

Nº 112
2ES.



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

**Validación y Comparación Estadística de dos
Métodos Analíticos para la Determinación
de Pirazinamida en Tabletas**



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

Que para obtener el Título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Presenta:

MARTIN NAVA LEMUS

México, D. F.

1992

FALLA DE ORIGEN



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

CAPITULO I.

INTRODUCCION. 1

CAPITULO II.

--MONOGRAFIA DE LA PIRAZINAMIDA. 2

--CROMATOGRAFIA. 21

--ESTADISTICA. 29

--VALIDACION. 38

CAPITULO III.

PARTE EXPERIMENTAL. 45

--METODO ESPECTROFOTOMETRICO EN LA REGION ULTRAVIOLETA. 46

--METODO POR CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA. 48

CAPITULO IV.

RESULTADOS.

--VALIDACION DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO EN LA REGION ULTRAVIOLETA.	51
--VALIDACION DEL METODO POR CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA.	62
--COMPARACION ESTADISTICA DE LOS METODOS.	77
--RESUMEN COMPARATIVO DE MEDIDAS ESTADISTICAS.	80

CAPITULO V.

CONCLUSIONES.	83
---------------	----

CAPITULO VI.

BILBIOGRAFIA.	84
---------------	----

CAPITULO I

INTRODUCCION

Uno de los principales problemas de salud en las zonas rurales y urbanas de nuestro país, es el padecimiento de la Tuberculosis, la cual en forma progresiva, es potencialmente fatal y puede ser transmitida a individuos susceptibles.

Esta enfermedad, es producida por la infestación de un bacilo, específicamente Mycobacterium tuberculosis y por esta razón se ha generalizado el uso de agentes tuberculostáticos en la quimioterapia de este padecimiento.

Los medicamentos usados para combatir esa enfermedad, pueden dividirse en dos categorías principales. Los de primera elección combinan el mayor nivel de eficacia con un grado aceptable de toxicidad; dichos agentes incluyen Isoniazida, Rifampicina, Etambutol y Estreptomina. La gran mayoría de los enfermos de tuberculosis pueden tratarse exitosamente con estos fármacos. Ocasionalmente, sin embargo, puede ser necesario recurrir a un medicamento de "segunda línea"; esta categoría de agentes incluye Pirazinamida, Etionamida, Acido Aminosalicílico entre otras.

La Pirazinamida es una sustancia de acción tuberculostática, que ha demostrado ser de gran efectividad en terapias de tratamiento cortos e intermitentes.

El presente estudio se realizó con el objeto de validar y comparar dos métodos analíticos para la cuantificación de Pirazinamida, que a través de un proceso práctico experimental y evaluación estadística resulten sencillos, específicos, precisos y reproducibles, características que conducen a obtener métodos de análisis confiable.

Este trabajo consta de siete capítulos en donde se presentan en orden los siguientes temas:

- 1.- Monografía del Principio Activo.
- 2.- Generalidades del Análisis Espectrofotométrico.
- 3.- Generalidades sobre Cromatografía.
- 4.- Generalidades del Análisis Estadístico.
- 5.- Generalidades en la Validación de los Métodos Analíticos.
- 6.- Discusión de resultados y conclusiones.
- 7.- Bibliografía.

CAPITULO II

MONOGRAFIA DE LA PIRAZINAMIDA

Descripción: (6, 13, 14)

Polvo blanco cristalino, prácticamente inodoro, con ligero sabor amargo.

Nombres químicos: (6, 11, 13, 14, 15)

Pirazinacarboxamida; pirazina-2-carboxamida.

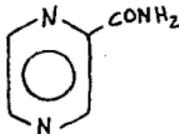
Nombre genérico: (6, 13, 14)

Pirazinamida.

Nombres comerciales: (6, 11, 15)

Aldinamid, Eprazin, Piraldina, Pirilene,
Pyrafat, Tebrazid, Tisamid.

Formula:



Peso Molecular: (6, 11, 13, 14, 15)
123.11

Propiedades Físicas:

Espectro Infrarrojo. (6)

El espectro infrarrojo de la Pirazinamida se muestra en la figura No.1.

La longitud de onda y la asignación a las principales bandas de absorción se presenta en la tabla No.1.

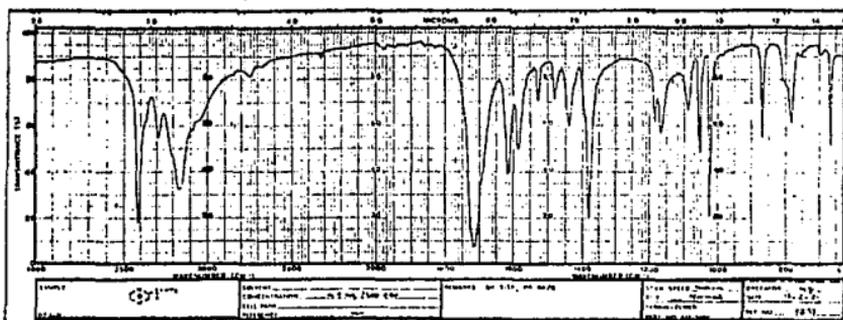


Figura No. 1. Espectro Infrarrojo de Pirazinamida (pastilla KBr)

TABLA No. 1.

longitud de onda (cm^{-1})	Asignamiento
3425, 3290, 3160	ν NH
1716	ν C=O (amida I)
1614	δ NH+ ν C=N (amida II)
1585, 1528	ν C=C y ν C=N (anillo)
1382	vibración π del anillo
1183-782	δ CH fuera del plano, NH ₂

Espectro de Resonancia Magnética Nuclear.

¹H-NMR. (6)

El espectro NRM protónica de Pirazinamida se muestra en la figura No.2.

La interpretación del espectro se muestra en la tabla No.2.

TABLA No. 2

Cambio químico δ H (ppm) TMS	Multiplicidad	Intensidad	Asignamiento
9.21	doblete	1H	H-3 (13.5 1.5Hz)
8.85	doblete	1H	H-6 (15.6 2.4Hz)
8.71	cuarteto	1H	H-5 (15.6 2.4Hz) (13.5 1.5Hz)
8.25 y 7.88	singulete, ancho	2H	--CONH ₂
3.40		--	H ₂ O
2.5		--	DMSO
0.0		--	TMS

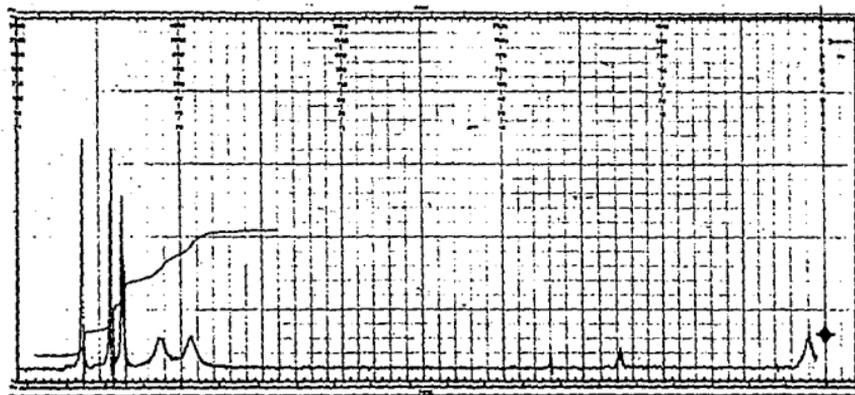


Figura No.2. $^1\text{H-NMR}$ (100 MHz) Espectro de Pirazinamida en DMSO-d_6

^{13}C -NMR

El espectro ^{13}C -NMR de Pirazinamida en una solución de DMSO, se muestra en la figura No. 3. La interpretación del espectro se muestra en la tabla No. 3.



Figura No.3. ^{13}C -NMR(25.2 MHz) Espectro de Pirazinamida en DMSO-d_6

TABLA No. 3.

δ_c (ppm) TMS	Línea	Intensidad	Asignamiento
165.0	1	40	C=O
147.3	2	129	C-6
145.0	3	35	C-2
143.6	4	99	C-3
143.2	5	107	C-5
40.0	6-12	--	DMSO
0.0	13	--	TMS

Espectro de Masas. (6)

El espectro de masas de Pirazinamida se presenta en la figura No. 4.

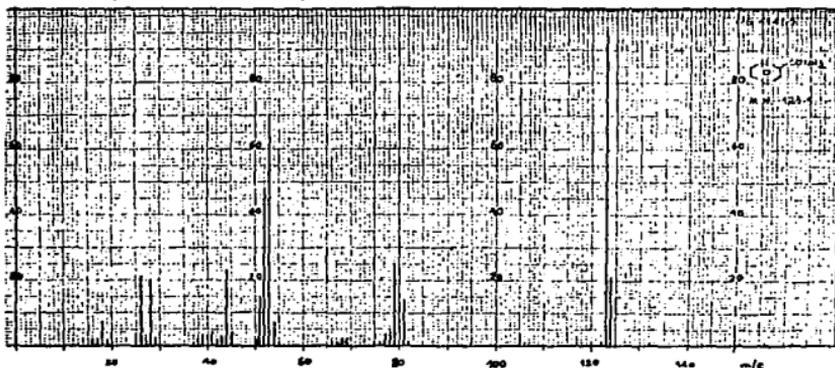
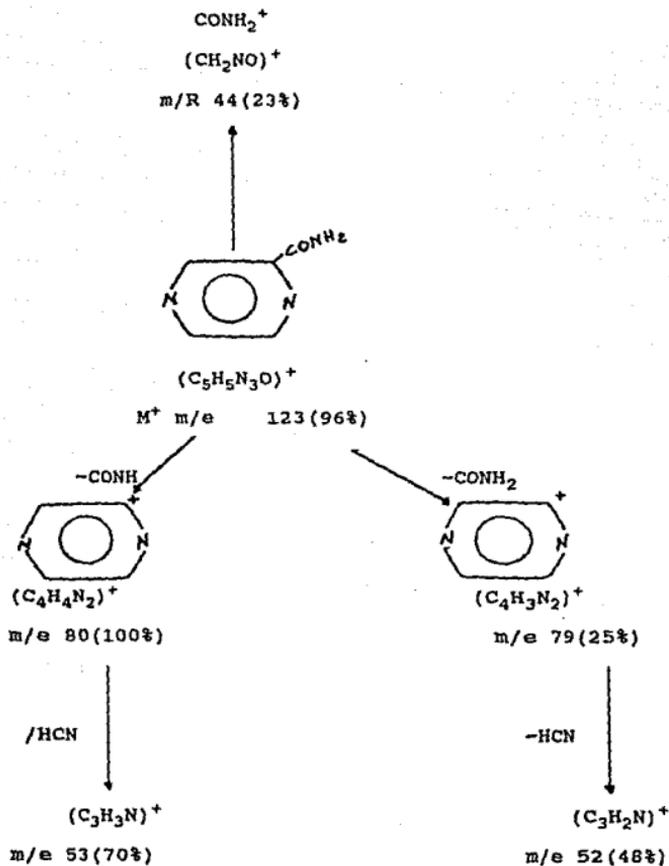


Figura No.4. Espectro de Masas de Baja Resolución de Pirazinamida.

Las vías de fragmentación son las siguientes.



Espectro Ultravioleta. (6)

El espectro U.V. de la Pirazinamida ha sido determinado en agua, metanol, ácido clorhídrico 0.1 N e hidróxido de sodio 0.1 N

El espectro U.V. en agua se presenta en la fig. No.5. Las absortividades molares y sus correspondientes longitudes de onda se denotan en la tabla No. 4.

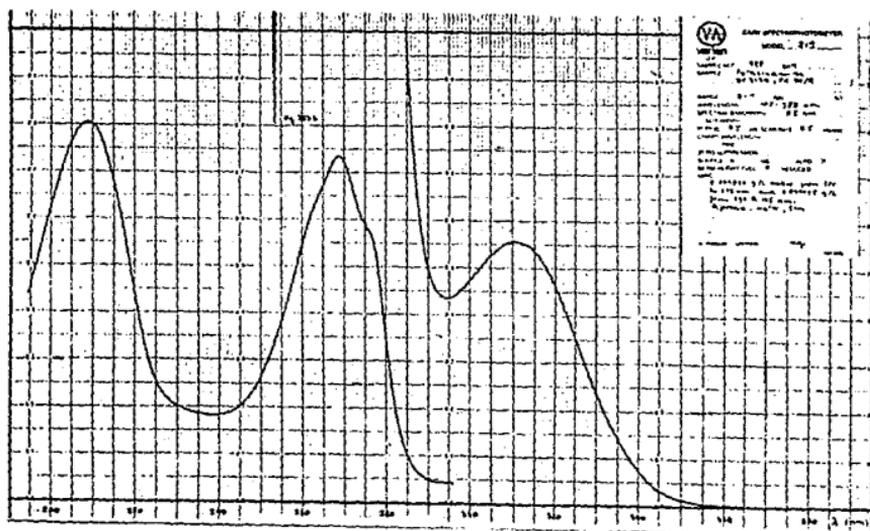


Figura No.5. Espectro Ultravioleta de Pirazinamida en agua.

