prácticamente neutras al litmus. (1,2)

Absorción al Ultravioleta: (3)

-En ácido clorhídrico diluido: 285 nm.

-En etanol: 570 nm.

Incompatibilidades: (4)

-Se altera con la luz.

-Se ve afectada por los metales pesados.

Productos de degradación: (5)

Clorhidrato de alfa-aminopropiofenona.

Solubilidades: (6)

-En agua 1 mg en 1.1 ml.

-En etanol: 1 mg en 7.4 ml.

- En cloroformo: 1 mg en 4100.0 ml.
- En éter: insoluble.
- En benceno: insoluble.

Usos: Se utiliza como broncodilatador y descongestionante nasal. Es una amina simpaticomimética, con acción similar a la efedrina, pero es más activa como vasoconstrictor y algo menos activa como estimulante central y broncodilatador. (2)

Métodos de análisis: (2)

- Titulación con ácido perclórico.
- Titulación por retroceso con ácido sulfúrico e hidróxido de sodio.
- Espectrofotometría UV.
- Análisis colorimétrico por formación de complejos coloridos, por ejemplo: reacción con ninhidrina, formación de un complejo con azul de bromotimol, etc.
- Análisis fluorométrico.
- Cromatografía en columna.
- Cromatografía en papel.
- Cromatografía en capa fina.
- Cromatografía de gases.
- Cromatografía de líquidos de alta resolución.

2.2. TABLETAS

Las tabletas son formas farmacéuticas sólidas que contienen dosis individuales de uno o varios fármacos, que se administran junto con excipientes. Se pueden incluir en la formulación, aditivos tales como conservadores, desintegrantes y sustancias para mejorar el aspecto físico, (olor, color, sabor, etc.).⁽⁴⁾

Las tabletas tienen algunas ventajas sobre otras formas farmacéuticas orales. Al fabricante le ofrecen las siguientes: sencillez y economía en la preparación, estabilidad y conveniencia para envasar, transportar y expedir. Las ventajas para el paciente son: exactitud en la dosis, facilidad para llevar en el bolsillo, sabor suave y administración sencilla.⁽²⁾

La calidad de las tabletas se controla mediante diferentes pruebas entre las que se incluyen:

- Variación de peso
- Uniformidad de contenido.
- Dureza.
- Friabilidad.
- Desintegración.

- Disolución.
- Identificación del o los fármacos que contienen.
- Cuantificación de los principios activos.

La forma de hacer las pruebas, y los límites de aceptación o rechazo, deben consultarse en las monografías respectivas del laboratorio fabricante y/o en las Farmacopeas que las autoridades regulatorias acepten como válidas.

2.3. CROMATOGRAFIA FUNDAMENTOS

La cromatografía abarca una gran variedad de técnicas de separación sumamente efectivas. El principio común a todas las técnicas cromatográficas es el siguiente: un fluido (fase móvil) circula a través de una fase estacionaria, sólida o líquida; cuando una mezcla de sustancias se introduce en el sistema, ocurren una serie de equilibrios de distribución entre las dos fases, generalmente de distinta magnitud para cada componente de la mezcla, por lo que cada uno de ellos se desplazará con diferente velocidad a lo largo del sistema. Los componentes de la mezcla deben ser solubles en la fase móvil.

No hay restricciones sobre la naturaleza de las dos fases. La fase estacionaria puede ser sólida o líquida y la fase móvil, líquida o gaseosa. Por consiguiente hay varias combinaciones posibles. (*)

La primera descripción de una cromatografía se le atribuye a Michael Tswett, bioquímico ruso, quien aisló la clorofila de una mezcla de pigmentos vegetales en 1906. Colocó una pequeña muestra en la parte superior de una columna empacada con polvo de carbonato de calcio y en seguida eluyó la muestra con éter de petróleo. A medida que la muestra

descendía por la columna, se iba separando en distintas bandas que se desplazaban a velocidades diferentes. Las bandas tenían colores diversos, debido a la naturaleza de los pigmentos de la muestra, de ahí que del griego *chromatos* (color) y *graphos* (escritura) se le diera el nombre de cromatografía al proceso, aun cuando los colores eran accidentales. Tswett también acuñó el término cromatograma para describir la separación obtenida. En la actualidad, se le da el nombre de cromatograma a la gráfica que se obtiene al separar una mezcla. (2)

MÉTODOS CROMATOGRAFICOS

Los métodos cromatográficos pueden ser clasificados de acuerdo a la naturaleza de las fases estacionaria y móvil. Si la fase estacionaria es un sólido, el proceso se llama cromatografía de adsorción, mientras que si la fase estacionaria es un líquido recibe el nombre de cromatografía de partición.

En la cromatografía de adsorción, la fase móvil que contiene el soluto disuelto pasa sobre la superficie de la fase estacionaria. La retención de los componentes y su consiguiente separación, dependen de la capacidad de los átomos que hay en la superficie para extraer los solutos de la fase móvil y adsorberlos temporalmente por medio de fuerzas electrostáticas. Si la fase móvil es un líquido, el proceso se

llama cromatografía líquido-sólida, pero cuando la fase móvil es un gas, se le denomina cromatografía gas-sólido.

En la cromatografía de partición, un material sólido inerte, tal como gel de sílice o la tierra de diatomeas, sirve para apoyar una capa delgada de líquido que es en realidad la fase estacionaria. A medida que la fase móvil que contiene el soluto pasa muy cerca de esta fase líquida, hay retención y separación debido a la solubilidad relativa de los componentes analizados en los dos líquidos según lo determinan sus coeficientes de partición. Si la fase móvil es un líquido, este tipo de cromatografía de partición se denomina cromatografía líquido-líquido, y si la fase móvil es un gas, el proceso se llama cromatografía gas-líquido.

La cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía por exclusión molecular, son otros dos tipos de cromatografía que no se describen en el presente trabajo, y que pueden consultarse en los manuales y/o textos especializados en cromatografía.

TEORIA DE LA CROMATOGRAFIA

Se han desarrollado dos enfoques teóricos para describir los procesos implicados en el pasaje de solutos a través de un sistema cromatográfico.

El primero de éstos, la "teoría de los platos" basada en

el trabajo de J.P.Martin y R.L.M. Synge, "Cromatografía de Partición", publicado en 1941, considera el sistema cromatográfico como una serie discreta de platos teóricos. En cada uno de éstos hay un equilibrio del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria. El movimiento del soluto se considera como una serie de transferencias paso a paso entre plato y plato.

La segunda teoría, o "teoría de la velocidad", analizada por Giddings en su libro "Dinámica de la Cromatografía", publicado en 1965, considera la dinámica de la partícula de soluto a medida que ésta pasa a través de los espacios ubicados en la fase estacionaria del sistema, al igual que la cinética de estas partículas, a medida que son transferidas hacia la fase estacionaria y desde ella. (2)

CONCEPTO DEL PLATO TEORICO.

Conceptualmente, puede considerarse la cromatografía como similar a los procesos que ocurren en la destilación fraccionada o en la extracción secuencial por disolventes. En la destilación, las mezclas de líquidos son separadas por una serie de pasos que tienen que ver con la vaporización y la condensación posterior. Cada paso implica un equilibrio entre un vapor enriquecido en el componente más volátil y un condensado líquido de la misma composición. A cada equilibrio entre las fases se le llama *plato teórico*, y al tramo de la columna necesario para que se verifique el equilibrio,

se le denomina *altura equivalente de un plato teórico*.

TIEMPO DE RETENCION

Al tiempo que transcurre desde que se deposita la muestra en el sistema cromatográfico hasta el tiempo máximo de elución del soluto se le llama tiempo de retención t_R , y es una función que depende del largo de la columna o fase estacionaria, de la velocidad de la fase móvil, de la afinidad del soluto por la fase estacionaria, y de la temperatura de la columna.

VOLUMEN DE RETENCION

Otro parámetro que se usa para describir el retardo de un soluto es el volumen de retención V_R , que es el volumen de fase móvil requerido para eluir un compuesto en el sistema, y se expresa mediante:

$$V_R = V_M + K V_S$$

Donde: V_M = volumen de la fase móvil en el sistema.

K = coeficiente de partición = C_S/C_M .

V_S = volumen efectivo de la fase estacionaria.

W_i , es el ancho del pico medido en los puntos de inflexión, que están ubicados al 60.7% de la altura total del pico; el ancho en este punto, por lo tanto es de $2s$.

Si se trazan tangentes en los puntos de inflexión extendiéndolas hasta la línea base, y se mide la distancia que existe entre ellas, se obtiene el ancho del pico, W_b , que es igual a $4s$.

El ancho del pico medido al 50% de su altura total es W_h y corresponde a $2.354s$.

Otras dos características importantes de un pico cromatográfico son el área y la altura. El área del pico es el área bajo la curva, desde el punto en que ésta deja la línea base, hasta el punto en donde vuelve a ella, y es proporcional a la concentración del soluto.

La altura se mide en el máximo del pico, por lo tanto, corresponde a la mayor concentración en la zona. En este punto de altura máximo se miden los tiempos y volúmenes de retención.

CALCULO DEL NUMERO DE PLATOS TEORICOS

Un parámetro que se utiliza comunmente para evaluar la eficiencia de un sistema cromatográfico es N , el número de platos teóricos. Una manera sencilla de calcular N , es la siguiente:

$$N=16 (t_R/W_b)^2 \quad y/o$$

$$N=5.545 (t_R/W_h)^2$$

Donde: t_R = tiempo de retención.
 W_b = ancho del pico medido en su base.
 W_h = ancho del pico medido al 50% de su altura total

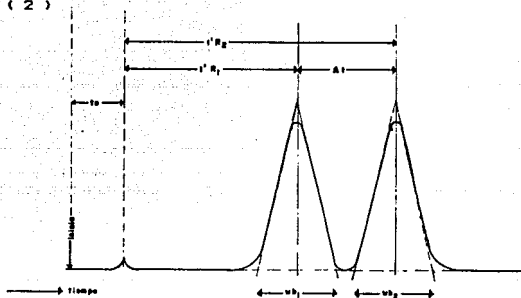
Este parámetro puede ser evaluado fácilmente en cualquier cromatograma. Estas dos expresiones son equivalentes desde el punto de vista matemático, la primera se utiliza con mayor frecuencia; sin embargo, la segunda es particularmente útil para picos no ideales de forma asimétrica.

Un sistema con un número mayor de platos teóricos producirá un pico más estrecho, y por lo tanto será capaz de separar muestras más complejas.

SEPARACION Y RESOLUCION

En cromatografía se analizan por lo general mezclas con multicomponentes, por lo que la separación individual de las sustancias es de gran importancia. En la figura 2, se muestra un cromatograma con tres picos, el primero corresponde a un componente no retenido por la columna y los otros dos a picos adyacentes perfectamente separados, cuya separación puede ser expresada de dos maneras diferentes, como factor de separación, α , o como resolución, R_s .

Fig. (2)



El factor de separación o factor de selectividad describe la posición relativa de dos picos adyacentes y puede expresarse como:

$$\alpha = \frac{(tr_2 - t_m)}{(tr_1 - t_m)} = \frac{(Vr_2 - V_m)}{(Vr_1 - V_m)}$$

Donde: tr_2 = tiempo de retención del componente que eluye en segundo término.

tr_1 = tiempo de retención del componente eluido en primer término.

t_m = tiempo transcurrido desde el momento de la inyección, hasta el máximo del pico del componente o componentes no retenidos.

Vr_2 = Volumen de retención del componente 2.

Vr_1 = Volumen de retención del componente 1.

V_m = Volumen de la fase móvil.

