

17
203



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**DESARROLLO Y VALIDACION DE METODOS
ANALITICOS POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS
DE ALTA RESOLUCION PARA CUANTIFICAR
NETOBIMIN, METILPARABENO Y PROPILPARABENO
CONTENIDOS EN UNA SUSPENSION DE USO
VETERINARIO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A

MARIA ROSIO CALDERON MUÑOZ



MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

Jurado asignado según el tema :

Presidente Prof: ALFREDO GARZON SERRA
Vocal Prof: JOSE DE JESUS M. VILLACAMPA RAMOS
Secretario Prof: AIDA NAVAS PEREZ
1er Suplente Prof: CONSUELO AYALA MONDRAGON
2do Suplente Prof: PEDRO A. GORGONIO HERNANDEZ

Síto donde se desarrolló el tema:

Schering-Plough, S.A. de C.V.

Asesor del tema: JOSE DE JESUS M. VILLACAMPA RAMOS

Supervisor Técnico: ROSA MARIA ROSETE ALVAREZ

Sustentante: MARIA ROSIO CALDERON MUÑOZ

Con amor a mis Padres,
por el apoyo, comprensión
y cariño que siempre me han dado.

A mis hermanos,
Marina, Martha, Lilia,
Gustavo, Leticia, Alma y
Blanca por todo su cariño.

A mis amigas,
Tere, Marina, Silvia,
Ady, Gaby, Ruth y Blanca
por todo lo que compartimos.

A Gutavo S.
por su interés en la
conclusión de este trabajo.

A Monica,
por su valiosa amistad.

Agradezco a Schering Plough,
por las facilidades prestadas
para la realización de este trabajo.

Agradezco a José y Rosy
por su ayuda y paciencia.

INDICE

INDICE

CAPITULO	PAGINA
- Capitulo I.	
1.1 Introduucción.	1
- Capitulo II.	
2.1 Monografías.	3
2.1.1 Netobimin.	3
2.1.2 Metilparabeno.	6
2.1.3 Propilparabeno.	9
2.2 Parásitos.	11
2.3 Benzimidazoles.	17
2.4 Cromatografía.	19
2.4.1 Parámetros fundamentales.	22
2.4.2 Cromatografía de Líquidos.	26
2.5 Validación.	34
2.5.1 Parámetros.	34
2.6 Evaluación Estadística.	39
- Capitulo III.	
3.1 Desarrollo y Validación del método analítico para la cuantificación de Netobimin.	46
3.1.2 Método de trabajo.	47
3.1.3 Método analítico para la cuantificación de Netobimin.	49
3.1.4 Validación del método analítico para la cuantificación de Netobimin.	52

3.2 Desarrollo y validación del método analítico para cuantificar Metilparabeno y Propilparabeno.	76
3.2.2 Método de trabajo.	77
3.2.3 Método analítico para la cuantificación de Metilparabeno Y Propilparabeno.	78
3.2.4 Validación del método analítico para la cuantificación de Metilparabeno y Propilparabeno.	81
- Capitulo IV.	
4.1 Conclusiones.	107
- Capitulo V.	
5.1 Bibliografía.	108

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 INTRODUCCION

El desarrollo y la validación de métodos analíticos de los productos farmacéuticos para uso humano, así como los productos veterinarios, ha cobrado gran importancia en los últimos años. Debemos asegurar la eficacia y seguridad de los medicamentos, mediante técnicas analíticas que permitan demostrar que los productos farmacéuticos cumplen con las normas de calidad establecidas.

En este trabajo, se presenta el desarrollo y validación de dos métodos analíticos por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), para cuantificar el principio activo (netobimin) y los conservadores (metilparabeno y propilparabeno), contenidos en una suspensión antiparasitaria de uso veterinario.

El netobimin es un probenzimidazol de acción antiparasitaria, el cual se cuantifica por cromatografía de líquidos de alta resolución, mediante un método analítico sencillo, en el cual se hacen una serie de diluciones para finalmente inyectar una muestra en el cromatógrafo.

El metilparabeno y propilparabeno se cuantifican también por cromatografía de líquidos, a través de un método analítico, en el que se siguen una serie de extracciones con cloroformo para separar los parabenos del netobimin, ya que uno de los productos de degradación del netobimin interfiere con el metilparabeno. Para validar los métodos analíticos desarrollados se hicieron las

siguientes determinaciones:

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

La información obtenida se trató estadísticamente para demostrar la confiabilidad y reproducibilidad del método.

CAPITULO II

GENERALIDADES

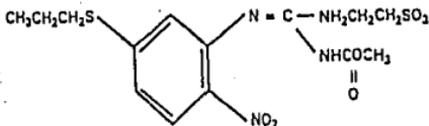
2.1 MONOGRAFÍAS

2.1.1 NETOBIMIN

Netobimin, probenzimidazol, 2{[(metoxicarbonil)amino] [[2-nitro- 5-(propiltio)fenil]amino] metilen]amino}etano, ácido sulfónico.

Fórmula condensada: $C_{14}S_2N_4O_7 \cdot H_2O$

ESTRUCTURA:



Polvo amarillo de olor y sabor característico. P.f. = 200 - 205°C

Solubilidad: 650mg/ml H₂O, con Tris (hidroximetilaminometano).

El netobimin tiene un pH de máxima estabilidad entre 3.5 y 5. Se degrada con bases fuertes y con temperaturas altas.

Productos de degradación:

1.- 2{(Amino) - [2 - nitro - 5 - (n - propiltio) - fenilamino]} metilamino etano, ácido sulfónico, al que llamaremos "Compuesto B".

El compuesto B es el mayor producto de degradación en solución, aparece desde la síntesis del netobimin, el Compuesto B es identificado en este trabajo.

2.- 1-Metoxicarbonilamino - (2- nitro - 5 - propiltiofenil) úrea. al que llamaremos compuesto "A".

El compuesto A, se encuentra en una concentración menor en solución . También es identificado en este trabajo.

3.- El netobimin tiene otros productos de degradación pero aún no han sido identificados.

Mecanismos de acción:

El netobimin se considera un probenzimidazol; se convierte en albendazole y albendazole sulfóxido por la microflora ruminal. El sulfóxido es un metabolito muy efectivo en contra de parásitos internos, el cual es absorbido y transformado en albendazole sulfona para ser eliminado por el organismo.(10)

El netobimin produce la muerte de los parásitos mediante dos mecanismos: inhibe la formación de los microtúbulos celulares, impidiendo el intercambio de los metabolitos entre el parásito y su medio ambiente; e inhibe la enzima fumarato reductasa, la cual es esencial para el metabolismo energético de los parásitos.

Indicaciones:

Esta indicado en el tratamiento y control de nemátodos gastrointestinales y pulmonares (gusanos redondos), céstodos (tenias) tremátodos (Fasciola Paramphistomum) de bovinos, ovinos y caprinos. Presenta también actividad ovicida y larvicida sobre larvas hipobióticas o inhibidas de *O. ostertagi*, larvas L4 y nemátodos resistentes a otros antihelmínticos.

Contraindicaciones:

No usar en ovinos y caprinos en las primeras 7 semanas de gestación.

Dosis:

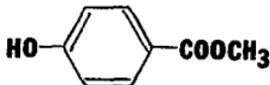
7.5 mg netobimin /Kg de peso.

2.1.2 METILPARABENO

Metilparabeno, parahidroxibenzoato de metilo, solbrol, nipagin.

Fórmula condensada: $C_8H_8O_3$, (152.1 g/mol).

ESTRUCTURA:



Cristales blancos o polvo cristalino blanco, es inodoro o tiene débil olor característico y ligero sabor urente, produce la sensación de que quema la lengua, seguido por entumecimiento. $pka = 9.49$, p.f. $125-128^{\circ}C.$ (1)

Preparado por esterificación de ácido parahidroxibenzoico con metanol.

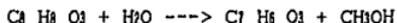
Solubilidad:

Soluble 1/400 de agua caliente; 1/3 de alcohol; 1/10 de éter. Soluble en glicerina, aceites, grasas, cloroformo, propilenglicol caliente, metanol y alcalis, es poco soluble en benzeno y tetracloruro de carbono.

Estabilidad:

Se hidroliza catalíticamente en presencia de ácidos y bases, es incompatible con sales de hierro. El pH de máxima estabilidad es 4, por lo que se utiliza en un intervalo de pH 3-9.

El metilparabeno se hidroliza produciendo ácido parahidroxibenzóico y metanol.



La velocidad de hidrólisis se incrementa al aumentar la fuerza iónica.

La actividad antimicrobiana se reduce de un 75 a un 100 % en la presencia de silicato de magnesio y aluminio al 1%, talco, polisorbato 80, y trisilicato de magnesio.®

Algunos plásticos como el nylon 6 absorben al metilparabeno y al propilparabeno disminuyendo su actividad antimicrobiana contra *Aspergillus niger*, *Klebsiella auroginosa* y *Pseudomona auroginosa*.

Usos:

Antiséptico y conservador en preparaciones farmacéuticas en concentraciones de 0.05 a 0.25 %, y en combinación con otros parabenos. Se utiliza también para la preparación de cosméticos que contienen grasas, y aceites vegetales y animales.

Métodos de análisis:

1. Método oficial de la Farmacopea Nacional: Valoración residual con ácido sulfúrico, usando como indicador azul de bromo timol S.I.

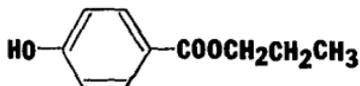
2. Método especificado en la USP XXII: Cromatografía de gases.
3. Espectroscopia U.V.
4. Cromatografía en capa fina.
5. Resonancia magnética nuclear.
6. Método bromométrico, previa hidrólisis.
7. Cromatografía de líquidos.

2.1.3 PROPILPARABENO

Propilparabeno, parahidroxibenzoato de propilo, nipasol.

Fórmula condensada: $C_{10}H_{12}O_3$ (180.20 g/mol).

ESTRUCTURA:



Cristales incoloros o polvo blanco, es inodoro o tiene olor débil, sin sabor o con sabor muy ligero; p.f. = 95 a 98°C.

Preparado por esterificación del ácido parahidroxibenzoico con propanol.

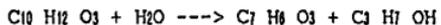
Solubilidad:

Soluble 1/2500 de agua fría; 1/400 de agua caliente; 1/3.5 de etanol; 1/3 de acetona; 1/4 de cloroformo; 1/3 de éter; 1/140 de glicerol; 1/6 de propilenglicol; 1/140 de aceites fijos. Soluble en metanol y en soluciones alcalinas.(1,18)

Estabilidad:

Su pH de máxima estabilidad está entre 4 - 5. Es incompatible con álcalis y sales de hierro, sufre catálisis ácida y básica.

La hidrólisis produce ácido hidroxibenzoico y propanol.



Usos:

Conservador en combinación con metilparabeno.

Métodos de análisis:

1. Método oficial de la Farmacopea Nacional: Valoración residual con ácido sulfúrico.
2. Método especificado en la USP XXII: Cromatografía de gases.
3. Espectroscopia U.V.
4. Cromatografía en capa fina.
5. Resonancia magnética nuclear.
6. Método bromométrico.
7. Cromatografía de líquidos.

2.2 PARASITOS

El parasitismo implica una relación simbiótica en la cual un animal, llamado huésped, es lesionado hasta cierto punto por las actividades de otro, llamado parásito. El parasitismo al igual que otra forma de simbiosis, implica una relación íntima entre las dos especies.(67)

En el tratamiento de las parasitosis, siempre se debe tener en mente que cualquier medicamento empleado para liberar al huésped de sus parásitos, se basa en la toxicidad diferencial. Esto significa que el agente antiparasitario es más tóxico para el parásito que para el huésped. Aunque en algunos sujetos el margen es más corto y la variación individual de la resistencia del huésped lo reduce aun más.

Activamente se conocen tres tipos de parásitos internos; los tremátodos con 69 géneros diferentes, los nemátodos con 143 géneros y los céstodos con 134 géneros diferentes. Todos ellos afectan a los animales aunque no a todos los animales domésticos.(12)

Durante años, el hombre ha tratado de controlar a los parásitos con diferentes sustancias, algunas efectivas pero con alto grado de toxicidad, otras menos tóxicas pero poco efectivas. Las parasitosis más graves se han manifestado en animales domésticos, esto es un grave problema que afecta a la economía, de ahí la preocupación por hacer medicamentos veterinarios que ataquen este mal.

CICLOS BIOLÓGICOS

Muchos parásitos tienen un solo huésped y se transfieren de un individuo a otro de la misma especie, ya sea por contacto directo o mediante formas resistentes que pueden sobrevivir cierto tiempo fuera del huésped, durante el cual infectan a otros huéspedes.

Las infecciones parasitarias pueden transmitirse de un huésped a otro mediante vectores artrópodos. Un vector será huésped si la maduración del parásito se lleva a cabo en él. Si el artrópodo es tan sólo instrumento de transferencia pasiva, se llama vector mecánico. Muchos helmintos tienen ciclos biológicos complejos en los que participan dos o más huéspedes. Cuando se necesita de más de un huésped para la maduración del parásito, aquel en el que se lleva a cabo la reproducción sexual se le denomina huésped definitivo. A las especies en donde se realizan las etapas de larvas se les llama huésped intermedio.

