



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

DESARROLLO DE METODOS ANALITICOS Y
ESTUDIOS DE ESTABILIDAD PARA LA
SULFAMETAZINA SODICA EN MATERIA PRIMA Y
PLASMA. DESARROLLO Y VALIDACION DE UN
METODO ANALITICO PARA EVALUAR LA
ESTABILIDAD DE LA SULFAMETAZINA SODICA
POR CLAR

I N F O R M E
DE SERVICIO SOCIAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
MARIA DOLORES AGUILAR SANCHEZ

ASESORES: DRA. RAQUEL LOPEZ ARELLANO,
Q.F.B. JOSE ANTONIO GARDUÑO ROSAS.

259429

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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 el Informe de Servicio Social: Desarrollo de Métodos Analíticos y Estudios de Estabilidad para la Sulfametazina Sódica en Materia Prima y Plasma. Desarrollo y Validación de un Método Analítico para Evaluar la Estabilidad de la Sulfametazina Sódica por CLAR., que presenta la pasante: María Dolores Aguilar Sánchez con número de cuenta: 8907419-8 para obtener el TITULO de: Química Farmacéutica Bióloga .

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestra VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 7 de Enero de 1998

PRESIDENTE D.A.R. Juan José Díaz Esquivel

VOCAL D.E.S.S. Rodolfo Cruz Rodríguez

SECRETARIO Dra. Raquel López Arellano

1er. SUPLENTE Q.F.B. Guadalupe Rebollar Barrera

2do. SUPLENTE M. en C. Efrén Hernández Baltazar

AGRADECIMIENTOS.

*A mi Madre: Antonia Sánchez
Por sus sacrificios para mi superación personal.*

*A mi Padre: Santiago Aguilar
Por su apoyo y confianza que siempre me ha brindado.*

*A mis hermanos: Inere, Genaro, Miguel, Irma, Alfredo, Gloria, Luis y
Enrique (†):
Por que cada uno me ha ayudado a crecer y me ha enseñado que
con esfuerzo y dedicación todo es posible.*

*A Rubén Arreola:
Por su apoyo, amor y comprensión. Y por compartir
conmigo todos mis logros y derrotas*

*A mis Asesores:
Dra: Raquel López y QFB: J. Antonio Garduño
Por brindarme la oportunidad de aprender algo más para mi
superación profesional y por su interés en la superación académica.*

Al M. en C.: Efrén Hernández:

Por su ayuda incondicional como maestro y amigo. Y por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y aprender cosas nuevas que me han ayudado a crecer profesionalmente.

A Margot, Ana y Miguel:

Por los momentos que hemos compartido y porque han sido parte de mi superación personal y profesional.

A la Generación 19^a de QFB:

Por todas las experiencias que compartimos a lo largo de la carrera.

A Fundación UNAM a través de la Secretaría de Asuntos Estudiantiles:

Por el apoyo económico que nos brindan para finalizar nuestros estudios profesionales.

A las siguientes organizaciones por su apoyo para la realización de este trabajo:

- CONACYT
- UNAM a través de su Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica.
- Internacional Química Carter.

A Nuestra Casa de Estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México:

Por permitirme ser Universitaria y poder sentirme orgullosa de ello.

DEDICATORIAS

*A mis Padres y Hermanos.
Gracias por confiar en mí y apoyarme siempre.
¡Los Quiero!*

*A Rubén Arreola.
Su presencia en mi vida siempre ha sido fuente de motivación*

*Al QFB: J. Antonio Garduño.
Por el gran interés que mostró en la realización de éste
trabajo y su paciencia para la formación de nuevos
profesionistas.*

*A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
Lugar donde me forme como profesionista, y en donde
he vivido momentos que nunca olvidaré.*

Í N D I C E

ABREVIATURAS 1
INTRODUCCIÓN 3
OBJETIVO 4
CAPITULO I MARCO TEÓRICO 5
1. GENERALIDADES DE LA SULFAMETAZINA BASE Y SÓDICA. 5
1.1. Nombre y Estructura. 5
1.2. Propiedades Fisicoquímicas. 6
1.3. Estabilidad. 8
1.4. Actividad Farmacológica 8
1.5. Métodos de Análisis. 8
2. CONCEPTOS DE ESTABILIDAD. 10
2.1. Definición de Estabilidad 10
2.2. Definición de Fecha de Expiración. 10
2.3. Factores que influyen en la Estabilidad de un Producto Farmacéutico. 10
2.4. Tipos de Estabilidad. 11
2.5. Estudios de Estabilidad. 12
2.6. Importancia de la Cinética Química en los Estudios de Estabilidad. 13
3. INSTRUMENTACIÓN Y DIFERENTES MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS A ESTUDIOS DE ESTABILIDAD 14
3.1. Métodos Analíticos. 14
3.2. Métodos Instrumentales mas Usuales. 14
4. GENERALIDADES DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN. 17
4.1. Definición de Cromatografía. 17
4.2. Equipo de Cromatografía Líquida. 17
4.3. Clasificación de la Cromatografía. 18
4.4. Cromatografía de Fase Enlazada. 20
4.4.1. Antecedentes. 20
4.4.2. Características de la Silicagel. 21
4.4.3. Preparación de la Fase Enlazada o ligada. 22
4.5. Cromatografía de Fase Inversa. 24
4.5.1. Generalidades. 24
4.5.2. Fundamento. 25
4.5.3. Fase Móvil 26
5. SOLVENTES USADOS EN CLAR. 27
5.1. Propiedades de los Solventes. 27
5.2. Preparación de las Fases Móviles. 29

6. ANÁLISIS CUANTITATIVO.	. 33
6.1. Cuantificación por Área o Altura del Pico.	. 33
6.2. Métodos para la cuantificación del Analito.	. 33
7. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.	. 36
7.1. Definición de Validación.	. 36
7.2. Características del Método Analítico.	. 36

CAPITULO II. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO.

1. OBTENCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DE LA SULFAMETAZINA SÓDICA.	. 41
1.1. Obtención de los Productos de Degradación	. 41
1.2. Separación de Ac. Sulfanílico de la Solución Degradada de Sulfametazina .	. 43
1.3. Separación del Prod. Deg.3 de la Solución Degradada .	. 44
1.4. Caracterización del Prod. Deg.3 por Espectroscopía de Masas	. 45
2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.	. 47
2.1. Selección de la Fase Móvil	. 47
2.2. Estándar Interno	. 48

CAPITULO III. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

1. MATERIAL Y EQUIPO.	. 52
1.1. Solventes	. 52
1.2. Estándares y Materias Primas	. 52
1.3. Material	. 52
1.4. Equipo	. 53
2. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	. 53
3. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS	. 54
3.1. Preparación de Soluciones para Evaluar el Sistema	. 54
3.2. Preparación de Soluciones para Evaluar el Método Analítico	. 54
3.3. Ensayo Analítico	. 57
4. DESCRIPCIÓN DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.	. 58
4.1. Características Evaluadas al Método	. 58
4.2. Criterios de Aceptación	. 61

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS	. 62
5.1. Linealidad del Sistema	. 62
5.2. Precisión del Sistema	. 65
5.3. linealidad del Método	. 66
5.4. Precisión y Exactitud del Método	. 70
5.5. Repetibilidad y Reproducibilidad	. 72
5.6. Sensitividad	. 73
5.7. Tolerancia	. 75
6. APLICACIÓN DEL MÉTODO VALIDADO	. 77
CONCLUSIONES	. 78
ANEXO 1.	. 79
ANEXO 2.	. 82
ANEXO 3.	. 87
BIBLIOGRAFÍA.	. 94

ABREVIATURAS

CLAR	<i>Cromatografía Líquida de Alta Resolución.</i>
HPLC	<i>Hight Performance Chromatography.</i>
SMZ	<i>Sulfametazina.</i>
STZ	<i>Sulfatiazol.</i>
ADP	<i>2-Amino-4,6-Dimetilpirimidina.</i>
AS	<i>Ácido Sulfanílico.</i>
α	<i>Nivel de Significancia.</i>
CH ₃ CN	<i>Acetonitrilo.</i>
CH ₃ COOH	<i>Ácido Acético.</i>
KH ₂ PO ₄	<i>Fosfato de Potasio Monobásico.</i>
H ₃ PO ₄	<i>Ácido Fosfórico.</i>
CH ₃ Cl	<i>Cloroformo.</i>
ODS	<i>Octadecilsilano.</i>
TMCS	<i>Trimetilclorosilano.</i>
ϵ°	<i>Constante Dieléctica.</i>
λ	<i>Longitud de Onda.</i>
pKa	<i>Logaritmo Negativo de la Constante de Acidez.</i>
UV	<i>Ultravioleta.</i>
R	<i>Resolución.</i>
s	<i>Desviación.</i>
cv	<i>Coefficiente de Variación.</i>
b	<i>Ordenada al Origen.</i>
m	<i>Pendiente.</i>
VIS	<i>Visible.</i>
nm	<i>Nanómetros.</i>
r ²	<i>Coefficiente de Determinación.</i>
ppm	<i>Partes por Millón.</i>
mM	<i>Milimolar.</i>
GL	<i>Grados de Libertad.</i>
SC	<i>Suma de Cuadrados.</i>
CM	<i>Cuadrado Medio.</i>
Crecup.	<i>Cantidad Recuperada.</i>
Cadic.	<i>Cantidad Adicionada.</i>
Asmz	<i>Área de la Sulfametazina.</i>
Csmz	<i>Concentración de la Sulfametazina.</i>
Astz	<i>Área del Sulfatiazol.</i>
FD	<i>Factor de Dilución.</i>
LS	<i>Límite Superior.</i>
LI	<i>Límite Inferior.</i>
DMS	<i>Diferencia Mínima Significativa.</i>
FV	<i>Fuentes de Variación.</i>

<i>FM</i>	<i>Fase Móvil</i>
<i>Tr</i>	<i>Tiempo de Retención</i>
<i>F_{calc}</i>	<i>Valor de F calculado.</i>
<i>S_{yx}²</i>	<i>Desviación Estándar de las Observaciones en Torno a la Recta de Regresión Ajustada.</i>
<i>s_x²</i>	<i>Variación de las Observaciones de y.</i>
<i>s_y²</i>	<i>Variación de las Observaciones de x.</i>

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La Sección de Tecnología Farmacéutica y el Área Pecuaria de la FES-Cuautitlán colaboran en el desarrollo de una forma farmacéutica, que permita combatir la coccidiosis en el ganado caprino. Se desea que la forma farmacéutica sea de liberación controlada y que presente como principio activo sulfametazina sódica ya que ésta ayuda a combatir la coccidiosis además de ser económica.

El desarrollo de cualquier formulación involucra una serie de etapas dentro de las cuales se encuentran los estudios de estabilidad. Estos permiten conocer la estabilidad de los fármacos, lo cual repercute en la elección de proceso y componentes de la formulación. Los estudios de estabilidad realizados al producto terminado ayudan a determinar las condiciones de almacenamiento y la fecha de expiración.

Los métodos aplicados a estudios de estabilidad deben ser a primera instancia específicos, es decir, deben ser capaces de cuantificar solo la sustancia de interés sin interferencia de algún otro componente de la muestra.

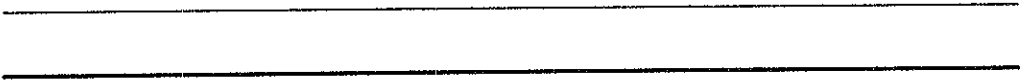
Los métodos por cromatografía de líquidos presentan una gran utilidad para el monitoreo de estabilidades, debido a que al ser un método separativo, logran identificar y cuantificar no solo el principio activo sino también sus productos de degradación. Lo anterior es posible siempre y cuando se tengan las condiciones cromatográficas adecuadas, lo cual se logra a través del desarrollo, la optimización y posteriormente la validación del método analítico, para garantizar la confiabilidad de sus resultados.

Debido a la importancia que presenta contar con métodos analíticos este trabajo se enfocó primeramente a desarrollar un método analítico que nos permita evaluar la estabilidad de la sulfametazina sódica, como materia prima, sin la interferencia de sus productos de degradación, por CLAR y posteriormente llevar a cabo la validación del método analítico.

El método desarrollado y las condiciones establecidas para la validación se consideraron tomando en cuenta que será aplicado a un estudio de estabilidad bajo las condiciones que establece la Norma Oficial Mexicana, ya que se desea aplicarlo, también, a los estudios de estabilidad de la forma farmacéutica, con las modificaciones pertinentes.

El trabajo se encuentra dividido en tres capítulos. El primero contiene los conceptos que nos permiten comprender el estudio realizado, el segundo involucra el desarrollo del método y el capítulo tres está destinado a todo lo referente a la validación del método desarrollado.

OBJETIVOS



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Desarrollar y validar un método para evaluar la estabilidad de la sulfametazina sódica, como materia prima, por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Identificar los productos de degradación de la sulfametazina sódica.
- Desarrollar un método cromatográfico, específico, que permita llevar a cabo la cuantificación de la sulfametazina sódica en presencia de sus productos de degradación.
- Validar el método desarrollado.
- Aplicar el método validado a muestras de sulfametazina sódica sometidas a condiciones drásticas de temperatura.

OBJETIVO ACADÉMICO:

Aplicar e Integrar conocimientos que permitan una mejor formación profesional para lograr un desarrollo adecuado dentro de la industria farmacéutica.

OBJETIVO SOCIAL

Colaborar en el desarrollo de una formulación de liberación controlada que permita combatir la coccidiosis en cabras y por consiguiente aumentar la producción de carne caprina y sus demás productos alimenticios derivados.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

CAPITULO I MARCO TEÓRICO

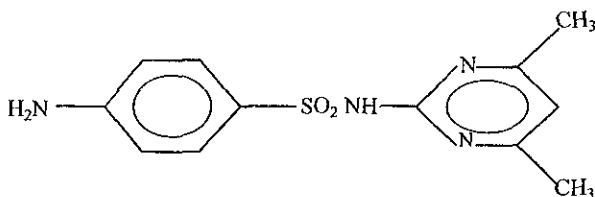
1 GENERALIDADES DE LA SULFAMETAZINA BASE Y SULFAMETAZINA SÓDICA.

1.1 Nombre y Estructura. (Florey, 1978, p.403).

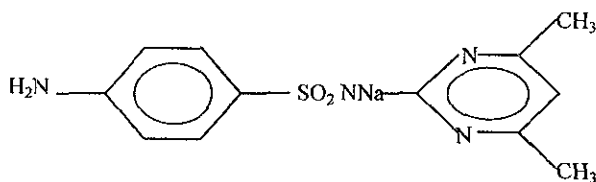
- Nombre químico: 4-Amino-N-(4,6-dimetil-2-pirimidinil)benzenosulfonamida.
- Nombre común: Sulfametazina, sulfadimerazina, sulfamidina, Sulfadimetilpirimidina. Sulfadimidina.
- Fórmula Condensada (Clarke's, 1986, p.984).

Sulfametazina base: $C_{12}H_{14}N_4O_2S$
Sulfametazina sódica: $C_{12}H_{13}N_4NaO_2S$

- Fórmula estructural:



**Sulfametazina
(SMZ)**



Sulfametazina Sódica

1.2 Propiedades Fisicoquímicas.

- Apariencia, color y olor.

Sulfametazina base: Polvo blanco, tiende a adquirir un color amarillo y oscurecerse por exposición a la luz, tiene un ligero sabor amargo y no tiene olor (Florey, 1978, p. 403).

Sulfametazina sódica: Se presenta como cristales o polvo blanco o ligeramente amarillo, higroscópico. Estos se decoloran y se descomponen lentamente al exponerse a la luz; al exponerse al aire este compuesto absorbe dióxido de carbono y llega a ser menos soluble en agua (Clarke's, 1986, p.984).

- Peso molecular (Clarke's, 1986, p.984).

-Sulfametazina base: 278.30 g/mol
-Sulfametazina sódica: 300.30 g/mol

- Espectro en U.V (Florey, 1978, p.403-409):

La figura 1 muestra el espectro al ultravioleta de la sulfametazina en agua (pH 6.6), en HCl 0.01N y en NaOH 0.01N.

A pH de 6.6, se observa un pico a 240 nm, con un rasgo a 260nm.

La sulfametazina en NaOH 0.01N muestra dos picos uno en 243nm y otro en 257nm.

Cuando el fármaco se disuelve en HCl 0.01N, se observan dos picos, uno en 241nm y el otro en 297nm.

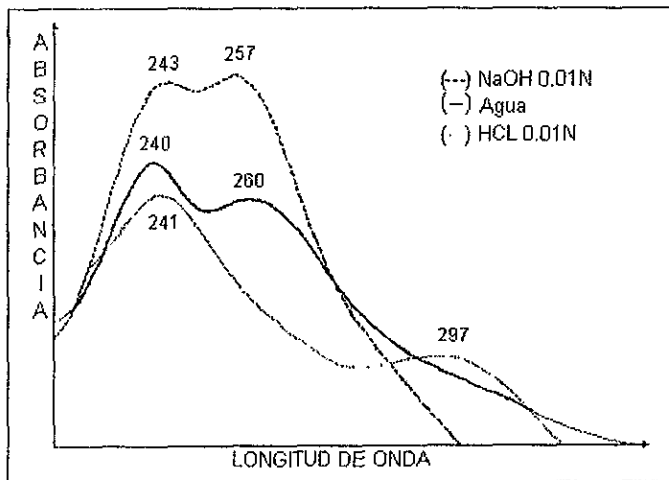


Figura 1. Espectro en UV de la Sulfametazina en Diferentes Soluciones Acuosas

- Solubilidad.

SMZ base: Es muy poco soluble en agua y cloroformo, ligeramente soluble en etanol, acetona y HCl 0.01N; poco soluble en 0.1N de NaOH e insoluble en benceno (Florey, 1978, p. 410).

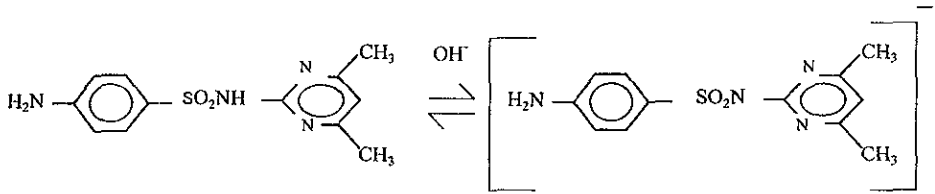
SMZ sódica: La sulfametazina sódica es soluble 1 en 25 de agua y 1 en 60 de etanol (Clarke's, 1986, p 984).

- Temperatura de fusión.

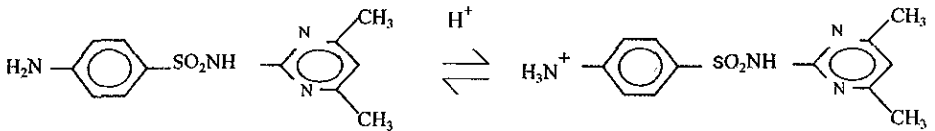
SMZ base: La USP XIX reporta que la temperatura de fusión debe ser 197°C - 200°C.

- Constante de disociación (Florey, 1978, p 410-413)

Se encontró un pKa que presenta un valor de 7.4 ± 0.2 , para el equilibrio:

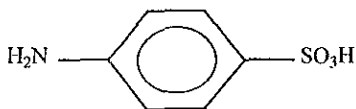


Y un pKa de 2.65 ± 0.2 para el equilibrio:

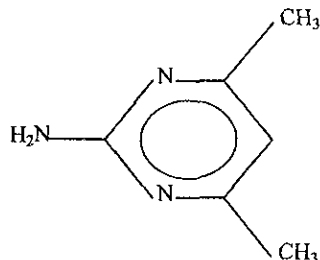


1.3 Estabilidad.

Venturella (Venturella V. S., 1968, p.1155) reporta que refluendo 10g de sulfametazina en 135 ml de HCl 2N, por 6 hrs, se obtiene ácido sulfanílico y 2-amino-4,6-dimetilpirimidina.

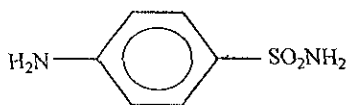


Acido Sulfanílico

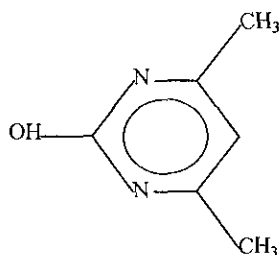


2-amino-4,6-dimetilpirimidina

Zajac-M (Zajac M, 1977) indica que de la hidrólisis ácida de la Sulfadimidina (sulfametazina) fueron aislados e identificados 4 productos de degradación: ácido sulfanílico, 2-amino-4,6-dimetilpirimidina, sulfanilamida y 2-hidroxi-4,6-dimetilpirimidina.



Sulfanilamida



2-hidroxi-4,6-dimetilpirimidina

1.4 Actividad Farmacológica.

La Sulfametazina presenta actividad antibacteriana, la cual es eficaz "in vitro" contra Streptococos y Stafilococos (Meyer L., 1982, p.383).

1.5 Métodos de Análisis.

Para la determinación de la Sulfametazina se cuenta con métodos titrimétricos, análisis colorimétrico, ensayos espectrofotométricos y cromatográficos (papel, capa fina, gases y líquida) (Florey, 1978, p 415-418). A continuación se muestra una serie de condiciones reportadas para la cuantificación de sulfametazina por CLAR (Tabla I)

Referencia	Tamaño de Columna	Material de Empaque	Longitud de Onda en UV (nm)	Vel. de Flujo (ml/min.)	Vol. Inyección (µl)	Fase Móvil
Boison, J. 1995 p. 651-658.	250 x 4.6 mm id	C ₁₈ de 5µm	265	1.2	20-50	0.05M de NaH ₂ PO ₄ - Acetonitrilo (72:28 v/v)
Boison, J. 1994 p. 558-564	250 x 4.6 mm id	C ₁₈ de 5µm	265	0.8	20-50	0.05M de NaH ₂ PO ₄ - MeOH (7.3 v/v)
Parks, O. 1982 p. 632-634	30cm x 4mm id	C ₁₈	254	1.0		H ₂ O-MeOH-Ac. Acético(1%) (80+20+0.5)
Long, A. 1990 p. 423-426	30 cm x 4 mm	ODS	270	1.0	20	0.017M H ₃ PO ₄ /Acetonitrilo (70:30 v/v)
Cox, B. 1982 p. 1311-1315	4.6 mm x 2.5 cm	C ₁₈	254	Hasta una presión de 1100 psi	20	Agua-Acetonitrilo (75:25)
Smedley, M. 1994 p. 1112-1122	250 x 4.6 mm	C ₁₈ (5µm)	265	1.5	100	MeOH- 0.01M KH ₂ PO ₄ (12:88 v/v)
Smedley, M. 1994 p. 875-879	250 x 4.6 mm	C ₁₈ (5µm)	265	1.5	100	MeOH- 0.01M KH ₂ PO ₄ (30:70 v/v)
Parasrampurria, J. 1986. p. 2511-2519	30cm x 3.9 mm	C ₈	257	2.0	20	MeOH-0.01M KH ₂ PO ₄ (16:84)
Van TKlooster, G. 1991 p. 157-168	100mm x 4mm	C ₁₈ (5µm)	265	0.8	20	MeOH-Buffer de Fosfatos (0.06M, pH=6.67) 10:90.
Goehl, T. 1978 p. 404-406	3.9mm x 30cm	C ₁₈ (10µm)	254	1.5	5	Acetonitrilo-1% Ac. Acético (13:87)

Tabla I. Condiciones Reportadas para la Cuantificación de Sulfametazina por CLAR.

2. CONCEPTOS DE ESTABILIDAD.

2.1 Definición de Estabilidad.

Estabilidad: se puede definir como la propiedad de una forma farmacéutica y/o materia prima contenida en un determinado material de empaque para mantener dentro de límites especificados y dentro del tiempo de almacenamiento y uso las características, físicas, químicas, microbiológicas y terapéuticas que tenían en el momento de ser fabricado (NOM-073-SSA1-1993, 1994, p. 63).

La *Estabilidad* también se puede definir como el lapso de tiempo desde la preparación inicial y envase, durante el cual la forma dosificada continúa cumpliendo con las especificaciones presentadas en la monografía con respecto a la identidad, pureza, calidad y potencia (Valdés J. R., p. 2).

2.2 Definición de Fecha de Expiración.

Fecha de expiración o periodo útil: Es aquella fecha que se indica en el material de envase primario y/o secundario de un medicamento, para designar el tiempo estimado durante el cual el lote del producto permanecerá dentro de las especificaciones si se conserva bajo las condiciones normales o particulares (NOM-073-SSA1-1993, 1994, p. 63).

Muchas veces el periodo útil es definido como el tiempo en el cual el producto no ha perdido más de un 10% de fármaco, sin embargo esto no se aplica cuando la DL_{50} del o los productos de degradación es mayor a la DL_{50} del principio activo. En este caso se debe realizar una evaluación adecuada para determinar el porcentaje de degradación que se aceptará (Ethel Sbarbati N., 1975, p. 3).

Asimismo no sólo debe considerarse la pureza y la toxicidad para determinar el periodo útil del fármaco, sino también es importante que cumpla con ciertas características físicas, químicas y terapéuticas.

La fecha de expiración del producto es un atributo de calidad valioso y debe estar acompañada preferiblemente por las condiciones de almacenamiento previstas por el fabricante del producto o por las especificaciones de la farmacopea (Valdés J. R., p. 2).

2.3 Factores que Influyen en la Estabilidad de un Producto Farmacéutico

Los factores que más pueden influir en la intensidad y velocidad de deterioro del producto farmacéutico son los siguientes:

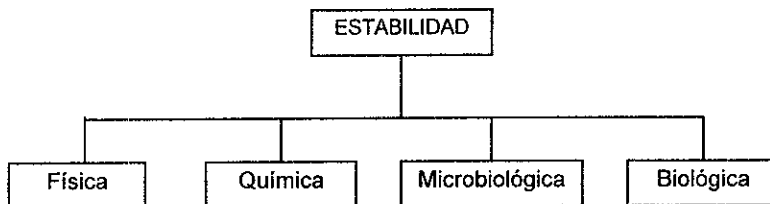
- Factores ambientales como: calor, humedad, luz, oxígeno y otras condiciones físicas (por ejemplo, vibraciones o congelación).

