



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

2/4/
29.

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO, POR
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR), PARA
DETERMINAR LA PUREZA DE LA SULFAMETAZINA SÓDICA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

ANGÉLICA MARÍA MENDOZA ÁNGELES.

ASESORES DE TESIS:

Q.F.B. JOSÉ ANTONIO GARDUÑO ROSAS.
DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO.

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

259443.



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
SISTEMA DE
MEXICO

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

ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

Departamento de
Exámenes Profesionales

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

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

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Desarrollo y validación de un método analítico, por cromatografía
líquida de alta resolución (CLAR), para determinar la pureza de
la sulfametazina sódica.

que presenta la pasante: Angélica María Mendoza Angeles.

con número de cuenta: 9156096-8 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

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

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

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 16 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

PRIMER SUPLENTE Q.F.B. Guadalupe Rebollar Barrera

SEGUNDO SUPLENTE M. en C. Efrén Hernández Baltazar

VIVE PLENAMENTE
CADA DÍA
DISFRUTA LO MEJOR
DE CADA HORA, DE CADA DÍA
DE CADA ETAPA DE TU VIDA.
ENTONCES PODRÁS MIRAR HACIA EL FUTURO
CON CONFIANZA, Y HACIA EL PASADO
SIN LAMENTACIONES.....
NO TRATES DE IMITAR A NADIE
PERO DA SIEMPRE LO MEJOR DE TI.
ATRÉVETE A SER DIFERENTE Y A SEGUIR
TU PROPIA ESTRELLA..... SIN TEMER A SER FELIZ.
GOZA DE TODO LO MARAVILLOSO.
AMA CON TODA TU ALMA Y TODO EL CORAZÓN.
NO DUDES DEL CARIÑO DE AQUÉLLOS QUE AMAS.
CUANDO TE ENFRENTE A UNA DECISIÓN,
ACTÚA LO MÁS INTELIGENTEMENTE POSIBLE Y OLVIDATE
DE ANALIZARLA DESPUÉS, EL MOMENTO
DE LA ABSOLUTA CERTEZA JAMÁS LLEGARÁ.
PERO POR ENCIMA DE TODO, RECUERDA QUE DIOS
AYUDA A AQUÉLLOS QUE SE AYUDAN A SÍ MISMOS.
PROCEDE COMO SI TODO DEPENDIERA DE TI Y REZA
COMO SI TODO ESTUVIERA EN LAS MANOS DE DIOS.



AGRADECIMIENTOS

A DIOS:

ERES PARTICIPE DEL LOGRO DE
UNA DE MIS METAS, GRACIAS
POR ESTAR SIEMPRE PRESENTE
EN MI VIDA.

A USTEDES PADRES:

QUE SIEMPRE HAN CONFIADO EN
MI Y ME HAN APOYADO DURANTE
TODA MI VIDA, LES OFREZCO EL
TRIUNFO QUE SIN SU AYUDA NO
HUBIERA PODIDO LOGRAR.
LOS AMO.

A MIS HERMANOS:

SONIA, ROSALBA Y OSCAR, POR
OBSERVAR EN USTEDES EL
ESPÍRITU QUE ME MOTIVO A
SALIR ADELANTE, GRACIAS
PORQUE SE QUE PUEDE CONTAR
EN TODO MOMENTO CON

A MI CUÑADA:

GRACIAS ROSALBA POR TUS
CONSEJOS DE HERMANA Y POR
TU OPTIMISMO.

A MIS ASESORES:

PROFESOR PEPE Y DRA RAQUEL,
POR CONTRIBUIR A LA
REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

A MI ABUELITA:

GRACIAS POR SU COMPRENSIÓN Y
CARIÑO.

MIS SINODALES:
POR SU TIEMPO Y VALIOSA
APORTACIÓN A ESTE TRABAJO.

PROFESOR EFREN:
GRACIAS POR SUS OPORTUNOS Y
SABIOS CONSEJOS.

GENERACIÓN 18^{AVA}. DE Q.F.B.:
DE LA CUAL GUARDO MUY BELLOS
RECUERDOS, MUY EN ESPECIAL DE MIS
SIEMPRE AMIGAS (LA CHAPIS, JULIETINA,
LA FLACU, TERE, ANGELIQUITA, LILIA Y
KARINA) GRACIAS POR SU AMISTAD
INCONDICIONAL.

