

48
25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

COMPARACION ESTADISTICA DE LA VALIDACION
DE DOS METODOS ANALITICOS PARA CUANTIFICAR
NITROFUZAZONA EN OVULOS

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MARICELA RODRIGUEZ CORONA

MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON
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.

CONTENIDO

INTRODUCCION	1
I. ANTECEDENTES TEORICOS	3
A. Nitrofurazona	3
1. PROPIEDADES FISICAS	3
a. Descripción	3
b. Punto de fusión	3
c. Color	3
2. PROPIEDADES QUIMICAS	3
a. Espectro de Absorción Infraroja	3
b. Fórmula Estructural	4
3. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS	4
a. Solubilidad	4
b. pH	4
c. Constante de Disociación	4
d. Características Espectrofotométricas	5
4. PROPIEDADES FARMACOLOGICAS	5
a. Acción Farmacológica	5
b. Toxicidad	6
c. Metabolismo	7
d. Dosis	7
B. Sistemas Dispersos	8
1. DEFINICION	8
2. CLASIFICACION	8

C. Ovulos	9
1. DEFINICION	9
2. CARACTERISTICAS FISICAS	9
a. Forma	9
b. Color	10
c. Olor	10
d. Dureza	10
e. Temperatura de Fusión	10
f. Tiempo de Licuefacción	11
g. Peso	13
h. Desintegración	13
3. CLASIFICACION	15
a. Anticonceptivos	15
b. Antibacterianos	16
c. Acidificantes de la vagina	16
4. MECANISMO Y MODO DE ACCION	17
5. COMPONENTES	18
a. Bases	18
1) Masas Hidrosolubles de Punto de Fusión	
Elevado	19
2) Masas Hidrosolubles Elásticas	21
6. MODO DE APLICACION	23
7. CONSERVACION	23
8. ACONDICIONAMIENTO	24
D. Cromatografía	25

1. DEFINICION	25
a. Cromatografía	25
b. Fase Estacionaria	25
c. Fase Móvil	25
2. CLASIFICACION	26
a. Líquida o de Partición	26
b. Líquido-Sólido o de Absorción	26
c. Intercambio Iónico	26
d. Exclusión de Tamaño o de Gel	27
e. Fase Enlazada	27
f. Par Iónico	28
g. Fase Normal	28
h. Fase Reversa	28
3. PARAMETROS CROMATOGRAFICOS	29
a. Tiempo de Retención	29
b. Tiempo Muerto	29
c. Tiempo de Retención Corregido	29
d. Factor de Capacidad	30
e. Número de Platos Teóricos	30
f. Altura Equivalente de un Plato Teórico ..	31
g. Factor de Selectividad	32
h. Resolución	32
E. Caracterizaciones de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución.	34

1. FASE MOVIL	34
2. FASE ESTACIONARIA	35
3. INSTRUMENTACION	37
a. Bombas	39
1) Mecánicas	40
2) Por Desplazamiento Continuo	41
3) Neumáticas	42
b. Dispositivos para la Inyección	43
1) Jeringa	44
2) Válvulas	45
c. Columnas	46
d. Detectores	47
1) Índice de Refracción	47
2) Desviación	48
3) Reflexión (Fresnel)	49
4) Ultravioleta (Longitud de onda fija)	49
5) Ultravioleta (Longitud de onda variable)	52
6) Fluorescencia	52
7) Electroquímico	52
8) Arreglo de Fotodiodos	53
F. Validación	55
1. DEFINICION	56
2. PARAMETROS	56

a. Linealidad del Sistema	56
1) Definición	56
2) Determinación	57
3) Cálculos	58
4) Criterios de Aceptación	58
b. Linealidad del Método	59
1) Definición	59
2) Determinación	59
3) Cálculos	60
4) Criterios de Aceptación	62
c. Especificidad	63
1) Definición	63
2) Determinación	63
3) Criterios de Aceptación	64
d. Exactitud	64
1) Definición	64
2) Determinación	65
3) Cálculos	65
4) Criterios de Aceptación	66
e. Precisión	67
1) Definición	67
f. Repetibilidad	67
1) Definición	67
2) Determinación	67
3) Cálculos	67
4) Criterios de Aceptación	68

g. Reproducibilidad	66
1) Definición	68
2) Determinación	68
3) Cálculos	69
4) Criterios de Aceptación	71
3. COMPARACION DE METODOS	71
a. Linealidad del Método	71
1) Cálculos	72
2) Criterios de Aceptación	74
b. Exactitud	74
1) Cálculos	75
2) Criterios de Aceptación	75
c. Repetibilidad	76
1) Cálculos	77
2) Criterios de Aceptación	78
e. Precisión	78
1) Cálculos	78
2) Criterios de Aceptación	79
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	80
III. OBJETIVOS	83
A. Objetivo General	83
B. Objetivos Particulares	83
IV. HIPOTESIS	84
V. DESARROLLO EXPERIMENTAL	85

A. Material, Reactivos y Equipo	85
B. Composición del Óvulo	86
C. Estabilidad de la Muestra	86
D. Método Espectrofotométrico	87
E. Método Cromatográfico de Alta Resolución	88
F. Validación del Método Espectrofotométrico	89
1. Linealidad del Sistema	89
2. Linealidad del Método	89
3. Especificidad	90
4. Exactitud	90
5. Precisión	90
a. Repetibilidad del Método	90
b. Reproducibilidad del Método	90
G. Validación del Método Cromatográfico	91
1. Linealidad del Sistema	91
2. Linealidad del Método	91
3. Especificidad	91
4. Exactitud	92
5. Precisión	92
a. Repetibilidad del Método	92
b. Reproducibilidad del Método	92
VI. RESULTADOS	93
A. Estabilidad de la Muestra.	93
B. Validación del Método Espectrofotométrico	94

1. LINEALIDAD DEL SISTEMA	94
2. LINEALIDAD DEL METODO	97
3. ESPECIFICIDAD	100
4. EXACTITUD	100
5. PRECISION	101
a. Repetibilidad del Método	101
b. Reproducibilidad del Método	102
C. Validación del Método Cromatográfico de Alta	
Resolución	104
1. LINEALIDAD DEL SISTEMA	104
2. LINEALIDAD DEL METODO	107
3. ESPECIFICIDAD	110
4. EXACTITUD	114
5. PRECISION	115
a. Repetibilidad del Método	115
b. Reproducibilidad del Método	115
D. Comparación de Métodos	118
1. LINEALIDAD DEL METODO	118
2. EXACTITUD	120
3. REPETIBILIDAD	121
4. PRECISION	121
VII. ANALISIS DE RESULTADOS	123
VIII. CONCLUSIONES	130
IX. SUGERENCIAS	131
X. REFERENCIAS	132

INDICE DE FIGURAS

Figura No. 1	Espectro de Absorción IR de Nitrofurazona.....	3
Figura No. 2	Espectro de Absorción UV de Nitrofurazona.....	5
Figura No. 3	Formas más comunes de los óvulos.....	9
Figura No. 4	Aparato para Determinar Tiempo de Licuefacción de un óvulo.....	12
Figura No. 5	Aparato para Determinar Tiempo de Desintegra- ción de un óvulo.....	14
Figura No. 6	Esquema del Mecanismo de Acción de un óvulo... ..	18
Figura No. 7	Representación de un Cromatograma.....	29
Figura No. 8	Esquema Representativo de las partes de un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución... ..	38
Figura No. 9	Ley de Beer.....	50
Figura No.10	Linealidad del Sistema (Método Espectro- fotométrico).....	96
Figura No.11	Linealidad del Método (Método Espectro- fotométrico).....	99
Figura No.12	Linealidad del Sistema (Método Cromato- gráfico).....	106
Figura No.13	Linealidad del Método (Método Cromato- gráfico).....	109
Figura No.14	Cromatograma del Placebo para determinar la Especificidad del Método	110
Figura No.15	Cromatograma del Placebo Cargado para determinar la Especificidad del Método.....	111

Figura No.16 Cromatograma del Estándar de Nitrofurazona para determinar la Especificidad del Método	112
Figura No. 17 Cromatograma de una Muestra Expuesta a la luz UV.....	113

INTRODUCCION.

En la actualidad, debido a la inminente apertura del mercado exterior, todos los principios activos de las diferentes formas farmacéuticas deberían incluir la validación del método o métodos para cuantificarlos, independientemente si son indicativos de estabilidad o para control de calidad.

La validación de un método analítico tiene la finalidad de cuantificar a uno o más principios activos de manera que no interfieran los excipientes, productos de degradación y las sustancias generadas por interacciones de los componentes de la formulación, de esta manera es posible asegurar la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados obtenidos.

El diseño de una formulación de óvulos de Nitrofurazona, hace necesario implementar metodologías que permitan cuantificar a dicho activo, y a la vez establecer las condiciones del análisis.

En el presente trabajo, se validaron dos métodos para control de calidad: por cromatografía de líquidos de alta resolución y espectrofotométrico, que cuantifican Nitrofurazona, considerando que ésta forma farmacéutica (óvulos) no es considerada en la Farmacopea Nacional 5a. edición o USP XXII.

Por lo general, la validación de un método para control de calidad incluye una evaluación de la linealidad, precisión, exactitud, estabilidad y especificidad; tales parámetros fueron

considerados para ambos métodos y comparados estadísticamente.
por lo que se establece que ambos son adecuados para el estudio.

I. ANTECEDENTES TEORICOS

A. Nitrofurazona

1. PROPIEDADES FISICAS

a. Descripción.

Polvo cristalino de sabor amargo.

b. Punto de Fusión.

De 236 - 240°C con descomposición.

c. Color.

Amarillo verdoso.

2. PROPIEDADES QUIMICAS.

a. Espectro de Absorción Infrarroja.

Los picos principales estan a 970, 1023, 1200, 1250, 1585 y 1718 nm.(Fig. No.1).

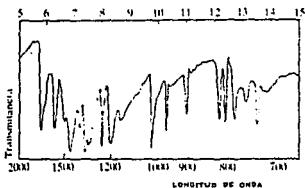
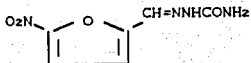


FIGURA No 1. ESPECTRO DE ABSORCION IR DE NITROFURAZONA.

b. Fórmula Estructural.



3. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS.

a. Solubilidad.

1 en 4200 partes de agua.

1 en 600 partes de alcohol.

1 en 350 partes de propilenglicol.

1 en 100 partes de mezclas de macrogol.

Soluble en dimetilformamida.

Insoluble en éter y cloroformo.

b. pH

Una solución al 1% en agua tiene un pH de 5.0 - 7.5

c. Constante de Disociación.

pKa = 10

d. Características Espectrofotométricas.

Una solución al 0.001% presenta un máximo de absorción a 365 nm y un mínimo a 306 nm. La relación E_{306}/E_{365} no debe ser mayor a 0.25 (Fig. No.2).

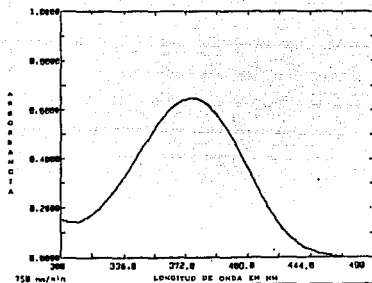


FIGURA No. 2. ESPECTRO DE ABSORCION UV DE NITROFURAZONA.

4. PROPIEDADES FARMACOLOGICAS.

a. Acción Farmacológica.

La Nitrofurazona actúa como bacteriostático o bactericida de amplio espectro, que incluye a la mayoría de las bacterias comúnmente encontradas en las infecciones superficiales como heridas y quemaduras. Muchos estudios indican que la Nitrofurazona tiene un mayor predominio como bactericida que como bacteriostático para la gran mayoría de los microorganismos. No es fungicida ni fungistático. Su espectro

antibacteriano incluye a los siguientes microorganismos Gram-negativos y Gram-positivos (1):

Gram-negativo	Gram-positivo
<i>Neisseriae gonorrhoeae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Neisseriae intracellularis</i>	<i>Staphylococcus albus</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Salmonella schottmuelleri</i>	<i>Streptococcus anhemolyticus</i>
<i>Salmonella paratyphi</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Eberthella typhosa</i>	<i>Diplococcus pneumoniae</i>
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Clostridium histolyticum</i>
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Clostridium novyi</i>
<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Clostridium sporogenes</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Clostridium tetani</i>
<i>Aerobacter aerogenes</i>	<i>Clostridium septicum</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

b. Toxicidad.

Produce reacciones de hipersensibilidad y alergia en la piel. Otros efectos tóxicos reportados por administración oral incluyen polineuritis, náusea, vómito y dolor de cabeza (2).

c. Metabolismo.

La Nitrofurazona es extensivamente metabolizada en el cuerpo. La mayor parte de los antiinfecciosos tópicos, en ausencia de inflamación, se absorben en forma mínima a la circulación general, sin embargo la absorción aumenta cuando se aplican a zonas grandes de piel desnuda o inflamada.

La acción de los antiinfecciosos locales es rápida, por lo general, en minutos. Su duración es limitada debido a que con frecuencia son inactivados por los componentes de la sangre, pus y exudados. Por lo que se deben utilizar a menudo de 3 a 6 veces al día después de que la piel esta despojada de costras, adherentes y desechos (3,4).

d. Dosis.

Dosis máxima simple 100 mg; máxima en 24 hrs 500 mg.

B. Sistemas Dispersos

1. DEFINICION.

El término sistema disperso se refiere a un sistema en el cual una sustancia (la fase dispersa) está distribuida homogéneamente en una segunda sustancia, la fase continúa o vehículo c.e.

2. CLASIFICACION.

Como se muestra en la tabla No. 1, las fases dispersas y continuas pueden ser sólidas, líquidas o gaseosas, y de acuerdo a eso se clasifican los diversos tipos de sistemas dispersos c.e.

TABLA 1. CLASIFICACION DE LOS SISTEMAS DISPERSOS BASADOS EN SU ESTADO FISICO.

FASE DISPERSA	MEDIO DE DISPERSION	SISTEMA
LIQUIDO	GAS	AEROSOL LIQUIDO
SOLIDO	GAS	AEROSOL SOLIDO
GAS	LIQUIDO	ESPUMA
LIQUIDO	LIQUIDO	EMULSION
SOLIDO	LIQUIDO	SUSPENSION
GAS	SOLIDO	ESPUMA SOLIDA
LIQUIDO	SOLIDO	EMULSION SOLIDA
SOLIDO	SOLIDO	SUSPENSION SOLIDA

C. Ovulos.

1. DEFINICION.

Los Óvulos son formas farmacéuticas sólidas o semisólidas de formas diversas, fabricadas por compresión y el procedimiento usual de los supositorios para su aplicación en la vagina donde ejerce su acción (7,8,9).

2. CARACTERISTICAS FISICAS.

a. Forma.

Existen en variadas formas: esféricas, ovoides, tipo torpedo y planas, ver Figura No. 3 (7,8).

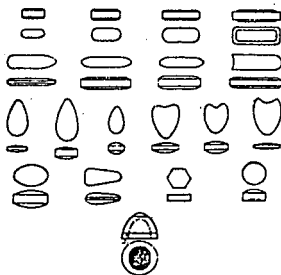


FIGURA No 3. FORMAS MAS COMUNES DE LOS OVULOS.

b. Color.

Los colores son usualmente muy variados aunque generalmente son blancos. También pueden presentarse en color rosa, beige, verde, gris o amarillo dependiendo de su principio activo (9).

c. Olor.

En medicina humana algunos óvulos presentan aroma; las esencias generalmente usadas son jasmín, lavanda, acitrón y rosas (9).

d. Dureza.

Es la determinación de la fuerza mecánica necesaria para romper un óvulo, lo cual indica si un óvulo es blando o elástico. El método Erweka es utilizado para esta prueba y las unidades de medida son Kgs. La fuerza mecánica no debe ser menor de 1.8 Kg (9,10).

e. Temperatura de Fusión.

El punto de fusión es un factor crítico en la determinación de la velocidad de liberación del o los ingredientes activos del óvulo. Debe ser evaluado periódicamente cuando es almacenado para verificar si no existe alguna forma metaestable de la base utilizada. Generalmente, la temperatura de fusión final no debe ser mayor de 37°C (9,11).

f. Tiempo de Licuefacción.

Esta prueba indica el comportamiento físico del óvulo cuando se expone a la temperatura funcional máxima de 37°C. El tiempo de licuefacción determina el tiempo necesario para licuar al óvulo bajo una presión similar a la del cuerpo, en presencia de agua y a temperatura corporal (37°C).

El Aparato consta de:

-Un cilindro de vidrio de 260 mm de longitud, con un diámetro externo de 50 mm, que se estrecha a un diámetro externo de 22 mm en una longitud de 30 mm en cada extremo y 2 conexiones para agua.

-Un tubo de celofán para diálisis de 34 a 35 cm de largo y cuyo diámetro al inflarse, arroja una medida de 2.85 cm, que se debe humedecer, abrir y montar en los extremos del cilindro de vidrio, estirándolo y asegurándose con 2 bandas elásticas.

- Una bomba para circular agua, conectada al cilindro de vidrio por dos mangueras de hule.

- Un termómetro con un rango de escala de 32 - 45°C y dividido en décimas de grado.

- Un cronómetro y un soporte.

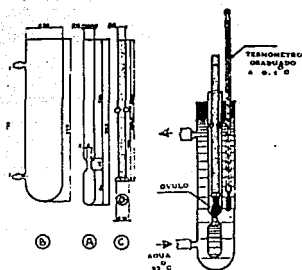


FIGURA No. 4. APARATO PARA DETERMINAR TIEMPO DE LICUEFACCION DE UN OVULO.

Una vez montado el aparato (Fig. No.4) sobre un soporte que permita su ascenso y descenso, hacer circular agua, a 37 °C a través de las dos mangueras de hule y a una velocidad tal, que la mitad inferior del tubo de celofán se colapse y la mitad superior se abra.