- Factores relacionados con el producto, entre los que pueden figurar:
 - a) Las propiedades químicas y físicas de la sustancia activa del medicamento y de los elementos auxiliares (como excipientes) utilizados (por ejemplo, la presencia de ciertas impurezas, la forma particular polimórfica o cristalina, el tamaño de las partículas y la posible presencia de agua o de otro solvente).
 - b) La forma farmacéutica y su composición.
 - c) El proceso de fabricación utilizado (inclusive condiciones ambientales y procedimientos tecnológicos)
 - d) La naturaleza del contenedor o de los envases con los que el producto puede entrar en contacto directo o que de cualquier otra forma puede influir sobre la estabilidad.

Así, se debe tener en cuenta todos los factores mencionados cuando se determine el periodo de conservación de un producto.

2.4 Tipos de Estabilidad.

Teniendo en cuenta lo expuesto en el punto anterior se puede clasificar la estabilidad desde diferentes perspectivas como se expone a continuación:



Estabilidad Física: En este caso se estudia si ha ocurrido algún cambio en las propiedades físicas tales como color, uniformidad, resuspensibilidad, transparencia, solubilidad, etc.

Estabilidad Química: Es la más estudiada, se basa en la determinación a través del tiempo del mantenimiento de la integridad durante el tiempo de vida útil señalado, empleando para ello métodos de análisis fisicoquímicos específicos. Pueden contemplar el aislamiento, purificación y determinación de productos de descomposición.

Estabilidad microbiológica: Estudia si la esterilidad o la resistencia al crecimiento microbiano establecida en una formulación es efectiva durante el periodo útil especificado. Puede incluir la determinación de la potencia en el caso de los antibióticos a fin de comprobar su caducidad

Estabilidad Biológica: Está relacionada principalmente con aquellos productos de fuerte actividad biológica tales como enzimas y hormonas, etc.

Puede también relacionarse con la estabilidad química en el estudio de la toxicidad de determinados productos de descomposición a fin de establecer los límites adecuados para los mismos (Valdés J. R., p. 3-4).

2.5 Estudios de Estabilidad.

Se pueden definir como aquellas pruebas o ensayos que se le realizan a un medicamento o materia prima para determinar como se modifican las características físicas, químicas y terapéuticas bajo la influencia de diversos factores ambientales cómo son temperatura, humedad y luz (NOM-073-SSA1-1993, 1994, p. 63), con el objeto de determinar el periodo útil y las condiciones de almacenamiento en que sus características permanecen dentro de los límites especificados (NOM-073-SSA1-1993, 1996, p. 60).

La estabilidad y fecha de caducidad de una forma farmacéutica dependerá de su formulación y de los resultados de los estudios de estabilidad realizados por el fabricante durante la etapa de desarrollo del producto y no pueden determinarse mediante sencillos análisis del producto terminado.

Los estudios de estabilidad se pueden clasificar en:

a) *Estudios de estabilidad acelerada.*

b) *Estudios de estabilidad a largo plazo.*

a) *Estudios de estabilidad acelerada:* son aquellos estudios realizados en circunstancias que incrementan la velocidad de degradación química, física y biológica de un fármaco o medicamento, utilizando condiciones exageradas de almacenamiento con el fin de poder observar las reacciones de degradación así como predecir el tiempo de conservación en condiciones determinadas.

b) *Estudios de estabilidad a largo plazo:* Son aquellos estudios que se realizan para confirmar la fecha de caducidad tentativa y se deben realizar bajo las condiciones de almacenamiento normales (NOM-073-SSA1-1993, 1994, p. 63).

2.6. Importancia de la Cinética Química en los Estudios de Estabilidad Acelerada.

Generalmente, los procesos de degradación son reacciones químicas que consumen energía y que pueden acelerarse por medio de la temperatura. La mayoría de los métodos de envejecimiento acelerados toman en cuenta esto y se fundan en mediciones de la velocidad de degradación a temperaturas superiores a la normal, para luego sacar inferencias de lo que sucedería a la temperatura ambiente. Están basados en principios fisicoquímicos y por ello se hace necesario tener conocimientos básicos de la cinética química a fin de poder interpretar los resultados.

De los métodos de envejecimiento acelerado propuestos, los que más se utilizan son: la aplicación directa de la ecuación de Arrhenius, desarrollada por Garret para la predicción de la estabilidad; el del coeficiente de temperatura, el de la relación de pendientes y el de tabla de estabildades entre otros. Mediante estos se puede evaluar la relación entre la temperatura y la velocidad de reacción (Ethel Sbarati N , 1975, p 76-84).

3. INSTRUMENTACIÓN Y DIFERENTES MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS A ESTUDIOS DE ESTABILIDAD.

3.1 Métodos Analíticos.

Un punto importante en los estudios de estabilidad, es el método analítico a emplear, el cual tiene como requisito fundamental su especificidad. Esto produce que sea poco común encontrar dichos métodos en las farmacopeas de uso general y que en repetidas ocasiones se necesite desarrollarlo (Valdés J. R., 1987, p. 55).

Al hablar del término especificidad queremos significar con ello que es necesario que el método sea capaz de medir solamente aquella parte de la molécula que sufre la descomposición. Esto puede realizarse de dos maneras (Valdés J. R., p. 4):

1. Midiendo solamente aquella parte del principio activo que no ha sufrido ninguna descomposición, sin que intervengan o interfieran los productos de degradación.
2. Midiendo solamente el o los productos de degradación que pudieran aparecer durante el curso de la degradación.

La diferencia entre los métodos de control de Calidad y los métodos analíticos para la estabilidad es evidente, ya que un método químico de control de calidad que sea capaz de cuantificar con exactitud suficiente la cantidad de principios activos contenidos en la formulación, inmediatamente después de su fabricación, es un método excelente; pero este mismo puede no ser útil pasado un tiempo después de fabricado el medicamento, ya que pudiera estar basado en la medición de determinadas partes de la molécula que permanecen inalteradas en el curso del tiempo (Valdés J. R., p. 4).

Es aconsejable que, en el caso de que se vaya a determinar la concentración del fármaco sin descomponer, el método analítico seleccionado para este fin presente un coeficiente de variación no mayor a $\pm 2\%$. (Valdés J. R., 1987, p. 55).

3.2. Métodos Instrumentales Mas Usuales (Valdés J. R., 1987, p 55-61 y Valdés J R , p.4-9).

A fin de lograr contar con las requisitos de precisión y especificidad se han usado varios métodos analíticos en los estudios de estabilidad como son:

- a) Espectrofotometría UV/VIS
- b) Colorimetría.
- c) Cromatografía en sus diferentes gamas de aplicación.

Han sido empleados también métodos tales como la calorimetría, polarimetría, la polarografía, la cromatografía de gases combinada con la espectroscopía de masas, etc.

a) Espectrofotometría UV/VIS.

Los métodos espectrofotométricos, la mayoría de las veces, permiten realizar estudios de estabilidad de manera fácil, rápida y precisa. Pero en muchas ocasiones carecen de especificidad, principalmente cuando los productos de degradación presentan un espectro idéntico al componente sin degradar.

Por otra parte este tipo de métodos no son adecuados cuando se requiere cuantificar concentraciones que se encuentran por debajo del límite de sensibilidad del método espectrofotométrico o dentro de su error experimental.

b) Colorimetría

La colorimetría ha servido como método alternativo, ya que es posible obtener coloraciones a través de reacciones con determinados grupos estructurales en la molécula, que diferencien perfectamente el componente a medir, pero también se ha visto limitada por problemas similares a la espectrofotometría UV/VIS, ya que pueden presentarse grupos funcionales que también den coloraciones similares.

c) Cromatografía

Es indiscutible que el desarrollo impetuoso de la cromatografía en sus diferentes modalidades ha dotado al analista de una excelente herramienta para enfrentar esta problemática debido no solamente a la alta sensibilidad y exactitud, sino también debido a que en esencia es un método separativo, lo que permite lograr separación de los componentes de una mezcla, con lo que pueden ser identificados y cuantificados no solo los diferentes principios activos, sino también los productos de descomposición.

La complejidad de los métodos cromatográficos va desde el más simple, como la *cromatografía en capa delgada y papel*, hasta los más sofisticados, como la *Cromatografía de líquidos de alta Resolución (CLAR)*. Los métodos en capa delgada han recibido principal atención en la problemática de la estabilidad debido a su rapidez y sencillez, así como en su bajo costo, lo que conjugado con la gran cantidad de información que nos brinda, lo hace muy útil y aconsejable.

Estos métodos han sido empleados solos y en combinación con otros como la espectrofotometría o la colorimetría.

El desarrollo de técnicas sofisticadas como la *cromatografía de gases* y la *cromatografía líquida de alta resolución*, han permitido ampliar las posibilidades analíticas aún mucho más que los métodos espectrofotométricos o la *cromatografía de capa delgada* usuales, ya que con ellos es posible la cuantificación de cantidades que pueden caer en ocasiones en niveles de los picogramos, con lo cual el enfoque del estudio de estabilidad puede ser mucho más preciso y real.

En especial la *Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución* es hoy en día una de las herramientas más empleadas por los especialistas de estabilidad, ya que posee múltiples ventajas como son:

- La introducción de la muestra en el sistema se puede realizar con solventes orgánicos y acuosos, lo que elimina y simplifica en muchas ocasiones toda una serie de pasos innecesarios para realizar la extracción de muestras.
- Debido a que el proceso cromatográfico se realiza generalmente a temperatura ambiente, se evita la descomposición del fármaco dentro de la columna cromatográfica, ya que cuando se usa cromatografía de gases es necesario la preparación de derivados que permitan estabilizar al compuesto termolábil para que pueda efectuarse la separación dentro de la columna a temperaturas elevadas sin provocar su descomposición.
- Los detectores empleados son generalmente detectores no destructivos, por lo que este método puede ser empleado no solo para la cuantificación de los productos sin degradar y/o degradados, sino que puede servir para el aislamiento e identificación de los mismos.
- Aunque el costo inicial de equipo y solventes son altos, la rapidez del análisis, la cantidad de información obtenida, la pequeña cantidad de muestra y el número de análisis que se puede realizar por jornada laboral, hace del mismo un método ideal para este tipo de estudios.
- Pueden emplearse los cuatro tipos de cromatografía (partición, adsorción, intercambio iónico y exclusión) con lo que la gama de componentes posibles a analizar es prácticamente la totalidad de las posibilidades.

Lo anteriormente señalado no implica que la *cromatografía en capa delgada* debe descartarse, ya que sirve como complemento de la *Cromatografía de Alta Resolución*.

La *cromatografía de gases* también ha sido empleada con éxito combinada con otros métodos, como por ejemplo la espectrofotometría de masas, en los estudios de estabilidad.

El desarrollo de nuevos instrumentos, conjuntamente con la aplicación de las microcomputadoras, ha dado una mayor flexibilidad y ha extendido el campo de aplicación de las técnicas cromatográficas.

El uso de las técnicas cromatográficas en una forma combinada o individual, las ha convertido en la selección por excelencia en la mayoría de los laboratorios donde se realizan estudios de estabilidad por las ventajas que presentan y sería difícil contar con un departamento de estabilidad moderno donde dichas técnicas no sean empleadas.

4. GENERALIDADES DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.

4.1 Definición de Cromatografía (Yost R. W., 1980, p. 3).

La Cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases; una de ellas es un lecho estacionario, mientras que la otra se mueve por percolación a través de este lecho.

Los procesos cromatográficos tienen lugar como resultado de repetidas adsorciones y desorciones durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo del lecho estacionario, alcanzándose la separación gracias a las diferencias en los coeficientes de distribución de los distintos componentes de la muestra.

Se utiliza "lecho estacionario" como término general para denominar cualquiera de las diferentes formas en que puede usarse la fase estacionaria, que puede estar empaquetada en una columna, extendida en forma de capa, etc. La fase móvil puede ser gaseosa o líquida.

En la cromatografía gaseosa la fase móvil es un gas, mientras que la cromatografía líquida, que es la que nos ocupa, es un líquido.

4.2 Equipo de Cromatografía Líquida (Quattrocchi O. A., 1992, p. 40).

La cromatografía líquida es en esencia, como todo método cromatográfico, un método separativo. Así, el lugar donde se produce la separación, la columna, puede considerarse el corazón del sistema cromatográfico, alrededor de la cual se monta un equipo de mayor o menor complejidad.

El cromatógrafo de Líquidos está constituido por:

- Un reservorio de solvente que alimenta al sistema con la fase móvil.
- Un sistema que permita la introducción de la muestra: Inyector o automuestreador.
- Un sistema para forzar el pasaje de la muestra y la fase móvil a través de la columna: La Bomba.
- Un sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna: el detector.
- Un sistema de registro de los datos provenientes del detector.

La señal del detector es siempre analógica y puede ser analizada tal cual por un registrador gráfico o por un integrador, o digitalizada, la cual puede ser interpretada y procesada por una computadora (con la ayuda de un programa de computo).

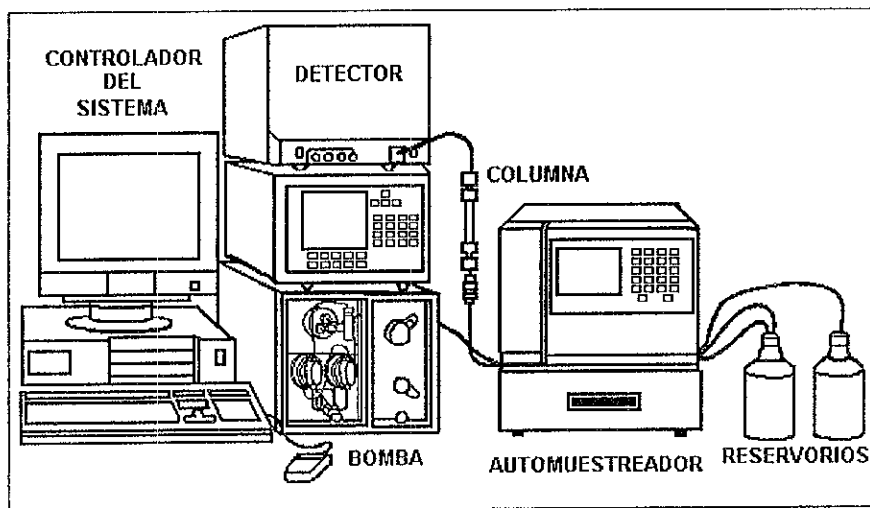


Figura 2. Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución.

4.3 Clasificación de la Cromatografía (Yost R. W., 1980, p. 4-5, 76).

Hay muchas maneras de clasificar la cromatografía Líquida en columna. Basándose en la naturaleza de la fase estacionaria y en los procesos de separación, pueden enumerarse cuatro tipos:

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

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

Algunos autores consideran el término de Fase ligada dentro de la cromatografía de partición pero otros prefieren llamarla cromatografía de fase enlazada debido a que el mecanismo de separación no solo implica la partición (Quattrocchi O. A , 1992, pag 6).

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.

Cromatografía de Exclusión: 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.

En cuanto a los dos primeros tipos, no siempre puede asegurarse cual de los procesos implicados (adsorción y reparto) desempeña el papel más importante. Por esta razón, en la práctica se definen dos o más tipos, según sea la polaridad relativa de las dos fases: cromatografía en fase normal y cromatografía en fase inversa.

En la *cromatografía en fase normal* el lecho estacionario es de naturaleza fuertemente polar (por ejemplo sílice) y la fase móvil es apolar (por ejemplo n-hexano y tetrahidrofurano). Las muestras polares quedan retenidas en la columna durante tiempos mayores que los materiales menos polares o apolares.

En la *cromatografía en fase inversa* es exactamente lo contrario. El lecho estacionario es de naturaleza apolar (hidrocarburo), mientras la fase móvil es un líquido polar, normalmente agua o un alcohol. En este caso entre más apolar sea la muestra, mayor será su retención.

Algunas veces se puede modificar la fase móvil para ajustar su polaridad. En fase normal, puede hacerse por adición de una sustancia más polar, en tanto que en fase inversa el aditivo será una sustancia menos polar.

En la figura 3 se representan estas dos técnicas, al tiempo que se indica el orden de elución de los distintos componentes de una muestra, en función de sus diferentes polaridades.

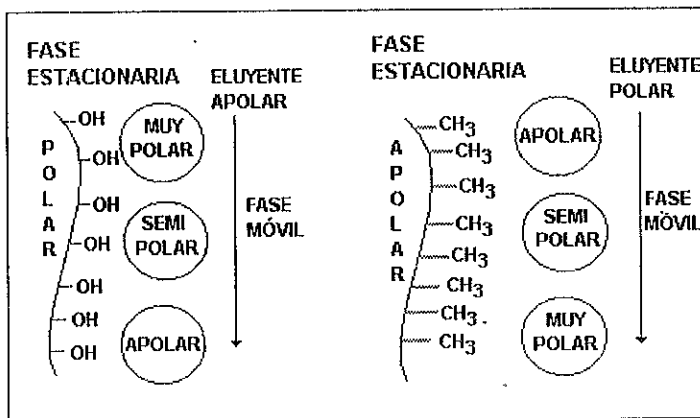


Figura 3. Ilustración de la Cromatografía Líquida en Fase Normal y en Fase Inversa. Los círculos representan los tipos de compuestos presentes en la muestra y su posición relativa en la dirección de flujo de la fase móvil indica su orden de elución.

4.4 Cromatografía de Fase Enlazada (Quattrocchi O. A., 1992, p. 89-105).

4.4.1 Antecedentes.

La cromatografía de partición fue de tal importancia que sus creadores, Martín y Syge, recibieron en 1952 el premio Nobel de Química. Sin embargo este tipo de cromatografía no estaba libre de desventajas, provocadas especialmente por la débil unión de la fase estacionaria al soporte. Para evitar la pérdida de la fase estacionaria, la fase móvil debía estar saturada en fase estacionaria, la muestra debía disolverse en esta fase móvil saturada y no podían efectuarse gradientes de elución, ni emplearse la temperatura como variable de separación.

Este problema llevó al estudio de materiales alternativos, donde la fase estacionaria estuviera químicamente unida a la fase móvil. El primer trabajo efectuado en la cromatografía de fase ligada se debe a Howard y Martin, los cuales trataron con tierra de diatomeas con dimetilclorosilano en fase vapor, obteniéndose un material hidrofóbico estable. En realidad, emplearon este material en modalidad cromatografía de partición, como soporte de octano y usaron como fase móvil mezclas hidro-metanólicas. Como la polaridad de la fase se invertía, este proceso fue llamado cromatografía de partición de fase inversa. Esta técnica tuvo gran difusión. Sin embargo, el mayor impacto de la cromatografía de la fase ligada en cromatografía líquida se produjo en 1970, cuando Kirkland y De Stefano crearon el primer relleno de fase inversa, que llamaron Permeace Octadecilsilano (ODS).

El notable aumento en la calidad del material de relleno y el avance en la instrumentación, llevaron al nacimiento y rápido crecimiento de una nueva modalidad: la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), en la cual los principales logros se concentraron en parámetros fundamentales: resolución, reproducibilidad y rapidez.

Actualmente, el método dominante es la cromatografía ligada (o enlazada) que puede clasificarse en fase normal y fase inversa, de acuerdo a la polaridad relativa de la fase móvil y los grupos funcionales químicamente ligados a la matriz. Cerca del 80% de las separaciones cromatográficas se efectúan con material de fase ligada y más del 70% corresponden a la cromatografía en fase inversa.

En la cromatografía en fase ligada, la partícula base se modifica químicamente para reemplazar sus grupos funcionales activos, los silanoles, de características polares, por determinados grupos funcionales: octadecilsilano (frecuentemente llamado ODS o C18), octilsilano (C8), fenilo, ciano (CN), amino, diol, etc

En algunos casos, la misma fase ligada puede ser empleada en fase normal o inversa según el tipo de fase móvil usada. Por ejemplo, un relleno ligado o grupos ciano funcionará en fase normal si la fase móvil es hidrófoba (por ejemplo iso octano) o en fase inversa, cuando se emplean mezclas hidroalcohólicas.

La Cromatografía de fase inversa ha desplazado no sólo a la cromatografía en fase normal (aunque nunca podría hacerlo totalmente), sino que también ocupa terrenos hasta hace poco exclusivos de la cromatografía de intercambio iónico y su empleo es progresivo para el análisis de macromoléculas, antiguamente tratadas sólo por técnicas de filtración molecular, intercambio iónico y electroforesis.

4.4.2 Características de la Silicagel.

La sílica empleada para cromatografía de adsorción es un sólido amorfo y poroso, de gran área superficial (30 a más de 500 m²/g).

Químicamente, puede definirse como un óxido de silicio hidratado, de tipo (SiO₂ · H₂O)_n, en el cual sus átomos metálicos internos están ligados entre si por átomos de oxígeno (puentes siloxano Si-O-Si) y los superficiales a grupos hidroxilo, constituyendo los grupos silanoles (Si-OH). Los cuales pueden ser "libre", "vecinal" o "germinal" y son los responsables de la actividad superficial (ver figura 4).

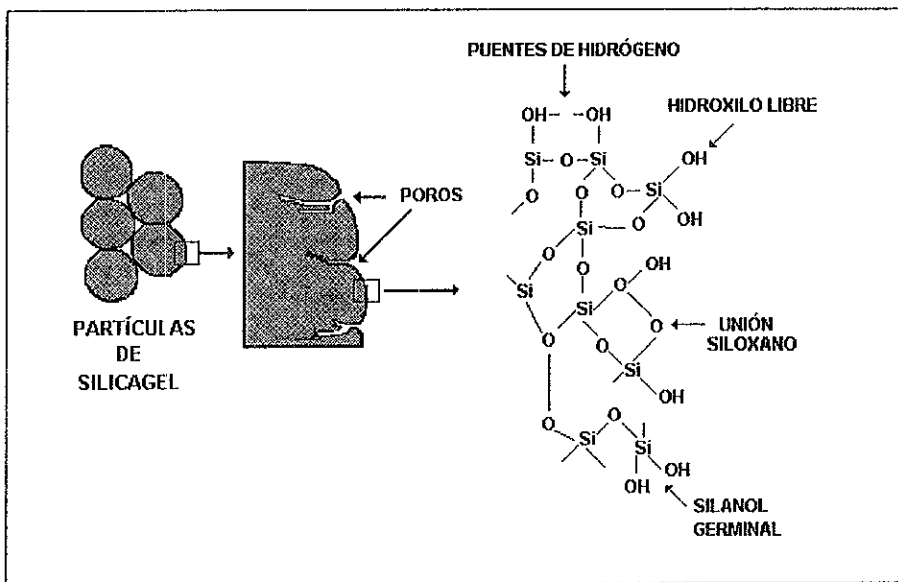


Figura 4. Estructura de la Silicagel

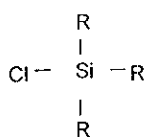
La silicagel es fuertemente higroscópica y el agua fijada por puentes de hidrógeno a los silanoles es responsable del bloqueo y pérdida de actividad.

La silicagel es insoluble en solventes no polares pero es soluble en agua, hasta 100 ppm a temperatura ambiente y pH neutro y aumenta a valores de pH mayores de 7.5. Y por ello el limitado intervalo de estabilidad a la disolución de la sílica gel en función del pH, ha generado el desarrollo de otros soporte, en base polimérica como alternativa. Actualmente, la silicagel sigue siendo el material de base más empleado y los rellenos de base polimérica debido a que permiten trabajar a intervalos de pH amplios (1-13) presenta una difusión creciente.

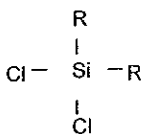
4.4.3 Preparación de la Fase Enlazada o ligada.

Las partículas de la fase ligada está compuesta por un material de base (silicagel, alúmina, agarosa, copolímero de estireno y divinilbenceno, etc.), al que se le une químicamente un compuesto que contiene un grupo funcional determinado. La mayor parte del material disponible comercialmente está formado por silicagel a la cual se ha unido un grupo funcional por unión covalente de tipo siloxano (Partícula Si-O-Si).

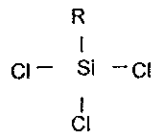
Las uniones del grupo funcional a la silicagel son básicamente cuatro: Tipo éster (Si-OR), amino (Si-NR₂), carbono (Si-CR₃) y siloxano (Si-O-SiR₃). Esta última es el de mayor difusión. Se sintetiza por reacción de los silanoles de la sílica con organo-n-halo-silanos (generalmente clorosilanos), que pueden ser monofuncionales, bifuncionales y trifuncionales. Por ejemplo para el clorosilano:



Monoclorosilano



Diclorosilano



Triclorosilano

La mayor reactividad corresponde al triclorosilano y la menor al monoclorosilano. La reacción puede efectuarse en medio anhidro, resultado la formación de una monocapa, o en presencia de agua, lo que dará lugar a la formación de capas poliméricas con diclorosilanos y triclorosilano. Los monoclorosilanos no pueden formar capas múltiples, sólo forman monocapas (ver figura 5).

Durante la silanización, la polimerización puede ser lineal o entrecruzada y el proceso es difícil de controlar. Así algunas partículas pueden contener capa poliméricas de mayor espesor que otras. Lo cual ocasiona diferencias en parámetros de importancia cromatográfica como velocidad de transferencia de masa de solutos y capacidad de carga de la columna. Incluso difícilmente se consiguen lotes de calidad reproducible.

