

2^o eje



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**DESARROLLO Y VALIDACION DEL METODO POR
CROMATOGRAFIA DE ALTA RESOLUCION PARA
DETERMINAR ALBENDAZOL EN SUSPENSION.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

BEATRIZ BALTAZAR MONTES DE OCA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. RAQUEL LOPEZ ARELLANO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1994



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA: desarrollo y validación del método por cromatografía de alta resolución para determinar albendazol en suspensión.

que presenta la pasante: Beatriz Baltazar Montes de Oca.
con número de cuenta: 8857337-5 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Biológica.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 24 de Marzo de 1991.

PRESIDENTE M.enC. Guadalupe Pérez Caballero

VOCAL Dra. Raquel López Arellano

SECRETARIO QFB. Elfa Granados Enriquez

PRIMER SUPLENTE QFB. José A. Graduño Rosas

SEGUNDO SUPLENTE QFB. Guadalupe Rebollier Barrera

DEDICATORIAS

A MIS PADRES GILBERTO BALTAZAR ZAVALA Y RAQUEL
MONTES DE OCA DE B. POR BRINDARME SU CARIÑO,
COMPRESION Y APOYO A LO LARGO DE TODA MI VIDA.
MUCHAS GRACIAS.

A MIS HERMANAS MA. EUGENIA, MA ELENA, CAROLINA
Y A MI HERMANO GILBERTO POR TOLERARME EN LOS
MOMENTOS MAS DIFICILES Y POR ALENTARME A SEGUIR
ADELANTE.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS DE LA FES-CUAUTITLAN,
POR SU AYUDA EN LOS MOMENTOS DE ADVERSIDAD Y
POR COMPARTIR TAMBIEN LOS DE ALEGRIA.

AGRADECIMIENTOS

A LA DRA. RAQUEL LOPEZ ARELLANO POR SU CONTINUA COLABORACION PARA MI DESARROLLO PROFESIONAL Y PARA LA REALIZACION DE LA TESIS.

AL PROFESOR EFREN HERNANDEZ B. POR BRINDARME SU CONFIANZA Y AYUDARME A SUPERARME CADA DIA MAS.

A TODOS LOS PROFESORES DE LA FES-CUAUTITLAN POR SU ARDUA LABOR Y POR HACER DE GRANDES TRIUNFADORES.

A LOS LABORATORIOS IMPORTADORA Y MANUFACTURERA BRULUART POR DARME LA OPORTUNIDAD DE REALIZAR ESTA TESIS Y TAMBIEN POR SU COLABORACION.

A RAYMUNDO GARDUÑO MONROY POR SU COLABORACION A LA IMPRESION DE LA MISMA.

"LOS PADRES PUEDEN SEMBRAR LA MAGIA EN LA MENTE
DE SUS HIJOS A TRAVES DE PALABRAS PRONUNCIADAS
EN TONO EMOCIONANTE CON CIERTA EXALTACION DEL
CORAZON Y DEL ESPIRITU "

HENRY

"HAZ LAS COSAS A LAS QUE MAS TEMES Y SIGUELAS
HACIENDO HASTA QUE YA NO LES TEMAS, ENTONCES
LLEGARAS A SER EL DUEÑO DE TU DESTINO."

WILLIAM

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL.....	1
INDICE DE TABLAS.....	3
INDICE DE FIGURAS.....	5
GLOSARIO.....	6
INTRODUCCION.....	7
OBJETIVOS.....	9
MARCO TEORICO	
3.0 ANTECEDENTES DEL ALBENDAZOL.....	10
4.0 DESARROLLO DE METODOS ANALITICOS.....	12
4.1 Propiedades físicas y químicas del analito.....	12
4.2 Concentración de analito en la muestra.....	12
4.3 Naturaleza de la matriz de la muestra.....	12
4.4 Pureza.....	14
4.5 Tipos de separación.....	14
4.6 Elección de la fase móvil.....	14
4.7 Tipo de detector.....	16
4.8 Ensayos exploratorios.....	16
4.9 Optimización de métodos.....	16
4.10 Cálculo de la concentración del analito.....	21
5.0 ANTECEDENTES DE LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA	
DE ALTA RESOLUCION.....	24
5.1 Definición de Cromatografía.....	24
5.2 Clasificación de la Cromatografía Líquida.....	25
5.3 Procesos de ensanchamiento de banda.....	28
5.4 Equipo de Cromatografía Líquida.....	30

6.0 ANTECEDENTES DE LA VALIDACION.....	40
6.1 Validación.....	40
6.2 Importancia de la validación.....	41
6.3 Cualidades de la validación.....	41
6.4 Categorías para la validación de métodos analíticos...	44

PARTE EXPERIMENTAL

7.0 DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	45
7.1 Material.....	45
7.2 Reactivos.....	45
7.3 Soluciones.....	45
7.4 Equipo.....	45
7.5 Definición del sistema preliminar.....	46
7.6 Optimización.....	47
7.7 Validación del método.....	54
8.0 RESULTADOS.....	56
9.0 ANALISIS DE RESULTADOS.....	63
10.0 CONCLUSIONES.....	78
11.0 APENDICES.....	79
12.0 BIBLIOGRAFIA.....	94

INDICE DE TABLAS

Tabla I	Selección sistemática de las variables.....	15
Tabla II	Requisitos para la validación de métodos analíticos..	44
Tabla III	Condiciones cromatográficas optimizadas.....	52
Tabla IV	Valores de áreas obtenidas para la linealidad del sistema.....	56
Tabla V	Áreas obtenidas de albendazol para precisión del sistema.....	57
Tabla VI	Porcentaje recuperado de placebos cargados de albendazol para el día 1.....	58
Tabla VII	Porcentaje recuperado de placebos cargados de albendazol para el día 2.....	59
Tabla VIII	Porcentajes de recobro de albendazol del día 1 y 2 para exactitud.....	60
Tabla IX	Porcentajes de recobro de albendazol para dos analistas en dos días diferentes.....	61
Tabla X	Datos obtenidos para especificidad del método.....	62
Tabla XI	Valores de coeficiente de variación para cada nivel de concentración.....	63
Tabla XII	Tratamiento estadístico para la linealidad del sistema.....	64
Tabla XIII	Análisis de variancia para evaluar la linealidad del sistema del día 1.....	65
Tabla XIV	Análisis de variancia para evaluar la linealidad del sistema del día	65
Tabla XV	Parámetros para evaluar la precisión del sistema....	68
Tabla XVI	Valores de coeficiente de variación para cada nivel de concentración de la linealidad del método...	69
Tabla XVII	Tratamiento estadístico para la linealidad del método.....	69
Tabla XVIII	Análisis de variancia para evaluar la linealidad del método del día 1.....	70
Tabla XIX	Análisis de variancia para evaluar la linealidad del método del día 2.....	71

Tabla XX	Resultados del tratamiento estadístico realizado a los datos de exactitud.....	74
Tabla XXI	Análisis de variancia para reproducibilidad del método de albendazol suspensión.....	75
Tabla XXII	Resultados obtenidos para evaluar la precisión del método validado.....	76
Tabla XXIII	Datos de porcentaje de error relativo para la linealidad del sistema.....	80
Tabla XXIV	Datos de porcentaje de error relativo para la precisión del sistema.....	81
Tabla XXV	Datos de porcentaje de error relativo para la linealidad del método.....	82
Tabla XXVI	Datos de porcentaje de error relativo para la exactitud del método.....	83
Tabla XXVII	Datos de porcentaje de error relativo para la reproducibilidad del método.....	83
Tabla XXVIII	Construcción de la tabla de análisis de variancia para la linealidad.....	85
Tabla XXIX	Matriz de tratamiento para reproducibilidad.....	90
Tabla XXX	Construcción de la tabla de análisis de variancia para reproducibilidad.....	91

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Pasos en el desarrollo de métodos por cromatografía líquida de alta resolución.....	13
FIGURA 2	Cromatograma tipo y algunos parámetros de medición frecuente.....	17
FIGURA 3	Representación de un pico asimétrico y las zonas de medición de asimetría.....	21
FIGURA 4	Ilustración gráfica de la cromatografía líquida en fase normal y en fase reversa.....	26
FIGURA 5	Gráfico de Van Deemter para una columna hipotética.....	29
FIGURA 6	Esquema funcional de un equipo general para cromatografía líquida.....	30
FIGURA 7	Esquema de un cabezal de bombeo de una boma alternante..	32
FIGURA 8	Esquema de una bomba jeringa.....	34
FIGURA 9	Esquema de un inyector cuando se emplea una jeringa.....	35
FIGURA 10	Válvula de inyección de guías y dos posiciones.....	36
FIGURA 11	Cromatograma obtenido en la definición del sistema preliminar.....	47
FIGURA 12	Cromatograma obtenido de la solución de 50 µg/ml de albendazol.....	49
FIGURA 13	Cromatograma obtenido de la muestra de albendazol en suspensión.....	50
FIGURA 14	Cromatograma con la modificación de la fase móvil.....	51
FIGURA 15	Diagrama de flujo del método optimizado.....	53
FIGURA 16	Cromatograma obtenido para especificidad.....	62
FIGURA 17	Gráfica de la linealidad del sistema del día 1 y 2.....	66
FIGURA 18	Gráfica del modelo determinado para la linealidad del sistema.....	67
FIGURA 19	Gráfica de % error relativo para precisión.....	68
FIGURA 20	Gráfica de la linealidad del método.....	72
FIGURA 21	Gráfica del modelo determinado para la linealidad del método.....	73
FIGURA 22	Gráfica del porcentaje de error relativo para exactitud.....	75
FIGURA 23	Gráfica de porcentaje de error relativo para reproducibilidad.....	77

GLOSARIO

CLAR	=	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
t_r	=	Tiempo de retención
b	=	Ordenada al origen o intercepto
r	=	Coefficiente de correlación
r^2	=	Coefficiente de determinación
CV	=	Coefficiente de variación
IC	=	Intervalo de confianza
Σ	=	Sumatoria
m	=	Pendiente de la recta
n	=	Número total de datos
t	=	Número de cantidades adicionadas
\bar{x}	=	Media aritmética
x	=	Dilución o cantidad adicionada
y	=	Propiedad medida o cantidad recuperada
S	=	Desviación estándar
Sx	=	Desviación estándar de x
Sy	=	Desviación estándar de y
t_{tab}	=	Valor de distribución t de Student
F	=	Valor de la distribución F de Fischer
g.l.	=	Grados de libertad
SC	=	Suma de cuadrados
MC	=	Media de cuadrados
LSIC	=	Límite superior del intervalo de confianza
LIIC	=	Límite inferior del intervalo de confianza
Conc.	=	Concentración
% de Alb.	=	Porcentaje de Albendazol
mg	=	Miligramos
μg	=	Microgramos
UV	=	Ultravioleta
FDA	=	Food Drug Administration

1. INTRODUCCION

El albendazol es un antihelmintico de amplio espectro, que ha demostrado ser efectivo contra trématodos, nemátodos y céstodos del ganado vacuno, ovino, caballar y porcino así como en gallinas, ratas y ratones. Es el único fármaco del grupo de los bencimidazoles eficaz en la eliminación de toda clase de parásitos en los rumiantes. (8,13,14,23,28,29,35,40)

El albendazol fué introducido a la medicina humana en 1979. Se ha realizado numerosos ensayos clínicos en todo el mundo para determinar la actividad del fármaco en helmintiasis humanas, así se encontró que es efectivo contra la parasitosis más frecuente en el humano (*Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichuria*, *ancylostoma*, *Enterobus vermicularis*, *Strongyloides stercolaris*, *Necator americanus*, *Hymenolepis nana*), así como el tratamiento de los quistes hidatídicos. (14,28,29,35,40)

En 1987, apareció en México un reporte de investigación clínica en 7 pacientes con diagnóstico de neurocisticercosis, los cuales fueron tratados con albendazol, se obtuvo un 86% de remisión total de los quistes, por lo que los autores concluyeron que el albendazol es altamente efectivo en parasitosis tisular. La baja incidencia de reacciones adversas, lo hace un candidato adecuado para el tratamiento de la neurocisticercosis parenquimatoso. (6,14)

Las formas de dosificación más usuales son tabletas y suspensión, las cuales se encuentran incluidas en el Cuadro Básico de Medicamentos del Sector Salud. (6)

En la literatura se reporta un método de cuantificación por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), fase normal para la presentación de suspensión, sin embargo, el método es complicado ya que requiere de varios pasos que consisten en ajuste de pH, extracciones, evaporación y disolución antes de su cuantificación. (37)

Se consideró importante desarrollar un método analítico para suspensión, que permita la cuantificación del principio activo con rapidez y a bajo costo, características importantes para un método de rutina.

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es una alternativa interesante para determinar albendazol en suspensión, ya que conjuga las características de especificidad (a través de la separación de los componentes de la muestra), con sensibilidad y precisión.

La modalidad cromatográfica que se propone en el presente trabajo es la de fase reversa, ya que es la más sencilla, los solventes son más económicos y de menos riesgo, los tiempos de equilibrio entre la columna y la fase móvil son menores y además el gradiente de elución no presenta dificultades.

Una vez desarrollado el método de análisis por CLAR, al igual que toda técnica analítica se optimizó y posteriormente se validó, es decir, se consideró las variables más importantes que afectaban al método para producir los mejores resultados y de ésta manera asegurar la calidad del producto en fabricación.

La validación de los métodos analíticos se especifica por medio de conceptos tales como exactitud, precisión, linealidad, especificidad, reproducibilidad y repetibilidad los cuales quedan descritos por medio de parámetros estadísticos y pruebas estadísticas que los definen. (1,2,9,20,30,33,39,41)

La primera parte del presente trabajo incluye conceptos generales para la comprensión del tema en estudio, la segunda parte comprende el desarrollo experimental, la validación del método analítico, análisis de resultados, y finalmente las conclusiones.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL:

Desarrollar, optimizar y validar por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) un método analítico para cuantificar albendazol en suspensión.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

- a) Diseñar el procedimiento analítico para cuantificar albendazol en suspensión.
- b) Identificar las principales fuentes de variación y optimizar el procedimiento de operación.
- c) Validar el método analítico a través de los siguientes criterios de confiabilidad: linealidad, precisión, exactitud y reproducibilidad.

MARCO
TEORICO

3. ANTECEDENTES DEL ALBENDAZOL.

3.1. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS.

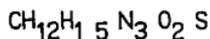
NOMBRES QUIMICOS. (7,27,)

Metil éster del ácido carbámico [5-(propiltio)-
1H-bencimidazol-2-ill];

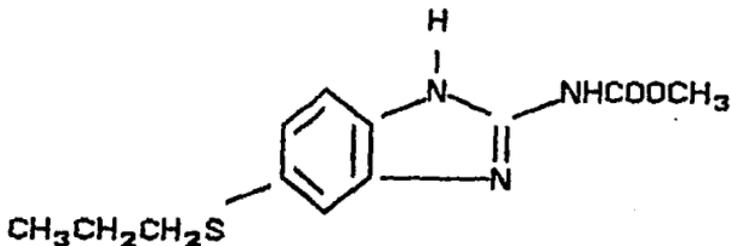
Metil 5-(propiltio)-2-bencimidazol carbamato;

Metil 5 (propilto)-2-carbometoxiamina bencimidazol.

FORMULA CONDENSADA (7,27)



FORMULA DESARROLLADA (7,27,37)



PESO MOLECULAR. (7, 27, 37)

265.33

SOLUBILIDAD. (7,27,37)

Prácticamente es insoluble en agua. Ligeramente soluble en cloroformo, acetato de etilo, metanol y en soluciones ácidas.

PUNTO DE FUSION. (7,27)

208-210°C

ESPECTRO ULTRAVIOLETA. (7)

En solución ácida a 292 nm ($A_1^1 = 370$ a)

PERDIDA POR SECADO. (37)

No más de 2 por ciento al secar durante 2 horas a 105°C.

EMPAQUE Y ALMACENAMIENTO. (37)

El albendazol se debe conservar en recipientes bien cerrados, para evitar la humedad.

3.2 CARACTERISTICAS DE LA SUSPENSION DE ALBENDAZOL.

DESCRIPCION. (37)

Suspensión homogénea, ligeramente rosa, libre de partículas extrañas y grumos. Después de 24 horas de reposo, puede presentar ligera sedimentación que al agitarse debe resuspenderse.

pH (37)

Debe encontrarse dentro del intervalo de 5.5 y 7.0.

VOLUMEN PROMEDIO.

20.0 ml y no más del 10%

COLOR DE LA SOLUCION. (37)

$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ a 450 nm, no más de 0.085.

LIMITES MICROBIANOS. (37)

La muestra no debe contener más de 100 colonias/ml de mesofílicos aerobios, no debe contener más de 10 colonias/ml de hongos y levaduras debe estar ausente de microorganismos patógenos.

4. DESARROLLO DE METODOS ANALITICOS.

El desarrollo de métodos es costoso y existe pérdida de tiempo, es conveniente emplear caminos sistemáticos, efectuando los ensayos en una dirección segura o al menos con buenas probabilidades de éxito. A continuación se describe un plan general sistemático para el desarrollo de un método por CLAR. (32,43)

4.1. PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DEL ANALITO.

El primer paso consiste en una investigación bibliográfica, fijar cuál es la meta perseguida y los límites de dichos objetivos.

El conocimiento de algunas de las características fisicoquímicas del analito es esencial en el diseño de métodos para la preparación de las muestras. Es conveniente conocer la estructura química, peso molecular, pK_a , solubilidad, espectros UV, concentración, de los componentes de interés, naturaleza de la matriz (suero, orina, tabletas). (32,43)

4.2. CONCENTRACION DE ANALITO EN LA MUESTRA.

Para analitos en altas concentraciones en general se requieren preparaciones de muestras sencillas como la solubilización y filtración. Analitos en bajas concentraciones requieren metodologías más elaboradas que involucren numerosas operaciones para lograr una solución de concentración adecuada para ser inyectada en el cromatógrafo. Además es necesario conocer el estado en el que se encuentra el analito en la muestra para poder diseñar un método apropiado de preparación. (1,32,43)

4.3. NATURALEZA EN LA MATRIZ DE LA MUESTRA.

La naturaleza de la muestra dicta el modo básico de preparar la solución a inyectar. La remoción de los componentes de la matriz puede ser un paso crítico en los casos donde la concentración de analito en la muestra se detecta con dificultad o no se detecta, cuando existen impurezas cuyos picos interfieren en el pico del analito en la muestra, o cuando existen sustancias que pueden dañar irreversiblemente los instrumentos o las columnas cromatográficas.