TABLA No. 4

Disolvente	λ máx. (nm)	ϵ (máx)	λ mín. (nm)	ϵ (mín)
H ₂ O	209	8765 \pm 22	238.5	2000
	269	8036 \pm 20	294	480
	310	611 10		
Metanol	269	7900	235	1600
	320	530	269.5	280
Cloroformo	322	530	269	7500
			298	250
NaOH 0.1N	268.5	7950	238.5	1500
	310	640	295	540
HCl 0.1N	209	8000	238.5	2000
	269	8200	295	510
	310.5	620		

Morfología Cristalina. (6)

Normalmente la Pirazinamida puede encontrarse en cuatro formas polimorfas:

- α -Pirazinamida: se obtiene de etanol a temperatura ambiente o de soluciones hidroalcohólicas.
- β -Pirazinamida: a partir de etanol a 0°C.
- γ -Pirazinamida: obtenida por fusión.
- δ -Pirazinamida: se obtiene de una solución en nitrometano a 80-140°C vaciando sobre tetraclorometano a temperatura ambiente o de una mezcla de hexano-alcohol etílico.

Punto de Fusión. (13, 15)

188-189°C

Solubilidad. (6)

Solubilidad de Pirazinamida en g/100g de solución.

<u>DISOLVENTE</u>	<u>0°C</u>	<u>38°C</u>
Agua	0.64	2.65
Metanol	0.84	1.63
Etanol	0.29	0.74
n-propanol	0.19	0.65
n-butanol	0.14	0.65
Acetato de metilo	0.59	1.18
Acetato de etilo	0.31	0.70
n-propilacetato	0.23	----
n-butilacetato	0.14	0.40
Cloroformo	0.28	----
Isobutano	0.0004	----

Coefficiente de Partición. (6)

El coeficiente de partición en n-butanol/agua y n-octanol/agua se determinó a 30°C.

n-butanol/agua	1:1	0.05 ± 0.01
n-octanol/agua	1:0.2	0.330 ± 0.003

Constante de Acidez. (15)

pKa= 0.5

Síntesis. (6)

En 1936 Dalmer and Walter fueron los primeros en sintetizar la Pirazinamida y Pirazinamida-N-alquil sustituidas, las cuales fueron reportadas para uso como anépticos. Los compuestos fueron sintetizados por métodos estándar para la preparación de amidas ácidas, preferentemente por reacción con ácido clorhídrico y de alquil ésteres de amonio.

Los métodos básicos de preparación de Pirazinamida se muestran en la figura No. 6.

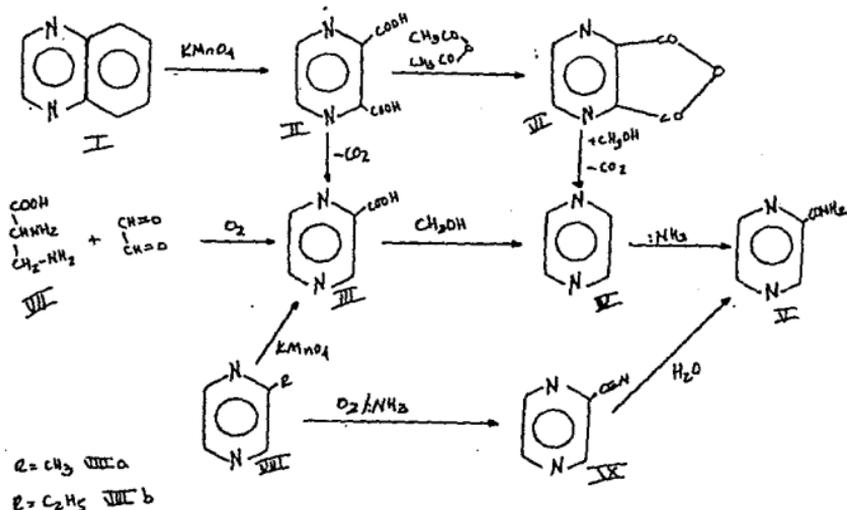


Figura No.6. Síntesis de Pirazinamida.

La quinoxalina (I) puede ser oxidada con KMnO_4 y obtener así el ácido-2,3-dicarboxílico (II), que puede ser convertido en su anhídrido (VI) por medio del método de Gabriel y Son.

De un sistema a reflujo en metanol, el anhídrido (VI) se transforma en el ácido mono metil ester de la pirazin-2,3-dicarboxílico, el cual se descarboxila a metilpirazinato (IV), y posteriormente en Pirazinamida.

Alternativamente el ácido pirazin-2,3-dicarboxílico (II) se descarboxila a ácido pirazin-2-carboxílico (III), que se esterifica con metanol para obtener metilpirazinoato (IV), el cual se purifica por destilación a presión reducida.

El ácido pirazinoico (III), intermediario regulador, únicamente puede ser preparado por condensación del ácido 2,3-diamino propiónico con glioxal, en atmósfera de aire. La oxidación de metilpirazina (VIIIa) con ácido selénico en piridina o de etilpirazina (VIIIb) con KMnO_4 son otras alternativas para la preparación de (III).

De la amonooxidación de metilpirazina (VIIIa) se obtiene 2-cianopirazina (IX), la cual es fácilmente convertida en Pirazinamida.

Estabilidad. (6)

La Pirazinamida exhibe gran estabilidad en el estado sólido, tanto en atmósfera húmeda como seca y también cuando es expuesta a luz natural.

Métodos de Análisis. (6)

Análisis Elemental.

La composición elemental de la Pirazinamida es:

<u>Elemento</u>	<u>% Teórico</u>
C	48.78
H	4.09
N	34.14
O	12.99

Pruebas de identificación. (6, 14)

Las reacciones de identificación reportadas son:

A.- Percepción de olor a amoníaco de una solución a ebullición conteniendo 20 mg de Pirazinamida en 5 ml de solución 5N de hidróxido de sodio.

B.- Una solución de 0.1 g de Pirazinamida en 10 ml de agua desarrolla un color rojo-naranja por la adición de 1 ml de solución reactivo de FeSO_4 . El color cambia a azul con la adición de 1 ml de solución reactivo de hidróxido de sodio.

Métodos oficiales de Valoración. (6, 13, 14)

El método de hidrólisis alcalina de la Pirazinamida, esta basado en la liberación de amoníaco libre y la titulación de este con solución 0.1 N de ácido clorhídrico.

Valoración en Medio no Acuoso. (6)

La Pirazinamida puede ser valorada en ácido acético glacial, conteniendo acetato mercúrico, con ácido perclórico en ácido acético glacial como valorante. El punto final de la titulación se determina potenciométricamente.

Determinación por Métodos Colorimétricos. (6)

A.- Hidrólisis a ácido pirazínico con una solución alcalina diluida y desarrollo de un color rojo-naranja con sulfato de amonio ferroso.

B.- Reacción con una solución de nitropentano ferroso, que presenta un color rojo-naranja con un máximo de absorción a 490-500 nm.

C.- Para la determinación, en presencia de amidas, mezclar una solución del fármaco con una solución 0.5 M de CaCl_2 , glicerol y una solución 2 N de KOH, dejar reposar por 5 minutos, adicionar H_2O_2 al 3%. Se desarrolla un color amarillo que se determina colorimétricamente.

Método Espectrofotométrico U.V. (6, 15)

La Pirazinamida puede ser determinada a 269 nm en solución acuosa $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 655.

Cromatografía en Papel. (6)

La cromatografía en papel de la Pirazinamida ha sido reportada indicando 5 sistemas y una gran variedad de reactivos visuales como revelador.

Las fases móviles utilizadas son:

- A.- 4.8 g de ácido cítrico en una mezcla de 130 ml de agua y 870 ml de n-butanol.
- B.- Solución amortiguadora de fosfatos (pH=7.4)
- C.- Solución amortiguadora de acetatos (pH=4.58).(11)
- D.- Acetato de butilo-ácido acético-agua (5:1:1)
- E.- n-butanol-solución 1 N de HCl (1:1)

Usando papel Whatman #1, los Rf obtenidos son:

- A) 0.56 B) 0.80 C) 0.83 D) 0.57 E) 0.58

Las manchas pueden ser visualizadas usando para ello:

- 1.- Luz U.V.
- 2.- Solución acuosa al 1% de KMnO_4
- 3.- Solución acuosa al 4% de nitroprusiato y solución 4N de NaOH.(1:1)

Cromatografía en Capa Fina. (6)

Las condiciones para la separación y detección de Pirazinamida se presentan en la siguiente tabla:

<u>Sistema de disolventes</u>	<u>Soporte</u>	<u>Rf</u>
I	A	0.63
II	B	0.26
III	B	0.44
IV	B	0.79
V	B	0.76
VI	B	0.48
VII	C	----

Sistema de disolventes.

- I.- Solución de Hidróxido de Amonio:Metanol (1.5:100).(11)
- II.- Tolueno:Acetato de Etilo:Ac. Fórmico 85% (50:45:5)
- III.- Tolueno:Isopropanol:Solución de Hidróxido de Amonio conc. (70:29:1)
- IV.- Tolueno:Acetato de Etilo:Isopropanol:Ác. Acético (10:35:35:20)
- V.- Tolueno:Dioxano:Metanol:Solución de Hidróxido de Amonio conc. (20:50:20:10)
- VI.- Cloroformo:Metanol:Solución de Hidróxido de Amonio conc. (20:20:1)
- VII.- Benceno:Cloroformo:Ácido Acético (8:1:1)

Soporte.

- A: Sílica Gel G.
- B: Kiesegel 60F 254 (Merck).
- C: Al₂O₃ 60F 254 (Merck).

Sistemas de detección.

- 1.- Yodo- CCl_4
- 2.- Luz U.V. 254 nm.
- 3.- Nitroprusiato de Sodio 4% en solución 4 N de NaOH (1:1)
- 4.- Cloruro de Picrilo 1.5%
- 5.- Solución al 0.1% de difenilamina.

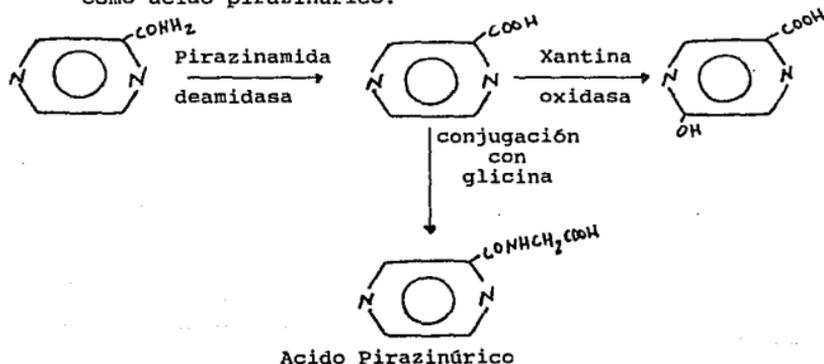
Farmacología.

Metabolismo. (6)

El metabolismo de la Pirazinamida ha sido estudiado en humanos, perros y en monos rhesus.

El ácido pirazinoico y el ácido 5-hidroxipirazinoico se han reportados como los mas importantes metabolitos.

En humanos otros dos metabolitos son secretados en menor cantidad; uno de ellos ha sido asignado tentativamente como ácido pirazinúrico.



Farmacocinética. (10)

Absorción, distribución y excreción. La Pirazinamida se absorbe bien desde el tracto gastrointestinal y tiene amplia distribución en todo el cuerpo. La administración oral de 1g produce concentraciones plasmáticas de unos 45 mcg/ml a las 2 horas y 10 mcg/ml a las 15 horas. El fármaco se excreta principalmente por filtración glomerular; las concentraciones urinarias son de 50 a 100 mcg/ml durante varias horas después de una sola dosis. La Pirazinamida se hidroliza a ácido pirazinoico y luego a ácido 5-hidroxi-pirazinoico, el principal producto excretorio.