CLASIFICACION

Los parásitos animales del hombre y casi todos los vertebrados pertenecen a cinco subdivisiones principales o phyla. Estos son Protozoa; Platyhelminths o gusanos planos (tremátodos y céstodos); Aschelminths, (nemátodos o gusanos redondos); Acanthocephala o gusanos de cabezas espinosas; y Arthropoda. La asignación de esta categoría se basa en características morfológicas. (47)

Tremátodos.

La palabra tremátodo significa cuerpo con agujeros. Los tremátodos o duelas adultos, son parásitos entozoarios de vertebrados. Casi todos son hermafroditas y muchos pueden fertilizarse por sí mismos son organismos delgados, en forma de hoja o elongados, que poseen órganos para adherirse en forma de ganchos o depresiones musculares llamadas ventosas, Los huevos que deposita el adulto en el vertebrado son arrojados al exterior directa o indirectamente con las heces, (Fasciola, Fasciolopsis, Clonorchis, formas heterofideas, Shistosomas, Japonicum, S. mansoni). Ahí se forma una larva a esta se le llama miracidio, la larva termina por madurar y llevar vida independiente. Para emerger debe esperar a que la ingiera otro huésped. El huésped intermediario es un molusco caracol o almeja.

Su alimentación consiste en el material líquido o semilíquido que se encuentra en la región en donde el gusano se establece; el modo de alimentación es suctorial, utilizando el órgano natural de fijación de las ventosas; en algunos casos este proceso se facilita por secreciones enzimáticas producidas por el tremátodo. La digestión es predominantemente extracelular.

La respiración de los tremátodos que viven en el aparato digestivo es esencialmente anaerobia. Los tremátodos sanguíneos obtienen oxígeno en su medio ambiente próximo a los glóbulos rojos, pero si esta fuente se inhibe artificialmente, pueden utilizar glicógeno. Cuentan con un sistema nervioso.

Entre los tremátodos están las formas que parasitan al intestino, hígado, vasos sanguíneos y pulmones del hombre.

Céstodos.

Los céstodos tienen un cuerpo segmentado, elongado y en forma de listón que posee un órgano de fijación, el escolex, en posición anterior, carece de aparato digestivo. El alimento se absorbe a través de la cutícula del gusano tanto de hidratos de carbono como de otras sustancias presentes en las mucosas del intestino del huésped. Su sistema excretor es muy primitivo. Cuentan con sistema nervioso.

Los órganos genitales están completamente desarrollados. Los huevos se forman en el ootipo y se almacenan en el útero. Los huevos de las especies de pseudofilidios (*Diphyllobothrium*) son ovoides y operculados, y están inmaduros al ser eliminados; los de las especies de ciclofilidios (*Taenia*, *Hymenolepsis*, *Dypilidium*, etc.) son generalmente específicos, no esporulados y casi totalmente embrionados al salir del útero.

Los céstodos adultos habitan en el intestino delgado. Sus ciclos biológicos son muy complejos. Al ingerir las larvas infectantes, ya sea en forma accidental o en la comida se escaparán al intestino delgado y empezarán a crecer. La infección con gusanos adultos siempre se lleva a cabo por vía bucal. El transporte de un huésped a otro suele ser pasivo. El tratamiento se considera adecuado si se expulsa todo el gusano.

Nemátodos.

Los nemátodos son gusanos cilíndricos, y alargados, con frecuencia achatados en sus extremos. Tienen una cutícula rígida, la cual puede suavizarse o extenderse para formar gran variedad de formas. Muchas especies son de vida libre; algunos se encuentran en las aguas dulces o saladas y otras en el lodo, en la tierra del campo y en el jardín. Otros nemátodos son parásitos de animales invertebrados. Entre los vertebrados es dudoso que no haya una especie que no sea parasitada por uno o más nemátodos. Muchos de estos como (*Ascaris lumbricoides*, *Trichinella spiralis*, *Wuchereria bancrofti*), son agentes de enfermedad muy importante en el hombre.

Los sexos están separados y el macho suele ser mucho más pequeño que la hembra. Tienen un aparato digestivo bien formado. Carecen de sistema circulatorio y también tienen sistema nervioso.

Las etapas de ciclos biológicos incluyen a los huevos , larvas, las cuales sufren varias mudas y adultos. Los huevos y larvas de las especies que viven en el tubo digestivo salen exterior por las heces del huésped. Cuando los gusanos viven en el tejido pulmonar o en los riñones, los huevos son expulsados con los esputos o con la orina. Los huevos hacen eclosión y las larvas del primer estadio se alimentan , mudan y se transforman en larvas filariformes infectivas para el hombre por vía cutánea.

Las larvas atraviesan la piel y se dirigen a los pulmones antes de llegar al intestino, maduran y acaban por establecerse en lugares apropiados para cada especie.

2.3 BENZIMIDAZOLES

Todos los benzimidazoles derivan de un anillo químico como núcleo. Los benzimidazoles son parte integral de la estructura de la vitamina B12 a partir del núcleo se han realizado numerosas variables como el benzimidazol carbamato.

Los benzimidazoles carbamatos son muy efectivos en contra de diversos parásitos, pero sus limitantes son la absorción y la solubilidad en agua. Los benzimidazoles son insolubles en agua, lo que limita su uso en el tratamiento de parásitos gastrointestinales. Sin embargo, los parabenzimidazoles, son más solubles en agua.

Los parabenzimidazoles se desarrollaron sustituyendo las moléculas de benceno que son convertidas enzimáticamente a benzimidazol carbamato activo después de la absorción, Al lograr esto se superan las limitantes de los benzimidazoles carbamatos, ya que sobre todo uno de ellos en especial el netobimin es más soluble en agua, lo que favorece su absorción.

El netobimin reduce el grupo nitro por acción de la microflora intestinal. Los derivados orthoamino resultantes, ciclan a metil 5 - (propiltio) benzimidazole carbamato.

Todos los benzimidazoles y probenzimidazoles actúan destruyendo los microtúbulos de las células del parásito que son necesarias para el transporte de nutrientes, a través de la pared celular del parásito. El metabolismo de la célula se suspende en forma instantánea, esto ocasiona la muerte de la célula del

parásito.

También actúan bloqueando la enzima fumarato reductasa en la célula del parásito. Esto provoca una falta de glicógeno, (energía) a nivel celular provocando la muerte del parásito.Ⓢ

Aparentemente no hay diferencia en su forma de acción, pero si existe gran diferencia en la absorción. El netobimin es el único benzimidazol que empieza a actuar desde el rumen, por lo consiguiente, el único que actúa en contra de parásitos ruminales como el paramphistomum.

2.4 CROMATOGRAFIA

Los métodos de separación son una de las herramientas fundamentales de la química analítica.

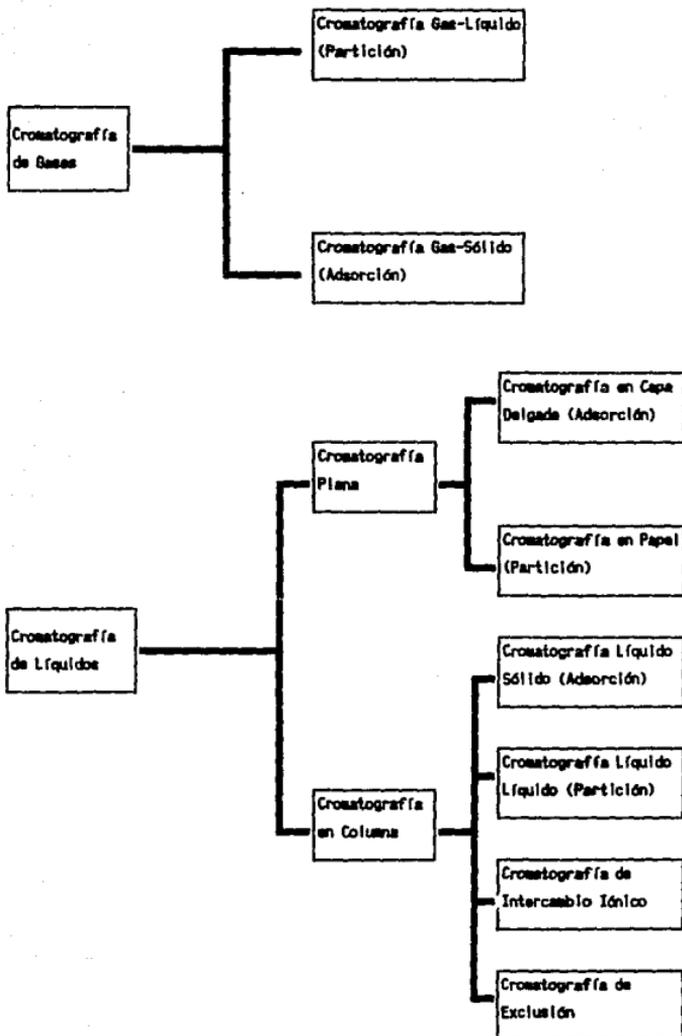
La cromatografía se define como un método físico de separación, en el cual los componentes a separarse se distribuyen entre dos fases, una fase móvil, (líquida o gaseosa) que circula a través de una fase estacionaria, (sólida o líquida). Cuando se introduce una mezcla de sustancias en un sistema cromatográfico, se producen una serie de equilibrios de distribución entre las dos fases. Los procesos cromatográficos tienen lugar como resultado de repetidas adsorciones-desorciones durante el movimiento de los componentes a lo largo de la fase estacionaria, lográndose la separación gracias a las diferencias en los coeficientes de separación o distribución de los distintos componentes de la muestra.

Según sea la naturaleza de las fases involucradas de los mecanismos de separación, la cromatografía se clasifica en:

- 1.- Cromatografía de adsorción: La fase estacionaria es un sólido, la separación se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción.
- 2.- Cromatografía de partición: La fase estacionaria es un líquido, la separación se basa en una partición entre la fase móvil y la fase estacionaria.

TIPOS DE CROMATOGRAFIA

20



3.- Cromatografía de intercambio iónico: La fase estacionaria esta cargada iónicamente con carga contraria a la de la muestra.

4.- Cromatografía de exclusión: Se rellena la columna con un material especial con lo que la muestra es retenida o filtrada según sea el tamaño molecular.

2.4.1 PARAMETROS FUNDAMENTALES

Factor de capacidad (K'): Es la medida de la capacidad para retener un soluto en una columna. Es expresado por la siguiente ecuación:

$$K' = \frac{t_r}{t.}$$

Donde:

t_r = tiempo de retención

$t.$ = tiempo requerido para que un componente no retenido pase a través de la columna.

Si K' es muy bajo, los componentes son eluidos demasiado rápido, mientras que si K' es muy alto los componentes son eluidos demasiado lento.

Número de platos teóricos (N): Es una medida de la eficiencia de la columna., indica la importancia relativa de los fenómenos que provocan la dispersión de la banda respecto a la retención del compuesto. Se puede calcular con la ecuación siguiente:

$$N = 16 (t_r/W_b)^2$$

Donde:

t_r = tiempo de retención de la sustancia.

W_b = ancho del pico medido en su base.

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

Tiempo de retención (t_R): Es el tiempo que transcurre desde que se deposita la muestra en el sistema cromatográfico hasta el tiempo máximo de elución del soluto. El tiempo de retención es medido del inicio de la inyección a la altura máxima del pico del soluto; es una función que depende del largo de la columna o fase estacionaria, de la velocidad de la fase móvil, de la afinidad del soluto por la fase estacionaria y de la temperatura de la columna.

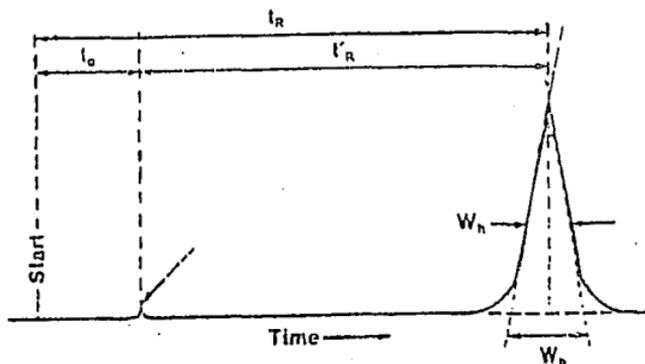


Fig. 2 Tiempo de retención

Donde:

t_r = tiempo requerido para que un componente no retenido pase a través de la columna.

t_r = tiempo que las moléculas del soluto permanecen en la fase estacionaria (tiempo de retención corregido).

W_b = ancho del pico.

W_h = ancho del pico medido al 50 % de su altura total.

Volumen de retención (V_r): Es el volumen de la fase móvil requerido para eluir un compuesto en el sistema, se expresa con la ecuación siguiente:

$$V_r = V_m + KV_s$$

Donde:

V_m = Volumen de la fase móvil en el sistema.

K = Coeficiente de partición en el sistema.

V_s = Volumen efectivo de la fase estacionaria.

Resolución (R_s): La resolución es una medida de la separación de dos componentes en una mezcla. Este termino incluye la separación y ancho de los picos, es calculado por la siguiente ecuación:

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_{b2} + W_{b1}}$$

El factor de resolución R_s , da el grado de separación entre dos picos.