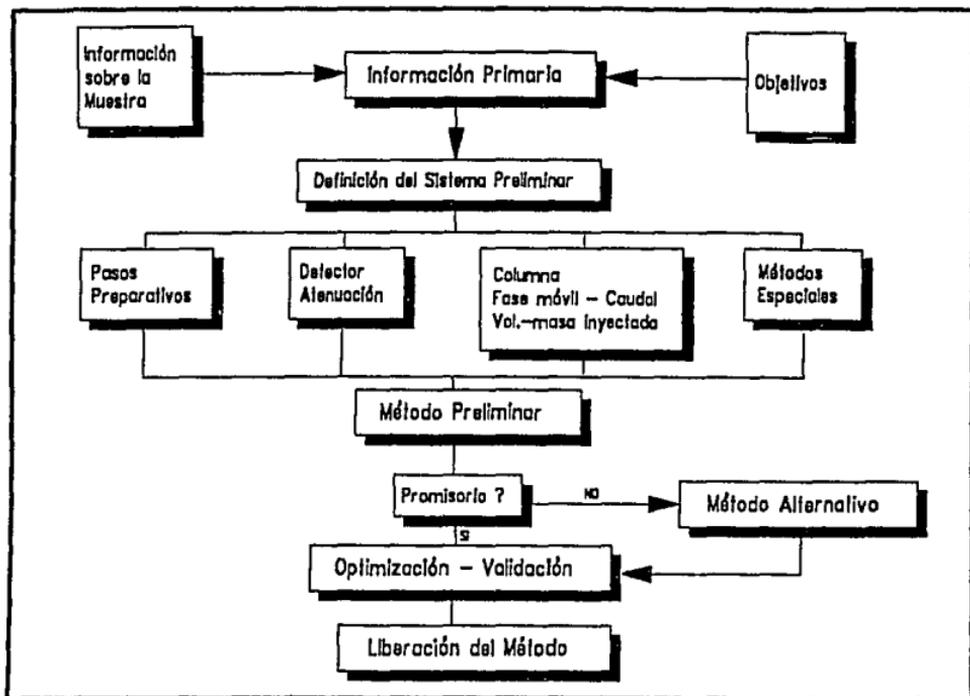


FIGURA 1. PASOS EN EL DESARROLLO DE METODOS POR CLAR. (32)

Tanto para el tratamiento previo de las muestras, como para posteriores pasos de purificación pueden utilizarse todas las operaciones conocidas de la química analítica como liofilización, evaporación, filtración, centrifugación, precipitación, extracción, solubilización, etc. (1,32,43)

4.4. PUREZA.

En cromatografía líquida es importante que tanto la disolución de la muestra como los disolventes de la fase móvil sean líquidos puros, libres de cualquier partícula sólida.

La fase móvil debe filtrarse y desgasificarse, los gases disueltos en la fase móvil pueden producir varios inconvenientes, entre ellos: liberación de burbujas en el cabezal de la bomba, liberación o formación de burbujas en la celda del detector, aumento en la línea de base de los detectores UV, etc. (1,32,43)

4.5. TIPOS DE SEPARACION.

La elección del tipo de operación y de las correspondientes fases estacionaria y móvil pueden efectuarse de manera sistemática, empezando con la investigación de las características de la muestra. En la tabla I se presenta un posible esquema a seguir para el establecimiento de un método de cromatografía líquida.

El pH de la fase móvil utilizada en los rellenos de fase enlazada o de gel de sílice debe ser inferior a 2 pero no superior a 7.5 ya que podrían destruirse los enlaces con la superficie del gel de sílice o incluso disolver el propio gel. (1,32,43)

4.6. ELECCION DE LA FASE MOVIL

Es necesario seleccionar los posibles disolventes a utilizar como fase móvil, en cromatografía líquida muchas separaciones requieren el uso de fase móviles de dos o más componentes. El tipo de cromatografía elegida y los detectores disponibles imponen ciertas condiciones en la selección de los líquidos que han de utilizarse en la composición de la fase móvil.

15

TABLA I. SELECCION SISTEMATICA DE LAS VARIABLES
DE UNA CROMATOGRAFIA LIQUIDA. (43)

MUESTRA		TIPO DE ANALISIS CROMATOGRAFICO		FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL
SOLUBILIDAD	POLARIDAD o ACIDEZ				
insoluble en agua	apolar	cromatografía de partición sobre fase enlazada;		fase enlazada C ₁₈	metanol, o bien agua/acetonitrilo (70:30)
		cromatografía en fase inversa		fase enlazada C ₈	agua/acetonitrilo (50:50)
	semipolar	cromatografía de adsorción		gel de sílice sin desactivar	n-heptano/cloroformo (95:5)
		cromatografía en fase normal		gel de sílice desactivado	
		polar	cromatografía de partición sobre fases enlazadas	fase inversa	fase enlazada C ₈
fase normal	fase enlazada CN			n-heptano/isopropanol (98:2)	
soluble en agua	básica	fuerte	cromatografía de intercambio iónico	intercambiador de cationes	Na ₂ HPO ₄ 0,01-0,1 M
		débil	cromatografía de partición sobre fase enlazada; cromatografía en fase inversa	fase enlazada C ₁₈	agua (con ácido hexanosulfónico 0,005M)/metanol
	ácida	fuerte	cromatografía de intercambio iónico	intercambiador de aniones	NaH ₂ PO ₄ 0,01-0,1 M
		débil	cromatografía de partición sobre fase enlazada; cromatografía en fase inversa	fase enlazada C ₁₈	agua/metanol (con hidróxido de tetrabutylamonio 0,005M)

En CLAR se requiere que la solución a inyectar sea compatible y miscible con la fase móvil. Es recomendable que el solvente de disolución de la muestra sea la misma fase móvil, o en su defecto, un solvente débil (por ejemplo agua, en fase reversa). (32,43)

4.7. TIPO DE DETECTOR.

La selección de la fase móvil también depende de algunas consideraciones relacionadas con el detector, como el intervalo espectral de transparencia del disolvente y la longitud de onda de máxima absorción del compuesto.

El detector de primera elección y el más empleado es el UV, por su simplicidad de uso, robustez y confiabilidad. Cuando no es posible su empleo porque el analito carece de grupos cromóforos o porque su respuesta es baja, es posible emplear otros detectores (índice de refracción, fluorescencia o electroquímicos), o bien emplear métodos de derivatización. (32,43)

4.8. ENSAYOS EXPLORATORIOS.

Los ensayos exploratorios permiten determinar en poco tiempo: a) si los compuestos de interés pueden detectarse a las concentraciones requeridas, b) si son retenidos, c) si se eluyen de la columna, y seleccionar la concentración de la fase móvil, o gradiente. (43)

4.9. OPTIMIZACION DE METODOS.

Una vez probado exitosamente un sistema (columna-solvente-parámetros instrumentales), se debe optimizar para mejorar al máximo la separación cromatográfica. El primer paso en el proceso de optimización es el ajuste de los parámetros cromatográficos: R , k' , N , α . Para la mejor comprensión de los parámetros anteriores es necesario definir algunos conceptos:

Cromatograma. El concepto actual corresponde, según International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), a un 'gráfico u otra representación de la respuesta del detector,

concentración del efluente u otra cantidad usada como una medida de la concentración del efluente, versus el volumen de efluente o tiempo'', el cromatograma se ilustra en la siguiente figura:

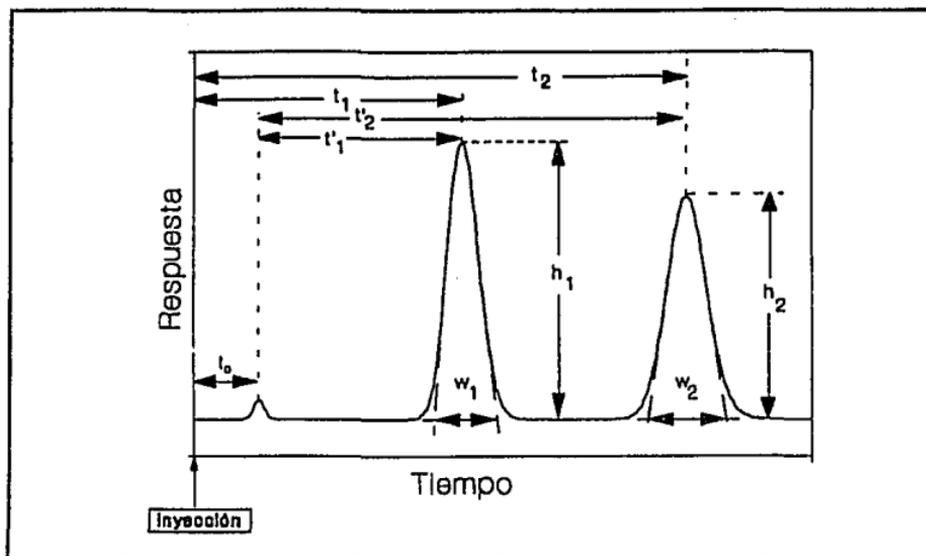


FIGURA 2. CROMATOGRAMA TIPO Y ALGUNOS PARAMETROS DE MEDICIÓN FRECUENTE. (32)

Volumen de elución. Es el volumen de fase móvil eluida entre la inyección y la elución de la concentración máxima del soluto. A caudal constante, el tiempo transcurrido entre dichos puntos corresponde al tiempo de elución o tiempo de retención.

Volumen muerto. Es el volumen total de solvente entre el punto de inyección y el de detección, exceptuando el correspondiente a las partículas de fase estacionaria.

Línea base. Es la porción del cromatograma donde sólo se aprecia la elución de la fase móvil, sin señal debida al soluto.

Tiempo de retención. Es el tiempo medido entre la inyección y la elución de la concentración máxima del soluto enésimo (máxima señal).

4.9.1 RESOLUCION.

El objetivo primario de la cromatografía es la separación de los componentes de una mezcla, y el grado de separación se mide por el parámetro de resolución. La resolución, se calcula por cada par de picos adyacentes como:

$$R = \frac{(t_2 - t_1)}{1/2(w_2 + w_1)}$$

w_1, w_2 = anchuras de los picos.

t_1, t_2 = tiempos de retención de los picos 2 y 1

La fórmula se basa en el gráfico del cromatograma y sólo indica que para mejorar la resolución, los picos deberán alejarse tanto como sea posible y que sus anchos de base deberán ser pequeños, sin mostrar como lograrlo es decir, sin exponer las variables que la gobiernan.

Un valor de $R_s = 1.5$ representa "separación hasta la línea base" de los dos picos, mientras $R_s = 1.0$ significa que la resolución es aproximadamente del 90%. (1, 10, 31, 32, 38, 43)

4.9.2 FACTOR DE CAPACIDAD (k')

Es el cociente entre el número de moles de soluto en la fase estacionaria y el número de moles de soluto en la fase móvil y está relacionado con el coeficiente de distribución entre ambas fases.

El factor de capacidad, k' , se calcula como:

$$k' = \frac{(t_n - t_0)}{t_0}$$

Siendo t_n el tiempo de retención del pico de interés y t_0 el tiempo del volumen muerto.

En la práctica, se debe obtener un valor de uno para el primer pico de interés, con el fin de asegurar su separación del disolvente y sus posibles impurezas, las cuales generalmente se eluyen a un tiempo igual, o muy próximo, a t_0 . Tampoco interesa tener picos con un valor de k superior a 10-15 porque en este caso el tiempo del análisis sería demasiado largo. (1, 10, 25, 32, 43)

4.9.3 NUMERO DE PLATOS TEORICOS (N)

El plato teórico se define como la zona de la fase estacionaria donde la concentración promedio de los solutos es igual a la concentración que se obtendría si existiera un equilibrio real. De una parte de la columna a otra existen diferentes concentraciones por lo que se habla de concentraciones promedio. (1, 10, 25, 32, 43)

La eficiencia aumenta al aumentar el valor de N , es decir, el número de platos teóricos N se calcula según:

$$N = 16 \left[\frac{t_n}{w_{tan}} \right]^2$$

Donde t_n es el tiempo de retención del pico enésimo y w_{tan} el ancho de pico, medido entre las tangentes a los puntos de inflexión y la línea de base.

El número de platos depende de la longitud de la columna: a mayor longitud de columna, mayor número de platos. En consecuencia se ha introducido otro término que relaciona el número de platos con la longitud de la columna, es la altura de plato o altura equivalente a un plato teórico, HEPT, cuya dimensión es la longitud:

$$h = \frac{L}{n}$$

4.9.4 FACTOR DE SEPARACION (α)

Es el cociente entre los factores de capacidad (k') de un par de picos. Si no existe separación, α es igual a la unidad y su valor aumenta cuando aumenta la separación.

El factor de separación α se calcula como el cociente de factores de capacidad de un par de picos determinados:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

El factor de separación de un sistema depende de la naturaleza de cada uno de sus componentes, fase móvil, columna y muestra, afinidad mutua y del modo en que interaccionan entre sí. (43)

4.9.5 ASIMETRIA

La asimetría (A_s , tailing) es una de las formas más comunes de alejamiento de la curva gaussiana y su medición es importante puesto que puede llevar, de acuerdo a su magnitud, a errores considerables de cuantificación, e incluso a oscurecer picos adyacentes.

$$A_{s,10\%} = \frac{b}{a}$$

Donde a y b son las medidas entre la línea que une al máximo del pico con la línea de base y los extremos anterior y posterior del pico, tomados al 10% de su altura.

El ensanchamiento de la base del pico es responsable de las separaciones deficientes, mientras la dificultad de integración por la no definición de los límites del pico es responsable de la baja precisión de cuantificación. En general no debe aceptarse un método que presente picos con asimetría superior a 1.5 tomado al 10% de altura o 2.0 tomado al 5% de altura. (1,32,43)

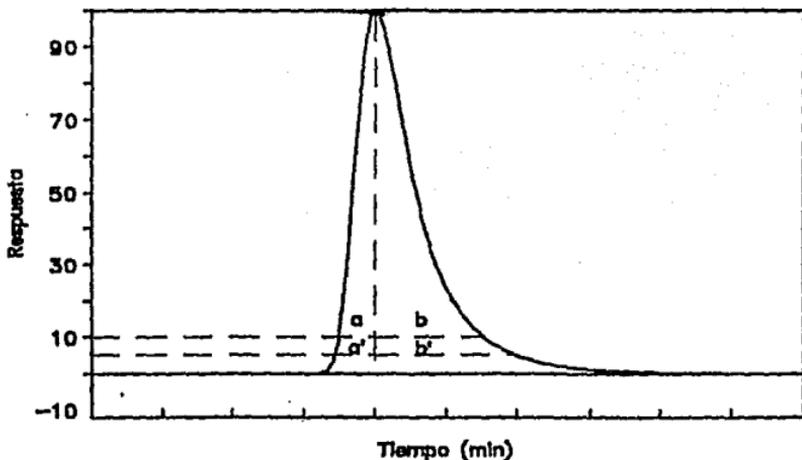


FIGURA 3. REPRESENTACION DE UN PICO ASIMETRICO Y LAS ZONAS DE MEDICION DE ASIMETRIA. (32)

4.10. CALCULO DE LA CONCENTRACION DE ANALITO.

La concentración de analito en la muestra se puede calcular por diferentes métodos: estandarización interna, estándar externo, estándar interno, estándar agregado.

La selección del método más adecuado depende del tipo de muestra, del nivel de precisión requerido y de la existencia o no de sustancias de referencia. (32)

4.10.1 ESTANDAR EXTERNO.

El estándar externo es el método de cuantificación más utilizado en CLAR. Consiste en la preparación de estándares de concentración semejante al analito en la muestra y en el ensayo cromatográfico de ambas, muestra y estándar, en las mismas condiciones operativas. La concentración de analito en la mezcla se

determina comparando el área del pico en cuestión con el área correspondiente al estándar de referencia. Es decir:

$$P = \frac{A_m C_s}{A_s} D 100$$

Donde P es el porcentaje de analito en la muestra, A_m y A_s son las áreas de la muestra y el estándar respectivamente, C_s es la concentración del estándar y D es un factor de dilución.

Este método requiere, obviamente, la utilización de un estándar de referencia y su exactitud dependerá ampliamente de la calidad del estándar utilizado. La precisión de los datos que se obtienen depende tanto de la preparación de la muestra y el estándar como de la inyección de ambos, ya que utilizando esta modalidad de trabajo, ninguna de las dos operaciones se compensa. Para mejorar la precisión de esta metodología se suele realizar varias inyecciones, típicamente 3 inyecciones de estándar y dos inyecciones de cada muestra. Además para evitar la falta de precisión originada en las variaciones ambientales se pueden correr alternativamente muestra y estándar o intercalar estándares después de un grupo de unas 5 ó 6 muestras. Para obtener resultados cuantitativos válidos es necesario que el método sea lineal y proporcional. (32)

4.10.2 NORMALIZACION INTERNA.

Consiste en referir el contenido del analito al total de áreas en el cromatograma. Para ello se suman las áreas de todos los picos presentes (exceptuando al pico que corresponda al solvente) y el contenido de analito en la muestra se calcula según:

$$P_i = \frac{A_i}{\sum A_i} 100$$

Donde P_i es el porcentaje del componente i en la mezcla, A_i es el área del componente i y $\sum A_i$ es la sumatoria de todas las áreas del cromatograma.

Este método tiene, fundamentalmente, dos ventajas: no requiere estándar de referencia y es muy preciso ya que los errores de inyección y de preparación de la muestra se compensan. (32)

4.10.3 ESTANDAR INTERNO.

Este método consiste en agregar cantidades exactamente medidas de una sustancia así denominada, tanto a la muestra como a un estándar que contiene al analito, preparado con la misma concentración que la muestra.

Para determinar la concentración de analito en la muestra se calcula la relación de áreas de analito a estándar interno tanto en la muestra y como en el estándar y se efectúa el cociente entre ambas:

$$P = \frac{R_m C_s}{R_s} D 100$$

Donde P es el porcentaje de analito en la muestra, R_m y R_s son las relaciones de área de analito a estándar interno en la muestra y el estándar respectivamente, C_s es la concentración del estándar y D es un factor de dilución.