La presión hidrostática del agua en el aparato es de cero aproximadamente cuando el tubo comienza a colapsarse. Cuando el termómetro alcance una temperatura estable de 37°C, introducir el óvulo y bajar el aparato 30 cm aproximadamente; iniciar con el cronómetro la medición del tiempo de licuefacción, deteniéndolo, en el momento en que el óvulo este completamente fundido en el tubo.

Una vez concluida la determinación, subir el aparato, hasta que el tubo de celofán se abra, lavar las paredes del tubo, con agua conteniendo detergente y posteriormente con agua destilada, dejarla escurrir unos minutos y repetir las pruebas con 2 muestras más (11).

g. Peso.

El peso de los óvulos es variado, en medicina humana oscila entre 0.5g - 2.8g; en medicina veterinaria de 2.7 - 15g (12).

h. Desintegración.

La prueba se basa en la medición del tiempo requerido por los óvulos para reblandecerse o desintegrarse en un medio líquido, bajo condiciones establecidas (13).

El aparato consta de un cilindro de vidrio o plástico rígido transparente, abierto en ambos extremos, de 60 mm de altura, con un diámetro interno de 52 mm y un grosor en las paredes de 8 mm.

Dos placas de acero inoxidable, perforadas, que se fijan internamente al cilindro en forma horizontal y paralela, separadas a una distancia de 30 mm y sostenida por 3 abrazaderas de acero inoxidable, igualmente espaciadas alrededor de la circunferencia de las placas. Las placas son de 50 mm de diámetro, con 39 perforaciones de 4 mm de diámetro, ordenadas en

anillos conteniendo 6, 12 y 20 perforaciones, además de una perforación central. Un vaso de precipitados, con una capacidad mínima para 4 litros, conteniendo agua a 36 a 38 °C.

Además un dispositivo que pueda detener el cilindro a 90 mm por abajo de la superficie del agua y que permita que el cilindro sea invertido cada 10 minutos sin emerger del agua.

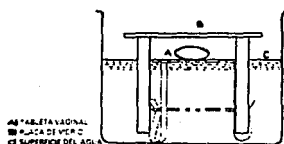


FIGURA No 5. APARATO PARA DETERMINAR TIEMPO DE DESINTEGRACION DE UN OVULO.

Una vez montado el aparato, colocar el cilindro armado con los discos y asegurados por las abrazaderas, como se indica en la figura No.5, en un vaso de precipitados de diámetro adecuado, conteniendo agua a 36-37 °C, con el nivel, abajo del disco superior. Usando una pipeta, ajustar el nivel con agua a 35-37 °C, hasta que una capa uniforme cubra las perforaciones del disco.

Colocar un óvulo sobre el disco superior y cubrir con una placa de vidrio, para mantener condiciones apropiadas de humedad. Examinar el estado de las muestras después de transcurrido el tiempo indicado en la monografía específica del producto.

Se considera que la desintegración se ha realizado, cuando no permanece ningún residuo sobre los discos, o si permanece un residuo, éste consiste solamente de una masa suave o espumosa sin centro sólido que ofrezca resistencia a la presión con una varilla de vidrio «D».

3. CLASIFICACION.

a. Anticonceptivos.

Los contraceptivos vaginales contienen como principio activo un espermicida y son diseñados de tal forma para que se fijen en la vagina y que no sean absorbidos, además de ejercer su acción por un mecanismo de licuefacción. Se considera que los anticonceptivos más seguros y efectivos son el Menfegol, Nonoxinol-9 y el Octoxinol-9. El nonoxinol y octoxinol son 100 % espermicidas *in vitro*, pero el índice de fracasos en la práctica varía entre 2 y 4 %. Son muy poco irritantes y se ocupan en productos de higiene femenina. A estas formas se pueden incorporar agentes tensoactivos para obtener espuma, que es

necesaria para atrapar a los espermatozoides, pero también es útil en los demás para una mejor distribución del agente terapéutico sobre la superficie vaginal (6,9,10).

b. Antibacterianos.

Debido a las modificaciones de pH y humedad en la vagina, pueden desarrollarse bacterias, hongos, parásitos y gérmenes patógenos que generan procesos infecciosos como la Candidiasis, Tricomoniasis, ulceraciones, llagas, leucorrea, vaginitis, entre otros. Para el tratamiento de este tipo de infecciones suelen emplearse antibacterianos como la Nitrofurazona, derivados de amonio cuaternarios (cloruro de bencetonio, cloruro de cetalconio, y cloruro de cetilpiridinio), violeta de genciana, acetato fenilmercúrico, etc. (6,9,10).

c. Acidificantes de la vagina.

El líquido lactescente que lubrica la vagina es ácido debido al bacilo de Döderlein, microorganismo gram positivo, presente habitualmente en la vagina y éste medio le sirve de protección. El bacilo produce ácido láctico a partir de los glucósidos presentes. Así, el pH de la vagina en la mujer sufre variaciones conforme con la edad y en condiciones patológicas. El pH en la mujer adulta es de 4.0 - 4.5.

Durante el embarazo, la vagina alcanza el óptimo de pH,

después del alumbramiento, la sangre alcaliniza el líquido vaginal lo que da lugar a desarrollo de microorganismos, lo que también ocurre durante la menstruación. Después de la menopausia la acidez disminuye con la desaparición de los estrógenos por atrofia de los ovarios y la vagina se vuelve más vulnerable a las infecciones. Por ello es necesario el uso de óvulos tendientes a regular el pH vaginal para evitar procesos infecciosos, regularmente se utilizan con éste fin óvulos con un azúcar como lactosa utilizado como sustrato por los bacilos de Döderlein para generar ácido láctico, y además por ser la única azúcar que no favorece la propagación de las micosis vaginales, de esta manera el "activo" ajusta el pH. Suelen utilizarse otros glucósidos como la glucosa, dextrosa, sacarosa y galactosa (6,9,10).

4. MECANISMO Y MODO DE ACCION.

Los óvulos se funden en la vagina, se licúan con ayuda de la secreción vaginal o forman una espuma en contacto con ésta (Fig. No. 8). La sustancias contenidas en los óvulos sólo deben actuar a nivel vaginal. Por lo tanto, no es deseable que se produzca una absorción. Sin embargo, hay que pensar en la posibilidad de una absorción fortuita, sobre todo en los lavados (10,12).



FIGURA No. 6. ESQUEMA DEL MECANISMO DE ACCION DE UN OVULO.

5. COMPONENTES.

a. Bases.

Las bases utilizadas en la fabricación de óvulos se clasifican en dos tipos: Masas hidrosolubles de punto de fusión elevado y Masas hidrosolubles elásticas, que deben de cumplir los siguientes requisitos (5):

1) Fisiológicamente inertes: no han de producir irritaciones en la vagina; dichas irritaciones pueden ser provocadas por dimensiones no fisiológicas o por enranciamiento, por excesiva dureza o alteraciones en la fabricación de la forma farmacéutica.

2) Químicamente inertes: no ha de haber incompatibilidades con el medicamento.

3) Ausencia de alotropismos: modificaciones inestables.

4) Pequeño intervalo entre el punto de fusión y el punto de solidificación: por tanto más rápida solidificación de la masa en el moldeo, buena contractibilidad, ausencia de sobreenfriamiento en el moldeo.

5) Suficiente viscosidad: reducción adecuada de la sedimentación del medicamento en suspensión, garantía de exactitud en la dosificación.

6) Los óvulos deben disgregarse o disolverse en pocos minutos a la temperatura corporal: requisito para la eficacia del medicamento.

7) Buena conservabilidad y almacenamiento: no ha de producirse enranciamiento, coloración, ni endurecimiento; buena estabilidad del moldeo y resistencia a la ruptura.

8) Capacidad de incorporación de líquidos lipófilos e hidrófilos.

1) Masas Hidrosolubles de Punto de Fusión Elevado. Han ido perdiendo importancia las masas hidrosolubles de punto de fusión elevado, para óvulos. Están formadas generalmente del óxido de polietileno (producto de condensación del óxido de etileno y ácido ricinoléico).

Los polietilenglicoles se obtienen por polimerización del óxido de etileno en presencia de catalizadores (por ejemplo cloruro de zinc). Otra vía de preparación consiste en hidrolizar primero el óxido de etileno a etilenglicol y condensarlo luego hasta polietilenglicol.

Algunas masas corrientes comerciales estan formadas por polietilenglicoles de alta polimerización, con un peso molecular medio de 6000 y un punto de fusión que oscila entre 54 y 60 °C. Una masa de polietilenglicol con punto de fusión de 47-49 °C y mejor solubilidad está formada por polietilenglicol 1000 y polietilenglicol 4000. Los componentes pueden entremezclarse para conseguir la consistencia deseada, para la fabricación de bases de óvulos se recomienda utilizar mezcla de ellos.

Los productos de polimerización sólidos que se conservan durante años, (carb Wax, poli Waxse y oxyd Waxse) son buenos disolventes para muchos medicamentos, lo cual puede tener como consecuencia una lentificación de la absorción de tales medicamentos. Otras desventajas son su notable dureza y su posterior endurecimiento, las propiedades reductoras que caracterizan a los productos del polietilenglicol, que dan lugar a intolerancias con una serie completa de medicamentos. El endurecimiento posterior puede evitarse con agentes plastificantes (glicerina y lanolina). Unicamente aquellos medicamentos que producen disminución del margen de fusión pueden elaborarse ventajosamente con masas de polietilenglicol.

A pesar de las restricciones realizadas con respecto al uso de estos polimerizados existen observaciones aisladas según las cuales se pueden conseguir con tales masas una gran disgregación. La adición de emulgentes y otros aditivos mejoran la eficiencia cuando los polietilenglicoles participan en la formulación (5).

2) Masas Hidrosolubles Elásticas. A este grupo pertenecen los geles de glicerina-gelatina, elásticos que mantienen su forma a temperatura ambiente y que se funden a temperatura corporal.

La gelatina es una macromolécula (proteína) anfótera integrada por diversos aminoácidos, entre los que figuran la glicina, alanina, leucina, arginina, prolina, ácido glutámico e hidroxiprolina. La preparación de la gelatina se hace por hidrólisis de colágeno, que es un componente principal de los huesos y tejido conjuntivo. Según la forma de preparación, se distinguen dos tipos:

Tipo A. Se obtiene por hidrólisis ácida y presenta un punto isoeléctrico a $\text{pH} = 7$ ó hasta 8.3.

Tipo B. Se forma en hidrólisis alcalina. Su punto isoeléctrico se encuentra a $\text{pH} = 4.7$ hasta 5.0.

Por debajo del punto isoeléctrico, la gelatina se comporta activamente como catión y por encima del mismo como anión. La

gelatina se hincha en agua, y se disuelve calentando. Pequeñas cantidades de fosfatos, citratos y sulfatos incrementan la velocidad de disgregación. Es soluble en alcoholes. A concentraciones del 1.5 % en adelante, la gelatina forma con agua un gel transparente y elástico que sirve como base para la fabricación de jaleas.

Durante la disgregación de la gelatina y durante la agitación de la glicerina-gelatina se producen burbujas de aire. Deben ser evitadas cuidadosamente, pues perjudican la firmeza de las formas farmacéuticas. Para eliminar las burbujas se deja reposar un tiempo la solución caliente. Los óvulos no deben sacarse enseguida de los moldes pues su firmeza solo se alcanza completamente al cabo de algunas horas.

Como ventaja de esta base hay que citar su rápida disgregación. Como desventaja, la base de glicerina-gelatina constituye un buen medio de cultivo para bacterias, especialmente cuando la proporción de glicerina es baja. La conservación de la glicerina-gelatina como base para óvulos vaginales o para supositorios puede prolongarse hasta 30 días si se guarda en recipientes muy bien cerrados y bajo refrigeración. Bajo estas condiciones no es necesario recurrir a agentes conservadores (como sería, por ejemplo 0.15% del éster del ácido p-hidroxibenzóico). El cumplimiento de este requisito es necesario por el peligro de un desecamiento paulatino de la masa (5,p).

6. Modo de Aplicación.

Los óvulos deben colocarse lo más profundamente en la vagina para que se aprovechen mejor. Por eso a veces se presentan con un aplicador de plástico que permite la inserción a profundidad.

Generalmente la primera aplicación suele hacerla el médico mediante un espéculo y pinzas. Luego lo hace la misma enferma, de preferencia en la tarde o al acostarse por la noche. Si la aplicación se hace de día, es aconsejable taponar para evitar pérdida de medicamento. Si se inserta sin aplicador, se recomienda mojar ligeramente el óvulo.

Los óvulos antibacterianos se suelen aplicar en todo momento y aun durante la menstruación. Los que contienen estradiol no pueden aplicarse durante la menstruación, y los de progesterona en los diez días anteriores.

En cuanto a los anticonceptivos, siendo que su acción mecánica depende de la espuma que forma, tienen un corto período de actividad óptima y deben aplicarse en tiempo oportuno (9).

7. CONSERVACION.

Puesto que los óvulos suelen fundirse entre 32 y 37 °C, según la masa para óvulos utilizada, se conservarán a una temperatura inferior a 30 °C. Los óvulos que se han fundido o ablandado en el envase, deben meterse antes de su empleo en el refrigerador con la punta hacia abajo (9).

B. ACONDICIONAMIENTO.

Los óvulos vertidos en moldes metálicos se sellan en láminas de plástico o de aluminio. En el proceso de vértido directo, los óvulos se vierten directamente dentro de láminas de plástico o en láminas de aluminio revestidas de plástico. La lámina de aluminio es hermética a los gases y protege, por lo tanto, del oxígeno del aire.

La extracción de los óvulos se facilita con una ranura, una pequeña muesca en la lámina o por no estar sellada una parte de ambas láminas en la punta del óvulo, con lo que al separar las dos láminas queda libre el óvulo (4,9).

D. Cromatografía.

1. DEFINICION.

a. Cromatografía.

Es un procedimiento por el cual los componentes de una muestra son separados por un proceso de migración diferencial en un sistema que consta de dos fases, una de las cuales se mueve continuamente en una dirección dada. En este sistema los compuestos individualmente presentan diferentes comportamientos en su movilidad por diferencias en adsorción, partición, solubilidad, presión de vapor, tamaño molecular o carga iónica.

(13,14,15).

b. Fase Estacionaria.

Es un término que se utiliza para denominar cualquiera de las diferentes formas que puede usarse la fase fija, que puede estar empaquetada en una columna, extendida en forma de capa, etc.

c. Fase Móvil.

Término utilizado para denominar a la fase que acarrea a las muestras, durante el proceso de cromatografía, ésta puede ser líquida o gaseosa.

2. CLASIFICACION.

Los métodos cromatográficos pueden ser clasificados de acuerdo al tipo de fase móvil y fase estacionaria seleccionados. La cromatografía de gases involucra aquellos métodos en los cuales la fase móvil es un gas; y la cromatografía líquida los métodos en los cuales la fase móvil es un líquido (13,14,15).

En base a la naturaleza de la fase estacionaria y procesos de separación pueden mencionarse 4 casos:

a. Líquida o de Partición.

Este tipo de cromatografía consta de una fase estacionaria líquida de composición diferente a la fase móvil, en donde las moléculas de la muestra se distribuyen entre las 2 fases, similar a un proceso de extracción líquido-líquido. Las 2 fases deben ser inmiscibles.

b. Líquido-Sólido o de Adsorción.

En éste tipo de cromatografía existe una superficie muy grande de partículas pequeñas que retienen a las moléculas de la muestra debido a la atracción que existe entre las diferentes sustancias y la superficie de las partículas, proporcionando diferentes grados de adsorción.

c. Intercambio Iónico.

En este tipo de cromatografía la fase estacionaria contiene iones los cuales son capaces de intercambiarse con los

iones del soluto de la fase móvil. El ión cambiador se encuentra de manera general unido a grupos de amonio cuaternario $\{-(CH_2)_nNR^{+3}X^{-}\}$ para la separación de aniones, o unido a grupos de ácido sulfónico $(-CH_2SO_3^{-}H^{+})$ en la separación de cationes. En este tipo de cromatografía existen 2 variables importantes que deben considerarse para realizar una separación adecuada de los componentes de una muestra, que son la fuerza iónica de la fase móvil y la variación del pH en la misma.

d. Exclusión de Tamaño o de Gel.

En la cromatografía de exclusión el empaque de la columna es un material poroso de cierto tamaño. Las moléculas que son grandes quedan excluidas por los poros y sólo cierto tipo de moléculas pequeñas penetran por los poros, obteniéndose una separación de las moléculas pequeñas de las grandes. En este tipo de cromatografía es estrictamente importante el tamaño molecular.

e. Fase Enlazada.

Es el tipo de cromatografía en la cual se utiliza una fase orgánica estacionaria que está químicamente enlazada a las partículas activas. El mecanismo es la partición del soluto entre dos solventes inmiscibles.

f. Par Iónico.

De manera general se acepta que existe adsorción del soluto iónico en la fase estacionaria, formación de pares de iones soluto-contraión en el eluente y formación de pares iónicos soluto-contraión en la fase estacionaria. Cabe mencionar que el mecanismo de retención aún no está completamente dilucidado.

Estos dos últimos tipos de cromatografía no siempre aseguran cual de los dos procesos implicados (adsorción o reparto) es el más importante. Por ésta razón en la práctica se definen otros dos tipos considerando la polaridad de las fases.

g. Fase Normal.

Es un tipo de cromatografía en la cual la fase estacionaria es de naturaleza polar (como la sílica) y la fase móvil no polar (ejemplo hexano o tetrahidrofurano). Las muestras polares quedan retenidas durante tiempos mayores que los materiales menos polares o apolares.

h. Fase Reversa.