Por estos factores, el tipo de capa de mayor difusión es la monomérica. La reacción es (ver figura 5) un ataque nucleofílico del oxígeno del hidroxilo de la sílica al átomo de silicio del silano. Este ataque se favorece por agregado de una base (piridina, imidazol), que sirve para tomar el HCl liberado y como catalizador por formación de un intermediario previo al siloxano

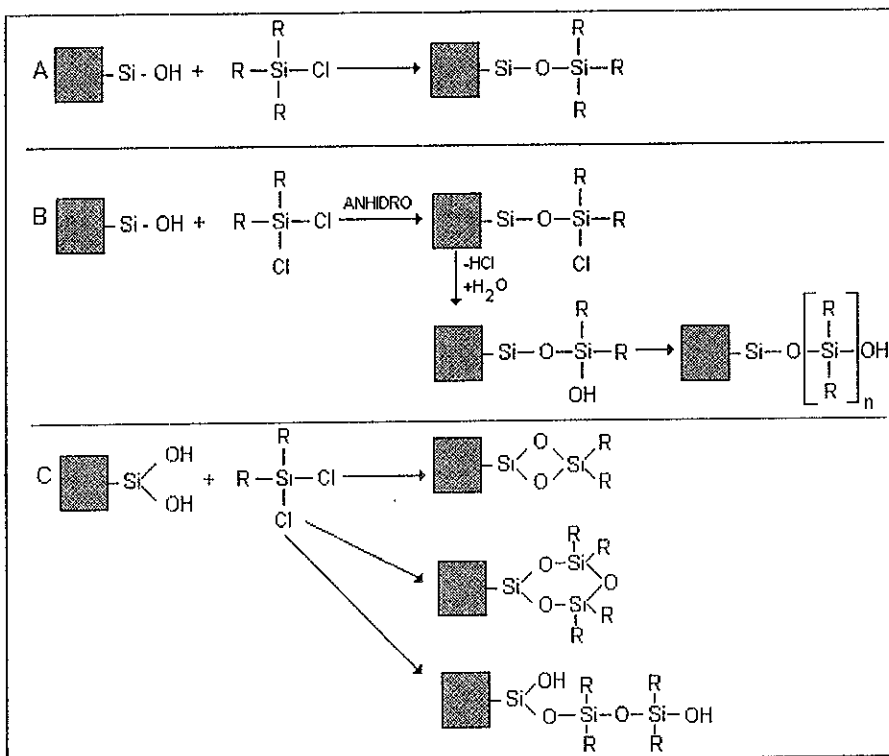


Figura 5. Algunas de las Rutas de Síntesis de la Fase Ligada a Silicagel, mostrando la unión de un organo-monoclorosilano a un silanol libre (A), y de un organo-diclorosilano a un silano libre (B) y un silanol germinal (C).

Al llevar a cabo la silanización, las moléculas de reactivo silanizante grandes (por ejemplo octadecil dimetil clorosilano) simplemente no pueden llegar a la base de los poros, especialmente si la entrada de los mismos fue objeto de reacción previa por otras moléculas silanizantes.

En una separación en fase inversa, los silanoles superficiales que no llegan a silanizarse, pueden dar lugar a mecanismos mixtos de retención, fuerte retención de solutos polares, picos asimétricos con solutos básicos (por su naturaleza ácida), adsorciones indeseables e incluso disminución de la vida media de la columna, por ofrecer un blanco al ataque por agua a la silicagel subyacente a la fase ligada.

Para eliminar o reducir el efecto de los silanoles superficiales, muchas veces se completa la silanización con moléculas grandes (que dan origen a rellenos de C18 y de C8) con una segunda silanización, pero con una molécula más chica, por ejemplo, TMCS (trimetilclorosilano) o hexametildisilazano. Este proceso, conocido como "end-capping" o "capping off", puede completar la cobertura de la matriz, pero como se ha visto y puede demostrarse por técnicas de intercambio isotópico, quedan aún grupos sin reaccionar. De cualquier modo, es poco probable que los solutos que habitualmente se manejan en Cromatografía Líquida de Fase Inversa puedan penetrar hasta la zonas en las cuales no lo ha hecho el TMCS.

4.5 Cromatografía En Fase Inversa.

4.5.1 Generalidades (Quattrocchi O. A., 1992, p.106-107).

La difusión de la fase inversa se debe a un factor clave: la silicagel, un material fuertemente higroscópico. El agua adsorbida, que forma capas simples o múltiples alrededor de la partícula y llega a tapar sus poros, es responsable de la pérdida de actividad de la fase estacionaria en fase normal, o al menos, conduce a mecanismos mixtos de retención: por una parte fenómenos de adsorción debido a los silanoles superficiales de la fase estacionaria y por otra, el mecanismo de partición entre la fase móvil y la fase estacionaria.

Empleando solventes no polares, la retención será menor en silicagel sin agua adsorbida y la retención disminuirá con el aumento del agua adsorbida al relleno. Para conseguir resultados reproducibles en la fase normal, se debe controlar rigurosamente la humedad de los solventes, sin embargo, esto no resulta tan sencillo como podría parecer ya que ni la humectación de la silicagel ni la de los solventes no polares son procesos rápidos, al menos en relación a los tiempos que se pretenden manejar en estas metodologías y la humedad del sistema puede variar durante el transcurso del día por factores ambientales, humedad del recipiente, etc.

Por otra parte, la naturaleza de los grupos funcionales de la silicagel, fuertemente activos, pueden dar lugar a otro tipo de fenómenos indeseados. Los silanoles superficiales son débilmente ácidos y estas características pueden provocar fuerte retención, a veces irreversibles de compuestos básicos, la deshidratación de alcoholes lábiles y pueden incluso comportarse como intercambiadores iónicos débiles, con capacidad de retener iones metálicos de actividad catalítica.

Estas dificultades llevaron las preferencias del analista hacia otro tipo de material, en el cual la reactividad de los grupos activos en términos cromatográficos fuera intensa y donde el contenido de agua no incidiera de tal forma sobre los resultados

Las ventajas de la cromatografía en fase inversa pueden resumirse en:

- * Compuestos no iónicos, iónicos e ionizables pueden ser separados en la misma columna, con la misma fase móvil.
- * La fuerza de atracción superficie no polar-soluto es débil.
- * La adsorción irreversible, frecuentemente en silicagel raramente ocurre.
- * La fase móvil predominante es agua, abundante y económica.
- * Se necesita poco tiempo para el equilibrio del sistema luego de un cambio de fase móvil.

4.5.2 Fundamento (Yost R. W., 1980, p. 80-82).

El proceso de separación cromatográfica en fase inversa se explica a continuación con la ayuda de la figura 6. En este tipo de cromatografía la fases móviles habitualmente son mezclas de agua-metanol o agua-acetonitrilo.

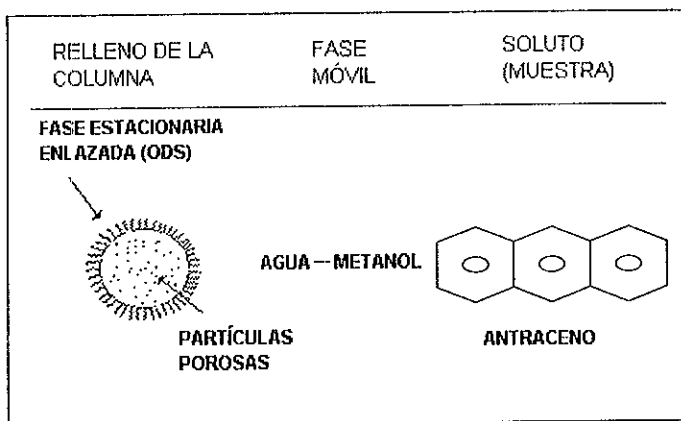


Figura 6. Ejemplo de Cromatografía Líquida en Fase Inversa Sobre un Relleno Apolar.

La molécula apolar del antraceno presenta mayor afinidad hacia la fase estacionaria apolar (ODS) que en la fase móvil, formada por una mezcla de agua-metanol. si se aumenta el contenido de metanol de la fase móvil aumentará también la afinidad del antraceno en esta fase, eluyéndose de la columna con mayor rapidez. Por el contrario, si la muestra se eluye con demasiada rapidez, hay que aumentar el contenido de agua, permitiendo así que el antraceno interaccione mayor tiempo con la fase estacionaria.

El mecanismo de la separación sobre fases enlazadas, en fase inversa, no es de reparto pura y se cree que operan simultáneamente tres mecanismos: adsorción, reparto y tensión superficial.

Horvath y Melander sugieren una posible explicación a la gran capacidad de separación de las columnas de la fase inversa, puesto que estas fases no están limitadas a los compuestos apolares a los que cabe aplicar el principio tradicional de la teoría de reparto, sino que dichas fases también pueden usarse para separar compuestos semipolares y aun muy polares, como esteroides, alcoholes etc. Estas separaciones pueden llevarse a cabo gracias a las propiedades de tensión superficial del relleno. Para grandes concentraciones de agua, las fuerzas de tensión superficial entre las moléculas de la muestra y la fase estacionaria tienden a ser muy elevadas y al aumentar la cantidad de sustancia orgánica en la fase móvil, la unión de la muestra con la fase estacionaria debida a fuerzas de tensión superficial se debilita, eluyéndose los componentes.

4.5.3 Fase Móvil (Yost R. W., 1980, p. 82-85).

En fase inversa la fase móvil es la mezcla de agua con un disolvente miscible y menos polar, como metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, etc. el agua es el disolvente "mas débil", y origina los mayores tiempos de retención. Al aumentar la concentración del disolvente menos polar disminuyen los tiempos de retención.

La elección del componente menos polar de la fase móvil depende de diversos factores, principalmente de la solubilidad de la muestra, compatibilidad fase móvil-muestra-detector, viscosidad de la fase móvil y eficiencia del equipo utilizado. Todos ellos están interrelacionados, debiéndose elegir el disolvente que mejor satisfaga todas las condiciones.

Entre los líquidos de uso general, el acetonitrilo y la mezcla de acetonitrilo agua presentan la menor viscosidad, y por lo tanto serán las fases móviles de elección en instrumentos equipados con bombas de baja presión. A causa de su baja viscosidad, el acetonitrilo puede proporcionar la mayor eficiencia. Se ha demostrado experimentalmente que cuando se utiliza acetonitrilo en lugar de metanol puede lograrse un aumento de la eficiencia de casi el 30%.

En el análisis de muestras ionizables hidrosolubles normalmente es necesario suprimir la ionización de la muestra para eliminar las colas que suelen presentar los picos de estos solutos. Para compuestos ácidos, suele ser suficiente la adición de menos de un 1% de un ácido como el fosfórico o el acético. Es preferible el fosfórico por su baja absorción en UV. También los fosfatos son muy utilizados en cromatografía de fase inversa como sales de sodio y potasio debido a su baja absorción en UV aún a longitudes de onda cortas.

Las aminas se utilizan habitualmente para reducir el coelo de los picos de sustancias con carácter básico. Las alquilaminas comúnmente usadas son la trietilamina, etilamina, dietilamina y dibutilamina, en concentraciones bajas (1-20 mM).

5. SOLVENTES USADOS EN CLAR (Quattrocchi O. A., 1992, p. 65-87).

5.1 Propiedades de los Solventes.

La fase móvil en CLAR es fundamental, ya que puede por sí misma modificar completamente la selectividad de las separaciones en fase normal y es, a la vez, el verdadero "motor" de las separaciones en fase inversa.

Se debe tomar en cuenta que no todos los solventes son adecuados para trabajar en CLAR, ya que la condición de estado líquido no es suficiente por sí misma para que una sustancia se pueda emplear como fase móvil. Un solvente apropiado para CLAR debe cumplir con algunos requisitos, entre los cuales podemos destacar los siguientes:

- *Alto poder solubilizante de la muestra.*
- *Baja reactividad.*
- *Compatibilidad con el detector utilizado.*
- *Adecuado punto de ebullición.*
- *Baja viscosidad.*
- *Seguridad.*
- *Alto grado de pureza.*

Poder solubilizante de las muestras.

Es evidente que en Cromatografía Líquida, la muestra a inyectar debe estar completamente disuelta. Es conveniente que el solvente de disolución de la muestra sea la misma fase móvil. Si esto no es posible se debe tener en cuenta tanto la miscibilidad entre el solvente de disolución y la fase móvil, como la posible precipitación de componentes de la muestra al entrar en contacto con la fase móvil.

Baja reactividad.

Los solventes con un elevado grado de reactividad no se utilizan en CLAR, ya que pueden reaccionar con la muestra, la fase estacionaria, o los componentes del equipo cromatográfico. Así por ejemplo no se utilizan oleofinas, nitrocompuestos, aldehídos ni cetonas. Los solventes con grupos cetónicos deben evitarse particularmente con columnas de fase ligada o grupos amino, dado que el producto de reacción es estable y la degradación ocasionada es irreversible.

Compatibilidad con el detector utilizado.

Teniendo en cuenta que el detector en CLAR más difundido es el espectrofotométrico, es habitual elegir un solvente "transparente" a la longitud de onda de trabajo. Esa transparencia puede evaluarse por la longitud de onda de corte λ_c , es decir, la longitud de onda a la cual la absorbancia del solvente, en una cubeta de 10mm de paso óptico, es igual a una unidad de absorbancia empleando aire como referencia (ver tabla II).

Solventes como el tolueno ($\lambda_c=285\text{nm}$) y acetona ($\lambda_c= 330\text{nm}$) prácticamente no se emplean, ya que la señal de fondo que se produce en un detector convencional (absorción de base, debida a la fase móvil) es tan alta que impide, no solamente la medición de los compuestos eluidos, sino incluso el ajuste a cero en el instrumento. Como contrapartida, el metanol ($\lambda_c=205\text{nm}$) y el acetonitrilo ($\lambda_c=190\text{nm}$) son los solventes más empleados en CLAR.

Solventes	λ_c en UV (nm)	<i>I.</i> Refracción 25°C	<i>P.</i> Ebullición (°C)	Viscosidad a 25°C	ϵ°
Agua		1.333	100	0.89	78.3
Ac. Acético		1.327	118	1.26	6 15
Acetona	330	1.356	56	0.30	0.56
Acetonitrilo	190	1.341	82	0.34	0.65
Ciclohexano	200	1.423	81	0.90	0.04
Ciclopentano	200	1.404	49	0.42	1.96
Cloroformo	245	1.443	61	0.53	0.40
Cloruro de Metilo	233	1.421	40	0.41	0.42
Dimetilsulfóxido	268	1.477	189	2.00	0.62
Dioxano	215	1.420	101	1.20	0.56
Etanol	210	1.359	78	1.08	0.88
n-Heptano	195	1.385	98	0.40	0.01
n-Hexano	190	1.372	69	0.30	0.01
Isooctano	197	1.389	99	0.47	0.01
Isopropanol	205	1.384	82	1.90	0.82
Metanol	205	1.326	65	0.54	0.95
Tetrahidrofurano	212	1.405	66	0.46	0.45
Tolueno	285	1.494	110	0.55	2.38

Tabla II. Propiedades de los Solventes Usados en CLAR.
(Quattrocchi O. A., 1992, p. 72 , Yost R. W., 1980, p.66-67)

Punto de ebullición.

En general se prefieren los solventes de punto de ebullición intermedio. Si el solvente tiene bajo punto de ebullición, su volatilidad es alta y la composición de la fase móvil puede variar durante la jornada de trabajo. Por otra parte, el ciclo de descompresión de una bomba recíproca puede llevar a la formación de burbujas, lo que se asocia con irregularidades en el caudal, atascamiento de los pistones etc. También se ha visto que un alto punto de ebullición se correlaciona, por lo general, con alta viscosidad. Esto último es sinónimo de alta presión (con ello menor vida media de los componentes del instrumento) y baja eficiencia. Sin embargo un solvente viscoso puede resultar muy útil para modificar la selectividad del sistema, y puede ser apropiado si se emplea en baja proporción

Viscosidad

La viscosidad de los solventes está estrechamente relacionada con la presión del sistema. Con solventes viscosos, la eficiencia de la separación es menor debido a que el coeficiente de difusión de la muestra se reduce y se dificulta la transferencia de masa del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

El aumento de la viscosidad reduce la permeabilidad de la columna y al mismo caudal la presión será mayor que la producida por solvente de baja viscosidad. Por ese motivo se prefiere evitar el uso de solventes de alta viscosidad como dimetilsulfóxido o isopropanol.

En el caso de mezclas de solventes, la viscosidad de la mezcla, depende preferentemente de la viscosidad del solvente menos viscoso. Sin embargo, esto no se cumple en el caso de mezclas de solventes de fuerte asociación, como las que habitualmente se utilizan en CLAR, ya que la viscosidad de la mezcla resulta mucho más elevada que la de los componentes puros. Por ejemplo, la viscosidad máxima de una mezcla de MeOH-Agua se da para un 40% de Metanol y en la mezcla AcN-Agua para un 10% de acetonitrilo.

Seguridad

Como en cualquier método analítico, en CLAR debe evitarse el empleo de solventes que, por sus características (en particular inflamabilidad y toxicidad), representan un serio riesgo para el operador. En general, se recomienda no utilizar solventes de alto grado de toxicidad como el sulfuro de carbono, benceno o tetracloruro de carbono y tomar precauciones durante la manipulación de otros solventes.

Pureza

Los Solventes empleados en CLAR deben cumplir, como se ha visto, con ciertos requisitos de calidad. La presencia de impurezas puede, por un lado, inducir modificaciones de la selectividad de la fase móvil y, por el otro, contribuir a una señal de base importante en el detector (absorbancia, reacciones de óxido-reducción, etc.)

La utilización de los solventes de menor calidad sin posterior purificación puede parecer económicamente tentadora, pero los posibles problemas asociados resultan en general en mayores costos.

5.2 Preparación de las Fases Móviles.

Al preparar la fase móvil se debe tener en cuenta.

- pH.
- filtración.
- Desgasificación.
- Métodos de desgasificación.

pH

El valor del pH de la fase móvil puede ser un parámetro crítico en la retención de solutos ionizables y en algunos casos, debe controlarse rigurosamente. Así el pH de una solución acuosa aumenta cuando se incorpora un solvente orgánico. Por otra parte, a valores de pH mayores a 7.5 se disuelve la sílice de base de las columnas, y a pH's menores a 2 se hidroliza la unión entre la sílice y la fase enlazada.

Filtración

Las filtración de las fases móviles se puede considerar como parte de un tratamiento preventivo para cuidar el adecuado funcionamiento del equipo de CLAR.

Las partículas presentes en la fase móvil pueden bloquear los filtros y tuberías del instrumento, acelerar el desgaste de sellos y rotores de inyector, afectar el normal movimiento de las válvulas de entrada y salida de las bombas, etc. Por otra parte como el tamaño de partículas que rellenan la columna es muy pequeño, en general entre 3 y 10 μm , constituyen un filtro perfecto para la retención de todo material en suspensión que se introduzca con los fluidos, ya sea fase móvil o muestra en solución. El empleo de guardacolumnas, altamente recomendado, constituye un filtro previo a la columna. La filtración se efectúa por medio de membranas de 0.45 ó 0.22 μm de porosidad en equipos de filtración adecuados (ver figura 7) y es útil para eliminar tanto las partículas como las bacterias.

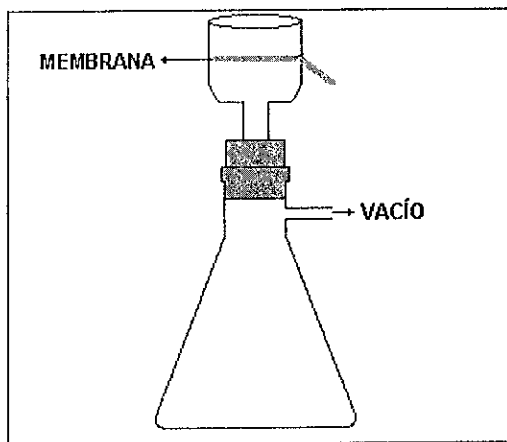


Figura 7. Equipo de Filtración.

Las soluciones a inyectar también deben filtrarse, idealmente, a través de membranas semejantes a las empleadas para la fase móvil. Existen para ello dispositivos más pequeños, en los cuales se intercambia el filtro y otros descartables, que incluyen el filtro.

Desgasificación

Además de filtrarse la fase móvil se debe desgasificar. Los gases disueltos en la fase móvil pueden producir varios inconvenientes, entre los cuales se encuentran:

- *Liberación de burbujas en el cabezal de la bomba:* en ese caso, el caudal es irregular, y se producen variaciones en la línea base y en los tiempos de retención. Si la cantidad de aire es importante, la bomba comenzará a trabajar a vacío, lo cual puede dañar tanto los sellos como los pistones.
- Liberación o formación de burbujas en la celda del detector, por descompresión de la fase móvil. En este caso, se produce variaciones en la línea base y aparición de picos fantasmas.
- *Oxígeno disuelto:* La presencia de oxígeno en la fase móvil puede producir un aumento de la línea de base en los detectores UV. Este incremento de la absorción es más notorio a bajas longitudes de onda y prácticamente deja de tener importancia a longitudes de onda mayor a 250nm.

Métodos de Desgasificación

La cantidad de gas disuelto en un líquido depende de tres factores: Temperatura, Presión y Afinidad.

La **Temperatura** puede favorecer o no la disolución del gas en el líquido. Si el proceso de disolución es exotérmico, el incremento de la temperatura disminuye la solubilidad, mientras que si es endotérmico, el incremento de la temperatura aumenta la solubilidad

La solubilidad de un gas en un líquido es directamente proporcional a la presión parcial que ese gas ejerce sobre el líquido. Por ello, si por algún método efectivo, se reduce la **presión**, la cantidad de gas en solución disminuirá.

Por último, la cantidad de gas disuelto depende de su **afinidad** mutua. Por ejemplo, si tanto en el gas como en el líquido las fuerzas predominantes son las de Vander Waals, la solubilidad será mayor que en aquellos líquidos en los que predomine otro tipo de fuerzas.

Todo los conceptos anteriores sirven como base para comprender los métodos que habitualmente se emplean para la desgasificación de las fases móviles, los cuales se tratan a continuación:

- *Reflujo:* Consiste en el calentamiento o la ebullición a reflujo de la fase móvil con ayuda de agitación durante unos 15 minutos. Por este procedimiento se eliminan casi todos los gases disueltos. Habitualmente no se emplea, ya que se debe aplicar en forma continua para prevenir la redisolución de los gases atmosféricos y no puede emplearse en el caso de mezclas de solventes.

- Burbujeo de un gas inerte: Se puede realizar en forma continua o por cortos períodos de tiempo. Se realiza a través de una pieza de acero inoxidable sinterizado con diámetro de poro de 2 a 10 μ m y a un caudal de unos 80-100 ml/min. De esta forma se logra un efectivo desplazamiento de los gases. Alcanzado el equilibrio, se reduce el caudal para impedir el reingreso de gases atmosféricos.

Con el fin de reducir costos, ya que el helio es un gas bastante caro, es conveniente el uso de reservorios de solventes provistos de tapas con válvulas que permitan mantener una cierta presión sobre la fase móvil para evitar la redisolución de los gases y que permitan trabajar a un caudal constante de unos 50 ml/min. Se debe trabajar con buena ventilación ya que este burbujeo puede desplazar al ambiente al componente más volátil de una fase móvil.

- Ultrasonido. El ultrasonido es una onda electromagnética, producida por la propagación de un choque mecánico generado por un cristal piezoeléctrico. Esta onda necesita un material de soporte, no se propaga en el vacío y se caracteriza por la frecuencia

La aplicación inmediata de esta propiedad es la limpieza de materiales, especialmente los que presentan zonas de difícil acceso, a partir de la disolución de sólidos. Aplicado a la desgasificación de un líquido, no reduce la solubilidad de un gas disuelto, y no puede expulsarlo sino cuando la solución este sobresaturada. Es así que su aplicación para la desgasificación da los resultados más pobres, y en ocasiones puede aumentar el nivel de oxígeno disuelto.

- Vacío. Es el método más frecuentemente empleado. En general se aplica junto al proceso de filtración (ver figura 7)

Si se prepara la fase móvil por más de un día de trabajo, debe filtrarse y desgasificarse a diario, como si se tratara de una solución recientemente preparada.

En el caso de que la desgasificación se efectúe con una bomba de vacío, esta debe ser a prueba de explosiones, ya que durante el uso, puede aspirar solventes volátiles de la fase móvil.

6. ANÁLISIS CUANTITATIVO (Quattrocchi O. A., 1992, p. 56-64).

6.1 Cuantificación por Área o Altura del Pico.

La cuantificación de los picos cromatográficos puede realizarse midiendo su área o altura. La mayor parte de los cromatografistas acostumbran a medir el área, aunque se ha reportado una mejor precisión midiendo la altura en lugar del área siempre y cuando los picos sean simétricos y las condiciones de operación se mantengan constantes.

Como la concentración del analito es directamente proporcional al área que genera, cualquier factor que modifique el valor del ancho del pico influirá sobre la cuantificación por altura. A eficiencia constante, un aumento en los tiempos de retención va acompañado de un aumento en el valor del ancho del pico y consecuentemente, de una disminución de la altura. Asimismo, cualquier parámetro que modifique la eficiencia de la columna modifica el valor del ancho del pico.

En contrapartida, las mediciones de áreas resultan poco precisas cuando no se puede definir exactamente la línea base. Así resulta más conveniente medir la altura en el caso de picos parcialmente resueltos, picos con coleo severo y en análisis de trazas si la línea base es muy ruidosa.

6.2 Métodos Para la Cuantificación del Analito.

La concentración del analito en la muestra se puede calcular por diferentes métodos, como son:

- Normalización 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.

Normalización Interna

Dicho método 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 el pico que corresponda al solvente) y el contenido del analito en la muestra se calcula en base a la siguiente fórmula:

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

Donde P_i es el porcentaje del componente i en la mezcla, A_i es el área de 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. En contrapartida tiene varias limitaciones entre ellas se tiene que para generar resultados exactos es necesario que todos los componentes de la mezcla se separen, lo cual no siempre ocurre y en segundo lugar se requiere que todos los componentes tengan el mismo factor de respuesta. Es decir que si se trabaja con un detector UV, todas las sustancias deben tener el mismo valor de absorptividad a la longitud de onda elegida.