Un valor calculado de 1.5 o mayor representa una separación basal de los picos. Un valor de 1 indica que la separación es adecuada, con resolución de 0.5 se puede tener dificultad para cuantificar.

2.4.2 CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), es una de las técnicas más versátiles de la química analítica debido a su sencillez y capacidad para obtener separaciones de alta resolución.

El éxito en la aplicación de la cromatografía de líquidos para un compuesto depende de la combinación correcta de las condiciones de operación: el tipo de columna, la fase móvil, la longitud y diámetro de la columna, la velocidad de flujo de la fase móvil, etc.

Los mecanismos o procesos de separación que dan como resultado la retención de las moléculas de una muestra por parte de la fase estacionaria dan lugar a diferentes métodos de cromatografía líquida: líquido-líquido o de partición, líquido-sólido o de adsorción, la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de exclusión. Existen otros mecanismos de separación como la cromatografía de fases enlazadas en la cual la fase estacionaria esta unida químicamente a las partículas del soporte. Este empaque es de los más usados por CLAR por ser estable y no se pierde fácilmente por el uso. Esta variante de cromatografía se puede llevar a cabo en fase normal o fase inversa.

a) Cromatografía de fase normal: La fase estacionaria es fuertemente polar (sílice) y la fase móvil es apolar. Los componentes polares quedan retenidos en la columna durante tiempos mayores que los componentes no polares.

b) Cromatografía de fase inversa: La fase estacionaria es apolar (hidrocarburos) y la fase móvil es polar. En cuanto más apolares sean

los componentes de una muestra mayor será la retención.

La tabla No 2, muestra las diferentes modalidades de cromatografía, y el tipo de moléculas que separa cada una.

Para poder llevar a cabo la separación de una muestra por CLAR, el primer paso es disolver la muestra en un solvente apropiado. A continuación la muestra se introduce por medio de un mecanismo inyector en la columna. La muestra se mueve dentro de la columna por un flujo continuo de fase móvil que es impulsado por una bomba, dependiendo de la afinidad de los componentes por la columna y la fase móvil tardarán más o menos tiempo en salir de la columna. Un detector monitorea a los componentes al salir de la columna, el detector transmite señales a un mecanismo de registro que grafica los datos, registrándose sus concentraciones y sus tiempos de retención. El cromatograma obtenido puede proporcionar información tanto cualitativa como cuantitativa en relación a la muestra.

TIPOS DE CROMATOGRAFIA EN CLAR

TIPO DE SEPARACION	MECANISMO	MOLECULAS QUE SEPARAN (algunos ejemplos)	SOLVENTES QUE SEPARAN (algunos ejemplos)
Cromatografía de exclusión.	Separa moléculas por tamaños. Las más grandes eluyen primero.	Desde proteínas y carbohidratos hasta metacrilatos y neopreno.	Tolueno Dioxano Acetona, H ₂ O
Cromatografía líquido-sólido (fase normal)	Adsorción-Separa en base a polaridad. La menos polar eluye primero.	Hidrocarburos y aromáticos, Isómeros y Compuestos no polares.	Organicos no ionizables (hexano)
Cromatografía líquido-líquido (fase normal)	Partición del soluto entre 2 solventes inmiscibles "Fase estacionaria más polar"	Monosacáridos, Catecolaminas y aromáticos.	Polar no polar (agua-acetonitrilo).
Cromatografía líquido-líquido (fase reversa)	Partición del soluto entre 2 solventes inmiscibles "Fase móvil más polar"	Hervicidas Ácidos grasos.	Agua con modificadores orgánicos.
Cromatografía por intercambio iónico.	Iones de la muestra se intercambian con un contraión	Aminoácidos Nucleótidos	Diversos Buffers orgánicos.

La cromatografía líquida de alta resolución se caracteriza comunmente por:

- _Columnas reutilizables de pequeño diámetro (2-5 mm).
- _Rellenos de columnas de pequeño diámetro (5-50 micras).
- _Presión de entrada relativamente alta y flujo controlado de la fase móvil.
- _Introducción precisa de la muestra, sin necesidad de grandes cantidades.
- _Detectores continuos especiales, capaces de operar a caudales muy bajos y a concentraciones muy pequeñas.
- _Instrumentos normalizados y automatizados.
- _Análisis rápido y alta resolución.

EQUIPO

Los componentes básicos que integran un cromatógrafo de líquidos son: una bomba, un inyector, una columna, un detector y un registrador. (16)

En la figura No 3, se muestra el diagrama de un equipo completo de CLAR.

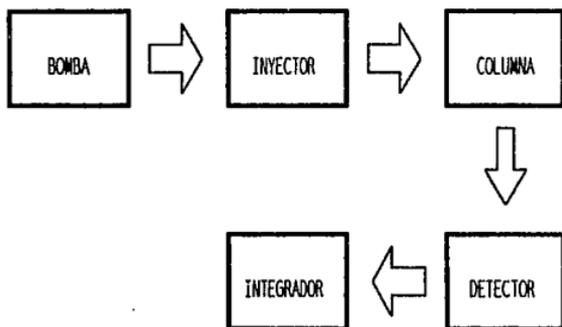


Fig. No. 3 Diagrama de un Cromatógrafo de Líquidos.

1. Sistema de bombeo

Tiene por objeto impulsar la fase móvil a través de la columna y debe cumplir con ciertas especificaciones como reproducibilidad y precisión, manteniendo un flujo constante.

2. Columna

Se considera a la columna la parte fundamental de la cromatografía, ya que es en esta donde se lleva a cabo la separación. Generalmente es un tubo de acero inoxidable, con una longitud de 7.5 a 30 cm de largo, con un diámetro interno de 2-5 mm; contiene a la fase estacionaria, el material de empaque seleccionado dependerá de la separación que se desee hacer. (10)

3. Fase móvil

La fase móvil es parte activa en un sistema de cromatografía de líquidos, por lo que la selección de una fase apropiada es una de las partes más importantes en la separación por CLAR.

Características de la fase móvil. (10)

- _Alta pureza.
- _Fácil disponibilidad a razonable precio.
- _Un punto de ebullición de 20 a 50 °C arriba de la temperatura de la columna.
- _Baja viscosidad (mayor de 0.5 cp).
- _Baja reactividad para evitar interacción con solutos o con el empaque.
- _Para cromatografía líquido-líquido, inmiscibilidad con la fase estacionaria.

Limitada inflamabilidad y toxicidad.

La selección de los solventes líquidos usados como fase móvil depende de varios parámetros. En la cromatografía de adsorción y partición el papel más importante lo desempeña la polaridad y la viscosidad y otras características que influyen en el detector. En la cromatografía de intercambio iónico son importantes la fuerza iónica y el pH, mientras que en la cromatografía de exclusión lo más importante es la solubilidad de la muestra en la fase móvil.

4. Sistema de inyección

Un factor muy importante para obtener una buena resolución en la separación es la adecuada introducción de la muestra en el sistema, debe ser en forma de paquete pequeño, esto ayuda a la obtención de picos simétricos y angostos. Existen varios mecanismos de introducción de la muestra; se pueden clasificar como manuales, automáticos y computarizados.

5. Detectores

Los cromatógrafos actuales de cromatografía líquida poseen un amplio intervalo operativo que normalmente permite trabajar en un mismo aparato a escala analítica o preparativa. Tienen una gran sensibilidad, lo que permite la detección de nanogramos de material.

El detector más utilizado en CLAR, es un detector de absorción (UV/VIS); responden a aquellas sustancias que absorben

luz visible o ultravioleta. Una gran cantidad de compuestos entran en esta categoría, incluyendo las sustancias que tienen electrones sin compartir como las olefinas, así como todos los aromáticos. Existen detectores con longitud de onda fija y con longitud de onda variable, los más sencillos se fijan a longitud de onda de 254 nm, dado que la mayoría de los componentes orgánicos aromáticos absorben a esta longitud de onda o por lo menos cerca de ella. Los detectores de onda fija tiene la ventaja de ser de bajo costo y alta sensibilidad, siendo capaces de detectar sustancias del orden de nanogramos. La capacidad de análisis puede aumentarse aun más usando un detector de longitud de onda variable. En estos la fuente luminosa comunmente usada es la lámpara de deuterio; el detector de arreglo de fotodiodos es el más sofisticado y costoso detector UV-VIS, proporciona espectros continuos.

Otros detectores también utilizados en CIAR son:

_Detector de índice de refracción.

(Detector de desviación y detector de reflexión).

_Detector de fluorescencia.

_Detector electroquímico.

_Detector infra-rojo.

2.5 VALIDACION

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, el método debe probarse para determinar su efectividad. La validación generalmente incluye una evaluación de la precisión, linealidad, exactitud; y proporciona una medida del comportamiento del método.(1)

La validación del método puede definirse como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio la capacidad del método, y que este satisface los requerimientos para las aplicaciones analíticas deseadas.(1)

Es importante tomar en cuenta que en la aplicación de los criterios de evaluación de un método analítico prevalece la experiencia y el criterio de la persona que lleve a cabo la validación.(1)

2.5.1 PARAMETROS

LINEARIDAD DEL SISTEMA

La linealidad del sistema, es la habilidad para asegurar que los resultados analíticos obtenidos, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado. Los resultados pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática.

Es el intervalo entre los niveles superior e inferior de la sustancia a determinar (incluyendo estos niveles), el cual se

ha demostrado que es preciso, exacto y lineal. Utilizando el método analítico correspondiente.

Generalmente la linealidad se determina construyendo una curva de calibración graficando respuesta medida contra concentración, utilizando cuando menos cinco diluciones de concentración diferente preparadas a partir de una solución patrón y por duplicado.

PRECISION DEL SISTEMA

La precisión del sistema es la concordancia entre resultados analíticos obtenidos en una serie de ensayos. Normalmente la prueba se realiza preparando una solución estándar del activo, que contenga el 100 %, y se analiza seis veces cuando menos. Generalmente se expresa en términos de Desviación Estándar o del Coeficiente de Variación.(15)

ESPECIFICIDAD

La especificidad, es la habilidad de un método analítico, para demostrar que la respuesta obtenida se debe exclusivamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra o productos de degradación. Se determina analizando placebos de la sustancia a determinar y producto terminado, sometidos a condiciones extremas de almacenaje con el fin de obtener los posibles productos de degradación. El método

desarrollado debe separar la sustancia de interés del resto de los componentes de la muestra, así como de los posibles productos de degradación y/o sustancias relacionadas.()

TOLERANCIA

La tolerancia, es la flexibilidad que tiene un método analítico para que los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo condiciones normales de operación sean reproducibles en diferentes laboratorios o por diferentes

analistas; variando lotes de reactivos, temperatura, columna, sistema de elución, flujos, etc.

EXACTITUD DEL METODO

Esta prueba recibe también el nombre de *LINEARIDAD DEL METODO O EFECTO PLACEBO*.

La exactitud del método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y un valor de referencia. Se expresa en por ciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia de interés.

Para hacer esta prueba se prepara un placebo, al cual se le adicionan diferentes cantidades de la sustancia de interés, generalmente del 60, 80, 100, 120 y 140 % de lo etiquetado en marbete, haciendo los análisis por duplicado.

La exactitud del método se evalúa mediante un análisis de regresión lineal, graficando miligramos recuperados vs miligramos adicionados. Debiendose obtener una respuesta lineal; la cual es

demostrada mediante el calculo del coeficiente de correlación, la pendiente y la ordenada al origen. Además se hacen pruebas de t, para establecer los limites de confianza para el porcentaje recuperado y se calcula también el coeficiente de variación existente entre las diferentes recuperaciones.(10)

PRECISION DEL METODO

La precisión, es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico, bajo las condiciones de operación. Generalmente se expresa en términos de desviación estándar o coeficiente de variación.

Repetibilidad

La repetibilidad es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos aparatos y técnicas de análisis.(11)

Reproducibilidad

La reproducibilidad, es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios. Utilizando el mismo o diferentes equipos.(12)

La prueba se lleva a cabo haciendo seis determinaciones, de un mismo lote de producto terminado. Los análisis se hacen por

dos químicos distintos en dos días diferentes. Siendo en total doce muestras analizadas. En esta prueba se calcula el coeficiente de variación y análisis de varianza

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Es la propiedad de la muestra preparada para su cuantificación, de mantener sus propiedades fisicoquímicas y la concentración de las sustancias de interés en un tiempo determinado. Para determinarla se prepara una serie de muestras, y se analizan el día de la preparación, se almacenan durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas, y reanalizándose al término del período de almacenamiento establecido.

SENSIBILIDAD

Esta se evalúa tanto cualitativamente, como cuantitativamente mediante:

Limite de detección

Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación.(4)

Limite de cuantificación

Es la menor concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo condiciones de operación.(4)

2.6 EVALUACION ESTADISTICA

Cualquier método de análisis químico cuantitativo involucra analizar una muestra, y hacer inferencias acerca de ella con base a los resultados obtenidos en el análisis. El analista hace éste trabajo más de una vez y considera el resultado de sus determinaciones como el resultado final.

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

La exactitud se define como el grado de dispersión de los datos al rededor del valor verdadero, en tanto que la precisión es una medida de la reproducibilidad.

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

$$s = \sqrt{\frac{\sum xi - x}{(n - 1)}}$$

Donde:

s = desviación estándar.

n = número de mediciones.

xi = valores individuales.

x = promedio de valores individuales.