Unión a Proteínas. (6)

La Pirazinamida no se une a proteínas plasmáticas.

Toxicidad. (6)

La DL_{50} de Pirazinamida es la siguiente:

Ratones 2500 mg/Kg i.p. y 2730 mg/Kg vía oral

Ratas 2350 mg/Kg i.v. y 3800 mg/Kg vía oral

USOS. (10, 16)

Actividad antibacteriana. La Pirazinamida muestra actividad tuberculostática *in vitro* solamente con pH ligeramente ácido. El crecimiento de los bacilos tuberculosos dentro de los monocitos *in vitro* se inhibe totalmente con el fármaco en concentración de 12.5 mcg/ml.

Preparados, vías de administración y dosis. La Pirazinamida, se vende en tabletas que contienen 500 mg. Sólo se encuentra en hospitales. La dosis diaria es de 20 a 35 mg/Kg por vía oral, en tres o cuatro tomas igualmente espaciadas. La cantidad máxima diaria posible es de 3g cualquiera sea el peso.

Efectos indeseables. El daño al hígado es el efecto secundario más común y más serio de la Pirazinamida. Cuando una dosis de 3 g por día es suministrada por vía oral aparecen signos y síntomas de enfermedad hepática en alrededor del 15% de los pacientes, ictericia en 2 o 3% y hay raros casos de muerte por *necrosis hepática*. Todos los pacientes tratados con Pirazinamida deben someterse a estudios de la función hepática antes de administrarles el fármaco; los mismos deben repetirse a intervalos frecuentes durante todo el tratamiento. Si hay pruebas evidentes de daños hepáticos significativos, el tratamiento debe cesar. La Pirazinamida no debe administrarse a personas con cierto grado de difusión hepática, excepto en casos absolutamente inevitables.

El fármaco inhibe la excreción de uratos y se han producido episodios agudos de gota. Entre otros efectos indeseables observados con la Pirazinamida se tienen, *artralgia*, *anorexia*, *náuseas* y *vómitos*, *disuria*, *malestar* y *fiebre*. La *diabetes mellitus* puede ser difícil de controlar en los pacientes que están recibiendo el fármaco. Se conocen casos de *hemoptisis* fatal durante el tratamiento de la tuberculosis pulmonar con Pirazinamida.

C R O M A T O G R A F I A

Las formulaciones farmacéuticas son mezclas complejas que incluyen además de uno o más ingredientes activos, un número de materiales inertes tales como: diluentes, desintegrantes, colorantes y saborizantes. Para asegurar la calidad y estabilidad del producto final, se debe contar con un método capaz de separar estas mezclas en componentes individuales. Entre las técnicas de mayor aplicación para la resolución de estas mezclas, destaca un grupo de métodos de alta eficiencia que son llamados colectivamente cromatografía. (1, 2)

La cromatografía está integrada por un grupo de métodos que se emplean para la separación molecular de mezclas, que depende de las afinidades diferenciales de los solutos entre dos fases inmiscibles; una estacionaria y una móvil, de tal forma que cada uno de los componentes es retenido selectivamente por la fase estacionaria. Esta retención selectiva obedece a razones de diferencias en adsorción, partición, presión de vapor, tamaño molecular o carga iónica. (1)

Los métodos cromatográficos pueden ser clasificados de acuerdo a la naturaleza de las fases móvil y estacionaria.

Si la fase estacionaria es un sólido, el proceso es llamado cromatografía de adsorción; si la fase estacionaria es un líquido, se llama cromatografía de partición.

En la cromatografía de adsorción, la fase móvil que contiene los solutos disueltos pasa por la superficie de la fase estacionaria. La retención de los componentes y su consecuente separación depende de la disponibilidad de los átomos de la superficie para remover 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-sólido (CLS), pero cuando la fase móvil es un gas, el método es llamado cromatografía gas-sólido (CGS).

En la cromatografía de partición, un material sólido, tal como la sílica gel o tierra de diátomeas, sirve como soporte a una capa delgada de líquido la cual es la fase estacionaria; la fase móvil que contiene los solutos pasa sobre la fase estacionaria y entonces se lleva acabo la retención y separación de los solutos entre los

dos líquidos; esta separación depende de los coeficientes de partición de los solutos. Si la fase móvil es un líquido, este tipo de cromatografía de partición se llama cromatografía líquido-líquido (CLL) y si la fase móvil es un gas el proceso se denomina cromatografía gas-líquido.

Existen otros dos tipos de cromatografía en las cuales la fase estacionaria es un sólido y se clasifican aparte de la CLS y la CGS por su naturaleza única en el proceso de separación; estas son cromatografías de intercambio iónico y cromatografía de exclusión molecular.

En la cromatografía de intercambio iónico la fase estacionaria consiste en una matriz polimérica rígida cargada ya sea positiva o negativamente. Si tiene carga positiva los sitios de intercambio son positivos (R^+) y atraen y retienen a los aniones de la fase móvil (Y^-); después estos se intercambian por los aniones de la muestra (X^-). Este proceso se denomina de intercambio aniónico y puede representarse por:



El proceso complementario de intercambio catiónico ocurre cuando la superficie de la resina tiene cargas negativas, dando sitios de intercambio negativos (R^-). Los iones de la fase móvil (Y^+) y muestra (X^+) son cationes y su intercambio puede representarse por:



La separación se basa en la fuerza de las interacciones entre los iones de la muestra y los sitios de intercambio. Los iones que interactúan débilmente con los sitios de intercambio se retienen poco, mientras que los iones que tienen interacciones fuertes se retienen mas. Este tipo de cromatografía se aplica a compuestos iónicos.

En la cromatografía de exclusión, la fase estacionaria es una sustancia polimérica que contiene numerosos poros de dimensiones moleculares. Los solutos cuyo tamaño molecular es suficientemente pequeño, se separan de la fase móvil para difundirse dentro de los poros. Las moléculas grandes, que no pueden entrar en los poros,

permanecen en la fase móvil y no son retenidos. Este método es el más apropiado para la separación de mezclas en las cuales los solutos varían considerablemente en tamaño molecular. La fase móvil en la cromatografía de exclusión puede ser líquida o gaseosa.

Es importante hacer notar que la CLL tiene dos variantes; a) fase normal, donde la fase estacionaria es un líquido polar; mientras que la fase móvil es relativamente no polar. Este método de operación es usado para separar compuestos polares que son distribuidos en la fase estacionaria polar; b) fase inversa, si la fase estacionaria es no polar (hidrocarburos) y la fase móvil polar.

La separación se lleva a efecto en una columna tubular rellena de un sólido poroso finamente dividido, el cual puede actuar como fase estacionaria propiamente dicha o como soporte de una fase estacionaria líquida. También se puede efectuar utilizando como fase estacionaria, papel filtro o un sólido finamente dividido colocado en forma de capa delgada sobre una placa de vidrio. Estos tres tipos de cromatografía se basan en los mismos principios fundamentales y se conocen respectivamente como cromatografía en columna, en papel y de capa delgada.

CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA (CCD).(3, 4)

La cromatografía en capa delgada es un método de análisis en donde la fase estacionaria es un sólido finamente dividido que es esparcido como capa delgada en un soporte rígido y la fase móvil es un líquido que migra a lo largo de la superficie de la placa; esta técnica difiere de otras en que la separación no se lleva a cabo en una columna cerrada, se realiza en una superficie plana y la fase móvil no fluye por influencia de la gravedad o presión alta; eluye por acción capilar.

La cromatografía en capa delgada es una de las técnicas de separación mas populares y ampliamente usadas en el análisis farmacéutico cualitativo y cuantitativo, ya que es sencilla, versátil, sensible, reproducible y barata. Pero el área farmacéutica no es su único campo de aplicación, ya que también es útil en áreas como la de alimentos y la toxicología.

Los primeros trabajos de cromatografía en capa delgada fueron realizados en 1938 por Izmailov y Schaiber en el Instituto Ucrainiano en Farmacia Experimental; pero la técnica tuvo aceptación hasta la década de los '50's con los trabajos de Stahl y colaboradores.

Los adsorbentes que se usan más comúnmente en CCD son: sílica gel, alúmina, tierra de diatomeas y celulosa en polvo, entre otros.

Cualquiera de los adsorbentes mencionados se pueden usar puros, pero es más conveniente incorporarles un agente aglutinante, por ejemplo: sulfato de calcio o almidón para que tenga una mayor cohesión. Ya que la adsorción es esencialmente un fenómeno de superficie, el grado de separación depende del área de superficie del adsorbente, de aquí el interés por adsorbentes con tamaño de partícula y características uniformes, por lo que es posible reproducir la calidad de una capa.

Para que se lleve acabo el desarrollo cromatográfico que en CCD es el proceso por el cual la fase móvil se mueve a través de la capa del adsorbente con el fin de separar las sustancias de la muestra, se necesita una cámara cerrada para evitar la evaporación del disolvente. Una vez completo el desarrollo, las placas se secan con una corriente de aire y las manchas pueden localizarse de diferentes maneras: zonas coloridas son localizadas visualmente, la iluminación con luz ultravioleta esta particularmente indicada para compuestos fluorescentes y en otros casos, las sustancias separadas pueden localizarse rociando reactivos que al reaccionar producen compuestos coloridos o fluorescentes.

La cuantificación puede efectuarse desprendiendo el área adsorbente que contiene la sustancia, por raspado o aspiración utilizando una pipeta Pasteur. El compuesto se separa del adsorbente usando un disolvente apropiado y la fase estacionaria sólida es removida por centrifugación o filtración y el soluto puede ser identificado y/o cuantificado por algún método espectrofotométrico.

CRITERIO PARA LA SEPARACION CROMATOGRAFICA.(3)

En todo procedimiento cromatográfico las condiciones óptimas para la separación se obtienen de una selección adecuada de las fases móvil y estacionaria. Los adsorbentes para CCD difieren de los usuales para cromatografía en columna en su estructura ya que para CCD es necesario un tamaño de partícula mas fino que para columna.

La elección de las fases móvil y estacionaria se hace de acuerdo al problema particular en estudio y es necesario considerar la estructura química y el comportamiento cromatográfico del soluto. De aquí la importancia de conocer propiedades como la polaridad y el coeficiente de distribución.

El movimiento de cada sustancia en el sistema cromatográfico es una característica particular que puede usarse para identificar dicha sustancia; esta característica se llama R_f el cual, es un valor que indica la posición del compuesto sobre un cromatograma desarrollado, y se calcula por la siguiente relación:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por la muestra desde el origen.}}{\text{distancia recorrida por el frente del disolvente desde el origen.}}$$

Sustancias con grupos funcionales similares a las de los solutos, tales como éteres, alcoholes o carboxilos, pueden ser agregados para incrementar el valor de R_f por el aumento de la solubilidad del soluto en la fase móvil.

El factor importante en cualquier tipo de cromatografía es el coeficiente de distribución, (K), de una sustancia entre las dos fases del sistema cromatográfico. En la cromatografía de adsorción, K depende de la temperatura y la concentración del soluto. A una temperatura dada la relación entre la cantidad de soluto en cada fase puede expresarse gráficamente por la isoterma de adsorción.

La isoterma ideal es una línea recta con pendiente igual a uno, que se obtiene al graficar la concentración de soluto en la fase estacionaria contra su concentración en la fase móvil. (figura No.7).

conc. de
solute en
la fase
estacionaria



Figura No. 7.
Isoterma de adsorción
lineal.

Si al desarrollar una placa se obtienen manchas poco definidas con tendencia al barrido y con forma de gota, es porque la isoterma de adsorción no es lineal sino cóncava o convexa.

Es por esta razón que en CCD se busca trabajar a concentraciones en las que la isoterma de adsorción se aproxime a la línea recta.

No existe un método universal para trabajar con mezclas de compuestos químicos, ya que una mezcla compleja puede ser sometida primero a una separación preliminar de sus componentes, por ejemplo: una fracción hidrofílica y una lipofílica, la fracción de interés es entonces subdividida en sus componentes hasta el aislamiento del compuesto en estudio para su identificación y cuantificación final.

La sílica gel y la alúmina son adsorbentes inorgánicos que se usan principalmente para separar compuestos lipofílicos teniendo como fase móvil a disolventes no polares. La celulosa se usa generalmente para separar compuestos polares con fase móvil de disolventes polares.