Estándar Externo

El estándar externo es el método de cuantificación más utilizado en CLAR. Consiste en preparar estándares de concentración semejante al analito presente en la muestra y el análisis cromatográfico de ambos, muestra y estándar, se lleva a cabo a las mismas condiciones de operación.

La concentración del analito en la muestra se determina comparando el área del pico de interés con el área correspondiente al estándar de referencia. La fórmula que nos ayuda a determinar la concentración de analito es la siguiente:

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

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

Este método requiere del uso de estándar de referencia y su exactitud dependerá de la calidad del estándar utilizado. La precisión de los datos dependen tanto de la preparación de la muestra y el estándar como de la inyección de ambos. La precisión de esta metodología es muy sensible a los errores de inyección. Por ello, para mejorar la precisión se inyecta varias veces, típicamente 3 inyecciones de estándar y dos de cada muestra. Además, para evitar la falta de precisión originada por las variaciones ambientales es adecuado analizar alternativamente muestra y estándar o intercalar estándares después de un grupo de unas 5 o 6 muestras.

Estándar Interno

El método de estándar interno consiste en agregar cantidades exactamente iguales de una sustancia así denominada, tanto a la muestra como a un estándar de referencia.

Para determinar la concentración del analito en la muestra se calcula la relación de áreas del analito y estándar interno tanto en la muestra como en el estándar. Es decir:

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

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

Este método requiere de patrones de referencia por lo cual su exactitud dependerá de la pureza de los mismos. Además se requiere del uso de otra sustancia, el estándar interno, cuya pureza no tiene que ser tan controlada como la del patrón de referencia, pero debe cumplir con los siguientes requisitos:

- No debe estar presente en la muestra.
- Debe presentar una respuesta similar al analito.
- Debe resolverse completamente de los componentes de la muestra
- Debe eluir cerca al analito (o los analitos).
- Debe ser estable y químicamente inerte.
- Debe responder en forma semejante al analito con el detector seleccionado.

El método de estándar interno tiene la ventaja de no ser sensible a los errores de inyección ya que los errores se compensan al utilizar la relación de áreas y en algunos casos pueden compensarse los errores generados en la preparación de la muestra como puede ser la dilución y extracción.

El uso de estándar interno para compensar los errores de inyección es prácticamente obligado en Cromatografía de Gases porque el error de inyección es grande, pero tiene menos sentido en CLAR donde éstos son mucho menores.

Por otro lado debe considerarse que al usar estándar interno se agrega otro pico más al cromatograma, por lo cual la separación se hace más compleja. Si se desea utilizar el estándar interno solamente para compensar los errores de inyección no es necesario aislar o añadir sustancias semejantes al analito.

Estándar Agregado

Este método 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 el factor de dilución.

Este método, como el del Estándar Externo, tiene principalmente dos desventajas: requiere del uso de un estándar de referencia y es sensible a los errores de inyección y preparación de la muestra. A pesar de que es mucho menos utilizado resulta el método de elección cuando la matriz de la muestra es muy compleja y lleva a cambios y deformaciones de los picos.

7. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

7.1 Definición de Validación.

La validación de un método analítico se puede definir como el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método satisfacen los requisitos para la aplicación analítica deseada (USP XXII, p 1711, 1990).

La validación de métodos analíticos tiene como finalidad determinar mediante una serie de pruebas sistemáticas que el método reúne los requisitos para la aplicación analítica para lo cual fue creado. Asimismo mediante el proceso de validación es posible determinar las variables que pueden presentarse al aplicar el método, así como la posibilidad de conocer como controlarlas y de esta manera poder generar las mejores condiciones para el análisis con el fin de lograr resultados analíticos confiables.

Por lo tanto todos los métodos analíticos que se emplean para el control de calidad de materias primas, productos en proceso así como del producto terminado deben ser validados para asegurar su confiabilidad y de esta manera llevar a cabo un control de calidad que permita obtener resultados verídicos.

Debido a la gran importancia que tiene la validación de métodos analíticos, organismos como la SSA (Secretaría de Salubridad y Asistencia), FDA (Food & Drug Administration), USP (United States Pharmacopeia), NF(National Formulary) entre otros han publicado una serie de guías que permiten unificar criterios entre los profesionistas y técnicos que tienen bajo su cargo la responsabilidad de desarrollar y validar métodos analíticos.

7.2 Características del Método Analítico (Quattrocchi O A, 1992, p.301-324; Colegio Nacional de QFB, p 1-10, 1986).

Las características de desempeño del método analítico son expresadas en términos de: Linealidad, Intervalo, Precisión, Exactitud, Límite de detección, Límite de cuantificación, especificidad y Tolerancia. los cuales deben ser considerados en la validación (USP XXII, p 1711, 1990). Es importante mencionar que debido a la gran variedad de ensayos, las características a evaluar dependerá de la aplicación que tenga el método analítico.

A continuación se definen cada una de las características que deben evaluarse a los métodos analíticos.

Intervalo

El intervalo de un método analítico está definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles de concentración superior e inferior del analito, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

Linealidad

La linealidad del sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo determinado. Los parámetros analíticos que se utilizan para su evaluación son:

- Coeficiente de determinación (r^2)
- Pendiente (m)
- Intercepto (b)

Determinación.

Linealidad del sistema: Se determina, construyendo una curva de calibración (concentración vs respuesta medida) utilizando cuando menos cinco diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo el análisis cuando menos por duplicado para cada dilución.

El intervalo entre las concentraciones analizar depende del propósito del método y deberá estar incluida la concentración seleccionada como el 100%

Para métodos aplicados para el seguimiento de la estabilidad de un fármaco el 100% corresponderá a la concentración del fármaco cuando la degradación del mismo es cero.

Linealidad del método: Se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos 3 diferentes cantidades del analito, (placebos cargados), cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado.

Las concentraciones de los placebos cargados a analizar deben estar dentro del intervalo propuesto en la linealidad del sistema incluyendo siempre la correspondiente al 100%.

La linealidad del método deberá ser realizada por el mismo analista y en bajo las mismas condiciones de operación.

Precisión.

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

- Desviación Estándar (s)
- Coeficiente de Variación (CV)

Determinación

Precisión del sistema: Se determina por el análisis por sextuplicado de una solución preparada a partir de una misma solución estándar correspondiente al 100%.

Precisión del método: se determina de al menos 6 placebos cargados de manera independiente, con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100%. El análisis se debe realizar en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

Repetibilidad y Reproducibilidad.

La precisión también es una medida de la reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

Repetibilidad entre días: Es la precisión del método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizada en dos diferentes días manteniendo las demás condiciones de operación.

Determinación.

Se determina igual que para precisión solo que en dos días diferentes se realiza el mismo procedimiento.

Reproducibilidad: Es la precisión del método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes de análisis (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o diferentes laboratorios, utilizando los mismos y/o diferente equipos, etc.).

Determinación

Se determina de una muestra homogénea del producto cercana al 100% de la concentración teórica, analizada por lo menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado

Exactitud

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre el porcentaje obtenido experimentalmente y un valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les adiciona cantidades conocidas del analito

Determinación

se determina con al menos 6 placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria del analito de interés para la concentración del 100%, utilizando el método propuesto. El análisis se lleva a cabo en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

Limite de detección

Es la mínima concentración de analito en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecida,

Limite de cuantificación

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

Tanto el límite de detección como el de cuantificación no se determinan a métodos que se aplican al seguimiento de la estabilidad de un fármaco siempre y cuando este se lleve a cabo mediante la cuantificación del activo y no de sus productos de degradación.

Sensitividad

La sensitividad de un método analítico se define como la mínima diferencia entre concentraciones que genera una diferencia significativa entre sus respuestas o resultados analíticos.

Especificidad

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

También se puede definir como la propiedad del método de producir una señal medible debida solo a la presencia del analito, libre de interferencia de otros componentes, en la matriz de la muestra. Estos componentes pueden ser excipientes, productos de degradación, productos laterales de síntesis de un fármaco, productos de biotransformación del mismo analito en un fluido biológico.

Determinación para métodos indicadores de estabilidad.

En el caso de contar con los posibles productos de degradación, se prepara una muestra placebo que contenga estos y el analito de interés y se analiza con el método propuesto. En el caso de métodos por CLAR se verifica la separación de la sustancia de interés.

Si no se cuenta con los productos de degradación, es necesario degradar la muestra bajo diferentes condiciones. La degradación debe ser tal que la concentración de la sustancia de estudio debe ser disminuida por lo menos en un 25% con respecto a la original.

Los métodos usados para la degradación de la sustancia dependerá de sus propiedades fisicoquímicas del compuesto.

Las formas más comúnmente empleadas para ello es someter la muestra, fármaco, o placebo a:

- Condiciones drásticas de temperatura (20°C por debajo de su punto de fusión) durante un número de días apropiado (2-4 semanas).
- La luz UV o a la luz fluorescente y/o humedad.
- Reflujo con agua, NaOH 1N o HCl 1N durante una hora.

Tolerancia

Es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos ante cambios comunes que pueden sufrir las condiciones normales de operación.

En CLAR las variaciones que comúnmente se pueden presentar son las siguientes:

- Variación en el pH de la fase móvil.
- Variación en la composición de la fase móvil.
- Diferentes columnas (Diferente lote y/o proveedor).
- Temperatura.
- Velocidad de Flujo.

CAPITULO II
DESARROLLO DEL
MÉTODO ANALÍTICO

CAPITULO II

DESARROLLO DEL MÉTODO PARA EVALUAR LA ESTABILIDAD DE LA SULFAMETAZINA SÓDICA POR CLAR.

Dentro de la etapa de desarrollo se contempló la obtención e identificación de los productos de degradación de la sulfametazina sódica, con la finalidad de considerarlos al optimizar las condiciones cromatográficas que permitan cuantificar la sulfametazina sin su interferencia.

1. OBTENCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DE LA SULFAMETAZINA SÓDICA.

1.1 Obtención de los productos de degradación.

La sulfametazina sódica fue hidrolizada en medio ácido (Venturella V. S., 1968, p. 1155) y la solución obtenida se analizó por CLAR (Anexo 1). Se obtuvo el cromatograma que se presenta en la figura 8, donde se observa la presencia de tres picos. Mediante un análisis detallado, con ayuda del software millenium, se realizaron varios cortes a lo largo de cada pico. Se observó, en el primer pico, dos espectros diferentes; entre 0.9 y 1.0 min se presenta un espectro con dos máximos (222 y 296.6 nm) y en 1.1 min. se presenta un espectro diferente al anterior con un máximo en 301.4 nm. (figura 9). En lo que respecta a los otros dos picos, sus espectros fueron los mismos a lo largo de cada pico. Lo anterior indica que mediante la hidrólisis ácida de la sulfametazina se obtienen 4 productos de degradación.

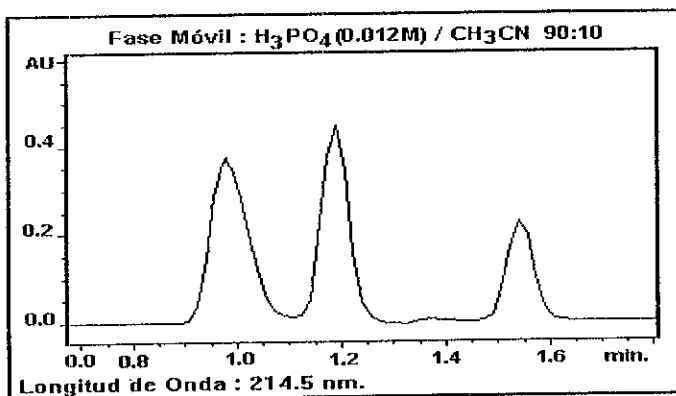


Figura 8. Cromatograma de la Solución de Sulfametazina Hidrolizada.

Para confirmar que por medio de la hidrólisis realizada se forma el ácido sulfanílico y la sulfanilamida (Zajac. M. 1977), se analizaron por CLAR, soluciones estándar de éstas sustancias. Sus espectros y tiempos de retención se compararon con los que se presentan en la figura 9, observándose que el pico 2, del cromatograma de la figura 8, corresponde al ac. sulfanílico y el tercer pico a la sulfanilamida (figura 9). Con lo que respecta al pico 1, no fue posible confirmar si corresponden a los productos de degradación que señala Zajac M., ya que no se encuentran disponibles comercialmente.

Con la finalidad de separar los cuatro productos de degradación y de esta manera lograr su identificación, se modificó la composición de la fase móvil, cambiando el acetonitrilo por metanol.

En la figura 10 se observa que la fase móvil de H_3PO_4 (0.012M)/ MeOH 90:10 separa los cuatro productos de degradación de la sulfametazina sódica.

Al comparar las figuras 10 y 11 se observó que el cambio de acetonitrilo por metanol, en la fase móvil, no alteró los espectros de los productos de degradación, pero sí los tiempos de retención.

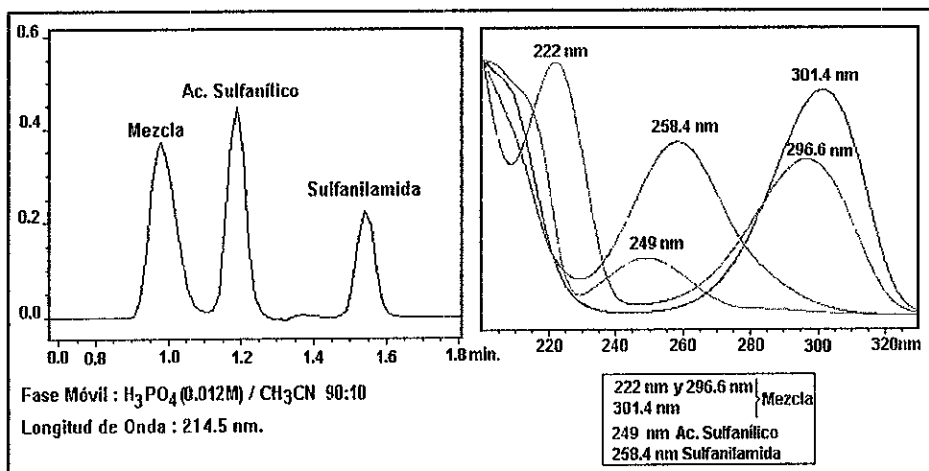


Figura 9. Cromatograma y Espectros de la Solución de Sulfametazina degradada.

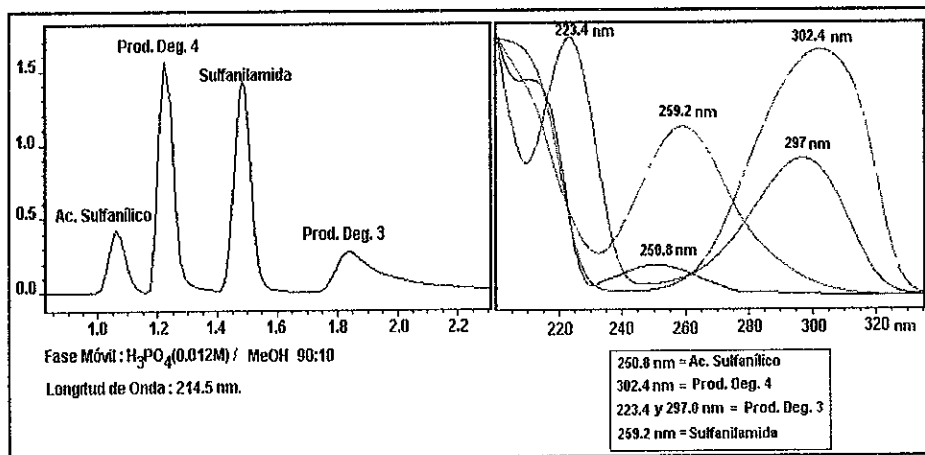


Figura 10. Cromatograma y Espectro de los Productos de Degradación de la Sulfametazina

1.2 Separación del ácido sulfanílico de la solución degradada de sulfametazina.

Después de mantener la solución degradada ácida a 10°C por dos días, precipitaron cristales en forma de aguja, color crema e insolubles en agua, los cuales se analizaron por CLAR. Su espectro y cromatograma (figura 11) se compararon con los obtenidos de una solución estándar de ácido sulfanílico (figura 12). Observándose que son similares por lo que se concluye que los cristales son de ácido sulfanílico.

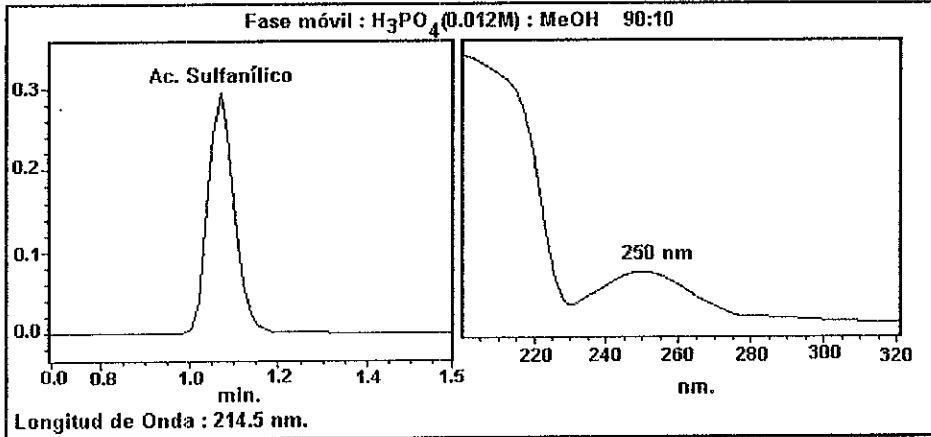


Figura 11. Cromatograma y Espectro del Estándar de Ac. Sulfanílico.

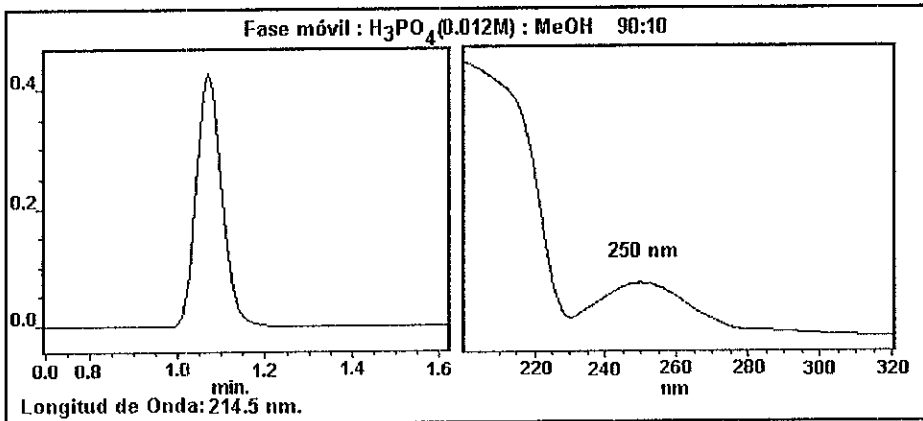


Figura 12. Cromatograma y Espectro de los Cristales Precipitados en la Solución Degradada Ácida.

1.3 Separación del producto de Deg.3 de la solución degradada.

Mediante un proceso de extracción múltiple y con lavados de la fase orgánica (procedimiento descrito en el anexo 1) se logró obtener un producto de degradación, el cual fue analizado por CLAR. Su espectro y cromatograma se muestran en la figura 13.

Comparando la figura 13 con la 10 se discierne que el producto aislado, por medio de la extracción, corresponde al denominado "Prod. Deg.3".

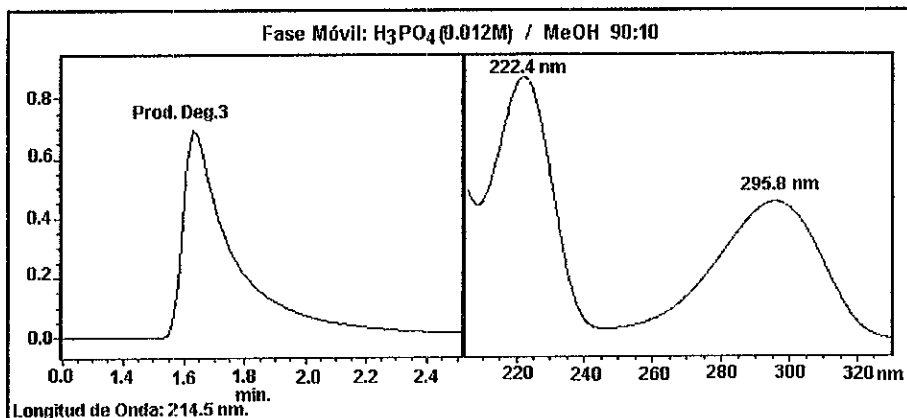


Figura 13. Cromatograma y Espectro del Residuo Obtenido por Extracción Líquido-Líquido.

Al modificar el pH de 1 hasta 11.5, de la solución degradada (Anexo 1), se provocó la precipitación de un sólido blanco, el cual se analizó por cromatografía de líquidos. Del análisis se obtuvo el cromatograma y espectros de la figura 14, mediante los cuales se determinó que también corresponde al denominado "Prod. Deg.3".

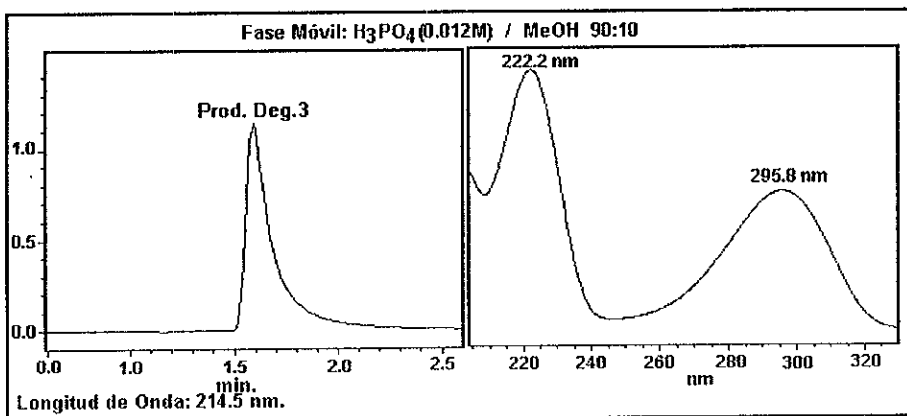


Figura 14. Cromatograma y Espectro del Sólido Precipitado en Medio Básico.

1.4 Caracterización del "Prod. Deg.3" por Espectroscopia de Masas.

El "Prod. Deg.3" presenta un punto de fusión entre 153 y 155°C y es soluble en agua, hidróxido de sodio y metanol.

Una muestra del "Prod. Deg.3" se analizó por espectroscopia de masas con la finalidad de conocer su peso molecular y composición atómica.

En la figura 15 se encuentra el espectro de masas del "Prod. Deg.3" y mediante su análisis se determinó que su peso molecular es de 123 g/mol y que presenta 6 átomos de carbono, 3 de nitrógeno y 9 hidrógenos.

Venturella reporta que el 2-amino-4,6-dimetilpirimidina (ADP) presenta un peso molecular y una composición atómica igual a la obtenida en el análisis por espectroscopia de masas, con lo cual se concluye que el analito separado de la solución degradada corresponde al ADP.

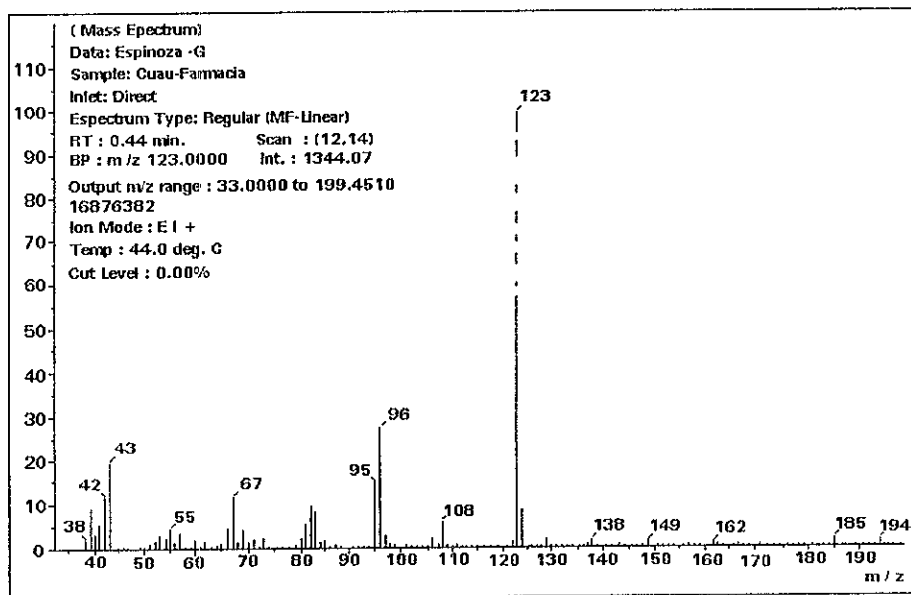


Figura 15. Espectro de Masas del "Prod. Deg.3"

A lo largo de la etapa de identificación de los productos de degradación, de la sulfametazina, se observó que el ac. sulfanílico (AS) y el ADP se encontraban presentes en mayor proporción con respecto a los otros dos productos de degradación (Sulfanilamida y Prod. Deg.4). Ya que en los cromatogramas a longitudes de onda, donde los productos de degradación presentan coeficientes de absorptividad semejantes, se aprecia que las respuestas de absorbancia son mayores para el AS y la ADP, que para la sulfanilamida y el Prod. Deg.4.

Lo anterior indica a su vez que es más factible que la hidrólisis de la sulfametazina se lleve a cabo en el grupo sulfamido entre el azufre y el nitrógeno (figura 16), que entre el grupo sulfamido y el carbono del heterocíclico (figura 17).