El factor de resolución, R_s , que como su nombre lo indica, da el grado de resolución entre dos picos, se expresa por:

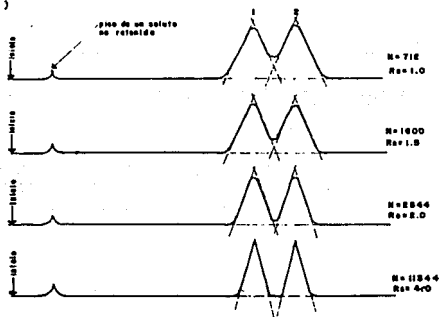
$$R_s = \frac{2(tr_2 - tr_1)}{(Wb_1 + Wb_2)}$$

En la figura 3, se muestra una tabla con diferentes valores de R_s . En ella se observa cómo, el número de platos teóricos influye en la eficiencia de la columna y en la resolución de los picos. El primer cromatograma muestra dos picos adyacentes del mismo tamaño. Su factor de resolución es de 1, y la columna donde se llevó a cabo la separación, un valor de $N = 712$. Los picos no están bien separados, existe una contaminación del 4% en cada componente, debida a la superposición de uno en el otro.

En el segundo cromatograma se tiene un valor de $R_s = 1.5$ con $N = 1600$, la separación se ha llevado a cabo en un 90%. En el siguiente cromatograma, se observa que los picos están perfectamente separados, su factor de resolución es de 2, debido a que el número de platos teóricos de la columna donde se separaron es de 2844. Se considera que hay una separación adecuada cuando se obtienen valores de R_s de 2 ó mayores. Por último, tenemos un cromatograma con un valor de $R_s = 4.0$ y $N = 11344$, la separación es buena, pero algunas

veces, un número tan elevado de platos teóricos, hace que los tiempos de retención se alarguen más de lo conveniente (10)

Figura (3)



VELOCIDAD DE LA FASE MOVIL Y SU INFLUENCIA EN LA SEPARACION.

La velocidad de la fase móvil tiene gran influencia en el proceso de separación, por ejemplo: si la velocidad de flujo es baja, las moléculas de la muestra a separar estarán mucho tiempo en la fase móvil, y los componentes se difunden a lo largo de la fase estacionaria, dando como resultado picos muy anchos y "coleados", con un factor de resolución bajo. Si la velocidad de flujo es muy rápida, las moléculas del soluto no tienen tiempo suficiente para interactuar con todos los sitios activos de la fase estacionaria, el coeficiente de partición disminuye, y por lo tanto no ocurre

la separación, o ésta es muy pobre.

La velocidad de flujo de la fase móvil se determina ,mg
diante la expresión:

$$u = L/t_m$$

Donde: u = velocidad lineal de la fase móvil, dada en cm/seg.
 L = longitud de la columna.
 t_m = tiempo transcurrido desde el momento de la inyección hasta la altura máxima del pico del disolvente.

2.3.1. CROMATOGRAFIA DE BASES

La cromatografía de gases es una técnica analítica que se utiliza para separar, identificar y cuantificar componentes de mezclas de sustancias que vaporicen a temperaturas comprendidas en un rango que va desde temperaturas menores a los cero grados, hasta los 450 grados centígrados, y mezclas de compuestos que al calentarse produzcan una presión de vapor de aproximadamente 30 mm de mercurio, sin alterarse o descomponerse. La separación en cromatografía de gases, se basa en la diferencia de velocidades de migración de los componentes de la mezcla, al ser arrastrados por un gas inerte a través de un tubo empacado con un material sólido, con características particulares. (1)

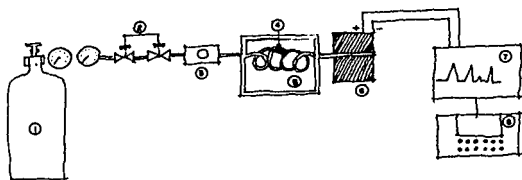
Existen dos modalidades en la cromatografía de gases, la cromatografía gas-sólido y la cromatografía gas-líquido. En la primera, la fase estacionaria es un material adsorbente de tipo sólido, y las partículas del soluto son extraídas mediante fuerzas electrostáticas. En la cromatografía gas-líquido, por lo general, la fase estacionaria es una capa delgada de líquido que recubre la superficie de partículas por lo general inertes. En este tipo de cromatografía la separación se lleva a cabo debido a los coeficientes de partición de los solutos entre la fase estacionaria y el gas de la fase móvil. (2)

USOS DE LA CROMATOGRAFIA DE GASES.

La cromatografía de gases tiene infinidad de aplicaciones en la industria en general, su campo no se limita al ramo farmacéutico. Se mencionan sólo algunas de sus aplicaciones: separación y cuantificación de derivados del petróleo, aceites esenciales, perfumes, sabores, sustancias de origen biológico, insecticidas, ácidos grasos, etc., etc.

Las separaciones cromatográficas por medio de gases se llevan a cabo en el aparato llamado cromatógrafo de gases, mismo que a continuación se ilustra y se explica en sus partes más importantes. Se harán comentarios sobre algunas de ellas. (*)

Fig. (5) Esquema elemental de un cromatógrafo de gases:



- 1) Fuente del gas portador; 2) regulador de presión o flujo; 3) sistema de inyección de la muestra; 4) columna separadora; 5) horno; 6) sistema de detección; 7) registrador; 8) integrador.

FASE ESTACIONARIA

Para la cromatografía gas-sólido, las columnas se empaquetan con un material sólido sin recubrir. Para la cromatografía gas-líquido, se llena el interior de la columna con un material sólido revestido de una capa delgada de fase líquida. El tamaño de partícula en ambos casos es de 80 a 120 mallas, con el fin de reducir el volumen de exclusión y proveer una gran superficie de contacto para interaccionar con los solutos. El volumen de exclusión es el volumen total de espacio intersticial entre las partículas. También existen columnas capilares que no llevan empaque. (2)

En la cromatografía gas-sólido los adsorbentes que se utilizan más frecuentemente son: carbón activado, gel de sílice, alúmina y perlas de vidrio. Para la cromatografía gas-líquido el material de soporte más usual es la tierra de diatomeas purificada y calcinada. La fase líquida recubre de modo uniforme a las partículas del soporte sólido. La cantidad de fase líquida generalmente es de 1 a 5% del peso del soporte sólido.

Una buena fase líquida debe cumplir con los siguientes requisitos: 1) no debe ser volátil; su presión de vapor debe ser menor de 0.1 torr a la temperatura a la que se va a usar 2) debe ser termoestable; 3) debe dar valores de K adecuados a los componentes que se van a separar; 4) preferiblemente debe ser un solo compuesto puro de peso molecular conocido

y con características semejantes a las sustancias que se van a separar; y 5) debe ser inerte respecto a los solutos, y si reacciona con ellos debe hacerlo rápidamente y en forma reversible. (2)

DETECTOR.

Es un dispositivo que permite medir cualquier cambio de composición del gas acarreador, generando una señal eléctrica cada vez que se modifica la composición del gas acarreador por la presencia de concentraciones muy pequeñas de la sustancia a analizar. (2. 11)

Existen diferentes tipos de detectores, los más comunes son: conductividad térmica, ionización de flama, captura de electrones, fotometría de flama (emisión de llama) y termoiónico o de llama alcalina. No existe un detector universal, ya que tendría que llenar todos los requisitos siguientes: bajo límite de detección, respuesta lineal en límites extremos de concentración, respuesta uniforme a todas las sustancias posibles, calibración sencilla, tiempo de respuesta corto, volumen interno pequeño, escaso ruido y estabilidad prolongada; además, debe ser sencillo, barato, resistente y seguro al operar.

La elección del detector debe hacerse teniendo en cuenta

las características de la mezcla que se desea analizar. En los manuales de cromatografía se pueden consultar tablas que ayudan a seleccionar el detector más conveniente.

REGISTRADOR-INTEGRADOR

Consiste en un sistema electrónico de amplificación y medida de la señal eléctrica enviada por el detector. Esta señal se registra en una gráfica. En la actualidad, la mayoría de los registradores están conectados a un computador que mide directamente el área de los picos y muestra su valor en forma numérica en la misma gráfica del registrador. Esto simplifica mucho los cálculos en el análisis cuantitativo. (*)

ANALISIS CUANTITATIVO.

Existen muchos métodos para determinar la concentración de una sustancia por cromatografía de gases. En general, todos los métodos coinciden en medir de forma cuantitativa la respuesta del detector a una cantidad de masa por unidad de tiempo. Los métodos para estimar la concentración se basan en la medición de la altura del pico o de su área. El área de cada pico puede ser estimada por métodos manuales o electrónicos. Dependiendo de la disponibilidad de instrumentos manuales o electrónicos, será el grado de precisión que se obtenga en el análisis. Los métodos más importantes para calcular la concentración en forma cuantitativa son los siguientes: normalización de área, estandarización externa y estandarización interna. El último, es el que se empleó en el presente trabajo, por lo que a continuación nos referiremos brevemente a él. (11, 12)

ANALISIS CUANTITATIVO POR ESTANDARIZACION INTERNA.

Es el método más preciso para análisis cuantitativo. Permite calcular concentraciones absolutas, compensar en forma cuantitativa las diferencias en la respuesta del detector cuando se trabaja en rango lineal. Las variaciones en la cantidad de muestra inyectada no afectan el resultado, y la calibración se lleva a cabo con los compuestos de interés.

Para llevar a cabo este método, es indispensable agregar a la muestra una concentración conocida de un compuesto al que se le da el nombre de estándar interno, que deberá seleccionarse tomando en cuenta los siguientes requisitos: estructura y concentración similar al compuesto que se desea cuantificar, buena resolución y elución cercana a los picos de interés, en una zona que no presente interferencias por ningún compuesto de la mezcla. ⁽¹¹⁾ ⁽¹²⁾

Para cuantificar la sustancia o sustancias de interés, es necesario preparar una mezcla de estándares analíticos a la que se le añade una cantidad de estándar interno igual a la que se le adicionó al problema. Con las áreas obtenidas en los cromatogramas de estos estándares, se calcula un factor de respuesta, contra el que se comparan las áreas de la sustancia problema. ⁽¹²⁾

2.3.2. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS

La cromatografía de líquidos es una de las técnicas más versátiles de las que disponen los analistas debido a su sencillez y capacidad para obtener separaciones de alta resolución. Se pueden desarrollar separaciones con base en características tan diversas como la polaridad de los solutos, su naturaleza iónica, su peso molecular, sus coeficientes de partición o su capacidad para formar complejos de afinidad. (2)

El término cromatografía líquida, o cromatografía de líquidos se usa en la actualidad para referirse a aquellos procesos en los que la separación tiene lugar dentro de una columna empacada. El material de empaque es la fase estacionaria, y puede ser un sólido, o un sólido inerte revestido de una delgada capa líquida. Como eluyente se utiliza una fase móvil que siempre es un líquido.

El proceso de cromatografía líquida puede realizarse por medio de dos métodos. El primero, llamado cromatografía de columna abierta, es el procedimiento clásico ideado por Tswett. La fase móvil se deja fluir a través de la columna empacada, por la acción de la gravedad, o por una presión relativamente baja, por ejemplo de 50 a 100 psi. En el segundo método, las columnas se empacan con materiales que tienen un tamaño de partícula de 10 micrometros o menos, por

lo que las columnas quedan empacadas más compactamente, desarrollando así retropresiones altas que es necesario vencer, bombeando la fase móvil a través de la columna por medio de una presión elevada, (de 1000 a 3000 psi). Este método recibe el nombre de "Cromatografía Líquida de Alta Resolución", o "Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento", cuyas iniciales CLAR, usaremos en lo sucesivo al referirnos a éste tipo de cromatografía.

Ya sea que se empleen métodos de CLAR o de columna abierta, el proceso de separación depende principalmente de la naturaleza de las fases móvil y estacionaria y de las características del compuesto a separar. Debido a ello, se han desarrollado cuatro modalidades de cromatografía de líquidos, que son: cromatografía de adsorción, de partición, de intercambio iónico y cromatografía por exclusión de tamaño.

En la tabla No. 1, se explica de manera breve, el mecanismo de las diferentes modalidades de cromatografía, y el tipo de moléculas que separa cada una.