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

ANALISIS DE REGRESION LINEAL

Para determinar si los valores obtenidos en un experimento siguen un comportamiento lineal, se efectúa un *ANALISIS DE REGRESION*.

Primeramente se traza una gráfica con valores muestrales sobre un plano xy. si los puntos se hallan cerca de una línea recta, se supone que las variables tienen una relación lineal.

Ecuación general de la línea recta:

$$y = a + bx$$

Donde:

a = ordenada al origen.

b = pendiente de la recta.

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

La ecuación de la recta de regresión es:

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

Donde: x y y son las medidas de los valores x y y de la muestra, y la pendiente de la recta esta dada por la fórmula:

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

El coeficiente de correlación r , nos da la medida de la relación entre las variables x y y , el valor de r en una recta hipotética perfecta con pendiente positiva, debe ser igual a 1 y se calcula con la siguiente fórmula:

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

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

Para calcular un intervalo de confianza se usa la siguiente fórmula:

estimador +/- (factor de confiabilidad) (error estandar)

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

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

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

ANALISIS DE VARIANZA

El análisis de varianza es la técnica estadística que permite evaluar el efecto que provoca una o más variables sobre la respuesta de un evento realizado, además de la interacción entre estas variable.

En la validación de métodos analíticos, el análisis de varianza no constituye un requisito mínimo; sin embargo si se quieren establecer las fuentes de variación del método como son: Analista, Día, Equipo, Laboratorios, etc. en la prueba de *REPRODUCIBILIDAD*, ésta prueba estadística permite determinar esas variaciones.

Cuando se evalúa el efecto del analista sobre el método en diferentes días, se ésta observando el comportamiento del método en relación a dos factores fundamentales.

Cuando el análisis es realizado por 2 analistas en dos días diferentes y con tres replicaciones cada uno, se realiza el siguiente análisis de varianza:

El modelo hipotético que se siguió se describe a continuación:

$$y_{ijk} = \mu + a_i + d_j(i) + E_k(ij)$$

Donde:

y_{ijk} = El ensayo de la sustancia de interés de la *késima* muestra analizada por el *iésimo* analista en el *jésimo* día.

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

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

$d_j(i)$ = Efecto del día anidado en el analista
(donde $j = 1 \dots d$).

$E_k(ij)$ = error del método analítico
(donde $k = 1 \dots r$).

a = número de analistas. (donde $a = 2$)

b = número de días. (donde $b = 2$)

r = número de replicaciones. (donde $r = 3$)

ANALISIS DE VARIANZA

TABLA ANADEVVA

FUENTE DE VARIANZA	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	Fcal	F0.05*
Analista	(a-1)	SCa/gla	MCa/MCd	gla/gld	
Día	(d-1)a	SCd/gld	MCD/MCe	gld/gle	
Error	ad(r-1)	SCE/gle	---	---	

a =analistas

d =días

r =número de replicaciones

e =error calculado
gl=grados de libertad

*F0.05 = Los valores de F0.05 se obtienen de la Tabla de F, localizando el cruce del valor de los grados de libertad (gl) de numerador horizontalmente y el valor de los grados de libertad del denominador verticalmente, para un $\alpha = 0.05$.

INTERPRETACION DE RESULTADOS

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

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DESARROLLO Y VALIDACION DEL METODO ANALITICO PARA LA CUANTIFICACION DE NETOBIMIN

Para el desarrollo de un método de análisis para cuantificar el netobimin se partió de un sistema establecido el cual fue optimizado, se hicieron modificaciones tales como: cambio del solvente para disolver las muestras y los estándares; cambio de alicuotas y diluciones; disminución del número de platos teóricos y cambio en la velocidad de flujo de la fase móvil. Lograndose con esto disminuir el costo y acortar el tiempo de realización del análisis. Con lo que se obtuvo un método sencillo, económico y que cumple con los requisitos establecidos para un análisis por CLAR, los cuales son demostrados en la sección de la "Validación del Método Analítico".

El método analítico se validó completamente y además por requerimientos de calidad y seguridad se determinó la sensibilidad del sistema cromatográfico, para el límite de detección y límite de cuantificación de dos de los productos de degradación del netobimin.

3.1.2 METODO DE TRABAJO

Para validar el método analítico se siguieron los parámetros descritos en el capítulo 2.

La cuantificación del netobimin se efectuó por estandarización interna. Para lo cual se utilizan las siguientes fórmulas:

Factor de respuesta, K:

$$K = \frac{\text{Area St. An.}}{\text{Area St. Int.}} * \frac{\text{Peso St. Int.}}{\text{Vol. Dil. St. Int.}} * \frac{\text{ml St. Int.}}{\text{Vol. final}}$$

$$\frac{\text{Vol. Dil. St. An.}}{\text{Peso St. An.}} * \frac{\text{Vol. final}}{\text{ml St. An.}}$$

$$\frac{\text{Area St. An.}}{\text{Area St. Int.}} * \frac{\text{Peso St. Int.}}{\text{Peso St. An.}} * \text{Factor de dilución}$$

Cuantificación de Netobimin.

$$\text{mg Netobimin/ml} = \frac{1}{K} * \frac{\text{Area Net.}}{\text{Area St. Int.}} * \frac{\text{Peso St. Int.}}{\text{Vol. Dil. St. Int.}}$$

$$\frac{\text{ml St. Int.}}{\text{Vol. final}} * \frac{\text{Vol. Dil. Mtra.}}{\text{ml Mtra.}} * \frac{\text{Vol. final}}{\text{ml Dil. Mtra.}}$$

Los límites de aceptación y rechazo de todos los parámetros, se establecieron utilizando los lineamientos del laboratorio donde se realizó el trabajo; los establecidos por la Guía Oficial de Validación de Métodos Analíticos editado por la Secretaría de Salud y el Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos; la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos 5a. Edición; la USP XXII; así como el criterio del analista.

3.1.3 METODO ANALITICO PARA LA CUANTIFICACION DE NETOBIMIN

SISTEMA CROMATOGRAFICO..

1. Instrumento: Cromatógrafo de líquidos.
2. Columna: uBondapak C18 (acero inoxidable, de 15 cm * 3.9 mm de diámetro interno, empacada con octadecilsilano unida a micropartículas de cerámica o sílica de 5 a 10 micras de diámetro).
3. Detector: Ultravioleta a 254 nm. a 0.1 AUF
4. Fase móvil: MeOH/KH₂PO₄ 0.05 M (60:40).
5. Velocidad de flujo: 1 ml/min.
6. Velocidad de carta: 0.25 cm/min.
7. Volumen de inyección: 20 microlitros.
8. Estándar Interno: butilparabeno (35 mcg/ml).

METODO ANALITICO.

Reactivos y solución estandar.

1. Metanol.
2. Metanol/agua (1:1).
3. Solución Tris.

Disolver 1.4 g de tris (hidroximetilaminometano) en 100 ml de agua.

4. Solución de estándar interno.

Exactamente pesar al rededor de 35 mg de estándar de butilparabeno en un matraz volumétrico de 100 ml. Diluir al volumen con metanol.

5. Solución de estándar de referencia.

Exactamente pesar al rededor de 30 mg de estándar de referencia de netobimin en un matraz volumétrico de 50 ml.

Adicionar 2.5 ml

de solución tris dentro del matraz y disolver el netobimin. Diluir al volumen con MeOH/H₂O.

Transferir 5 ml de solución de estándar de referencia del netobimin a un matraz volumétrico de 50 ml. Adicionar 5 ml de solución de estándar interno, Mezclar y diluir al volumen con MeOH/H₂O.

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.

- 1.- Agitar la suspensión con magneto, hasta homogenizar.

Tomar una porción de la muestra equivalente a 300 mg de netobimin en un matraz volumétrico de 100 ml.

- 2.- Lavar la pipeta con varias porciones de solución tris y recolectar los lavados en el matraz.
- 3.- Adicionar solución tris hasta tener un volumen total de 50 ml. Disolver y diluir al volumen con MeOH/H₂O.
- 4.- Inyectar 20 microlitros de la muestra en el cromatógrafo de líquidos.

TIEMPOS DE RETENCION APROXIMADOS

Netobimín 4 minutos

Butilparabeno 8 minutos

3.1.4 VALIDACION DEL METODO PARA LA CUANTIFICACION DE NETOBIMIN

ESPECIFICIDAD DEL METODO

Para demostrar la especificidad del método se prepararon los placebos de netobimin y el producto terminado y se sometieron a 70 °C durante 14 días, con el fin de obtener los productos de degradación del netobimin.

Posteriormente se analizaron las siguientes muestras utilizando el método antes descrito:

_Solvente.

_Estándar de netobimin.

_Estándar de butilparabeno.

_Estándar del compuesto A (producto de degradación del netobimin).

_Estándar del compuesto B (producto de degradación del netobimin).

_Factor respuesta.

_Estándar de metilparabeno.

_Estándar de propilparabeno.

_Placebo de netobimin a T.A. sin estándar interno.

_Placebo de netobimin a 70 °C durante 14 días sin estándar interno.

_Producto terminado a T.A. con estándar interno.

_Producto terminado a T.A. sin estándar interno.

_Producto terminado a 70 °C durante 14 días sin estándar interno.
En las figuras 1a,1b,1c,1d,1e,1f,1g,1h,1i,1j,1k,1l y 1m se pueden observar los cromatogramas obtenidos.

CONCLUSION:

En los cromatogramas obtenidos se puede observar que no hay interferencias tanto de los excipientes así como de los productos de degradación en la detección del netobimin, con lo que queda demostrado que el método es específico para la cuantificación del netobimin.

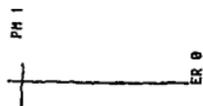
CROMATOGRAMAS DE LA ESPECIFICIDAD DEL METODO
DE NETOBIMIN

Fig. 1a SOLVENTE

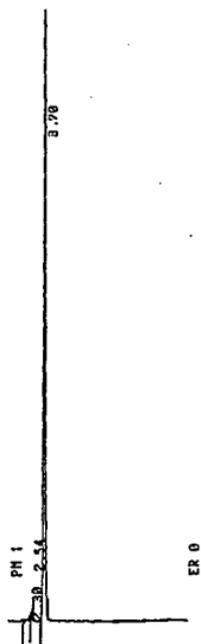


Fig. 1b ESTANDAR DE NETOBIMIN

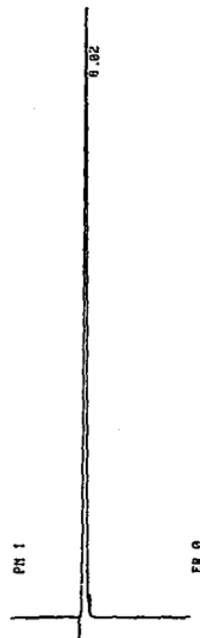


Fig. 1c ESTANDAR DE BUTILPARABENO

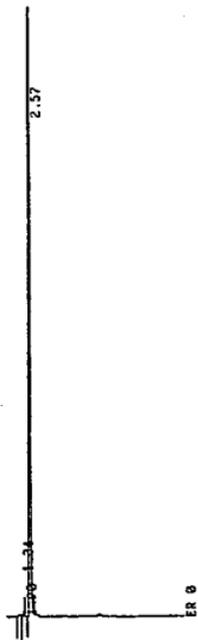


Fig. 1d ESTANDAR DEL COMPUESTO "A"

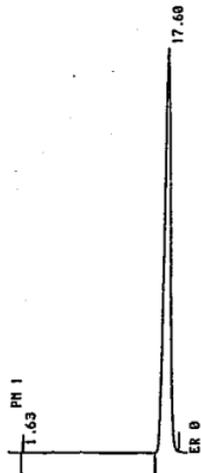


Fig. 1e ESTANDAR DEL COMPUESTO "B"

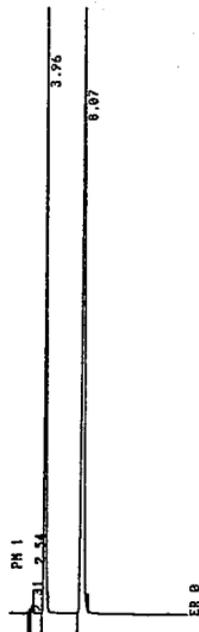


Fig. 1f FACTOR RESPUESTA

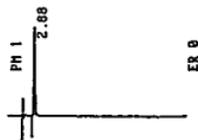


Fig. 1g ESTANDAR DE METILPARABENO



Fig. 1h ESTANDAR DE PROPILPARABENO

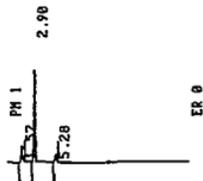


Fig. 11 PLACEBO DE NETOBIMBIN A T.A
SIN ESTANDAR INTERNO

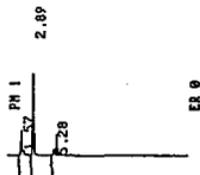


Fig. 1J PLACEBO DE NETOBIMBIN A 70°C
DURANTE 14 DIAS S/St. Int.