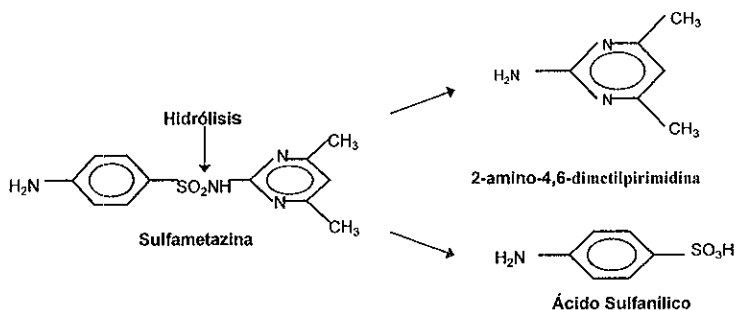


Figura 16. Hidrólisis de la Sulfametazina en el Grupo Sulfamido.

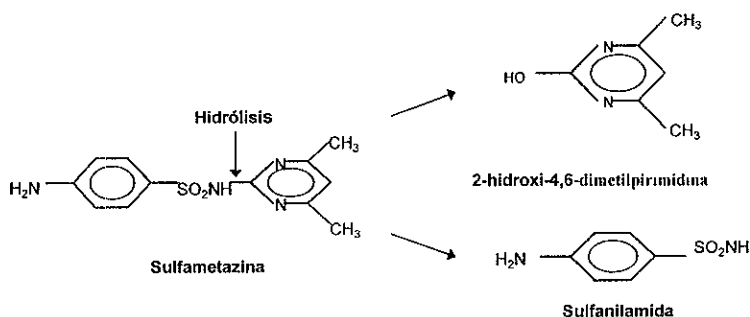


Figura 17. Hidrólisis de la Sulfametazina Entre el Grupo Sulfamido y el Carbono del Heterocíclico.

A pesar de no haber separado el producto de degradación cuatro y por tanto no haberlo identificado plenamente, se puede decir que probablemente corresponde al 2.hidróxi-4,6 dimetilpirimidina puesto que es el único que se forma junto con la sulfanilamida (figura 17), cuando la ruptura de la sulfametazina se presenta entre el grupo sulfamido y el carbono del heterociclo.

2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.

Las condiciones seleccionadas fueron la fase móvil, la concentración de sulfametazina en la muestra y el analito a utilizar como estándar interno. La velocidad de flujo (1 ml/min.) y el volumen de inyección se mantuvieron constantes.

2.1 Selección de la fase móvil.

En ésta etapa se utilizó una mezcla de la sulfametazina y tres de sus productos de degradación (AS, ADP Y SNA). Se preparó la mezcla a una concentración de 40 µg/ml La SMZ, AS y SNA se disolvieron en la mínima cantidad de NaOH (1 N) y se diluyeron junto con la ADP en agua de ósmosis inversa.

Se analizó por CLAR, la mezcla preparada, en diferentes fases móviles. Las primeras fases consistieron en la combinación de agua, acetonitrilo y metanol en diferentes proporciones. Los resultados obtenidos nos mostraron que para lograr la resolución entre los productos de degradación y la sulfametazina era necesario utilizar un 90% de agua. Lo cual implicaba tener tiempos de análisis de 10-12 min, picos anchos y coleados. Por lo que se decidió incluir en la fase móvil una sal de fosfatos que nos permitiera mejorar las características de los picos y a su vez disminuir el tiempo de análisis.

Se evaluaron nuevamente varias fases móviles formadas por KH_2PO_4 (0.05 M) con diferentes proporciones de acetonitrilo y metanol, de lo cual se obtuvo que la fase móvil de KH_2PO_4 (0.05 M)/ CH_3CN en una proporción 85:15 (figura 18), resuelve en forma adecuada los productos de degradación y la sulfametazina, sin ocasionar coleos marcados en los picos, ni anchuras en los mismos, además de un tiempo de análisis corto (5 min).

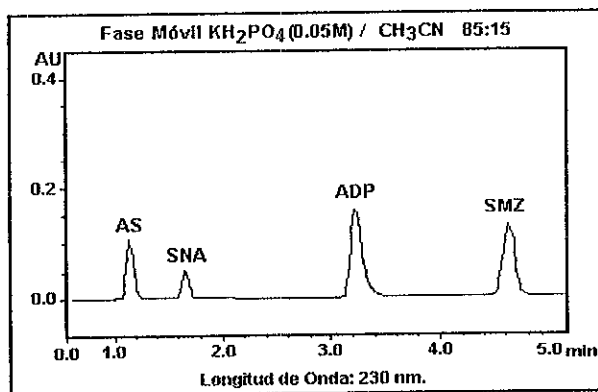


Figura 18

Sin embargo, el uso de fosfatos en la fase móvil provocó un tiempo de lavado de 2 horas, para eliminar las sales del sistema. Además de ocasionar el desgaste de algunas piezas del equipo cromatográfico, lo cual requirió un mantenimiento más frecuente y esto aumentó el costo del análisis. Por lo anterior fue necesario cambiar la fase móvil optimizada.

El cambio de fase móvil implicó el análisis cromatográfico de una mezcla de SMZ, AS, ADP, SNA (50 µg/ml) en 9 diferentes fases móviles.

Las fases móviles consistieron de tres diferentes concentraciones de ácido acético (0.5, 1 y 1.5%) y Acetonitrilo (10, 15 y 20%).

Los cromatogramas, tiempos de retención, resoluciones y asimetrías obtenidas, al evaluar las fases móviles, se presentan en el anexo 2.

La fase móvil formada por CH₃COOH (0.5%)/ CH₃CN en una relación 85:15 (figura 19) resultó ser la más adecuada. Ya que resuelve cada uno de los picos, no provoca coleos marcados ni anchura en los picos. Además el tiempo de análisis es corto (7.5 min).

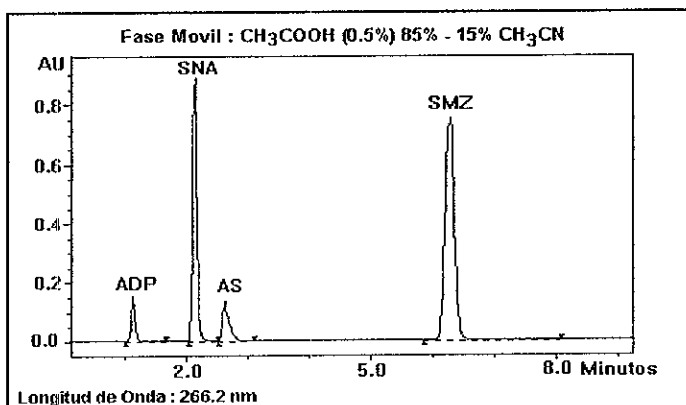


Figura 19

2.2 Estándar Interno.

Para llevar a cabo la cuantificación de la sulfametazina se propuso, primero, el método por estándar externo pero se encontró con el inconveniente de que es muy sensible a errores de inyección por lo que es necesario inyectar varias veces el estándar (3 inyecciones) y la muestra (2 inyecciones), lo cual repercute en el tiempo de análisis. Es por ello que se decidió llevar a cabo la cuantificación por el método de estándar interno, porque tiene la ventaja de no ser sensible a errores de inyección.

Para encontrar el mejor candidato para ser utilizado como estándar interno, se evaluaron varias sustancias (sulfametoxazol, trimetoprim, salicilato de sodio y sulfatiazol) en la fase móvil elegida.

De todos los analitos el sulfatiazol fue el seleccionado como estándar interno. Presenta un pico simétrico con tiempo de retención 4 min., no aumenta el tiempo de análisis y no se traslapa con ninguno de los productos de degradación ni con la sulfametazina.

Con la finalidad de corroborar lo anterior se incluyó el sulfatiazol en la mezcla de sulfametazina con sus tres productos de degradación y se analizó por cromatografía de líquidos, utilizando la fase móvil CH_3COOH (0.5%)/ CH_3CN 85:15.

Como se observa en la figura 20, la presencia del sulfatiazol en la mezcla no modificó las características de los picos pero provocó que el pico del ácido sulfanílico (AS) y el de la sulfanilamida (SNA) se juntaran.

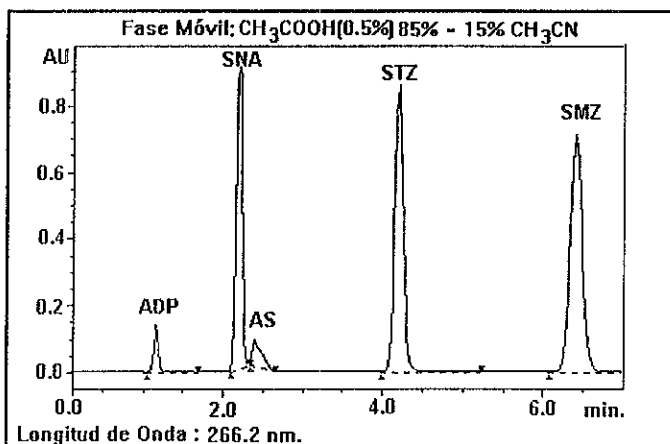


Figura 20.

Debido a lo anterior se realizó un pequeño ajuste en la composición de la fase móvil, se cambio la concentración del ácido acético a 0.25%. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 21 en la cual se observa que las características de la sulfametazina y sulfatiazol no se ven modificadas y se logra separar el pico del AS del de la SNA.

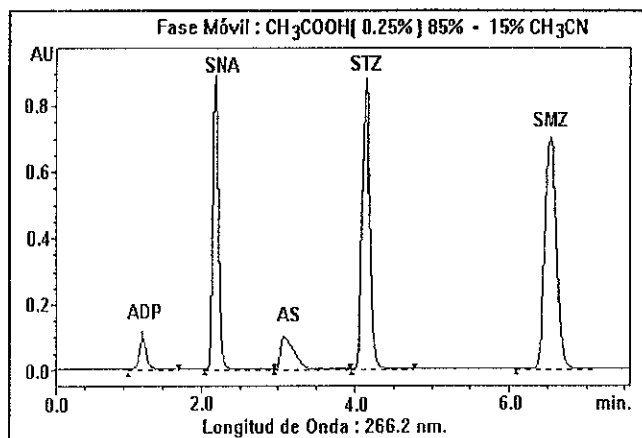


Figura 21

Por último se estableció la concentración de sulfametazina que se utilizaría como el 100% en el ensayo y la concentración del sulfatiazol.

Primeramente se decidió llevar a cabo la cuantificación de la sulfametazina a 266.2 nm, ya que es el máximo de absorción de la misma y también a esa longitud absorbe el sulfatiazol aunque su máximo se encuentra en 285 nm (figura 22).

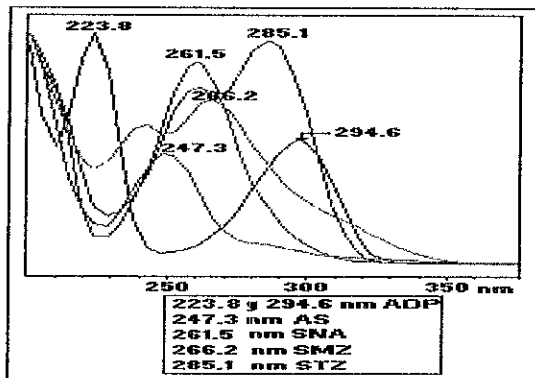


Figura 22. Espectros de los Picos que se Presentan en la Figura 21.

Se consideró que la concentración de sulfametazina debería estar dentro del intervalo de linealidad especificado para el detector (2 unidades de absorbancia). En base a varias pruebas realizadas se observó que una solución de sulfametazina a una concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ presenta aproximadamente 1.8 unidades de absorbancia a 266.2 nm.

Se estableció que la concentración del 100% de sulfametazina sería de 200 $\mu\text{g/ml}$ y que se utilizaría al sulfatiazol a una concentración de 150 $\mu\text{g/ml}$ (figura 23) porque en esa relación los dos presentan áreas semejantes, lo cual facilita la cuantificación por estándar interno.

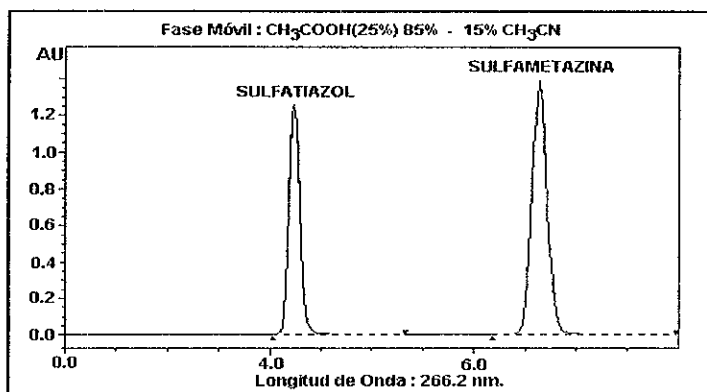


Figura 23. Sulfatiazol (150 $\mu\text{g/ml}$) y Sulfametazina (200 $\mu\text{g/ml}$).

Con la finalidad de establecer el intervalo de concentraciones para evaluar las características del método analítico, se almacenaron muestras de sulfametazina sódica a 100°C por 20 días y se analizaron por CLAR. Los resultados obtenidos indicaron que la sulfametazina sódica es estable a las condiciones almacenadas

De lo anterior se concluye que si el método se aplica a estudios de estabilidad, bajo las condiciones que establece la Secretaria de Salud, probablemente la degradación que sufra la materia prima será mínima ya que la condición más drástica que indica son a una temperatura de 40°C con 60% de humedad y por 3 meses.

En base a lo anterior se estableció que el intervalo de concentraciones sería de 200 µg/ml a 170 µg/ml lo cual a su vez representaría desde un 0% hasta un 15% de degradación de la sulfametazina. También se consideró que si llegara a degradarse la sulfametazina sódica a las condiciones señaladas, en el párrafo anterior, solo se formara el ácido sulfanílico y la ADP. Por lo cual, son los únicos productos de degradación que se consideraron en la validación del método analítico.

Con la finalidad de conocer si al degradarse la sulfametazina un 15% sería posible visualizar la presencia de sus dos principales productos de degradación, se preparó una muestra que representara el 15% de degradación. El cromatograma obtenido se presenta en la figura 24, en la cual se observa que la concentración manejada de sulfametazina permite apreciar la formación de sus productos de degradación.

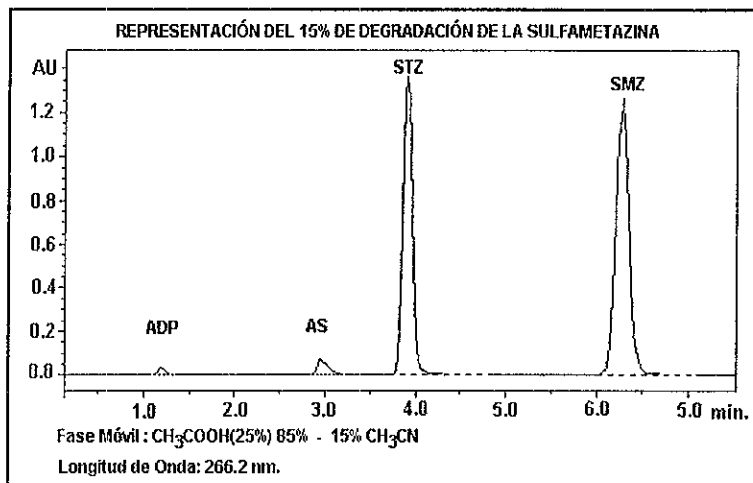


Figura 24.

CAPITULO III
VALIDACIÓN DEL
MÉTODO ANALITICO

CAPITULO III

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA EVALUAR LA ESTABILIDAD
DE LA SULFAMETAZINA SÓDICA

1. MATERIAL Y EQUIPO UTILIZADO.

1.1 Solventes

- Acetonitrilo Grado HPLC (OmniSolv, EM Science)
- Metanol Grado HPLC (OmniSolv, EM Science)
- Hidróxido de Sodio Grado Analítico (Merck)
- Ácido Acético Glacial Grado Analítico (Merck)
- Agua (ósmosis inversa)

1.2 Estándares y Materias Primas

- Sulfametazina estándar secundario, 99.95% (Helm de México)
- Sulfametazina Sódica Hidratada (Internacional Química Carter)
- Ac. Suifanílico Hidratado (Baker)
- Sulfatiazol (Helm de México)
- 2-Amino-4,6-Dimetilpirimidina (Sintetizado).

1.3 Material

- Matraces Kitazato de 1 litro.
- Matraces Erlenmeyer de 500 y 1000 ml.
- Pipetas Graduadas de 1 y 5 ml.
- Pipetas Volumétricas de 1, 2, 3, 4 y 5ml.
- Vasos de Precipitados de 100, 250 y 500 ml.
- Matraces Volumétricos de 25, 50, 100 y 250ml.
- Piseta.
- Varillas de Vidrio
- Espátula.
- Filtros Millipore de 0.45 μm (No. Catalogo HVLP04700)
- Filtros Millipore de 0 45 μm (No. Catalogo HVLP01300)

1.4 Equipo

- Balanza Analítica Ohaus AP250D-0 (No. Serie 1116032209)
-
- Bomba de Vacío Koblenz (Modelo OGP-13455)
-
- Cromatógrafo
 - Detector de Arreglo de Diodos Waters 996 (No. Serie MX5NM6889M).
 - Bomba Waters 616 (No. Serie MX6CM6678M).
 - Controlador de bomba Waters 600S (No. Serie SX5KM0096M).
 - Inyector Automático Waters 717 plus (No. Serie MX60M1948M).
 - Columna Symmetry C₁₈, 3.9 X 150 mm. (No. Parte WAT054205).
 - Columna guardia o precolumna Symmetry C₁₈, 3.9 X 20 mm.
 - Software Millennium Versión 2.1.
 - Computadora DELL (No. Modelo V1428UP).
 - Impresora HP DeskJet 660C.
- Milli_Q_{plus} Millipore (No. Serie F6NM12661L).
- Analizador de humedad HR73, Mettler Toledo.

2. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.

Las condiciones que se utilizaron fueron las siguientes:

- Fase Móvil Ac. Acético (0.25%)/CH₃CN 85:15
- Velocidad de flujo 1.0 ml/min.
- Longitud de Onda 266.2 nm.
- Volumen de Inyección 20 µl
- Tiempo de Análisis 7.5 min.
- Temperatura de Análisis 23-28°C.

3. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS.

3.1 Preparación de Soluciones Para Evaluar el Sistema.

- Solución Patrón de Sulfatiazol base (3.75 mg/ml).

Se pesaron 375 mg, se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 ml, se disolvieron con 2 ml de NaOH 1N y se diluyeron con agua de ósmosis inversa.

- Solución Patrón de Sulfametazina base (1.25 mg/ml).

Se pesaron 125 mg, se disolvieron con 1 ml de NaOH 1N y se diluyeron a 100 ml en un matraz volumétrico.

- Solución Patrón de Sulfametazina base (1.125 mg/ml).

Se pesaron 112.5 mg, se transfirieron a un matraz de 100 ml, se disolvieron con 1 ml de NaOH 1N y se llevaron a la marca del aforo con agua de ósmosis inversa.

- Preparación de la Curva de Calibración Para la Linealidad del Sistema.

En la tabla III se muestra cómo fue preparada la curva de calibración a partir de las soluciones patrón descritas anteriormente.

Volumen Tomado de la Solución Patrón en ml SMZ (1.25 mg/ml)	Volumen Tomado de la Solución Patrón en ml SMZ (1.125 mg/ml)	Volumen Tomado de la Solución Patrón en ml STZ (3.75 mg/ml)	Volumen de dilución (ml)	Concentración Final (µg/ml)	
				SMZ	STZ
1	-	1	25	50	150
2	-	1	25	100	150
3	-	1	25	150	150
-	4	1	25	180	150
4	-	1	25	200	150
5	-	1	25	250	150

Tabla III. Preparación de la Curva de Calibración para la Linealidad del Sistema

Nota: todas las diluciones se realizaron con agua de ósmosis inversa

3.2 Preparación de Soluciones Para Evaluar el Método Analítico.

- Solución Patrón de Sulfatiazol base (3.75 mg/ml).

Se preparó de la misma manera que en la linealidad del sistema.

- Solución Patrón de Sulfametazina base (estándar 100%).

Se pesaron 121.12 mg, se transfirieron a un matraz volumétrico de 25 ml, se disolvieron en 1 ml de NaOH 1 N y se diluyeron en un matraz volumétrico de 25 ml con agua de ósmosis inversa.

- Solución Patrón de 2-Amino-4,6- dimetilpirimidina (ADP) 107 µg/ml.

Se pesaron 66.9 mg, se transfirió a un matraz volumétrico de 250 ml posteriormente se disolvieron y se llevaron a la marca del aforo con agua de ósmosis inversa.

- Solución Patrón de Ácido Sulfanílico 93.8 µg/ml.

Se pesaron 93.8 mg, se disolvieron con 1 ml de NaOH 1 N y se diluyeron en un matraz volumétrico de 250 ml, llevándose a la marca de aforo con agua de ósmosis inversa.

- Preparación de la Curva para Evaluar la Linealidad del Método.

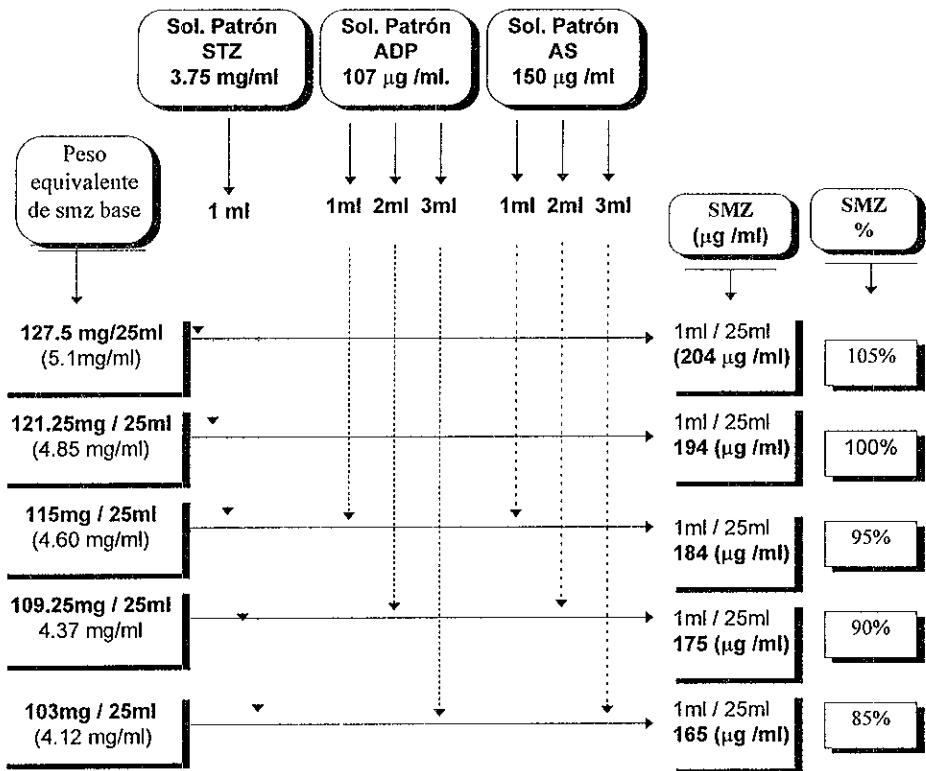


Figura 25. Preparación de la Curva Para Evaluar la Linealidad del Método.

Los pesos que se encuentran en la parte izquierda en la figura indican la cantidad equivalente de sulfametazina base contenida en la sulfametazina sódica pesada. Y a la derecha están los porcentajes de sulfametazina que se pueden obtener en el ensayo analítico

- Procedimiento de Preparación de Soluciones Para Determinar la Sensitividad del Método.

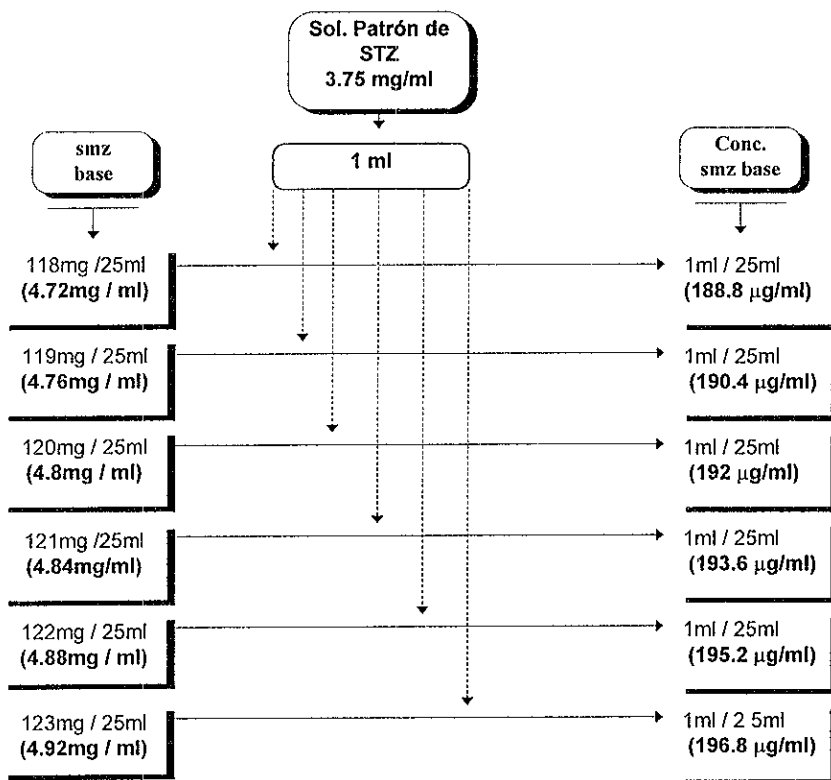


Figura 26. Preparación de Soluciones para Evaluar la Sensitividad.

A la derecha de la figura 26, se encuentran las concentraciones de sulfametazina que se utilizaron para evaluar la sensibilidad del método. Entre cada nivel de concentración existe una diferencia de 1.6 µg/ml.