TABLA No. 1 TIPOS DE CROMATOGRAFIA EN HPLC

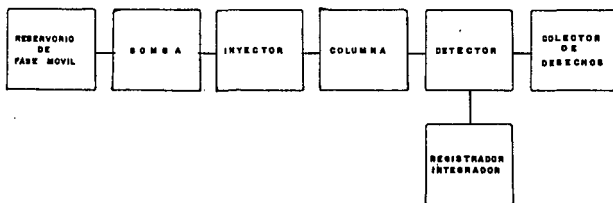
	TIPO DE SEPARACION	MECANISMO	MOLECULAS QUE SE SEPARAN (algunos ejemplos)	SOLVENTES UTILIZADOS (algunos ejemplos)
	Cromatografía de exclusión	Separa moléculas por tamaños. Las más grandes eluyen primero.	Desde proteínas y Carbohidratos hasta metacrilatos y neopreno.	Tolueno Dioxano Acetona, H ₂ O
FASE NORMAL	Cromatografía líquido-sólido	Adsorción.- Separa en base a polaridad. La menos polar eluye primero.	Hidrocarburos y aromáticos isómeros y compuestos no polares.	Orgánicos no ionizables (hexano)
	Cromatografía líquido-líquido (Bonded-Phase)	Partición del soluto entre 2 solventes inmiscibles. "Fase estacionaria más polar".	Monosacáridos, Catecolaminas y aromáticos.	Polar no polar (Agua-acetonitrilo).
	Cromatografía líquido-líquido (fase reversa)	Partición del soluto entre 2 solventes inmiscibles. "Fase móvil más polar".	Herbicidas, Acidos grasos.	Agua con modificadores orgánicos. (Metanol)
	Cromatografía por intercambio iónico.	Iones de la muestra se intercambian con un contra-ión.	Aminoácidos Nucleótidos	Diversos Buffers orgánicos.

INSTRUMENTACION.

CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

Debido a las presiones relativamente altas que son necesarias para realizar este tipo de cromatografía, se requiere de equipo más complejo. En la figura 12, se muestra el diagrama de bloques de un aparato completo de CLAR. (2. 10)

Figura (12)



Como se puede observar, los componentes básicos de este sistema son:

1. Reservorios de fase móvil. Estos son recipientes de vidrio o de acero inoxidable que contienen la fase móvil.
2. Bomba para impeler la fase móvil.
3. Inyector, para introducir la muestra al sistema.
4. Columna que contiene la fase estacionaria.
5. Detector para determinar los componentes de una mezcla.

6. Registrador integrado a un equipo de cómputo. Dibuja los cromatogramas y calcula el área o la altura de los picos.
7. Colector de desechos, que consiste en un recipiente donde pueden depositarse los componentes ya separados, o los desechos.

A continuación se harán comentarios sobre algunas de estas partes.

LA COLUMNA

En la columna analítica tiene lugar la separación. Es un tubo de acero inoxidable, por lo general de 7.5 a 30 cm de largo, con un diámetro interior de 2 a 4.6 mm. Contiene a la fase estacionaria.

LA FASE ESTACIONARIA

La separación en la cromatografía de líquidos se lleva a cabo a través de interacciones entre la muestra, la fase móvil y la fase estacionaria.

La fase estacionaria puede ser un material sólido poroso como el que se utiliza en las cromatografías por adsorción, intercambio iónico y exclusión de tamaño, con algunas diferencias en composición, estructura y tamaño de partícula. Otra posibilidad es el uso de una fase estacionaria líquida

que recubre la superficie de las partículas de un soporte sólido tal como se hace en cromatografía de gases.

La mayoría de las columnas empacadas para la cromatografía de partición tienen una fase estacionaria unida químicamente a las partículas del soporte. En todos los manuales y/o textos de cromatografía pueden consultarse tablas para seleccionar el tipo de columna y la fase móvil más adecuadas de acuerdo con las características de los compuestos a separar. (2. 10)

LA FASE MOVIL.

Con excepción de la cromatografía por exclusión de tamaño, la fase móvil es parte activa en un sistema de cromatografía líquida, a diferencia de la fase móvil de la cromatografía de gases, donde ésta no participa en el proceso de separación. Debido a esto, la selección de una fase móvil apropiada es una de las partes más importantes en una separación por CLAR. (2. 10)

La selección de los líquidos a usar en una fase móvil depende de varios factores. En las cromatografías de adsorción y de partición, la polaridad tiene un papel importante, la viscosidad y algunas otras características que pueden influir en la función del detector, como por ejemplo la absorción que presentan al UV., índice de refracción, etc.,

también son importantes. En la cromatografía de intercambio iónico, la fuerza iónica (pH), es importante, en tanto que en la cromatografía por exclusión de tamaño lo que más importa es la solubilidad de la muestra en la fase móvil.

En la cromatografía líquida puede usarse una sola sustancia como fase móvil, o una mezcla de dos o más. También se puede mantener la proporción de los componentes durante todo el proceso de separación, o modificarlos gradualmente. A la primera modalidad se le da el nombre de operación isocrática y a la segunda, elución por gradiente. (2. 10)

CONTROL DEL FLUJO DE LA FASE MOVIL.

En CLAR, frecuentemente es necesario variar la velocidad de flujo: un flujo rápido aumenta la velocidad del paso de la muestra a través del sistema, al mismo tiempo que aumenta la presión, sin embargo, esto no favorece la difusión de la muestra dentro de la columna, ni facilita la separación, pues la presión no es un parámetro pasivo. A presiones altas se dificulta la inyección de la muestra y la eficiencia es baja debido a que el líquido se vuelve más denso y la velocidad de transferencia de masa se reduce. Por estas causas, se seleccionan velocidades de flujo relativamente bajas, ya que la eficiencia de la separación se incrementa conforme el flujo decrece. Las velocidades de flujo clásicas van de 1 a

2 ml/min, en columnas de 2 a 5 mm de diámetro interno. (10)

DETECTORES.

El instrumento más frecuentemente utilizado en CLAR como detector, es un espectrofotómetro ultravioleta-visible con una celda de flujo de pequeño volumen (8 microlitros). Existen detectores con longitud de onda fija y con longitud de onda variable, los más sencillos se fijan a 254 nm, dado que la mayoría de los compuestos orgánicos aromáticos absorben a esta longitud de onda o por lo menos cerca de ella. También existen modelos de longitud de onda fija a 280 nm, que es donde absorben los péptidos, o a 214 nm donde lo hacen las dobles ligaduras aisladas como el grupo carbonilo. Los detectores de onda fija tienen las ventajas de ser de bajo costo y alta sensibilidad, siendo capaces de detectar algunos compuestos en el orden de nanogramos. La sensibilidad puede aumentarse usando un detector de longitud de onda variable, dado que puede colocarse en el punto exacto de la máxima absorptividad del soluto. También hay modelos más elaborados que son capaces de recorrer todo el espectro UV durante la elución de un pico, para determinar si hay más de una sustancia que coeluye.

Un detector mucho más sensible pero de menor aplicación, es el espectrómetro fluorescente. Se pueden lograr sensibilidades del orden de los picogramos con los compuestos que po-

seen fluorescencia natural o que pueden convertirse en fluorescentes mediante la derivación.⁽²⁾

ANALISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO.

Como en cualquier método cromatográfico, el análisis cualitativo (identificación de picos), se hace principalmente con el auxilio de los tiempos de retención, comparando los tiempos obtenidos en el análisis de un compuesto, contra los de estándares conocidos y analizados en condiciones idénticas a la muestra. Esto no siempre es suficiente y se debe tratar de identificar a los componentes de un problema por medio de otros métodos de análisis.

Debido a la posibilidad de interferencias, es recomendable hacer análisis en blanco de los disolventes y de todas las sustancias que se utilizan al preparar una muestra, con el fin de determinar si tales reactivos introducen o no contaminantes indeseados en el análisis cromatográfico.⁽¹⁰⁾

El análisis cuantitativo, como ya se explicó en cromatografía de gases, se basa en los valores de las áreas de los picos. Los métodos de calibración y los cálculos son exactamente iguales a los explicados en esa sección.

2.4. EVALUACION ESTADISTICA DE RESULTADOS

Cualquier método de análisis químico cuantitativo involucra tomar una muestra, analizarla y hacer inferencias acerca de ella con base en los datos contenidos en el análisis. El analista por lo general hace este trabajo más de una vez y considera el promedio de sus determinaciones como el resultado final. (13)

Existen dos criterios importantes para evaluar cualquier análisis, el primero es la exactitud y el segundo es la precisión.

La exactitud se define como el grado de dispersión de los datos alrededor del valor verdadero, en tanto que la precisión es una medida de la reproducibilidad. La exactitud de las mediciones depende del analista, del método seleccionado y de la calibración del material y equipo. La precisión refleja la calidad de la instrumentación y el trabajo del analista.

Tanto la exactitud como la precisión se evalúan por métodos estadísticos. En estadística, se expresa el grado de precisión y exactitud mediante la desviación estándar relativa o coeficiente de variación y se calcula del modo siguiente:

$$s = \sqrt{\frac{\sum x_i - \bar{x}}{n-1}}$$

Donde: s = desviación estándar.
 n = número de mediciones.
 x_i = valores individuales.
 \bar{x} = promedio de valores individuales.

$$\text{C.V.} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

El análisis de regresión lineal, y el análisis de varianza, son otros dos métodos estadísticos que se utilizan en la validación de métodos analíticos.

ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL

Para saber si los valores obtenidos en un determinado experimento siguen un comportamiento lineal, se efectúa una serie de pruebas a cuyo conjunto se le denomina "Análisis de Regresión". (14. 15)

En primer lugar se traza una gráfica con valores muestrales sobre un plano x y, (datos pareados). Si los puntos se hallan cerca de una línea recta, se supone que las variables tienen una relación lineal. La recta se puede

ajustar visualmente, pero éste método es subjetivo y puede acarrear más error. Para obtener una recta que se aproxime en realidad al comportamiento de los datos se usa un método denominado "método de mínimos cuadrados", desarrollado por Gauss. Este método consiste en encontrar mediante transformaciones matemáticas, una recta que se ajuste a los puntos dados de manera que la suma de los cuadrados de las distancias de éstos puntos hasta la recta sea mínima. La distancia se mide en dirección vertical. (13. 14)

La ecuación general de la línea recta es la siguiente:

$$y = a + bx$$

Donde: a = ordenada al origen.
b = pendiente de la recta.

La ordenada al origen en una recta hipotética perfecta debe ser igual a 0 y la pendiente igual a uno.

La ecuación de la recta de regresión es:

$$y - \bar{y} = a + (x - \bar{x})$$

donde: \bar{x} y \bar{y} son las medias de los valores x y y de la muestra, y la pendiente de la recta está dada por la fórmula:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i}{\sum_{i=1}^n x_i^2}$$

Otro parámetro importante en el análisis de regresión es el coeficiente de correlación r , el cual nos da la medida de la relación entre las variables x y y . El valor de r en una recta hipotética perfecta con pendiente positiva, debe ser igual a 1.

El coeficiente de correlación r se puede definir como:

$$r = \frac{n \sum x_i y_i - (\sum x_i)(\sum y_i)}{(\sqrt{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2})(\sqrt{n \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2})}$$

Como es casi imposible que el comportamiento de los datos en un experimento determinado sea el de una línea recta perfecta, se hacen pruebas de t , para calcular los intervalos de confianza para la ordenada al origen a , para la pendiente b , y para el coeficiente de correlación r , y comprobar de ésta manera que sus valores son significativamente iguales a 0, 1 y 1 respectivamente.⁽¹⁷⁾

La fórmula general para calcular un intervalo de confianza es la siguiente:

estimador \pm (factor de confiabilidad)(error estándar)

Donde: estimador= cantidad o cifra sobre la cual se establecerá el límite de confianza.

factor de confiabilidad= factor tomado de tablas estadísticas, que depende del tipo de prueba que se desea hacer.

error estándar= error estándar calculado con los datos del experimento.