Su funcionamiento es a la inversa ya que la fase estacionaria es de naturaleza no polar (hidrocarbonada) y la fase móvil es un líquido muy polar normalmente agua o metanol. En este caso cuanto menos polar sea la muestra mayor será su retención.

3. PARAMETROS CROMATOGRAFICOS.

a. Tiempo de Retención (t_r).

Es el tiempo que transcurre desde el momento en que la muestra es introducida al sistema, hasta el momento en que se obtiene el punto de máxima concentración por la señal o pico.

b. Tiempo Muerto (t_0).

Es el tiempo de trayecto de un compuesto no retenido, o de la fase móvil para trasladarse de un extremo a otro de la columna.

c. Tiempo de Retención Corregido (t'_r).

Es la distancia entre t_r y t_0 , es decir, la medida del tiempo en que la muestra permanece retenida en el material de relleno de la columna. Dicho de otro modo, t_r es el tiempo total de la permanencia en la columna, t_0 el tiempo que la muestra permanece en la fase móvil y por lo tanto, t'_r es el tiempo en que la muestra permanece retenida en la fase estacionaria. $t'_r = t_r - t_0$.

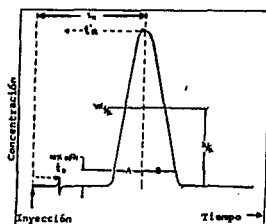


FIGURA NO. 7. REPRESENTACION DE UN CROMATOGRAMA.

d. Factor de Capacidad (K).

El factor de capacidad es un término que indica el tiempo de retención de un soluto en la columna. Se determina mediante la siguiente ecuación:

$$K = \frac{t_r}{t_o} = \frac{t_r - t_o}{t_o} = \frac{\text{tiempo en la fase estacionaria}}{\text{tiempo en la fase móvil}}$$

Conociendo el factor de capacidad, es posible determinar el tiempo de retención de un compuesto.

$$t_r = t_o (1 + K)$$

En la práctica, se debe hacer lo posible para obtener un valor del factor de capacidad tendiente a 1 para el pico de interés, con la finalidad de asegurar su separación del solvente y sus posibles impurezas las cuales eluyen generalmente al tiempo t_o .

e. Número de Platos Teóricos (N).

En cromatografía debe tratar de evitarse el ensanchamiento de las bandas de la columna tanto como sea posible ya que cuanto más agudos sean los picos podrán resolverse un mayor número ellos en un mismo intervalo de tiempo, y por lo tanto en un mismo tiempo pueden separarse mayor número de componentes de la muestra. Por todo lo anterior es necesario conocer la eficiencia de una columna calculándola a través del número de platos

teóricos, que se determina de la siguiente manera:

$$N = 16 \left[\frac{t_r}{w_b} \right]^2 \quad \text{o} \quad N = 5.545 \left[\frac{t_r}{w_h} \right]^2$$

Donde:

N = Número de platos teóricos.

t_r = Tiempo de retención del pico.

w_b = Ancho del pico (obteniéndose por extrapolación de tangentes del punto de inflexión a la línea base como se muestra en la Figura No 7).

w_h = Ancho del pico tomado a la mitad de la altura.

La eficiencia de la columna es mejor a mayor número de platos teóricos.

f. Altura Equivalente de un Plato Teórico (H).

El número de platos teóricos depende de la longitud de la columna, así a mayor longitud, mayor número de platos. En consecuencia se ha introducido otro término que relaciona el número de platos con la longitud de la columna, y es la altura del plato o altura equivalente a un plato teórico (HEPTD), el cual se calcula por :

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

Donde:

L = Longitud de la Columna.

N = Número de platos teóricos.

Así, se ha determinado que a menor altura de cada plato y mayor número de platos, la columna será más eficiente.

g. Factor de Selectividad (α).

Este factor describe la posición relativa de dos picos adyacentes. La separación de los picos depende de la interacción selectiva con la fase estacionaria. Calculándose para dos picos A y B de la siguiente manera:

$$\alpha = \frac{t'r \text{ (B)}}{t'r \text{ (A)}} = \frac{K_B}{K_A}$$

Si $\alpha = 1$ los dos picos tienen tiempos de retención idénticos, o sea, no existe separación.

h. Resolución (R).

El factor de resolución de selectividad expresa la posición relativa de los dos picos, pero no proporciona información sobre la separación real de ellos, que depende de lo puntiagudos que éstos sean. Por ello se ha dado el nombre de resolución a la medida de la separación que existe entre dos picos calculándose como:

$$R = \frac{2 \Delta t}{W_{b1} + W_{b2}}$$

Donde:

Δt = Diferencia de los tiempos de retención.

Wb_1 y Wb_2 = Ancho de los picos respectivamente.

Si se tiene un valor de $R = 1.5$ representa separación hasta la línea base de los picos mientras que un $R = 1.0$ significa que la resolución es aproximadamente del 90 % (13,14,15).

E. Caracterizaciones de la Cromatografía

Líquida de Alta Resolución.

La cromatografía líquida moderna se caracteriza por:

- Columnas reutilizables de pequeño diámetro (2-5mm)
- Rellenos de partículas muy pequeños (5-50 μm)
- Desarrollo de nuevos materiales para utilizarlos como fases estacionarias.
- Presiones de entrada relativamente altas y flujo controlado de la fase móvil.
- Introducción precisa de la muestra, sin necesidad de grandes cantidades.
- Detectores continuos especiales, capaces de operar a flujos muy bajos y de detectar cantidades muy pequeñas.
- Instrumentos normalizados y automatizados.
- Análisis rápidos.
- Alta resolución.

1. FASE MOVIL.

Excepto para el caso de cromatografía de exclusión, la fase móvil desempeña, en general, una parte activa en cromatografía líquida. Se puede utilizar una única sustancia como fase móvil durante el análisis de una mezcla de dos o más sustancias, ajustando adecuadamente las características de la fase. También es posible mantener constante la composición de la fase móvil durante el análisis, o bien cambiarla. El primer

método se denomina operación isocrática, mientras que el segundo se conoce como elución por gradiente.

La elución por gradiente se utiliza con muestras cuyos componentes posean polaridades muy diferentes, pues en estos casos es preferible variar la polaridad de la fase móvil durante el análisis, para mejorar la separación de los componentes. Generalmente se inicia con una sustancia única y se aumenta con el tiempo la concentración del (os) otro (s) componente(s) de la fase móvil. La variación puede ser lineal, convexa o cóncava. La selección de los solventes utilizados depende de varios parámetros; en el caso de la cromatografía de adsorción o reparto, el papel más importante es la polaridad, también a veces viscosidad y otras características que pueden influir en el detector. En la cromatografía de intercambio iónico son importantes la fuerza iónica y el pH, mientras que en la cromatografía de exclusión la consideración más importante es la solubilidad de la muestra en la fase móvil (13,14,15,16).

2. FASE ESTACIONARIA.

La fase estacionaria puede ser un sólido poroso del tipo de los utilizados en la cromatografía de adsorción, intercambio iónico y exclusión. Las diferentes fases difieren en su composición química, estructura y tamaño de partícula. Otra posibilidad es usar una fase estacionaria líquida e impregnar con ellas la superficie de las partículas de un sólido que actúa

únicamente como soporte. Sin embargo, hoy en día estas columnas son muy poco frecuentes, ya que resulta difícil evitar que la fase estacionaria sea arrastrada por la fase móvil.

Los rellenos más ampliamente utilizados en la actualidad en la cromatografía líquida de partición tienen la fase estacionaria químicamente enlazada a las partículas soporte. Son las denominadas fases enlazadas que poseen larga duración y no requieren acondicionamiento. Las fases enlazadas se preparan por reacción química entre los grupos hidroxilos de la superficie de las partículas de sílice y una molécula orgánica lineal o un organosilano.

Aunque también existen fases enlazadas polares que se utilizan en fase normal como las que contienen un grupo amino o ciano al final de la cadena hidrocarbonada, las más ampliamente utilizadas son de naturaleza no polar con una cadena alquílica (por ejemplo octadecilo) enlazada por medio del átomo de silicio del alquilsilano. Estas fases se usan en fase reversa y son útiles en la separación de una amplia gama de sustancias.

En la preparación de fases enlazadas como en el recubrimiento por fases líquidas no enlazadas se utilizan dos tipos de partículas soporte. En el primer tipo son partículas totalmente porosas, mientras en el segundo existe un núcleo sólido recubierto por una delgada capa porosa. A este último se denomina soporte pelicular.

Las partículas de soporte poroso son en general de sílice de gran superficie y se encuentra una gran variedad de tamaños. Los soportes pelliculares son un núcleo sólido (generalmente cuentas de vidrio) recubiertas por una capa fina porosa, normalmente de sílice, son de formas regulares por lo que las columnas pueden rellenarse fácilmente, sin embargo, generalmente son de tamaño grande y por tanto las columnas no son tan eficaces como las de partículas pequeñas de relleno totalmente poroso.

Como se ha visto el tamaño de partícula es muy importante ya que si no es suficientemente pequeño la fase móvil y la muestra disuelta no se difundirán homogéneamente, además se debe de tener la mayor superficie de contacto posible entre la fase móvil y la fase estacionaria. Sin embargo, existe un límite inferior de tipo práctico aproximadamente de unas 3 μm de diámetro. La mayoría de las columnas comerciales contienen rellenos de partículas cuyo tamaño promedio oscila entre 5-15 μm , en tanto que muchos rellenos pelliculares presentan tamaños de entre 37-42 μm (13,14,15).

3. INSTRUMENTACION

Para lograr que las separaciones sean más eficaces y rápidas además de emplear empaques de columnas más finos se deben utilizar equipo y presión especiales. Se requieren presiones de 1000-3000 psi para lograr velocidades de flujo de

1-2 ml/min., en columnas de 2-4 mm de diámetro y 10-15 cm de longitud, aunque en ciertos casos pueden ser necesarias presiones de hasta 8000 psi.

Los componentes esenciales de un sistema cromatográfico de alta presión son: un sistema hidráulico, una columna y un detector. Además de que se deben controlar la temperatura del sistema y la inyección de la muestra (Fig. No.8). Aparte de una gran resolución y una gran sensibilidad, el equipo debe tener un alto grado de reproducibilidad y una resistencia máxima a la corrosividad, debe poseer entradas de altas presiones, inyectores y detectores de bajos volúmenes muertos. La variación en la velocidad de flujo no sólo afecta el tiempo de elución, sino también la forma del pico del cromatograma y por lo tanto la cuantificación de la muestra (13,14,15).

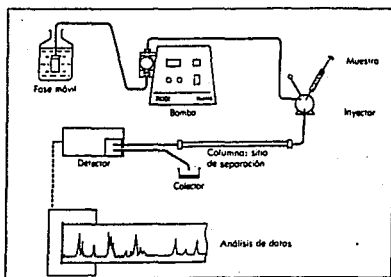


FIGURA No. 8. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LAS PARTES DE UN CROMATOGRÁFO DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

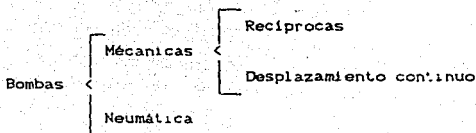
a. Bombas.

La principal función del sistema de bombeo es proveer de fase móvil a la columna con un flujo constante y reproducible. Las columnas utilizadas en la cromatografía líquida de alta resolución están rellenas de partículas muy pequeñas que presentan resistencia al flujo de la fase móvil, por lo tanto se requiere de un sistema de bombeo que haga fluir la fase móvil a un flujo razonable (13,14,15).

Los requisitos más importantes de un sistema de bombeo son:

- El sistema debe ser hecho de materiales químicamente resistentes a la fase móvil.
- Alcanzar presiones de operación máxima (usualmente hasta 400 atm equivalentes a 6000 psi).
- Un amplio intervalo del volumen de flujo (de 0.5 a 10 ml).
- Flujo reproducible y constante.
- Facilidad para el cambio de fases móviles.
- Características de flujo libre de pulsaciones o tener un regulador de pulsaciones.
- Facilidad de limpieza y mantenimiento del sistema.

De acuerdo con las características de funcionamiento y diseño se puede considerar la siguiente clasificación:



1) Mecánicas. Las bombas de un sólo pistón desplazan flujos de volumen constante en forma no continua, considerado más bien como pulsante. La máxima presión que se puede alcanzar varía según el diseño, pero en general es de aproximadamente de 600 atm (8000 psi). Su operación es mediante el movimiento de un pistón o diafragma, y a través de una válvula control que alternamente se abre y se cierra, y así se llena y descarga una pequeña cámara. El volumen que envía la bomba en cada pulso se ajusta controlando la distancia del recorrido del pistón o diafragma, el flujo se ajusta variando el número de veces del desplazamiento por unidad de tiempo.

VENTAJAS:

- Depósito de disolvente limitado.
- Rapidez del cambio de fase móvil.
- Volumen de flujo constante.
- Facilidad de limpieza.

DESVENTAJAS:

-El flujo es en pulsaciones, por lo que hay pérdida en la eficiencia de la columna e inestabilidad del detector.

Las alternativas que se utilizan para eliminar el exceso de pulsaciones son :

-Colocando un serpiente de 15 cm de longitud entre la bomba y la cámara de inyección, para absorber las pulsaciones producidas por la bomba.

-El uso de un manómetro de presión con un gran tubo de Bourdon (normalmente intercalado, para evitar retención del líquido) que también se flexiona con cada pulso.

-Otra manera más eficaz es utilizando bombas de doble pistón, donde existen dos pistones gobernados por mismo motor a través de un eje excéntrico. Este mecanismo permite que un pistón succione mientras el otro expulsa el líquido fuera de la bomba. Por lo tanto los perfiles de flujo se superponen el uno al otro reduciéndose apreciablemente las pulsaciones.

2) Por Desplazamiento Continuo (Jeringas). Son aquellas en las que un émbolo o pistón es desplazado en forma continua y uniforme por un motor de precisión, comprimiendo el líquido contenido en una cámara de cierto volumen; el líquido fluye luego a través de una abertura en la misma cámara y se obtiene así un flujo de volumen constante, que puede variar según se desplace el émbolo a mayor o menor velocidad.

VENTAJAS:

- El flujo proporcionado es uniforme y continuo.
- Alcanzan altas presiones de operación.
- Son de bajo mantenimiento.

DESVENTAJAS:

- Limitada capacidad del depósito (250-500ml) y para llenar la cámara es necesario suspender su operación.
- A altas presiones hay ligeros cambios en el flujo al comprimirse el disolvente (4% a 400 atm equivalentes a 6000 psi).
- Son de alto costo.

3) Neumáticas. Este sistema emplea un cilindro de gas conectado directamente a través de un regulador al depósito de la fase móvil. La presión del gas impulsa el líquido a través del aparato. La máxima presión del trabajo esta limitada por la presión del gas y el material de fabricación del sistema.

VENTAJAS:

- Flujos de presión constante y libre de pulsaciones.
- Son de bajo costo.
- Bajo mantenimiento (no hay juntas ni válvulas).

DESVENTAJAS:

- Baja capacidad de volúmen del depósito.
- El cambio de un disolvente a otro es lento.
- La presión máxima de trabajo se limita por el depósito de gas (200 atm equivalente a 3000 psi).
- Difusión del gas en el líquido.

Esto se puede resolver al usar un serpentín largo que hace que la superficie de la interfase gas/líquido disminuya bastante y la mayor parte de la fase móvil se usa antes de que llegue al detector la porción que contiene el gas. También se logra desechando las últimas porciones del líquido que han sido saturadas por el gas.

Algunos diseños tienen sistemas amplificadores de presión que pueden producir 400 atm (6500 psi) utilizando bajas presiones del gas. En estos sistemas se utiliza un pistón de gran diámetro para el gas que transmite su movimiento a otro de pequeño diámetro para el líquido. Así, se obtiene que la presión en el líquido es proporcional al cociente del área de la sección de ambos pistones, proporcionando gran presión al líquido. Sin embargo, el diseño es caro, complejo y de alto mantenimiento (13,14,15).

b. Dispositivos para la Inyección.

Para la introducción de la muestra en la columna es necesario tener en cuenta el diseño del inyector, ya que se

requiere de una zona de poco volumen impregnada por la fase móvil, con el fin de evitar la difusión de la muestra y la dilución exponencial (13,14,15).

Requisitos con los que debe cumplir un buen inyector:

- La introducción de la muestra hacia la columna es a través de una estrecha entrada.
- Debe ser reproducible.
- Operar a presiones altas.

1) Inyección con Jeringa. La inyección se hace con una microjeringa diseñada para resistir presiones superiores a 1500 psi. Los materiales del septum incluyen silicona, neopreno, y fluoroelastómeros; algunos contienen teflón para retardar el ataque hacia los elastómeros provocado por ciertos disolventes.

La inyección con jeringa puede ser usada a presiones mayores de 1500 psi usando la técnica de inyección *con paro de flujo*. De esta manera la bomba se apaga hasta que la presión de entrada en la columna iguala a la atmosférica, entonces se inyecta la muestra a las condiciones usuales y posteriormente la bomba se enciende.

VENTAJAS:

- Muy económico.
- Flexible y de fácil operación.

DESVENTAJAS:

Limitación de operación a presiones alrededor de 1500 psi para evitar fracturar la jeringa, la vida corta del septum debido a la introducción de la aguja y a los disolventes utilizados; las reproducibilidades obtenidas pocas veces son < 2%.

2) Inyección con válvulas. Debido al principal inconveniente que presentan las inyecciones con jeringa que es la limitación de trabajar con presiones bajas se ha dispuesto de válvulas de alta presión ya que se puede trabajar a presiones elevadas y proporcionan una aplicación de la muestra muy reproducible.