La elección de la fase móvil depende de la naturaleza del compuesto a separar. Las interacciones soluto-fase móvil y soluto-adsorbente están determinadas por el número y naturaleza de los grupos funcionales en el soluto. El grado de interacción del soluto con las fases móvil y estacionaria determina su distribución entre las dos fases.

El éxito en la cromatografía en capa delgada depende en gran medida de la selección adecuada de la fase móvil por lo que deben considerarse algunas recomendaciones:

- * Muchos disolventes son higroscópicos y pueden ser afectados por la humedad, por lo que es conveniente almacenarlos en lugares secos y en recipientes bien cerrados.

- * Las condiciones y duración de almacenamiento pueden causar deterioro en los disolventes, por lo que debe procurarse no utilizar disolventes viejos.

- * La mezcla de disolventes no debe prepararse con mucha anticipación, ya que puede haber interacciones que modifique la naturaleza de la mezcla.

- * La mezcla de disolventes no debe usarse varias veces, ya que puede variar la composición al evaporarse alguno de los componentes al abrir la cámara cromatográfica.

FACTORES QUE AFECTAN LA REPRODUCIBILIDAD EN CCD. (1, 3, 4)

La reproducibilidad de un valor de R_f en CCD se ve afectado por varios factores experimentales, por lo que se debe tomar control sobre las condiciones ambientales durante el manejo y aplicación de la muestra, así como durante el desarrollo del cromatograma.

Es conveniente correr en la misma placa muestras conocidas junto con la desconocida para compensar las variaciones producidas por los siguientes factores:

**** Grosor de la capa adsorbente.** El R_f varía con el grosor de la capa porque el flujo de la fase móvil no es igual en una capa gruesa que en una capa delgada.

**** Humedad en la capa adsorbente.** El contenido de agua de un adsorbente afecta su actividad, por consiguiente afecta el R_f y la resolución.

**** Saturación de la cámara cromatográfica.** Para lograr reproducibilidad en el valor de R_f es necesario que la cámara cromatográfica esté completamente saturada con la fase móvil.

**** Temperatura.** La temperatura es un factor importante para la reproducibilidad del R_f , ya que un incremento en la temperatura conduce a la evaporación del disolvente y en consecuencia un cambio en el R_f .

**** Naturaleza del adsorbente.** Parámetros tales como el tamaño de partícula y el tamaño de poro deben estar bajo control en el adsorbente para lograr una separación buena y reproducible, ya que ellos controlan las características de flujo de la fase móvil.

**** Tamaño de la muestra.** La concentración de la solución de la muestra puede afectar el R_f y la resolución, cuando se aplica en gran cantidad se obtienen zonas o manchas barridas que son difíciles de delimitar para obtener el valor de R_f , además de dificultarse la cuantificación por no tener una mancha bien definida.

**** Fase móvil.** El uso repetido de la fase móvil no es recomendable en CCD porque el valor de R_f puede ser afectado. La volatilidad de los disolventes ocasiona variación en la composición de la fase móvil, por esta razón, la mezcla de disolventes no debe ocuparse para el desarrollo de varias placas. La pureza de los disolventes usados es un factor decisivo para la reproducibilidad de los R_f 's, ya que las impurezas pueden cambiar la viscosidad y/o la polaridad de la fase móvil.

ANALISIS ESTADISTICO.

De uno u otro modo, las técnicas estadísticas se usan en casi todas las ramas de la ciencia moderna, así como en muchos otros campos de la vida humana. En nuestra sociedad, el progreso puede medirse mediante diversos índices numéricos. La estadística se utiliza para describir e interpretar estos números.

EMPLEO DE ESTADISTICA EN LA TOMA DE DECISIONES. (8)

El fenomenal crecimiento experimentado por la estadística desde comienzos de siglo ha tenido lugar principalmente en el campo de la llamada inferencia estadística o estadística inductiva. Este campo se ocupa de la formulación de generalizaciones, así como de la predicción y estimación de las relaciones entre dos o más variables. Por lo general, consiste en sacar conclusiones acerca de un conjunto de datos, (llamado población), a partir de valores observados en una muestra extraída de esa población. Sobre la base de esta información muestral, la inferencia estadística puede proporcionar a menudo la cantidad de información necesaria para decidir entre vías de acción alternativas cuando es imposible predecir con exactitud cuáles serán las consecuencias de cada una de ellas.

Como instrumento de la toma de decisiones, la estadística desempeña un papel importante en áreas tales como la investigación y el desarrollo, y sirve como guía y control de una amplia variedad de campos. Por ejemplo, tanto el gobierno como la industria participan en el desarrollo, prueba y certificación de nuevos fármacos, proceso que a menudo requiere gran número de ensayos estadísticos, (y decisiones), concernientes a la seguridad y efectividad de esos productos.

Puesto que las situaciones en que hay que tomar decisiones complejas requieren casi siempre algún tipo de análisis estadístico, (formal o informal, explícito o implícito), nunca se insistirá lo suficiente en la importancia que tiene la estadística inferencial para el tomador de decisiones.

De hecho, la estadística es la ciencia, pura y aplicada, que crea, desarrolla y aplica técnicas de modo que pueda evaluarse la incertidumbre de inferencias inductivas. (17).

En los problemas de inferencia estadística, el conjunto de todos los valores en consideración, (todos los datos pertinentes), suele llamarse población o universo. En general, cualquier conjunto de datos cuantificables puede llamarse una población si ese conjunto de datos está constituido por todos los valores de interés.

La función de la estadística como auxiliar del tomador de decisiones consiste en ayudarle a decidir sobre: (a) qué información se requiere para un tipo particular de decisión y (b) cuál es la mejor forma de recopilar y analizar esta información con el fin de utilizarla en la toma de decisiones.

Al tratar de decidir que información se requiere acerca de una población para tomar un decisión, se refiere a ciertas características numéricas que distinguen a esa población. Dichas características numéricas, llamadas parámetros poblacionales, o simplemente parámetros, describen propiedades específicas de la población.

Puesto que con frecuencia es imposible la determinación del valor exacto de los parámetros de una población, las características de una población dada, suelen juzgarse observando una muestra, constituida por una parte de todos los valores posibles. Las características numéricas de las muestras se llaman estadísticos muestrales o estimadores de los parámetros que describen a la población.

Las gráficas y diagramas, que son los medios más popularizados y, a menudo, los más convenientes para presentar los datos, se emplean cuando se desea tener una respuesta visual de la totalidad o de la mayor parte de la información.

La medida de posición central más común, sin duda alguna, es la media aritmética, que también puede llamarse promedio. La media de un conjunto de números no es más que la suma de todos los valores considerados, dividido entre el número total de valores del conjunto. Dentro de las medidas de tendencia central también se encuentra la moda y la mediana, siendo sólo éstas medidas de localización.

Puesto que hay varias formas de medir la dispersión, consideremos algunas de las propiedades que debe tener una buena medida. Un buen índice de dispersión requiere ser independiente de la media de los datos. Esta propiedad implica que si se suma (o se resta), una constante a cada uno de los valores de un conjunto de observaciones, tal transformación no debe influir en la medida de dispersión. Además, para que fuese más útil, una medida de dispersión debe tomar en cuenta todas las observaciones, y no solo algunos valores seleccionados tales como el mayor y el menor.

La varianza se considera como el promedio de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media; con el cuadrado se evita el problema propio de las desviaciones ordinarias en relación con la media, ya que su suma es igual a cero. Como se indico, este índice tiene todas las propiedades de una medida de dispersión. Por esta razón, el método tradicional para medir la variabilidad de un conjunto de datos consiste en obtener la varianza.

Para describir la variabilidad, en vez de la varianza se usa con mucha frecuencia la raíz cuadrada de ésta, llamada desviación estándar (D.E.). La desviación estándar es, por lo general, más conveniente que la varianza para interpretar la variabilidad de un conjunto de datos, ya que la varianza está expresada en unidades al cuadrado, en tanto la desviación estándar tiene las mismas unidades que los datos originales.

El coeficiente de variación (C.V.) se define por la desviación estándar de la muestra, expresada como porcentaje de la media muestral.(18). Es una medida de la dispersión, expresada en porcentaje, que permite la comparación de datos con distintas unidades.

Cuando se considera la relación lineal de dos variables digamos X y Y nos interesan:

La Pendiente de la recta que es el número de unidades que aumenta (o disminuye) Y por cada unidad que aumenta X, puede ser positiva o negativa (o cero) y entera o fraccionaria.(18).

Ordenada al origen que es el valor de Y cuando X toma el valor de cero.(18).

El método de mínimos cuadrados consiste en encontrar los estimadores de un modelo lineal de una recta, tales que minimicen la suma cuadrada del error (S.C. Error).

La idea de estimar los parámetros del modelo es de tal forma que se minimice la diferencia con el modelo real de aquí que la mínima suma de cuadrados que corresponde a los estimadores producidos por el método de mínimos cuadrados recibe el nombre de S.C. del Error.

Coefficiente de correlación que es una medida de la asociación entre dos variables. (18).

El Coeficiente de determinación que es el cuadrado del coeficiente de correlación. Se usa como una medida de la bondad del ajuste de los datos a la recta, ya que a mayor coeficiente de determinación menor es la suma de cuadrados del error. (18).

Si estamos dispuestos a suponer que un modelo probabilístico representa adecuadamente una situación dada, el siguiente paso es tratar de llegar a conclusiones sobre la estructura del modelo usando los datos; es decir, inferir sobre la población usando la muestra que se tiene. Una de las formas en que esto puede hacerse, es mediante una dócima de hipótesis.* En su contexto más general, una hipótesis estadística es una aseveración sobre un modelo probabilístico y una dócima de hipótesis es un método para determinar sobre la plausibilidad de esa aseveración, usando la muestra como guía.

Otro concepto que se usa para reforzar la estimación de parámetros, es el de Intervalos de Confianza, los cuales permitirán dar una idea acerca de los valores límite en donde fluctúa el posible valor real de un parámetro.

Una de las ventajas de los intervalos de confianza, es que puede expresarse la incertidumbre de la estimación respecto al verdadero valor del parámetro poblacional. Otra ventaja es que sirven para verificar la validez de cualquier suposición hecha acerca del valor de un parámetro poblacional. Tal valor supuesto viene a ser lo que se llama una hipótesis estadística. La determinación de la validez de una suposición de esta naturaleza se llama dócima de una hipótesis estadística, o simplemente docimasia de hipótesis, como se mencionó anteriormente. (8). El propósito principal de la docimasia de hipótesis es hacer posible una elección adecuada entre dos hipótesis que se refieren al valor de un parámetro poblacional.

* También se le da el nombre de "prueba estadística de hipótesis" o de "verificación de hipótesis".

Al especificar las hipótesis referentes a los valores que puede tener un parámetro poblacional es conveniente distinguir entre las hipótesis simples y las compuestas. En una hipótesis simple sólo se especifica un valor del parámetro poblacional. Las hipótesis compuestas, en cambio, no especifican solo un valor, sino un recorrido de valores que puede tomar el parámetro poblacional. En el primer caso, sólo es necesario determinar si el parámetro poblacional es o no igual al valor especificado, mientras que en el segundo caso se hace necesario determinar si el parámetro poblacional toma o no toma algún valor de los de un conjunto que puede ser muy grande, (o incluso infinito).

Las dos hipótesis en conflicto, (mutuamente excluyentes) que figuran en una dócima se llaman hipótesis nula e hipótesis alternativa. El término "hipótesis nula" proviene de los primeros estudios sobre la teoría de la docimasia de hipótesis, donde esta hipótesis se refería a un valor que, según presumía el investigador, no correspondía al verdadero valor del parámetro poblacional (de ahí la palabra "nula", que significa no válida, vacía o carente de valor). La hipótesis alternativa especifica generalmente los valores del parámetro que en opinión del investigador tiene validez.

El problema de decisión que se trata de resolver en la docimasia de hipótesis es el de escoger una entre dos proposiciones mutuamente excluyentes que se refieren a un parámetro poblacional, en una situación de incertidumbre proveniente del muestreo realizado en una población. Para elegir entre aceptar la hipótesis nula (lo que equivale a rechazar la alternativa), o rechazar la hipótesis nula, el tomador de decisiones tiene como única base la evidencia muestral.

Más aún, puesto que la decisión de aceptar o rechazar la hipótesis nula se basa en probabilidades y no en certezas, al tomar la decisión existen posibilidades de error. Específicamente, existen dos tipos de error:

- 1.- Puede ocurrir que se rechace la hipótesis nula, siendo que es verdadera, (error tipo I).
- 2.- Puede ocurrir que se acepte la hipótesis nula, siendo que no es verdadera, (error tipo II).