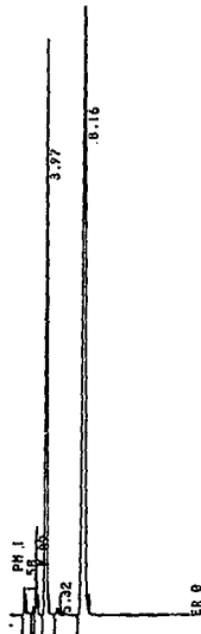


Fig. 1k PRODUCTO TERMINADO A T.A
CON ESTANDAR INTERNO

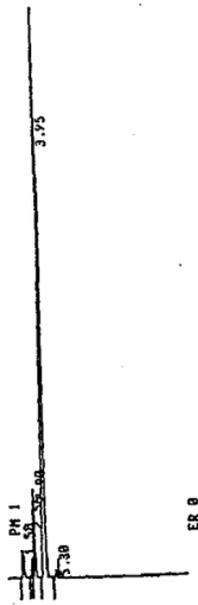


Fig. 1l PRODUCTO TERMINADO A T.A
SIN ESTANDAR INTERNO

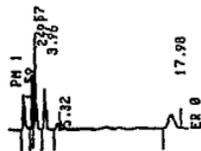


Fig. 1m PRODUCTO TERMINADO A 70°C
DURANTE 14 DIAS 5/St. Int.

TOLERANCIA DEL SISTEMA

Criterio de aceptación: Factor de resolución mayor a 2.

La tolerancia del sistema se efectuó haciendo variaciones en el número de platos teóricos, la velocidad de flujo, y en la proporción de fase móvil, observándose el efecto de estos cambios en el tiempo de retención y el factor de resolución; entre el metilparabeno (M) y netobimín (N), entre netobimín (N) y propilparabeno (P), entre propilparabeno (P) y butilparabeno (B) y entre butilparabeno (B) y compuesto B (producto de degradación del netobimín) (D). Para realizar esta prueba se usó producto terminado almacenado a temperatura ambiente y ciclado de 70 °C a 5 °C por 48 horas durante 16 días. Los resultados se presentan en las siguientes tablas.

TABLA No. 12 NUMERO DE PLATOS TEORICOS (NPT)

A.- MUESTRAS A TEMPERATURA AMBIENTE (TA).

NPT	TIEMPO DE RETENCION (MIN)					FACTOR DE RESOLUCION			
	M	N	P	B	D	M/N	N/P	P/B	B/D
1171	2.85	3.82	4.90	7.31	-	2.98	2.53	4.03	-
1781*	2.65	4.21	5.72	8.89	-	4.66	3.68	5.61	-
1820	2.94	4.18	5.49	8.50	-	3.76	2.91	5.35	-

B.- MUESTRAS CICLADAS 70 °C - 5 °C/48 HRS, DURANTE 16 DIAS

NPT	TIEMPO DE RETENCION (IN)					FACTOR DE RESOLUCION			
	M	N	P	B	D	M/N	N/P	P/B	B/D
1050	2.83	3.84	4.91	7.38	16.19	2.40	2.28	4.02	7.08
1570*	2.93	4.05	5.49	8.58	19.74	2.33	2.53	4.72	10.24
1594	2.89	4.21	5.42	8.41	19.23	2.64	2.10	4.75	9.45

NPT.- Evaluada con butilparabeno.

TABLA No. 13 VELOCIDAD DE FLUJO

A.- MUESTRAS A T.A.

ml/min	TIEMPO DE RETENCION (MIN)					FACTOR DE RESOLUCION			
	M	N	P	B	D	M/N	N/P	P/B	B/D
0.7	3.49	5.52	7.23	11.17	-	5.01	3.93	6.71	-
1.0*	2.65	4.21	5.72	8.89	-	4.66	3.68	5.61	-
1.3	2.14	3.01	3.93	6.05	-	3.82	3.20	5.11	-

B.- MUESTRAS CICLADAS 70 °C - 5 °C/48 HRS, DURANTE 16 DIAS

ml/min	TIEMPO DE RETENCION (MIN)					FACTOR DE RESOLUCION			
	M	N	P	B	D	M/N	N/P	P/B	B/D
0.7	3.49	5.50	7.20	11.10	25.00	5.22	3.25	5.63	11.39
1.0*	2.93	4.05	5.49	8.58	19.74	2.33	2.53	4.72	10.24
1.3	2.15	3.01	3.93	6.04	13.60	3.07	2.39	4.69	9.25

TABLA No. 14 PROPORCION DE FASE MOVIL

A.- MUESTRAS A T.A.

A:B	TIEMPO DE RETENCION (MIN)					FACTOR DE RESOLUCION			
	M	N	P	B	D	M/N	N/P	P/B	B/D
57:43	3.13	4.88	6.38	10.40	-	3.14	2.34	5.14	-
60:40*	2.65	4.21	5.72	8.89	-	4.66	3.68	5.61	-
63:37	2.64	3.36	4.44	6.67	-	1.92	2.41	4.02	-

B.- MUESTRAS CICLADAS 70 °C - 5 °C/48 HRS, DURANTE 16 DIAS

A:B	TIEMPO DE RETENCION (MIN)					FACTOR DE RESOLUCION			
	M	N	P	B	D	M/N	N/P	P/B	B/D
57:43	3.17	5.02	6.54	10.77	26.22	3.59	2.48	5.44	9.63
60:40*	2.93	4.05	5.49	8.58	19.74	2.33	2.53	4.72	10.24
63:37	2.62	3.35	4.42	6.46	13.52	1.84	2.46	4.00	8.02

A:B = Metanol:buffer.

* Condiciones óptimas.

CONCLUSION.

El método mostró ser tolerante a cambios en la velocidad de flujo de +/- 0.3 ml/min y se pueden utilizar columnas con un mínimo de 1050 platos teóricos, además es tolerante para una disminución en la concentración del metanol en el intervalo estudiado, más no para un aumento del mismo.

PRECISION DEL SISTEMA

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

La precisión del sistema fue probada obteniendo la desviación estándar del factor respuesta (K), obtenida por seis inyecciones de solución estándar al 100 %. Los resultados se muestran en la tabla No. 4.

TABLA No. 4 PRECISION DEL SISTEMA

INYECCION No.	FACTOR RESPUESTA (K)
1	0.32238
2	0.32359
3	0.32437
4	0.32396
5	0.32369
6	0.32543
\bar{X}	0.32390
C.V	0.31 %

Donde: Factor respuesta (K) =

$$K = \frac{\text{Area del pico de Netobimin}}{\text{Area del pico del St. Int.}} \cdot \frac{\text{Concentración del St. Int.}}{\text{Concentración del Netobimin}}$$

CONCLUSION

El coeficiente de variación obtenido es menor que el establecido. Con lo que se cumple el criterio de aceptación de la precisión del sistema.

LINEARIDAD DEL SISTEMA

Criterio de aceptación: coeficiente de correlación no menor de 0.99.

La linealidad del sistema, se probó inyectando soluciones estándar de netobimin en un intervalo de 60 al 140 % de la concentración propuesta para el ensayo. La concentración del estándar interno (butilparabeno), fue constante en todas las soluciones estándar.

Para determinar este parámetro se construyó una curva de calibración graficando respuesta medida contra concentración. Los resultados son mostrados en la siguiente tabla:

TABLA No. 5 LINEARIDAD DEL SISTEMA

DE NIVEL ENSAYADO	CONCENTRACION NET. (mg/ml)	REALACION DE AREAS N/B
60	0.03804	0.35098
80	0.05072	0.46624
100	0.06340	0.58448
120	0.07608	0.69560
140	0.08876	0.80951

Datos del análisis de regresión:

$$y = mx + b$$

Pendiente, $m = 9.04117$

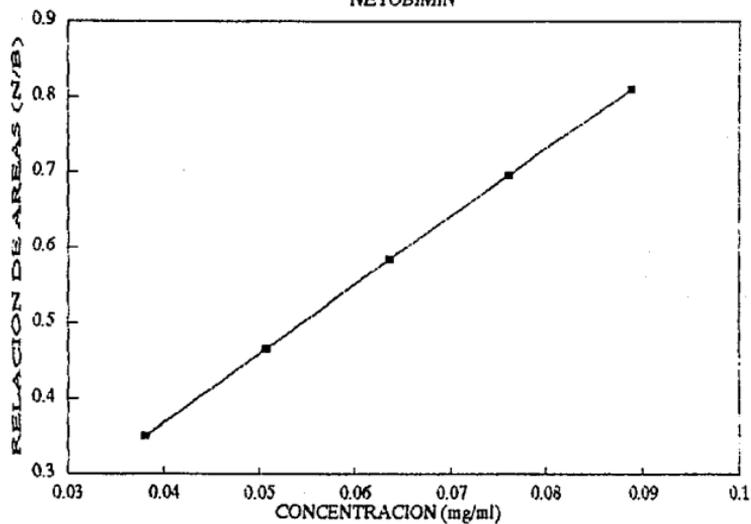
Ordenada al origen, $b = 0.00815$

Coefficiente de correlación, $r = 0.99995$

CONCLUSION

La respuesta de netobimín mostró ser lineal en el rango estudiado, ya que cumple con el criterio de aceptación establecido.

LINEARIDAD DEL SISTEMA NETOBIMIN



EXACTITUD DEL METODO

Criterio de aceptación: promedio de recobro de 98 a 102 % y coeficiente de variación no mayor a 2.0 %. La recta obtenida deberá tener una pendiente significativamente igual a 1, la ordenada al origen significativamente igual a 0 y el coeficiente de correlación no menor de 0.99.

La exactitud del método es demostrada, adicionando diferentes concentraciones de solución estándar de netobimín a cantidades constantes de placebo, las concentraciones del estándar fueron 60, 80, 100, 120 y 140 % de lo etiquetado en marbete. Se determinaron los porcentajes de recobro y se obtuvo la ecuación de la recta, graficando cantidad recuperada contra cantidad adicionada. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

TABLA No. 6 EXACTITUD DEL METODO

% DE NIVEL ENSAYADO	mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS	% DE RECUPERACION
60	90.975	90.985	100.01
80	121.300	122.245	100.78
100	151.625	152.570	100.62
120	181.950	181.860	99.95
140	212.275	213.560	100.60
		\bar{X}	100.39
		C.V	0.38 %

Intervalo de confianza para el % recuperado:

IC = [100.03 a 100.75]

Datos del análisis de regresión:

Pendiente, $m = 1.00499$

Ordenada al origen, $b = -0.13850$

Coefficiente de correlación, $r = 0.99993$

Intervalo de confianza para la pendiente, m :

IC_m = [0.9831 a 1.02683] , el intervalo incluye al 1.

Intervalo de confianza para la ordenada al origen, b :

IC_b = [-3.5785 a 3.3015], el intervalo incluye al 0.

CONCLUSION

El método es exacto para el intervalo de concentración estudiado. Se cumple con los criterios de aceptación establecidos.

PRECISION DEL METODO (REPRODUCIBILIDAD)

Criterio de aceptación: coeficiente de variación no mayor del 2.0 %.

La precisión del método se determinó, analizando seis muestras por dos químicos en dos días diferentes. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

TABLA No 7 PRECISION DEL METODO

	MUESTRA No.	% DE RECUPERACION	
		QUIMICO 1	QUIMICO 2
DIA 1	1	104.6	102.00
	2	104.2	104.66
	3	104.0	103.17
<hr/>			
DIA 2	4	103.4	103.87
	5	103.9	102.78
	6	103.9	102.04
		\bar{X}	103.56
		C.V	0.87 %

Además se realizó un análisis de varianza obteniéndose los siguientes resultados:

TABLA No. 8 ANALISIS DE VARIANZA DE NETOBIMIN

TABLA ANADEVVA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE	Fcal	FO.05
Analista	(2-1)=1	2.5025	2.5025	9.9761	38.51
Día	(2-1)2=2	0.5017	0.2508	0.3582	6.06
Error	(2*2) (3-1)=8	5.6031	0.7004		

CONCLUSION.

Los resultados en este experimento indican que el método es reproducible, con una desviación estándar menor del 2.0 %.

Y como se puede ver en la Tabla de ANADEVVA, la F calculada es menor que la F de tablas, no existen diferencias significativas entre analistas ni entre los diferentes días. El método analítico es reproducible entre analista y en distintos días por un mismo analista.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Criterio de aceptación: la diferencia no debe ser mayor del 2.0 % entre la medida de la muestra y la medida de la muestra inicial.

Para determinar la estabilidad de la muestra, se prepararon una serie de seis muestras del producto terminado. Se analizaron inicialmente y fueron almacenadas en refrigeración durante 3 días. En la siguiente tabla se muestran los resultados.

TABLA No.11 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

MUESTRA	ANALISIS INICIAL	ANALISIS/DESPUES DE 3 DIAS
1	106.45	106.43
2	106.22	106.70
3	102.00	102.42
4	104.66	104.57
5	103.66	102.79
6	104.64	104.60
\bar{X}	104.52	104.59
C.V	1.65	1.70 %

CONCLUSION

Las muestras son estables por lo menos 3 días después de su preparación, si son almacenadas en refrigeración.

A.- DETECCION Y CUANTIFICACION DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACION

La estimación del compuesto A fue determinada usando el sistema cromatográfico para el netobimín.