El instrumental moderno emplea en general válvulas inyectoras donde la muestra se introduce a la válvula mediante una jeringa, desplaza el líquido y llena el espacio interno de una pequeña porción del tubo capilar de acero (usualmente el volumen contenido en el tubo es de 10 a 50 μl). La muestra se inyecta en la columna accionando la válvula de forma tal que la disposición de entrada y salida se invierte.

De esta forma se logra inyectar a cualquier presión un amplio intervalo de tamaños de muestra (no es necesario llenar todo el volumen del tubo con la muestra) con un alto grado de reproducibilidad. Las válvulas inyectoras se fabrican de

materiales inertes, como el teflón y acero inoxidable, y su diseño es tal que resisten presiones muy elevadas (13,14,15).

c. Columnas.

Se considera que el corazón del cromatógrafo es la columna, puesto que en ella se lleva a cabo la separación de los componentes de una mezcla de estudio.

Básicamente la columna consiste de un segmento recto de tubo de acero inoxidable tipo 316, cuya longitud varía entre 10 y 50 cm, con diámetros internos de 2.6-3.0 mm ó bien de 4.6-5.0 mm (al tener diámetros más pequeños los análisis son más rápidos) y diámetro externo de 1/4 de pulgada.

Aunque no forman parte de la columna como tal, las conexiones entre las columnas, así como entre columna-detector o el inyector, deben ser herméticas y de tamaño pequeño. En los extremos de la columna se coloca un disco de metal o teflón poroso para evitar que el relleno de la columna se afloje o se pierda y se produzcan caídas de presión muy grandes.

Actualmente las columnas de cromatografía líquida se han desarrollado en un alto grado de eficiencia (aproximadamente 10,000 platos teóricos por metro de columna). (13,14,15).

d. Detectores.

Un detector ideal sería aquel que satisficiera los siguientes requisitos:

- Altamente sensible.
- Estable.
- De lectura continua.
- Respuesta universal.

Sin embargo, en la actualidad no se cuenta con este tipo de detector y los que existen solo son adecuados para ciertas aplicaciones en particular (13,14,15).

1) Indice de Refracción. La detección de indice de refracción se basa en equilibrar el sistema con la fase móvil pura y medir el cambio de indice de refracción cuando aparece la muestra eluida junto con la fase móvil. es lógico que cuanto mayor sea la diferencia entre los índices de refracción de la muestra y la fase móvil mayor será el desequilibrio; la máxima sensibilidad es cuando se alcanzan a detectar diferencias muy pequeñas entre ambos.

DESVENTAJAS:

En mezclas complejas los índices de refracción de los componentes pueden cubrir un amplio rango de valores y algunos de ellos pueden ser tan cercanos a los de la fase móvil que no pueden ser detectados. Existe la necesidad de equilibrar el

detector cada vez que se produce un pequeño cambio en la composición de la fase móvil. No se puede trabajar por gradiente.

Existen dos tipos de detectores de índice de refracción, ambos requieren del uso de una celda de doble paso en la cual el lado que contiene a la muestra se compara con la referencia que no contiene muestra.

2) Desviación. Este tipo de detectores se basan en la medida del desplazamiento óptico de un rayo de luz, al variar la composición del lado de la muestra en relación con el de referencia. Conforme se eluye la muestra varia el ángulo de refracción, moviéndose el rayo de luz. Esto se traduce como un cambio de la señal que va al detector y lo desequilibra. Esta señal se relaciona con la concentración de la muestra.

VENTAJAS:

- Baja sensibilidad frente a partículas sólidas y burbújas de aire.
- Intervalos de índice de refracción (1.0000-1.7500).

DESVENTAJAS:

- Costoso, difícil manejo (no se puede limpiar con facilidad).

3) Reflexión (Fresnel). Se fundamenta en el principio de Fresnel según el cual en la interfase entre un prisma de vidrio y algún líquido, la cantidad de luz transmitida y reflejada es proporcional al ángulo de incidencia de la luz y al índice de refracción del líquido.

Al entrar la muestra en una celda de luz se refracta con un ángulo diferente, con lo cual a la salida hacia la fotocelda habrá variado su intensidad. El desequilibrio que se genera en el detector provoca un cambio en la energía eléctrica de su señal de salida, dicha señal se relaciona con la concentración de la muestra.

VENTAJAS:

- Alta sensibilidad.
- Opera a flujos muy bajos con celdas de poco volumen.
- Fácil acceso a la celda.
- Bajo costo.

DESVENTAJAS:

- Necesidad de cambiar prismas para adaptarse al índice de refracción de los disolventes.
- Ajuste óptico cuando se cambia el disolvente.

4) Ultravioleta (longitud de onda fija). La ley que rige la espectrofotometría se llama ley de Beer, la cual dice

que un haz de radiación de potencia P_0 incide en el bloque perpendicular a una superficie, después de atravesar una distancia b del material, su potencia se reduce a P por la absorción (Fig. No. 9).

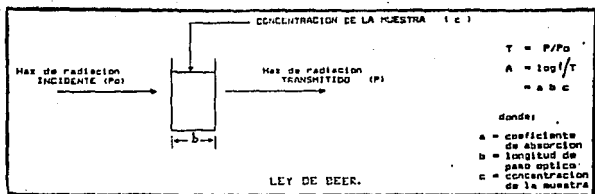


FIGURA No. 9 . LEY DE BEER.

En la ecuación anterior:

a = Absortividad (gramos por litro).

b = Longitud de trayectoria

c = Concentración de la muestra (gramos por litro).

A = Absorbancia

T = Transmitancia.

P = Intensidad de la radiación que pasa.

P_0 = Radiación incidente.

La absortividad es una constante que depende de la longitud de onda y de la naturaleza de la sustancia absorbente y se representa con el término "a" que indica la absortividad de una solución que contenga el 1% en peso de la sustancia

absorbente en una celda de 1 cm de longitud, y se representa como $a_{1\text{ cm}}^{1\text{ M}}$. La ecuación indica que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración de especies absorbentes cuando la longitud de la trayectoria luminosa es fija y directamente proporcional a la trayectoria luminosa cuando la concentración es fija (17).

Cuando algunos grupos funcionales se exponen a la radiación, experimentan excitación electrónica a causa de la absorción de energía a la longitud de onda específica del grupo funcional. Esta energía provoca el paso de un electrón provocando desviación de la luz.

Espectro del Visible: 380-800 nm.

Espectro Ultravioleta: 210-380 nm.

La fuente luminosa más utilizada en los detectores UV posee la mayor parte de su energía a una longitud de onda fija de 254 nm.

VENTAJAS:

- Estables, sensibles [<ing>], económico y sencillo.
- La mayoría de los compuestos que absorben en UV presentan cierta absorción en 254 nm. Muchos detectores presentan filtros también de otras longitudes de onda, sin embargo, la estabilidad de la línea base y la intensidad de la sensibilidad no son comparables como las de 254 nm.

5) UV (Longitud de onda variable). Este tipo de detectores son útiles en 3 casos:

- Para obtener mejor sensibilidad a longitud de onda distinta de 254 nm.
- En caso de que los diferentes componentes presenten absorción a diferentes longitudes de onda.
- Evitar algunos problemas cuando la fase móvil absorbe a 254 nm.

6) Fluorescencia. Para compuestos que presentan fluorescencia natural, así como para los que pueden convertirse en fluorescentes por derivación. Los detectores difieren en el modo de controlar las longitudes de onda. Los más baratos utilizan filtros, los de precio medio se controlan a través de monocromador de una longitud de onda, generalmente la de excitación y los más completos ofrecen control por monocromador de ambas longitudes de onda tanto de excitación como de emisión.

7) Electroquímico. Representa para algunos compuestos mayor selectividad y sensibilidad. Se basa en la oxidación o reducción del compuesto en un electrodo adecuado midiéndose la corriente resultante.

La fase móvil debe ser conductora de la corriente

eléctrica estabilizándose con una sal adecuada, esto impide trabajar en fase normal, se trabaja mejor en fase inversa e intercambio iónico. A la fase móvil se le debe eliminar oxígeno, contaminantes metálicos y haluros para reducir la corriente de fondo y por lo tanto el ruido que se deriva de la línea base.

En cuanto a las muestras deben ser oxidables o reducibles a un potencial que no provoque electrólisis de la fase móvil o los restantes compuestos de la muestra.

B) Arreglo de fotodiodos. Es el principio de detección más moderno que existe para cromatografía de líquidos. Cubre un intervalo de longitud de onda desde UV hasta cerca del IR. Obtiene absorciones UV/VIS simultáneamente por lo que se pueden construir cromatogramas en tres dimensiones (absorbancia v.s tiempo v.s longitud de onda).

Utiliza una lámpara de deuterio, la cual emite luz que pasa a través de un lente y de una abertura, (la cual limita la cantidad de luz que penetra al sistema proveniente de la lámpara) y luego entra en la celda. Toda la luz proveniente de la lámpara pasa a través de la celda, y viaja hasta el monocromador de óptica inversa donde es dispersada en todas sus longitudes de onda y es así como llega hasta el arreglo de fotodiodos. Cuando la luz incide sobre los fotodiodos, la energía luminosa para cada longitud de onda no llega a un fotodiodo en particular, sino que éstos están dispuestos en tal

forma que sólo reciben la energía luminosa correspondiente a un intervalo pequeño de longitud de onda del total del espectro. Los fotodiodos al recibir la señal luminosa se descargan en una cierta medida, la descarga de los fotodiodos es directamente proporcional a la cantidad de muestra y por consiguiente a la absorbancia.

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

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

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

F. Validación.

1. DEFINICION.

Cuando se inicia el desarrollo de un nuevo método analítico se requiere de parámetros que permitan la selección de la técnica más apropiada para el análisis de un compuesto determinado, así como la seguridad de la confiabilidad de la misma. La validación de métodos analíticos puede definirse como el proceso por el cual a través de estudios de laboratorio, se establece que la capacidad del método satisface los requisitos necesarios para las aplicaciones analíticas deseadas. El proceso de validación verifica que una metodología en particular este basada sobre principios técnicos y que ha sido optimizada para los propósitos prácticos de medición. Más que una simple medida de un procedimiento, la validación de métodos es una medida de la efectividad total de un sistema analítico, ya que los estudios deben de asegurar que el método, los instrumentos, disolventes, reactivos y todo lo usado durante el ensayo es adecuado para el compuesto a analizar. Obviamente que un método que es validado en una situación determinada puede ser inválido para otra. Las características de rendimiento se expresan generalmente por términos de parámetros analíticos.

Las validaciones deben ser realizadas tomando en cuenta una serie de consideraciones como son: método de análisis, compuesto a analizar, forma farmacéutica y/o matriz donde se localiza el compuesto, niveles de concentración, etc. Por lo que es lógico

suponer que diferentes métodos de ensayo requieran diferentes esquemas de evaluación. Sin embargo los parámetros de evaluación más comunes para la validación de métodos analíticos son los siguientes:

- a. Exactitud
- b. Linealidad
 - 1) Linealidad del Sistema
 - 2) Linealidad del Método
- c. Precisión
 - 1) Repetibilidad
 - 2) Reproducibilidad
- d. Especificidad

Algunos otros parámetros menos comunes, que se utilizan según lo requiera el método son: Sensibilidad, Tolerancia del Sistema, Cantidad mínima detectable, Cantidad mínima cuantificable, Estabilidad de la Muestra, etc. (18,19).

2. PARAMETROS.

a. Linealidad del Sistema.

1) Definición. La linealidad de un sistema es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un rango determinado.

2) Determinación. Se determina, construyendo una curva de calibración de la concentración contra la respuesta, de una misma solución patrón utilizando cuando menos 5 diluciones y haciendo análisis por triplicado 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 un fármaco en una forma farmacéutica, deberá estar incluido el cien por ciento de la dosis.

CONCENTRACION DE LA DILUCION DE LA SOLUCION PATRON (X).	PROPIEDAD MEDIDA (Y)
X ₁	Y ₁₁ , Y ₁₂ , ... Y _{1n}
X ₂	Y ₂₁ , Y ₂₂ , ... Y _{2n}
X ₃	Y ₃₁ , Y ₃₂ , ... Y _{3n}
.
.
X _t	Y _{t1} , Y _{t2} ... Y _{tn}

t = Número de diluciones.

n = Número de repeticiones (propiedad medida) de cada dilución de la solución patrón.

3) Cálculos.

$$\sum X = X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_t.$$

$$\sum Y = Y_{11} + Y_{12} + \dots + Y_{1n} + Y_{21} + Y_{22} + \dots + Y_{2n} \\ + \dots + Y_{t1} + Y_{t2} + \dots + Y_{tn}.$$

$$\sum X^2 = X_1^2 + X_2^2 + \dots + X_t^2.$$

$$\sum Y^2 = Y_{11}^2 + Y_{12}^2 + \dots + Y_{1n}^2 + Y_{21}^2 + Y_{22}^2 + \dots + Y_{2n}^2 \\ + \dots + Y_{t1}^2 + Y_{t2}^2 + \dots + Y_{tn}^2.$$

$$\sum XY = X_1(Y_{11} + Y_{12} + \dots + Y_{1n}) + X_2(Y_{21} + Y_{22} + \dots + \\ Y_{2n}) + \dots + X_t(Y_{t1} + Y_{t2} + \dots + Y_{tn}).$$

PENDIENTE.

$$m = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2}$$

ORDENADA AL ORIGEN.

$$b = \frac{(\sum Y)(\sum X^2) - (\sum X)(\sum XY)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2} = \frac{\sum Y - m \sum X}{n}$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION.

$$r^2 = \frac{[n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)]^2}{[n(\sum X^2) - (\sum X)^2][n(\sum Y^2) - (\sum Y)^2]}$$

4) Criterios de aceptación:

Coefficiente de Determinación (r^2) ≥ 0.98

Coefficiente de Correlación (r) ≥ 0.99

b. Linealidad del Método.

1) Definición. La linealidad de un método analítico es definida como la variación de fármaco recuperado en el análisis en función de la cantidad real de la muestra.

Algunas desviaciones de la linealidad del método indican que el método no está siendo trabajado adecuadamente para las muestras con respecto a las concentraciones del fármaco. En tales casos el estudio puede modificarse y revalidarse el método.

2) Determinación. La linealidad puede evaluarse por ensayos de placebos cargados, cuando menos a tres diferentes concentraciones alrededor del valor teórico que se va a analizar, haciendo los análisis por triplicado de cada concentración.

La amplitud del estudio 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.

Los resultados se tabulan en base al siguiente formato:

CANTIDAD ADICIONADA (X)	CANTIDAD RECUPERADA (Y)
X ₁	Y _{11}, Y_{12}, ... Y_{1n}}}}
X ₂	Y _{21}, Y_{22}, ... Y_{2n}}}}
.	.
.	.
X _t	Y _{t1}, Y_{t2}, ... Y_{tn}}}}

t = Número de cantidades adicionadas.

n = Número de repeticiones (cantidad recuperada) por cada cantidad adicionada.

3) Cálculos.

$$\Sigma X = X_1 + X_2 + \dots + X_t.$$

$$\Sigma Y = Y_{11} + Y_{12} + \dots + Y_{1n} + Y_{21} + Y_{22} + \dots + Y_{2n} \\ + \dots + Y_{t1} + Y_{t2} + \dots + Y_{tn}.$$

$$\Sigma X^2 = X_1^2 + X_2^2 + \dots + X_t^2.$$

$$\Sigma Y^2 = Y_{11}^2 + Y_{12}^2 + \dots + Y_{1n}^2 + Y_{21}^2 + Y_{22}^2 + \dots + Y_{2n}^2 \\ + \dots + Y_{t1}^2 + Y_{t2}^2 + \dots + Y_{tn}^2.$$

$$\Sigma XY = X_1 (Y_{11} + Y_{12} + \dots + Y_{1n}) + X_2 (Y_{21} + Y_{22} + \dots + Y_{2n}) \\ + \dots + X_t (Y_{t1} + Y_{t2} + \dots + Y_{tn}).$$

PENDIENTE.

$$m = \frac{n (\sum XY) - (\sum X) (\sum Y)}{n (\sum X^2) - (\sum X)^2}$$

ORDENADA AL ORIGEN.

$$b = \frac{(\sum Y) (\sum X^2) - (\sum X) (\sum XY)}{n (\sum X^2) - (\sum X)^2} = \frac{\sum Y - m \sum X}{n}$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION.

$$r^2 = \frac{[n (\sum XY) - (\sum X) (\sum Y)]^2}{[n (\sum X^2) - (\sum X)^2] [n (\sum Y^2) - (\sum Y)^2]}$$

Finalmente se determinan los valores de t de Student, para evaluar la ordenada al origen y la pendiente estadísticamente.

$$McErrReg = \frac{\sum Y^2 - m (\sum XY) - b (\sum Y)}{n - 2}$$

$$McReg = b (\sum Y) + m (\sum XY) - [(\sum Y)^2/n]$$

$$Sm = \left[McErrReg \left(\frac{X_p^2}{n \sum X^2 - (\sum X)^2} + \frac{1}{n} \right) \right]^{1/2}$$

$$S_b = \left[\text{McReg} \left(\frac{1}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \right) \right]^{1/2}$$

Donde:

McErrReg = Media Cuadrática de Error de Regresión.

McReg = Media Cuadrática de Regresión.

S_m = Desviación Estándar para la Pendiente.

S_b = Desviación Estándar para la Ordenada al origen.

X_P = Promedio de x.

n = Número de datos.

$$t_{\text{calc } m} = \frac{1 - m}{S_m}$$

$$t_{\text{calc } b} = \frac{0 - b}{S_b}$$

La t de tablas se determina con n-1 grados de libertad y un nivel de significancia de 0.95.

4) Criterios de aceptación.

Para la pendiente y la ordenada al origen: Se comparan el valor de tablas contra los valores calculados de t_m y t_b

Si:

$|t_b| < t_{\text{tablas}} (n-1, 0.95)$ estadísticamente la ordenada al origen es igual a cero.