Los análisis de regresión y correlación son medios estadísticos muy poderosos cuando son bien empleados, sin embargo su uso inapropiado puede conducir a resultados sin sentido. La ecuación de regresión no debe usarse para predecir o estimar fuera del intervalo de valores ensayados, el comportamiento de la variable independiente. Hacer cualquier extrapolación tiene riesgos, pues fuera del intervalo probado suele suceder que el comportamiento no sea lineal. (17)

ANÁLISIS DE VARIANZA

El análisis de varianza es una técnica de análisis estadístico mediante la cual, la variación total presente en un conjunto de datos se distribuye en varios componentes. Con cada componente se asocia una fuente específica de variación de modo que en el análisis es posible averiguar la magnitud

de las contribuciones de cada una de estas fuentes a la variación total. El análisis de varianza tiene su aplicación más amplia en el análisis de los datos obtenidos a partir de experimentos. (14. 10)

El análisis de varianza consiste en la obtención de dos estimaciones independientes de la varianza, una con base en la variabilidad entre grupos, (varianza entre grupos) y otra en la variabilidad dentro de grupos, (varianza dentro del grupo). La significación de la diferencia entre estas dos estimaciones de varianza está proporcionada por las distribuciones de Fisher. Si la varianza entre grupos es grande en relación con la varianza de grupos, el cociente F es grande, por lo tanto, si la varianza entre grupos es pequeña con respecto a la varianza dentro de grupos, el cociente F será pequeño.

Un concepto básico en el análisis de varianza es la suma de cuadrados; la cual se calcula con la siguiente fórmula:

$$SC = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}$$

Con esta fórmula se calcula la suma de cuadrados total, la suma de cuadrados dentro de grupos, la suma de cuadrados entre grupos y la suma de cuadrados del error estimado. Con los resultados obtenidos se construye una tabla comparativa

llamada "Tabla ANDEVA", que se describirá en el Capítulo 3.

En el presente trabajo, el análisis de varianza se utilizó para establecer las fuentes de variación existentes en la prueba de Reproducibilidad del Método, y el modelo hipotético que se siguió es el que se describe a continuación: (19)

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \delta_{ij} + \epsilon_{kij}$$

Donde: Y_{ijk} = ensayo de la sustancia de interés de la késima muestra analizada por el iésimo analista en el jésimo día.

μ = media poblacional del ensayo de la sustancia de interés en la muestra.

α_i = efecto del analista en el ensayo (donde $i = 1 \dots a$).

δ_{ij} = efecto del día anidado en el analista (donde $j = 1 \dots d$).

ϵ_{kij} = error el método analítico (donde $k = 1 \dots r$).

a = número de analistas = 2.

d = número de días = 2.

r = número de replicaciones = 3.

La forma de hacer los cálculos se puede consultar en la "Guía Oficial de Validación de Métodos Analíticos", publicada por la Secretaría de Salud y el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, en julio de 1991. (19)

2.5. VALIDACION Y REVALIDACION DE METODOS ANALITICOS

La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. (19. 20. 21)

La forma de validar un método analítico depende de la aplicación que se le vaya a dar, ya sea para control de calidad, estudios de estabilidad, o análisis de procesos; de los requerimientos gubernamentales, y desde luego, del criterio del analista. (19. 20. 21)

Para validar un método es necesario efectuar una serie de pruebas con el fin de determinar su efectividad. Estas pruebas incluyen evaluaciones estadísticas de la precisión, linealidad, exactitud y especificidad y proporciona una medida del comportamiento del método. (19)

Los parámetros a validar son los siguientes:

LINEARIDAD DEL SISTEMA

La linealidad del sistema consiste en demostrar que los resultados analíticos obtenidos en esta prueba, (que pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación

matemática bien definida), son proporcionales a la concentración de la sustancia de interés, dentro de un intervalo determinado:

El intervalo de un método analítico es la diferencia existente entre el nivel superior e inferior de cuando menos cinco diluciones preparadas a partir de una solución patrón. La dilución del punto central deberá ser igual al 100% de la cantidad teórica a cuantificar por el método.

Esta prueba se determina construyendo una curva de calibración graficando concentración vs respuesta medida, de cada uno de los intervalos. Cada punto de la gráfica representa el resultado promedio de dos análisis cuando menos.

PRECISION DEL SISTEMA.

La precisión del sistema es la concordancia entre los resultados analíticos obtenidos en una serie de ensayos. La prueba se lleva a cabo preparando una solución estándar del activo, que contenga el 100% de la cantidad que se usa en el análisis normal, y se analiza seis veces por lo menos. Usualmente se expresa en términos de Desviación Estándar o del Coeficiente de Variación. (19)

ESPECIFICIDAD

Es la capacidad que tiene un sistema para detectar el principio, o principios activos de interés, aún en presencia de productos de degradación o excipientes. Se determina analizando muestras de placebos y de producto terminado sometidas a condiciones extremas de almacenaje con el fin de degradarlas. Se analizan con el método propuesto y se verifica que los productos de degradación y/o sustancias relacionadas no interfieran con la cuantificación de la sustancia de interés. (17)

TOLERANCIA DEL SISTEMA

Esta prueba trata de demostrar hasta qué punto el sistema elegido es capaz de generar resultados confiables cuando se analiza una muestra modificando las condiciones normales de operación, por ejemplo: variación de la temperatura y de la velocidad de flujo del gas acarreador en un análisis por cromatografía de gases. En un análisis por cromatografía de líquidos: empleo de columnas con diferente número de platos teóricos, variación del pH de la fase móvil, y/o su proporción, velocidad de flujo de la misma, etc.

LINEARIDAD DE LA MUESTRA

El objetivo de esta prueba, es demostrar que el método analítico no afecta a la confiabilidad de los resultados cuando varía el tamaño de la muestra en un rango que puede ir del 60 al 140% de la cantidad de muestra propuesta para el análisis, usualmente en intervalos de 20% de diferencia. En el punto intermedio de tal rango, debe situarse el 100% de la cantidad teórica. Para efectuar esta demostración, se preparan una serie de muestras de producto terminado, a las que se les da el tratamiento propuesto en el método a validar. Se calcula el % de recuperación en cada uno de los niveles, y el coeficiente de variación.

EXACTITUD DEL METODO

Esta prueba recibe también los nombres de "Linealidad del Método" o "Efecto Placebo", tiene como objetivo demostrar la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y un valor de referencia.

Para hacer esta prueba, se prepara una serie de muestras con un placebo del medicamento, al que se le agregan 60, 80, 120 y 140% del principio activo de interés, simulando una falta o exceso del mismo en el fármaco.

La exactitud del método se evalúa mediante un análisis de regresión, graficando miligramos adicionados contra miligramos recuperados. Deberá obtenerse una respuesta lineal. Se hacen además pruebas de t , para establecer los límites de confianza del porcentaje recuperado. Se calcula también el coeficiente de variación existente entre las diferentes recuperaciones. (17)

PRECISION DEL METODO

Esta prueba recibe también el nombre de Reproducibilidad del Método. Su objetivo es demostrar que la variación entre diferentes determinaciones es mínima, y que el método validado puede ser utilizado por cualquier químico, siempre que se sigan las condiciones en él establecidas. En esta prueba se califican la reproducibilidad y la repetibilidad.

La repetibilidad es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones, (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc). (17)

La reproducibilidad es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes, (diferentes analistas, en distintos días, en el mismo y/o

diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc).⁽¹⁹⁾

La prueba se lleva a cabo haciendo seis análisis procedentes de seis pesadas diferentes, de un mismo lote de producto terminado. Estos análisis se hacen por dos químicos distintos en dos días diferentes, siendo en total 12 muestras. Los resultados se evalúan estadísticamente por medio del análisis de varianza cuyos límites se establecen de antemano.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Como no siempre es posible efectuar el análisis de una muestra el mismo día que se prepara, es necesario establecer el lapso durante el cual se conservan sus propiedades físico químicas y la concentración del principio activo. Para determinar, se prepara una serie de muestras utilizando el método validado, se analizan el día de la preparación, almacenándose después durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas, y se analizan de nuevo al terminar el periodo de almacenamiento que se establezca.⁽¹⁹⁾

CAPITULO TRES

PARTE EXPERIMENTAL

3.1. OPTIMIZACION DE METODOS ANALITICOS

La optimización de un método analítico consiste en mejorar un método ya existente con el fin de obtener un mayor rendimiento del equipo analítico, mejorar el porcentaje de recuperación, disminuir el gasto de reactivos y acortar el tiempo de realización del análisis.

Los métodos analíticos para cuantificar los principios activos contenidos en las tabletas antigripales reformuladas que dieron origen al presente trabajo, ya estaban establecidos y validados por lo que solo fue necesario hacer pequeñas modificaciones tales como ajuste en los pesos de las muestras, disminución de los tiempos de agitación entre cada extracción, y ajuste en la concentración de los estándares internos.

3.2. METODO DE TRABAJO

Para validar los métodos analíticos se siguieron los lineamientos descritos en el capítulo 2, inciso 5: "Validación de Métodos Analíticos".

Los métodos para cuantificación de ácido acetilsalicílico, maleato de clorfeniramina y clorhidrato de fenilprop-nolamina se revalidaron, ya que no hubo cambio en el sistema cromatográfico. Los parámetros incluidos fueron: especificidad del sistema, exactitud y precisión del método, linealidad y estabilidad de la muestra. (19)

El método analítico para cuantificación de cafeína se validó totalmente.

En todos los casos la cuantificación de los principios activos se efectuó por el método de estandarización interna. A continuación se da un ejemplo general de cálculo:

Factor de respuesta, K:

$$K = \frac{\text{Area Std.An}}{\text{Area St.Int}} \times \frac{\text{peso Std. Int.}}{\text{Vol.dil.ST.I.}} \times \frac{\text{ml.Std.Int.}}{\text{Vol.final}} \times \frac{\text{Vol.Dil.S.An}}{\text{Peso Std.An.}}$$

$$\times \frac{\text{Vol final}}{\text{ml.Std.An}} = \frac{\text{Area Std.An.}}{\text{Area St.Int.}} \times \frac{\text{peso Std.Int.}}{\text{peso Std.An.}} \times \text{factor dil.}$$

Cuantificación de activos:

$$\text{mg/tableta} = \frac{I}{K} \times \frac{\text{Área activo}}{\text{Área St.Int}} \times \frac{\text{peso Std.Int.}}{\text{vol.dil.St.I.}} \times \frac{\text{ml.Std.Int.}}{\text{vol. final}}$$

× $\frac{\text{Volumen final}}{\text{peso de muestra}}$ × peso promedio de tabletas.

Los límites de aceptación o rechazo de todos los parámetros, son los establecidos por la Guía Oficial de Validación de Métodos Analíticos editado por la Secretaría de Salud y el Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos. (4)

3.3. METODO ANALITICO PARA CUANTIFICACION DEL
ACIDO ACETIL SALICILICO, (AAS).

SISTEMA CROMATOGRAFICO:

Instrumento: cromatógrafo de líquidos Waters, com-
puesto por las siguientes partes:
Bomba No. 510 (operación isocrática)
Inyector automático WISP 710, Detec-
tor UV/VIS 440/441, Integrador No.
746.

Columna: Microporasil, (acero inoxidable, de
30 cm x 3.9 mm de diámetro interno,
empacada con sílica de 10 micras de
diámetro).

Fase móvil: ácido acético glacial al 4% en hepta-
no.

Velocidad de flujo: 2.5 ml/min.

Detector: Ultravioleta, a 254 nm.

Velocidad de carta: 0.25 cm/min.

Estándar Interno: Fenol, en concentración de 5 mg/ml.

Medio de disolución de la muestra: ácido acético glacial/clg
reformo, en proporción de 1:10.