3.3 Ensayo Analítico.

Procedimiento Para Realizar el Análisis Cromatográfico de Muestras de Sulfametazina Sódica, Sometidas a Estudios de Estabilidad Acelerada.

1. Pesar con exactitud, de sulfametazina sódica, el equivalente a 121 mg de sulfametazina base.
2. Transferir la muestra pesada a un matraz volumétrico de 25 ml, disolver y llevar a la marca del aforo con agua de ósmosis inversa (*Solución A*).
3. Tomar 1 ml de la *solución A* y 1 ml de un la solución patrón de sulfatiazol (3.75 mg/ml), colocarlos en un matraz volumétrico de 25 ml y llevar a la marca del aforo con agua de ósmosis inversa (*Solución B*).
4. Tomar 2 ml de la *solución B* con una jeringa de 5 ml.
- 5 Adaptar a la jeringa un acrodisco con membrana de 0.45 μm .
6. Filtrar 1 ml de la solución a través del acrodisco y recibir el filtrado en un vial de 1 ml
7. Analizar la muestra bajo las condiciones cromatográficas ya especificadas.

Nota: *Según como se maneje la muestra la pureza de la sulfametazina será expresada en peso seco o húmedo. Se corrige con el porcentaje de humedad*

4. DESCRIPCIÓN DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

4.1 Características Evaluadas al Método.

A continuación se mencionan cada una de las características del método analítico evaluadas y se explica brevemente la manera en que se realizó.

- **Linealidad del Sistema.**

La linealidad del sistema se evaluó construyendo una curva de calibración con 6 niveles de concentración (50, 100, 150, 180, 200 y 250 $\mu\text{g/ml}$) y se utilizó al sulfatiazol como estándar interno a una concentración de 150 $\mu\text{g/ml}$.

Cada concentración fue preparada por triplicado a partir de una misma solución patrón. La linealidad del sistema se evaluó en dos diferentes días

- **Precisión del Sistema.**

Para su evaluación se analizaron dos diferentes concentraciones de Sulfametazina Estándar (180 y 200 $\mu\text{g/ml}$). Cada nivel de concentración se preparó por sextuplicado a partir de la misma solución patrón.

Se utilizó Sulfatiazol como estándar interno a una concentración de 150 $\mu\text{g/ml}$.

- **Descripción de los placebos utilizados para evaluar las Características del Método Analítico.**

Los placebos cargados utilizados para la evaluación de las características del método desarrollado, consistieron de sulfametazina sódica (materia prima) y sus dos principales productos de degradación (ácido sulfanílico y la 2-amino-4,6-dimetilpirimidina). La combinación de los tres componentes no se realizó mediante la mezcla de los polvos porque el tamaño de partícula de cada uno es diferente y esto genera que la mezcla no sea homogénea, lo cual repercute en el porcentaje de recuperación. Por lo anterior se decidió formar los placebos a partir de soluciones patrón de cada componente. La forma en que se prepararon se muestra en la figura 25.

El intervalo de concentraciones de sulfametazina sódica que se utilizaron fue de 220, 209, 199, 188 y 178 $\mu\text{g/ml}$ equivalente a 204, 194, 184, 175 y 165 $\mu\text{g/ml}$ de sulfametazina base lo cual representó a su vez el 105, 100, 95, 90 y 85% de sulfametazina sódica o equivalente a base

Los productos de degradación se adicionaron en porcentajes iguales y la suma de los dos corresponde al porcentaje de degradación de la sulfametazina.

Analitos	Nivel de Concentración (%)				
	105	100	95	90	85
Sulfametazina	105	100	95	90	85
Ac. Sulfanílico	0	0	2.5	5	7.5
2-Amino-4,6-dimetilpirimidina	0	0	2.5	5	7.5

Tabla IV. Niveles de Concentración Utilizados para la Validación del Método.

Analitos	Concentración en $\mu\text{g/ml}$				
	204	194	184	175	165
Sulfametazina (SMZ)	204	194	184	175	165
Ac. Sulfanílico (AS)	0	0	6.0	12.0	18.0
2-Amino-4,6Dimeitilpirimidina (ADP)	0	0	4.3	8.6	12.9

Tabla V. Intervalo de Concentraciones Utilizados para la Validación de Método.

Las concentraciones de Ac. Sulfanílico y ADP, utilizadas en la validación del método, se determinaron en base a la estequiometría de la reacción que se presenta al hidrolizarse la sulfametazina.

- **Linealidad del Método.**

Se analizaron placebos cargados con 5 diferentes niveles de concentración de sulfametazina sódica 105%, 100%, 95%, 90% y 85% (204, 194, 184, 175, 165 $\mu\text{g/ml}$ de sulfametazina base respectivamente).

Se prepararon, de manera independiente tres placebos de cada nivel de concentración. La linealidad del método se evaluó en dos días diferentes.

- **Exactitud del Método.**

Se analizaron placebos que representaron el 100%, 95% y 90% (194, 184, 175 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente) de sulfametazina.

Se prepararon 7 placebos, de manera independiente, de cada concentración y se analizaron bajo las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

- **Precisión.**

Repetibilidad.

Se prepararon placebos que representaran el 0%, 5% y 10% de degradación de la sulfametazina. Se elaboraron 3 placebos, en forma independiente, de cada nivel de degradación y fueron analizados por el mismo analista en dos diferentes días.

Reproducibilidad.

Se evaluó de la misma manera que para repetibilidad solo que en este caso los placebos se analizaron por 3 diferentes analistas y en dos días diferentes.

- **Sensitividad.**

Se analizaron soluciones de 6 niveles de concentración de sulfametazina, con 1.6 µg/ml de diferencia entre cada una de ellas (188.8, 190.4, 192, 193.6, 195.2, 196.8 µg/ml).

Cada concentración se preparó por triplicado a partir de pesadas independientes y se incluyó el uso del sulfatiazol como estándar interno a una concentración de 150 µg/ml.

- **Tolerancia.**

La tolerancia del método desarrollado se determinó evaluando el efecto que presenta el porcentaje de ácido acético en la fase móvil sobre el tiempo de retención de la sulfametazina y sulfatiazol así como del porcentaje de recuperación.

Se utilizaron 5 diferentes concentraciones de ácido acético (0.2, 0.225, 0.25, 0.275, 0.3 %).

El efecto de la fase móvil fue evaluado inyectando una muestra que representará el 15% de degradación de la sulfametazina, utilizando los diferentes niveles de ácido acético en la fase móvil.

4.2 Criterios de Aceptación.

En la siguiente tabla se muestran los criterios establecidos para cada una de las características evaluadas del método analítico:

	CARACTERÍSTICA	CRITERIO DE ACEPTACIÓN ESTABLECIDO
S I S T E M A	Linealidad	$r^2 > 0.98$, $CV < 1.5\%$. Análisis de Variancia: $F_{\text{calc}} > F_{\text{critica}}$ Prueba del intercepto: $t_{\text{calc.}} < t_{\text{critica.}}$ Prueba de la pendiente: $t_{\text{calc.}} > t_{\text{critica}}$
	Precisión	$CV < 1.5\%$
M É T O D O	Linealidad	$r^2 \geq 0.98$, $CV < 1.5\%$. Análisis de Variancia: $F_{\text{calc.}} > F_{\text{critica.}}$ Prueba del intercepto: $t_{\text{calc.}} < t_{\text{critica}}$ Prueba de la pendiente: $t_{\text{calc.}} > t_{\text{critica.}}$
	Precisión	$CV < 1.5\%$
	Exactitud	Prueba de t (comparación de una media con respecto a la media poblacional): $t_{\text{calc.}} < t_{\text{critica}}$
	Repetibilidad	Análisis de Variancia: $F_{\text{calc.}} < F_{\text{critica}}$
	Reproducibilidad	Análisis de Variancia: $F_{\text{calc}} < F_{\text{critica}}$
	Sensitividad	Prueba de Diferencia Mínima Significativa
	Tolerancia	$CV < 2$ entre los todos los resultados de las diferentes proporciones de Ac. Acético manejadas

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS.

5.1 Linealidad del Sistema.

En la tabla VI se muestra las respuestas obtenidas de las seis concentraciones de sulfametazina base analizadas en dos días diferentes

Curva (Día 1)		Curva (Día 2)	
Concentración smz(μ g/ml) (X)	Respuesta (Asmz/Astz)*Cstz (Y)	Concentración smz (μ g/ml) (X)	Respuesta (Asmz/Astz)*Cstz (Y)
50.1	59 5728	50.0	57.3250
	57.8181		57.9950
	58 9633		58.1690
100.1	117 5690	100.0	116.5163
	118.4989		116.8127
	117 9819		117.2591
150.2	176.7959	150.0	174.6679
	179.0919		173.9225
	176 5901		173.4138
180 2	210.4575	180 0	208.3299
	211.2457		208.5818
	210 6754		206.5165
	211.0130		209 7449
	211.3330		209.7814
	210 0355		210.0503
200.2	238.1604	200.1	233.9165
	238 8562		231.9040
	239 2800		233.0650
	239 3492		231 9207
	239.9094		234.2444
	238 1927		231.1351
250.3	298.6668	250.1	291.2020
	298.0791		292.3478
			291.1933

Tabla VI. Respuestas de Sulfametazina para la Linealidad del Sistema.

Los coeficientes de determinación obtenidos del análisis de regresión se presentan en la tabla VII en la cual se observa que para las tres curvas el 99.99% de la variación en la respuesta es explicada por el modelo de regresión determinado. Asimismo dentro de la misma tabla se visualiza que los coeficientes de variación son menores a 15% indicándonos que la variación que existe entre las respuestas se encuentran dentro del criterio establecido

Curva	Ecuación de Regresión Determinada	r^2	CV
Día 1	$Y = 1.1942X - 1.18078$	0.9993	0.9946
Día 2	$Y = 1.1651X - 0.4293$	0.9998	0.5718
Global (Día 1 y 2)	$Y = 1.1781X - 0.9234$	0.9988	1.1532

Tabla VII. Análisis de Regresión para la Linealidad del Sistema.

El gráfico de regresión ajustada que se presenta en la figura 27 se obtuvo a partir del modelo matemático de regresión para la curva global. En la figura mencionada no solo se presenta la curva ajustada sino también los datos experimentales los cuales se encuentran dispersos alrededor de la recta.

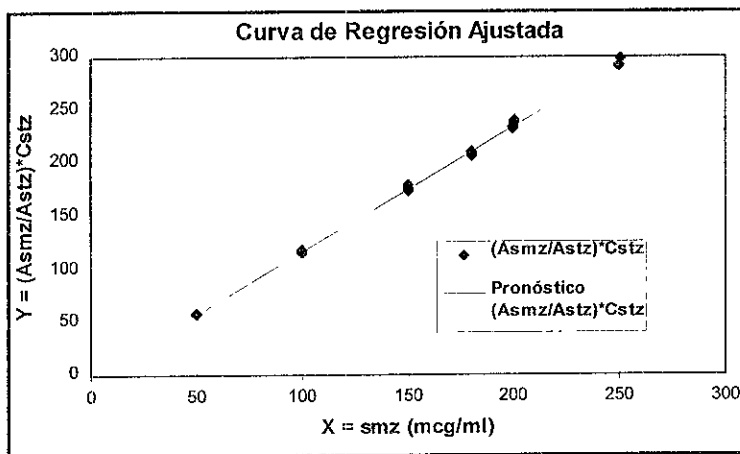


Figura 27. Curva de Regresión Ajustada para la Linealidad del Sistema.

La dispersión que presentan los puntos experimentales con respecto al estimado con la ecuación de regresión se visualiza mejor en la figura 28. En ella se encuentra el gráfico de residuales y en el se observa, que todos los datos están distribuidos alrededor del cero lo cual indica que las variaciones que existen se deben a errores aleatorios y no errores sistemáticos.

El residuo mayor que se presenta en el gráfico de residuales es de aproximadamente 5 y esto equivale a un 2% de error en la predicción del modelo de regresión.

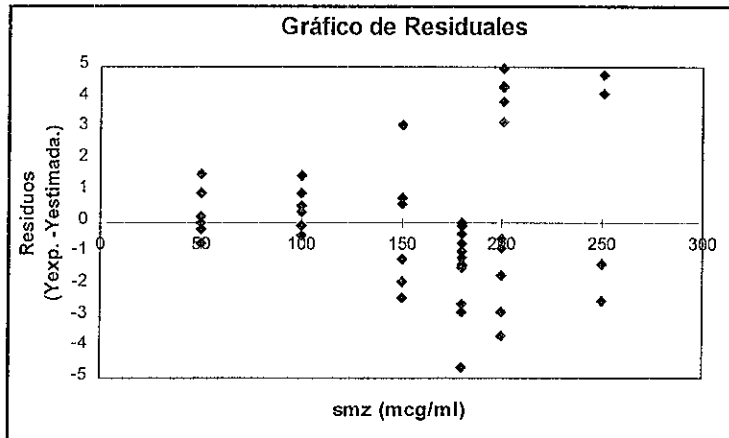


Figura 28. Gráfico de residuales para la Linealidad del Sistema.

En la tabla VIII aparecen los resultados obtenidos del análisis de variancia realizado, para determinar si la concentración y la respuesta se encuentran relacionadas linealmente (H_A). Para las tres curvas analizadas la $F_{calculada}$ fue mayor que la $F_{critica}$ lo cual indica que estadísticamente sí existe una relación lineal entre las dos variables.

Hipótesis

H_0 = X y Y no están relacionadas linealmente.

H_A = X y Y están relacionadas linealmente.

Curva		GL	SC	CM	$F_{Calc.}$	$F_{critica}$ $\alpha=0.05$
Día 1	Regresión	1	108062.5583	108062.5583	31362.9117	4.3248
	Residuos	21	72.3566	3.4456		
	Total	22	108134.9149			
Día 2	Regresión	1	113236.0753	113236.0753	104883.376	4.3009
	Residuos	22	23.7520	1.0796		
	Total	23	113259.8274			
Global	Regresión	1	221145.1951	221145.1951	38308.5499	4.0566
	Residuos	45	259.7732	5.7727		
	Total	46	221404.9683			

Tabla VIII. Análisis de Variancia para Evaluar la Linealidad del Sistema.

Los límites de confianza para la pendiente de cada una de las curvas aparecen en la tabla IX y en ella se aprecia que los intervalos de todas las pendientes no son idénticos, pero se traslapan entre sí y por ello, estadísticamente no son diferentes. Lo anterior es indicativo de que la sensibilidad del sistema fue la misma en los dos días en que se evaluó la linealidad.

El valor de pendiente obtenido, de cada curva, es positivo y esto indica que la relación entre las dos variables es directa, es decir que a medida que aumenta la concentración aumenta la respuesta. Lo anterior se observa gráficamente en la figura 27.

De los resultados expuestos en la tabla IX se concluye que las curvas de regresión pasan por el origen y por lo tanto se tiene que el sistema no da respuesta cuando la concentración del analito es nula.

Análisis Estadístico:

	Intercepto	Pendiente
$H_0:$	$b = 0$	$m = 0$
$H_A:$	$b \neq 0$	$m \neq 0$

Curva Día 1

	Coefficientes	Error típico	$t_{calc.}$	$t_{critica}$ ($\alpha = 0.05$)	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepto	-1.8078	1.1474	-1.5756	± 2.0796	-4.1940	0.5784
Pendiente	1.1942	0.0067	177.0958	± 2.0796	1.1802	1.2083

Curva Día 2

Intercepto	-0.4293	0.6263	-0.6854	± 2.0739	-1.7282	0.8696
Pendiente	1.1651	0.0036	323.8570	± 2.0739	1.1577	1.1726

Curva Global

Intercepto	-0.9234	1.0363	-0.8911	± 2.0141	-3.0107	1.1638
Pendiente	1.1781	0.0060	195.7257	± 2.0141	1.1660	1.1902

Tabla IX. Análisis Estadístico para la Linealidad del Sistema.

5.2 Precisión del Sistema.

En la tabla X se observa que los coeficientes de variación son menores al 1.5% lo cual indica que las respuestas generadas por el sistema son precisas ya que los coeficientes de variación que se obtienen cumplen con el criterio establecido.

Parámetro	Día 1		Día 2		Global (Día 1 y 2)	
	180 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$	180 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$	180 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$
\bar{x}	1.1639	1.1934	1.1600	1.1631	1.1648	1.1782
s	0.0028	0.0035	0.0074	0.0062	0.0074	0.0165
cv	0.2367	0.2896	0.6387	0.5329	0.6330	1.4047

Tabla X.-Análisis Estadístico para Evaluar la Precisión del Sistema.

5.3 Linealidad del método.

Los resultados obtenidos de las curvas realizadas para evaluar la linealidad del método se presentan en la tabla XI.

Día 1			Día 2		
Cantidad Adicionada (mg)	Cantidad Recuperada (mg)	% Recuperado	Cantidad Adicionada (mg)	Cantidad Recuperada (mg)	% Recuperado
102.87	102.98	100.11	102.87	102.65	99.79
102.88	101.78	98.93	102.87	103.56	100.68
102.89	104.77	101.83	102.87	101.97	99.12
108.95	108.34	99.44	108.92	107.19	98.41
108.98	107.47	98.62	108.90	108.59	99.71
108.99	107.39	98.54	108.90	110.04	101.05
115.02	114.68	99.70	115.00	115.27	100.23
115.02	115.03	100.01	114.97	114.57	99.65
115.02	114.52	99.56	114.98	113.74	98.92
121.02	121.86	100.70	121.06	121.43	100.31
121.03	122.24	101.00	121.03	120.10	99.23
121.05	122.03	100.81	121.05	120.50	99.55
127.10	127.24	100.11	127.11	125.73	98.92
127.11	126.68	99.66	127.09	128.52	101.13
127.13	128.77	101.29	127.09	129.68	102.04

Tabla XI. Resultados Analíticos de la Linealidad del Método.

Los resultados del análisis de regresión y los coeficientes de variación de las curvas analizadas se muestran en la tabla XII, en la cual se aprecia que, en general, los coeficientes de determinación y los coeficientes de variación son muy semejantes, lo cual indica que cualquiera de las ecuaciones de regresión obtenida tiene la misma capacidad de predicción.

Curva	Ecuación de Regresión	r^2	cv
Día 1	CRecup. = 1.0421 CAdic. - 4.7879	0.9881	0.9654
Día 2	CRecup. = 1.0326 CAdic. - 3.8207	0.9847	0.9894
Global	CRecup. = 1.0373 CAdic. - 4.3049	0.9863	0.9620

Tabla XII. Análisis de Regresión para la Linealidad del Método.

Asimismo, los coeficientes de determinación indican que aproximadamente el 98.5% de las variación de los resultados son explicados por los modelos de regresión determinados.

Con los resultados obtenidos de las dos curvas (día 1 y día 2), se construyó el gráfico de residuales (ver figura 29) obteniéndose que las variaciones que presenta el método son debidas a errores aleatorios y no a errores sistemáticos.

En el gráfico de residuales también se observa que la cantidad de sulfametazina que se puede predecir con menor error es la del centro, ya que es donde se encuentra menor dispersión alrededor de cero.

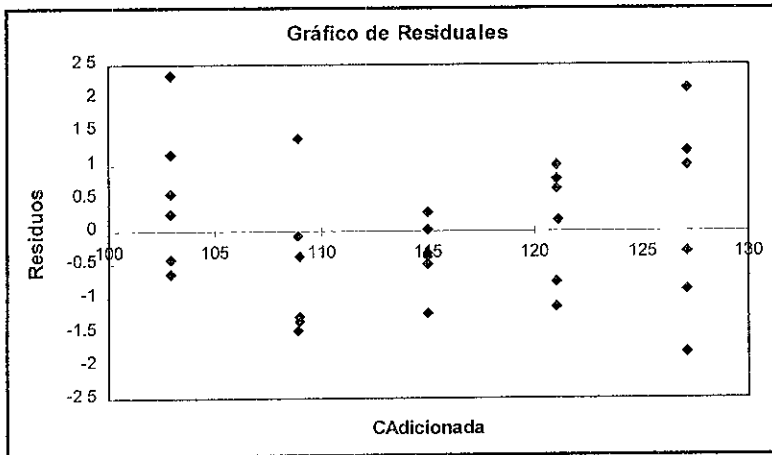


Figura 29. Gráfico de Residuales de la Linealidad del Método.

El análisis de variancia realizado a las diferentes curvas nos indicó que la cantidad recuperada y adicionada se encuentran relacionadas linealmente y que las ecuaciones de regresión tienen la capacidad de describir adecuadamente esta relación (ver tabla XIII). Además mediante el análisis estadístico realizado a el valor de la pendiente se determinó (ver tabla XIV), que la relación que existe entre las dos variables es directa lo cual significa que al aumentar la cantidad adicionada aumenta la cantidad recuperada, este comportamiento se aprecia en la figura 30.

Análisis de Variancia.

H_0 = CAdic. y CRecup. no están relacionadas linealmente

H_A = CAdic. y CRecup. están relacionadas linealmente

Curva		GL	SC	CM	F	$F_{critica}$ ($\alpha = 0.05$)
Día 1	Regresión	1	1193.6447	1193.6447	1081.6314	4.6672
	Residuos	13	14.3463	1.1036		
	Total	14	1207.9909			
Día 2	Regresión	1	1174.4847	1174.4848	837.6915	4.6672
	Residuos	13	18.2266	1.4020		
	Total	14	1192.7113			
Global	Regresión	1	2368.1328	2368.1328	2025.2738	4.196
	Residuos	28	32.7401	1.1693		
	Total	29	2400.8729			

Tabla XIII. Análisis de Variancia para Evaluar la Linealidad del Método.

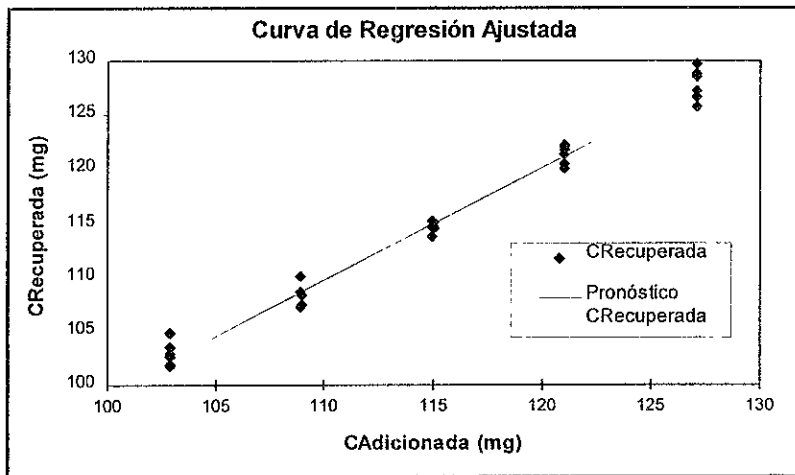


Figura 30. Curva de Regresión Ajustada de la Linealidad del Método

Hipótesis
 Intercepto Pendiente
 $H_0: b = 0$ $m = 0$
 $H_A: b \neq 0$ $m \neq 0$

Parámetro	Curva		
	Día 1	Día 2	global
Pendiente	1.0421	1.0326	1.0373
LS Intervalo de Confianza al 95%	1.1105	1.1096	1.0845
LI Intervalo de confianza al 95%	0.9736	0.9555	0.9901
$t_{calc.}$	32.8882	28.2929	45.0030
$t_{critica} (\alpha = 0.05)$	±2.1604	±2.1604	±2.0484
Ordenada al origen	-4.7879	-3.8207	-4.3049
LS Intervalo de Confianza al 95%	3.1061	5.0656	1.1396
LI Intervalo de Confianza al 95%	-12.6818	-12.7070	-9.7493
$t_{calc.}$	-1.3103	-0.9289	-1.6197
$t_{critica} (\alpha = 0.05)$	±2.1604	±2.1604	±2.0484

Tabla XIV. Análisis Estadístico para Evaluar la Linealidad del Método.

En la tabla XIV se observa que el intercepto de cada una de las curvas se puede considerar estadísticamente igual a cero y esto a su vez indica que el método no proporciona una respuesta significativa cuando no existe analito presente en la muestra.

5.4 Precisión y Exactitud del Método.

Los resultados obtenidos para evaluar la precisión y exactitud del método se presentan en la tabla XV.

Nivel de Concentración	Cantidad Adicionada (mg)	Concentración de SMZ ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración Estimada ($\mu\text{g/ml}$)	Cantidad Recuperada (mg)	% Recuperado
100%	120.96	193.53	194.05	121.2830	100.27
	120.99	193.59	193.56	120.9767	99.99
	120.99	193.58	194.58	121.6123	100.52
	120.97	193.55	193.80	121.1247	100.13
	120.98	193.56	193.33	120.8284	99.88
	121.04	193.66	193.22	120.7621	99.77
	120.96	193.53	195.02	121.8845	100.77
95%	114.96	183.94	184.88	115.5474	100.51
	114.96	183.94	184.94	115.5846	100.54
	114.94	183.90	183.77	114.8583	99.93
	114.94	183.90	186.54	116.5904	101.44
	114.96	183.93	183.88	114.9276	99.98
	114.99	183.99	184.00	115.0000	100.01
	114.99	183.99	183.91	114.9442	99.96
90%	108.90	174.24	173.54	108.4632	99.60
	108.89	174.23	174.38	108.9858	100.09
	108.90	174.24	174.15	108.8457	99.95
	108.92	174.27	173.43	108.3911	99.52
	108.88	174.21	175.62	109.7655	100.81
	108.91	174.25	174.13	108.8293	99.93
	108.90	174.24	173.46	108.4152	99.55

Tabla XV. Resultados Analíticos para Evaluar la Precisión y Exactitud del Método.

Los coeficientes de variación determinados a partir de los porcentajes de recuperación se presentan en la tabla XVI, en la cual se observa que para los tres niveles de concentración el cv es menor al 1% con lo cual se demuestra que el método tiene la característica de ser preciso

Nivel de Concentración	\bar{x}	s	cv
100%	100.1871	0.3563	0.3557
95%	100.3341	0.5519	0.5501
90%	99.9190	0.4512	0.4516

Tabla XVI. Estadístico de la Precisión del Método.