Si

$|t_m| < t_{(n-1, 0.95)}$ estadísticamente la pendiente es igual a 1. (18.19).

c. Especificidad.

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

2) Determinación. La especificidad es una medida de la interferencia o carencia de la misma al analizar una muestra compleja. La especificidad de un método analítico se demuestra al comparar los resultados del análisis que contienen impurezas, placebo, productos de degradación o formación, con muestras que carecen de lo anterior. Cuando las impurezas, productos de degradación o formación no son conocidas, la especificidad se demuestra obteniendo los primeros y más importantes productos de degradación a través de reacciones simuladas y controladas de degradación. Para

ésto se someten a degradación, por las vías más comunes (hidrólisis ácida y básica, oxidación y fotólisis) a:

- Principios activos.
- Placebo.
- Formulación o placebo cargado.

3) Criterios de Aceptación.

Para Métodos de Control de Calidad: Confirmar que el método desarrollado es capaz de cuantificar la sustancia de interés sin que exista interferencia de los excipientes.

Para Métodos Indicadores de Estabilidad: Verificar que los productos de degradación y/o sustancias relacionadas no interfieran con la cuantificación de la sustancia de interés utilizando el método desarrollado (18,19).

d. Exactitud.

1) Definición. La exactitud de un método analítico es la concordancia de los resultados obtenidos en el análisis experimental con respecto al valor verdadero, se expresa generalmente a través del porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

La estimación de la exactitud de un método está asociado con el error total ($E_t = E_d + E_i$) que es la suma del error indeterminado y el error determinado. El error determinado se

debe a una falta de control en la técnica analítica (errores de operación, calibración, reactivos, etc.) y es controlable. El error indeterminado permanece, aún cuando se han hecho todos los esfuerzos por eliminarlo, es incontrolable pero puede medirse con una validación adecuada.

2) Determinación. Se determina al aplicar el método a placebos cargados ya sea al cien por ciento (mínimo seis análisis) o a diferentes concentraciones arriba y abajo de la concentración teórica, por el mismo analista en las mismas condiciones de operación (18,19).

3) Cálculos.

PORCIENTO RECUPERADO PARA CADA RECOBRO (X)

$$X = C \frac{Y}{x} \cdot 100$$

MEDIA DEL PORCIENTO RECUPERADO (\bar{x})

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

DESVIACION ESTANDAR DEL PORCIENTO RECUPERADO (S)

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

COEFICIENTE DE VARIACION (CV)

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

t DE STUDENT

$$t_{calc} = \frac{\bar{x} - 100\%}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$$

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA.

$$IC = \bar{x} \pm t_{(gl, n-2, 0.95)} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Donde: n = Número de recobros independientes.

x = Cantidad adicionada.

Y = Cantidad recuperada.

4) Criterios de Aceptación.

$$CV < 2\%$$

$$t_{calc} \leq t_{(gl, n-2, 0.95)}$$

e. Precisión.

1) Definición. La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto.

Usualmente se expresa en términos de coeficiente de variación. Para evaluar este parámetro se determina la repetibilidad y reproducibilidad del método (18,19).

f) Repetibilidad.

1) Definición. Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por un mismo analista, usando los mismos aparatos y técnicas.

2) Determinación. Para cuantificar este parámetro se utilizan los datos obtenidos en la exactitud del método (18,19).

3) Cálculos.

$$CV = C \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

Donde: s = Desviación Estándar.

\bar{x} = Promedio de valores.

4) Criterios de Aceptación.

METODO	C. V
ESPECTROFOTOMETRICOS Y QUIMICOS	< 3%
CROMATOGRAFICOS	< 2%
MICROBIOLOGICOS	< 5%

g. Reproducibilidad.

1) Definición. 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 aparatos.

2) Determinación.

Se analiza una muestra homogénea por triplicado por cada uno de dos analistas en dos días diferentes, utilizando un modelo anidado, de efectos aleatorios de dos factores (A:analista, D:día), el cual se representa con la siguiente ecuación (18,19):

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_{j(i)} + E_{k(ij)}$$

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

μ = Cantidad de principio activo en la muestra.

A_i = Efecto del analista en el porcentaje cuantificado.

$D_{j(i)}$ = Efecto del j -ésimo día en el i -ésimo analista sobre el porcentaje cuantificado.

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

3) Cálculos.

Los resultados se tabulan de la siguiente manera:

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

$$\Sigma Y^2 \dots = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + Y_{123} + \dots + Y_{223})^2$$

$$\Sigma Y^2_{ijk} = Y^2_{111} + Y^2_{112} + Y^2_{113} + Y^2_{121} + Y^2_{122} + Y^2_{123} + \dots + Y^2_{223}$$

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

$$\Sigma Y^2_{(j)} = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113})^2 + (Y_{121} + Y_{122} + \\ Y_{123})^2 + (Y_{211} + Y_{212} + Y_{213})^2 + (Y_{221} + Y_{222} + \\ Y_{223})^2$$

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

Donde:

a = Número de analistas.

d = Número de días.

r = Número de repeticiones por día y por analista.

Y = Porcentaje del principio activo cuantificado.

$\Sigma Y^2_{...}$ = Suma total de los porcentajes cuantificados por los analistas al cuadrado.

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

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

ΣY^2_{ij} = Suma total de los cuadrados de los porcentajes cuantificados por un analista en un día.

$\Sigma Y^2_{i..}$ = Suma total de los cuadrados de los porcentajes cuantificados por un analista.

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALC
ANALISTA	a - 1	$\Sigma C_a = \frac{\Sigma Y^2_{i..}}{d} - \frac{\Sigma Y^2_{...}}{adr}$	$MC_a = \frac{\Sigma C_a}{a-1}$	$F_a = \frac{MC_a}{MC_d}$
DIA	a (d-1)	$\Sigma C_d = \frac{\Sigma Y^2_{.j.}}{r} - \frac{\Sigma Y^2_{...}}{dr}$	$MC_d = \frac{\Sigma C_d}{a(d-1)}$	$F_d = \frac{MC_d}{MC_e}$
ERROR	ad(r-1)	$\Sigma C_e = \Sigma Y^2_{ijk} - \frac{\Sigma Y^2_{ij.}}{r}$	$MC_e = \frac{\Sigma C_e}{ad(r-1)}$	

4) Criterios de Aceptación.

$F_a \text{ calc} \leq F_a \text{ tablas.}$

$F_d \text{ calc} \leq F_d \text{ tablas.}$

3. COMPARACION DE METODOS.

Los parámetros estadísticos para comparar dos métodos analíticos validados son: Linealidad del Método, Exactitud, Precisión y Repetibilidad (48,10).

a. Linealidad del Método.

Se requiere de la siguiente información:

$\Sigma X_1, \Sigma X_1^2, \Sigma Y_1, \Sigma Y_1^2, \Sigma XY_1, m_1, t_1$ y n_1 (METODO 1).

$\Sigma X_2, \Sigma X_2^2, \Sigma Y_2, \Sigma Y_2^2, \Sigma XY_2, m_2, t_2$ y n_2 (METODO 2).

Donde:

ΣX_1 = Sumas de las cantidades adicionadas (Método 1).

ΣX_2 = Sumas de las cantidades adicionadas (Método 2).

m_1 = Pendiente - Método 1.

m_2 = Pendiente - Método 2.

n_1 = Número de replicas por nivel (método 1).

n_2 = Número de replicas por nivel (método 2).

t_1 = Número de niveles por porcentaje recuperado
(Método 1).

t_2 = Numero de niveles por porcentaje recuperado
(Método 2).

1) Cálculos.

$$S_E^2 = \frac{(\Sigma Y_1^2 - m_1(\Sigma XY_1) - b_1(\Sigma Y_1)) + (\Sigma Y_2^2 - m_2(\Sigma XY_2) - b_2(\Sigma Y_2))}{t_1 n_1 + t_2 n_2 - 4}$$

Determinación de la desviación estándar de pendientes:

$$S_{dm}^2 = S_E^2 * \left[\frac{1}{\Sigma X_1^2 - (\Sigma X_1)^2 / n_1 t_1} + \frac{1}{\Sigma X_2^2 - (\Sigma X_2)^2 / n_2 t_2} \right]$$

Determinación del límite superior para la diferencia de
pendientes (LSIC):

$$LSIC = (m_1 - m_2) + t * \sqrt{S_{dm}^2}$$

Determinación del límite inferior para la diferencia de pendientes (LIIC):

$$LIIC = (m_1 - m_2) - t \cdot \sqrt{S^2_{dm}}$$

t = valor de la t de la distribución de Student con

$(n_1 + n_2 - 4)$ grados de libertad y una

probabilidad acumulada de 0.975.

Determinación de la desviación estándar de las ordenadas al origen:

$$S^2_{do} = S^2_E \cdot \left[\frac{1}{n_1 t_1} + \frac{1}{n_2 t_2} + \frac{(EX_1)^2}{n_1^2 t_1^2 (\Sigma X_1^2 - (EX_1)^2 / n_1 t_1)} + \frac{(EX_2)^2}{n_2^2 t_2^2 (\Sigma X_2^2 - (EX_2)^2 / n_2 t_2)} \right]$$

Determinación del límite superior para la diferencia de las ordenadas al origen (LSIC):

$$LSIC = (b_1 - b_2) + t \cdot \sqrt{S^2_{do}}$$

Determinación del límite inferior para la diferencia de las ordenadas al origen:

$$LIIC = (b_1 - b_2) - t \cdot \sqrt{S^2_{do}}$$

2) Criterios de Aceptación.

- En el intervalo de confianza para la diferencia de la pendiente de la cantidad adicionada-cantidad recuperada debe localizarse el valor de cero.

- En el intervalo de confianza para la diferencia de las ordenadas al origen de cantidad adicionada-cantidad recuperada debe localizarse el valor de cero (0,10).

b. Exactitud.

CASO I: Cuando los métodos tienen la misma repetibilidad.

Información requerida:

DE_1 , DE_2 , N_1 , N_2 , \bar{R}_1 y \bar{R}_2 .

Donde:

DE_1 = Desviación Estándar del porcentaje recuperado (Método 1).

DE_2 = Desviación Estándar del porcentaje recuperado (Método 2).

N_1 y N_2 = Números de porcentajes recuperados para ambos métodos respectivamente.

\bar{R}_1 y \bar{R}_2 = Media aritmética del porcentaje recuperado para ambos métodos.

1) Cálculos.

$$Dep = \left[\frac{(N_1 - 1) DE_1^2 + (N_2 - 1) DE_2^2}{N_1 + N_2 - 2} \right]^{1/2}$$

Determinación del límite superior del intervalo de confianza para la diferencia de las medias aritméticas(LSIC):

$$LSIC = (\bar{R}_1 - \bar{R}_2) + \underline{t} * Dep * \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}$$

Determinación del límite inferior del intervalo de confianza para la diferencia de las medias aritméticas(LIIC):

$$LIIC = (\bar{R}_1 - \bar{R}_2) - \underline{t} * Dep * \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}$$

\underline{t} = valor de la distribución de t de Student con $(N_1 + N_2 - 2)$ grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975.

CASO II : Cuando los métodos NO tienen la misma repetibilidad.

$$g.1 = \frac{(DE_1^2 / N_1 + DE_2^2 / N_2)^2}{\frac{(DE_1^2 / N_1)^2}{N_1 + 1} + \frac{(DE_2^2 / N_2)^2}{N_2 + 1}} - 2$$

Determinación de los límites superior e inferior del intervalo de confianza para la diferencia de las medias aritméticas respectivamente LSIC y LIIC:

$$LSIC = (\bar{R}_1 - \bar{R}_2) + \underline{t} * \sqrt{DE_1^2 / N_1 + DE_2^2 / N_2} \quad y$$

$$LIIC = (\bar{R}_1 - \bar{R}_2) - \underline{t} * \sqrt{DE_1^2 / N_1 + DE_2^2 / N_2}$$

\underline{t} = valor de la distribución de la t de Student con g.1 grados de libertad y una probabilidad de 0.975.

2) Criterios de Aceptación.

-En el intervalo de confianza para la diferencia de las medias aritméticas del por ciento recuperado, debe localizarse el valor de cero (0,00).

c. Repetibilidad.

Información requerida.

DE₁ y DE₂.

Donde:

DE₁ = Desviación Estándar del porciento recuperado (Método 1).

DE₂ = Desviación Estándar del porciento recuperado (Método 2).

1) Cálculos.

Determinación del límite superior del intervalo de confianza para la razón de varianzas (LSIC):

$$LSIC = \frac{DE_1^2}{DE_2^2} * F$$

Determinación del límite inferior del intervalo de confianza para la razón de varianzas (LIIC):

$$LIIC = \frac{DE_1^2}{DE_2^2} * \frac{1}{F}$$

F = valor de la distribución de Fischer con (N₁-1) grados de libertad en el numerador y (N₂-1) grados de libertad en el denominador, y una probabilidad acumulada de 0.975.

2) Criterios de Aceptación.

-En el intervalo de confianza para la razón de varianzas (calculada a partir del porcentaje recuperado de Exactitud al 100 %) debe localizarse el valor de 1 (10,10).

d. Precisión.

Información requerida.

DE₁ y DE₂.

Donde:

DE₁ = Desviación Estándar del porcentaje recuperado (Método 1).

DE₂ = Desviación Estándar del porcentaje recuperado (Método 2).

1) Cálculos.

Nota: Los cálculos indicados se aplican cuando se utilizan 2 días, 2 analistas y 3 determinaciones.

Determinación del límite superior del intervalo de confianza para la razón de varianzas (LSIC):

$$LSIC = \frac{DE_1^2}{DE_2^2} = 4.43$$

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Determinación del límite inferior del intervalo de
confianza para la razón de varianzas (LIIC):

$$LIIC = \frac{DE_1^2}{DE_2^2} \times 0.226$$

2) Criterios de Aceptación.

- En el intervalo de confianza para la razón de varianzas
calculada a partir del porciento recuperado de Exactitud al
100% debe localizarse el valor de 1 (u.e.).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En nuestro país es común encontrar enfermedades vaginales provocadas por los cambios fisiológicos propios del desarrollo de la mujer. Aunque no se ha llegado a problemas de salud nacional, es importante señalar que en México existe una gran cantidad de mujeres que padecen infecciones de este tipo, originadas en su mayoría por bacterias.

Desde el año de 1944 (20), se publicaron trabajos relacionados con la actividad bacteriostática y bactericida de los nitrofuranos contra un gran número de bacterias gram positivas y gram negativas, por lo que son considerados como principios activos de amplio espectro, posteriormente se demostró la utilidad de estos, principalmente de la Nitrofurazona para el tratamiento de diversos padecimientos infecciosos, y actualmente su empleo en el campo de la medicina es amplio (21).

El interés actual sobre esta actividad de la Nitrofurazona ha permitido determinar que no sólo puede formularse como ungüento o crema, sino también como óvulo cuya forma farmacéutica es específica para los padecimientos ya mencionados. El diseño de esta forma origina la necesidad de desarrollar y validar un método analítico para cuantificar al activo y garantizar su efecto.

Cabe mencionar que los óvulos de Nitrofurazona como

forma farmacéutica no son considerados en la USP XXII ni en la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos 5ª edición por lo que es importante desarrollar métodos analíticos específicos, rápidos, sencillos y económicos, además de demostrar su confiabilidad y aceptabilidad mediante la validación de los mismos.

El hecho de validar diferentes métodos, permite realizar comparaciones entre ellos, con la finalidad de determinar cuales son los que cumplen con los requisitos establecidos. Es conveniente señalar que existen dos tipos de métodos analíticos (a) para cuantificar un principio activo; los de control de calidad cuya característica principal debe ser la rapidez y facilidad del análisis y los métodos indicadores de estabilidad, que pueden ser utilizados para control de calidad y que permiten cuantificar a productos de degradación y excipientes de manera adicional después de ser sometidos a diferentes condiciones de estabilidad (temperatura y humedad relativa) al producto.

Actualmente es un requisito indispensable que el desarrollo de un método analítico independientemente de sus características, sea validado.

La validación de cualquier método permite evaluar su reproducibilidad con lo cual se puede garantizar la cuantificación del principio activo y su uniformidad en la forma farmacéutica.

En el presente trabajo se desarrolló y validó un método de cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificar Nitrofurazona en óvulos y se validó además un método espectrofotométrico ya establecido para el mismo fin siendo ambos para control de calidad.

III. OBJETIVOS

A. Objetivo General:

Validar y comparar estadísticamente dos métodos analíticos para cuantificar Nitrofurazona en Óvulos.

B. Objetivos Particulares:

1. Determinar la estabilidad de la muestra para establecer las condiciones de trabajo.

2. Validar el método analítico espectrofotométrico establecido para cuantificar Nitrofurazona en óvulos, considerando los siguientes parámetros:

Linealidad del método

Linealidad del sistema

Precisión

Exactitud

Especificidad

3. Validar el método analítico por cromatografía líquida de alta resolución desarrollado para cuantificar Nitrofurazona en óvulos, considerando los parámetros mencionados anteriormente.

4. Realizar una comparación estadística de los métodos validados.

IV. HIPOTESIS

La comparación estadística entre los parámetros de validación de los métodos espectrofotométrico y cromatográfico, permite establecer que existe una correlación adecuada entre ellos, los cuales se pueden utilizar como métodos para control de calidad alternativamente.