La linealidad del compuesto A se probó inyectando soluciones estándar en un intervalo de 3.96 mcg/ml a 59.40 mcg/ml; Correspondientes a 6.24 y 93.69 % de (w/w) en relación al netobimín. La concentración del estándar interno (butilparabeno), fue constante en todas las soluciones estándar.

TABLA No. 9 LINEARIDAD DE EL SISTEMA PARA EL COMPUESTO A

CONCENTRACION DEL COMP. A (mcg/ml)	RELACION DE AREAS (Comp. A/B)
3.96	0.02352
7.92*	0.04546
11.88	0.07002
15.84	0.08839
19.80	0.11857
27.72	0.16566
39.60	0.23841
59.40	0.35859

* Desde este punto la respuesta del compuesto A es lineal; esta es la cantidad mínima cuantificable.

Datos del análisis de regresión.

$$y = mx + b$$

Donde "y" es el área del pico del compuesto A y "x" es la concentración en mcg/ml del compuesto A.

b = 0.006105
m = -0.003858
r = 0.999830

Se hicieron más diluciones para encontrar el límite de detección del compuesto A y este fue aproximadamente de 0.5 mcg/ml, (en condiciones normales del ensayo). En la fig. 1n se muestra el cromatograma.

CONCLUSIONES

El coeficiente de correlación esta cercano a 1 puede asumirse que el modelo es lineal en el rango de concentración estudiado.

B.- CUANTIFICACION Y DETECCION DE EL COMPUESTO B

La cuantificación y la detección del compuesto B se determinó, usando el sistema cromatográfico propuesto para el netobimin.

La linealidad del compuesto B fue probada por inyección de soluciones estándar en un intervalo de 2.9 mcg/ml a 24.2 mcg/ml correspondiendo a 4.5 y 38.2 % de (w/w) en relación a netobimin. La concentración del estándar interno (butilparabeno) fue constante en todas las soluciones estándar.

La respuesta de el compuesto B fue lineal desde 9.69 mcg/ml.

TABLA No. 10 LINEARIDAD DE EL SISTEMA PARA EL COMPUESTO B

CONCENTRACION DEL COMP. B (mcg/ml)	RELACION DE AREAS (A/B)
2.907	**
3.876	**
4.845	**
6.783	**
9.690*	0.03618
14.535	0.06116
24.225	0.08444

* Desde este punto la respuesta de el compuesto B es lineal, este es el punto de cuantificación limite.

** Estos datos no son integrados en condiciones normales del ensayo.

Datos del análisis de regresión.

a = 0.00909

b = 0.00318

r = 0.97793

Límite de detección para el compuesto B, es aproximadamente 2.9 mcg/ml. En la fig. 1o se muestra el cromatograma.

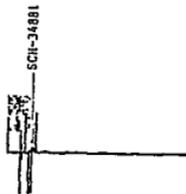


Fig. 1a LIMITE DE DETECCION DEL COMPUESTO A

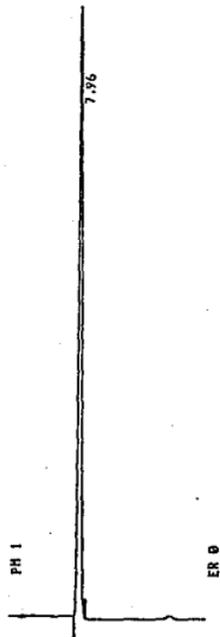


Fig. 1b LIMITE DE DETECCION DEL COMPUESTO B

3.2 DESARROLLO Y VALIDACION DEL METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR METILPARABENO Y PROPILPARABENO

Inicialmente se intentó cuantificar a los parabenos en el sistema desarrollado para el netobimin, pero al tenerse dentro de la formulación concentraciones muy diferentes (aproximadamente 100:1 de netobimin con respecto a los parabenos), no fue posible lograr una separación adecuada, ya que el pico del netobimin aparece en forma de barra y uno de los productos de degradación del netobimin impide la cuantificación del metilparabeno.

Después de realizar un estudio y diferentes pruebas se vio que lo más conveniente era realizar la separación por medio de extracciones con cloraformo antes de pasar al sistema cromatografico.

Al separar el netobimin de los parabenos se logró eliminar el producto de degradación, y se eligió el sistema cromatográfico más adecuado para cuantificarlos.

3.2.2 METODO DE TRABAJO

Para validar el método analítico para la cuantificación de metilparabeno y propilparabeno se siguió el mismo criterio que para el método del netobimán. La cuantificación también se hace por estandarización interna.

Factor de respuesta K

$$K = \frac{\text{Area St. An.} \cdot \text{Peso St. Int.}}{\text{Area St. Int.} \cdot \text{Peso St. An.}} \cdot \text{Factor de dilución}$$

Cuantificación de metil y propilparabeno.

$$\text{mg Activo/ml} = \frac{1}{K} \cdot \frac{\text{Area Activo}}{\text{Area St.Int.}} \cdot \frac{\text{Peso St.Int.}}{\text{Vol.Dil.St.Int.}} \cdot$$

$$\frac{\text{ml St. Int.}}{\text{Vol. Final}} \cdot \frac{\text{Vol. Final}}{\text{ml Mtra.}}$$

**3.2.3 METODO ANALITICO PARA LA CUANTIFICACION
DE METILPARABENO Y PROPILPARABENO**

SISTEMA CROMATOGRAFICO.

1. Instrumento: Cromatógrafo de líquidos.
2. Columna: uBondapak C₁₈ (acero inoxidable, de 15 cm *
3.9 mm de diámetro interno, empacada con octadecilsilano unida a microparticulas de cerámica o sílica de 5 a 10 micras de diámetro).
3. Detector: Ultravioleta a 254 nm.
4. Fase Móvil: MeOH/*ACNH₄ 0.065 M 50:50
5. Velocidad de flujo: 2 ml/min.
6. Velocidad de carta: 0.25 cm/min.
7. Volumen de inyección: 20 microlitros.
8. Estándar Interno: butilparabeno (50 mcg/ml).

* ACNH₄ = acetato de amonio.

METODO ANALITICO.

Reactivos y solución estándar.

1. Metanol.
2. Cloroformo.
3. Agua destilada.
4. Solución de estándar interno.

Pesar exactamente al rededor de 50 mg de estándar de butilparabeno y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 ml. Disolver y diluir al volumen con metanol.

5. Solución estándar de metilparabeno.

Pesar exactamente al rededor de 33 mg de estándar de metilparabeno cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 ml. Disolver y diluir al volumen con metanol.

6. Solución estándar de propilparabeno.

Pesar exactamente al rededor de 20 mg de estándar de propilparabeno y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 ml. Disolver y diluir al volumen con metanol.

7. Solución de referencia.

Transferir 5 ml de solución estándar de metilparabeno y 5 ml de solución estándar de propilparabeno, a un matraz volumétrico de 50 ml; adicionar 5 ml de solución de estándar interno. Diluir al volumen con metanol y mezclar.

Tratamiento de la muestra.

- 1.- Agitar la suspensión con magneto hasta homogenizar.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 2.- Tomar una alícuota de 5 ml de suspensión en un tubo de centrifuga de 50 ml, lavar la pipeta con 5 ml de agua y agregar los lavados al tubo centrifuga.
- 3.- Transferir 5 ml de solución de estándar interno al tubo, agregar 15 ml de cloroformo para extraer los parabenos.
- 4.- Tapar el tubo y agitar en vortex por 5 minutos, centrifugar 5 minutos a 3000 rpm.
- 5.- Separar la fase clorofórmica, (fase inferior), y depositarla en un matraz volumétrico de 100 ml, (pasar los extractos clorofórmicos a través de papel filtro No. 4 que contenga sulfato de sodio anhidro).
- 6.- Hacer dos extracciones más con 15 ml cada una de cloroformo, continuar igual que en la primera extracción.
- 7.- Evaporar los extractos clorofórmicos a T.A bajo corriente de nitrógeno hasta sequedad.
- 8.- Reconstituir con 50 ml de metanol.
- 9.- Filtrar a través de una membrana de 0.2 micras para solventes orgánicos e inyectar 20 microlitros en el cromatógrafo de líquidos.

TIEMPOS DE RETENCION APROXIMADOS

Metilparabeno	2.0 min.
Propilparabeno	5.2 min.
Butilparabeno	9.7 min.

3.2.4 VALIDACION DEL METODO ANALITICO PARA LA CUANTIFICACION DE METILPARABENO Y PROPILPARABENO

ESPECIFICIDAD DEL METODO

Para demostrar la especificidad del método para la cuantificación de los parabenos, El producto terminado los placebos de la suspensión se sometieron a 70 °C durante 14 días, con el fin de obtener los productos de degradación posibles. Posteriormente se analizaron las siguientes muestras:

- _ Solvente.
- _ Estándar de metilparabeno.
- _ Estándar de propilparabeno.
- _ Estándar de butilparabeno.
- _ Estándar de netobimin.
- _ Estándar del compuesto A (producto de degradación del netobimin).
- _ Estándar del compuesto B (producto de degradación del netobimin).
- _ Factor respuesta.
- _ Placebo de metilparabeno a T.A. sin estándar interno.
- _ Placebo de metilparabeno a 70 °C durante 14 días sin St. Int.
- _ Placebo de propilparabeno a T.A. sin estándar interno.
- _ Placebo de Propilparabeno a 70 °C durante 14 días sin St. Int.
- _ Placebo de metilparabeno y propilparabeno a T.A. sin St. Int.
- _ Placebo de metilparabeno y propilparabeno a 70 °C durante 14 días sin St. Int.

_Producto terminado a T.A. con estándar interno.

_Producto terminado a T.A. sin estándar interno.

_Producto terminado a 70 °C durante 14 días sin St. Int.

En las figuras 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g, 2h, 2i, 2j, 2k, 2l, 2m, 2n, 2o, 2p y 2q se muestran los cromatogramas obtenidos.

CONCLUSION

El método es específico para analizar metilparabeno y propilparabeno en las condiciones del ensayo, ya que se demuestra que no existen interferencias con los picos de interés.

CROMATOGRAMAS DE LA ESPECIFICIDAD DEL METODO
DE METILPARABENO Y PROPILPARABENO

83



Fig. 2a SOLVENTE

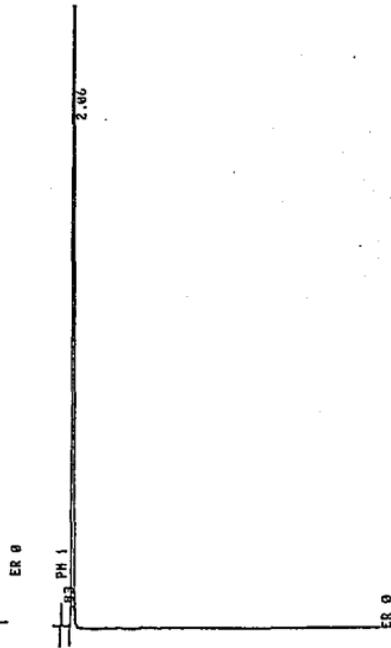


Fig. 2b ESTANDAR DE METILPARABENO

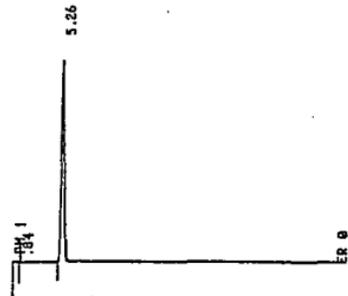


Fig. 2c ESTANDAR DE PROPILPARABENO

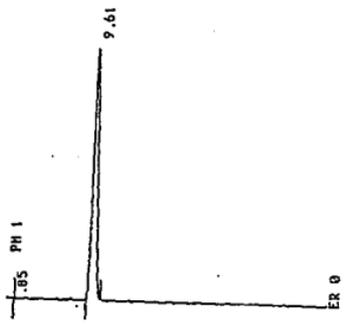


Fig. 2d ESTANDAR DE BUTILPARABENO

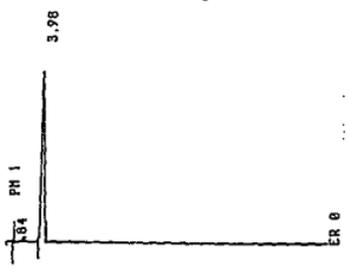


Fig. 2e ESTANDAR DE NETOBIMIN

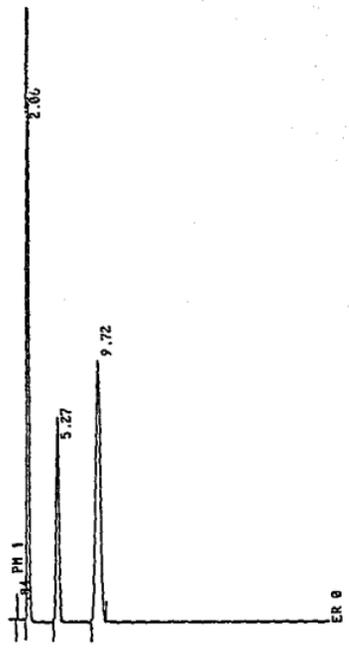


Fig. 2f FACTOR RESPUESTA

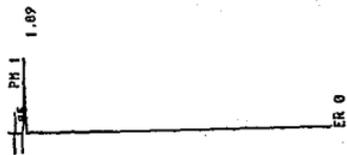


Fig. 2g ESTANDAR DEL COMPUESTO "A"

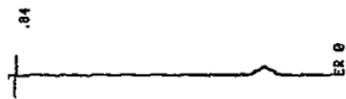


Fig. 2h ESTANDAR DEL COMPUESTO "B"

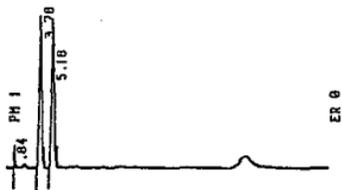


Fig. 21 PLACEBO DE METILPARABENO A T.A.
SIN ESTANDAR INTERNO

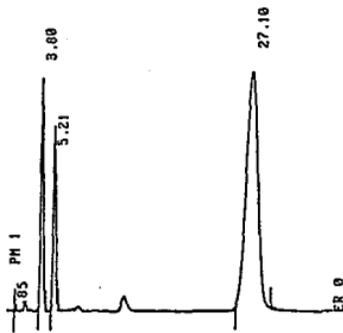


Fig. 2J PLACEBO DE METILPARABENO A 70°C
DURANTE 14 DIAS SIN St. Int.