En la docimasia de hipótesis pueden intervenir muchos parámetros poblacionales diferentes, muchas formas potenciales diferentes de las hipótesis, así como muy diversos estadísticos variables aleatorias y distribuciones. Sin embargo, en todas ellas se sigue un procedimiento similar que puede aprenderse y aplicar a las diferentes situaciones que surjan. El procedimiento puede resumirse en los cinco pasos siguientes:

- 1.- Plantear la hipótesis nula y la alternativa.
- 2.- Determinar el estadístico para la d6cima.
- 3.- Determinar la regi6n cr6tica.
- 4.- Calcular el valor del estadístico usado en la d6cima.
- 5.- Tomar la decisi6n estadística e interpretar.

EL ANALISIS DE VARIANZA. (7)

El método de análisis para experimentos que contienen diversas variables independientes puede explicarse desarrollando intuitivamente el procedimiento del modelo lineal. Se inicia presentando una explicaci6n l6gica de un procedimiento que se conoce como análisis de varianza.

Como el nombre lo indica, el procedimiento de análisis de varianza trata de analizar la variaci6n de una respuesta y de asignar porciones, (componentes), de esta variaci6n a cada una de las variables de un conjunto de variables independientes. El razonamiento se basa en que la variable de respuesta se modifica por la variaci6n de alg6n conjunto de variables independientes desconocidas. Como el investigador raras veces concluirá, si alguna vez lo hace, todas las variables que afectan a la respuesta en un experimento, es posible observar una variaci6n aleatoria en la respuesta, a6n cuando se mantengan constantes todas las variables independientes consideradas. El objetivo del análisis de varianza es identificar variables independientes importantes en un estudio y determinar como interact6an y afectan a la respuesta.

Considérese una situaci6n en la que se desea estudiar el efecto de dos factores A y B sobre alguna respuesta. El término factor se emplea en sentido general para indicar cualquier aspecto del experimento tal como temperatura, tiempo etc. y que puede

modificarse entre un ensayo y otro. Tratamientos son las diferentes clasificaciones de las variables. Nivel son los tratamientos de un factor o interacción que es la combinación de tratamientos.

Para un caso particular del análisis de 2 analistas en dos diferentes días y con 3 replicas cada uno, se realiza el análisis de varianza que se describe a continuación:

El modelo hipotético que representa este caso es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \gamma_i + B_j + (\gamma B)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

$$i = 1, 2, \dots, a$$

$$j = 1, 2, \dots, b$$

$$k = 1, 2, \dots, c$$

Donde se definen las siguientes sumas:

$$Y_{...} = \sum_i \sum_j \sum_k Y_{ijk}$$

$$Y_{i..} = \sum_j \sum_k Y_{ijk}$$

$$Y_{.j.} = \sum_i \sum_k Y_{ijk}$$

$$Y_{ij.} = \sum_k Y_{ijk}$$

i = número de analistas

j = número de días

k = número de replicas por día y por analista

Por medio de la tabla de análisis de varianza correspondiente se pueden realizar las siguientes comparaciones:

- (1) H_0 : Todas las interacciones son iguales o no existe efecto combinado de los dos factores.

Si esta hipótesis no se rechaza es claro que los factores son independientes, por lo tanto nos ocuparemos a revisar el efecto por cada factor; de lo contrario no es posible analizar a los factores, pues existe un tratamiento combinado que es determinante en el experimento.

Para revisar cada uno de los factores utilizamos las siguientes hipótesis:

- (2) H_0 : Todos los niveles del factor A (analista) son iguales.

Si esta hipótesis se rechaza nos indica que existe un tratamiento que se comporta de diferente manera y habrá que estudiarlo.

La otra hipótesis será:

- (3) H_0 : Todos los niveles del factor B (día) son iguales.

Nuevamente si la hipótesis se rechaza la metodología es la misma.

La metodología para analizar estas dósimas sería la siguiente:

consideremos:

$$a * b * c = N$$

Suma de Cuadrados del Factor A= SC_A

$$SC_A = \frac{\sum Y_{i..}^2}{bc} - \frac{Y^2...}{N}$$

Suma de Cuadrados del Factor B= SC_B

$$SC_B = \frac{\sum Y^2_{.j.}}{ac} - \frac{Y^2...}{N}$$

Suma de Cuadrados de la Interacción= SC_{AB}

$$SC_{AB} = \frac{\sum Y^2_{ij.}}{c} - SC_A - SC_B + \frac{Y^2...}{N}$$

Suma de Cuadrados del Error= SCE

$$SCE = \sum_j \sum_k \sum_l Y^2_{ijk} - \frac{Y^2_{ij.}}{c}$$

Los cálculos para un experimento de dos factores con n replicaciones, se presenta a continuación:

FACTOR DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	Fcalculada
FACTOR A	a-1	SC _A	SC _A /a-1	CM _A /CME
FACTOR B	b-1	SC _B	SC _B /b-1	CM _B /CME
FACTOR DE INTERACCION AB	(a-1)(b-1)	SC _{AB}	$\frac{SC_{AB}}{(a-1)(b-1)}$	CM _{AB} /CME
ERROR	ab(c-1)	SCE	$\frac{SCE}{ab(c-1)}$	

Para realizar la d6cima (1) comparamos:

$$F_{\text{experimental}} = CM_A / CME$$

$F_{\text{te6rica}} = F$ (0.95, g.l. AB, g.l. E), y si esta es mayor se rechaza la hip6tesis.

Para la d6cima (2) se compara:

$$F_{\text{experimental}} = CM_B / CME$$

$F_{\text{te6rica}} = F$ (0.95, g.l. A, g.l. E), y si esta es mayor se rechaza la hip6tesis.

Para la d6cima (3) se compara:

$$F_{\text{experimental}} = CM_{AB} / CME$$

$F_{\text{te6rica}} = F$ (0.95, g.l. B, g.l. E), y si esta es mayor se rechaza la hip6tesis.

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.

Debido a que los medicamentos que son lanzados al mercado deben cumplir con requisitos de calidad, seguridad y eficiencia clínica para uso adecuado en el tratamiento de un padecimiento, la industria farmacéutica y las autoridades sanitarias han mostrado gran interés en la Validación, tanto de los procesos de fabricación como de los métodos analíticos.

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir, el método debe probarse para determinar su efectividad. La validación incluye una evaluación de la Precisión, Linearidad y Exactitud, y proporciona una medida de comportamiento del método.

La validación del método puede definirse 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.

La capacidad se expresa en este caso en términos de parámetros analíticos.

Durante la validación se trabaja inicialmente con el principio activo, para determinar si el método lo detecta adecuadamente, enseguida se cuantifica el principio activo en placebos adicionados, y finalmente se analiza el producto terminado, en donde se evalúa si el procedimiento de manufactura afecta la cuantificación del principio activo.

El criterio de aceptación dependerá de la complejidad del método analítico.

La validación es un cúmulo de experimentos sucesivos con el fin de establecer que tan variable y exacto es el método.

La validación se enfoca a conocer el error de los métodos analíticos y si ese error es menor que el establecido, la técnica se considera validada y adecuada.

Actualmente la validación del método analítico es una parte integral del desarrollo de un medicamento por lo que no es posible considerarlos por separado.

NOTAS:

Es necesario evaluar estadísticamente cada uno de los pasos o experimentos inmediatamente, para conocer si cumple o no con el criterio establecido. Esto tiene por objeto, determinar desde un principio si el método cumple o no con el propósito para el cual esta siendo desarrollado y evitar gasto de tiempo y trabajo innecesario.

Los resultados parciales o finales de la validación pueden dar como conclusión que:

- 1.- El método es confiable y por consiguiente se considera validado.
- 2.- Requiere modificaciones y una vez llevadas a cabo, iniciar o completar la validación.
- 3.- El método no es confiable para cuantificar a la sustancia problema entonces es necesario desarrollar una nueva técnica e iniciar la validación.

REQUISITOS MINIMOS PARA LA VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.

DEFINICIONES:

Linealidad. La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

Intervalo. El intervalo de un método analítico son las concentraciones comprendidas entre los niveles superior e inferior de la sustancia (incluyendo estos niveles), en el cual se ha demostrado que es preciso, exacto y lineal.

Exactitud. La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se han adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

Precisión. La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de Desviación Estándar o del Coeficiente de Variación.

La precisión es una medida del grado de reproductibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

A) Repetibilidad: Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos aparatos y técnicas.

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

Límite de Detección. Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

Limite de Cuantificación. Es la menor concentración de la sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.

Especificidad. Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

Tolerancia. La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, sistemas de elusión, tipos de empaque, condiciones ambientales, etc.

DETERMINACIONES.

Linealidad del Sistema.

Se determina construyendo una curva de calibración de una misma solución patrón utilizando cuando menos 5 diluciones, y haciendo análisis por duplicado para cada dilución.

El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método para propósitos de control de calidad y de seguimiento de la estabilidad de una forma farmacéutica, deberá estar incluida la concentración seleccionada como 100%.

Criterio de aceptación.

Conforme los valores obtenidos sean más próximos a los parámetros que se dan a continuación, el sistema será más aceptable:

ordenada al origen (b)=0
coeficiente de correlación $(r) \geq 0.99$
coeficiente de determinación $(r^2) \geq 0.98$
pendiente de la recta (m)=1.

Precisión del Sistema.

Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema.

Criterio de aceptación.

Se considera un valor límite dentro de la comparación, de manera que se espera sea menor a este valor.

coeficiente de variación (C.V.) $\leq 1.5\%$

Linealidad del Método.

Se determina con placebos adicionales del principio activo, (placebos cargados), cada uno de manera independiente, cuando menos a tres diferentes concentraciones incluyendo el 100%, haciendo los análisis por triplicado de cada concentración.

La amplitud del método dependerá del uso y aplicaciones del método (control de calidad y estabilidad) y preferentemente deberá llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

Criterio de aceptación.

Para Cantidad Adicionada vs. Cantidad Recuperada se esperan los siguientes valores:

ordenada al origen (b)=0
coeficiente de correlación (r) \geq 0.99
coeficiente de determinación (r^2) \geq 0.98
pendiente de la recta (m)=1.

Por ciento recuperado: En el intervalo para la media, debe localizarse el 100%.

El C.V. dependerá del tipo de método y la muestra, hay que tomar en cuenta la forma farmacéutica y la concentración, así se espera para:

<u>Método.</u>	<u>C.V.</u>
Cromatográficos	2%
Químicos y Espectrofotométricos	3%
Microbiológicos	5%

Exactitud al 100%.

Se debe cuando menos analizar 6 placebos cargados con el 100% del principio activo, de manera independiente, por el mismo analista y en las mismas condiciones de operación.

Criterio de aceptación.

El I.C. para la media, debe incluir el 100%.

El C.V. debe cumplir con los criterios establecidos en la linealidad del método.

Precisión. (Reproducibilidad).

Se debe llevar a cabo cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado cada muestra.

Trabajar de manera independiente partiendo de una muestra homogénea del producto cercana al 100% de la concentración teórica.

Criterio de aceptación.

El C.V. debe cumplir con los fines para los cuales el método será utilizado, esperando los siguientes resultados:

<u>Método.</u>	<u>C.V.</u>
Cromatográficos	2%
Químicos y Espectrofotométricos	3%
Microbiológicos	5%

Por otra parte se establecerán las fuentes de variación de manera independiente para cada método. Esto se logra mediante una prueba estadística adicional (análisis de varianza) para la prueba de precisión específicamente REPRODUCIBILIDAD.

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL.

El trabajo experimental realizado, consistió en la validación y comparación estadística de dos métodos analíticos para la determinación cuantitativa de Pirazinamida en Tabletas, una determinación por espectrofotometría en la región ultravioleta y otro por cromatografía en capa delgada (CCD) que se lee en la región ultravioleta, con la finalidad de que ambos métodos proporcionen un análisis similar y confiable.

La comparación estadística de reproducibilidad se realizó en base a un modelo lineal de un análisis de varianza, el cual nos permite identificar las posibles interacciones entre variables.

El método espectrofotométrico se basa en la absorción de la Pirazinamida en una longitud de onda de 268 nm (método oficial USP XXII, FNEUM 5ª Ed.).

El método por CCD desarrollado, consiste en la separación de la Pirazinamida de los demás componentes de la formulación y de los productos de degradación y su cuantificación por espectrofotometría U.V.

**METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR
PIRAZINAMIDA POR ESPECTROFOTOMETRIA U.V. EN
PRODUCTO TERMINADO (TABLETAS).**

Preparación de Referencia: Preparar una solución de la Sustancia estándar (estándar secundario) en agua destilada que contenga 7.4 mcg/ml de Pirazinamida.

Preparación de la muestra: Pesar no menos de 20 tabletas, determinar el peso promedio y triturar a polvo fino.

Pesar el equivalente a 61.6 mg de Pirazinamida y transferir a un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar 50 ml de agua destilada, dejar reposar 10 minutos, agitar. Llevar a volumen con agua destilada y mezclar.

Filtrar a través de un filtro y descartar los primeros mililitros del filtrado. Transferir una alícuota de 3 ml del filtrado a un matraz volumétrico de 250 ml, llevar a volumen con agua destilada y mezclar.

Obtener la Absorbancia de ambas preparaciones, a una longitud de onda de 268 nm, usando celdas de 1 cm y agua destilada como blanco.

Obtener los mg de Pirazinamida/Peso Promedio, utilizando la fórmula siguiente:

$$\frac{Am * C * P * PE}{As * Z}$$

$$As * Z$$

donde:

Am= Absorbancia de la muestra.

As= Absorbancia del estándar.

C= Peso del estándar en mg.

P= Peso promedio (mg).

Z= Peso muestra (mg).

PE= Potencia del estándar.

Especificidad:

Con los componentes de la muestra (placebo), se procedió de acuerdo al método descrito, realizando posteriormente un barrido en la región ultravioleta del espectro con el objeto de comprobar la habilidad del método para obtener una respuesta debida sólo a la muestra de interés (principio activo).

**METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR
PIRAZINAMIDA POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA EN
PRODUCTO TERMINADO (TABLETAS).**

Preparación del Sistema Eluente: (6)

Preparar en un matraz volumétrico de 200 ml, una solución de hidróxido de amonio concentrado: metanol (1.5 : 100).

Preparación de Referencia: Preparar una solución de la sustancia de referencia (estándar secundario) en metanol que contenga 3.2 mg/ml de Pirazinamida.

Preparación de la muestra: Pesar no menos de 20 tabletas, determinar el peso promedio y triturar a polvo fino.

Pesar el equivalente a 80.0 mg de Pirazinamida y transferir a un matraz volumétrico de 25 ml, disolver en metanol RA, llevar a volumen y agitar con vortex durante 2 minutos.

Procedimiento:

Saturar 1 hora antes la cámara cromatográfica con el sistema eluente, conteniendo internamente papel filtro de poro ancho.

Dividir en 5 carriles la cromatoplaça de Sílica Gel G-254 (indicador de fluorescencia) de 0.25 mm de espesor.

Aplicar por duplicado 50 mcl de la solución de la muestra y de la solución estándar de referencia, en un carril aplicar el disolvente.

Meter la placa a la cámara y permitir que el frente del sistema corra 15 cm a partir del punto de aplicación de las soluciones. Sacar la cromatoplaça y dejar que el disolvente se evapore. Identificar bajo la acción de una lámpara de luz ultravioleta las manchas correspondientes a la Pirazinamida con un Rf de 0.7.

Raspar la sílica correspondiente a las manchas y transferir cuantitativamente a tubos de ensaye previamente identificados. Reconstituir volumétricamente con 20 ml de agua destilada.

Agitar con vortex durante 3 minutos, filtrar a través de papel filtro Whatman No.42.

Ajustar el espectrofotómetro con el blanco a una longitud de onda de 268 nm, usando celdas de cuarzo de 1 cm.

Determinar las absorbancias de la solución de la muestra y solución estándar de referencia.

Cálculos.

Calcular los mg de Pirazinamida/Peso Promedio, utilizando la siguiente formula:

$$\frac{A_m * C * P * PE}{A_s * Z}$$

donde:

A_m= Absorbancia de la muestra.

A_s= Absorbancia del estándar.

C= Peso del estándar en mg.

P= Peso promedio (mg).

Z= Peso muestra (mg).

PE= Potencia del estándar.

Especificidad:

Un método indicador de estabilidad al igual que un método de control de calidad deben ser específicos, esto quiere decir que la respuesta esté únicamente dada por la sustancia de interés, para métodos cromatográficos se dice que un método es específico cuando es capaz de separar la sustancia de interés de sus productos de degradación, además de cuantificar a este.

En este trabajo se realizaron diferentes pruebas para desarrollar el método por cromatografía en capa fina.

El sistema cromatográfico con el que se trabajó es el reportado en Analytical Profiles of Drug Substances, Florey, 1983.

Fase Estacionaria: Sílica Gel G-254 de 0.25 mm de espesor.

Fase Móvil: Solución concentrada de hidróxido de amonio:metanol (1.5:100).

Revelador: Luz Ultravioleta.

Para obtener los productos de degradación, se sometieron muestras de principio activo, placebo y producto terminado a las siguientes condiciones:

Condición	Principio activo	Placebo	Producto terminado
Reflujo HCl 0.1N	3 h.	3 h.	3 h.
Reflujo NaOH 0.1N	0.5 h.	0.5 h.	0.5 h.
Luz solar.	60 días.	60 días.	60 días.
H ₂ O ₂ al 30% 21 lb/in ² , 123°C	1.5 h.	1.5 h.	1.5 h.
Luz U.V.	60 días.	60 días.	60 días.
80°C	15 días.	15 días.	15 días.

CAPITULO IV

RESULTADOS

VALIDACION DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO.

Linealidad del sistema.

Se determinó construyendo una curva de calibración de concentración de Pirazinamida contra la respuesta analítica, partiendo de una misma solución stock (0.37 mg/ml), haciendo diluciones al 40%, 80%, 100%, 120% y 140% de la concentración adecuada para su análisis, realizando análisis por duplicado para cada dilución.

Los datos obtenidos se presentan a continuación:

	Conc. Pirazinamida (mcg/ml)	ABSORBANCIA
40%	2.96	0.180
	2.96	0.182
80%	5.92	0.377
	5.92	0.376
100%	7.40	0.471
	7.40	0.472
120%	8.88	0.567
	8.88	0.568
140%	10.36	0.663
	10.36	0.660

Al graficar Absorbancia contra Concentración se obtiene los siguientes resultados:

$$b = -0.0097, \quad r = 0.9999, \quad r^2 = 0.9999,$$

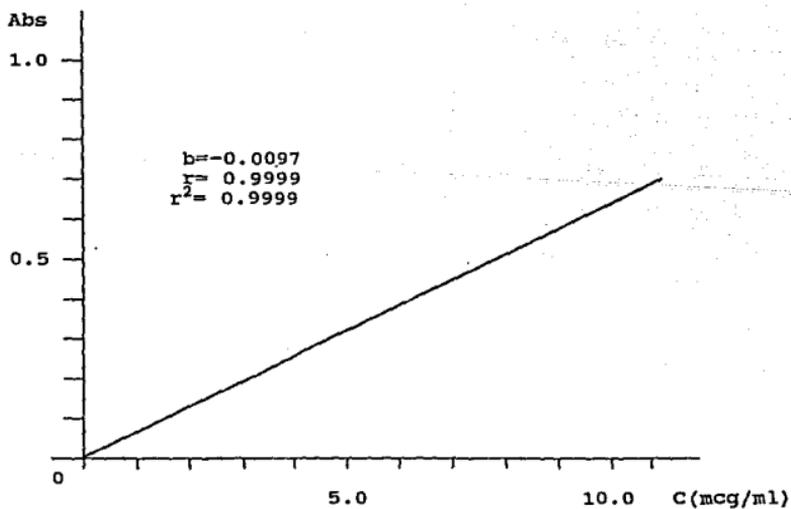
Criterio de aceptación: Debe cumplirse lo siguiente:

$$r \geq 0.99, \quad r^2 \geq 0.98, \quad b \neq 0,$$

Dictamen:

Ya que $b \neq 0$, $r > 0.99$ y $r^2 > 0.98$, si cumple con los criterios para linealidad del sistema en el intervalo de las cantidades empleadas.

REPRESENTACION GRAFICA DE LA LINEARIDAD DEL SISTEMA (Abs vs Conc)
DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA CUANTIFICAR PIRAZINAMIDA EN
TABLETAS



Precisión del Sistema.

Se determinó por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar de Pirazinamida correspondiente al 100% de la Linearidad de Sistema (7.4 mcg/ml).

Los datos obtenidos se presentan a continuación:

Absorbancia

	0.470
	0.469
C.V.= 0.30%	0.468
	0.470
	0.471
	0.472

Criterio de aceptación. Se debe cumplir que el:

$$C.V. \leq 1.5\%$$

Dictamen:

El coeficiente de variación es menor a 1.5%, por lo tanto el sistema es preciso.

Linealidad del Método.

Se determinó con placebos adicionados del principio activo, cada uno de manera independiente, a 5 diferentes concentraciones; 40%, 80%, 100%, 120% y 140%, haciendo análisis por triplicado para cada concentración.

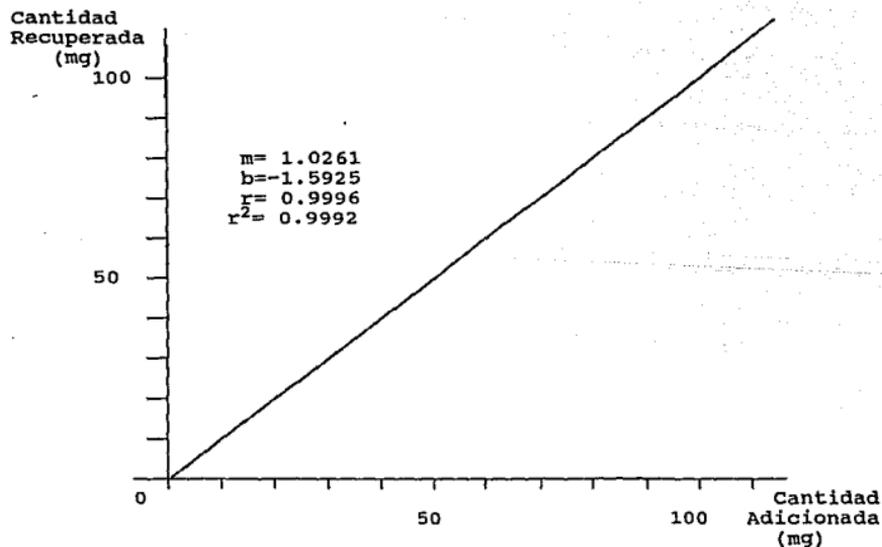
Los datos obtenidos se presentan a continuación:

Cantidad Adicionada (mg)	Cantidad Recuperada (mg)	% Recuperado
24.60	24.09	97.9
25.00	24.39	96.7
24.60	24.59	99.9
49.80	49.30	98.9
49.40	48.10	97.8
50.00	48.56	97.1
61.60	61.10	99.2
61.60	61.35	99.6
61.70	61.40	99.5
74.30	75.14	101.1
73.50	73.15	99.5
73.90	74.53	100.8
86.80	88.18	101.6
87.70	88.79	101.2
86.20	87.18	101.1

Al graficar Cantidad Recuperada contra Cantidad Adicionada se obtienen los siguientes datos:

$$m = 1.0261, \quad b = -1.5925, \quad r = 0.9996, \quad r^2 = 0.9992$$

REPRESENTACION GRAFICA DE LA LINEARIDAD DEL METODO
(CANTIDAD ADICIONADA vs CANTIDAD RECUPERADA)
DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA CUANTIFICAR PIRAZINAMIDA EN
TABLETAS



Criterio de aceptación, se debe cumplir que:

$$m=1, \quad b=0, \quad r^2 \geq 0.98$$

Dictamen:

Ya que $b \approx 0$, $r^2 > 0.98$ y $m \approx 1$ si cumple con los criterios para linealidad del método en el intervalo de las cantidades empleadas.

De acuerdo al por ciento recuperado:

$$\bar{X} = 99.52, \quad D.E. = 1.45, \quad I.C. = (98.71-100.32) \text{ al } 95 \% \quad C.V. = 1.46 \\ t (14 \text{ g.l.}, 97.5 \%) = 2.1448$$

Criterio de aceptación:

En el intervalo de confianza para la media debe localizarse el 100% de recuperado.

$$C.V. \leq 3.0\%$$

Dictamen:

El método es lineal en el intervalo de cantidades ensayadas, ya que cumple con los criterios.