V. DESARROLLO EXPERIMENTAL

A. Material, Reactivos y Equipo.

MATERIAL	DESCRIPCION
Matraces volumétricos	10, 25, 50, 100 ml
Pipeta graduada Pyrex	5 ml
Pipetas volumétricas Pyrex	1, 2, 3, 4, 5, 10, 25 ml
Vasos de precipitado Pyrex	100, 250 ml
Probeta graduada Pyrex	50, 250, 1000 ml
Termómetro Taylor	-10 a 110° C
Matraz erlenmeyer Pyrex	1000 ml
Navecillas de pesado	
Viales de vidrio ambar para inyector automático de 1 ml	
Equipo de filtración Millipore	
Membranas de filtración Millex de 45 micras	
Jeringa de filtración de 5 ml	

REACTIVOS

Nitrofurazona USP
Pluracol E 400, E 500, E 6000.
Acido acético glacial R.A. J.T.Baker
Agua destilada
Dimetilformamida R.A. J.T.Baker
Agua grado HPLC
Metanol grado HPLC Baxter

EQUIPO

Balanza Mettler AE200

Espectrofotómetro Beckman DU 68

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Beckman.

Bomba Beckman modelo S.G. 126 para cromatógrafo de líquidos.

Detector Beckman modelo S.G. 166 para cromatógrafo de líquidos de longitud de onda variable.

Inyector automático Beckman modelo S.G. 507 .

Integrador IBM .

Baño de ultrasonido.

Columna Novapak Cis, 3.8 mm de diámetro, 7.5 cm de longitud.

B. Composición del Óvulo.

Cada óvulo contiene:

Nitrofurazona..... 6 mg

Pluracol E 400

Pluracol E 500

Pluracol E 8000

C. Estabilidad de la Muestra.

Se prepararon placebos cargados (por duplicado) que contenían el equivalente al 100% del principio activo, se analizaron inmediatamente y se sometieron a las siguientes condiciones: temperatura ambiente, 4 °C, 40 °C y a la luz durante 24 y 48 hrs, y se analizaron en ambos lapsos de tiempo

D. Método Espectrofotométrico.

SOLUCION PROBLEMA:

En un vaso de precipitado de 100 ml pesar 3.334g de la muestra, fundir en baño maria, agregar 10 ml de Dimetilformamida si es necesario disolver en caliente y llevarlo cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 ml dejar enfriar y aforar con agua destilada; homogenizar la solución. De esta solución tomar una alícuota de 5 ml y llevar a 100 ml con agua destilada en otro matraz volumétrico, homogenizar la solución.

SOLUCION ESTANDAR:

En un matraz volumétrico de 100 ml colocar 10 mg de Nitrofurazona SR, exactamente pesados, adicionar 10 ml de Dimetilformamida y agitar para disolver, enseguida llevar a volumen con agua destilada y homogenizar la solución; de esta solución tomar una alícuota de 5 ml y llevarlos a un matraz volumétrico de 100 ml, aforar con agua destilada y agitar. (Concentración final 5µg/ml).

Determinar la absorbancia de la solución problema y estándar a 365 nm utilizando agua como blanco.

Nota: Proteger las soluciones de la luz durante el ensayo.

E. Método Cromatográfico de Alta Resolución.

FASE MOVIL: Adicionar 4.2 ml de ácido acético glacial a 850 ml de agua HPLC y mezclar, adicionar 150 ml de metanol HPLC, mezclar y desgasificar.

SOLUCION PROBLEMA:

En un vaso de precipitado de 100 ml pesar 2.0 g de la muestra, agregar 50 ml de Dimetilformamida y fundir en baño maría agitando hasta disolver la muestra. Transferir cuantitativamente la solución a un matraz volumétrico de 100 ml, enjuagar el vaso con pequeñas porciones de Dimetilformamida y agregar al matraz, disolver y aforar con el mismo disolvente.

De esta solución transferir una alícuota de 5 ml a un matraz volumétrico de 10 ml, diluir y aforar con fase móvil.

Passar la solución a través de un filtro millex de 45 micras.

SOLUCION ESTANDAR:

En un matraz volumétrico de 100 ml colocar 15 mg de Nitrofurazona SR, exactamente pesados, adicionar 50 ml de Dimetilformamida y agitar para disolver, enseguida llevar a volumen con el mismo disolvente homogenizar la solución; de esta solución tomar una alícuota de 10 ml y llevarlos a un matraz volumétrico de 50 ml, diluir y aforar con fase móvil.

SISTEMA CROMATOGRAFICO:

Columna: Novapak C18, 3.8 mm de diámetro,
7.5 cm de longitud.
Detector UV: 360 nm.
Flujo: 1 ml/min.
Volumen de inyección: 20 µl.
Fase móvil: Agua acidificada-Metanol (85:15).
Tiempo de corrida: 5 minutos.

F. Validación del Método Espectrofotométrico.

1. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Se preparó una solución patrón de referencia cuya concentración era de 25 mg/ml, de esta solución se prepararon por triplicado diferentes soluciones para obtener la cantidad de principio activo equivalente al 50% (5 mg), 75% (7.5 mg), 100% (10 mg), 125% (12.5 mg) y 150% (15 mg) de la cantidad necesaria para llevar a cabo el análisis.

2. LINEALIDAD DEL METODO.

Se preparó una solución patrón de referencia cuya concentración era de 25 mg/ml, de esta solución se prepararon por triplicado diferentes soluciones para obtener la cantidad de principio activo equivalente al 50% (5 mg), 75% (7.5 mg), 100% (10 mg), 125% (12.5 mg) y 150% (15 mg) de la cantidad necesaria

para llevar a cabo el análisis, y se le agregó a cada una de las muestras el placebo correspondiente al 100% de principio activo y se analizaron.

3. ESPECIFICIDAD.

Se analizaron por duplicado muestras de estándar de Nitrofurazona, placebos cargados y placebos en cantidad equivalente al 100% de principio activo bajo las mismas condiciones analíticas.

4. EXACTITUD.

Se pesaron 10 muestras de estándar de principio activo equivalente al 100% de la cantidad necesaria para llevar a cabo el análisis. A cada una de las muestras se agregó la cantidad correspondiente de placebo y se analizaron de acuerdo al método.

5. PRECISION.

a. Repetibilidad del Método.

Para cuantificar este parámetro se utilizaron los datos obtenidos en la Exactitud del Método.

b. Reproducibilidad del Método.

Se seleccionaron al azar dos analistas, a los cuales se les entregó una muestra de placebo cargado para que la analizaran por triplicado, dos días diferentes por el método indicado.

G. Validación del Método Cromatográfico.

1. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Se preparó una solución patrón de referencia cuya concentración era de 37.5 mg/ml, de esta solución se prepararon por triplicado diferentes soluciones para obtener la cantidad de principio activo equivalente al 50% (15 µg), 75% (22.5 µg), 100% (30 µg), 125% (37.5 µg) y 150% (45 µg) de la cantidad necesaria para llevar a cabo el análisis.

2. LINEALIDAD DEL METODO.

Se preparó una solución patrón de referencia cuya concentración era de 37.5 mg/ml, de esta solución se prepararon por triplicado diferentes soluciones para obtener la cantidad de principio activo equivalente al 50% (15 µg), 75% (22.5 µg), 100% (30 µg), 125% (37.5 µg) y 150% (45 µg) de la cantidad necesaria para llevar a cabo el análisis, y se le agregó a cada una de las muestras el placebo correspondiente al 100% de principio activo y se analizaron.

3. ESPECIFICIDAD.

Se analizaron por duplicado muestras de referencia de nitrofurazona, placebos cargados y placebos en cantidad equivalente al 100% de principio activo bajo las mismas condiciones analíticas.

4. EXACTITUD.

Se pesaron 10 muestras de estándar de principio activo equivalente al 100% de la cantidad necesaria para llevar a cabo el análisis. A cada una de las muestras se agregó la cantidad correspondiente de placebo y se analizaron de acuerdo al método.

5. PRECISION.

a. Repetibilidad del Método.

Para cuantificar este parámetro se utilizaron los datos obtenidos en la Exactitud del Método.

b. Reproducibilidad del Método.

Se seleccionaron al azar dos analistas, a los cuales se les entregó una muestra de placebo cargado para que la analizaran por triplicado, dos días diferentes por el método indicado.

VI. RESULTADOS

A. Estabilidad de la Muestra.

		CONDICION			
		4°C	40°C	Luz Blanca	Tem. Amb.
T I E M P O	I N I C I A L	99.50%	97.52%	99.00%	99.50%
		99.25%	96.26%	99.50%	100.50%
	24 HRS	99.00%	98.26%	83.13%	99.50%
		99.00%	98.76%	84.12%	99.50%
	48 HRS	97.27%	96.28%	79.65%	96.26%
		97.27%	96.77%	80.40%	96.53%

B. Método Espectrofotométrico.

1. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

CANTIDAD ADICIONADA (X) mg	PROPIEDAD MEDIDA (Y) ABS
5.0	0.200, 0.201, 0.200
7.5	0.301, 0.301, 0.300
10.0	0.404, 0.402, 0.403
12.5	0.503, 0.504, 0.503
15.0	0.604, 0.605, 0.604

$$\Sigma X = 150.0$$

$$\Sigma Y = 6.035$$

$$\Sigma X^2 = 1687.5$$

$$\Sigma Y^2 = 2.7344$$

$$\Sigma XY = 67.93$$

PENDIENTE.

$$m = \frac{15 (67.93) - (150) (6.035)}{15 (1687.5) - (150)^2} = 0.04043$$

ORDENADA AL ORIGEN.

$$b = \frac{(6.035) - (0.04043) (150)}{15} = - 0.001966$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION.

$$r^2 = \frac{[15 (67.93) - (150) (6.035)]^2}{[15 (1687.5) - (150)^2] [15 (2.7344) - (6.035)^2]}$$

$$r^2 = 1.0003$$

$$r = 1.00015$$

Criterios de aceptación:

Coefficiente de Determinación $1.0003 \geq 0.99$

Coefficiente de Correlación $1.00015 \geq 0.99$

LINEALIDAD DEL SISTEMA. NITROFURAZONA.

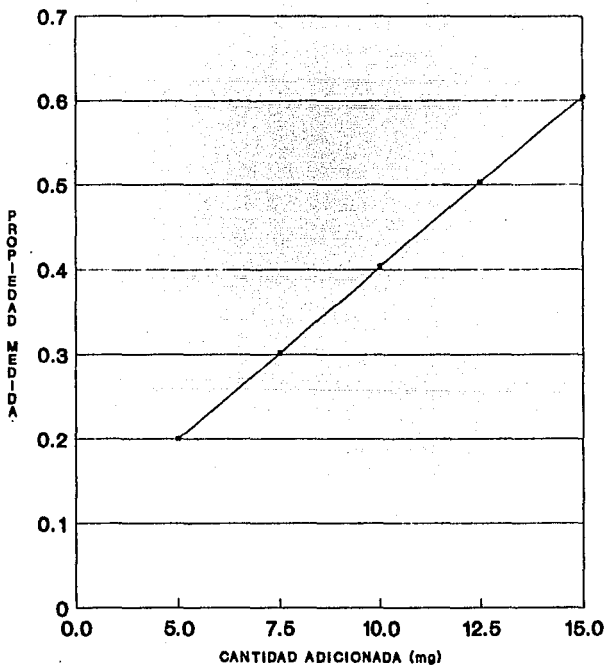


FIGURA 10 LINEALIDAD DEL SISTEMA
METODO ESPECTROFOTOMETRICO

2. LINEALIDAD DEL METODO.

CANTIDAD ADICIONADA (X) mg	CANTIDAD RECUPERADA (Y) mg
5.0	4.9268, 4.9024, 4.8780
7.5	7.3902, 7.4146, 7.3902
10.0	9.9512, 9.9512, 9.9512
12.5	12.4390, 12.4390, 12.4390
15.0	14.9024, 14.9512, 14.8780

$$\Sigma X = 150$$

$$\Sigma Y = 148.8044$$

$$\Sigma X^2 = 1687.5$$

$$\Sigma Y^2 = 1854.5474$$

$$\Sigma XY = 1675.9710$$

PENDIENTE.

$$m = \frac{15 (1675.9710) - (150) (148.8044)}{5 (1687.50) - (150)^2} = 1.0022$$

ORDENADA AL ORIGEN.

$$b = \frac{148.8044 - (1.0022) (150)}{15} = - 0.1017$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION.

$$r^2 = \frac{[15 (1675.9710) - (150) (148.8044)]^2}{[15 (1687.50) - (150)^2] [15 (1664.5474) - (148.8044)^2]}$$

$$r^2 = 0.9999$$

Finalmente se determinan los valores de t de Student, para evaluar la ordenada al origen y la pendiente estadísticamente.

$$McErrReg = 0.0017439$$

$$McReg = 188.3414$$

$$S_m = 0.0030497$$

$$S_b = 4.9416$$

$$t_{calc} m = \frac{1 - 1.0022}{0.0030497} = - 0.7213$$

$$t_{calc} b = \frac{0 - (- 0.1017)}{4.9416} = 0.0205$$

Criterios de Aceptación.

Para la pendiente y la ordenada al origen:

Si:

$|0.0205| < 2.1448$ estadísticamente la ordenada al origen es igual a cero.

Si

$|0.7213| < 2.1448$ estadísticamente la pendiente es igual a uno.

LINEALIDAD DEL METODO. NITROFURAZONA.

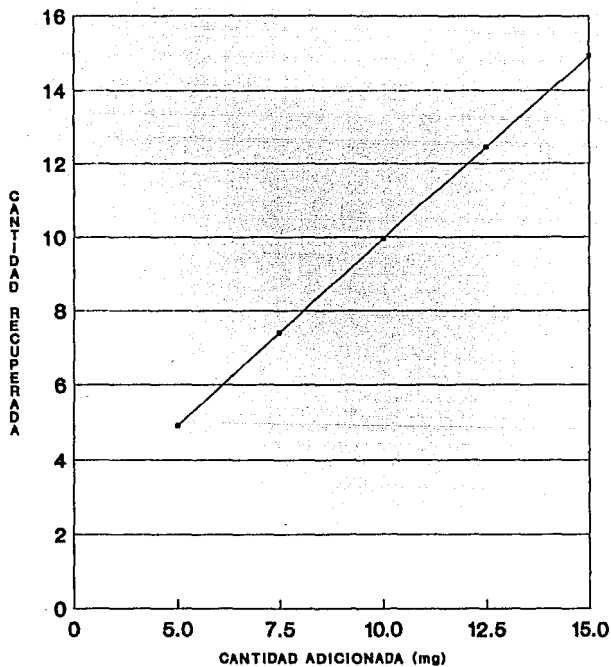


FIGURA 11 LINEALIDAD DEL METODO.
METODO ESPECTROFOTOMETRICO.

3. ESPECIFICIDAD.

Respuesta del placebo = 0.0%

4. EXACTITUD.

PORCIENTO RECUPERADO PARA CADA RECUBRO (X)

mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS	(Y) % RECUBRO	Y ²
10.0	10.0502	100.5020	10100.0520
10.0	10.0000	100.0000	10000.0000
10.0	10.0000	100.0000	10000.0000
10.0	9.8994	98.9940	9799.8120
10.0	9.9748	99.7480	9949.6630
10.0	9.8492	98.4920	9700.6740
10.0	9.9246	99.2460	9849.7680
10.0	9.8492	98.4920	9700.6740
10.0	10.0000	100.0000	10000.0000
10.0	9.9748	99.7480	9949.6630

MEDIA DEL PORCIENTO RECUPERADO (\bar{x})

$$\bar{x} = \frac{995.222}{10} = 99.5222$$

DESVIACION ESTANDAR DEL PORCIENTO RECUPERADO (S)

$$S = \sqrt{\frac{10(99050.906) - (995.222)^2}{10(10-1)}} = 0.6850$$

COEFICIENTE DE VARIACION (CV)

$$CV = \left(\frac{0.6850}{99.5222} \right) 100 = 0.6882$$

t DE STUDENT

$$t_{\text{calc}} = \frac{99.5222 - 100 \%}{\frac{0.6850}{\sqrt{10}}} = - 2.2057$$

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA.

$$IC = [99.032, 100.012]$$

Criterios de Aceptación.

COEFICIENTE DE VARIACION

$$0.6882 < 2\%$$

T calculada

$$- 2.2057 \leq 2.2622$$

5. PRECISION.

a. Repetibilidad.

$$CV = \left(\frac{0.6850}{99.5222} \right) 100 = 0.6882$$

Criterios de Aceptación.

METODO	C. V
ESPECTROFOTOMETRICOS Y QUIMICOS	< 3%
CROMATOGRAFICOS	< 2%
MICROBIOLOGICOS	< 5%

b. Reproducibilidad.

Modelo Estadístico:

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

ANALISTA

		1	2
D I A		100.1880	99.2108
		99.2628	99.5797
		99.0171	100.4308
		100.4700	100.0800
		100.2500	100.6100
		100.2200	100.0000

$$\Sigma Y^2 \dots = 1438818.722$$

$$\Sigma Y^2_{ijk} = 119904.9966$$

$$\Sigma Y^2_{i..} = 719409.6075$$

$$\Sigma Y^2_{.ij.} = 359708.6849$$

Donde:

a = 2 analistas

d = 2 días

r = 3 replicas por analista

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALC
ANALISTA	1	$\Sigma ca = 0.04105$	$Mc_a = 0.04105$	$F_a = 0.063$
DIA	2	$\Sigma cd = 1.293716$	$Mc_d = 0.64685$	$F_d = 0.462$
ERROR	8	$\Sigma ce = 2.1016$	$Mc_e = 0.2627$	

Criterios de Aceptación.