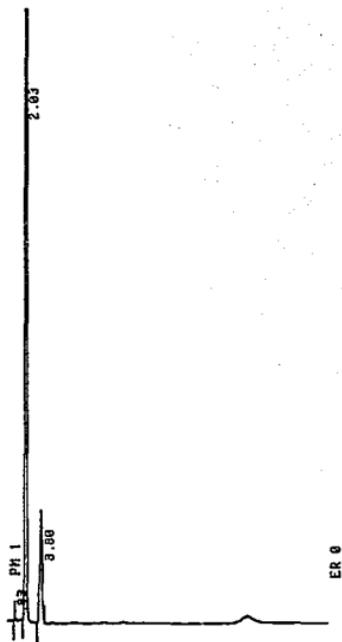


Fig. 2k PLACEBO DE PROPILPARABENO A T.A
SIN ESTANDAR INTERNO

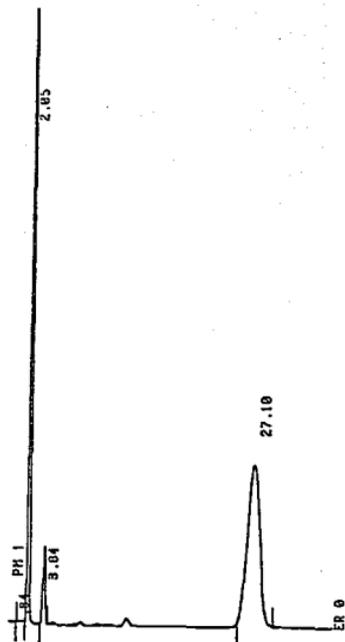


Fig. 2l PLACEBO DE PROPILPARABENO A 70°C
DURANTE 14 DIAS SIN St. Int.

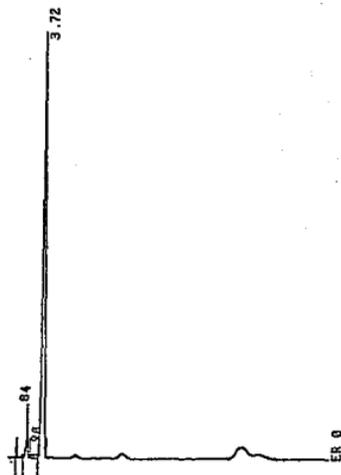


Fig. 2m PLACEBO DE METILPARABENO Y PROPILPARABENO
A T.A SIN ESTANDAR INTERNO



Fig. 2n PLACEBO DE METILPARABENO Y PROPILPARABENO
A 70°C DURANTE 14 DIAS S/St. Int.

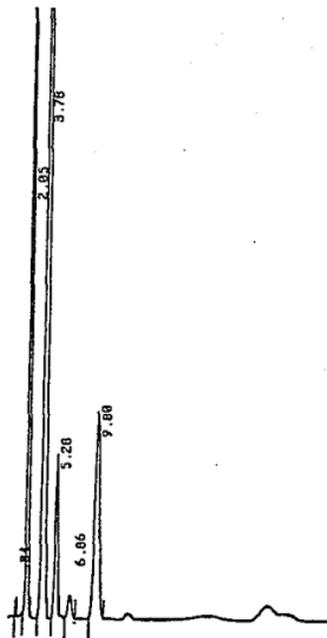


Fig. 2o PRODUCTO TERMINADO A T.A
CON ESTANDAR INTERNO

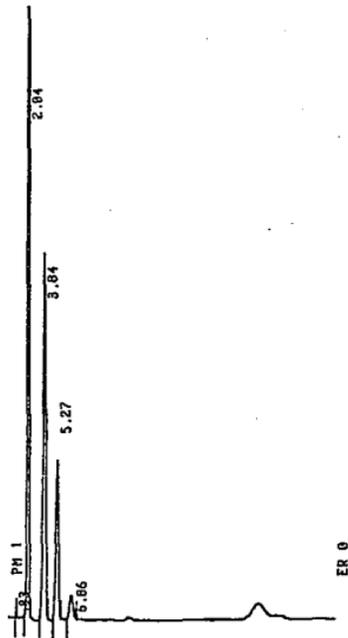


Fig. 2p PRODUCTO TERMINADO A T.A
SIN ESTANDAR INTERNO

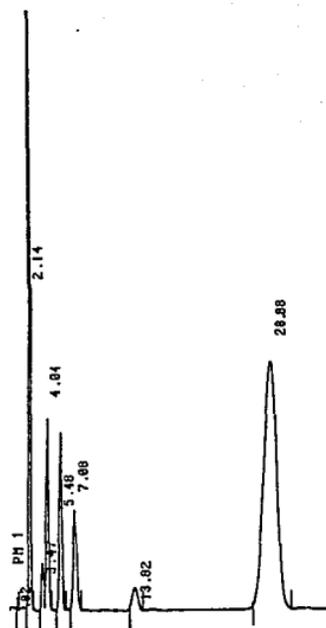


Fig. 2q PRODUCTO TERMINADO
A 70°C 14 DIAS S/ST. INT.

TOLERANCIA DEL SISTEMA

Criterio de aceptación: Factor de resolución mayor a 2 %.

La tolerancia del sistema se determinó variando el número de platos teóricos, la velocidad de flujo y la proporción de fase móvil; con la finalidad de observar el efecto de éstos cambios en el tiempo de retención y el factor de resolución entre excipiente (E) y metilparabeno (M), entre metilparabeno (M) y netobimin (N), entre netobimin (N) y propilparabeno (P), entre propilparabeno (P) y producto de degradación de Netobimin 1 (D1), entre 1 (D1) y butilparabeno (B) y entre butilparabeno (B) y producto de degradación 2 (D2).

Para este experimento se usó producto terminado almacenado a T.A. y ciclado de 70 a 5 °C por 48 hrs. durante 14 días.

Los resultados se muestran en las siguientes tablas.

TABLA No. 12 NUMERO DE PLATOS TEORICOS (NPT)

A. MUESTRAS A TEMPERATURA AMBIENTE (T.A).

NPT	TIEMPO DE RETENCION (MIN)						
	E	M	N	P	D1	B	D2
994	0.87	1.70	3.09	4.17	5.49	7.56	10.24
1732*	0.78	2.01	3.77	5.29	6.97	9.87	13.40
1948	0.77	2.00	3.95	5.29	7.04	9.87	12.10

E/M	FACTOR DE RESOLUCION				
	M/N	N/P	P/D1	D1/B	B/D2
3.19	3.05	2.27	2.57	3.15	3.27
6.00	3.80	2.69	2.50	3.36	3.71
6.13	4.73	2.69	2.38	3.66	3.62

B. MUESTRAS CICLADAS DE 70 A 5 °C/48 HRS, DURANTE 16 DIAS.

NPT	TIEMPO DE RETENCION (min)						
	E	M	N	P	D1	B	D2
989	0.87	1.71	3.04	4.14	5.43	7.46	10.11
1734*	0.78	2.01	3.77	5.26	6.94	9.82	13.42
1815	0.76	1.97	3.89	5.25	7.00	9.82	12.30

E/M	FACTOR DE RESOLUCION				
	M/N	N/P	P/D1	D1/B	B/D2
3.91	3.11	2.05	2.22	2.60	3.08
4.56	3.55	2.78	2.73	3.62	3.54
5.60	4.51	2.83	3.21	3.61	3.76

NPT. - Número de platos teóricos evaluado con butilparabeno.

TABLA No. 13 VELOCIDAD DE FLUJO

A. MUESTRAS A T.A.

ml/min	TIEMPO DE RETENCION (min)						
	E	M	N	P	D1	B	D2
1.5	1.06	2.69	5.03	5.97	9.09	12.89	17.57
2.0*	0.78	2.01	3.77	5.29	6.97	9.87	13.14
2.5	0.63	1.56	2.90	4.00	5.24	7.39	10.05

E/M	FACTOR DE RESOLUCION				
	M/N	N/P	P/D1	P/B	B/D2
5.67	3.98	2.83	2.62	3.56	3.92
6.00	3.80	2.69	2.50	3.36	3.71
4.65	3.25	2.38	2.26	2.93	4.29

B. MUESTRAS CICLADAS DE 70 A 5 °C/48 HRS, DURANTE 16 DIAS.

ml/min	TIEMPO DE RETENCION (min)						
	E	M	N	P	D1	B	D2
1.5	1.05	2.65	4.95	6.82	8.90	12.38	17.22
2.0*	0.78	2.01	3.77	5.26	6.94	9.82	13.42
2.5	0.63	1.59	2.95	4.05	5.32	7.54	10.26

FACTOR DE RESOLUCION					
E/M	M/N	N/P	P/D1	D1/B	B/D2
5.61	2.67	2.25	2.84	3.21	3.52
4.56	3.55	2.78	2.73	3.62	5.54
4.08	3.24	2.34	2.29	3.22	3.18

TABLA No. 14 PROPORCION DE FASE MOVIL

A. MUESTRAS A T.A.

A:B	TIEMPO DE RETENCION (min)						
	E	M	N	P	D1	B	D2
53:47	0.73	1.74	2.88	4.03	5.10	7.06	9.50
50:50*	0.78	2.01	3.77	5.29	6.97	9.87	13.14
47:53	0.84	2.40	5.23	7.02	9.52	13.87	19.00

FACTOR DE RESOLUCION					
E/M	M/N	N/P	P/D1	D1/B	B/D2
3.96	2.75	2.27	1.76	2.47	2.49
6.00	3.80	2.69	2.50	3.36	3.71
6.43	4.96	2.37	2.71	3.52	2.65

B. MUESTRAS CICLADAS DE 70 A 5 °C/48 HRS, DURANTE 16 DIAS.

A:B	TIEMPO DE RETENCION (min)						
	E	M	N	P	D1	B	D2
53:47	0.74	1.76	2.90	4.05	5.13	7.09	9.66
50:50*	0.78	2.01	3.77	5.26	6.94	9.82	13.42
47:53	0.83	2.40	4.19	7.02	9.50	13.83	18.90

E/M	FACTOR DE RESOLUCION				
	M/N	N/P	P/D1	D1/B	B/D2
4.08	2.89	2.11	1.71	2.50	2.54
4.56	3.55	2.78	2.73	3.62	5.54
5.02	2.83	3.64	2.65	3.48	2.82

A = metanol

B = Buffer

* Condiciones óptimas.

CONCLUSION

El método es tolerante a cambios en la velocidad de flujo de +/- 0.5 ml/min. y se pueden utilizar columnas con un mínimo de 989 platos teóricos. Por otra parte el método soló es tolerante a una disminución en la concentración de metanol en el intervalo estudiado, pero no a un aumento.

LINEARIDAD DEL SISTEMA

Criterio de aceptación: coeficiente de correlación no menor de 0.99.

La linealidad del sistema de metilparabeno y propilparabeno, se probó inyectando soluciones estándar en un intervalo de 60 al 140 % de la concentración propuesta para el ensayo. La concentración del estándar interno (butilparabeno), fue constante en todas las soluciones estándar.

Para determinar este parámetro se construyó una curva de calibración graficando respuesta medida contra concentración. Los resultados se presentan en las siguientes tablas.