Exactitud.

Se determinó con 6 placebos adicionados del principio activo al 100%, de manera independiente.

Los datos obtenidos se presentan a continuación:

Cantidad Adicionada (mg)	Cantidad Recuperada (mg)	% Recuperado
61.20	61.75	100.90
61.60	62.24	101.04
61.20	62.37	102.01
61.70	62.12	100.68
61.30	61.25	99.92
61.60	61.10	99.24

\bar{X} = 100.63, D.E. = 0.9575, I.C. = (99.62-101.63) al 95 %,
C.V. = 0.95%

Criterio de aceptación:

El intervalo de confianza para la media debe incluir el 100% y el coeficiente de variación debe ser menor a 3%.

Dictamen:

Ya que el intervalo de confianza para la media se localiza el 100% y C.V. < 3%, el método es exacto.

Precisión del Método (Reproducibilidad).

Se llevó acabo por dos analistas en dos diferentes días, analizando una misma muestra por triplicado y utilizando el mismo equipo.

Los datos obtenidos se presentan a continuación:

ANALISTA			
		1	2
		D	1
	98.34	99.90	
I	98.21	100.10	
A	2	99.56	99.30
		99.94	99.65
		99.52	98.68

C.V.= 0.66%

Criterio de aceptación, se debe cumplir que:

C.V. \leq 3%

Dictamen:

El coeficiente de variación es menor a 3%, por lo tanto el método es reproducible.

ANALISIS DE VARIANZA.

Hipótesis:

- (1) Ho: El método espectrofotométrico no se ve afectado por la combinación de un día y un analista determinado.
- (2) Ho: El método espectrofotométrico es reproducible sin importar los analistas.
- (3) Ho: El método espectrofotométrico es reproducible sin importar los días.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculada	F Teórica
Analista	1	0.05	0.05	0.03	7.57
Día	1	0.10	0.10	0.02	7.57
Analista/ Día	1	1.06	1.06	0.27	7.57
Error	8	3.81	3.81		

Criterio de rechazo:

$$\text{Si } F_{\text{calculada}} > F_{\text{teórica}}$$

Dictamen para la hipótesis (1):

$$F_{\text{teórica}} > F_{\text{calculada}}$$

Por lo tanto no se rechaza la hipótesis de la combinación de los analista con los días, esto quiere decir que no existe un efecto combinado de días con analistas, lo cual sugiere revisar cada una de las otras hipótesis por separado.

Dictamen para la hipótesis (2):

$$F_{teórica} > F_{calculada}$$

Por lo tanto no se rechaza la hipótesis, lo que sugiere que es reproducible el método indistintamente por cualquier analista.

Dictamen para la hipótesis (3):

$$F_{teórica} > F_{calculada}$$

Por lo tanto no se rechaza la hipótesis, lo que nos dice que no importa que día se realice el análisis.

ESPECIFICIDAD

Resultado:

Al realizar el barrido en la región visible del espectro, no se presentó ninguna absorbancia (figura 8).

Por lo tanto queda comprobado que el método es específico, ya que dará una respuesta debida solo a la sustancia de interés (principio activo).

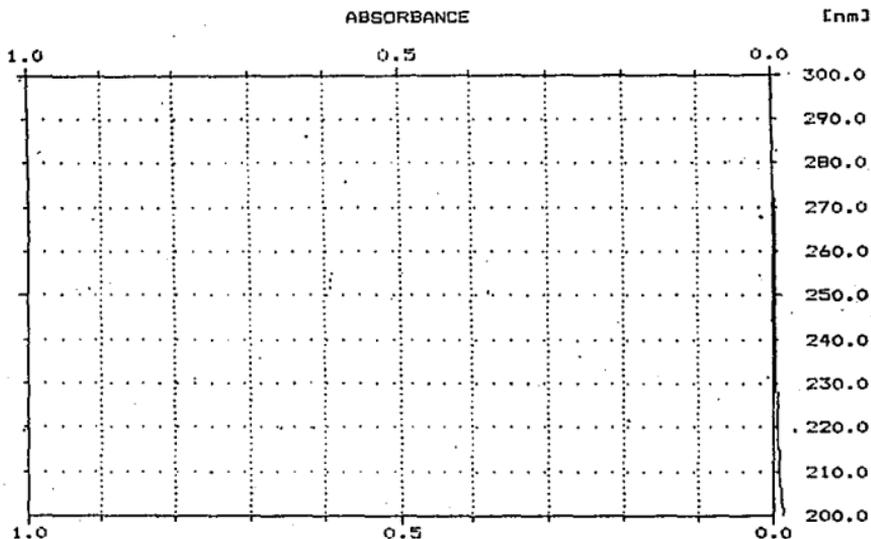


fig 8. Espectro de Absorción en la región U.V. de placebo de Pirazinamida Tabletas.

VALIDACION DEL METODO CROMATOGRAFICO.

Linealidad del Sistema..

Se determinó construyendo una curva de calibración de concentración de Pirazinamida contra la respuesta analítica, partiendo de una misma solución stock (3.19 mg/ml), utilizando diluciones al 40%, 80%, 100%, 120% y 140%, realizando análisis por duplicado para cada dilución.

Los datos obtenidos se presentan a continuación:

	Conc. Pirazinamida (mcg/ml)	ABSORBANCIA
40%	3.19	0.206
	3.19	0.189
80%	6.38	0.369
	6.38	0.377
100%	7.98	0.501
	7.98	0.515
120%	9.57	0.599
	9.57	0.614
140%	11.17	0.724
	11.17	0.705

Al graficar Absorbancia contra Concentración se obtiene lo siguiente:

$$b = -0.022, \quad r = 0.9969, \quad r^2 = 0.9938,$$

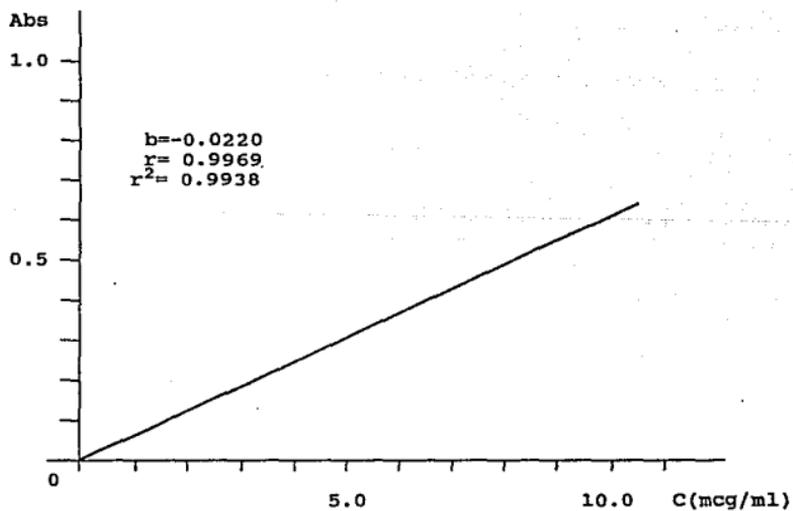
Criterio de aceptación:

$$r \geq 0.99, \quad r^2 \geq 0.98, \quad b=0,$$

Dictamen:

Ya que $b \approx 0$ $r > 0.99$ y $r^2 > 0.98$, si cumple con los criterios para linealidad del sistema en el intervalo de las cantidades empleadas.

REPRESENTACION GRAFICA DE LA LINEARIDAD DEL SISTEMA (Abs vs Conc)
DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CUANTIFICAR PIRAZINAMIDA EN TABLETAS



Precisión del Sistema.

Se determinó por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar de Pirazinamida correspondiente al 100% de la Linearidad de Sistema (7.98 mcg/ml).

Los datos obtenidos se presentan a continuación:

Absorbancia

	0.511
	0.506
	0.509
C.V.= 0.95%	0.506
	0.497
	0.506

Criterio de aceptación.

$$C.V. \leq 1.5\%$$

Dictamen:

El coeficiente de variación es menor a 1.5%, por lo tanto el sistema es preciso.

Linealidad del Método.

Se determinó con placebos adicionados del principio activo, cada uno de manera independiente, a 5 diferentes concentraciones; 40%, 80%, 100%, 120% y 140%, haciendo análisis por triplicado para cada concentración.

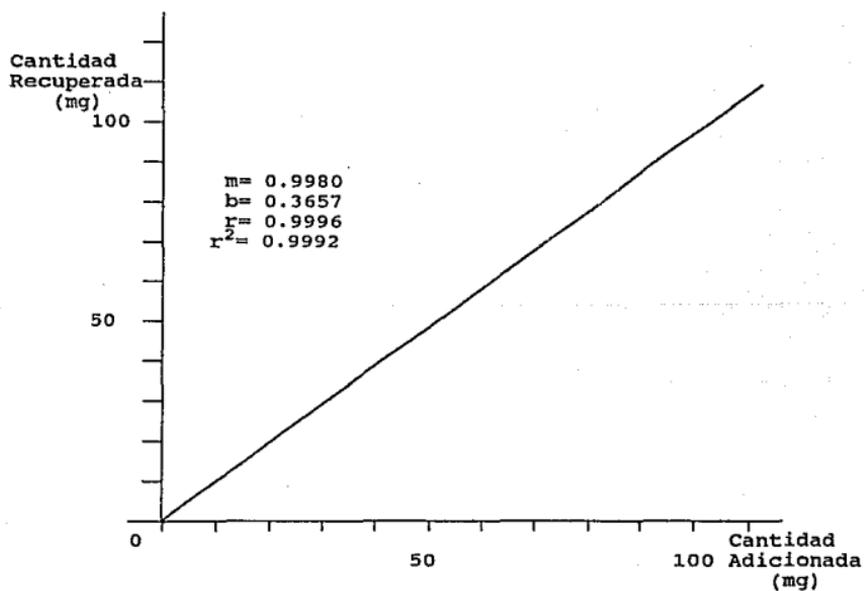
Los datos obtenidos se presentan a continuación:

Cantidad Adicionada (mg)	Cantidad Recuperada (mg)	% Recuperado
31.80	31.96	100.50
31.90	31.96	100.12
31.70	31.89	100.60
63.70	64.90	101.88
63.80	65.05	101.96
64.00	65.04	101.62
79.90	79.70	100.00
79.60	79.19	99.48
79.70	78.30	98.24
96.10	95.43	99.30
96.10	95.75	99.63
96.00	96.84	100.34
112.00	112.03	100.02
111.70	111.49	99.81
111.20	112.62	101.46

Al graficar Cantidad Recuperada contra Cantidad Adicionada se obtienen los siguientes datos:

$$m = 0.9980, \quad b = 0.3657, \quad r = 0.9996, \quad r^2 = 0.9992$$

REPRESENTACION GRAFICA DE LA LINEARIDAD DEL METODO
(CANTIDAD ADICIONADA vs CANTIDAD RECUPERADA)
DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA CUANTIFICAR PIRAZINAMIDA EN TABLETAS



Criterio de aceptación, se debe cumplir que:

$$m=1, \quad b=0, \quad r^2 \geq 0.98$$

Dictamen:

Ya que $b \approx 0$, $r^2 > 0.98$ y $m \approx 1$, cumple con los criterios para linealidad del método en el intervalo de las cantidades empleadas.

De acuerdo al por ciento recuperado:

Resultados:

$$\bar{X} = 100.36, \quad D.E. = 1.05, \quad I.C. = (99.78-100.94) \text{ al } 95 \% \quad C.V. = 1.05 \\ t (14 \text{ g.l. } 97.5 \%) = 2.1448$$

Criterio de aceptación:

En el intervalo de confianza de la media debe localizarse el 100%.

$$C.V. \leq 3\%$$

Dictamen:

El método es lineal en el intervalo de cantidades ensayadas, ya que cumple con los criterios.

Exactitud.

Se determinó con 6 placebos adicionados del principio activo al 100%, de manera independiente.

Los datos obtenidos se presentan a continuación:

Cantidad Adicionada (mg)	Cantidad Recuperada (mg)	% Recuperado
79.80	79.73	99.41
79.90	80.23	100.41
80.00	80.23	100.29
79.60	83.19	104.51
79.90	79.70	100.00
79.70	78.30	98.24

Resultados:

\bar{X} = 100.56, D.E. = 2.0888, I.C. = (98.37-102.75) al 95 %
C.V. = 2.07%

Criterio de aceptación:

El intervalo de confianza para la media debe incluir el 100% y el coeficiente de variación debe ser menor a 3%.