Este método requiere de patrones de referencia, al igual que el método del estándar externo, por lo cual su exactitud dependerá de la pureza de los mismos. Además requiere del uso de otra sustancia, el estándar interno, cuya pureza no tiene que ser tan controlada como la del patrón de referencia. (32)

4.10.4 ESTANDAR AGREGADO.

Consiste en inyectar dos muestras para realizar un análisis, una de ellas es la muestra tal cual y la otra es la muestra a la que se le agrega una cantidad conocida de estándar de referencia. Esta segunda muestra se utiliza como estándar. La concentración del analito en la muestra se calcula de la siguiente manera:

$$P = \frac{A_m C_s}{A_{ms} - A_m} D 100$$

Donde P es el porcentaje de analito en la muestra, A_m y A_{ms} son las áreas del analito en la muestra tal cual y la muestra a la que se le ha agregado estándar respectivamente, C_s es la concentración del estándar y D es un factor de dilución. (32)

5. ANTECEDENTES DE LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION.

5.1. DEFINICION DE CROMATOGRAFIA.

CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR) HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución ha tenido una creciente difusión desde comienzos de la década de los 70's, y hoy representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio analítico moderno, ya sea éste dedicado a la investigación básica o aplicada, industrial, biológico o bromatológico. (32)

Esta técnica fué desarrollada por el botánico ruso M. S. Tswett para la separación y aislamiento de los pigmentos de las plantas. El eligió el nombre de las palabras griegas que significan 'escritura en color', refiriéndose a las bandas de las diferentes sustancias coloreadas que logró separar, hizo hincapié en que la técnica no queda restringida a la separación de sustancias coloreadas. (10,43)

Keulemans definió a la cromatografía "como un método físico de separación, en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de ellas está constituida por un lecho estacionario de gran área superficial y la otra es un fluido que percola a través del lecho estacionario". (25)

Se utiliza "lecho estacionario" como término general para denominar cualquiera de las diferentes formas en que puede usarse la fase estacionaria, que pueda estar empaquetada en una columna, extendida en forma de capa, etc. La cromatografía líquida puede desarrollarse en diferentes sistemas, en función de la forma física de la fase estacionaria. (25,43)

El aspecto simple más importante del proceso cromatográfico es la distribución en el equilibrio de los diversos componentes de la muestra entre la fase estacionaria y móvil.

En la cromatografía en columna, la fase móvil puede ser un líquido o un gas, y a esta cromatografía se denominan cromatografía de líquidos respectivamente. (10)

La moderna cromatografía líquida, comparada con la clásica, se caracteriza por (43):

- Columnas reutilizables de pequeño diámetro (2-5 mm);
- Rellenos de columna de partículas muy pequeñas (5-50 μm), y desarrollo de nuevos materiales para usarlos como fase estacionaria;
- Presiones de entrada relativamente altas y flujo controlado de la fase móvil;
- Introducción precisa de la muestra, sin necesidad de grandes cantidades (1-100 microlitros);
- Detectores continuos especiales, capaces de operar a caudales muy bajos y de detectar cantidades muy pequeñas;
- Análisis rápidos y alta resolución.

5.2. CLASIFICACION DE LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA.

5.2.1 CLASIFICACION SEGUN LA NATURALEZA DE LA FASE ESTACIONARIA Y LOS PROCESOS DE SEPARACION. (32,43)

5.2.1.1 Cromatografía de adsorción.

La fase estacionaria es un adsorbente y la separación se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción.

5.2.1.2 Cromatografía de partición.

La separación no se basa en la adsorción, sino en una verdadera partición entre la fase móvil y la fase estacionaria.

5.2.1.3 Cromatografía de intercambio iónico.

El lecho estacionario tiene una superficie cargada iónicamente, con carga contraria a la de la muestra. Esta técnica se usa casi exclusivamente con muestras iónicas o ionizables. Cuanto mayor sea la carga de la muestra, más fuertemente será atraída hacia la superficie iónica y, por tanto, más tiempo tardará en ser eluida. La fase móvil es un tampón acuoso, en el que el pH y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de elución.

5.2.1.4 Cromatografía de exclusión molecular.

Se rellena la columna con un material que posea poros de dimensiones comprendidas entre ciertos límites, con lo que la muestra es retenida o filtrada según sea su tamaño molecular. Por razones fundamentalmente históricas, esta técnica se llama también

filtración sobre geles o cromatografía sobre geles, aunque en la actualidad la fase estacionaria no queda restringida a un gel.

5.2.2. CLASIFICACION DE ACUERDO A LA POLARIDAD RELATIVA DE LA FASE ESTACIONARIA Y DE LA FASE MOVIL. (32, 43)

5.2.2.1 Cromatografía en fase normal.

El lecho estacionario es de naturaleza fuertemente polar (p. ej. sílice) y la fase móvil es apolar (p. ej. n-hexano o tetrahidrofurano). Las muestras polares quedan retenidas en la columna durante tiempos mayores que los materiales menos polares o apolares.

5.2.2.2 Cromatografía en fase reversa.

El lecho estacionario es de naturaleza apolar (hidrocarburo), mientras la fase móvil es un líquido polar, normalmente agua o un alcohol. En este caso, cuanto más apolar sea la muestra, mayor será su retención. La cromatografía en fase reversa en la actualidad es el tipo de cromatografía más utilizado.

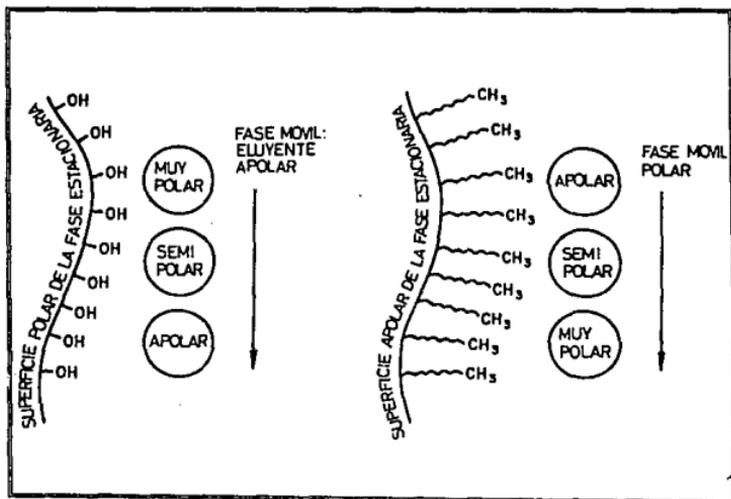


FIGURA 4. ILUSTRACION GRAFICA DE LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA EN LIQUIDA EN FASE NORMAL Y EN FASE REVERSA. LOS CIRCULOS REPRESENTAN LOS TIPOS DE COMPUESTOS PRESENTES EN LA MUESTRA Y SU POSICION RELATIVA EN LA DIRECCION DEL FLUJO DE LA FASE MOVIL INDICADA SU ORDEN DE ELUCION. (43)

A. MECANISMO DE RETENCION.

No se comprende totalmente el mecanismo de retención en fase reversa. Sin embargo se ha sugerido que el modo de interacción entre el soluto y la fase ligada puede ser de tres tipos, partición, del soluto entre la fase móvil y una fase estacionaria líquida, adsorción, sobre una fase estacionaria sólida, o bien un proceso mixto partición-adsorción.

La hipótesis de partición puede tener algún sustento en el caso de materiales poliméricos, es poco probable en los monoméricos, los de mayor difusión. Es claro que una capa monomolecular no puede comportarse como un líquido.

En cromatografía de fase reversa (RPLC), la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es muy polar (en general mezcla de agua y un modificador orgánico, Metanol, Acetonitrilo, etc.). Como el material de relleno de la columna es no polar, las únicas fuerzas de interacción posibles deberían ser las de Van der Waals, descartándose la priori otras interacciones, por ejemplo, puentes de hidrógeno, formación de complejos, etc. Sin embargo, las fuerzas de Van der Waals no bastan por sí mismas para justificar la retención observada.

La teoría solvofóbica de Horvath es probablemente la de mayor aceptación. Según ésta, la fuerza de retención en fase inversa se debe al aumento de entropía que acompaña a la transferencia del soluto de la fase móvil (polar) a la fase estacionaria (no polar). Dicho de otro modo, la interacción entre moléculas de soluto y de solventes es mucho más débil que la interacción de las moléculas de solvente entre sí. Como consecuencia, el soluto es expulsado de la fase móvil y forzado a penetrar en la fase estacionaria, que actúa como receptor pasivo.

B. VENTAJAS DE LA CROMATOGRAFIA EN FASE REVERSA.

Las ventajas pueden resumirse así:

- a). Compuestos no iónicos, iónicos e ionizables pueden ser separados en la misma columna, con la misma fase móvil.
- b). La fuerza de atracción superficie no polar-soluto es débil.
- c). La adsorción irreversible, frecuente en sílica gel, raramente ocurre.

- d). La fase móvil predominante es agua, abundante y económica.
- e). El modificador orgánico predominante, metanol, es asequible en calidad y precios adecuados.
- f). El orden de elución es predecible, en función de la hidrofobicidad del analito.
- g). Se necesita poco tiempo para el equilibrio del sistema luego de un cambio de fase móvil.

5.3. PROCESOS DE ENSANCHAMIENTO DE BANDA.

La eficiencia de una columna se mide por su número de platos teóricos (N), o bien, por la altura equivalente a un plato teórico (HEPT o H).

La primer ecuación de HEPT fué postulada por Van Deemter, describiendo el proceso de ensanchamiento de banda dentro de una columna cromatográfica: por un proceso multipaso, difusión longitudinal, resistencia a la transferencia de masa en la fase móvil, y resistencia a la transferencia de masa en la fase estacionaria. (10,25,32)

5.3.1 PROCESO MULTIPASO (A)

En una columna rellena con partículas de la fase estacionaria, el soluto encontrará diversos caminos, los cuales será impulsado a recorrer por la fase móvil. En un trayecto finito, algunas moléculas seguirán caminos directos y otras, encontrando partículas en su paso, serán obligadas a seguir caminos más tortuosos, retrasándose respecto de las primeras. (10,25,32)

5.3.2 DIFUSION LONGITUDINAL (B/v)

Si un soluto se abandona en un líquido (la fase móvil), sus moléculas permanecerán inmóviles sino que difundirán en todas direcciones hasta que su concentración sea uniforme en todo el seno del líquido. (10,25,32)

5.3.3 RESISTENCIA A LA TRANSFERENCIA DE MASA EN

LA FASE MOVIL (C/v).

Las moléculas de soluto más favorables a la interacción con la fase estacionaria son las más cercanas a ésta, mientras que

las más alejadas demorarán más tiempo para que esta interacción tenga lugar. Como la fase móvil está en movimiento, las moléculas más alejadas de la partícula habrán viajado un determinado trayecto antes de que sean retenidas por la fase estacionaria, lo que resultará una dispersión de la banda inicial. (10,25,32)

5.3.4 RESISTENCIA A LA TRANSFERENCIA DE MASA EN LA FASE ESTACIONARIA (C/v).

Las moléculas de soluto se retienen en la fase estacionaria y son luego devueltas a la fase móvil en un tiempo finito. Las moléculas de soluto próximas a la superficie serán devueltas a la fase móvil más rápidamente que las moléculas que difundieron profundamente, lo que dará lugar a un ensanchamiento de la banda original.

La combinación de los cuatro efectos descritos da lugar a la expresión final de la ecuación de Van Deemter que agupada en función de la velocidad lineal resulta:

$$H = A + \frac{B}{v} + C v$$

En la figura 5 se puede deducir que existe una velocidad lineal a la cual la HEPT es mínima, es decir, la eficiencia es máxima. Caudales menores favorecen la difusión longitudinal y caudales mayores dificultan los procesos de transferencia de masa. En el gráfico el trazado grueso corresponde a la suma de las contribuciones individuales al ensanchamiento de banda. (10, 25,32)

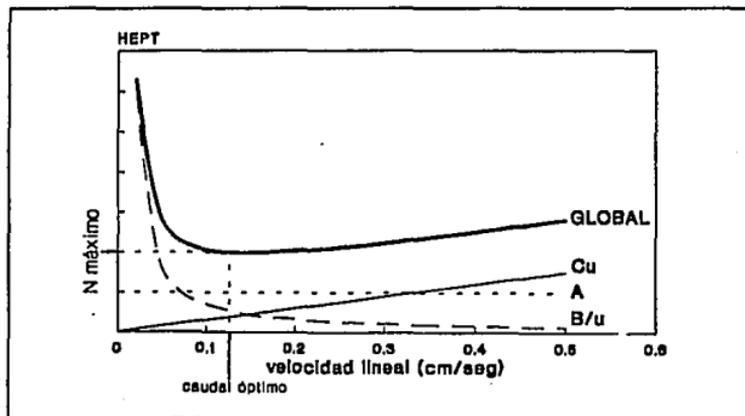


FIGURA 5. GRAFICO DE VAN DEEMTER PARA UNA COLUMNA HIPOTETICA (32)

5.4. EQUIPO DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA.

En la figura 6 se muestra el esquema funcional de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución. (43)

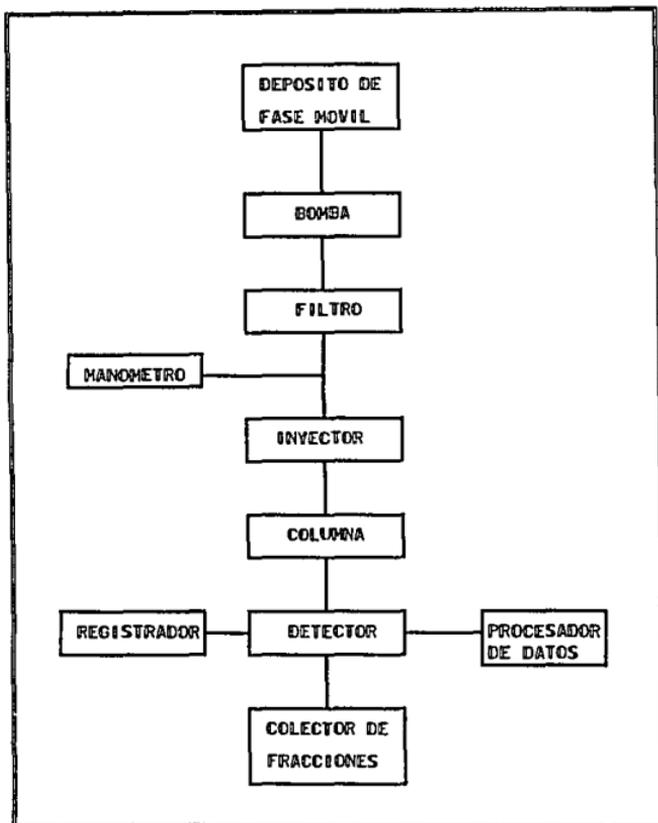


FIGURA 6. ESQUEMA FUNCIONAL DE UN EQUIPO GENERAL PARA DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA (43)

5.4.1. SISTEMA DE BOMBEO DE SOLVENTES.

Las bombas de CLAR impulsan la fase móvil proveniente del reservorio hacia el inyector, y posteriormente a la columna. (4,32,43)

5.4.1.1 CARACTERISTICAS DE LAS BOMBAS.

1. CAUDAL.

Los equipos convencionales operan con caudales entre 0.1 y 10 ml/min y trabajan con presiones de hasta 6000 psi. Las bombas que se utilizan con columnas microbore operan en el rango de 0.01 a 0.5 ml/min. (4,32,43)

2. EXACTITUD EN EL CAUDAL.

La importancia de la exactitud reside en la determinación de los tiempos de retención de las sustancias a cuantificar, parámetro que no es importante en muchos casos. (4,32)

3. RUIDO.

Este parámetro es de importancia para asegurar resultados cuantitativamente válidos debido a que las áreas de los picos de CLAR varían cuando varía el caudal del solvente. (32)

4. DERIVA.

Es un cambio continuo (positivo o negativo) en la entrega del solvente que se produce en intervalos de tiempo muy largos (típicamente durante horas). (32)

5. SISTEMA DE CORTE.

El sistema de corte evita que excesos en la presión del sistema cromatográfico puedan dañar los componentes más sensibles como columnas y celda de los detectores. Permite detectar las posibles pérdidas de solvente o la incorporación de burbujas de aire al agotarse la fase móvil. (32)

5.4.1.2 BOMBA DE PRESION CONSTANTE. (4,32,43)

Las principales ventajas de la mayoría de las bombas de presión constante son:

- a). Simplicidad y ausencia de pulsaciones, que da lugar a líneas de base suave.
- b). Las más sencillas normalmente son baratas, fáciles de operar y necesitan escaso mantenimiento.

Las desventajas de las bombas de presión constante son:

- a). El caudal debe controlarse con cuidado y constantemente, principalmente al cambiar la viscosidad del disolvente a causa de cambios en la temperatura, o bien cuando se acumulan en la columna componentes de la muestra no disueltos o partículas desprendidas del material del septum, así como al sedimentarse el relleno de la

columna o al inyectar muestras disueltas en matrices viscosas. (42)

b). Los cambios de caudal pueden influir tanto en los análisis cualitativos como en los cuantitativos.

5.4.1.3 BOMBA ALTERNANTE. (4,32,43)

La bomba alternante más importante es la de pistón único, cuyo esquema se presenta en la figura 7.

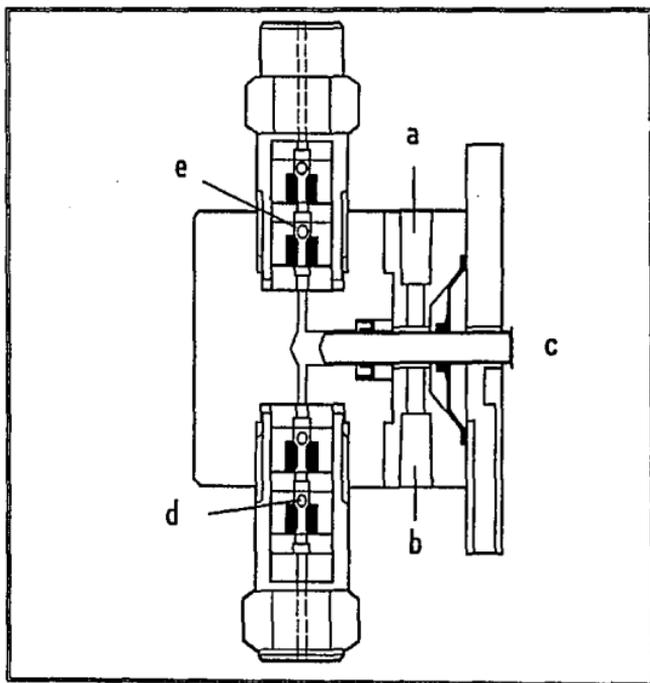


FIGURA 7. ESQUEMA DE UN CABEZAL DE BOMBEO DE UNA BOMBA ALTERNANTE, a) y b) ENTRADA Y SALIDA DE SOLVENTE DE LIMPIEZA DEL PISTON, c) PISTON, d) Y e) VALVULAS DE ENTRADA Y SALIDA. (32)

Las ventajas de las bombas alternantes son:

- a). El depósito de disolvente ilimitado, permitiendo el uso durante largo tiempo sin control personal.
- b). Rapidez de cambio de fase móvil y fácil limpieza.