TABLA No. 15 LINEARIDAD DEL SISTEMA DE METILPARABENO

% DE NIVEL ENSAYADO	CONC. DE METIL. (mg/ml)	RELACION DE AREAS M/B
60	0.07908	1.96284
80	0.10544	2.58054
100	0.13180	3.23219
120	0.15816	3.87955
140	0.18452	4.50173

TABLA No. 16 LINEARIDAD DEL SISTEMA DE PROPILPARABENO

% DE NIVEL ENSAYADO	CONC. DE PROPIL. (mg/ml)	RELACION DE AREAS P/B
60	0.01242	0.25958
80	0.01656	0.34808
100	0.02070	0.43803
120	0.02484	0.52534
140	0.02898	0.61655

Datos del análisis de regresión:

$$y = mx + b$$

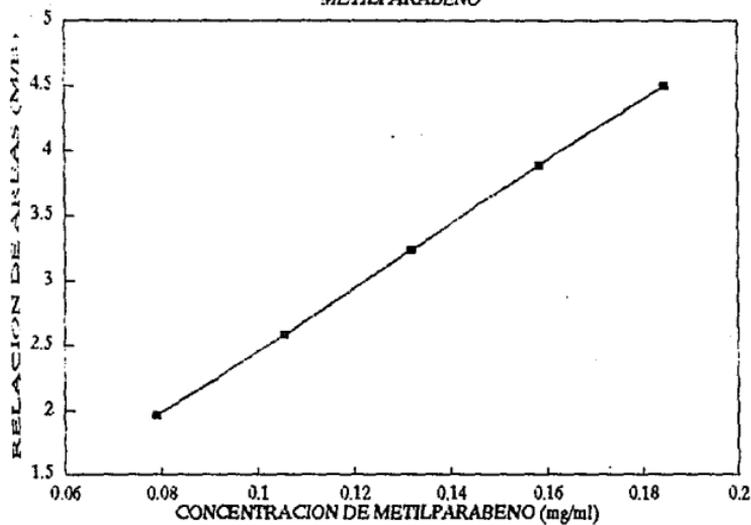
Donde "y" es el área del pico en el rango estudiado y "x" es la concentración de metilparabeno o propilparabeno en mg/ml.

	METILPARABENO	PROPILPARABENO
Pendiente, m =	24.19120	21.52657
Ordenada al origen, b =	0.04297	- 0.00808
Coefficiente de correlación, r =	0.99996	0.99998

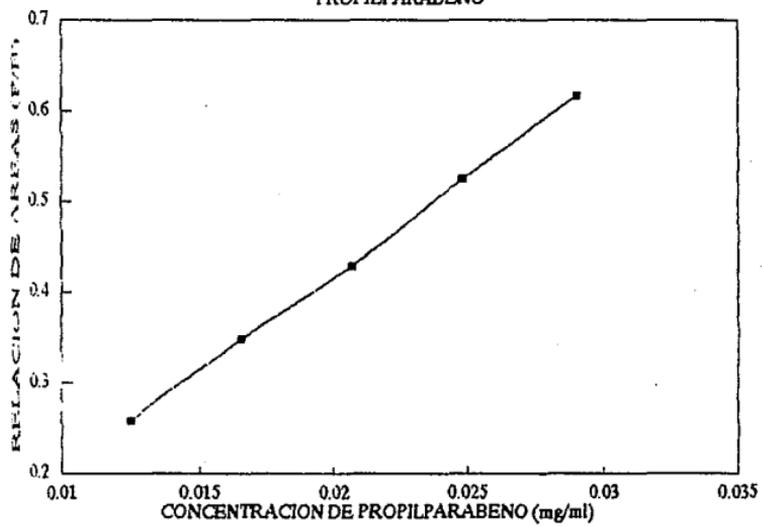
CONCLUSIONES

La respuesta del metilparabeno y propilparabeno es lineal en el intervalo de concentración estudiado, con lo que se cumple con el criterio de aceptación establecido.

LINEARIDAD DEL SISTEMA METILPARABENO



LINEARIDAD DEL SISTEMA PROPILPARABENO



PRECISION DEL SISTEMA

Criterio de aceptación: Coeficiente de variación menor o igual al 1.5 %.

La precisión del sistema fue probada obteniéndose la desviación estándar del factor respuesta (K), haciendo seis inyecciones de solución estándar al 100 %. Los resultados se presentan en la tabla No. 6.

TABLA No. 17 PRECISION DEL SISTEMA

INYECCION No.	FACTOR RESPUESTA (K) METILPARABENO	FACTOR RESPUESTA (K) PROPILPARABENO
1	1.23516	1.06679
2	1.24311	1.07258
3	1.23746	1.06737
4	1.23414	1.08594
5	1.23431	1.06866
6	1.24295	1.06559
\bar{X}	1.23786	1.07116
C.V	0.34 %	0.77 %

Donde Factor respuesta (K) es:

$$K = \frac{\text{Area del pico del activo}}{\text{Area del pico del St. Int.}} \cdot \frac{\text{Concentración del St. Int.}}{\text{Concentración del activo}}$$

CONCLUSION

Los coeficientes de variación para el factor respuesta del metilparabeno y del propilparabeno son menores al límite fijado. Se cumple con el criterio de aceptación establecido.

EXACTITUD DEL METODO

Criterio de aceptación: promedio de recobro de 98 a 102% y coeficiente de variación no mayor de 2.0 %. La recta obtenida deberá tener una pendiente significativamente igual a 1, la ordenada al origen significativamente igual a 0 y un coeficiente de correlación mayor de 0.99.

La exactitud de método de metilparabeno y propilparabeno se demostró adicionando estándares de éstos a una cantidad constante de placebo, para obtener las concentraciones de las sustancias de interés de 60, 80, 100, 120 y 140 % de lo etiquetado en el marbete. Se determinaron los porcentajes de recobro y se obtuvo la ecuación de la recta, graficando cantidad recuperada contra cantidad adicionada. Los resultados se muestran en las siguientes tablas.

TABLA No. 18 EXACTITUD DEL METODO PARA METILPARABENO

% DE NIVEL ENSAYADO	mg ADICIONADOS DE METILP.	mg RECUPERADOS DE METILP.	% DE RECUPER.
60	3.921	3.930	100.23
80	5.228	5.364	102.60
100	6.535	6.581	100.70
120	7.920	8.011	101.49
140	9.149	9.250	101.10
		\bar{X}	101.22
		C.V	0.89 %

Intervalo de confianza para el % recuperado;

IC = [100.36 a 102.08]

Datos del análisis de regresión:

Pendiente, $m = 1.01057$

Ordenada al origen, $b = 0.00735$

Coefficiente de correlación, $r = 0.99978$

Intervalo de confianza para la pendiente, m :

IC_m = [0.9713 a 1.0498], el intervalo incluye al 1.

Intervalo de confianza para la ordenada al origen, b :

IC_b = [-0.2600 a 0.2746], el intervalo incluye al 0.

TABLA No. 19 EXACTITUD DEL METODO PARA PROPILPARABENO

% DE NIVEL ENSAYADO	mg ADICIONADOS DE PROPILP.	mg RECUPERADOS DE PROPILP.	% DE RECUPER.
60	0.603	0.597	99.00
80	0.804	0.800	99.50
100	1.005	1.024	101.89
120	1.248	1.272	101.92
140	1.407	1.402	99.64
		\bar{X}	100.39
		C.V	1.40 %

Intervalo de confianza para el % recuperado:

IC = [99.05 a 101.73]

Datos del análisis de regresión:

Pendiente, $m = 1.01611$

Ordenada al origen, $b = - 0.01072$

Intervalo de confianza para la pendiente, m :

IC_m = [0.9389 a 1.0964] , el intervalo incluye al 1.

Intervalo de confianza para la ordenada al origen, b :

IC_b = [-0.0922 a 0.0707] , el intervalo incluye al 0.

CONCLUSION

El método para cuantificar metilparabeno y propilparabeno es exacto para el intervalo de concentración estudiado. Ya que cumple con los criterios de aceptación establecidos.

PRECISION DEL METODO (REPRODUCIBILIDAD)

Criterio de aceptación: Coeficiente de variación no mayor del 2.0 %.

La precisión del método se determinó analizando seis muestras de producto terminado dos químicos en dos días diferentes.

TABLA No. 20 PRECISION DEL METODO

	MUESTRA No.	% DE RECUPERACION DE METILPARABENO		% DE RECUPERACION DE PROPILPARABENO	
		QUIMICO 1	QUIMICO 2	QUIMICO 1	QUIMICO 2
DIA 1	1	97.34	96.80	100.86	99.05
	2	99.22	99.55	102.80	102.38
	3	95.54	97.33	99.73	101.79
DIA 2	4	96.46	94.84	101.80	100.23
	5	97.99	94.66	101.82	98.20
	6	97.64	93.85	101.82	102.00
		\bar{X}	96.77		101.04
		C.V	1.84 %		1.42 %

CONCLUSION

Los resultados en este experimento indican que el método es reproducible con una desviación estándar menor del 2.0 %.

Como se observa en las tablas de ANADEVA la F calculada es menor que la F de tablas. Por lo que se concluye que el método es reproducible, ya que no hay diferencias significativas entre analistas ni entre días.

TABLA No. 21 ANALISIS DE VARIANZA DE METILPARABENO**TABLA ANADEVVA**

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	Fcal	F0.05*
Analista	(2-1)=1	4.2722	4.2722	0.4820	38.51
Día	(2-1)2=2	17.7248	8.8624	5.5083	6.06
Error	(2*2) (3-1)=8	12.8710	1.6089		

TABLA No. 22 ANALISIS DE VARIANZA DE PROFILPARABENO**TABLA ANADEVVA**

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	Fcal	F0.05*
Analista	(2*)=1	2.2361	2.2361	2.2385	38.51
Día	(2-1)=2	1.9978	0.9989	0.4350	6.06
Error	(2*2) (3-1)=8	18.3682	2.2960		

* - Valores obtenidos en la tabla F de Fisher, localizando el cruce del valor de los grados de libertad del numerador horizontalmente, y el valor de los grados de libertad del denominador verticalmente, para una $\alpha = 0.05$.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Criterio de aceptación: La diferencia del resultado de el análisis inicial y el siguiente análisis no debe ser mayor al 2.0 %.

Para determinar la estabilidad de la muestra, se prepararon una serie de seis muestras del producto terminado, se analizaron inicialmente y se almacenaron en refrigeración reanalizandose cinco días después.

Los resultados se observan en las siguientes tablas:

TABLA No. 23 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PARA METILPARABENO

MUESTRA No.	ANALISIS INICIAL % DE MET.	5 DIAS EN REF. % DE MET.
1	99.34	99.67
2	99.22	100.98
3	95.54	97.46
4	96.46	95.62
5	96.80	97.26
6	97.33	98.02
\bar{X}	97.12	98.17
C.V	1.26 %	1.93 %

TABLA No. 24 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PARA PROPILPARABENO

MUESTRA No.	ANALISIS INICIAL % DE PROP.	5 DIAS EN REF. % DE PROP.
1	104.00	101.66
2	102.78	104.73
3	101.12	101.60
4	102.10	102.93
5	102.18	102.54
6	102.78	102.37
X	102.49	102.64
C.V	0.93 %	1.12 %

CONCLUSIONES

Con estos datos se concluye que es posible analizar las muestras por lo menos cinco días después de su preparación, si se guardan en refrigeración.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

4.1. CONCLUSIONES

Los dos métodos de análisis desarrollados por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, demostraron ser específicos; ya que en ninguno de ellos se detectan picos que interfieran con las sustancias de interés, ni con el estándar interno.

Además de que se simplificó y optimizó el método inicial que sirvió de base para el desarrollo de uno de los métodos presentados.

En los estudios de validación se demostró, que los dos métodos son precisos, exactos y reproducibles, y que pueden ser usados tanto en estudios de estabilidad, como en análisis rutinarios de control de calidad. Cumpliéndose así con el objetivo principal de este trabajo.

CAPITULO V

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación.
Validación de Métodos Analíticos.
Secretaría de Salud - Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos.
México, 1991.
- 2.- Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos,
5a Edición, Secretaría de Salud.
México, 1985.
- 3.- International Parasitology,
February 1987, Vol. 17 No. 2.
- 4.- Marriner, S.: Therapeutics in Practice, Anthelmintic Group,
The Veterinary Record, 1986.
- 5.- Martindale The Extra Pharmacopoeia,
27 th, ed. The Pharmaceutical Press, London
- 6.- Parasitología .
Edward K. Markell.
Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V.
México D.F. 1984.
- 7.- Parasitología Clínica.
Craig y Faust.
Salvat Editores, S.A.
Barcelona 1984.
- 8.- Parasitology Today: Vol. 6, No. 4, 1990.
- 9.- Probabilidad y Estadística,
Traducción de la primera edición en inglés de
Probability and Statistics.
Murray R. Spiegel.
Mc GRAW - HILL, México 1975.
- 10.- Quiroz, R. H, Herrera R. D., López A. M., Mendoza, G. P.,
Urrutia, D. C. Fioraz, H. O. : Efectividad de Netobimín contra Nematodos
Gastroentéricos en Bovinos. Tec. Pec. Mex. 52, 66-66 (1986).
- 11.- Remington Farmacia, traducción de la 17a edición de
Remington's Pharmaceutical Sciences.
Editorial Médica Panamericana.
Buenos Aires, 1987.
- 12.- Soulsby, E. J.: Parasitología y Enfermedades Parasitarias en Animales
Domésticos, 7a, Edición, Interamericana México 1987.
- 13.- The Merck Index, Tenth Edition.
Merck & Co., Inc.
Rahway, N. J., U.S.A., 1973.
- 14.- U.S.P. XXII.
- 15.- Willard, Hobart H.
Métodos Instrumentales de Análisis.
Cfa, Editorial Continental, S.A.
México, 1977.

- 16.- Waters Associates.
Operator's Manual. USA 1982. Waters. Associates.
- 17.- Watty B., Margarita.
Química Analítica.
Editorial Alhambra.
Madrid, 1974.
- 18.- Yost, R.W.
Practical Liquid Chromatography.- An Introduction.
Perkin Elmer, U.S.A 1988.
- 19.- Haber, Audrey et Al.
Estadística General.
Addison Wesley Interamericana.
México, 1986.