Volumen de inyección: 10 microlitros.

Tiempos de retención aproximados:

Acido salicílico	5 minutos.
Fenol	11 minutos.
AAS	13 minutos.

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Una cantidad de polvo de tabletas equivalente a 163 mg de AAS, se disuelve en 10 ml de la mezcla de cloroformo/ácido acético. Se agregan 0.6ml de ácido fórmico, se agita manualmente y se le adicionan 10 ml de la solución de estándar interno, se agita en vórtex, se centrifuga y se inyectan al cromatógrafo alícuotas del sobrenadante.

3.3.1. RESULTADOS DE LA REVALIDACION DEL METODO PARA CUANTIFICACION DE ASPIRINA.

ESPECIFICIDAD DEL METODO

Para determinar la especificidad del método, se preparó e inyectó en el cromatógrafo la siguiente serie de muestras:

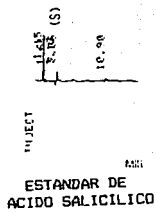
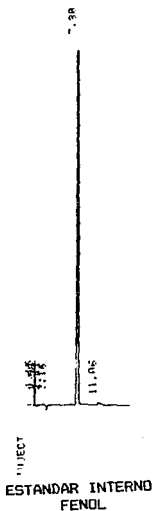
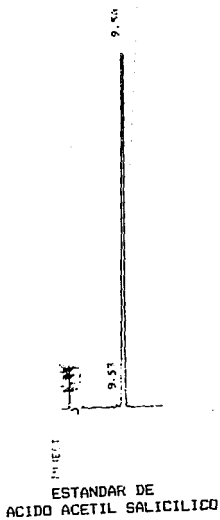
- Estándar interno (fenol), en concentración de 5 mg/ml.
- Estándar de aspirina, en concentración de 8 mg/ml.
- Estándar de ácido salicílico, en concentración de 24mcg/ml.
- Mezcla de estándar de AAS y estándar interno.
- Producto terminado a temperatura ambiente, (TA), con y sin estándar interno.
- Producto terminado a 70°C* sin estándar interno.
- Placebo total a T.A. y 70°C.*
- Placebo de aspirina a T.A. Y 70°C.*

El estándar de ácido salicílico se inyectó con el fin de identificar la presencia de este producto de degradación del AAS en el producto terminado.

* Todos los placebos y un lote de producto terminado, se sometieron a 70°C durante 15 días, con el fin de obtener sus productos de degradación.

En las páginas siguientes se muestran los cromatogramas correspondientes.

ACIDO ACETILSALICILICO
ESPECIFICIDAD DEL METODO
CROMATOGRAMAS

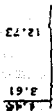


INJECT
FACTOR RESPUESTA
AAS/FENOL



INJECT
FACTOR RESPUESTA
ACIDO SALICILICO/FENOL

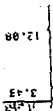




INJECT

PLACERO TOTAL
70°C. DURANTE 15 DIAS

93



INJECT

PLACERO DE AAS
70°C. DURANTE 15 DIAS

29



INJECT

PRODUCTO TERMINADO, 70°C
SIN ESTANDAR INTERNO



INJECT

PRODUCTO TERMINADO, T.A.
CON ESTANDAR INTERNO



INJECT

PRODUCTO TERMINADO, T.A.
SIN ESTANDAR INTERNO

CONCLUSIONES

El método es específico, no se encontraron picos que interfieran con alguno de los estándares o con el principio activo.

EXACTITUD DEL METODO

Criterios de aceptación: promedio de recobros de 98 a 102% y coeficiente de variación no mayor de 2.0%. La recta obtenida al graficar cantidades adicionadas vs cantidades recuperadas debe tener una pendiente significativamente igual a 1, ordenada al origen significativamente igual a 0 y coeficiente de correlación no menor de 0.98. (17)

RESULTADOS

% DE NIVEL ENSAYADO	% DE RECUPERACION
60	101.07
80	101.96
100	100.86
120	100.52
140	100.35
	\bar{x} 100.95
Coefficiente de variación	0.62%

Intervalo de confianza para el % recuperado:

$$IC = [100.17, 101.73]$$

Datos del análisis de regresión:

Ordenada al origen, $b = 0.11917$

Pendiente, $m = 0.99379$

Coefficiente de correlación, $r = 0.9995$

Intervalo de confianza para la pendiente:

$IC_m = [0.98388, 1.00370]$, el intervalo contiene al 1.0.

Intervalo de confianza para la ordenada al origen:

ICb = $[-0.02336, 0.21499]$, el intervalo contiene al 0.0).

CONCLUSIONES

El método es exacto, cumple con los criterios de aceptación.

LINEARIDAD DE LA MUESTRA

Criterio de aceptación: promedio de recuperación de 90 a 110% de la cantidad teórica contenida en las tabletas y coeficiente de variación no mayor de 2.0%. (19)

RESULTADOS

% DEL NIVEL DE PROCEDIMIENTO	% DE A.A.S. RECUPERADO
60	102.81
80	102.93
100	102.23
120	101.62
140	102.60
	\bar{x} 102.44
Coefficiente de variación	0.52%

Intervalo de confianza para el % recuperado:

$$IC = [101.78, 103.10]$$

CONCLUSIONES

La variación del tamaño de la muestra no afecta a la confiabilidad de los resultados. Se cumple con los criterios de aceptación.

PRECISION DEL METODO (REPRODUCIBILIDAD)

El criterio de aceptación establecido para esta prueba en métodos cromatográficos, es de un coeficiente de variación no mayor del 2.0%. (19)

RESULTADOS

	NUMERO DE MUESTRA	% DE RECUPERACION	
		QUIMICO 1	QUIMICO 2
DIA 1	1	101.94	101.67
	2	102.93	102.24
	3	103.79	102.53
DIA 2	4	101.11	101.80
	5	101.85	102.60
	6	102.51	102.54
TOTALES	6	614.13	613.38
MEDIA TOTAL		102.30	
Coefficiente de variación total		0.68%	

CONCLUSIONES

El método es reproducible, se cumple con el criterio de aceptación.

ANALISIS DE VARIANZA

TABLA ANDEVA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F 0.05*
Analista	(a-1)	SC a	SCa/qla	Mca/Mce	qla/qld
Dia	(d-1)a	SC d	SCd/qld	Mcd/Mce	qld/gle
Error	ad(r-1)	Sc e	Sc e/ql e		

Totales

a= analistas
 d= días
 r= número de repeticiones
 e= error calculado
 ql= grados de libertad

*F_{0.05}.- Los valores de 0.05 se obtienen de la tabla de F de Fisher, localizando en el cruce del valor de los grados de libertad del numerador horizontalmente, y el valor de los grados de libertad del denominador verticalmente, para una

$$\alpha = 0.05. (**. **)$$

RESULTADOS

TABLA ANDEVA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F 0.05
Analista	(2-1)=1	0.0469	0.0469	0.1080	18.51
Dia	(2-1)2=2	1.7376	0.8688	2.0000	4.46
Error	(2*2)(3-1)=8	3.4751	0.4344		
<u>Total</u>	<u>11</u>	<u>5.2596</u>			

INTERPRETACION DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

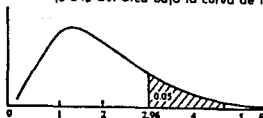
H₀: Si la F calculada es menor que la F de tablas, el método es reproducible.

Como puede verse en la tabla ANDEVA, la F calculada es menor que la F de tablas, no existen diferencias significativas entre analistas ni entre los resultados obtenidos en los diferentes días, por lo que se concluye que el método es reproducible.

NOTA: El análisis de varianza no es requisito mínimo dentro de una validación, solamente se realiza si se desean establecer las fuentes de variación de un método. (19)

Tabla 2.

Valores de F para el 5% de probabilidad superior
[o 5% del área bajo la curva de la distribución F]



Ejemplo.
 D_1 (grados de libertad para el numerador de la razón F) = 5,
 D_2 (grados de libertad para el denominador) = 14.
 El extremo arriba de $F = 2.96$ representa 0.05 o 5% del área bajo la curva.

D_1	1	2	3	4	5	6	7	8	10	12
1	161	200	216	223	230	234	237	239	242	244
2	18.21	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.36	19.37	19.39	19.41
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.88	8.84	8.78	8.74
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	5.96	5.91
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.74	4.68
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.06	4.00
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.63	3.57
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.34	3.28
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	2.97	2.91
12	4.75	3.88	3.49	3.26	3.11	3.00	2.92	2.85	2.76	2.69
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.77	2.70	2.60	2.53
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.49	2.42
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.52	2.45	2.35	2.28
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.43	2.36	2.26	2.18
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.34	2.27	2.16	2.09
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.07	2.00
50	4.03	3.18	2.79	2.56	2.40	2.29	2.20	2.13	2.02	1.95
100	3.94	3.09	2.70	2.46	2.30	2.19	2.10	2.03	1.92	1.85
200	3.89	3.04	2.65	2.41	2.26	2.14	2.05	1.98	1.87	1.80
∞	3.84	2.99	2.60	2.37	2.21	2.09	2.01	1.94	1.83	1.75

D_1	14	16	20	24	30	40	50	100	200	∞
1	245	246	248	249	250	251	252	253	254	254
2	19.42	19.43	19.44	19.45	19.46	19.47	19.47	19.49	19.49	19.50
3	8.71	8.69	8.66	8.64	8.62	8.60	8.58	8.56	8.54	8.53
4	5.87	5.84	5.80	5.77	5.74	5.71	5.70	5.66	5.65	5.63
5	4.64	4.60	4.56	4.53	4.50	4.46	4.44	4.40	4.38	4.36
6	3.96	3.92	3.87	3.84	3.81	3.77	3.75	3.71	3.69	3.67
7	3.52	3.49	3.44	3.41	3.38	3.34	3.32	3.28	3.25	3.23
8	3.23	3.20	3.15	3.12	3.08	3.05	3.03	2.98	2.96	2.93
10	2.86	2.82	2.77	2.74	2.70	2.67	2.64	2.59	2.56	2.54
12	2.64	2.60	2.54	2.50	2.46	2.42	2.40	2.35	2.32	2.30
14	2.48	2.44	2.39	2.35	2.31	2.27	2.24	2.19	2.16	2.13
16	2.37	2.33	2.28	2.24	2.20	2.16	2.13	2.07	2.04	2.01
20	2.23	2.18	2.12	2.06	2.04	1.99	1.96	1.90	1.87	1.84
24	2.13	2.09	2.02	1.98	1.94	1.89	1.86	1.80	1.76	1.73
30	2.04	1.99	1.93	1.89	1.84	1.79	1.76	1.69	1.66	1.62
40	1.95	1.90	1.84	1.79	1.74	1.69	1.66	1.59	1.55	1.51
50	1.90	1.85	1.78	1.74	1.69	1.63	1.60	1.52	1.48	1.44
100	1.79	1.75	1.68	1.63	1.57	1.51	1.48	1.39	1.34	1.28
200	1.74	1.69	1.62	1.57	1.52	1.45	1.42	1.32	1.26	1.19
∞	1.69	1.64	1.57	1.52	1.46	1.40	1.35	1.24	1.17	1.00

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Criterio de aceptación para ésta prueba: diferencia no mayor del 2.0% entre la media de la muestra y la media de la muestra del análisis inicial. (4*)

Para determinar la estabilidad de la muestra, se preparó una serie de seis muestras de producto terminado, las cuales se almacenaron a temperatura ambiente y a 5° C, analizándose el día de su preparación y en el segundo y cuarto días posteriores.

Debido a la inestabilidad de la aspirina en medio ácido, hubo necesidad de preparar estándares cada uno de los días en que se inyectaron las muestras, con el fin de cuantificar correctamente la degradación de la aspirina y/o la aparición de ácido salicílico.

Solo se analizaron las muestras almacenadas a temperatura ambiente, ya que si son estables en éstas condiciones, con mayor razón lo serán si se mantienen en refrigeración.