Las bombas alternantes pueden tener varias desventajas:

a). Tienen tendencia a producir pulsaciones no totalmente compensadas, que pueden a veces observarse, especialmente en detectores de índice de refracción a sensibilidades altas, sobre todo a caudales bajos en los que los ciclos de los pistones están muy espaciados.

b). Los mecanismos de transmisión de algunas de las más sofisticadas de estas bombas suelen resultar complejos, por lo cual su mantenimiento puede tener un elevado costo.

5.4.1.4 BOMBA JERINGA.

La bomba jeringa es, a diferencia de las bombas alternantes, un dispositivo de desplazamiento continuo. Es decir, el solvente contenido en un cilindro es impulsado hacia el inyector por medio de un movimiento continuo y hacia adelante del pistón. En la figura 8 se presenta un esquema de una bomba de este tipo. (43)

Estas bombas presentan varias ventajas:

a). Total ausencia de pulsos.

b). Pueden alcanzar presiones altas y no suelen precisar mantenimiento, puesto que no existen válvulas de control fluctuantes y los engranajes son sencillos y fuertes.

c). Sólo es preciso llenar el depósito de fase móvil una o dos veces al día en las operaciones de rutina, ya que su capacidad es normalmente de 250 a 500 ml. Esto da lugar a muy poco desgaste en los cierres y en los componentes.

Las desventajas que presenta este tipo de bomba son:

a). Limitada capacidad de depósito y un ligero cambio del caudal a presiones muy altas, al comprimirse el disolvente.

b). Este tipo de bomba no es compatible con los sistemas convencionales con caudales de 1 o más ml/min.

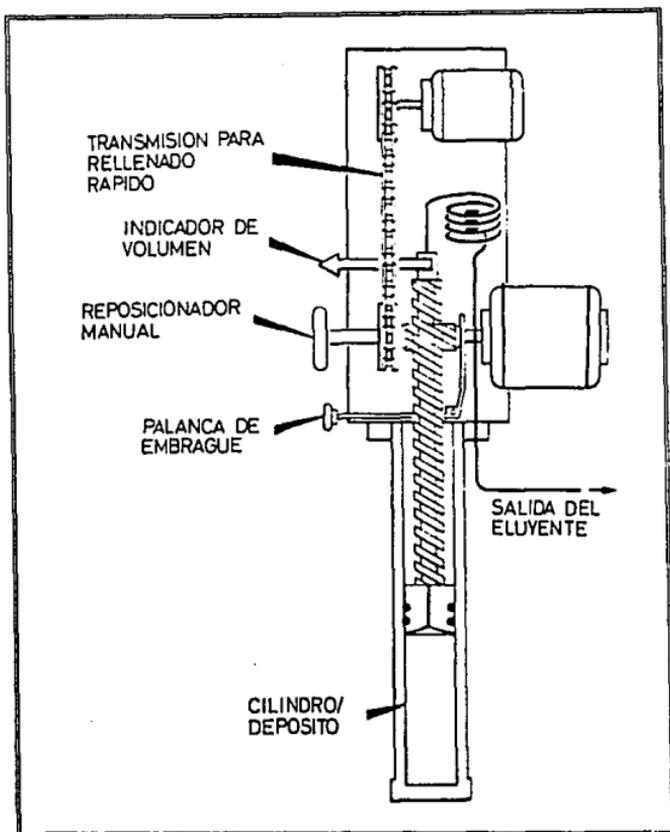


FIGURA 8. ESQUEMA DE UNA BOMBA JERINGA. (43)

5.4.2 INYECTORES (4,32,43)

El inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal de solvente a través del sistema.

5.4.2.1 CARACTERISTICAS DE UN INYECTOR. (4,32,43)

- a). Debe ser fácil de operar.
- b). Debe ser inerte al ataque químico y capaz de soportar altas presiones.
- c). Debe ser preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida en el sistema.

- d). No debe provocar diluciones importantes de la solución inyectada.
- e). En casos especiales puede requerirse que opere a altas temperaturas.

5.4.2.2 INYECCION CON JERINGA A TRAVES DE UN SEPTUM. (32,43)

Los inyectores con septum están siendo sustituidos rápidamente por válvulas impelentes de inyección sin septum.

Las ventajas que presenta este tipo de inyectores son:

- a). Es barata, flexible y de fácil realización.

Las desventajas de la inyección a través de un septum son:

a). Desprendimiento del material del septum, obstruyendo de esta manera la columna y la contrapresión que debe vencerse al inyectar la muestra, lo cual obliga con caudales altos a su interrupción momentánea.

b). Dependencia respecto de la técnica del operador cuando se usa en análisis cuantitativos.

En la figura 9 se muestra un inyector cuando se emplea una jeringa.

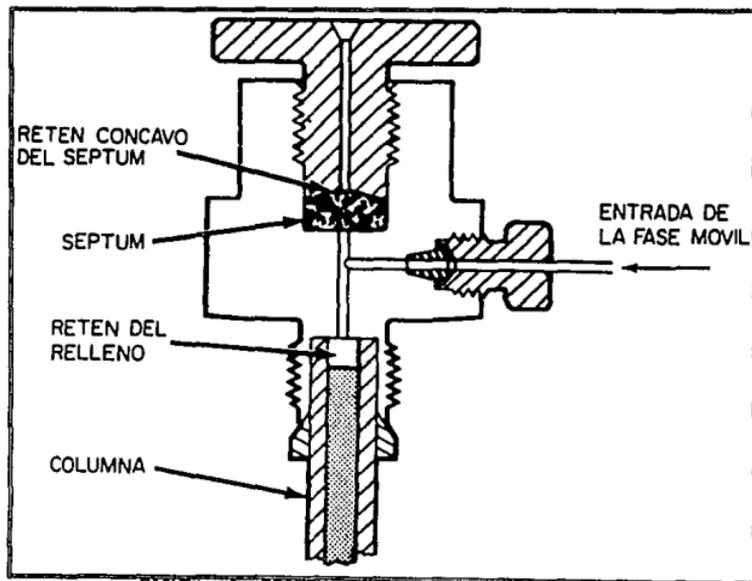


FIGURA. 9. ESQUEMA DE UN INYECTOR CUANDO SE EMPLEA UNA JERINGA. (43)

5.4.2.3 INYECTORES AUTOMATICOS. (32,43)

Las válvulas de inyección de 6 vías, pueden accionarse eléctrica o neumáticamente y se utilizan en la construcción de inyectores automáticos.

Están constituidas por un cuerpo fijo, un rotor con un sello que gira y un "loop" en el cual se introduce la solución a inyectar. El inyector que se muestra en la figura 10 ilustra éste sistema.

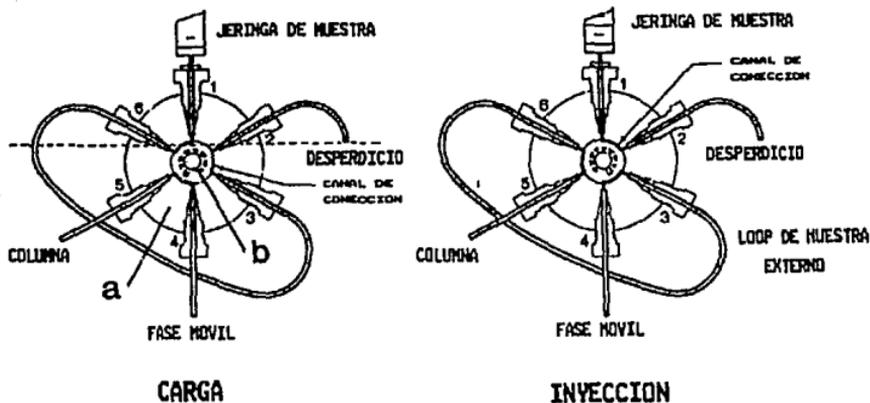


FIGURA 10. VALVULA DE INYECCION DE 6 VIAS Y DOS POSICIONES. (32)

La precisión obtenida con estos inyectores es en general superior a la de métodos manuales, porque no depende de la habilidad del operador.

5.4.3 DETECTOR. (4,32,43)

El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite "ver" y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica.

5.4.3.1 CARACTERISTICAS DE UN DETECTOR. (4,32,43)

- a). Tener un amplio rango dinámico de respuesta.
- b). Poseer una respuesta lineal.
- c). No contribuir al ensanchamiento de banda extracolumnar.
- d). Responder a todos los solutos.
- e). Tener la sensibilidad apropiada.
- f). No afectarse por cambios de temperatura.
- g). Poseer una buena relación señal/ruido.
- h). No destruir la muestra.
- i). Tener una constante de tiempo baja.

5.4.3.2 DETECTORES GENERALES. (4,32,43)

Los detectores generales miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene el analito en comparación con la misma fase móvil pura. Ejemplos típicos, son el detector de índice de refracción y el de conductividad.

5.4.3.3 DETECTORES SELECTIVOS. (4,32,43)

Los detectores selectivos son aquellos sensibles a alguna propiedad propia del soluto, por ejemplo el detector UV, que producirá una señal proporcional a la absorbancia del soluto a una longitud de onda dada. El detector de UV es el más empleado en CLAR. Posee buena sensibilidad y rango lineal, y permite detectar analitos en el orden de los nanogramos. No es destructivo y puede emplearse con gradientes de solventes. Otro ejemplo es el detector de fluorescencia, empleado para la detección de solutos con fluorescencia natural o conferida por reacción con un reactivo fluorogénico.

5.4.4 COLUMNA. (43)

Se considera a la columna como la parte fundamental de la cromatografía ya que es en ésta, donde se va a llevar a cabo la separación. El material de empaque seleccionado dependerá básicamente de la separación que se desee hacer.

Las dimensiones de una columna dependerán también del tipo de separación que se desea hacer. Si el objeto de la separación es aislar sustancias de una mezcla, se emplean columnas preparativas en la que las partículas del empaque son de dimensiones mayores que en las columnas analíticas y tanto la longitud como el diámetro interno son mayores; tienen la capacidad de contener cantidades elevadas de la muestra. Las más comunes son las fabricadas con acero inoxidable aunque también las hay de vidrio.

La longitud puede ser de 10 cm a 1 m. Al aumentar la longitud aumenta el número de platos teóricos y por lo tanto, se obtiene una mayor resolución aunque en ocasiones es más importante el tipo de empaque y el tamaño de partícula de éste, ya que al elevar el área de superficie del empaque, se aumenta la interacción del soluto con la fase estacionaria.

La eficiencia de las columnas se ha elevado con dispositivos y técnicas de empaque que mejoran el contacto del soluto con la fase estacionaria en su paso en la fase móvil. Uno de estos sistemas consiste en la compresión radial de una columna hecha de un material flexible disminuyendo así los espacios vacíos que quedan entre la pared de la columna y las partículas.

Por otro lado, se emplean actualmente materiales de empaque con partículas muy pequeñas que elevan el área superficial total, pudiendo así reducir las dimensiones de la columna. Otra manera de mejorar la eficiencia y resolución es el empleo de hornos que mantienen la temperatura constante a lo largo de la columna.

5.4.5 REGISTRADOR (43)

El resultado del ensayo cromatográfico es, por un lado, la obtención de fracciones separadas de los componentes de la muestra, y por el otro, la de un gráfico o cromatograma, de cuya interpretación puede extraerse conclusiones cualitativas y

cuantitativas. Este registro y la eventual manipulación se obtienen a partir de la señal proveniente del detector por medio de un sistema de toma y procesamiento de datos entre los que se pueden citar:

a). Registrador gráfico. Convierte la señal en un gráfico del tipo X-Y.

b). Integrador. Se obtiene un registro gráfico (cromatograma) y su tratamiento matemático para el cálculo de concentraciones.

c). Computadora. Básicamente, el integrador es una computadora de uso muy específico. La computadora es de tipo 'personal', que permite con el software apropiado tanto el registro gráfico del cromatograma como los cálculos apropiados, la manipulación de datos, el almacenamiento de ensayos, generación de reportes, e incluso el manejo global de varios cromatográficos.

6. ANTECEDENTES DE LA VALIDACION

6.1. VALIDACION.

Desde 1976, el énfasis por parte de la FDA para la validación de métodos analíticos ha tenido gran impacto en fármacos y en el proceso de manufactura. Históricamente, la FDA enfocó la validación para procesos de esterilización. A principios de los años 80's, la FDA empezó a dirigir la validación hacia procesos no estériles. (16,19,36,42)

De acuerdo a la FDA la validación de un método se define como: "El establecimiento de una evidencia documentada que proporciona una gran seguridad de que un método estudiado, generará consistentemente un producto que cumpla con las especificaciones y atributos preestablecidos". (19)

La evidencia documentada hace necesaria la preparación de un protocolo escrito de la validación del método con las especificaciones y pruebas necesarias para demostrar la reproducibilidad y que proporcionen además una medida precisa para determinar la variabilidad en intentos sucesivos.

La documentación de validación deberá incluir la evidencia de que los materiales son apropiados y el desempeño, confiabilidad de los equipos y sistemas.

La validación de métodos analíticos es parte fundamental del desarrollo de una nueva formulación y de la técnica de análisis de control de calidad de una forma farmacéutica, ya que es durante esta secuencia de pruebas y análisis en donde el químico se da cuenta si el estudio, el cual está siendo evaluado sistemáticamente, cumple con los propósitos para los cuales fué diseñado. (24)

La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. (9,11)

La Industria Farmacéutica está interesada especialmente en la validación de métodos, debido al incremento constante de la lista de productos nuevos asociado con el interés clínico y el medio ambiente, ya que cada producto requiere del establecimiento apropiado de un método de ensayo para cuantificarlo. (9)

6.2. IMPORTANCIA DE LA VALIDACION.

Son dos las razones importantes para la validación de métodos analíticos en la industria farmacéutica. La primera y la más importante es que la validación de métodos analíticos es una parte integral del sistema control-calidad. La segunda es que las actuales regulaciones de las prácticas de buena manufactura requieren de métodos analíticos validados. (24)

Como parte del sistema control-calidad la validación de métodos analíticos juega un papel clave en el ciclo de control universal.

Este ciclo incluye las siguientes etapas:

- a) Fijación de estándares.
- b) Valoración conforme a los estándares.
- c) Tomar la acción apropiada cuando los estándares no son satisfactorios.
- d) Planeación para mejoramiento.

El ciclo de control-calidad es un proceso evolutivo, la necesidad para la validación de ensayos implica algunas formas de verificación continua a través de procedimientos o ensayos que estén en uso.

La naturaleza muy variada de las diferencias entre los laboratorios de desarrollo analítico y los laboratorios de control de calidad es una buena razón para los programas de validación.

Otras razones importantes para llevar a cabo la validación de métodos analíticos son: desarrollo de nuevos productos, métodos analíticos, instrumentos y reactivos analíticos nuevos, puntos de ensayos nuevos (parámetros de calidad). cambios en la fórmula, cambios en el proceso, cambios en equipos analíticos, etc.

6.3. CUALIDADES DE LA VALIDACION.

6.3.1 LINEALIDAD.

Es la capacidad del método para asegurar que los resultados son directamente proporcionales a la concentración del activo dentro de un intervalo determinado. (2, 9, 11, 16, 19, 20, 30, 36, 39)

Se considera el 100 % como la concentración de la muestra en la solución final a analizar, que proporciona una respuesta

adecuada dependiendo del método de cuantificación.

CRITERIO:

$$CV. \leq 1.5 \%$$

$$r \geq 0.99, \quad r^2 \geq 0.98$$

$$m = 1, \quad b = 0,$$

Los porcentajes recuperados y los CV a cada nivel y los globales de todo el intervalo de la linealidad deben estar entre un promedio de recobro de 98-107% con un coeficiente de variación menor o igual a 2%.

Para suspensiones y semisólidos se acepta una aplicación del 1% en el intervalo expresado en el promedio de recobro y el CV \leq 3 %.

6.3.2 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100 %

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia. (2,9,11,16,19,20,33,36,39)

CRITERIO:

El porcentaje recuperado debe estar entre el 98-107% con un coeficiente de variación menor o igual a 2% .

6.3.3 PRECISION

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación. (9,20)

6.3.4 REPETIBILIDAD.

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.)(9)

6.3.5 REPRODUCIBILIDAD.

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes: diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando diferentes equipos, etc.)(2,9,11,16,19,20,36,39)

CRITERIO:

Para métodos cromatográficos el coeficiente de variación debe ser menor o igual al 2%.

1. Dependiendo de la naturaleza de la muestra, el CV puede incrementarse.
2. Si se requiere(n) establecer la(s) fuente(s) de variación del método (lo cual no constituye un requisito mínimo dentro de la validación).

6.3.6 ESPECIFICIDAD.

Es la capacidad del método para cuantificar exactamente y de manera exclusiva a los principio(s) activo(s) en presencia de componentes de la muestra (impurezas, componentes endógenos de la matriz biológica, metabolitos), el método debe de separar y cuantificar sólo los compuestos de interés. La especificidad es una medida de la interferencia o carencia de la misma al analizar una muestra compleja. (2, 9, 11, 16, 19, 20, 36, 39)

CRITERIOS:

Verificar que los productos de degradación y/o sustancias relacionadas no interfieran con la cuantificación de la sustancia de interés utilizando el método desarrollado.

En éste caso, ajustar las condiciones de operación para obtener la máxima resolución.

6.3.7 TOLERANCIA.

Es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de condiciones normales de operación: diferentes temperaturas, diferentes instrumentos, diferentes marcas de reactivos, diferentes columnas, diferentes sistemas de elución, etc.

CRITERIO:

Igual a precisión.

Los parámetros que se evalúan en ésta etapa son el factor de capacidad, selectividad, eficiencia de la columna, resolución y el factor de simetría, estos no deben encontrarse alterados considerablemente con respecto a los obtenidos bajo las mejores condiciones cromatográficas propuestas. (33, 32)

6.4. CATEGORIAS PARA LA VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.

Considerando la gran variedad de ensayos, los requerimientos difieren. Existe un esquema de validación que clasifica las categorías que cada método necesita para su validación. (41)

La categoría I contempla a los métodos analíticos que cuantifican componentes principales de sustancias a granel o ingredientes activos, incluyendo conservadores en producto terminado.

La categoría II contempla a los métodos analíticos para determinar impurezas en sustancias a granel o compuestos de degradación en producto terminado como son análisis cuantitativos y pruebas límite.

La categoría III contempla a métodos analíticos que determinan las características físicas como disolución y liberación del principio activo.