EFFECTO POR ANALISTA:

$$0.063 \leq 38.51$$

EFFECTO POR DIA:

$$0.462 \leq 6.06$$

C. Método Cromatográfico de Alta Resolución.

1. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

CANTIDAD ADICIONADA (X) μg	PROPIEDAD MEDIDA (Y) AREAS
15.0	9.65, 9.58, 9.57
22.5	14.50, 15.66, 14.98
30.0	19.77, 19.11, 19.69
37.5	22.62, 26.53, 25.84
45.0	31.11, 29.97, 29.12

$$\Sigma X = 450.00$$

$$\Sigma Y = 297.70$$

$$\Sigma X^2 = 15188.00$$

$$\Sigma Y^2 = 6697.4500$$

$$\Sigma XY = 10075.94$$

PENDIENTE.

$$m = \frac{15 (10075.94) - (450) (297.70)}{15 (15188) - (450)^2} = 0.6784$$

ORDENADA AL ORIGEN.

$$b = \frac{(297.70) - (0.6784) (450)}{15} = - 0.5062$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION.

$$r^2 = \frac{[15 (10075.94) - (450) (297.70)^2]}{[15 (15188) - (450)^2] [15 (6697.45) - (297.70)^2]}$$

$$r^2 = 0.9844$$

$$r = 0.9922$$

Criterios de aceptación:

Coefficiente de Determinación $0.9844 \geq 0.98$

Coefficiente de Correlación $0.9922 \geq 0.99$

LINEALIDAD DEL SISTEMA. NITROFURAZONA.

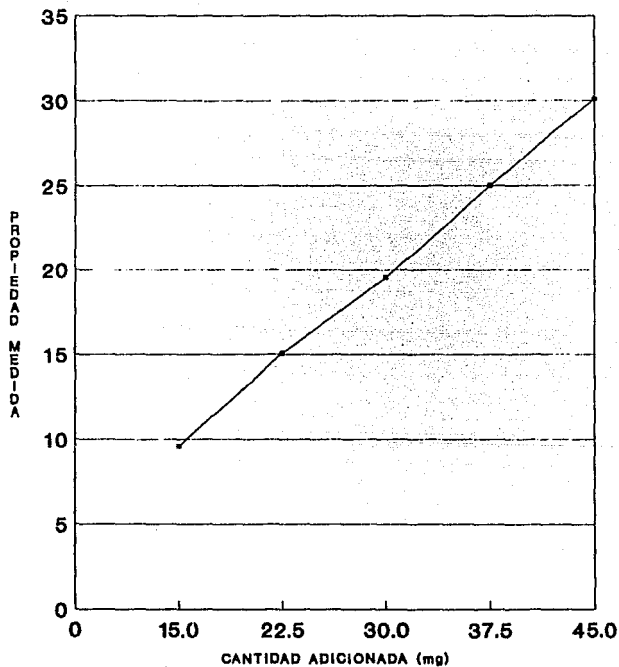


FIGURA 12 LINEALIDAD DEL SISTEMA.
METODO CROMATOGRAFICO.

2. LINEALIDAD DEL METODO.

CANTIDAD ADICIONADA (X) mg	CANTIDAD RECUPERADA (Y) mg
15.0	14.8999, 15.2924, 14.9061
22.5	22.8473, 22.5368, 22.5648
30.0	29.9727, 29.6523, 30.0522
37.5	37.6707, 37.8134, 36.9989
45.0	45.3242, 45.3147, 44.5171

$$\Sigma X = 450.0000$$

$$\Sigma Y = 450.3635$$

$$\Sigma X^2 = 15187.5000$$

$$\Sigma Y^2 = 15205.2200$$

$$\Sigma XY = 15195.7700$$

PENDIENTE.

$$m = \frac{15 (15195.77) - (450) (450.3635)}{15 (15187.50) - (450)^2} = 0.9984$$

ORDENADA AL ORIGEN.

$$b = \frac{450.3635 - (0.9984) (450)}{15} = 0.0710$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION.

$$r^2 = \frac{[15 (15195.77) - (450) (450.3635)]^2}{[15 (15187.50) - (450)^2] [15 (15205.22) - (450.3635)^2]}$$

$$r^2 = 0.9993$$

Finalmente se determinaron los valores de t de Student, para evaluar la ordenada al origen y la pendiente estadísticamente.

$$McErrReg = 0.04$$

$$McReg = 1682.24$$

$$S_m = 0.2610$$

$$S_b = 0.2600$$

$$t_{calc} m = \frac{1 - 0.9984}{0.2610} = 0.01$$

$$t_{calc} b = \frac{0 - 0.0710}{0.2600} = -0.28$$

Criterios de aceptación:

Para la pendiente y la ordenada al origen:

Si:

$|0.28| < 2.1448$ estadísticamente la ordenada al origen es igual a cero.

Si

$|0.01| < 2.1448$ estadísticamente la pendiente es igual a uno.

LINEALIDAD DEL METODO. NITROFURAZONA.

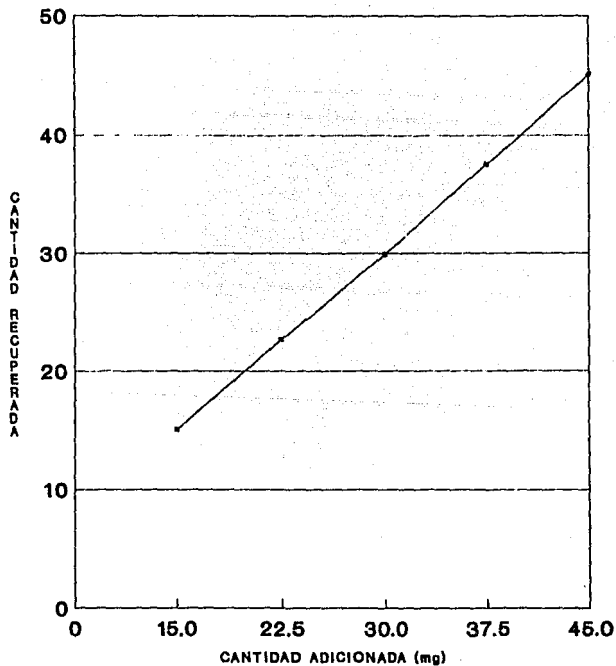


FIGURA 13 LINEALIDAD DEL METODO.
METODO CROMATOGRAFICO.

3. ESPECIFICIDAD.

CONDICIONES DEL ANALISIS

VALIDACION METODO ANALITICO PARA NITROFURAZONA OVULOS

ESPECIFICIDAD DEL METODO

FASE MOVIL METANOL-AGUA ACIDIFICADA AL 0.5% CON AC. ACETICO (15:85)

COLUMNA: NOVA PAK C18, 3.9 X 75 mm, TAMAÑO DE PARTICULA 4UM

Nombre Muestra	Factor Escala	No. Inj.	No. Vial	Vol. Inj. uL
PLACEBO	1.0000	1/1	4	20

Flujo	1.00	Parametros	Tiempo: 5.00
NA	85.00	Solvente A 4	Presion A 0.975
NB	15.00	Solvente B 4	Presion B 0.065
Long.onda,360nm		Absorb, AU 0.00	Numero Vial 4

Numero Pico	Tiempo Retencion	Nombre Componente	Area Pico	Altura Pico
1	0.703		0.79007	0.00586
TOTAL			0.79007	0.00586

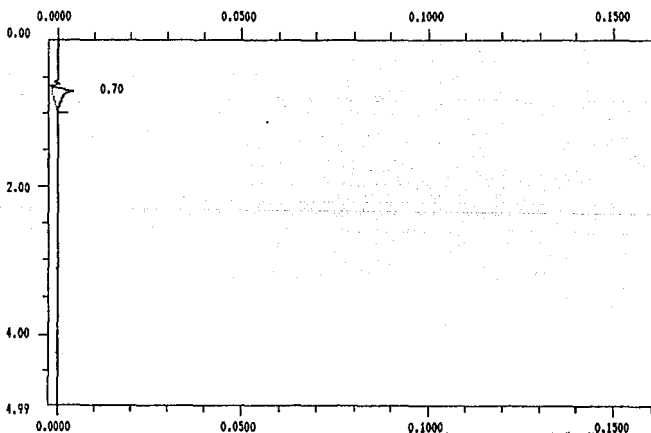


FIGURA No 14. CROMATOGRAMA DEL PLACEBO PARA DETERMINAR LA ESPECIFICIDAD DEL METODO PARA NITROFURAZONA OVULOS.

CONDICIONES DEL ANALISIS
VALIDACION METODO ANALITICO PARA NITROFUZAZONA OVULOS
ESPECIFICIDAD DEL METODO
FASE MOVIL METANOL-AGUA ACIDIFICADA AL 0.5% CON AC. ACETICO (15:85)
COLUMNA: NOVA PAK C18, 9.9 X 75 mm, TAMANO DE PARTICULA 4UM

Nombre Muestra	Factor Escala	No. Inj.	No. Vial	Vol. Inj. uL
FLA + PA	1.0000	1/1	13	20
Flujo	1.00	Parametros		Tiempo: 5.00
NA	85.00	Solvente A		Preston A 0.068
NB	15.00	Solvente B		Preston B 0.041
Long. onda, nm	260nm	Absorb, AU		0.00
				Numero Vial 18

Numero Pico	Tiempo Retencion	Nombre Componente	Area Pico	Altura Pico
1	0.728		0.51478	0.00264
2	3.296	NITROFUZAZONA	20.51454	0.13156
TOTAL			21.02932	0.13420

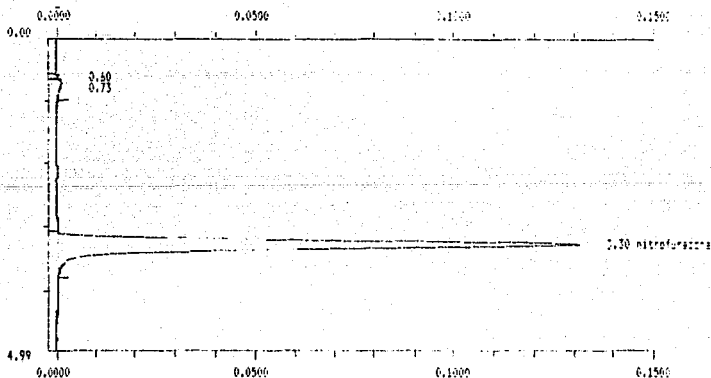


FIGURA No 15. CROMATOGRAMA DEL PLACEBO CARGADO PARA DETERMINAR LA ESPECIFICIDAD DEL METODO PARA NITROFUZAZONA OVULOS.

CONDICIONES DEL ANALISIS
 VALIDACION METODO ANALITICO PARA NITROFURAZONA OVULOS
 ESPECIFICIDAD DEL METODO
 FASE MOVIL METANOL-AQUA ACIDIFICADA AL 0.5N CON AC. ACETICO (15:85)
 COLUMNA: NOVA PAK C18, 3.9 X 75 mm. TAMAÑO DE PARTICULA 4UM

Nombre Muestra	Factor Escala	No. Inj.	No. Vial	Vol. Inj. uL
SPR NITRO	1.0000	2/8	5	20
Flujo	1.00	Parametros		Tiempo: 5.00
NA	85.00	Solvente A	4	Presion A 0.005
NB	15.00	Solvente B	4	Presion B 0.060
Long. onda, 280nm	Absorb. AU	0.00		Numero Vial 5

Numero Pico	Tiempo Retencion	Nombre Componente	Area Pico	Altura Pico
1	0.725		0.50897	0.00208
2	8.322	NITROFURAZONA	20.71592	0.13207
TOTAL			21.22489	0.13475

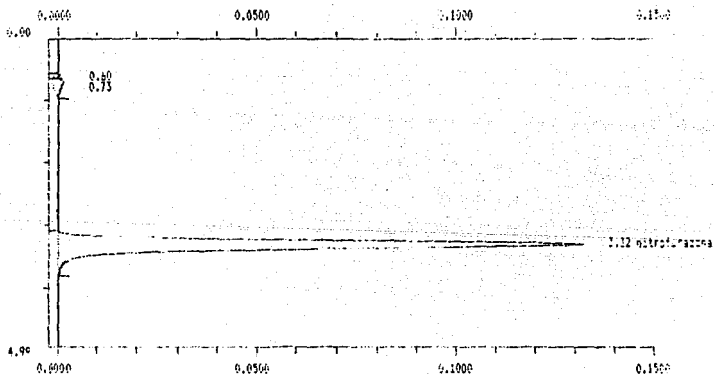


FIGURA No 16. CROMATOGRAMA DEL ESTANDAR DE NITROFURAZONA PARA DETERMINAR LA ESPECIFICIDAD DEL METODO PARA NITROFURAZONA OVULOS.

CONDICIONES DEL ANALISIS
 VALIDACION METODO ANALITICO PARA NITROFUZAZONA OVULOS
 ESPECIFICIDAD DEL METODO
 FASE MOVIL METANOL-AGUA ACIDIFICADA AL 0.5% CON AC. ACETICO (15:85)
 COLUMNA: NOVA PAK C18, 3.9 X 75 mm, TAMAÑO DE PARTICULA 4UM

Nombre Muestra	Factor Escala	No. Inj.	No. Vial	Vol. Inj. uL
DEG LUZ	1.0000	1/1	14	20
Flujo	1.0	Parametros		Tiempo: 5.00
NA	85.0	Solvente A 4		Presion A 0.008
NB	15.0	Solvente B 4		Presion B 0.047
Long.onda,800nm		Absorb,AU 0.00		Numero Vial 14

Numero Pico	Tiempo Retencion	Nombre Componente	Area Pico	Altura Pico
1	0.781		0.50064	0.00257
2	2.068	PROD. DEG LUZ	2.10094	0.01452
3	3.288	NITROFUZAZONA	17.43055	0.11186
TOTAL			20.04113	0.12895

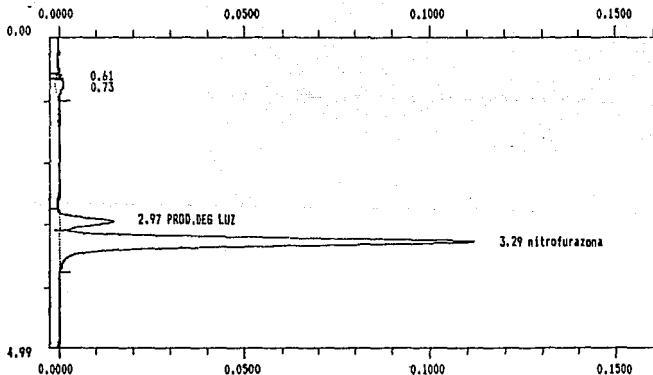


FIGURA No 17. CROMATOGRAMA DE UNA MUESTRA EXPUESTA A LA LUZ
 UV DURANTE 30 MIN.

4. EXACTITUD.

PORCIENTO RECUPERADO PARA CADA RECOBRO (X)

μg ADICIONADOS	μg RECUPERADOS	(Y) % RECOBRO	Y^2
29.604	29.1200	98.0600	9614.8800
29.403	29.3100	99.0800	9816.1024
30.099	29.9200	99.4100	9882.3481
29.897	29.8200	99.7400	9948.0760
29.448	29.2500	99.8800	9976.4144
30.1515	30.4800	101.0900	10219.1810
30.1200	30.1100	99.9700	9994.0009
30.9810	31.5000	101.9600	10395.8410
31.4790	31.5700	100.2900	10058.0810
30.1245	30.8000	100.5800	10116.3840

MEDIA DEL PORCIENTO RECUPERADO (\bar{x})

$$\bar{x} = \frac{1000.41}{10} = 100.041$$

DESVIACION ESTANDAR DEL PORCIENTO RECUPERADO (S)

$$S = \sqrt{\frac{10(100091.1077) - (1000.41)^2}{10(10-1)}} = 0.9500$$

COEFICIENTE DE VARIACION (CV)

$$CV = \left(\frac{0.9500}{100.041} \right) 100 = 0.9496$$

t DE STUDENT

$$t_{calc} = \frac{100.041 - 100\%}{\frac{0.9500}{\sqrt{10}}} = 0.136$$

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA.

IC = [99.8251, 100.2549]

Criterios de Aceptación.

COEFICIENTE DE VARIACION:

0.9496 < 2%

T calculada:

0.1360 ≤ 2.2822

5. PRECISION.

a. Repetibilidad.

$$CV = \left(\frac{0.9500}{100.041} \right) 100 = 0.9496$$

Criterios de Aceptación.

METODO	C.V
CRONATOGRAFICOS	< 2%

b. Reproducibilidad.

Modelo Estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_j(t) + E_{k(ij)}$$

ANALISTA

		1	2
D	1	06.58	06.69
		04.58	04.19
A	2	03.84	04.46
		04.09	02.42
		04.66	04.57
		06.44	05.79

$$\Sigma Y^2 \dots = 1295635.828$$

$$\Sigma Y^2_{ijk} = 107987.7$$

$$\Sigma Y^2_{i..} = 647820.0$$

$$\Sigma Y^2_{.j.} = 323913.30$$

a = 2 analistas

d = 2 días

r = 3 replicas

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALC
ANALISTA	1	$\Sigma C_a = 0.3400$	$MC_a = 0.3400$	$F_a = 0.6172$
DIA	2	$\Sigma C_d = 1.1019$	$MC_d = 0.5509$	$F_d = 0.2648$
ERROR	8	$\Sigma C_e = 16.6552$	$MC_e = 2.0819$	

Criterios de Aceptación.

EFFECTO POR DIA:

$$0.2646 \leq 6.06$$

EFFECTO POR ANALISTA:

$$0.6172 \leq 38.51$$

D. Comparación de Métodos.

Los parámetros estadísticos para comparar dos métodos analíticos validados son: Linealidad del Método, Exactitud, Precisión y Repetibilidad.