RESULTADOS

MUESTRAS ALMACENADAS A TEMPERATURA AMBIENTE

% DE A.A.S.

NUMERO DE MUESTRA	ANALISIS INICIAL	2 DIAS	4 DIAS
1	101.85	101.27	100.08
2	102.51	101.62	100.54
3	103.12	101.76	100.88
4	101.67	103.53	101.75
5	101.97	102.77	101.04
6	102.53	103.81	101.90
MEDIA	102.28	102.46	101.03
Coefficiente de variación	0.53%	1.04%	0.69%
Diferencias		+0.18%	-1.22%

CONCLUSIONES

Las muestras son estables hasta 4 días después de su preparación, cuando son almacenadas a temperatura ambiente.

3.4. METODO ANALITICO PARA CUANTIFICACION DE CAFEINA**SISTEMA CROMATOGRAFICO**

Instrumento: cromatógrafo de líquidos Hewlett
Packard modelo 4851.

Columna: Microbondapack C18, acero inoxidable
30 cm x 3.9mm de diámetro interno.

Detector: Ultravioleta, a 254 nm.

Fase móvil: metanol/ácido acético al 1%, en pro-
porción de 28:72.

Velocidad de flujo: 1.5ml/min.

Estándar interno: fenacetina, en concentración de 200
microgramos por mililitro.

Volumen de inyección: 5 microlitros.

Tiempos de retención aproximados:

-Cafeína	7 minutos.
-A.A.S.	10 minutos.
-Acido salicílico	12 minutos.
-Fenacetina	14 minutos.

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Una cantidad de polvo de tabletas equivalente a 30 miligramos de cafeína se disuelve en 30 ml de la fase móvil y se agita en baño ultrasónico durante 30 minutos; se lleva a un volumen de 50 ml y se filtra a través de papel filtro Whatman No. 4, desechándose los primeros 10 a 15 ml. Se toman 5 ml de filtrado, se colocan en un tubo de ensayo; se agregan 5 ml de estándar interno, se agita un poco para mezclar, y se inyectan al cromatógrafo alícuotas de 5 microlitros.

3.4.1. RESULTADOS DE LA VALIDACION DEL METODO ANALITICO PARA CUANTIFICACION DE CAFEINA

ESPECIFICIDAD DEL METODO

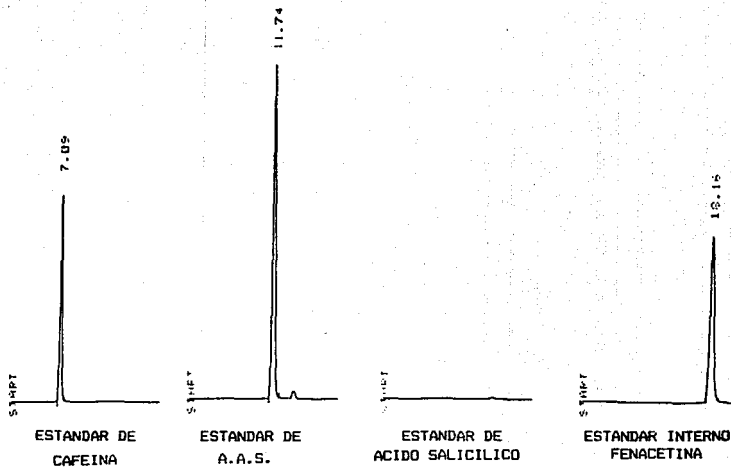
Se prepararon e inyectaron al cromatógrafo las siguientes muestras:

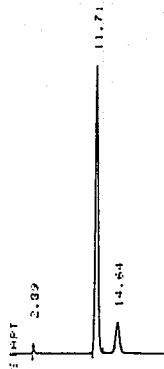
- Estándar de cafeina, en concentración de 600 mcg/ml.
- Estándar de A.A.S., en concentración de 8 mg/ml.
- Estándar interno (fenacetina), en concentración de 200 microgramos por mililitro.
- Estándar de ácido salicílico, en concentración de 60 mcg/ml
- Placebo de cafeina, a T.A. y 70° C.
- Placebo de cafeina y A.A.S., a T.A. y 70° C.
- Placebo total a T.A. y 70° C.
- Producto terminado a T.A. con y sin estándar interno.
- Producto terminado a 70° C sin estándar interno.

Los estándares de aspirina y ácido salicílico se inyectan con fines de identificación, debido a que el sistema los detecta. Este método no se recomienda para la cuantificación de A.A.S., ya que el medio de disolución la hidroliza, y por lo tanto aumenta la presencia de ácido salicílico.

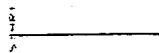
En las páginas siguientes se muestran los cromatogramas correspondientes.

CAFEINA
ESPECIFICIDAD DEL METODO
CROMATOGRAMAS

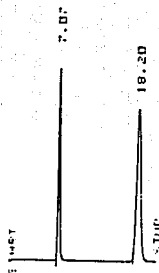




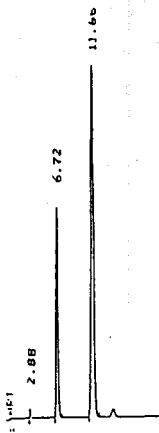
PLACEBO DE CAFEINA
70°C, 15 DIAS



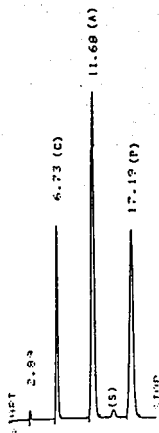
PLACEBO TOTAL
70°C, 15 DIAS



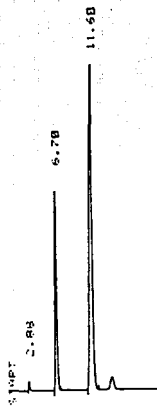
FACTOR RESPUESTA
CAFEINA-FENACETINA



PRODUCTO TERMINADO, T.A.
SIN ESTANDAR INTERNO



PRODUCTO TERMINADO, T.A.
CON ESTANDAR INTERNO



PRODUCTO TERMINADO, 70°C
SIN ESTANDAR INTERNO

CONCLUSIONES

El método es específico para la cafeína en las condiciones del ensayo. El método no detecta picos que interfieran con los de la cafeína y de la fenacetina.

TOLERANCIA DEL SISTEMA

Criterio de aceptación: se considera aceptable un factor de resolución mayor de 2.0. (10)

RESULTADOS

PARAMETROS PROPORCIÓN DE FASE MOVIL METANOL:ACIDO ACETICO	FACTOR DE RESOLUCION	
	C/A	S/F
25:75	7.9	4.2
28:72*	8.1	3.1
30:70	9.1	1.5
NUMERO DE PLATOS TEORICOS		
1910	3.3	2.3
4564*	8.1	3.1
4491	9.7	3.0
VEL. DE FLUJO, (ML/MIN)		
1.0	9.8	3.6
1.5*	8.1	3.1
2.0	8.1	2.5

*= Condiciones óptimas.

C= Cafeína.

A= Aspirina.

S= Acido salicilico.

F= Fenacetina.

CONCLUSIONES

El método es tolerante a cambios en la velocidad de flujo de ± 0.5 ml/min.: es posible utilizar columnas con un

minimo de 1910 platos teóricos y el método acepta una disminución de metanol en el rango estudiado, más no un aumento.

Las condiciones óptimas del sistema son las marcadas con asterisco, ya que además de obtenerse buena resolución, los tiempos de retención son adecuados.

LINEARIDAD DEL SISTEMA

Criterio de aceptación: coeficiente de correlación no menor de 0.99. (10)

Para determinar éste parámetro, se construyó una curva de calibración, graficando concentración vs respuesta medida, utilizando 5 diluciones preparadas a partir de una solución patrón de cafeína.

RESULTADOS

% DE NIVEL ENSAYADO	CONCENTRACION (MG/ML)	RESPUESTA MEDIDA (RELACION DE AREAS)
60	0.1811	0.31075
80	0.2414	0.41836
100	0.3018	0.51433
120	0.3622	0.62908
140	0.4225	0.72533

Datos del análisis de regresión:

$$y = mx + b$$

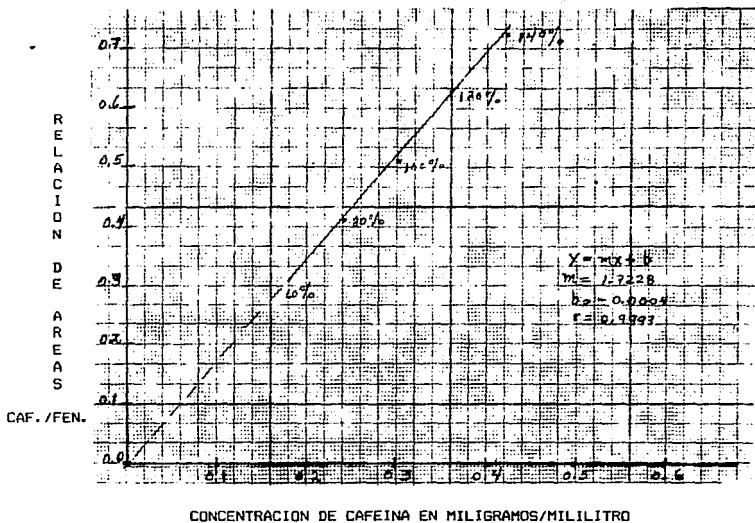
Pendiente, $m = 1.7228$

Ordenada al origen, $b = -0.0004$

Coefficiente de correlación, $r = 0.9997$

En la página siguiente se muestra la gráfica correspondiente.

CAFEINA
LINEARIDAD DEL SISTEMA



CONCLUSIONES

El sistema origina una respuesta lineal, se cumple con el criterio de aceptación establecido.

PRECISION DEL SISTEMA

Criterio de aceptación: coeficiente de variación menor o igual a 1.5%. (**)

RESULTADOS

NUMERO DE INYECCION	FACTOR DE RESPUESTA (K)
1	0.34928
2	0.35513
3	0.34964
4	0.34708
5	0.34965
6	0.35123

\bar{K} 0.35034

Coeficiente de variación 0.77%

$$K = \frac{\text{AREA CAFEINA}}{\text{AREA FENACETINA}} \times \frac{\text{CONCENTRACION FENACETINA}}{\text{CONCENTRACION CAFEINA}}$$

CONCLUSIONES

El coeficiente de variación obtenido, es menor que el coeficiente de variación establecido. Se cumple con el criterio de aceptación para la precisión del sistema.

EXACTITUD DEL METODO

Criterio de aceptación: promedio de recobro de 98 a 102% y coeficiente de variación no mayor de 2.0%. La recta obtenida al graficar cantidades adicionadas vs cantidades recuperadas, deberá tener una pendiente significativamente igual a 1, ordenada al origen significativamente igual a 0 y coeficiente de correlación no menor de 0.98. (17)

RESULTADOS

% DE NIVEL ENSAYADO	% DE RECUPERACION
60	100.78
80	102.11
100	100.01
120	100.10
140	101.89
	\bar{x} 101.00
Coefficiente de variación	0.95%

Intervalo de confianza para el % recuperado:

$$IC = [99.81, 102.19]$$

Datos del análisis de regresión:

Pendiente, $m = 1.01467$

Ordenada al origen, $b = -0.00138$

Coefficiente de correlación, $r = 0.9995$

Intervalo de confianza para la pendiente, m :

$$IC_m = [0.99000, 1.04160], \text{ el intervalo incluye al } 1.0.$$

Intervalo de confianza para la ordenada al origen, b:
ICb = $[-0.01109, 0.00833]$, el intervalo incluye al 0.0.

CONCLUSIONES

El método es exacto, se cumplen los criterios de aceptación.