PARAMETROS REQUERIDOS PARA C/CATEGORIA	CATEGORIA I	CATEGORIA II		CATEGORIA III
		CUANTI- TATIVA	LIMITE DE PBA.	
PRECISION	SI	SI	NO	SI
EXACTITUD	SI	SI	*	*
LIMITE DE DETECCION	NO	NO	SI	*
LIMITE DE CUANTIFICACION	NO	SI	NO	*
ESPECIFICIDAD	SI	SI	SI	*
LINEALIDAD	SI	SI	NO	*
REPRODUCIBILIDAD	SI	SI	SI	SI

TABLA II. REQUISITOS PARA LA VALIDACION
DE METODOS ANALITICOS. (41)

* Puede ser requerido dependiendo de la prueba específica.

PARTE
EXPERIMENTAL

7. DESARROLLO EXPERIMENTAL

7.1. MATERIAL.

- Matraces volumétricos de 50, 100 ml (Pyrex)
- Matraces erlenmeyer de 200 ml (Pyrex)
- Pipetas graduadas de 5 ml (Kimax)
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 4, 5, 10 ml (Kimax)
- Microjeringa de 25 microlitros (Hamilton)
- Membrana 0.45 micras (Millipore)
- Embudos de filtración
- Papel filtro No. 1 (Whatman)
- Agitadores magnéticos (Corning)

7.2. REACTIVOS.

- Estándar secundario de Albendazol. (F. Establihisment)
Pureza: 100.00 %
- Materia Prima de Albendazol. (Megafarma S.A.)
Pureza: 99.85 %
- Metanol absoluto (Baker)
- Metanol HPLC (Merck)
- Agua de osmosis inversa

7.3. SOLUCIONES

- Acido clorhídrico al 1% v/v en Metanol
- Hidróxido de sodio 0.1 N

7.4. EQUIPO.

- Cromatógrafo de Líquidos (Merck & Hitachi)
de Alta Resolución;
Bomba L-6200 A
Detector-UV L-4000
Integrador D-2500
- Columna Micro-Bondapak C18 (Merck)
(25 cm x 4 mm), dp 5 µm
- Equipo de filtración. (Millipore)
- Balanza analítica (Sauter)
- Parrillas de agitación (Corning)

7.5. DEFINICION DEL SISTEMA PRELIMINAR.

La etapa de desarrollo comprende de una revisión exhaustiva, con la finalidad de conocer las propiedades físicas y químicas, estabilidad, interacciones del principio activo, así como las referencias para la cuantificación del mismo por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Cabe mencionar que muy poca información de albendazol se encuentra reportada en bibliografía.

El primer punto que se evaluó en la definición del sistema preliminar fué determinar los pasos preparativos para mantener el analito en solución, en la concentración adecuada. En la preparación de la muestra se trató de evitar las extracciones e implantar un método más práctico para minimizar el tiempo de análisis.

Al albendazol se le realizó pruebas de solubilidad en diferentes disolventes normalmente usados, resultó ser soluble en metanol, cloroformo y muy soluble en soluciones ácidas. Debido a que el albendazol fué soluble en metanol, se preparó una solución de albendazol en dicho solvente a una concentración aproximadamente de 100 µg/ml.

Con la solución anterior se realizó un barrido en el espectrofotómetro para seleccionar la longitud de onda óptima, la cual fué de 293 nm. El detector utilizado fué de UV por su simplicidad, robustez y confiabilidad.

Se eligió una columna C₁₈, ya que se deseaba desarrollar un método por cromatografía en fase reversa, como fase móvil se propuso como primera opción agua (abundante y económica) y metanol (es asequible en calidad y precios adecuados). Con la fase móvil se realizó un gradiente desde un 10% hasta un 100%, inyectando la solución de 100 µg/ml. Lo anterior permitió observar que el compuesto de interés podía detectarse a dicha concentración, y seleccionar la proporción de la fase móvil, el cromatograma se muestra en la figura 11:

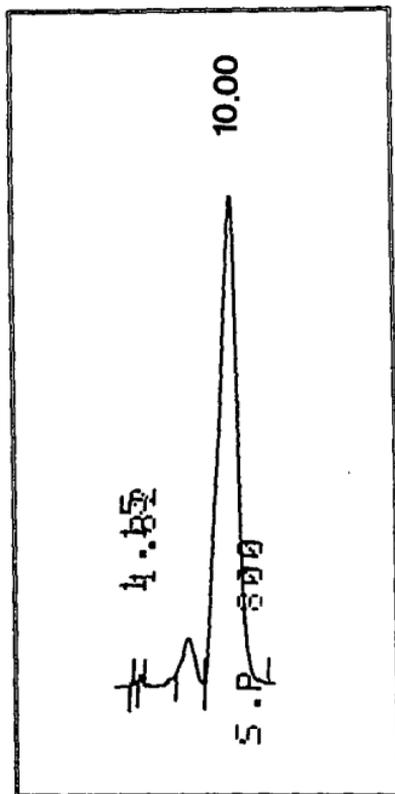


FIGURA 11. CROMATOGRAMA OBTENIDO EN LA DEFINICION DEL SISTEMA PRELIMINAR.

Se aprecia que este sistema favorece adecuadamente la aparición del pico de interés y elimina la inestabilidad de la línea base. Este sistema se toma como base para el inicio del desarrollo: fase móvil: Metanol-Agua 60:40, flujo 0.5 ml/min, sensibilidad 1.0.

7.6. OPTIMIZACION.

Al examinar los resultados obtenidos de la definición del sistema preliminar, se estimaron las posibles variables a modificar para optimizar el método.

Las modificaciones se realizaron controladamente y una a la vez, las cuales se mencionan a continuación:

- a) Se cambió el solvente del analito.
- b) Se disminuyó la concentración.
- c) Se cambió la fase móvil.
- d) Se cambió la atenuación.
- e) Se propuso el uso de estándar externo.
- f) Se cambió la velocidad de flujo

Se determinó cambiar la concentración de la solución, para definir más el pico y evitar que la muestra concentrada (100 µg/ml) saturará a la fase estacionaria.

Se decidió cambiar el solvente del analito, porque se observó que el albendazol no se solubilizaba totalmente en metanol.

La información bibliográfica y las pruebas de solubilidad realizadas evidencian que el albendazol es muy soluble en soluciones ácidas, resolviéndose usar ácido clorhídrico.

Se pesó 50 mg de albendazol estándar y se transfirió a un matraz de 100 ml, adicionando 5 ml de ácido clorhídrico al 1% v/v en metanol (ya que el albendazol es insoluble en agua), se probó con ácido clorhídrico al 2% v/v en metanol, pero con ácido clorhídrico al 1% en metanol fué suficiente para solubilizar rápido al albendazol, sin embargo, el pH de la solución era de 1, por lo que se intentó agregar algo que pudiera elevar el pH, ya que si se dejaba a ese pH, dicha solución dañaría la columna. A la solución de pH aproximadamente a 1 se le agregó 40 ml de metanol y después se adicionó 5 ml de hidróxido de sodio al 0.1 N, quedando el pH aproximadamente a 1, se le agregó 40 ml de metanol y después se adicionó 5 ml de NaOH 0.1 N, el pH fué aproximadamente de 5.0 y se llevó al aforo. La solución fué inyectada, el cromatograma que se obtuvo se muestra en la figura 12:

llevó al aforo. La solución fué inyectada, el cromatograma que se obtuvo se muestra en la siguiente figura:

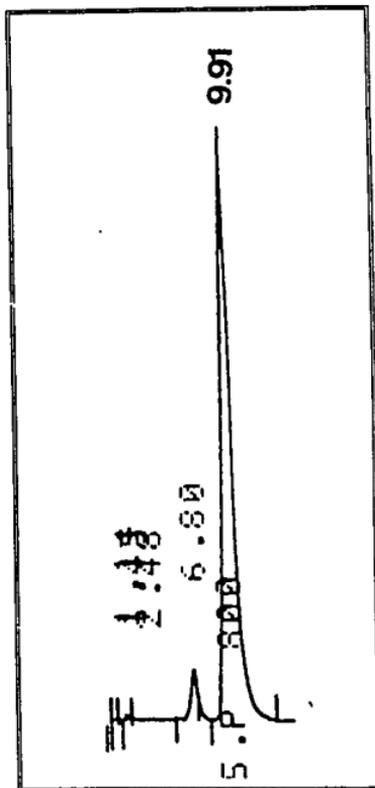


FIGURA 12. CROMATOGRAMA OBTENIDO DE LA SOLUCION ESTANDAR DE ALBENDAZOL.

La figura 12 se observa que el pico ha mejorado con la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$, el cual tiene una asimetría de 1.0, se disminuyó la atenuación con el objeto de aumentar la altura del pico.

Después se intentó con una muestra de albendazol suspensión, se pesó el equivalente a 50 mg de albendazol (aproximadamente 2.8 g de la suspensión) y se transfirió a un matraz de 100 ml, adicionando 5 ml de ácido clorhídrico al 1% v/v en metanol, se le agregó 40 ml de metanol y después se adicionó 5 ml de hidróxido de sodio al 0.1 N,

quedandó el pH aproximadamente de 5.0, se llevó al aforo con metanol, filtrando ésta solución por papel Whatman No. 1, de ahí se tomó una alícuota de 5 ml y se transfirió a un matraz volumétrico de 50 ml, llevando el aforo con metanol. La solución se inyectó, el cromatograma que se obtuvo se muestra en la siguiente figura:

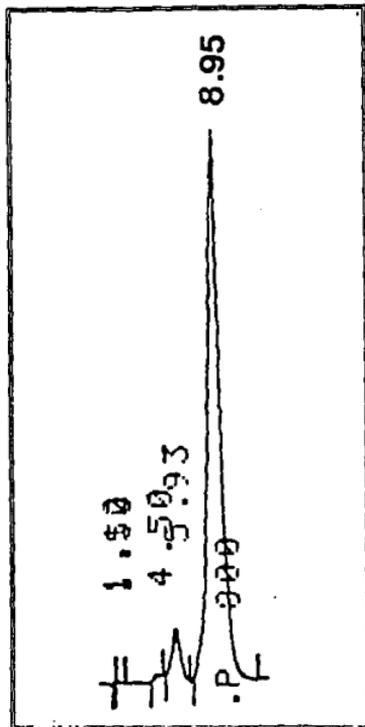


FIGURA 13. CROMATOGRAMA OBTENIDO DE LA MUESTRA DE ALBENDAZOL EN SUSPENSION.

El cromatograma obtenido en la figura 13 tiene una asimetría de 1, lo cual es aceptable, (32).

Cuanto mayor sea el volumen de inyección mejor será la precisión, aunque se debe tener en cuenta que, aumentándolo por encima de cierto valor, aumenta el ensanchamiento del pico causando una pérdida de eficiencia no adjudicable a la columna, en la literatura recomiendan que para columnas menores de 12.5 el volumen

de inyección debe de ser de 20 μ l (43), por lo anterior el volumen de inyección elegido fué de 20 μ l, éste volumen resultó ser adecuado ya que en los cromatogramas mostrados se puede observar la buena definición y precisión de los picos.

La fase móvil se modificó para disminuir la retención de la muestra en la columna, por lo que se aumentó la proporción de metanol en la fase móvil, quedando de: metanol-agua (65:35), esto se observa en la figura 14 en donde el cromatograma mostrado tiene un factor de asimetría de 1.

La velocidad de flujo con la que se empezó fué de 0.5 ml/min, la cual se modificó a 0.7 ml/min con el objeto de disminuir el tiempo de retención, esto no modificó los parámetros cromatográficos, ver figura 14.

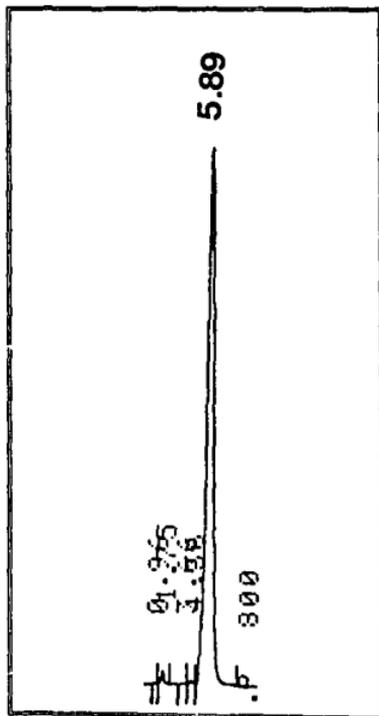


FIGURA 14. CROMATOGRAMA CON LA MODIFICACION DE LA FASE MOVIL.

Para verificar las condiciones del sistema operativo, se inyectó un estándar secundario de albendazol por triplicado y se verificó el coeficiente de variación, el cual no fué mayor a 1%. Se preparó un duplicado de las muestras inyectando cada una de las muestras. volviéndose a inyectar al último la solución estándar, se calculó que el coeficiente de variación del estándar con respecto al promedio obtenido en las primeras inyecciones y el último estándar no fuera mayor a 1%, lo cual se cumplió, y el porcentaje de recobro para las muestras de albendazol era del 100% , para el calculo del analito en la muestra ver apéndice I.

Con los resultados obtenidos se determinaron las mejores condiciones de operación para llevar a cabo la determinación de albendazol en suspensión, por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución. Las condiciones cromatográficas óptimas se mencionan en la tabla III y en la figura 15 se muestra el diagrama de flujo del método optimizado.

<u>Columna:</u>	C18 Fase reversa Columna Micro-Bondapak C18 (25 cm x 4 mm), dp 5 µm
<u>Fase móvil:</u>	Agua-Metanol (35x-65x)
<u>Longitud de onda:</u>	293 nm
<u>Velocidad de flujo:</u>	0.7 ml/min
<u>Atenuación:</u>	4
<u>Sensibilidad:</u>	0.05 (Absorbance Unit Full Scale)
<u>Volumen de inyección:</u>	20 µl

TABLA III. CONDICIONES CROMATOGRAFICAS OPTIMIZADAS

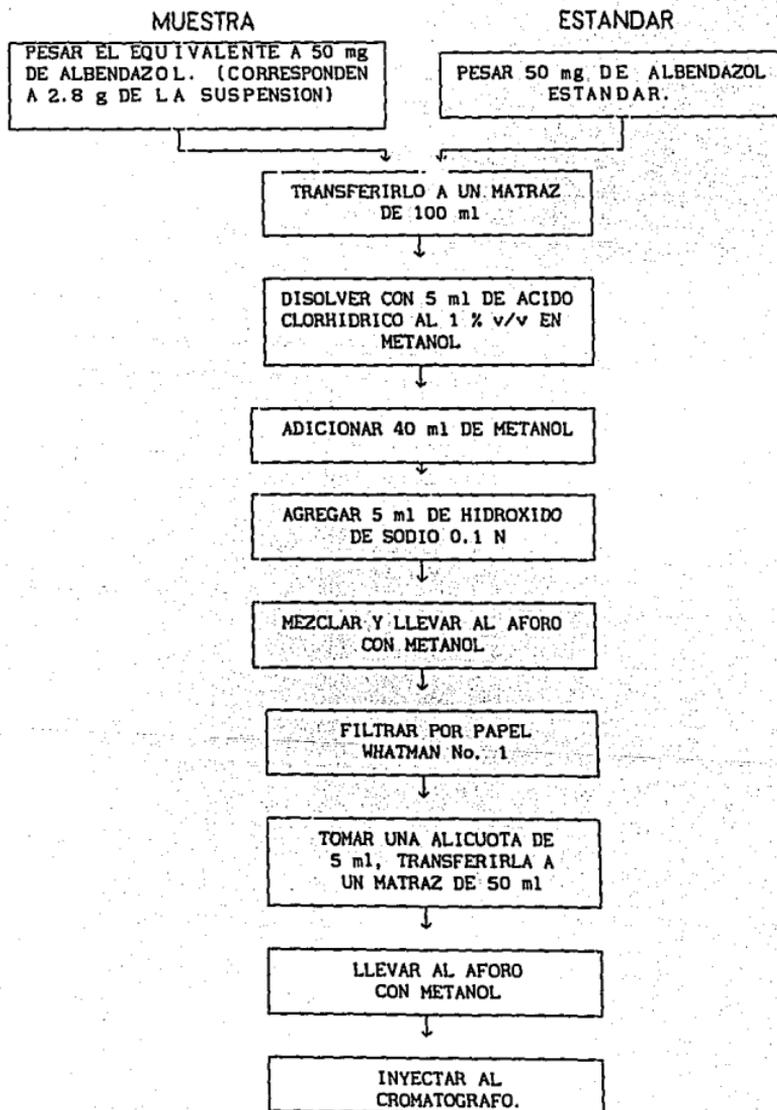


FIGURA 15. DIAGRAMA DE FLUJO DEL METODO OPTIMIZADO

7.7. VALIDACION DEL METODO.

Una vez optimizado el método de análisis, deberá validarse, es decir, se debe confirmar y documentar que los resultados por él producidos son confiables.

7.7.1 ESPECIFICIDAD.

Uno de los parámetros a evaluar para la validación de métodos analíticos es la especificidad. Se debe comprobar que ninguno de los excipientes interfieren en el ensayo. Para determinar este parámetro se preparó un lote placebo, se analizaron tres muestras usando el método analítico optimizado.

7.7.2 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Se determinó construyendo una curva de calibración a partir de una solución estándar de albendazol (500 µg/ml), analizando 5 niveles de concentración (80, 90, 100, 110 120), cada nivel por triplicado. La linealidad del sistema se realizó en dos días diferentes.

7.7.3 PRECISION DEL SISTEMA.

Se determinó a partir de una misma solución estándar, cuya concentración corresponde a la del 100%. El análisis se realizó por sextuplicado, en dos días diferentes.

7.7.4 LINEALIDAD DEL METODO.

Se evaluó utilizando un lote placebo con adición de principio activo a diferentes concentraciones. Las concentraciones a las que se trabajaron fueron 80, 90, 100, 110, 120% . El análisis fué realizado por triplicado para cada concentración en dos días diferentes.

Las concentraciones se eligieron en base a los límites especificados para el activo (21).

7.7.5 EXACTITUD.

Se determinó con lotes placebo y adición del principio activo. Se analizó la concentración del 100% por sextuplicado en dos días diferentes.

7.7.6 REPRODUCIBILIDAD

Se realizó con dos analistas. Se obtuvo del porcentaje de albendazol de muestras homogéneas, cuya concentración era cercana al 100 % de la concentración teórica establecida. Se hizo por sextuplicado en dos días diferentes.

7.7.7 REPETIBILIDAD.

Para evaluar la repetibilidad del método se emplearon los mismos datos que para exactitud, ya que la repetibilidad se determina de la misma forma que la exactitud.