1. LINEALIDAD DEL METODO.

Se requiere de la siguiente información:

METODO CROMATOGRAFICO

$EX_1 = 450$
 $\Sigma X_1^2 = 15187.30$
 $\Sigma Y_1 = 450.3635$
 $\Sigma Y_1^2 = 15205.22$
 $\Sigma XY_1 = 15195.77$
 $m_1 = 0.9984$
 $t_1 = 5$
 $b_1 = 0.0710$
 $n_1 = 3$

METODO ESPECTROFOTOMETRICO

$EX_2 = 150$
 $\Sigma X_2^2 = 1887.5$
 $\Sigma Y_2 = 148.8044$
 $\Sigma Y_2^2 = 1884.5474$
 $\Sigma XY_2 = 1675.9710$
 $m_2 = 1.0022$
 $t_2 = 5$
 $b_2 = -0.1017$
 $n_2 = 3$

Cálculos.

$$S_{E^2}^2 = 0.0696$$

Desviación estándar de pendientes:

$$S^2_{dm} = 0.000412$$

Límite superior para la diferencia de pendientes (LSIC):

$$LSIC = 0.04165$$

Límite inferior para la diferencia de pendientes (LIIC):

$$LIIC = -0.04181$$

Desviación estándar de las ordenadas al origen:

$$S^2_{do} = 0.0479$$

Límite superior para la diferencia de las ordenadas al origen (LSIC):

$$LSIC = 0.4878$$

Límite inferior para la diferencia de las ordenadas al origen:

$$LIIC = -0.4122$$

Criterios de Aceptación.

-En el intervalo de confianza para la diferencia de la pendiente de la cantidad adicionada-cantidad recuperada $[-0.0479, 0.04185]$ se localiza el valor de cero.

-En el intervalo de confianza para la diferencia de las ordenadas al origen de cantidad adicionada-cantidad recuperada $[-0.4122, 0.4878]$ se localiza el valor de cero.

2. EXACTITUD.

CASO I: Cuando los métodos tienen la misma repetibilidad.

Información requerida:

$$DE_1 = 0.9500$$

$$DE_2 = 0.6850$$

$$N_1 = 10$$

$$N_2 = 10$$

$$\bar{R}_1 = 100.04$$

$$\bar{R}_2 = 99.52$$

Cálculos.

$$Dep = 0.8282$$

Límite superior del intervalo de confianza para la diferencia de las medias aritméticas (LSIC):

$$LSIC = 0.9808$$

Límite inferior del intervalo de confianza para la diferencia de las medias aritméticas (LIIC):

$$LIIC = -0.5856$$

Criterios de Aceptación.

-En el intervalo de confianza para la diferencia de las medias aritméticas del porcentaje recuperado $[-0.5856, 0.9808]$ se localiza el valor de cero.

3. REPETIBILIDAD.

Información requerida:

$$DE_1 = 0.9500$$

$$DE_2 = 0.6850$$

Cálculos.

Límite superior del intervalo de confianza para la razón de varianzas (LSIC):

$$LSIC = 7.7512$$

Límite inferior del intervalo de confianza para la razón de varianzas (LIIC):

$$LIIC = 0.4773$$

Criterios de Aceptación.

-En el intervalo de confianza para la razón de varianzas (calculada a partir del porcentaje recuperado de Exactitud al 100 % [0.4773,7.7512] se localiza el valor de 1.

4. PRECISION.

Información requerida.

$$DE_1 = 0.9500$$

$$DE_2 = 0.6850$$

Cálculos.

Límite superior del intervalo de confianza para
la razón de varianzas (LSIC):

$$LSIC = 8.5205$$

Límite inferior del intervalo de confianza para
la razón de varianzas (LIIC):

$$LIIC = 0.4347$$

Criterios de Aceptación.

-En el intervalo de confianza para la razón de varianzas
(calculada a partir del porcentaje recuperado de Exactitud al
100%) [0.4347, 8.5205] se localiza el valor de 1.

VII. ANALISIS DE RESULTADOS

De todos los parámetros requeridos para validar un método analítico de Control de Calidad, la estabilidad de la muestra es muy importante, debido a que con esta es posible establecer las condiciones necesarias para el manejo de las muestras de Nitrofurazona durante su cuantificación, o bien, si por algún motivo no se puede concluir dicho análisis saber bajo que condiciones el analista puede continuar su trabajo.

Considerando lo anterior, se procedió a realizar primeramente, la estabilidad de la muestra a condiciones extremas 4 °C, 40°C, T.A. y luz visible, durante 24 y 48 horas.

Como se puede apreciar, los resultados de las muestras sometidas a 4°C. son estables a las 24 horas, ya que los resultados de la cuantificación del activo son muy similares a los iniciales. A las 48 horas, se observa una disminución de aproximadamente 2% atribuido a una posible degradación.

Para el caso de las muestras sometidas a 40°C, la concentración aumento en un 2%. (comparada con la concentración inicial) a las 24 horas, debido a que el disolvente utilizado dimetilformamida, es muy volátil. El resultado a las 48 horas presenta una disminución en la concentración del 2%, debido a la sensibilidad de la Nitrofurazona por efecto de la temperatura, por lo que es muy probable una degradación.

A temperatura ambiente (T.A), las muestras durante las primeras 24 horas tuvieron un cambio muy poco significativo, no así, a las 48 horas donde disminuyó la concentración en un 3%.

Las muestras expuestas a la luz demostraron la inestabilidad de los nitrofuranos, en este caso, de la Nitrofurazona en donde hubo una disminución de la concentración del 15 y 19%, a las 24 y 48 horas respectivamente.

De los resultados anteriores, se estableció que si el analista, por algún motivo no terminó el análisis, puede continuar en un tiempo máximo de 24 horas, posterior a la preparación de las muestras, siempre que no estén expuestas a la luz.

Por otro lado, después de 24 horas los análisis no son confiables a ninguna condición, a pesar de encontrarse dentro del intervalo que marcan las especificaciones (97-103%). ya que se considera que existe degradación parcial, como es el caso de las diferentes temperaturas, y de manera adicional, un cambio de coloración para el caso de las muestras expuestas a la luz, en donde el activo experimenta un cambio de color de amarillo (inicial), a café oscuro.

VALIDACION DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO.

En cuanto a la validación del método espectrofotométrico se determinó que el sistema es adecuado, es decir existe una

relación lineal en cuanto a los diferentes niveles de concentración en la región de trabajo. (50, 75, 100, 125 y 150%).

El resultado del coeficiente de correlación, indica que el sistema es lineal a los diferentes niveles de concentración empleados. La figura No.10, muestra la linealidad del sistema y que no existe una dispersión significativa.

Para la linealidad del método, los valores de la distribución t de student, para evaluar la ordenada y la pendiente indican que estadísticamente la ordenada es igual a cero y la pendiente a uno.

La exactitud se evaluó con 10 muestras al 100% determinando que el valor del coeficiente de variación (0.688%) es menor al 2%, por lo que el método espectrofotométrico es exacto, además de que el valor de la distribución t calculada es menor al de la t de tablas.

Para la determinación de la precisión, se emplearon los datos de la exactitud, determinando que el C.V. es menor a 2%. de esta manera se considera que el método es preciso.

La reproducibilidad de la muestra fué diseñada para evaluarse mediante un análisis de varianza, considerando dos días y dos analistas. De esta manera los valores de la distribución F de las fuentes de variación son menores a los valores de tablas existiendo reproducibilidad del método.

Finalmente, se determinó la especificidad frente a excipientes, obteniéndose una respuesta nula del placebo, frente al placebo cargado y al principio activo.

VALIDACION DEL METODO CROMATOGRAPICO.

La validación del método cromatográfico comprende los mismos parámetros del método anterior, por lo que se evaluó inicialmente la linealidad del sistema.

El coeficiente de correlación y la ordenada obtenidos de la regresión, indican que en la linealidad del sistema existe una dispersión mínima en los datos. La figura No.12 presenta el comportamiento del sistema.

La precisión del sistema determinada al 100%, presenta una dispersión mínima de los valores cuantificados por la desviación estándar y por el coeficiente de variación, por lo que al ser menor de lo establecido (1.5%), éste último parámetro indica que el sistema es preciso.

Una vez determinada la linealidad del sistema, se continuó con la linealidad del método trabajando con los mismos niveles. Los resultados muestran que existe una relación lineal de los mg adicionados contra los mg recuperados. Además, de los parámetros estadísticos de la regresión lineal evaluados con la distribución t de student, se encontró que los valores absolutos de la ordenada al origen (b) y de la pendiente (m) son estadísticamente igual a cero y uno, respectivamente.

En la figura No.13, se observa la relación lineal del método a diferentes niveles.

La exactitud del método, fué evaluada con 10 muestras al 100%, utilizando la distribución t de student, considerando que el método es exacto por ser el valor de la t_{calc} (0.136) menor al valor de la t_{tablas} (2.262).

La precisión se determinó, utilizando los datos obtenidos para la exactitud, evaluando en este caso el coeficiente de variación (C.V), siendo de 0.95%, menor a lo establecido (2%), por lo que el método es preciso.

La evaluación de la reproducibilidad del método (dos días con dos analistas) fué determinada mediante un análisis de varianza, encontrando que los valores de la distribución F para el día y el analista son menores a los de tablas. Por lo anterior el método es reproducible a las condiciones dadas.

Para concluir con la validación del método por cromatografía de líquidos de alta resolución se determinó la especificidad frente a excipientes, observando que el placebo analizado no genera ninguna respuesta. Además, la respuesta de los placebos cargados y del principio activo fué la esperada. En las figuras No. 14, 15 y 16 se observan los cromatogramas respectivos que ilustran lo anterior.

En la figura No 17, se presenta el cromatograma obtenido de una muestra expuesta a luz ultravioleta, durante 30 minutos. En el cual se observa la aparición de un pequeño pico, que

corresponde al producto de degradación por efecto de la luz de la Nitrofurazona. Analizando los parámetros cromatográficos se obtiene que el factor de resolución (R), es igual a 0.69 lo que indica que no hay una separación base a base entre el pico del principio activo y el del producto de degradación, ya que para que éste sea óptimo, (R) debe ser igual a 1.5. Asimismo, el factor de selectividad (α) obtenido, es igual a 1.14, demostrando así que no hay una buena selectividad de la columna por los picos mencionados anteriormente, ya que el valor óptimo debe ser mayor de 1.2; los resultados de dichos factores demuestran de manera adicional, a la estabilidad, la importancia de proteger a las muestras de Nitrofurazona de la luz, durante su análisis debido a que éste método no es indicativo de estabilidad porque no es específico frente a productos de degradación.

COMPARACION ESTADISTICA DE AMBOS METODOS.

Los parámetros estadísticos considerados para la comparación de los métodos analíticos validados incluyen: linealidad del método, exactitud, precisión y repetibilidad.

La comparación de las linealidades de ambos métodos, establecen que la relación de la diferencia de las pendientes de la cantidad adicionada-cantidad recuperada presenta un intervalo de -0.04181 a 0.04165, mientras que para la diferencia de las

ordenadas el intervalo es de -0.4122 a 0.4878. Como ambos intervalos incluyen el valor de cero, se considera que entre ambos métodos existe una relación entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

La determinación de las exactitudes comparadas, considerando que los métodos presentan la misma repetibilidad indica que el intervalo de confianza de las medias incluye el valor de cero (-0.5856 a 0.9808), dicho intervalo para la diferencia de las medias aritméticas del porciento recuperado de ambos métodos es adecuada.

El parámetro de la repetibilidad, presenta un intervalo de confianza de 0.4773 a 7.7512 determinado a partir de la relación de las desviaciones estándar de los métodos incluye el valor de uno, por lo que la razón de varianzas calculada con los datos de exactitud al 100%, cumple con el criterio establecido.

Para concluir, la evaluación de la precisión de los métodos comparados a partir de la razón de varianzas incluye el valor de uno, por lo que la relación de los métodos cumple con lo establecido.

Los resultados de las validaciones permiten establecer que los métodos cromatográfico y espectrofotométrico, cumplen con las especificaciones establecidas por el laboratorio y la Secretaría de Salud, con lo cual es posible su uso de manera indistinta u alternativa, en un momento dado, para la cuantificación de Nitrofurazona en óvulos.

VIII. CONCLUSIONES

1. Se validaron dos métodos para cuantificar Nitrofurazona en óvulos, y se compararon estadísticamente.

2. Una vez concluido el análisis de los resultados de la validación del método de cromatografía de líquidos de alta resolución, se determinó que éste es lineal en el intervalo de la concentración estudiada, además de ser exacto, preciso y reproducible.

3. Se considera que el método cromatográfico es específico frente a excipientes, debido a que no presentan respuesta.

4. Los resultados de la validación del método espectrofotométrico indican que es lineal en el intervalo de trabajo, es exacto, preciso y reproducible. Al igual que el método anterior, también es específico frente a excipientes.

5. Se encontró que las muestras analizadas son estables a las condiciones a las que fueron sometidas (excepto luz visible) por un máximo de 24 horas.

6. Se considera que el método espectrofotométrico es el más sencillo y rápido para cuantificar Nitrofurazona.

7. La comparación estadística entre ambos métodos, establece la relación que existe entre estos, pudiendo ser utilizados alternativamente o sustituyendo uno al otro, en un momento dado, siendo los resultados confiables en cualquiera de ellos.

IX. SUGERENCIAS

Debido a que los métodos validados son exclusivamente para Control de calidad, se considera necesario establecer un método indicador de estabilidad, por lo que el método cromatográfico sería el más adecuado para ello, por ser la técnica más específica y sensible.

Considerando la estabilidad de la Nitrofurazona y el uso de Dimetilformamida como disolvente, es recomendable, guardar las muestras en refrigeración y/o a temperatura ambiente protegidas de la luz, si por alguna razón no se pudiera continuar con el análisis.

El análisis por cromatografía de la Nitrofurazona después de exponerse a la luz, presenta un pico de degradación muy cercano al del producto de interés, por lo que sería conveniente modificar la proporción de la fase móvil u otra variable, para incrementar la resolución entre ellos. Dicha sugerencia esta encaminada a implementar un método indicador de estabilidad.

Como último punto, es necesario sugerir que la columna empleada para el método cromatográfico debe ser utilizada exclusivamente para este fin, de lo contrario estaría expuesta a sufrir alguna contaminación y a una posible modificación en la respuesta.

X. REFERENCIAS

1. Main, J.R. "The Nitrofurans-A New Type of Antibacterial Agent". J. Am. Pharm. Assoc. 36, (s/n), 317-320 (1947).

2. Clarke's. Isolation and Identification of Drugs. 2th ed. The Pharmaceutical Press. London (1986).

3. Guía Profesional de Medicamentos. Manual Moderno. 2^o ed. México, D.F. pp 707,715. (1987).

4. Beckman, H. Drugs Their Nature, Action and Use. W. B. Saunders Company. Philadelphia. pp 958 (1980).

5. Voigt, R. H., Bornschein M. Tratado de Tecnología Farmacéutica. Acribia. Zaragoza, España. pp130-133. (1983).

6. Gold, M. Suppository Development and Production.
In Lieberman, H. A. et al (Edits). "Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems". Vol. 2. Marcial Dekker. Inc NY, New York. pp 533-561. (1989).

7. Helman, J. Farmacotecnia Teoría y Práctica. Continental. Tomo VII. pp 2017-2022. México. (1984).

8. Henning, A., Baun E. Formas Farmacéuticas y su Aplicación. Han Hess. Basilea, Suiza (1984).

9. Duchene D. "Les Comprimés Gynécologiques". Prod. Et. Prob. Pharm. 21, (7). 299-310 (1966).

10. Plaxco, James. Suppositories.

In Hoover, J.E. (edit). "Dispensing of Medication". 8^{ed}. Mack Publishing Company. Pennsylvania, USA pp 163-177 (1976).

11. United States Pharmacopoeia. Twenty second Rev. Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1990).

12. Moës, A. "Biodisponibilité des formes d'administration rectale". Sci. Techniques Pharm. 9, (6). 283-288 (1980).

13. Belman, P.F. Curso de Introducción a la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Perkin Elmer de México, S.A. (1988).

14. Manual de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Instituto de Análisis Instrumental. México, D.F. (1991).

15. Bello, G. "La Cromatografía Líquida de Alta Resolución". Pharma News, 2 (1), 19-21 (1991).

16. Lloyd, R.S. Solvent Selection For Separation Processes. Beckman Instruments de México.(1991).

17. Fritz, J.S. and Schenk, H.G. Química Analítica Cuantitativa, 3^aed. Limusa, México, D.F. (1989).

18. "Guía Oficial de Validación de Métodos Analíticos de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, SSA", pp 1-73, (1991).

19. Curso de Estadística Aplicada a la Validación de Métodos Analíticos. Instituto de Capacitación de la Industria Farmacéutica y Químico Farmacéutica . (1987).

20. Carvajal, G., Rivas, A. y Méndez, A. "Métodos para la Determinación de los Nitrofuranos". Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, 8, (s/n), 131-138. (1973).

21. Dood, C.M. et al. "The Relationship of Structure and Antibacterial Activity in the Nitrofurans". J. Am. Pharm. Assoc. 15, (s/n), 313-318 (1966).

22. Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana.
Vol. II. 8^o ed. Roma, pp 735-736 (1972).

23. Thorpe, A.V. "Sample Preparation of Carbadox, Furazolidone, Nitrofurazone and Ethopabate in Medicated Feeds for High Pressure Liquid Chromatography". J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63, (6) 981-984, (1980).

24. Sugden, E. A. et al. "High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Nitrofurazone and Furazolidone in Chicken and Pork Tissues". J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66, (4), 874-880. (1983).

25. British Pharmacopoeia. Vol. I. London Her Majesty's Stationery Office, 307, (1980).

26. Martin Dale. The Extra Pharmacopoeia, 27th ed. Pharm Press, London, 448, (1978).

27. The Merck Index. 10th ed. Merck & Co. Inc. Rahway, N.J. USA, pp 8449, (1983).

28. Banker, G.S. and Rhodes, C. T. Modern Pharmaceutics. Marcel Dekker, Inc. New York, (1979).

29. Martin, A. Swarbrick, J. and Cammarata, A. Physical Pharmacy. 3th ed. Lea & Ferger, Philadelphia, (1983).