LINEARIDAD DE LA MUESTRA

Criterio de aceptación: promedio de recobro entre 90 y 110% de la cantidad teórica contenida en las tabletas, y un coeficiente de variación no mayor de 2.0%. «19»

RESULTADOS

% DEL NIVEL DE PROCEDIMIENTO	% DE CAFEINA RECUPERADA
60	96.89
80	96.66
100	97.73
120	97.29
140	97.77
	\bar{x} 97.27
Coefficiente de variación	0.51%

Intervalo de confianza para el % recuperado:

$$IC = [97.05, 97.49]$$

CONCLUSIONES

El tamaño de la muestra no afecta a la confiabilidad de los resultados, ya que se cumple con los criterios de aceptación.

PRECISION DEL METODO (REPRODUCIBILIDAD)

Criterio de aceptación: coeficiente de variación no mayor de 2.0%. (**)

RESULTADOS

	NUMERO DE MUESTRA	% DE RECUPERACION	
		QUIMICO 1	QUIMICO 2
DIA 1	1	96.98	98.89
	2	97.01	97.48
	3	97.72	96.95
DIA 2	4	97.69	96.56
	5	97.59	96.15
	6	97.10	96.79
TOTALES	6	584.09	582.82
MEDIA		97.24	
Coeficiente de variación		0.72%	

CONCLUSIONES

El método es reproducible, cumple con el criterio de aceptación.

ANALISIS DE VARIANZA

TABLA ANDEVA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F 0.05*
Analista	(2-1)=1	0.1344	0.1344	0.3880	18.51
Día	(2-1)2=2	2.5069	1.2535	3.6186	4.46
Error	(2*2)(3-1)=8	2.7713	0.3464		
Total	11	5.4126			

*F0.05.- Valores obtenidos en la tabla de F de Fisher, localizando el cruce del valor de los grados de libertad del numerador horizontalmente, y el valor de los grados de libertad del denominador verticalmente, para una $\alpha = 0.05$. (ver tabla No. 2).

INTERPRETACION DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Ho: Si la F calculada es menor que la F de tablas (F0.05), el método es reproducible.

La F calculada es menor que la F de tablas, por lo que se concluye que el método es reproducible. No hay diferencias significativas ni entre analistas ni entre días.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Criterio de aceptación para métodos cromatográficos: diferencia no mayor de 2.0% entre la media de la muestra y la media de la muestra inicial. (10)

Se prepararon 6 muestras de un lote de producto terminado, las cuales se conservaron durante cinco días a temperatura ambiente y en refrigeración. Las muestras se analizaron el día de su preparación y al tercero y quinto días posteriores.

RESULTADOS

MUESTRAS ALMACENADAS A TEMPERATURA AMBIENTE

NUMERO DE MUESTRA	% D E C A F E I N A	
	ANALISIS INICIAL	5 DIAS A T.A.
1	96.98	97.75
2	97.01	97.61
3	97.72	97.59
4	97.69	98.33
5	97.57	97.94
6	97.10	97.07
\bar{x}	97.35	97.72
Coeficiente de variación	0.36%	0.43%
Diferencias		+ 0.38%

CONCLUSIONES

Las muestras son estables al menos durante 5 días a temperatura ambiente.

3.5. METODOS PARA CUANTIFICACION DE MALEATO DE CLOROFENIRAMINA Y CLORHIDRATO DE FENILPROPANOLAMINA

Los métodos para cuantificación del maleato de clorfeniramina y del clorhidrato de fenilpropanolamina son similares, debido a que ambos fármacos tienen propiedades semejantes. Los métodos analíticos difieren tan sólo en el peso de la muestra y la temperatura de la columna, por éstas razones, describiremos solamente una vez el sistema cromatográfico y el tratamiento de la muestra, dándose por separado los resultados correspondientes a cada activo, ya que las revalidaciones se hicieron en forma independiente.

SISTEMA CROMATOGRAFICO:

Instrumento: cromatógrafo de gases Hewlett Packard, modelo 5880 A.

Columna: de vidrio, de 6 pies de largo x 2mm de diámetro interno, empacada con Chromosorb WHP 100/120, recubierto con 1.2% de Carbowax 20M y 0.5% de hidróxido de potasio.

Gas acarreador: nitrógeno.

Velocidad de flujo: 30 ml/min.

Detector: ionización de flama

Temperatura de la columna: 155° C para el clorhidrato de fenilpropanolamina y 200° C para el maleato de clorofeniramina.

Temperatura del detector: 250° C en los dos casos.

Temperatura del inyector: 250° C en los dos casos.

Estándares internos: Para maleato de clorofeniramina: maleato de bromofeniramina en concentración de 70 microgramos por mililitro; y para clorhidrato de fenilpropanolamina: sulfato de pseudoefedrina, en concentración de 200 microgramos por mililitro.

Tiempos de retención aproximados:

a) Columna a 155° C:

-Fenilpropanolamina 6 minutos.

-Pseudoefedrina 5 minutos.

b) Columna a 200° C:

-Clorofeniramina 4 minutos.

-Bromofeniramina 6 minutos.

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Una cantidad de polvo de tabletas equivalente a 1 mg de maleato de clorofeniramina, o a 25 mg de clorhidrato de fenilpropanolamina (según el caso), se disuelve en 5 ml de

Ácido clorhídrico 0.1N, quedando la solución con pH de 1. Se agregan 5.0 ml del estándar interno correspondiente y se dispersa la muestra con ayuda de un vórtax. Se agregan 5 mililitros de cloroformo, se agita de nuevo en vórtax y se centrifuga. La fase clorofórmica se extrae y se desecha. A la fase acuosa se le añade 1 ml de hidróxido de sodio al 50% con el fin de cambiar el pH a 13, y se hacen 3 extracciones sucesivas con porciones de cloroformo de 10, 10 y 4 ml respectivamente. Los extractos clorofórmicos se depositan en un matraz aforado de 25 ml, llevándose a volumen con cloroformo.

Se inyectan al cromatógrafo alícuotas de 3 microlitros en los dos casos.

3.5.1. RESULTADOS DE LA REVALIDACION DEL METODO PARA CUANTIFICACION DE MALEATO DE CLOROFENIRAMINA.

ESPECIFICIDAD DEL METODO

Se inyectaron al cromatógrafo las siguientes muestras:

- Estándar de maleato de clorofeniramina, en concentración de 40 microgramos por mililitro.
- Estándar de maleato de bromofeniramina, en concentración de 70 microgramos por mililitro.
- Mezcla de estándares de maleato de clorofeniramina y maleato de bromofeniramina.
- Estándar de cafeína, en concentración de 1.2 mg/ml.
- Placebo de maleato de clorofeniramina, a T.A. y 70° C.
- Placebo total a T.A. y 70° C:
- Producto terminado con y sin estándar interno a T.A.
- Producto terminado sin estándar interno a T.A. y 70° C.

El estándar de cafeína se inyectó con fines de identificación, pues el sistema detecta una fracción de ésta sustancia, que debido a su naturaleza de base débil, es extraída junto con el maleato de clorofeniramina.

En las páginas siguientes se muestran los cromatogramas correspondientes.

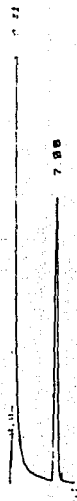
MALEATO DE CLOROFENIRAMINA
ESPECIFICIDAD DEL METODO
CROMATOGRAFAS



MALEATO DE CLOROFENIRAMINA
ESTANDAR DE REFERENCIA

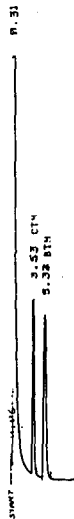


MALEATO DE BROMOFENIRAMINA
ESTANDAR INTERNO



ESTANDAR DE CAFEINA

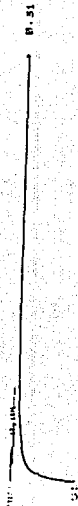
FACTOR RESPUESTA



PLACEBO DE MALEATO DE
CLOROFENIRAMINA, A 70°C
DURANTE 15 DIAS



PLACEBO TOTAL
70°C DURANTE 15 DIAS

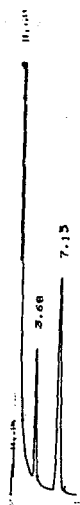




PRODUCTO TERMINADO, T.A.
SIN ESTANDAR INTERNO



PRODUCTO TERMINADO, T.A.
CON ESTANDAR INTERNO



PRODUCTO TERMINADO, 70°C
SIN ESTANDAR INTERNO

CONCLUSIONES

El método es específico para el maleato de clorofeniramina en las condiciones del ensayo. El sistema no detecta picos que interfieran con los del maleato de clorofeniramina o del estándar interno.

EXACTITUD DEL METODO

Criterio de aceptación: promedio de recobro de 98 a 102% y coeficiente de variación no mayor del 2.0%. La recta obtenida al graficar cantidades adicionadas vs cantidades recuperadas, deberá tener una pendiente significativamente igual a 1, ordenada al origen significativamente igual a 0 y un coeficiente de correlación no menor de 0.98. (19)

RESULTADOS

% DE NIVEL ENSAYADO	% DE RECUPERACION
60	99.41
80	100.79
100	100.74
120	99.63
140	99.54
	\bar{x} 100.02
Coeficiente de variación	0.68%

Intervalo de confianza para el % recuperado:

$$IC = [99.17, 100.87]$$

Datos del análisis de regresión:

Pendiente, $m = 0.99226$

Ordenada al origen, $b = 0.00033$

Coeficiente de correlación, $r = 0.9998$

Intervalo de confianza para la pendiente, m :

$IC_m = [0.97722, 1.00730]$, el intervalo incluye al 1.0.

Intervalo de confianza para la ordenada al origen, b:
ICb = $[-0.00047, 0.00113]$, el intervalo incluye al 0.0.

CONCLUSIONES

El método es exacto. Se cumple con los criterios de aceptación.

LINEARIDAD DE LA MUESTRA

Criterios de aceptación: promedio de recobro de 90 a 110% de la cantidad teórica contenida en las tabletas, y coeficiente de variación no mayor de 2.0%. (*)

RESULTADOS

% DEL NIVEL DE PROCEDIMIENTO	% DE CLOROFENIRAMINA RECUPERADA
60	94.24
80	94.38
100	94.03
120	95.23
140	95.04
	\bar{x} 94.58
Coefficiente de variación	0.55%

Intervalo de confianza para el % recuperado:

$$IC = [93.93, 95.23]$$

CONCLUSIONES

El tamaño de la muestra no afecta a la confiabilidad de los resultados, ya que se cumple con el criterio de aceptación.

PRECISION DEL METODO (REPRODUCIBILIDAD)

Criterio de aceptación: coeficiente de variación total no mayor de 2.0%. (**)

RESULTADOS

	NUMERO DE MUESTRA	% DE RECUPERACION	
		QUIMICO 1	QUIMICO 2
DIA 1	1	94.08	95.36
	2	92.33	95.78
	3	94.81	96.40
DIA 2	4	92.90	95.79
	5	93.38	96.40
	6	97.52	96.70
TOTALES	6	565.02	576.43
Promedio		95.12	
Coeficiente de variación total		1.72%	

CONCLUSIONES

El método es reproducible, cumple con el criterio de aceptación.

ANALISIS DE VARIANZA

TABLA ANDEVA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F 0.05*
Analista	(2-1)=1	10.8490	10.8490	5.0663	18.51
Dia	(2-1)2=2	12.2622	6.1311	2.8631	4.46
Error	(2*2)(3-1)=8	17.1309	2.1414		
Totales	11	40.2421			

*F0.05.- Valores obtenidos de la tabla F de Fisher, localizando el cruce del valor de los grados de libertad del numerador horizontalmente, y el valor de los grados de libertad del denominador verticalmente, para una $\alpha=0.05$, (ver tabla No. 2). (**)

INTERPRETACION DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

H₀: Si la F calculada es menor que la F_{0.05}, el método es reproducible.