8. RESULTADOS

8.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Los resultados obtenidos para la linealidad del sistema del primero y segundo día se muestran en la siguiente tabla:

CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$)	DIA 1	DIA 2
	AREA	AREA
40.0	1) 313154	1) 315010
	2) 313625	2) 309690
	3) 312410	3) 312007
45.0	1) 354405	1) 352196
	2) 353346	2) 355831
	3) 353925	3) 357078
50.0	1) 393408	1) 396705
	2) 393842	2) 394155
	3) 393759	3) 397639
55.0	1) 434785	1) 437669
	2) 433196	2) 436164
	3) 434461	3) 438451
60.0	1) 474325	1) 476152
	2) 472684	2) 473535
	3) 476096	3) 476791

TABLA IV. VALORES DE AREAS OBTENIDAS PARA LA LINEALIDAD DEL SISTEMA.

8.2. PRECISION DEL SISTEMA.

Los resultados para precisión del sistema se reportan en la siguiente tabla:

CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$)	DIA 1	DIA 2
	AREA	AREA
50.0	398038	392113
	397526	392745
	397034	394262
	396676	393438
	396080	389148
STD REF. \bar{x}	395145	391003

TABLA V. AREAS OBTENIDAS DE ALBENDAZOL,
PARA PRECISION DEL SISTEMA.

El STD ref. \bar{x} , es el estándar de referencia promedio de un triplicado de estándares, con el objeto de determinar la estabilidad de la columna, como se mencionó anteriormente este triplicado de estándares deben de tener un coeficiente de variación menor a 2%.

8.3. LINEALIDAD DEL METODO.

Los resultados de porcentajes de recobro del día 1 se muestran en la siguiente tabla:

DIA 1

PORCENTAJE ADICIONADO (%)	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	AREA	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	PORCENTAJE RECUPERADO (%)
80	40.1	313792	39.8309	79.46
80	40.0	313033	39.7346	79.47
80	40.1	314044	39.8629	79.53
90	45.0	347496	44.1091	88.22
90	45.1	356198	45.2137	90.22
90	45.0	352441	44.7368	89.47
100	50.1	393156	49.9049	99.61
100	50.1	393149	49.9040	99.61
100	50.0	392234	49.7879	99.57
110	55.0	433143	54.9806	109.96
110	55.0	432155	54.8552	109.71
110	55.1	433326	55.0039	109.81
120	60.0	468398	59.4557	118.91
120	60.0	467692	59.3661	118.73
120	60.1	470200	59.6844	119.17
STD REF. \bar{x}		393905		

TABLA VI. PORCENTAJE RECUPERADO DE PLACEBOS CARGADOS DE ALBENDAZOL EN EL DIA 1.

LINEALIDAD DEL METODO.

Los resultados de porcentajes de recobro del día 2 se muestran en la siguiente tabla:

DIA 2

PORCENTAJE ADICIONADO (%)	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	AREA	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	PORCENTAJE RECUPERADO (%)
80	40.1	308648	39.7599	79.32
80	40.1	307929	39.6672	79.13
80	40.0	305070	39.2989	78.60
90	45.2	355498	44.7951	91.18
90	45.1	350585	45.1622	90.12
90	45.0	347100	44.7132	89.42
100	50.2	392041	50.5025	100.60
100	50.1	388202	50.1080	100.01
100	50.2	392142	50.5155	100.63
110	55.2	429969	55.3884	110.37
110	55.0	420213	54.1316	108.26
110	55.1	425766	54.8470	109.49
120	60.8	476060	61.3258	121.03
120	60.8	478258	61.6089	121.59
120	60.6	472343	60.8470	120.49
STD REF. \bar{x}		388140		

TABLA VII. PORCENTAJE RECUPERADO DE PLACEBOS CARGADOS DE ALBENDAZOL EN EL DIA 2.

8.4. EXACTITUD Y REPETIBILIDAD.

Los porcentajes de recobro para exactitud y repetibilidad del día 1 y día 2, al 100% se indican en la tabla VIII.

DIA 1			DIA 2		
CANTIDAD ADICIONADA (mg)	AREA	% ALBEN	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	AREA	% ALBEN.
50.0	390836	100.61	50.0	365089	99.60
50.0	385933	99.35	50.0	367378	100.23
50.0	391243	100.72	50.0	366626	100.02
50.0	388903	100.11	50.0	369992	100.94
50.0	388537	100.02	50.0	369835	100.89
50.0	387481	99.75	50.0	365704	99.77
STD REF. \bar{x}	388455		STD REF. \bar{x}	366542	

TABLA VIII. PORCENTAJES DE RECOBRO DE ALBENDAZOL DEL DIA 1 Y 2.

B.5. REPRODUCIBILIDAD

Los porcentajes obtenidos de Albendazol para reproducibilidad se muestran en la Tabla IX.

ANALISTA 1			ANALISTA 2		
CANTIDAD ADICIONADA (mg)	AREA	% ALBEN	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	AREA	% ALBEN.
DIA 1					
50.0	390836	100.61	50.1	395639	100.52
50.0	385933	99.35	50.2	396637	100.57
50.0	391243	100.72	50.2	396918	100.65
50.0	388903	100.11	50.0	393034	100.06
50.0	388537	100.02	50.0	393829	100.26
50.0	387481	99.75	50.0	392771	99.99
STD REF. \bar{x}	388455		STD REF. \bar{x}	392790	
DIA 2					
50.0	365089	99.60	50.4	381491	100.71
50.0	367378	100.23	50.5	383157	100.95
50.0	366626	100.02	50.1	379222	100.71
50.0	369992	100.94	50.3	381736	100.99
50.0	369835	100.89	50.5	383067	100.92
50.0	365704	99.77	50.0	377908	100.56
STD REF. \bar{x}	366542		STD REF. \bar{x}	375804	

TABLA IX. PORCENTAJES DE RECUBRO DE ALBENDAZOL PARA 2 ANALISTAS EN 2 DIAS DIFERENTES.

8.6. ESPECIFICIDAD.

En la tabla X se muestran los datos obtenidos para especificidad.

MUESTRA	ADICIONADO (mg)	RECUPERADO (mg)
1	0.0	0.0
2	0.0	0.0
3	0.0	0.0

TABLA X. PLACEBOS PARA DETERMINAR LA ESPECIFICIDAD.

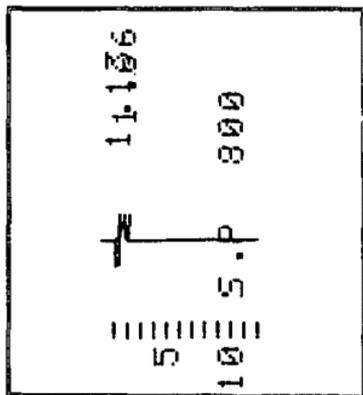


FIGURA 16. CROMATOGRAMA OBTENIDO PARA ESPECIFICIDAD.

9. ANALISIS DE RESULTADOS.

9.1. ESPECIFICIDAD.

Con el objeto de conocer la especificidad del método, los placebos sometidos al análisis cromatográfico, no presentaron respuesta, por lo que la respuesta obtenida fué únicamente a el principio activo.

9.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Para evaluar la linealidad del sistema se llevaron a cabo diferentes tratamientos estadísticos (ver apéndice III).

Se determinó el coeficiente de variación para cada nivel de concentración para los dos diferentes días en que se realizaron las curvas de calibración, estos resultados se muestran en las siguientes tablas:

CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$)	DIA 1		DIA 2	
	AREAS x	C. V. %	AREAS x	C. V. %
40.0	313063	0.19	312236	0.85
45.0	353892	0.15	355035	0.71
50.0	393670	0.06	396166	0.45
55.0	434147	0.19	437428	0.26
60.0	474368	0.36	475493	0.36

TABLA XI. VALORES DE COEFICIENTE DE VARIACION
PARA CADA NIVEL DE CONCENTRACION.

De acuerdo con los criterios de aceptación, para métodos cromatográficos el coeficiente de variación debe ser menor al 2%, se puede apreciar que los valores obtenidos son menores al valor establecido.

El análisis estadístico de regresión y correlación para los datos de linealidad del sistema para el principio activo indicaron que la relación que existe entre las variables es altamente significativa y se observa un comportamiento lineal, esto se muestra en la figura XI.

PARAMETRO	DIA 1	DIA 2
PENDIENTE	8057.32	8178.14
LIMITE SUP. INTERV. CONF.	8123.718972	8351.456624
LIMITE INF. INTERV. CONF.	7990.921028	8004.823376
t tab (0.975,13)	2.16	2.16
ORDENADA AL ORIGEN	-9037.933333	-13635.466670
LIMITE SUP. INTERV. CONF.	-2855.336804	2502.535548
LIMITE INF. INTERV. CONF.	-15220.529860	-29773.468890
COEFICIENTE DE DETERMINACION	0.999811	0.998750
COEFICIENTE DE CORRELACION	0.999905	0.999375
COEFICIENTE DE VARIACION	0.40	0.82

TABLA XII. TRATAMIENTO ESTADISTICO PARA LA LINEALIDAD DEL SISTEMA.

En la tabla XII se puede apreciar que el coeficiente de determinación es mayor de 0.9980 para ambas curvas, o sea, que la respuesta es independiente de los días en que se realizaron las curvas.

El valor del coeficiente de variación del día 1 y 2 es menor al 1%, lo cual es aceptable, ya que para métodos cromatográficos el CV = 2%.

La ordenada de la relación lineal concentración y área no pasa por el origen con este intervalo de concentraciones, sin embargo, la correlación es significativamente alta entre ambas variables.

Los interceptos para cada una de las curvas de la linealidad del sistema son con un 95% de confianza, estadísticamente iguales a cero.

Para la linealidad del sistema para el día 1 y 2 se analizaron los datos por medio de un análisis de variancia, los resultados se muestran en las tablas XIII y XIV.

DIA 1

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F _{exp.}	F _{tab.}
REGRESION	1	4.8690x10 ¹⁰	4.8690x10 ¹⁰	68701.5	9.07
ERROR DE REGRESION	13	9213397.9	708722.9		
FALTA DE AJUSTE	3	5603979	186799.3	0.22	3.71
ERROR PURO	10	8653000	865300		
F tab (0.99,1,13) = 9.07					
F tab (0.95,3,10) = 3.71					

TABLA XIII. ANALISIS DE VARIANCIA PARA EVALUAR LA LINEALIDAD DEL SISTEMA DEL DIA 1.

DIA 2

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F _{exp.}	F _{tab.}
REGRESION	1	5.0161x10 ¹⁰	5.0161x10 ¹⁰	10388.1	9.07
ERROR DE REGRESION	13	62773675.4	4828744.3		
FALTA DE AJUSTE	3	20516675.4	6838891.8	1.61	3.71
ERROR PURO	10	42257000	4225700		
F tab (0.99,1,13) = 9.07					
F tab (0.95,3,10) = 3.71					

TABLA XIV. ANALISIS DE VARIANCIA PARA EVALUAR LA LINEALIDAD DEL SISTEMA DEL DIA 2.

El análisis de variancia para el día 1 y 2 permite apreciar que $F_{exp.}$ es mayor que F_{tab} (9.07) con un nivel de significancia de 99 %, por lo que existe una relación altamente significativa entre la concentración y la respuesta, por lo tanto, el modelo se ajusta a un modelo lineal, ver figura 17.

En cuanto $F_{fa\ exp.}$, podemos observar que es menor que F_{tab} (3.71) con un nivel de significancia de 95 % para ambos días, es decir, que no existe falta de ajuste a la relación lineal concentración y la respuesta medida, por lo que el modelo lineal representa de manera correcta la cantidad adicionada contra la respuesta medida.

La relación que existe entre la concentración y el área indica tener un comportamiento descrito por la ecuación que se observa en la figura 18, inciso A, en donde el área es directamente proporcional a la concentración, lo cual resulta ser del promedio de los datos del día 1 y 2.

La diferencia entre el valor observado y el valor predicho para las 30 experiencias es casi nula, es decir el porcentaje de error relativo es menor al 1%, ver figura 18, inciso B. (Ver apéndice II)

FIGURA 17. GRAFICA DE LINEALIDAD DEL SISTEMA.

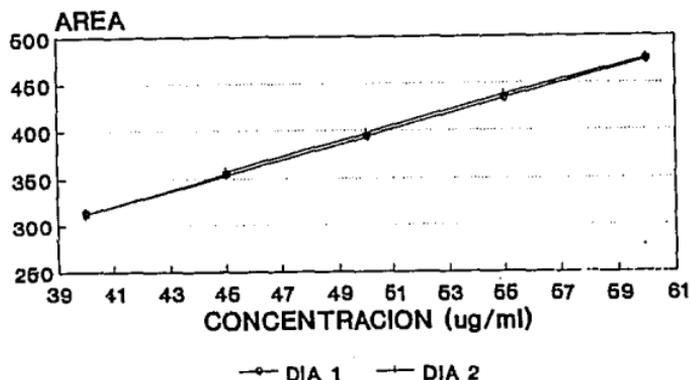


FIGURA 18. MODELO DETERMINADO
 $AREA = -11336.70 + 8117.73 x$

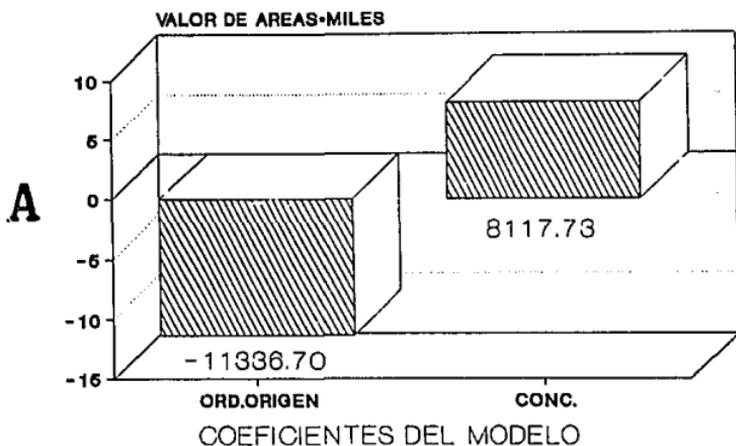
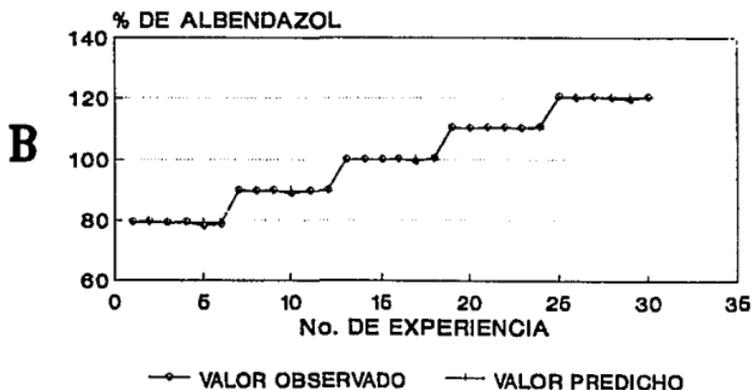


FIGURA 18. GRAFICA DE PORCENTAJE DE ERROR RELATIVO



9.3. PRECISION.

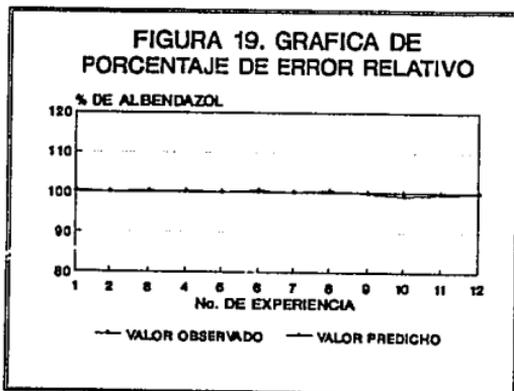
Para precisión del sistema se realizó el tratamiento estadístico indicado en la tabla XV.

PARAMETRO	DIA 1	DIA 2
MEDIA ARITMETICA	396749	392118
DESVIACION ESTANDAR	1036.55	1832.83
COEFICIENTE DE VARIACION	0.26	0.46

TABLA XV. PARAMETROS PARA EVALUAR LA PRECISION.

La desviación estándar y el coeficiente de variación de ambos días tienen un valor menor a 1%, para determinar la precisión de un método cromatográfico el coeficiente de variación debe ser menor a 2.0%. En este caso el sistema es preciso, ya que los valores obtenidos son menores al valor establecido.

En la siguiente figura se muestra la gráfica del porcentaje de error relativo de los valores observados y predichos, el porcentaje de error relativo es menor a 1% (ver apéndice II), por lo que el sistema es preciso, para realizar éste calculo se calculó el porcentaje de albendazol



9.4. LINEALIDAD DEL METODO.

Para evaluar la linealidad del método se llevaron a cabo diferentes tratamientos estadísticos (ver apéndice III) para los dos días en que se realizaron las curvas de calibración, éstos resultados se muestran en las siguientes tablas:

CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$)	DIA 1		DIA 2	
	\bar{x}	C. V. %	\bar{x}	C. V. %
40.0	313623	0.17	307216	0.61
45.0	352045	1.24	351061	1.20
50.0	392846	0.13	390795	0.57
55.0	432875	0.14	425316	1.15
60.0	468763	0.27	475554	0.63

TABLA XVI. VALORES DE COEFICIENTE DE VARIACION PARA CADA NIVEL DE CONCENTRACION, DE LA LINEALIDAD DEL METODO.

PARAMETRO	DIA 1	DIA 2
PENDIENTE	0.994316	1.032110
LIMITE SUP. INTERV. CONF.	0.995058	1.065476
LIMITE INF. INTERV. CONF.	0.993574	0.998744
t_{tab}	2.16	2.16
ORDENADA AL ORIGEN	0.000158	-1.601589
LIMITE SUP. INTERV. CONF.	1.895460	1.454128
LIMITE INF. INTERV. CONF.	-1.895777	-4.657307
COEFICIENTE DE DETERMINACION	0.998840	0.997096
COEFICIENTE DE CORRELACION	0.999420	0.998547

TABLA XVII. TRATAMIENTO ESTADISTICO PARA LA LINEALIDAD DEL METODO.

En la tabla XVI se puede observar que el coeficiente de variación para cada nivel de concentración es menor a 1.5%, lo cual cumple con el valor establecido del coeficiente de variación el cual es menor al 2%.

En la tabla XVII se puede apreciar que existe una relación de tipo $y = mx + b$, entre el porcentaje adicionado y el porcentaje recuperado en el intervalo de concentraciones trabajadas, para ambos días ya que el coeficiente de correlación es aproximado a 0.99. El valor de la pendiente es cercana a 1 y la ordenada al origen se aproxima a cero y están dentro de los límites, con un intervalo de confianza del 95%, para ambos días.

Para la linealidad del método del día 1 y 2 se analizaron los datos por medio de una análisis de variancia, ver tablas XVIII y XIX. El análisis de variancia refuerza los resultados anteriores.