Con la ayuda de la prueba de t que sirve para comparar dos medias (media recuperada y la media adicionada) se determinó que el método analítico es exacto, esto se puede apreciar en la tabla XVII en ella se observa que para los tres niveles de concentración el valor de la $t_{calculada}$ es menor al valor crítico de t , lo cual indica que no existe diferencia significativa entre la cantidad adicionada y la recuperada, es decir, que estadísticamente se puede considerar que todo lo que se adiciona se recupera al aplicar método analítico.

Hipótesis:

$$H_0 = \bar{x}_{ADICIONADA} = \bar{x}_{RECUPERADA}$$

$$H_A = \bar{x}_{ADICIONADA} \neq \bar{x}_{RECUPERADA}$$

Prueba t para dos muestras con variancias iguales

Nivel de Concentración		CAdicionada (mg)	CRecuperada (mg)
100%	Media	120.9826605	121.2102624
	Variancia	0.000767732	0.17167513
	Observaciones	7	7
	Grados de libertad	12	
	Estadístico $t (t_{calc})$	-1.45011462	
	P(T<=t) dos colas	0.172656768	
	Valor crítico de t (dos colas)	± 2.178812792	
95%	Media	114.9633316	115.3503432
	Variancia	0.000470442	0.390010463
	Observaciones	7	7
	Grados de libertad	12	
	Estadístico $t (t_{calc})$	-1.638600637	
	P(T<=t) dos colas	0.127231282	
	Valor crítico de t (dos colas)	± 2.178812792	
90%	Media	108.8999966	108.8136879
	Variancia	0.000127639	0.232839033
	Observaciones	7	7
	Grados de libertad	12	
	Estadístico $t (t_{calc})$	0.473104291	
	P(T<=t) dos colas	0.644628406	
	Valor crítico de t (dos colas)	± 2.178812792	

Tabla XVII. Análisis Estadístico para Evaluar la Exactitud del Método.

5.5 Repetibilidad y Reproducibilidad.

Los porcentajes de recuperación obtenidos por tres analistas en dos días diferentes y en tres niveles de concentración se enlistan en la tabla XVIII.

Nivel de Concentración	Día 1 (% Recuperado)			Día 2 (% Recuperado)		
	194 ($\mu\text{g/ml}$)	184 ($\mu\text{g/ml}$)	175 ($\mu\text{g/ml}$)	194 ($\mu\text{g/ml}$)	184 ($\mu\text{g/ml}$)	175 ($\mu\text{g/ml}$)
Analista 1(D)	100.27	100.51	99.60	101.03	99.18	101.34
	100.52	99.93	99.95	100.09	100.51	101.24
	99.77	100.01	99.93	99.56	100.33	99.40
Analista 2(A)	99.98	99.87	101.86	101.48	101.58	100.84
	99.93	95.94	100.29	100.44	100.02	99.37
	100.34	102.88	101.72	100.13	99.26	101.78
Analista 3(R)	99.74	100.27	101.16	100.87	100.37	101.35
	101.22	99.54	101.57	99.55	100.33	99.68
	100.60	99.57	100.32	99.95	99.57	100.76

Tabla XVIII. Porcentajes de Recuperación para Evaluar la Repetibilidad y Reproducibilidad.

Los datos de la tabla XVIII se sometieron a un análisis de variancia (modelo factorial anidado) para determinar si no existía diferencia significativa entre los resultados obtenidos por los diferentes analistas (H_0) y también si el día no influye en el resultado analítico obtenido por el analista (H_0).

Análisis de variancia.

Reproducibilidad

H_0 : Analista₁ = Analista₂ = Analista₃

H_A : Analista₁ \neq Analista₂ \neq Analista₃

Repetibilidad

Día₁ = Día₂

Día₁ \neq Día₂

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	FV	GL	SC	CM	$F_{\text{calc.}}$	F_{critica} ($\alpha = 0.05$)
194	Analista	2	0.0976	0.0488	0.1875	9.5521
	Día	3	0.7809	0.2603	0.6928	3.4903
	Error	12	4.5085	0.3757		
184	Analista	2	0.0857	0.0428	0.1358	9.5521
	Día	13	0.9468	0.3156	0.1305	3.4903
	Error	12	29.0224	2.4185		
175	Analista	2	1.7696	0.8848	1.4013	9.5521
	Día	13	1.8942	0.6314	0.8244	3.4903
	Error	12	9.1906	0.7659		

Tabla XIX. Análisis de variancia para Repetibilidad y Reproducibilidad del Método.

En la tabla XIX se aprecia que en los tres niveles de concentración el valor de las Fcríticas, para el día y analista, son mayores que lo valores de Fcalculadas indicándonos que no existe una diferencia significativa entre los resultados obtenidos en diferentes días y por diferentes analista y esto a su vez nos lleva a concluir que el método analítico tiene la capacidad de ser repetible (entre días) y reproducible por cualquier analista previamente capacitado.

5.6 Sensitividad.

Las respuestas del análisis de los seis niveles de concentración para determinar la sensitividad del método se encuentran en la tabla XX.

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Respuesta (Asmz/Aszt)*Cstz
188.88	222.9798
188.90	224.7921
188.83	221.6317
$\bar{x}_1 = 188.87$	$\bar{x}_1 = 223.1345$
190.46	226.1414
190.46	225.6568
190.46	225.4165
$\bar{x}_2 = 190.46$	$\bar{x}_2 = 225.7382$
192.10	226.8686
192.06	228.0062
192.08	225.0720
$\bar{x}_3 = 192.08$	$\bar{x}_3 = 226.6489$
193.65	228.3642
193.68	229.9817
193.70	228.2950
$\bar{x}_4 = 193.67$	$\bar{x}_4 = 228.8803$
195.25	230.4890
195.28	230.0669
195.23	231.2580
$\bar{x}_5 = 195.25$	$\bar{x}_5 = 230.6046$
196.85	232.0560
196.88	232.3700
196.89	232.4403
$\bar{x}_6 = 196.87$	$\bar{x}_6 = 232.2888$

Tabla XX. Respuestas de Sulfametazina para Evaluar la Sensitividad

La prueba de DMS se realizo a partir de las promedios de las respuestas provenientes de concentraciones iguales.

La prueba de diferencia mínima significativa (DMS) consiste en calcular la diferencia entre todas las medias y comparar estas con un valor mínimo que deben cumplir (Anexo 3).

FV	GL	SC	CM	F _{calc.}	F _{crítica} ($\alpha = 0.05$)
Concentración	5	169.4514	33.8903	33.02	3.11
Error	12	12.3151	1.0263		

Medias	\bar{x}_1	\bar{x}_2	\bar{x}_3	\bar{x}_4	\bar{x}_5	\bar{x}_6
\bar{x}_1	0.0000	2.6037	3.5144	5.7458	7.4701	9.1543
		<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>
\bar{x}_2	-2.6037	0.0000	0.9107	3.1421	4.8664	6.5505
			<i>ns</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>
\bar{x}_3	-3.5144	-0.9107	0.0000	2.2314	3.9557	5.6398
				<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>
\bar{x}_4	-5.7458	-3.1421	-2.2314	0.0000	1.7243	3.4085
					<i>ns</i>	<i>s</i>
\bar{x}_5	-7.4701	-4.8664	-3.9557	-1.7243	0.0000	1.6841
						<i>ns</i>
\bar{x}_6	-9.1543	-6.5505	-5.6398	-3.4085	-1.6841	0.0000

Tabla XXI. Análisis Estadístico para Evaluar la Sensitividad

DMS $_{0.05/2, 12} = 1.8$

ns = No significativo

s = Significativo.

Criterio: Si la diferencia entre dos medias $> 1.8 \Rightarrow$ Existe diferencia significativa entre ellas.

Mediante la prueba de DMS se determinó que algunas veces se obtendrán respuestas significativamente diferentes entre concentraciones que presenten 1.6 $\mu\text{g/ml}$ de diferencia entre ellas, pero en ocasiones esta diferencia no será suficiente para obtener una respuesta significativamente diferente. Pero cuando se tiene 3.2 $\mu\text{g/ml}$ de diferencia entre dos concentraciones siempre va a existir una diferencia significativa entre sus respuestas, lo cual significa que la sensibilidad del método es mayor a 1.6 $\mu\text{g/ml}$ y menor o igual a 3.2 $\mu\text{g/ml}$.

5.7 Tolerancia.

Esta característica se evaluó solamente probando diferentes concentraciones de ácido acético debido a que es la parte del método analítico que puede presentar una mayor variación por parte del analista ya que las demás variaciones de alguna manera se encuentran controladas por el funcionamiento automático del equipo y algunas otras como, diferente columna (C_{18}) y equipo no fueron posibles de evaluar por carecer de ello.

Para conocer la tolerancia que presenta el método ante pequeños cambios en la concentración de Ácido Acético en la fase móvil, se determinaron los tiempo de retención de sulfatiazol, sulfametazina y los porcentajes de recuperación de sulfametazina a las diferentes concentraciones de Ácido Acético. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

Concentración de Ácido Acético

0.20%	0.225%	0.25%	0.275%	0.30%
TR(min.) SMZ	TR(min.) SMZ	TR(min.) SMZ	TR(min.) SMZ	TR(min.) SMZ
6.54	6.478	6.418	6.393	6.39
6.528	6.477	6.425	6.403	6.402
6.527	6.487	6.422	6.408	6.402

TR (SMZ)

$$\bar{x} = 6.446$$

$$s = 0.054$$

$$cv = 0.836$$

Concentración de Ácido Acético

0.20%	0.225%	0.25%	0.275%	0.30%
TR(min.)STZ	TR(min.) STZ	TR(min.) STZ	TR(min) STZ	TR(min) STZ
4.123	4.095	4.052	4.027	4.023
4.128	4.093	4.042	4.02	4.018
4.127	4.087	4.038	4.025	4.018

TR (STZ)

$$\bar{x} = 4.061$$

$$s = 0.043$$

$$cv = 1.057$$

Concentración de Ácido Acético				
0.20%	0.225%	0.25%	0.275%	0.30%
%Recuperado	%Recuperado	%Recuperado	%Recuperado	%Recuperado
101.03	100.70	101.03	101.00	101.09
101.14	100.67	101.12	101.14	101.18
101.15	100.88	101.13	101.05	101.15

%Recuperado.

$$\bar{x} = 101.03$$

$$s = 0.1595$$

$$cv = 0.1579$$

En los resultados anteriormente citados se aprecia que las variaciones producidas por las diferentes concentraciones de ácido acético afectan en mayor proporción a los tiempos de retención de la sulfametazina y sulfatiazol que al porcentaje recuperado.

En general se puede considerar que el porcentaje de recobro no se ve afectado puesto que su variación es menor al 0.2%.

De lo anterior podemos concluir que los porcentajes de recuperación son los mismos aun cuando cambie la concentración de ácido acético entre 0.2 y 0.3%

6. APLICACIÓN DEL MÉTODO VALIDADO.

Con el fin de conocer la estabilidad de la sulfametazina sódica, en condiciones drásticas de temperatura, se sometió a 100°C por un periodo de 8 meses y posteriormente se analizó aplicando el método validado. Los resultados obtenidos del análisis se presentan en las tablas XXIII y XIV.

Peso	Concentración smz base ($\mu\text{g/ml}$)	Asmz	Astz	Respuesta Asmz/Astz	Media de las Respuestas
121.04	193.66	14535736	9523319	1.5263	1 5269
		14480711	9480312	1.5275	

Tabla XXII. Resultados del Estándar Analizado para Estimar las Concentraciones de Sulfametazina.

Muestra	Peso (mg)	Asmz	Astz	CEstimada ($\mu\text{g/ml}$)	Cantidad Estimada	% Estimado
1	120.9875	14616278	9605073	193.01	120.6299	99.70
2	121.0926	14640646	9550633	194.43	121.5198	100.35
3	121.0488	14800556	9592154	195.70	122.3153	101.05

Tabla XXIII. Resultados Estimados de las Muestras de SMZ Sódica Sometidas a 100°C.

El coeficiente de variación determinado de los porcentajes estimados se presentan en la tabla XXIV.

Parámetro	% Estimado
\bar{x}	100.37
s	0.6710
c v	0.6686

Tabla XXIV. Estadísticos Obtenidos de los porcentajes de Recobro de las Muestras Sometidas a 100°C.

En la tabla XXIV se aprecia que la media estimada, para las muestras de sulfametazina sódica, es del 100.4% y esto indica que la sal de la sulfametazina es estable a 100°C por un periodo de 8 meses

Nota: La cantidad que se indica en la tabla XXIII, en la segunda columna, corresponde al peso que aparentemente debe contener la muestra de smz base cuando esta no ha sufrido degradación. La forma en que se calculó el porcentaje estimado, se presenta en el Anexo 3.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Mediante la hidrólisis de la sulfametazina sódica, en medio ácido se obtuvieron 4 productos de degradación: ácido sulfanílico, 2-amino-4,6-dimetilpirimidina, sulfanilamida y probablemente el 2-hidroxi-4,6-dimetilpirimidina.
2. El ácido sulfanílico y el 2-amino-4,6-dimetilpirimidina son los principales productos de degradación de la sulfametazina, ya que se forman en una mayor proporción a las condiciones de hidrólisis manejadas.
3. La identificación de los productos de degradación de la sulfametazina permitió desarrollar un método cromatográfico para la cuantificación de ésta sin su interferencia.
4. El método desarrollado para la cuantificación de sulfametazina es confiable ya que:
 - es lineal en el intervalo de 165 - 204 $\mu\text{g/ml}$,
 - preciso con un coeficiente menor al 1%,
 - exacto en las concentraciones de 175, 184 y 194 $\mu\text{g/ml}$
 - repetible y reproducible entre días y analistas.
5. La sensibilidad del método analítico es mayor a 1.6 $\mu\text{g/ml}$ y menor o igual a 3.2 $\mu\text{g/ml}$.
6. Se obtienen los mismos resultados analíticos cuando la concentración de ácido acético, en la fase móvil, se encuentra entre 0.2% y 0.3%.
7. La sulfametazina sódica no presenta degradación cuando se almacena por 8 meses a una temperatura de 100°C.

ANEXO 1

ANEXO 1

MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS UTILIZADOS EN EL DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO.

MATERIAL

Matraz de bola de 500ml
 Refrigerante
 Vasos de precipitado de 50, 100, 250 y 500 ml
 Matraz kitazato de 250 ml
 Embudo de porcelana
 Embudo de separación de 125 y 20 ml
 Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4 y 5 ml
 Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml.
 Matraces volumétricos de 10, 50, 100, 200 y 250 ml
 Soporte universal
 Parrilla
 Triángulo de porcelana
 Pinzas de tres dedos
 Nuez
 Piseta.
 Varillas de Vidrio.
 Espátula.
 Filtros Millipore de 0.45 µm

REACTIVOS

Hidróxido de sodio	(Merck)
Ácido acético	(Merck)
H ₃ PO ₄	(Merck)
Cloroformo	(Monterrey)
KH ₂ PO ₄	(Monterrey)
Metanol	(Omnisol, EM Science)
Ácido clorhídrico	(Baker)
CH ₃ CN	(Omnisol, EM Science)
Ácido Silfánilico	(Baker)
Sulfatiazol	(Helm de México)

EQUIPO

Balanza Analítica Ohaus AP250D-0)
 Bomba de Vacío Koblenz OGP-13455
 Cromatógrafo
 Detector de Arreglo de Diodos Waters 996
 Bomba Waters 616
 Controlador de bomba Waters 600S
 Inyector Automático Waters 717 plus
 Columna Nova Pak C₁₈, 3.9 X 150 mm.
 Columna Symmetry C₁₈, 3.9 X 150 mm
 Software Millennium Versión 2.1.
 Computadora DELL
 Impresora HP DeskJet 660C.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE LA SOLUCIÓN DEGRADADA ÁCIDA, PARA SU ANÁLISIS POR CLAR.

Se tomó un ml de la solución degradada ácida y se diluyó en un matraz volumétrico de 100 ml, con agua destilada. De esta dilución se tomó 1 ml y se diluyó con agua de ósmosis inversa en un matraz volumétrico de 10ml. De la última dilución se filtró 1 ml y se analizó en el sistema cromatográfico bajo las siguientes condiciones de análisis:

Velocidad de Flujo:	1 ml/min.
Volumen de Inyección:	20 μ l
Fase Móvil:	KH_2PO_4 (0.012M) / CH_3CN 90:10

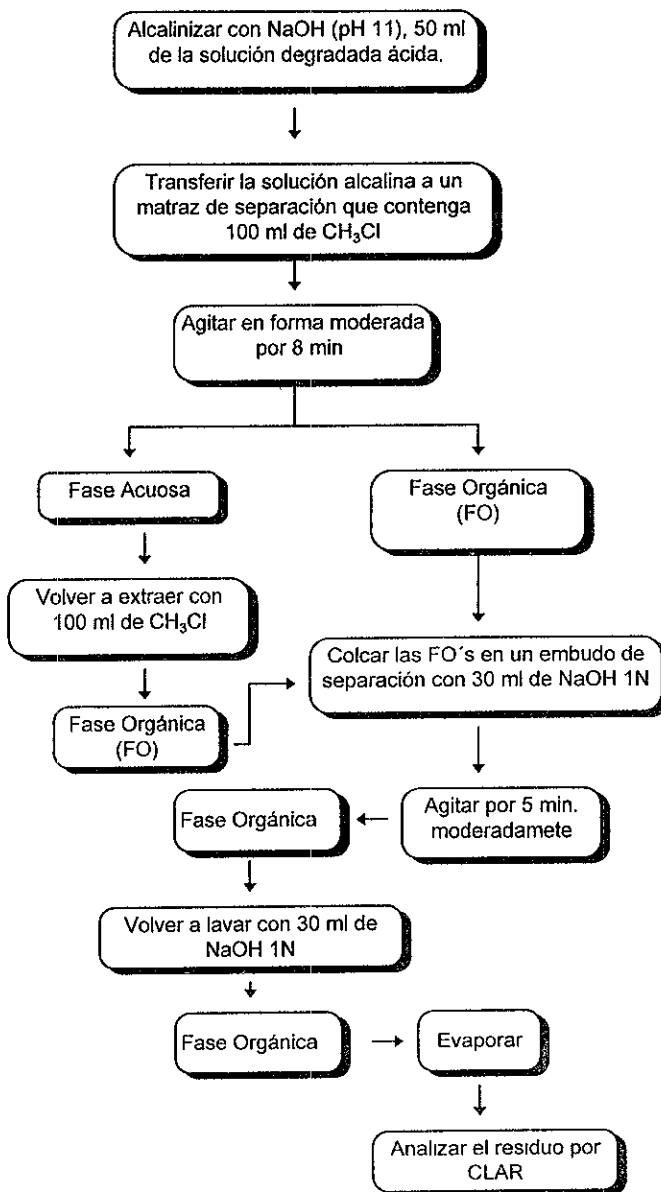
La velocidad de flujo y el volumen de inyección se mantuvieron constantes durante el desarrollo del método.

PROCEDIMIENTO PARA SEPARAR EL "PROD. DEG.3" DE LA SOLUCIÓN DEGRADADA MEDIANTE SU PRECIPITACIÓN EN MEDIO ALCALINO.

1. Colocar 50 ml de la solución degradada ácida.
2. Pesar aproximadamente 6g de NaOH
3. Disolver poco a poco, el hidróxido de sodio, en la solución degradada hasta la presencia de un precipitado blanco.
4. Filtrar el precipitado y recristalizarlo en una mezcla Metanol-Agua 70-30.

PROCEDIMIENTO PARA OBTENER EL "PROD. DEG.3" MEDIANTE UNA EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO.

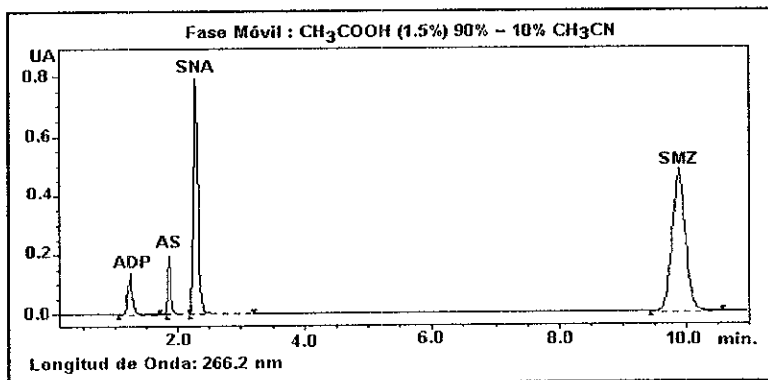
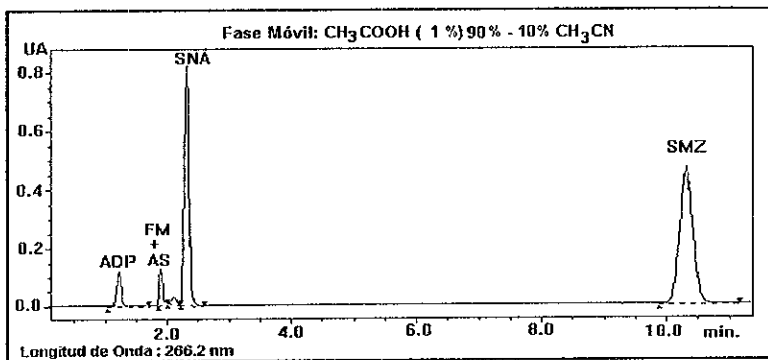
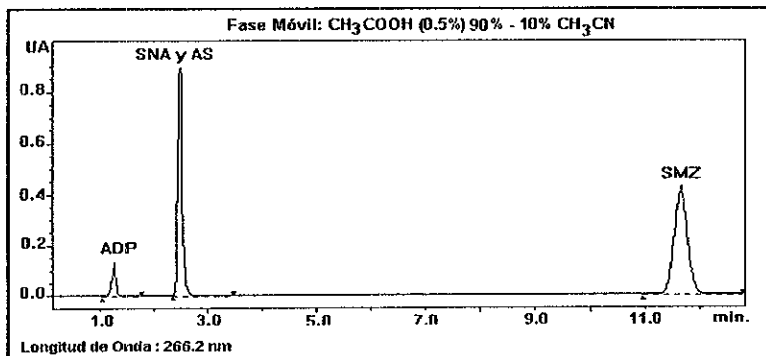
El siguiente diagrama de flujo ilustra la manera en que se separó el "Prod. Deg.3" de la solución degradada.