Dictamen:

Ya que en el intervalo de confianza para la media se localiza el 100% y C.V. \leq 3%, el método es exacto.

Precisión del Método (Reproducibilidad).

Se llevó a cabo por dos analistas en dos diferentes días, analizando una misma muestra por triplicado y utilizando el mismo equipo.

Los datos obtenidos se presentan a continuación:

ANALISTA			
		1	2
		D	1
98.83	99.23		
99.92	100.68		
I	2	100.41	102.02
		101.47	100.54
		99.92	99.15

Resultado:

$$C.V. = 1.09\%$$

Criterio de aceptación, se debe cumplir que:

$$C.V. \leq 3\%$$

Dictamen:

El coeficiente de variación es menor a 3%, por lo tanto el método es reproducible.

ANALISIS DE VARIANZA.

Hipótesis:

- (1) Ho: El método cromatográfico no se ve afectado por la combinación de un día y un analista determinado.
- (2) Ho: El método cromatográfico es reproducible sin importar los analistas.
- (3) Ho: El método cromatográfico es reproducible sin importar los días.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculada	F Teórica
Analista	1	0.81	0.81	0.09	7.57
Día	1	0.93	0.93	0.10	7.57
Analista/ Día	1	0.90	0.90	0.09	7.57
Error	8	9.33	9.33		

Criterio de rechazo:

$$\text{Si } F_{\text{calculada}} > F_{\text{teórica}}$$

Dictamen para la hipótesis (1):

$$F_{\text{teórica}} > F_{\text{calculada}}$$

Por lo tanto no se rechaza la hipótesis de la combinación de los analista con los días, esto quiere decir que no existe un efecto combinado de días con analistas, lo cual sugiere revisar cada una de las otras hipótesis por separado.

Dictamen para la hipótesis (2):

$$F_{teórica} \geq F_{calculada}$$

Por lo tanto no se rechaza la hipótesis, lo que sugiere que es reproducible el método indistintamente por cualquier analista.

Dictamen para la hipótesis (3):

$$F_{teórica} > F_{calculada}$$

Por lo tanto no se rechaza la hipótesis, lo que nos dice que no importa que día se realice el análisis.

ESPECIFICIDAD

Al terminar el tiempo de exposición, las muestras de cada una de las condiciones se aplicaron en el sistema cromatográfico descrito, obteniéndose los siguientes resultados:

Cromatografía en capa delgada para productos de degradación de Pirazinamida.

Materia prima: Pirazinamida.

Fase móvil: $\text{NH}_4\text{OH}:\text{MeOH}$ (1.5:100)

std.	NaOH 0.1 N	HCl 0.1 N	H_2O_2 AL 30 %	Luz Solar	Luz U.V.	80°C
A						
	B					

A: $R_f = 0.70$

B: $R_f = 0.63$

Cromatografía en capa delgada para productos de degradación de Pirazinamida.

Producto terminado: Tabletas de Pirazinamida.

Fase móvil: $\text{NH}_4\text{OH}:\text{MeOH}$ (1.5:100)

std.	NaOH 0.1 N	HCl 0.1 N	H_2O_2 AL 30 %	Luz Solar	Luz U.V.	80°C
A						

A: $R_f = 0.70$

B: $R_f = 0.63$

Cromatografía en capa delgada para productos de degradación de Pirazinamida.

Placebo Tabletas de Pirazinamida.

Fase móvil: $\text{NH}_4\text{OH}:\text{MeOH}$ (1.5:100),

std.	NaOH 0.1 N	HCl 0.1 N	H_2O_2 AL 30 %	Luz Solar	Luz U.V.	80°C
A 						

A: $R_f = 0.70$

Las cromatoplasmas muestran que las condiciones donde hay degradación es en medio alcalino y en medio ácido.

Para corroborar que no existe otro producto de degradación bajo la mancha del principio activo, se raspó esta y se aplicó en otra cromatoplasma y se desarrolló en el sistema formado por $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (20:20:1), observándose como resultado en todos los casos una sola mancha con un $R_f=0.6$, correspondiente a la Pirazinamida. Este experimento comprueba que la mancha con un $R_f=0.7$ en el primer sistema es debido únicamente a la Pirazinamida.

Producto Terminado

Fase móvil: $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (20:20:1)

std.	NaOH 0.1 N	HCl 0.1 N	H_2O_2 AL 30%	Luz Solar	Luz U.V.	80°C
A						

A: $R_f= 0.60$

Materia Prima: Pirazinamida.

Fase móvil: $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (20:20:1)

std.	NaOH 0.1 N	HCl 0.1 N	H_2O_2 AL 30 %	Luz Solar	Luz U.V.	80°C
A						

La prueba de cromatografía en capa fina acompañada del resultado de la absorción en la región U.V., pueden ser usados para obtener datos en un estudio de estabilidad.

Para realizar un trabajo más completo lo ideal sería conseguir los productos de degradación del principio activo y de los excipientes; esto para tener una identificación más objetiva de los mismos; pero esto en México, para la mayoría de los laboratorios es muy difícil debido al costo y dificultad que representa.

COMPARACION ESTADISTICA DE LOS METODOS VALIDADOS.

Para demostrar que los métodos son equivalentes, se comparan los resultados obtenidos utilizando una d6cima de hip6tesis, a trav6s de una t de student tomando en cuenta la siguiente hip6tesis:

H_0 : El m6todo espectrofotom6trico es igual al m6todo cromatogr6fico.

Criterio de rechazo:

$$\text{Si } t_{\text{experimental}} > t_{\text{te6rica}}$$

Linealidad del M6todo.

Tomando los datos de recuperaci6n encontramos:

Resultados.

$$t_{\text{te6rica}} = 2.048$$

$$t_{\text{experimental}} = 1.188$$

Dictamen:

$$t_{\text{experimental}} < t_{\text{te6rica}}$$

Por lo tanto no se rechaza la hip6tesis y las diferencias entre los dos m6todos no son significativas, por ende los m6todos son equivalentes.

Exactitud del Método.

Considerando ahora los datos de recuperación:

Resultados.

$$t_{\text{teórica}} = 2.228$$

$$t_{\text{experimental}} = 1.066$$

Dictamen:

$$t_{\text{experimental}} < t_{\text{teórica}}$$

Por lo tanto no se rechaza la hipótesis y las diferencias entre los dos métodos no son significativas, por ende los métodos son equivalentes.

Precisión del Método.

Aquí es posible tomar los estimadores de las varianzas de ambos métodos y realizar una *décima* que los compare. Esto es posible tomando los estimadores de la tabla de análisis de varianza correspondientes a cada método.

$$\text{La } F_{\text{experimental}} = \text{CME1/CME2}$$

CME 1	CME 2	F calculada	F teórica
3.81	9.33	0.41	4.43

Donde:

CME 1 = Cuadrado medio del error del método U.V.

CME 2 = Cuadrado medio del error del método C.C.D.

g.l. = Grados de libertad.

F de Fisher: Valor a un nivel acumulado de 0.95 con g.l. del error del método U.V. y g.l. del error del método C.C.D.

Dictamen:

$$F_{\text{experimental}} < F_{\text{teórica}}$$

Por lo tanto no se rechaza la hipótesis y las diferencias entre los dos métodos no son significativas, por ende los métodos son equivalentes.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

RESUMEN COMPARATIVO DE MEDIDAS ESTADISTICAS

LINEARIDAD DEL SISTEMA

PARAMETRO	METODO ESPECTROFOTOMETRICO	METODO CROMATOGRAFICO
r	0.9999	0.9969
r ²	0.9999	0.9938
b	-0.0097	-0.0220

PRECISION DEL SISTEMA

PARAMETRO	METODO ESPECTROFOTOMETRICO	METODO CROMATOGRAFICO
C.V.	0.30	0.95

**RESUMEN COMPARATIVO DE MEDIDAS ESTADISTICAS
(CONTINUACION).**

LINEARIDAD DEL METODO.

PARAMETRO	METODO ESPECTROFOTOMETRICO	METODO CROMATOGRAFICO
r	0.9996	0.9996
r ²	0.9992	0.9992
b	-1.5925	0.3657
m	1.0261	0.9980
\bar{X}	99.52	100.36
D.E.	1.4500	1.0524
C.V.	1.46	1.05
I.C. al 95 %	98.71-100.32	99.78-100.94

EXACTITUD DEL METODO.

PARAMETRO	METODO ESPECTROFOTOMETRICO	METODO CROMATOGRAFICO
\bar{X}	100.63	100.56
D.E.	0.9575	2.0888
C.V.	0.95	2.07
I.C. al 95 %	99.62-101.63	98.37-102.75

**RESUMEN COMPARATIVO DE MEDIDAS ESTADISTICAS
(CONTINUACION).**

PRECISION.

PARAMETRO	METODO ESPECTROFOTOMETRICO	METODO CROMATOGRAFICO
\bar{X}	99.35	100.22
C.V.	0.66	1.09
D.E.	0.6739	1.1287

CAPITULO V

CONCLUSIONES.

La idea fundamental del presente trabajo es mostrar la posibilidad de manejar 2 métodos analíticos que puedan aportar los mismos resultados y que en un momento dado se opte por uno u otro, ya que proporcionan los mismos resultados, para ello se realizó una validación con estadística.

Los métodos en estudio espectrofotométrico y cromatográfico para determinar Pirazinamida en tabletas son confiables, ya que ambos cumplen con los requisitos mínimos para la validación de métodos analíticos.

Por medio de los métodos de inferencia estadística, principalmente la dódima y por medio del análisis de varianza se determinó que ninguna de las variables en estudio (analista, día e interacción analista-día), afectan la reproducibilidad de los métodos.

Ambos métodos son equivalentes en los parámetros de linealidad, exactitud y precisión (repetibilidad y reproducibilidad), por lo que la capacidad de ambos métodos satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

En la validación de métodos analíticos la estadística contribuye a garantizar que los resultados obtenidos presentan una confiabilidad aceptable.

Tanto el método espectrofotométrico como el método cromatográfico son específicos para determinar Pirazinamida.

La validación de métodos analíticos es indispensable para demostrar la confiabilidad de un método, durante la validación se corrigieron errores del método y se logra optimizarlo.

La amplitud del estudio dependerá de los fines para los cuales se destine el método analítico, pero todos deben cumplir con una serie de requisitos mínimos.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Johnson E.L. and Stevenson, R., Basic Liquid Chromatography. USA. Varian Associates, Inc. 1978.
- 2.- Mc Nair, Harold. Cromatografía Líquida de Alta Presión OEA, Washinton, D.C. 1973
- 3.- Stahl, E. Thin Layer Chromatography. A Laboratory Handbook. Springer-Verlag, New York.1969.
- 4.- Touchstone, C.J. and Murrel F. Dobbins. Practice of Thin Layer Chromatography. Willey Interscience. New York. 1978.
- 5.- Florey, A. Analitical Profiles of Drug Substances. American Pharmaceutical Association, Vol. 12. 1983.
- 6.- Mendenhall, W. Estadística Matemática con Aplicaciones. Grupo Editorial Iberoamérica. 1989.
- 7.- Harnett, L. Donald. Introducción al Análisis Estadístico. Addison-Wisley Iberoamericana. México, 1987.
- 8.- Validación de Métodos Analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. 1981.
- 9.- Goodman Gilman A., Goodman S. L., Gilman A. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 6ª Edición. Editorial Médica-Panamericana. México, D.F. 1981.

- 10.- Clark, E. Isolation and Identification of Drugs.
The Pharmaceutical-Press. London, Ing. 1974
- 11.- Remington's Pharmaceutical Sciences. 17th. Editor A.R.
Gennaro. Mack Publishing Company. USA. 1985
- 12.- The Unites States Pharmacopeia- National Formulary,
U.S.P. XXII.
- 13.- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 5^a Ed.
Monografias Oficiales.
- 14.- The Merck Index. IX Ed, published by Merck Co, Inc.
Rahway, N.J, 1976.
- 15.- Ama Drug Evaluations. American Medical Association.
Chicago, Illinois. 1980.
- 16.- Steel D.G.R., Torrie J.H. Bioestadística: Principios y
Procedimientos. Ed. Mc Graw-Hill. 1^a Edición. Bogota,
Colombia. 1985. Pg. 2
- 17.- Gil Infante S., Zarate de Lara G. Métodos Estadísticos.
Ed. Trillas. Primera edición. México, 1984. Pg. 76-77,
468, 482, 513-514.