DIA 1

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F _{exp.}	F _{tab.}
REGRESION	1	739.5579	739.5579	11198.39	9.07
ERROR DE REGRESION	13	0.858538	0.066041		
FALTA DE AJUSTE	3	0.160038	0.053346	0.76	3.71
ERROR PURO	10	0.6985	0.06985		
F tab (0.99, 1, 13) = 9.07					
F tab (0.95, 3, 10) = 3.71					

TABLA XVIII. ANALISIS DE VARIANCIA PARA EVALUAR LA LINEALIDAD DEL METODO DEL DIA 1.

DIA 2

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	$F_{exp.}$	$F_{tab.}$
REGRESION	1	842.649430	842.649430	4464.36	9.07
ERROR DE REGRESION	13	2.453756	0.188750		
FALTA DE AJUSTE	3	0.545226	0.181742	0.95	3.71
ERROR PURO	10	1.90853	0.190853		
F tab (0.99,1,13) = 9.07					
F tab (0.95,3,10) = 3.71					

TABLA XIX . ANALISIS DE VARIANCI A PARA EVALUAR LA LINEALIDAD DEL METODO DEL DIA 2.

El análisis de variancia para el día 1 y 2 permite apreciar que $F_{r exp.}$ es mayor que F_{tab} (9.07) con un nivel de significancia de 99%, por lo que existe una relación altamente significativa entre el porcentaje adicionado y recuperado, por lo tanto el modelo se ajusta a un modelo lineal, ver figura 20.

En cuanto $F_{fa exp.}$ podemos observar que es menor que F_{tab} (3.71) con un nivel de significancia de 95 % para ambos días, es decir, que no existe falta de ajuste a la relación lineal concentración y la respuesta medida, por lo que el modelo lineal representa de manera correcta la cantidad adicionada contra la respuesta medida.

La relación que existe entre la cantidad adicionada y la cantidad determinada indica tener un comportamiento descrito por la ecuación que se encuentra en la figura 21, inciso A, en donde gráficamente se representa dicha ecuación.

La diferencia entre el valor observado y el valor predicho para las 30 experiencias es casi nula, menor al 1%, ver figura 21, inciso B. (ver apéndice II)

FIGURA 20. GRAFICA DE LA LINEALIDAD DEL METODO

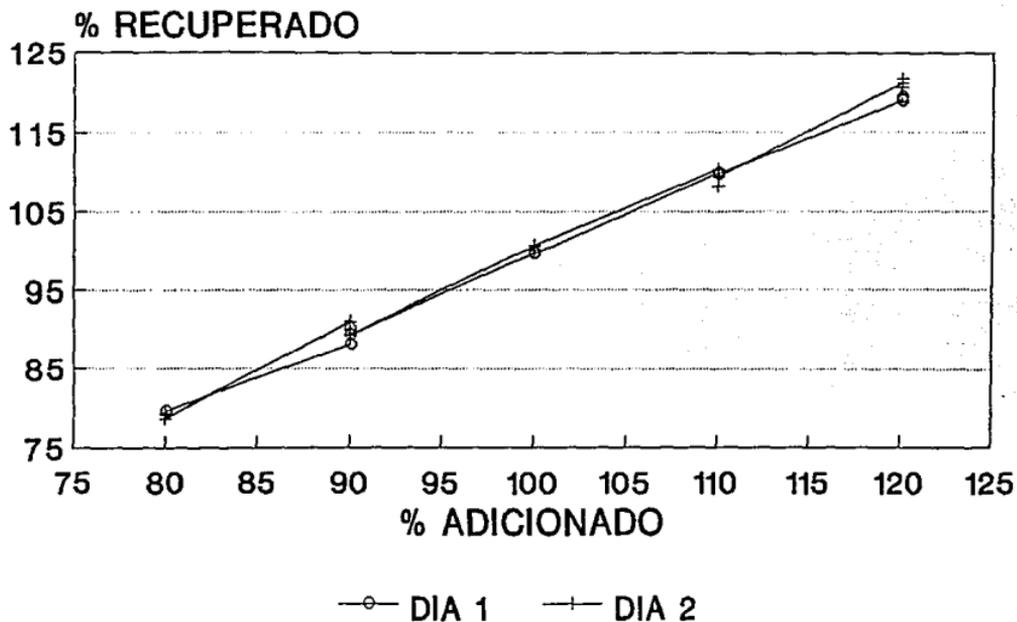


FIGURA 21. MODELO DETERMINADO
 $\% \text{ RECUPERADO} = -0.9799 + 1.00 x$

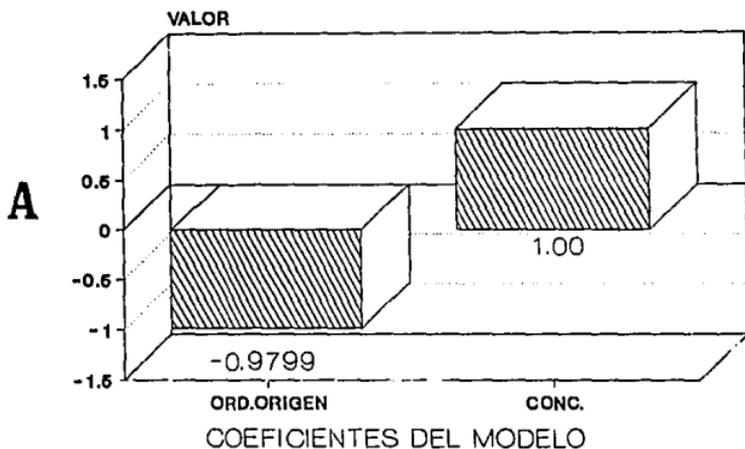
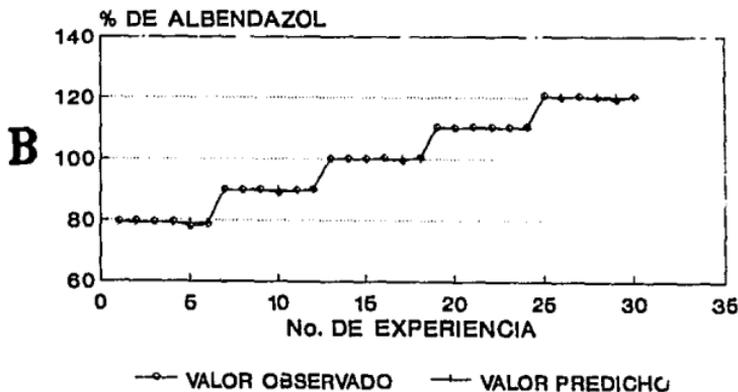


FIGURA 21. GRAFICA DE PORCENTAJE DE ERROR RELATIVO



9.5. EXACTITUD Y PRECISION.

La exactitud del método analítico fué evaluada con un nivel de concentración, los resultados del tratamiento estadístico se muestran en la siguiente tabla:

PARAMETRO EVALUADO	DIA 1	DIA 2
MEDIA ARITMETICA	100.093333	100.241667
DESVIACION ESTANDAR	0.516862	0.564178
COEFICIENTE DE VARIACION	0.516380	0.562818
LIMITE SUP. CONF. PARA LA MEDIA	100.635624	100.833601
LIMITE INF. CONF. PARA LA MEDIA	99.5510423	99.649732
$t_{exp.}$	0.442321	1.049243
$t_{tab.} (0.975,5)$	2.57	2.57

TABLA XX. RESULTADOS DEL TRATAMIENTO ESTADISTICO REALIZADO A LOS DATOS DE EXACTITUD.

El método resultó ser exacto con un 95% de confianza con el nivel de concentración del 100%, en la tabla XX se puede observar que $t_{exp.}$ es menor que t_{tab} para ambos días en que se realizó la exactitud, por lo que la hipótesis de $x=u$, donde u es el 100%, se acepta.

El coeficiente de variación debe ser menor al 2% , en la tabla XX se observa que el método optimizado para ambos días es preciso.

En la figura 22 se muestra la gráfica de porcentaje de error relativo, entre el valor observado y el valor predicho, no existe diferencias significativas entre ambas, ya que el porcentaje de error relativo es menor a 0.05 % de los datos obtenidos para exactitud. (ver apéndice II)

GRAFICA DE PORCENTAJE DE ERROR RELATIVO

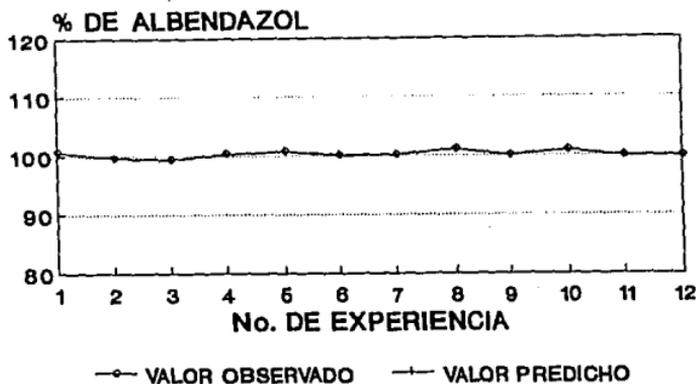


FIGURA 22. GRAFICA DE PORCENTAJE DE ERROR RELATIVO PARA EXACTITUD.

9.6. REPRODUCIBILIDAD.

Los resultados del análisis estadístico para establecer la reproducibilidad del método se encuentra en la siguiente tabla:

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	$F_{exp.}$	$F_{tab.}$
ANALISTA	1	0.992284	0.992284	2.77	18.50
DIA	2	0.714600	0.357300	2.56	3.49
ERROR	20	3.462500	0.173125		
$F_{tab} (0.95, 1, 2) = 18.50$ $F_{tab} (0.95, 2, 20) = 3.49$					

TABLA XXI. ANALISIS DE VARIANCIA (ANAVEVA)
PARA REPRODUCIBILIDAD DEL METODO.

En el análisis de variancia realizó se observa que F_{exp} es menor que $F_{tab.}$, por lo que se rechaza H_0 , con un intervalo del 95% de confianza que no hay influencia del analista para realizar la cuantificación del alendazol en suspensión. El análisis puede realizarse por diferentes analistas bajo las mismas condiciones de validación, ya que tampoco hay influencia entre analistas.

Para la evaluación de la precisión del método se obtuvieron los siguientes resultados (ver apéndice III), los cuales se muestran en la siguiente tabla:

COEFICIENTE DE VARIACION TOTAL	0.472332 %
REPRODUCIBILIDAD INTER DIA/ANALISTA	0.175202
REPRODUCIBILIDAD INTER ANALISTA	0.230033
REPETIBILIDAD DEL METODO	0.416083

TABLA XXII. RESULTADOS OBTENIDOS PARA EVALUAR LA PRECISION DEL METODO OPTIMIZADO.

El coeficiente de variación establecido es del 2%, en éste caso el coeficiente de variación es menor al valor establecido. En cuanto a la reproducibilidad y repetibilidad del método presentan una variación menor al 0.5%, por lo que la variación no es significativa.

En la figura 23 se observa que la diferencia entre el valor observado y el predicho no es significativa, ya que el valor de el porcentaje de error relativo es menor a 0.5%. (ver apéndice II)

GRAFICA DE PORCENTAJE DE ERROR RELATIVO

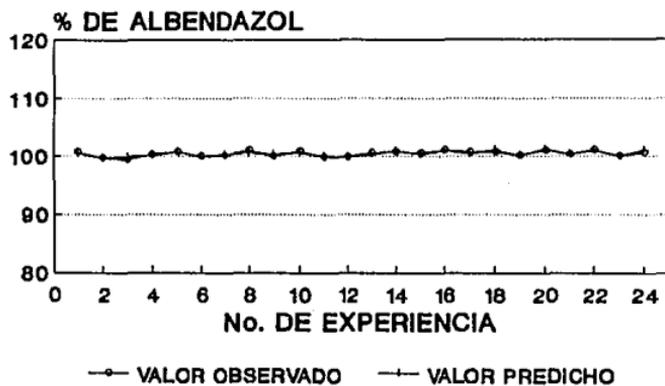


FIGURA 23. GRAFICA DE PORCENTAJE DE ERROR RELATIVO PARA REPRODUCIBILIDAD.

CONCLUSIONES

El método analítico para determinar albendazol en suspensión es confiable, dado que cumple con los parámetros estadísticos de linealidad, exactitud y precisión, éste último parámetro está en términos de repetición y reproducibilidad entre analistas y días.

Para controlar la reproducibilidad del análisis del método analítico es recomendable controlar el efecto de la variación de la temperatura ambiente sobre el porcentaje recuperado.

Las características del método analítico son las siguientes: el método desarrollado para preparar las muestras y determinar la respuesta por CLAR es sencillo y rápido, el tiempo de análisis es aproximadamente de 30 minutos, es confiable, ya que cumple con los parámetros estadísticos realizados en la validación, minimiza la cantidad de solventes, minimiza tiempos y por lo tanto costos.

La validación del método analítico para albendazol en suspensión expresa la confiabilidad y exactitud del mismo, para que el producto salga al mercado con el contenido de principio activo estipulado.

APENDICE I.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

1. CALCULO PARA LA CONCENTRACION DEL ANALITO.

La concentración del analito en la muestra se determina comparando el área del pico en cuestión con el área correspondiente al estándar de referencia.

Se le determina la densidad a la suspensión, con el fin de conocer el volumen de la muestra en mililitros.

(25°C)

$$\text{Densidad} = \frac{\text{peso picnómetro c/muestra} - \text{peso picnómetro vacío}}{\text{peso picnómetro c/agua} - \text{peso picnómetro vacío}}$$

$$V_m = \frac{P_m}{\rho_m}$$

V_m : Volumen de muestra en mililitros.

P_m : Peso de la muestra en gramos.

ρ_m : Densidad de la muestra.

La concentración de analito en la muestra puede obtenerse matemáticamente utilizando la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{A_m}{A_{STD}}\right) \times \left(\frac{100 \text{ ml}}{V_m \text{ ml}}\right) \times (50 \text{ ml}) \times \left(\frac{P_{STD}}{100 \text{ ml}}\right) \times (5 \text{ ml}) \times \left(\frac{\text{Pureza STD } \%}{100 \%}\right) = \text{mg/ml}$$

A_m : Area de la muestra.

A_{STD} : Area del estándar.

V_m : Volumen de la muestra en mililitros.

P_{STD} : Peso del estándar en miligramos.

Pureza STD: Pureza del estándar en porcentaje.

Para la precisión de la metodología se realiza 3 inyecciones del estándar y dos inyecciones de cada muestra.

APENDICE II.

En las siguientes tablas se muestran los valores observados y predichos que se emplearon para cada cualidad de la validación en la evaluación del porcentaje de error relativo, como el % de error relativo. Los datos de porcentaje se obtuvieron a partir de las áreas y empleando la fórmula del apéndice I.

No. DE EXPERIENCIA	VALOR OBSERVADO	VALOR PREDICHO	% DE ERROR RELATIVO
1	79.55	79.37	0.18
2	79.67	79.37	0.30
3	79.36	79.37	0.01
4	79.55	79.37	0.18
5	78.17	79.37	1.20
6	78.76	79.37	0.61
7	90.02	89.63	0.39
8	89.76	89.63	0.13
9	89.90	89.63	0.27
10	88.90	89.63	0.73
11	89.82	89.63	0.19
12	90.13	89.63	0.50
13	99.93	99.89	0.04
14	100.04	99.89	0.15
15	100.02	99.89	0.13
16	100.14	99.89	0.25
17	99.49	99.89	0.40
18	100.37	99.89	0.48
19	110.44	110.15	0.29
20	110.04	110.15	0.11
21	110.36	110.15	0.21
22	110.48	110.15	0.33
23	110.10	110.15	0.05
24	110.67	110.15	0.52
25	120.49	120.41	0.08
26	120.07	120.41	0.34
27	120.44	120.41	0.03
28	120.19	120.41	0.22
29	119.53	120.41	0.88
30	120.35	120.41	0.06

TABLA XXIII. DATOS DE PORCENTAJE DE ERROR RELATIVO PARA LA LINEALIDAD DEL SISTEMA.

No. DE EXPERIENCIA	VALOR OBSERVADO	VALOR PREDICHO	% DE ERROR RELATIVO
1	100.32	99.97	0.32
2	100.00	100.00	0.00
3	100.19	100.00	0.19
4	100.16	100.00	0.16
5	100.07	100.00	0.07
6	100.55	100.00	0.55
7	99.98	100.00	0.02
8	100.34	100.00	0.34
9	99.83	100.00	0.17
10	99.24	100.00	0.76
11	99.59	100.00	0.41
12	99.72	100.00	0.28

TABLA XXIV. DATOS DE PORCENTAJE DE ERROR RELATIVO, PARA LA PRECISION DEL SISTEMA

No. DE EXPERIENCIA	VALOR OBSERVADO	VALOR PREDICHO	% DE ERROR RELATIVO
1	79.46	79.17	0.29
2	79.47	79.17	0.30
3	79.53	79.17	0.36
4	79.32	79.16	0.44
5	79.13	79.76	0.63
6	78.60	79.76	1.16
7	88.22	89.30	1.08
8	90.22	89.30	0.92
9	89.47	89.30	0.17
10	91.18	89.89	1.29
11	90.12	89.89	0.23
12	89.42	89.89	0.47
13	99.61	99.43	0.18
14	99.61	99.43	0.18
15	99.57	99.43	0.14
16	100.60	100.02	0.58
17	100.01	100.02	0.00
18	100.63	100.02	0.61
19	109.96	109.56	0.40
20	109.71	109.56	0.15
21	109.81	109.56	0.25
22	110.37	110.14	0.22
23	108.26	110.14	1.80
24	109.49	110.14	0.65
25	118.91	119.69	0.78
26	118.73	119.69	0.96
27	119.17	119.69	0.52
28	121.03	120.27	0.75
29	121.59	120.27	1.31
30	120.49	120.27	0.21

TABLA XXV. DATOS DE PORCENTAJE DE ERROR RELATIVO PARA LA LINEALIDAD DEL METODO.

No. DE EXPERIENCIA	VALOR OBSERVADO	VALOR PREDICHO	% DE ERROR RELATIVO
1	100.61	100.63	0.02
2	99.60	99.62	0.02
3	99.35	99.33	0.02
4	100.23	100.23	0.00
5	100.72	100.73	0.01
6	100.02	100.03	0.00
7	100.11	100.11	0.00
8	100.94	100.92	0.02
9	100.02	100.02	0.00
10	100.89	100.88	0.01
11	99.75	99.74	0.01
12	99.77	99.78	0.01

TABLA XXVI. DATOS DE PORCENTAJE DE ERROR RELATIVO PARA LA EXACTITUD DEL METODO.