A N E X O 2

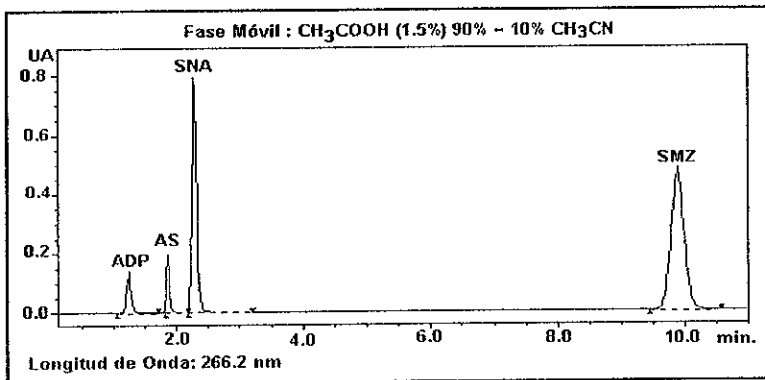
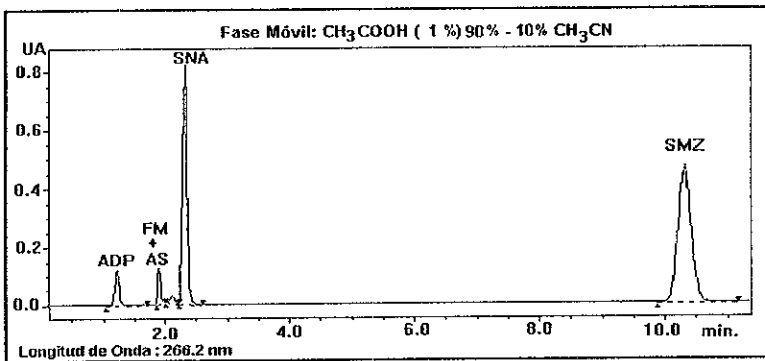
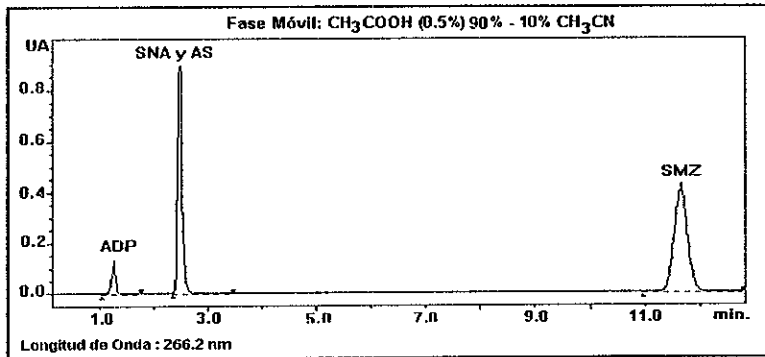
ANEXO 2

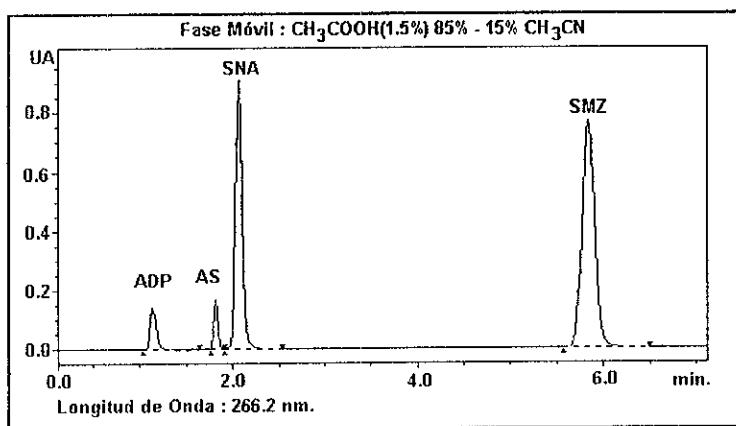
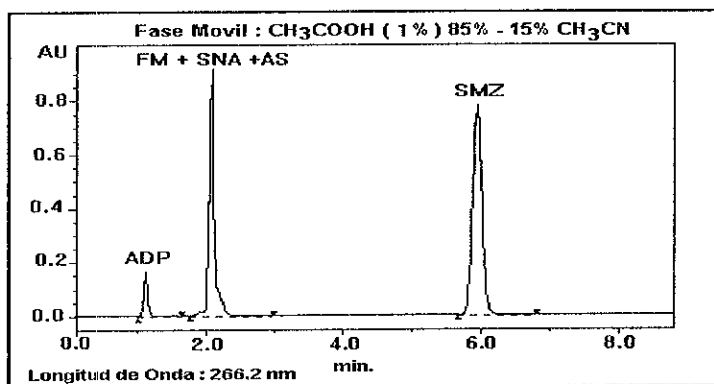
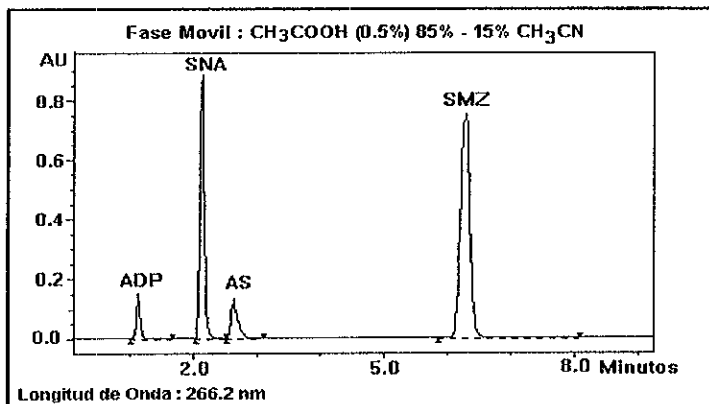
FIGURAS DE LA OPTIMIZACIÓN DE LA FASE MÓVIL

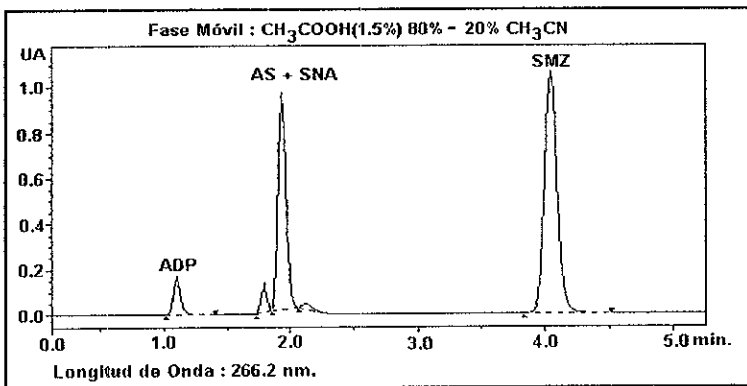
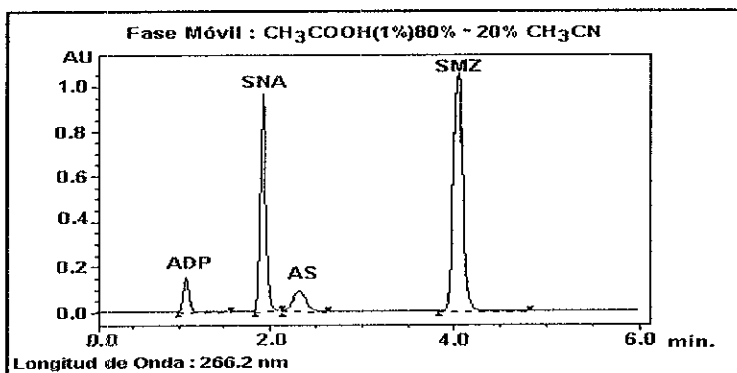
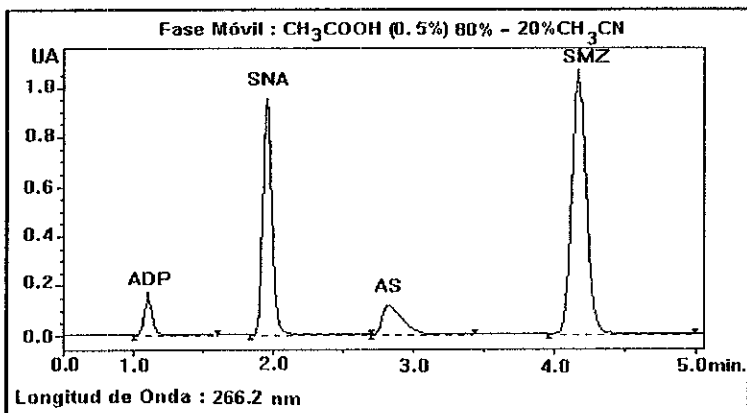


ANEXO 2

FIGURAS DE LA OPTIMIZACIÓN DE LA FASE MÓVIL







TIEMPOS DE RETENCIÓN DE LA SULFAMETAZINA Y TRES DE SUS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN EN LAS FASES MÓVILES EVALUADAS.

FASE MÓVIL	TIEMPOS DE RETENCIÓN (MIN.)				OBSERVACIONES
	ADP	AS	SNA	SMZ	
CH ₃ COOH (0.5%)/CH ₃ CN 90:10	1.27	2.48	2.48	11.67	No existe resolución entre el AS y la SNA.
CH ₃ COOH (1.0%)/CH ₃ CN 90:10	1.24	1.95	2.32	10.32	Al tiempo en que aparece el pico del AS se presenta una depresión de la línea base dada por algún componente, presente en la fase móvil, lo cual genera que el pico del AS se divida.
CH ₃ COOH (1.5%)/CH ₃ CN 90:10	1.25	1.80	2.30	9.90	-
CH ₃ COOH (0.5%)/CH ₃ CN 85:15	1.40	2.64	2.14	6.30	El pico del AS presenta un pequeño coleo.
CH ₃ COOH (1.0%)/CH ₃ CN 85:15	1.13	2.09	2.09	5.95	El AS y la SNA no se resuelven.
CH ₃ COOH (1.5%)/CH ₃ CN 85:15	1.14	1.82	2.08	5.84	-
CH ₃ COOH (0.5%)/CH ₃ CN 80:20	1.10	2.84	1.95	4.17	El pico del AS presenta coleo.
CH ₃ COOH (1.0%)/CH ₃ CN 80:20	1.09	2.32	1.92	4.04	-
CH ₃ COOH (1.5%)/CH ₃ CN 80:20	1.1	1.93	1.93	4.05	No existe separación entre el AS y la SNA. Además aparecen cerca de la depresión por lo cual se general varios picos

RESOLUCIÓN ENTRE LA SULFAMETAZINA Y SUS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN

FASE MÓVIL	RESOLUCIÓN			OBSERVACIONES
	PICO 1 Y 2	PICO 2 Y 3	PICO 3 Y 4	
CH ₃ COOH (0.5%)/CH ₃ CN 90:10	7.8	*	29.5	Pico 1 = ADP Pico 2 y 3 = AS Y SNA Pico 4 = SMZ
CH ₃ COOH (1.0%)/CH ₃ CN 90:10	5.8	1.6	29.4	Pico 1 = ADP Pico 2 = AS
CH ₃ COOH (1.5%)/CH ₃ CN 90:10	5.2	3.6	28.5	Pico 3 = SNA Pico 4 = SMZ
CH ₃ COOH (0.5%)/CH ₃ CN 85:15	8.1	2.7	14.3	Pico 1 = ADP Pico 2 = SNA Pico 3 = AS Pico 4 = SMZ
CH ₃ COOH (1.0%)/CH ₃ CN 85:15	7.7	*	19.8	Pico 1 = ADP Pico 2 y 3 = SNA Y AS Pico 4 = SMZ
CH ₃ COOH (1.5%)/CH ₃ CN 85:15	6.6	2.2	19.5	Pico 1 = ADP Pico 2 = AS Pico 3 = SNA Pico 4 = SMZ
CH ₃ COOH (0.5%)/CH ₃ CN 80:20	7.4	4.5	5.7	Pico 1 = ADP Pico 2 = SNA
CH ₃ COOH (1.0%)/CH ₃ CN 80:20	7.4	2.0	7.3	Pico 3 = AS Pico 4 = SMZ
CH ₃ COOH (1.5%)/CH ₃ CN 80:20	7.0	*	11.2	Pico 1 = ADP Pico 2 y 3 = AS Y SNA Pico 4 = SMZ

* No existe resolución entre los picos

ASIMETRÍA DEL PICO DE LA SULFAMETAZINA EN LAS DIFERENTES
FASES MÓVILES EVALUADAS.

FASE MÓVIL	PICO DE LA SULFAMETAZINA	
	ASIMETRÍA (10%)	COLEO (USP)
CH ₃ COOH (0.5%)/CH ₃ CN 90:10	1.06	1.04
CH ₃ COOH (1.0%)/CH ₃ CN 90:10	1.07	1.05
CH ₃ COOH (1.5%)/CH ₃ CN 90:10	1.05	1.04
CH ₃ COOH (0.5%)/CH ₃ CN 85:15	1.03	1.04
CH ₃ COOH (1.0%)/CH ₃ CN 85:15	1.12	1.08
CH ₃ COOH (1.5%)/CH ₃ CN 85:15	1.19	1.11
CH ₃ COOH (0.5%)/CH ₃ CN 80:20	1.23	1.14
CH ₃ COOH (1.0%)/CH ₃ CN 80:20	1.38	1.21
CH ₃ COOH (1.5%)/CH ₃ CN 80:20	1.12	1.08

Los valores de asimetría que se encuentran en la tabla anterior se determinaron por dos métodos diferentes: al 10% por arriba de la línea base y por el método que marca la USP.

A N E X O 3

ANEXO 3

FORMULARIO.

PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN.

$$\%R = \frac{\left(\frac{Asmz}{Astz}\right)_{Muestra} (Csmz)_{Estandar} FD 100}{\left(\frac{Asmz}{Astz}\right)_{Estandar} 1000 CE}$$

donde:

$FD = 25 \times 25.$

$CE =$ Cantidad del Ensayo Analítico (mg)..

$Cstz =$ Concentración de sulfametazina estándar en $\mu\text{g/ml}.$

LINEALIDAD.

- Coeficiente de correlación:

$$r^2 = \frac{m^2 \left[\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right]}{\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}}$$

- Ordenada al origen y pendiente:

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

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

- Intervalo de confianza de la ordenada al origen y la pendiente:

$$b \pm t_{\alpha/2, n-2} S_{yx} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}} \qquad m \pm t_{\alpha/2, n-2} \frac{S_{yx}}{\sqrt{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

Donde:

$$S_{yx} = \sqrt{\frac{n-1}{n-2} (s_y^2 - b^2 s_x^2)}$$

$$s_x^2 = \frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n-1}$$

$$s_y^2 = \frac{\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}}{n-1}$$

$n =$ numero de pares de los valores x, y .

- Prueba del intercepto:

$$t_{calc.} = \frac{|0 - b|}{S_{yx} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\sum \bar{x}^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}}$$

$$t_{critica} = t_{0.05/2, n-2}$$

- Prueba para la pendiente:

$$t_{calc} = \frac{|0 - m|}{S_{yx} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}}$$

$$t_{critica} = t_{0.05/2, n-2}$$

- Análisis de Variancia para la evaluar la linealidad del sistema.

1. Calcular las siguientes relaciones:

$$SC_{Total} = \sum (y - \bar{y})^2 \Rightarrow \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}$$

$$SC_{Explicada} = \sum (y_{calculada} - \bar{y})^2 \Rightarrow m^2 \left[\sum x^2 - (\sum x)^2 / n \right]$$

$$SC_{Inexplicada} = \sum (y - y_{calculada})^2 \Rightarrow \sum (y - \bar{y})^2 - \sum (y_{calculada} - \bar{y})^2$$

Donde:

$y_{calculada}$ = Valores de y estimados a partir de la ecuación de regresión.

\bar{y} = La media de los valores de y

2. Tabla de Anadeva:

FV	GL	SC	CM	F_{calc}	$F_{critica}$
regresión	1	$SC_{Explicada}$	$SC_{Explicada} / 1$	CM_{Explic} / CM_{Inexp}	$F_{0.05, 1, n-2}$
residual	$n-2$	$SC_{Inexplicada}$	$SC_{Inexplicada} / (n-2)$		
total	$n-1$	SC_{Total}			

PRECISIÓN.

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

EXACTITUD.

$$t_{calc} = \frac{\bar{x}_{Recup.} - \bar{x}_{Adic.}}{s \sqrt{\frac{1}{n_{Recup.}} + \frac{1}{n_{Adic.}}}} \quad t_{critica} = t_{\alpha/2, n-2}$$

donde:

$$s = \sqrt{\frac{[(n_{Recup.} - 1)s_{Recup.}^2 + (n_{Adic.} - 1)s_{Adic.}^2]}{(n_{Recup.} + n_{Adic.} - 2)}}$$

REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD.

- Análisis de Variancia (Modelo Factorial Anidado)

Modelo Matemático:

$$y_{ijk} = \mu + A_i + D_{ij} + E_{k(ij)}$$

1. Realizar la siguiente tabla:

	Analista 1	Analista 2	Analista 3
Día 1	Y_{111}	Y_{121}	Y_{131}
	Y_{112}	Y_{122}	Y_{132}
	Y_{113}	Y_{123}	Y_{133}
Día 2	Y_{211}	Y_{221}	Y_{231}
	Y_{212}	Y_{222}	Y_{232}
	Y_{213}	Y_{223}	Y_{233}

Donde:

El primer subíndice corresponde a el día

El segunda subíndice corresponde a el analista.

El último subíndice corresponde al numero de réplica.

2. Calcular las siguientes sumatorias

$$y_i^2 = (Y_{111} + \dots + Y_{213})^2 + (Y_{121} + \dots + Y_{223})^2 + (Y_{131} + \dots + Y_{233})^2$$

$$y_j^2 = (Y_{111} + Y_{112} + \dots + Y_{233})^2$$

$$y_{ijk}^2 = (Y_{111})^2 + (Y_{112})^2 + \dots + (Y_{233})^2$$

$$y_{ii}^2 = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113})^2 + (Y_{121} + Y_{122} + Y_{123})^2 + (Y_{131} + Y_{132} + Y_{133})^2 +$$

$$(Y_{211} + Y_{212} + Y_{213})^2 + (Y_{221} + Y_{222} + Y_{223})^2 + (Y_{231} + Y_{232} + Y_{233})^2$$

3. Calcular las siguientes sumas de cuadrados:

$$SC_{Analista} = \frac{y_{i..}^2}{dr} - \frac{y_{...}^2}{adr}$$

$$SC_{Dia} = \frac{y_{.j}^2}{r} - \frac{y_{...}^2}{adr}$$

$$SC_{Error} = y_{ijk}^2 - \frac{y_{ij}^2}{r}$$

Donde: a = Numero de analistas.
 d = Numero de días.
 r = Numero de réplicas.

4. Tabla de Anadeva.

FV	GL	SC	CM	$F_{calc.}$	$F_{critica}$
Analista	$a-1$	$SC_{Analista}$	$SC_{Analista} / (a-1)$	$CM_{Analista} / CM_{Dia}$	$F_{0.05, (a-1)}$
Día	$d-1$	SC_{Dia}	$SC_{Dia} / (d-1)$	CM_{Dia} / CM_{Error}	$F_{0.05, (d-1)}$
Error	$(r-1)ad$	SC_{Error}	$SC_{Error} / (r-1)ad$		

SENSITIVIDAD.

- *Análisis de Variancia para determinar el cuadrado Medio.*

Modelo Matemático:

$$Y_{ij} = \mu + C_i + E_{ij}$$

1. *Tabular los Resultados como se indica en la siguiente tabla:*

Respuestas de cada nivel de concentración					
C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
Y ₁₁	Y ₂₁	Y ₃₁	Y ₄₁	Y ₅₁	Y ₆₁
Y ₁₂	Y ₂₂	Y ₃₂	Y ₄₂	Y ₅₂	Y ₆₂
Y ₁₃	Y ₂₃	Y ₃₃	Y ₄₃	Y ₅₃	Y ₆₃

Donde:

Primer Subíndice: Nivel de Concentración.

Segundo Subíndice: Réplica.

2. *Realizar las siguientes sumatorias:*

$$y_{ij}^2 = (Y_{11})^2 + (Y_{12})^2 + (Y_{13})^2 + (Y_{21})^2 + \dots + (Y_{33})^2$$

$$y^2 = (Y_{11} + Y_{12} + Y_{13} + Y_{21} + \dots + Y_{33})^2$$

$$y_{i.}^2 = (Y_{11} + Y_{12} + Y_{13})^2 + (Y_{21} + Y_{22} + Y_{23})^2 + (Y_{31} + Y_{32} + Y_{33})^2 + (Y_{41} + Y_{42} + Y_{43})^2 + (Y_{51} + Y_{52} + Y_{53})^2 + (Y_{61} + Y_{62} + Y_{63})^2$$

3. *Calcular las siguientes sumas de cuadrados:*

$$SC_{Concentracion} = \frac{y_{i.}^2}{r} - \frac{y^2}{cr}$$

$$SC_{Error} = y_{ij}^2 - \frac{y_{i.}^2}{r}$$

4. Con los datos anteriores construir la siguiente tabla:

FV	GL	SC	CM
Concentración	C-1	$SC_{Concentración}$	$SC_{Concentración} / (C-1)$
Error	$(r-1)C$	SC_{Error}	$SC_{Error} / (r-1)C$

• Prueba de DMS.

1. Calcular los promedios de las respuestas de cada nivel de concentración.
2. Ordenar los promedios en forma creciente como se muestra en la siguiente tabla:

Medias	\bar{x}_1	\bar{x}_2	\bar{x}_3	\bar{x}_4	\bar{x}_5	\bar{x}_6
\bar{x}_1	$\bar{x}_1 - \bar{x}_1$	$\bar{x}_2 - \bar{x}_1$	$\bar{x}_3 - \bar{x}_1$	$\bar{x}_4 - \bar{x}_1$	$\bar{x}_5 - \bar{x}_1$	$\bar{x}_6 - \bar{x}_1$
\bar{x}_2	$\bar{x}_1 - \bar{x}_2$	$\bar{x}_2 - \bar{x}_2$	$\bar{x}_3 - \bar{x}_2$	$\bar{x}_4 - \bar{x}_2$	$\bar{x}_5 - \bar{x}_2$	$\bar{x}_6 - \bar{x}_2$
\bar{x}_3	$\bar{x}_1 - \bar{x}_3$	$\bar{x}_2 - \bar{x}_3$	$\bar{x}_3 - \bar{x}_3$	$\bar{x}_4 - \bar{x}_3$	$\bar{x}_5 - \bar{x}_3$	$\bar{x}_6 - \bar{x}_3$
\bar{x}_4	$\bar{x}_1 - \bar{x}_4$	$\bar{x}_2 - \bar{x}_4$	$\bar{x}_3 - \bar{x}_4$	$\bar{x}_4 - \bar{x}_4$	$\bar{x}_5 - \bar{x}_4$	$\bar{x}_6 - \bar{x}_4$
\bar{x}_5	$\bar{x}_1 - \bar{x}_5$	$\bar{x}_2 - \bar{x}_5$	$\bar{x}_3 - \bar{x}_5$	$\bar{x}_4 - \bar{x}_5$	$\bar{x}_5 - \bar{x}_5$	$\bar{x}_6 - \bar{x}_5$
\bar{x}_6	$\bar{x}_1 - \bar{x}_6$	$\bar{x}_2 - \bar{x}_6$	$\bar{x}_3 - \bar{x}_6$	$\bar{x}_4 - \bar{x}_6$	$\bar{x}_5 - \bar{x}_6$	$\bar{x}_6 - \bar{x}_6$

3. Restar las medias como se observa en la tabla anterior.

4. Determinar el valor de DMS, mediante la siguiente fórmula:

$$DMS = t_{0.05/2, g, l_{error}} \sqrt{\frac{2CM_{Error}}{r}}$$

5. El valor de DMS se compara con la diferencia de las medias (positivas) y el criterio que se toma es el siguiente:

Si $DMS < a$ la diferencia de las medias \Rightarrow Existe diferencia significativa entre ellas.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

1. **Anderson R. (1987).** "Practical statistics for analytical chemist." *Van Nostrand Reinhold*. New York, pp 99-103
2. **Boison O. Joe and Keng J. Y. Lily. (1994).** "Determination the sulfamethazine in bovine and porcine tissues by reverse-phase liquid chromatography." *J. of the A.O.A.C. International*. vol. 78, no 3, pp 987-993.
3. **Boison O. Joe and Keng J. Y. Lily. (1995).** "Determination of sulfadimethoxine and sulfamethazina residues in animal tissues by liquid chromatography and thermospray mass spectrometry." *J. of The A.O.A.C. International*. vol. 78, no 3. pp 987-993.
4. **CLARKE's (1986).** "Isolation and identification of drugs." 2da. ed. *The Pharmaceutical Press*. Great Britain. pp 984-985.
5. **Colegio Nacional de QFB AC. (1986).** "Comite de elaboración de guías oficiales de validación de la dirección general de control de insumos para la salud." *SSA*. pp 1-10
6. **Cox Byron et al. (1982).** "High pressure liquid chromatographic determinaton of sulfametazine in pork tissue." *J. of The A.O.A.C.* vol, 65. no. 6, pp 1311-1315
7. **Daniel W. (1991).** "Bioestadística." 3ra. ed. *Limusa*. México. pp 355-382
8. **Florey Klaus (1978).** "Analytical Profiles of drug Substance". vol. 7. *Academia Press Inc.* U S.A. pp 403-418.
9. **Goehl Thomas, Mathur K. Lalit, et al. (1978).** "Simple high pressure liquid chromatographic.determination of trisulfapyrimidines in human serum." *Journal of Pharmaceutical Sciences*. vol. 67, no.3. pp 404-406.
10. **Long R. Austin, Hsieh C.Lilyet et al. (1990).** "Multiresidue method for the determination of sulfonamides in pork tissue." *J. Agric.Food Chem.* vol. 38, no 2. pp 423-426.
11. **Meyer L. (1982).** "Farmacología terapéutica veterinaria." 2da. ed *Hispanoamerica*. México. pp 378
12. **Miller J. (1993).** "Estadística para química analítica." 2da ed., *Addison-Wesley Iberoamericana*. E.U.A. pp 21-28, 51-55, 94-100
13. **NOM-073-SSA1-1993 (1994).** "Estabilidad de medicamentos." *Diario oficial de la Federación*. 4 Nov. México D.F. pp. 63
14. **NOM-073-SSA1-1993 (1996)** "Estabilidad de medicamentos." *Diario Oficial*. 8 Marzo, México D.F. pp 60.
15. **Norma Ethel Sbarbati de Nubelman. (1975).** "Estabilidad de medicamentos" *Argentina. De. El Ateneo*. pp 3, 76-84.

16. **Parasramduria Jagdish and Gupta Das V. (1986).** "Quantitation of sulfacetamide, sulfadiazine, sulfamerazine and sulfamethazine in various combinations using High performance liquid chromatography." *Drug Development and Industrial Pharmacy*. vol 12, no. 14, pp 2511-2519.
17. **Parks. W. Owen. (1982).** "Screening test for sulfamethazine and sulfathiazole in swine liver." *J. of The A.O.A.C International*. vol. 65, no.3, pp 632-634.
18. **Quattrocchi O. A., Abelaira S. Laba R. F. (1992).** "Introducción a la HPLC" *La Argentina*. Argentina. pp 6, 40, 56-110, 301-324.
19. **Yost, L. S. Ettore, R. D. Conlon (1981).** "Introducción a la cromatografía líquida practica." *PERKIN-ELMER*. U.S.A. pp 3-10, 76-82.
20. **Smedley D. Michael. (1990).** "Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamide residues in bovine milk." *J. of The A.O.A.C. International*. vol. 73, no.6, pp 875-879.
21. **Smedley D. Michael. (1994).** "Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamide residues in bovine milk." Collaborative study. *J. of The A.O.A.C. International*. vol. 77, no.5, pp 1112-1122.
22. **Valdés J. R.** "La Estabilidad de los Productos Farmacéuticos. Industria Médico Farmacéutica". Aportación del autor a la Dra. Raquel López A. pp 2-9.
23. **Valdés J. R. (1987).** "Ventajas y limitaciones de la cinética química en los estudios de estabilidad." *Industria Médico Farmacéutica*. vol. 3, no. 1. pp 55-61.
24. **Van'Tklooster G. et al (1991).** "High-performance liquid chromatographic method for the routine determination of sulphadimidine, its hydroxy metabolites and N4-acetylsulphadimidine in body fluids and cell culture media." *Journal of Chromatography Biomedical Applications*. 557; pp 157-168.
25. **Venturella V. S. (1968).** "Selective acid-catalyzed hydrolyses of metoxy-sulfanilamidodiazines." *J. Pharm. Sci.* no. 57, pp 7.
26. **Zajac-M (1977).** "Kinetics and mechanism de degradation of some 2-sulfanilamidopyrimidine derivatives. Part 4. Mecanism and kinetics of especific acid catalyzed hydrolysis of sulfadimidine. *Pol.J.Pharmacol-Pharm.* no 29, Sep-Oct pp. 555-563. International Pharmaceutical Abstracts." 1970-Junio1997. *Silver Platter Information (CD)*.