La F calculada es menor que la F de tablas, por lo que se concluye que el método es reproducible. No existen diferencias significativas ni entre analistas ni entre días.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Criterio de aceptación para métodos cromatograficos: la diferencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial, no debe ser mayor del 2.0%. (1*)

Las muestras se conservaron a temperatura ambiente y 5°C durante 7 días. Se analizaron el día de su preparación y el 3º y 5º días posteriores.

RESULTADOS

NUMERO DE MUESTRA	% DE MALEATO DE CLOROFENIRAMINA			
	ANALISIS INICIAL	3 DIAS T.A.	7 DIAS T.A.	7 DIAS 5°C.
1	95.75	95.71	91.15	95.75
2	93.17	93.75	90.88	93.27
3	94.88	92.95	92.07	95.95
4	94.85	92.49	92.25	95.24
5	94.96	92.99	86.90	95.17
6	93.17	93.42	92.36	93.87
Media	94.46	93.55	90.93	94.88
Coefficiente de Variación	1.12%	1.22%	2.27%	1.13%
Diferencia entre medias		-0.96%	-3.73%	+0.44%

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos, se concluye que las muestras son estables almacenadas a temperatura ambiente sólo durante tres días. Si se conservan en refrigeración, son estables al menos durante 7 días.

3.5.2. RESULTADOS DE LA REVALIDACION DEL METODO PARA CUANTIFICACION DE CLORHIDRATO DE FENILPROPANOLAMINA

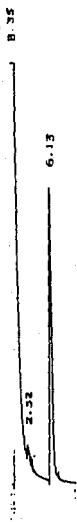
ESPECIFICIDAD DEL METODO

Se prepararon e inyectaron al cromatógrafo las siguientes muestras:

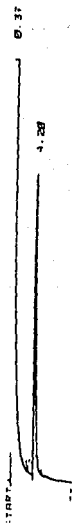
- Estándar de clorhidrato de fenilpropanolamina, en concentración de 250 microgramos por mililitro.
- Estándar de sulfato de pseudoefedrina, en concentración de 200 microgramos por mililitro.
- Mezcla de estándares de clorhidrato de fenilpropanolamina y sulfato de pseudoefedrina.
- Producto terminado sin estándar interno a T.A. y 70°C.
- Producto terminado con estándar interno a T.A.
- Placebo de clorhidrato de fenilpropanolamina a T.A. y 70°C.
- Placebo total a T.A. y 70°C.

En las páginas siguientes, se muestran los cromatogramas correspondientes.

CLORHIDRATO DE FENILPROPANOLAMINA
ESPECIFICIDAD DEL METODO
CROMATOGRAFAS



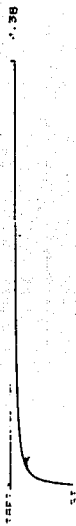
CLORHIDRATO DE FENILPROPANOLAMINA
ESTANDAR DE REFERENCIA



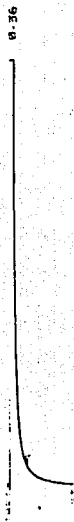
SULFATO DE PSEUDOFEDRINA
ESTANDAR INTERNO



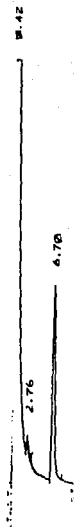
FACTOR RESPUESTA



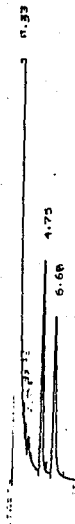
PLACEBO DE CLORHIDRATO
DE FENILPROPANOLAMINA
70°C DURANTE 15 DIAS



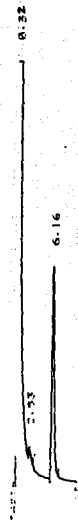
PLACEBO TOTAL 70°C
DURANTE 15 DIAS



PRODUCTO TERMINADO, T.A.
SIN ESTANDAR INTERNO



PRODUCTO TERMINADO, T.A.
CON ESTANDAR INTERNO



PRODUCTO TERMINADO, 70°C
SIN ESTANDAR INTERNO

CONCLUSIONES

El método es específico para el clorhidrato de fenilpropanolamina en las condiciones del ensayo. El sistema no detecta picos que interfieran con el del principio activo de interés, ni con el del estándar interno.

Criterio de aceptación: promedio de recobros de 98 a 102% y coeficiente de variación no mayor de 2.0%. La recta obtenida al graficar cantidades adicionadas vs cantidades recuperadas, deberá tener una pendiente significativamente igual a 1, ordenada al origen significativamente igual a 0, y un coeficiente de correlación no menor de 0.98. (**)

RESULTADOS

% DE NIVEL ENSAYADO	% DE RECUPERACION
60	99.99
80	99.02
100	100.10
120	101.98
140	100.50
	\bar{x} 100.32
Coefficiente de variación	1.07%

Intervalo de confianza para el % recuperado:

$$IC = [98.98, 101.65\%]$$

Datos del análisis de regresión:

Pendiente, $m = 1.02297$

Ordenada al origen, $b = -0.00456$

Coefficiente de correlación, $r = 0.99964$

Intervalo de confianza para la pendiente, m :

$IC_m = [0.99850, 1.04732]$, el intervalo incluye al 1.0.

Intervalo de confianza para la ordenada al origen, b:
ICb = $[-0.01179, 0.00269]$, el intervalo incluye al 0.0.

CONCLUSIONES

El método es exacto, se cumple con los criterios de aceptación.

LINEARIDAD DE LA MUESTRA

RESULTADOS

% DEL NIVEL DE PROCEDIMIENTO	% DE FENILPROPANOLAMINA RECUPERADA
60	95.26
80	96.27
100	99.81
120	96.95
140	99.06
	\bar{x} 97.47
Coefficiente de variación	1.96%

Intervalo de confianza para el % recuperado:

$$IC = [95.10, 99.84]$$

CONCLUSIONES

La variación del tamaño de la muestra no afecta a la confiabilidad de los resultados, ya que se cumple con los criterios de aceptación.

PRECISION DEL METODO (REPRODUCIBILIDAD)

Criterio de aceptación: coeficiente de variación total no mayor de 2.0%. (*)

RESULTADOS

	NUMERO DE MUESTRA	% DE RECUPERACION	
		QUIMICO 1	QUIMICO 2
DIA 1	1	98.05	97.25
	2	97.36	96.12
	3	97.63	96.67
DIA 2	4	95.22	97.19
	5	95.85	97.50
	6	95.71	96.00
TOTALES		579.82	580.73
Media total		96.71	
Coeficiente de variación total		0.94%	

CONCLUSIONES

El método es reproducible, cumple con el criterio de aceptación.

ANALISIS DE VARIANZA

TABLA ANDEVA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F 0.05*
Analista	(2-1)=1	0.0690	0.0690	0.2345	18.51
Día	(2-1)2=2	6.6017	3.3009	11.2199	4.46
Error	(2*2)(3-1)=8	2.3533	0.2942		
Total	11	9.0240			

*FO.05.- Valores obtenidos de la tabla F de Fisher, localizando en el cruce del valor de los grados de libertad del numerador horizontalmente, y el valor de los grados de libertad del denominador verticalmente, para una $\alpha=05$, (ver tabla No. 2). (**)

INTERPRETACION DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

H_0 : Si la F calculada es menor que la F de tablas, el método es reproducible.

Entre analistas, la F calculada es menor que la F de tablas, no existen diferencias significativas entre analistas.

El método no es reproducible por un mismo analista en diferentes días, sin embargo, no se rechaza la hipótesis nula, debido a que el coeficiente de variación entre los resultados obtenidos por cada analista es de 1.22% y 0.65% respectivamente; valores menores que el límite establecido de 2.0%.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Criterio de aceptación: diferencia de la media de la muestra, con respecto a la media del análisis inicial, no mayor de 2.0%. (*)

Las muestras se conservaron a temperatura ambiente y a 5°C. Se analizaron el día de su preparación y al 3º y 5º días posteriores.

RESULTADOS

NUMERO DE MUESTRA	% DE FENILPROPANOLAMINA			
	ANALISIS INICIAL	3º DIA T.A.	5º DIA T.A.	5º DIA 5°C
1	98.05	98.56	93.56	97.88
2	97.36	98.69	91.80	98.80
3	97.63	99.11	94.06	99.67
4	97.25	97.26	95.22	97.92
5	96.12	95.95	95.85	94.44
6	96.67	96.10	95.71	96.23
Medias	97.18	97.61	94.37	97.49
Coficientes de variación	0.71%	1.41%	1.65%	1.93%
Diferencias		+0.44%	-2.90%	+0.32%

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos, se concluye que las muestras son estables sólo durante tres días si se almacenan a temperatura ambiente. En refrigeración, las muestras son estables al menos durante cinco días

CAPITULO CUATRO

CONCLUSIONES

4. CONCLUSIONES

Los cuatro métodos validados son específicos, en ninguno de ellos se detectan picos que interfieran con el activo de interés o con el estándar interno.

Todos son precisos, exactos y reproducibles, como ha quedado demostrado en los resultados individuales.

Estos métodos pueden usarse para estudios de estabilidad y para análisis rutinarios de control de calidad, de la nueva formulación de las tabletas antigripales.

Al optimizar los métodos analíticos, se logró reducir los costos, cumpliéndose de este modo, el objetivo principal de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

5. BIBLIOGRAFIA

1. *The Merck Index*, Tenth Edition.
Merck & Co., Inc.
Rahway, N.J., U.S.A., 1973.
2. *Remington Farmacia*, traducción de la 17ª edición de *Remington's Pharmaceutical Sciences*.
Editorial Médica Panamericana
Buenos Aires, 1987.
3. Florey Klauss et Al.
Analytical Profiles of Drug Substances, Vol. 8.
Academic Press, Inc.
New York, 1983.
4. *Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos*, 5ª edición, Secretaría de Salud.
México, 1985.
5. Florey, Klauss et Al.
Analytical Profiles of Drug Substances, Vol 15.
Academic Press, Inc.
New York, 1983.
6. U.S.P. XXI
7. Florey, Klauss et Al.
Analytical Profiles of Drug Substances, Vol. 7.
Academic Press, Inc.
New York, 1983.
8. Florey, Klauss et Al.
Analytical Profiles of Drug Substances, Vol. 12
Academic Press, Inc.
New York, 1983.
9. Willard, Hobart H.
Métodos Instrumentales de Análisis.
Cia Editorial Continental, S.A.
México, 1977.
10. Yost, R.W.
Practical Liquid Chromatography.-An Introduction.
Perkin Elmer,
U.S.A., 1980.

11. Grob, R.I., et Al.
Modern Practice of Gas Chromatography.
Wiley-Interscience.
New York, 1977.
12. Watty B., Margarita.
Química Analítica.
Editorial Alhambra Mexicana, S.A.
México, 1982.
13. Bauer, E.L.
Manual de Estadística para Químicos.
Editorial Alhambra.
Madrid, 1974.
14. Kreysig, Erwin.
Introducción a la Estadística Matemática.
Editorial Limusa.
México, 1971.
15. Spiegel, Murray R.
Teoría y Problemas de Estadística.
Schaum Publishing Co.
México, 1961.
16. Rickmers D. Albert y Hollins N. Toad.
Introducción a la Estadística.
Compañía Editorial Continental, S.A.
Barcelona, 1971.
17. Daniel, Wayne W.
Bioestadística
Editorial Limusa, S.A.
México, 1985.
18. Haber, Audrey et Al.
Estadística General.
Addison Wesley Interamericana.
México, 1986.
19. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación.
Validación de Métodos Analíticos.
Secretaría de Salud-Colegio de Químicos Farmacéuticos
Biólogos.
México, 1991.
20. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación.
*Proyecto de Norma Técnica para Establecimiento de Guías
Generales de Validación.*
Asociación Farmacéutica Mexicana.
México, 1972.

21. David Couriel, Benito et Al.
Validación de Procesos Farmacéuticos,
Asociación Farmacéutica Mexicana,
México, 1982.