No. DE EXPERIENCIA	VALOR OBSERVADO	VALOR PREDICHO	% DE ERROR RELATIVO
1	100.61	100.57	0.04
2	99.60	99.71	0.11
3	99.35	99.77	0.42
4	100.23	100.08	0.14
5	100.72	100.64	0.08
6	100.02	99.96	0.06
7	100.11	100.25	0.14
8	100.94	100.51	0.43
9	100.02	100.19	0.17
10	100.89	100.48	0.40
11	99.75	100.02	0.27
12	99.77	99.81	0.04
13	100.52	100.30	0.22
14	100.71	100.86	0.15
15	100.57	100.31	0.26
16	100.95	100.97	0.02
17	100.65	100.35	0.30
18	100.71	100.97	0.26
19	100.06	100.04	0.02
20	100.99	101.06	0.07
21	100.26	100.17	0.09
22	100.92	100.95	0.03
23	99.99	99.99	0.00
24	100.56	100.91	0.35

TABLA XXVII. PORCENTAJE DE ERROR RELATIVO PARA REPRODUCTIBILIDAD

APENDICE III

CALCULOS Y CRITERIOS DE ACEPTACION PARA LA VALIDACION DE UN METODO ANALITICO

1. LINEALIDAD.

CALCULOS

1.1. Tabular los resultados en base al siguiente formato:

CANTIDAD ADICIONADA (x)	CANTIDAD MEDIDA (y)	TOTAL (y ²)
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

1.2. Calcular

$$\begin{array}{l} \sum x = \underline{\hspace{2cm}} \\ \sum x^2 = \underline{\hspace{2cm}} \\ \sum xy = \underline{\hspace{2cm}} \\ t = \underline{\hspace{2cm}} \\ r = \underline{\hspace{2cm}} \end{array} \quad \begin{array}{l} \sum y = \underline{\hspace{2cm}} \\ \sum y^2 = \underline{\hspace{2cm}} \\ \sum yi = \underline{\hspace{2cm}} \\ n = \underline{\hspace{2cm}} \end{array}$$

1.3. Calcular el valor de la pendiente:

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

1.4. Calcular el valor de la ordenada al origen:

$$b = \frac{\sum y}{n} - m \frac{\sum x}{n}$$

1.5. Construcción de la tabla del análisis de varianza (ANAVEVA):

1.5.1. Calcular la suma de cuadrados de regresión (SCr) y la suma de cuadrados del error de regresión (SCer) con las siguientes ecuaciones:

$$SCr = m \cdot Sxy + b (Sy) - [(Sy)^2/n]$$

$$SCer = Sy^2 - m (Sxy) - b (Sy)$$

1.5.2. Calcular la suma de cuadrados del error puro (SCep) y la suma de cuadrados de la falta de ajuste (SCfa) con las siguientes ecuaciones:

$$SC_{ep} = S_y^2 - [(S_{y \cdot}^2)/r]$$

donde:

r = número de réplicas

$$SC_{fa} = SC_{er} - SC_{ep}$$

1.5.3. Tabla de ANADEVIA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F _{exp.}
REGRESION	1	SCr	SCr	$\frac{M_{Cr}}{M_{Cer}} = F_r$
ERROR DE REGRESION	n - 2	SCer	$\frac{SC_{er}}{g_{ler}}$	
FALTA DE AJUSTE	(n-2)-t(r-1)	SCfa	$\frac{SC_{fa}}{g_{lfa}}$	$\frac{M_{Cfa}}{M_{Cep}} = F_{fa}$
ERROR PURO	t(r-1)	SCep	$\frac{SC_{ep}}{g_{lep}}$	

TABLA XXVIII. CONSTRUCCION DE LA TABLA DE ANALISIS DE VARIANCIA (ANADEVIA), PARA LA LINEALIDAD

1.5.4. Determinar en la tabla de distribución de 'F' los valores para F_r ($g_{lr}, g_{ler}; 0.01$) y F_{fa} ($g_{lfa}, g_{lep}; 0.05$).

1.6. Calcular el coeficiente de determinación (r^2) y correlación (r) por medio de las siguientes ecuaciones:

$$r^2 = \frac{[n(S_{xy}) - (S_x)(S_y)]^2}{[n(S_x^2) - (S_x)^2][n(S_y^2) - (S_y)^2]}$$

$$r = r^2$$

Donde:

S = Desviación estándar

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

CRITERIOS

- 1.- El valor de la pendiente (m) debe aproximarse a 1.
- 2.- El valor de la ordenada al origen (b) debe aproximarse a 0
- 3.- ANADEVIA

Establecer la decisión en base a lo siguiente:

Si $F_r \geq F$ (glr, gler; 0.01):

Existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida.

Si $F_r \leq F$ (glr, gler; 0.01):

No existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida.

Si $F_{fa} \geq F$ (glr, gler; 0.05):

Existe falta de ajuste a la relación lineal simple cantidad adicionada y propiedad medida.

Si $F_{fa} \leq F$ (glr, gler; 0.05):

No existe falta de ajuste a la relación simple cantidad adicionada y propiedad medida.

4.- $r^2 \geq 0.98$

$r \geq 0.99$

5.- C.V. = 2.0 %

1.7. Intervalo de confianza para la ordenada al origen.

1.7.1. Calcular la desviación estándar de la regresión (S_{yx}) con la siguiente ecuación:

$$S_{yx} = (S_{CER} / g_{ler})^{1/2}$$

1.7.2. Calcular la desviación estándar de la ordenada al origen:

$$S_b = S_{yx} \left[\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{(Sx^2) - (Sx)^2/n} \right]$$

1.7.3. Determinar en la tabla de distribución "t" de Student, el valor para t (n-2, 0.975).

1.7.4. Calcular el intervalo de confianza para la ordenada al origen [IC(b)] por medio de la siguiente ecuación:

$$IC(b) = b \pm t(n-2, 0.975) (S_b)$$

1.8. Intervalo de confianza para la pendiente.

1.8.1. Calcular la desviación estándar de la pendiente:

$$S_m = S_{yx} \left[\frac{1}{(Sx^2) - (Sx)^2 / n} \right]^{1/2}$$

1.8.2. Calcular el intervalo de confianza para la pendiente IC(m):

$$IC(m) = m \pm t(n-2, 0.975) (S_m)$$

1.9. Calcular el coeficiente de variación por nivel de concentración.

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

2. EXACTITUD

2.1. Tabular los resultados de porcentaje recuperado.

PORCENTAJE RECUPERADO
(y)

2.2. Calcular la suma del porcentaje recuperado (Σy), la suma de cuadrados del porcentaje recuperado (Σy^2) y determinar el número de recobros (n).

2.3. Calcular la media aritmética.

$$\bar{y} = \frac{\Sigma y}{n}$$

2.4. Calcular la desviación estándar.

$$s = \sqrt{\frac{n \cdot \Sigma y^2 - (\Sigma y)^2}{n(n-1)}}$$

2.5. Determinar en la tabla de distribución de 't' student el valor de t (n-1, 0.975).

2.6. Calcular el intervalo de confianza 95% para la media.

$$IC = \bar{y} \pm t_{0.975} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

2.7. Calcular el coeficiente de variación

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

CRITERIOS DE ACEPTACION.

1.- Hacer prueba de hipótesis para la media.

$$H_0 : \bar{x} = \mu$$

$$H_1 : \bar{x} \neq \mu$$

Donde:

$$\mu = 100 \% \text{ adiconado}$$

Nivel de significancia (α) = 0.050

Calcular la 't' experimental

$$t_{exp} = \frac{\bar{x} - \mu}{S / n^{1/2}}$$

Donde: S = Desviación estándar.

$$I.C. = \bar{x} \pm t_{tab} \frac{S}{n^{1/2}}$$

Buscar el valor de t_{tab} en las tablas para $n-1$ grados de libertad y $\alpha = 0.05$ (mismo valor que el IC).

Comparar el valor de T experimental con el T de tablas.

Si el valor de t $0.025 < t_{cal} < t$ 0.975 no se rechaza H_0 y el método puede considerarse exacto con un $\alpha = 0.050$.

El valor del C.V. debe estar de acuerdo al valor establecido, el cual es del 2% .

3. PRECISION.

- 3.1. Calcular la media aritmética.
- 3.2. Calcular la desviación estándar.
- 3.3. Calcular el coeficiente de variación.

4. REPRODUCIBILIDAD.

- 4.1. Tabular los resultados de acuerdo al siguiente formato:

ANALISTA (α_j)		1	2
DIA (β_{j1})	1	Y111	Y211
		Y112	Y212
		Y113	Y213
	2	Y121	Y221
		Y122	Y222
		Y123	Y223

TABLA XXIX. MATRIZ DE TRATAMIENTO PARA REPRODUCIBILIDAD.

Donde:

Primer subíndice = Resultado de cada analista 'Y'

Segundo subíndice = Resultado de cada analista en cada día.

Tercer subíndice = Resultado de cada analista para cada repetición.

Modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j (i) + \epsilon_k (ij)$$

2.- Calcular las siguientes sumatorias

$$Y = (Y111 + Y112 + Y113 + Y121 + Y122 + Y123 + Y211 + Y212 + Y213 + Y221 + Y222 + Y223)$$

$$Y1 = (Y111 + Y112 + Y113 + Y121 + Y122 + Y123)$$

$$Y2 = (Y211 + Y212 + Y213 + Y222 + Y223)$$

Donde:

a = analista

d = día

r = repeticiones

$$SC \text{ analista} = \frac{(Y11\dots)^2 + (Y2\dots)^2}{ar} - \frac{(Y\dots)^2}{adr}$$

$$SC \text{ día} = \frac{(Y11\dots + Y12\dots + Y21\dots + Y22\dots)}{r} - \frac{(Y1\dots)^2 + (Y2\dots)^2}{dr}$$

$$SC \text{ error} = (x_{ijk})^2 - \frac{(Y11\dots)^2 + (Y12\dots)^2 + (Y21\dots)^2 + (Y22\dots)^2}{r}$$

4.3. Construir con los datos anteriores la tabla de análisis de variancia (ANADSV4).

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F _{exp.}	F _{tab}
α1	a - 1	SCa.	SCa / gla	MCa/MCd	Fgla/gld
β1	(d - 1)a	SCdía	SCd / gld	Mcd/MCe	Fgld/gle
cx	(r - 1)ad	SCerror	SCe / gle		

TABLA XXX. ANALISIS DE VARIANCIA (ANADSV4), PARA REPRODUCIBILIDAD DEL METODO.

4.4. Calcular la variación interanalista de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Variación interanalista} = \pm \left[\frac{MCa - Mcd}{rd} \right]^{1/2}$$

- 4.5. Calcular la variación interdiás para cada analista a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Variación interdiás} = \sqrt{\left[\frac{MCd}{r} - \frac{MCE}{r} \right]^{1/2}}$$

- 4.6. Calcular la repetibilidad del método.

$$\text{Repetibilidad} = (MCE)^{1/2}$$

- 4.7. Calcular el coeficiente de variación total.

- 4.7.1. Calcular la media aritmética total, con la siguiente ecuación:

$$\bar{y} = \frac{\sum y_{...}}{n}$$

Donde: n = adr

- 4.7.2 Calcular la desviación estándar total con la siguiente ecuación:

$$S = \frac{\sqrt{n \sum \sum y_{ijk}^2 - (y_{...})^2}}{n(n-1)}$$

- 4.7.3 Calcular el coeficiente de variación total.

$$C.V. = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$$

CRITERIOS DE ACEPTACION.

1.- ANADEV

Regla de decisión:

Si $F_{cal} > F_{tab}$, H_0 se rechaza.

Si $F_a < F(g_{1a}, g_{1d}; 0.05)$:

El método analítico es reproducible por los analistas.

Si $F_a > F(g_{1a}, g_{1d}; 0.05)$:

El método analítico no es reproducible por los analistas.

Si $F_d < F(g_{1d}, g_{1e}; 0.05)$:

El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

Si $F_d > F(g_{1d}, g_{1e}; 0.05)$:

El método analítico no es reproducible en distintos días por un mismo analista.

2.- Coeficiente de variación. Este debe de corresponder al valor reportado, el cual es del 2 %.

14. BIBLIOGRAFIA

1. Adamovics A. Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals. Primera edición. Ed. Marcel Dekker, Inc. USA, (1990) 8-15.
2. Alcántara A. Validación de métodos analíticos. Pharma News., vol 1, no. 4 (1990) 19-20.
3. Anderson R. Practical Statistics for Analytical Chemists. 1a edición. Ed. Van Nostrand Reinhold, USA. (1987) 122-139.
4. Bello G. La Cromatografía líquida de alta resolución. Pharma News, (1992) 2(1): 19-23.
5. Box George. Estadística para investigadores. 1a. edición. Ed. Reverté. España (1988), 109-120.
6. Cejudo U., Vázquez R. Desarrollo de un método analítico por volumetría en medio no acuoso para determinar albendazol en tabletas. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, (1992) 23(2): 9-14.
7. Clark's. Isolation and identification of drugs in Pharmaceuticals. 5ta edición. Ed. Staff, Gran Bretaña (1986) 323.
8. Chester P., Clifton R. Parasitología Clínica. Salvat editores. 2da. edición. España, (1986) 571-577.
9. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación. Colegio Nacional de QFB., AC. Requisitos mínimos para la validación de métodos analíticos. México, 1986.
10. Connors K. Curso de análisis fundamental. Editorial Reverté, España, (1980), 403-448
11. Debesis E., Boehlert J., et al. Submitting HPLC methods to the compendia and regulatory agencies. Pharmaceutical Technology, (1982) 6(9):120-137.
12. Dux James. Handbook of Quality Assurance For The Analytical Chemistry Laboratory. 2da. edición. Ed. Van Nostrand Reinhold, New York, (1990), 59-75.
13. Escobar A., Flisser A., Cisticercosis. Instituto Nacional de Salud Pública. 2da. edición. Editorial Fondo de Cultura Económica. México, (1987) 74-75.

14. Gazder A.J., Roy J. Albendazole suspension in the treatment of intestinal helminthiasis in children. *Current Therapeutic Research*, (1987) 41(3): 324-327.
15. Guermouche S., Jilali G. Variation de la concentration du sulfoxyde d'albendazole dans le sérum, la membrane et le liquide hydatiques en fonction du temps. Etude par chromatographie en phase liquide. *Ann. pharmaceutiques francaises*, (1987) 45(6) : 439-444.
16. Guerra Johnny. Validation of analytical methods by FDA laboratories. *Pharmaceutical Technology*, (1986) 3: 74-84.
17. Hoaksey P., Awadzi K. Rapid and sensitive method for the determination of albendazole and albendazole sulphoxide in biological fluids. *Journal of Chromatography*, (1991) 566: 244-249.
18. Hurtado M., Medina M., Sotelo J., Jung H. Sensitive high-performance liquid chromatographic assay albendazol and its main metabolite albendazol sulphoxide in plasma and cerebrospinal fluid. *Journal of Chromatography and Biomedical Applications*, (1989) 494: 403-407.
19. Inman E., Frischmann J., et al. General Method Validation Guidelines for Pharmaceutical Samples. *Journal of Chromatographic Science*, (1987) 25: 252-256.
20. Jiménez E. Parámetros Estadísticos y Procedimientos de Validación, criterios de aceptación. II Parte. (1990) 1(6): 15-20.
21. Kateman G. Quality Control in Analytical Chemistry. Ed. John Wiley and Sons. 1a. edición. (1981) vol. 60, 72-93.
22. Keenan Taylo J. Quality Assurance of Chemical Measurements. 7a edición. Lewis Publishers, Inc. USA, (1990) Capítulo 21, 193-194.
23. Leech J., Sande M., Root R. Parasitic Infections. Churchill Livingstone. Estados Unidos de América, (1988) Vol. 7, 336-339.
24. Loftus Bernard T., Nash Robert A. Pharmaceutical Process Validation. Primera edición. Marcel Dekker, Inc. USA, (1984) Cap. 9 y 10, 251-277.

25. Martín Pérez A. Métodos fisicoquímicos de Análisis. Primera edición. Ed. Urmo, S.A. España (1975), 258-262.
26. Mehta A.C. The validation criteria for analytical methods used in pharmacy practice research. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, (1989) 14: 465-473.
27. Merck, Co., In. *The Merck Index*. 11a. edición. U.S.A, (1989) 36.
28. Misra R.C., Dewan R., et al. Albendazole: a new drug in the treatment of intestinal helminthiasis (nematodes and cestodes). *Current Therapeutic Research*, (1983) 33(5): 758-761.
29. Morris DS., Dykes PW., Dickson B., Marriner S., Bogan J. A., Burrows FGO. Albendazole in hydatid disease. *British Medical Journal*, (1983) 286: 103-104.
30. Mulholland M. Expert system for method validation in chromatography. *Journal of Chromatography* (1989) 485:283-296.
31. Patterson S. Use of solvent selectivity optimization procedures for high-performance liquid chromatographic method development. *Journal of Chromatography*, (1992) 592: 43-49.
32. Quattrocchi Oscar, et al. Introducción a la HPLC. Editorial Merck. Argentina, (1992) 267-300.
33. Rampazzo, P. Standardisation and validation of analytical methods in the pharmaceutical industry. *Farmaco*, (1990) 45 (6): 807-815.
34. Sadlej-Sosnowska. Validation of chromatographic retention models in reversed-phase high-performance liquid chromatography by fitting experimental data to the relevant equations. *Journal of Chromatography*, (1992) 595: 53-61.
35. Salmot A.G., Cremieux A.C., Hay J.M., Meulemans A., Giovanangeli M.D., Delaitre B., Coulaud J.P. Albendazole as a potential treatment for human hydatidosis. *The Lancet*, (1983) 8351: 652.

36. Sheinin E. Laboratory evaluation of proposed NDA analytical methodology. *Pharmaceutical Technology* (1986), 9: 82-96.
37. Soberon G. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. 5ta. edición. Secretaria de Salud. México, (1988) 972-973.
38. Szepesi G., Gazdag M., Mihályfi K. Selection of High-performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis. *Journal of Chromatography*, (1989) 464: 265-278.
39. Taylor John. *Validation of Analytical Methods*. *Analytical Chemistry* (1983) 55(6): 600-608.
40. Townsend L.B., Wise D.S. *The Synthesis and Chemistry of Anthelmintic Benzimidazoles*. *Parasitology Today*, (1990) 6(4): 107-136.
41. USP XXII. USP Inc. USA, 1990. 1711-1712.
42. Vanderwielen Adrianus J., Hardwidgw E. Guidelines for assay validation. *Pharmaceutical Technology*, (1982) 6(3): 66-76.
43. Yost R., Ettore L., Conlon R. *Introducción a la cromatografía líquida práctica*. Editorial Perkin-Elmer. U.S.A. (1981) 3-49