NO PIENSEN QUE ME HE OLVIDADO,
CLARO QUE NO, SI CON USTEDES HE
DISFRUTADO DE MOMENTOS MUY
ESPECIALES Y ME HAN
DEMOSTRADO SU APOYO Y AMISTAD
INCONDICIONAL, GRACIAS ENRIQUE,
SARA, CLAUDIA, MARINA, MARGOT,
ARMANDO, ANA BELEM Y LOLA.

A FRANCISCO:
GRACIAS POR TUS CONSEJOS,
MOTIVACIÓN Y APOYO QUE ME HAS
BRINDADO Y POR ENSEÑARME A NUNCA
DARME POR VENCIDA.

RECONOCIMIENTOS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN:

A LA SECCIÓN DE INGENIERÍA Y
TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA:
DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO Y
Q.F.B. JOSÉ ANTONIO GARDUÑO
ROSAS.

A LOS LABORATORISTAS: DON JUAN,
MIGUEL ANGEL Y MALBINA.

A CONACIT Y PAPIME:

POR SU APOYO AL PROYECTO DE
SULFAMETAZINA.

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
ABREVIATURAS.	iii
ÍNDICE DE TABLAS.	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.	v
INTRODUCCIÓN.	vi
OBJETIVOS.	vii
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO.	
1. SULFAMETAZINA.	
1.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS.	2
1.1.1.. SULFAMETAZINA SÓDICA.	4
1.2. SÍNTESIS.	4
1.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS.	5
2. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO.	
2.1. INTRODUCCIÓN.	7
2.2. RESERVOIRIO DE LA FASE MÓVIL.	8
2.3. BOMBA.	8
2.4. INYECTOR.	9
2.5. COLUMNA.	10
2.6. DETECTOR.	14
2.6.1. DETECTOR DE ARREGLO DE DIODOS (DAD)).	15
2.7. ADMINISTRADOR DE SISTEMA.	16
3. CRITERIOS PARA LA SELECCIÓN DE CONDICIONES DE OPERACIÓN EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.	
3.1. RESOLUCIÓN.	17
3.2. FACTOR DE CAPACIDAD.	19
3.3. FACTOR DE EFICIENCIA.	19
3.4. FACTOR DE SEPARACIÓN.	19
3.5. FACTOR DE COLEO.	20
4. MÉTODOS DE ANÁLISIS CUANTITATIVO UTILIZADOS EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	
4.1. NORMALIZACIÓN INTERNA.	21
4.2. ESTÁNDAR INTERNO.	22
4.3. ESTÁNDAR EXTERNO.	23
4.4. ESTÁNDAR AGREGADO.	24
5. REQUISITOS PARA EL DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO.	25

CAPITULO II: DESARROLLO EXPERIMENTAL.

	Páginas
6. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO.	28
7. DESARROLLO DEL MÉTODO PARA SELECCIONAR CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.	
7.1. ESTRATEGIA SEGUIDA EN EL DESARROLLO DEL MÉTODO.	29
7.2. SELECCIÓN DEL ESTÁNDAR INTERNO.	30
7.2.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	31
7.3. OPTIMIZACIÓN DE LA FASE MÓVIL.	34
7.3.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	34
8. DETERMINACIÓN DE LA PUREZA DE LA SULFAMETAZINA SÓDICA	
8.1. ESTRATEGIA.	41
8.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	42
9. VALIDACIÓN DEL MÉTODO.	
9.1. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN.	46
9.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	47
10. CONCLUSIONES.	61
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA.	62
12. ANEXOS	
ANEXO 1: PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y DE LA FASE MÓVIL.	65
ANEXO 2: DATOS PARA DETERMINAR LA REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO.	67
ANEXO 3. FORMULARIO.	70
ANEXO 4: GLOSARIO DE TERMINOS.	78

ABREVIATURAS

DAD	Detector de arreglo de diodos.
PDA	En inglés significa Photodiode Array detector.
NaOH	Hidróxido de sodio.
HCl	Ácido clorhídrico.
SMZ	Sulfametazina.
STZ	Sulfatiazol.
SXZ	Sulfametoxazol.
TPM	Trimetoprim.
CL	Cromatografía líquida.
CG	Cromatografía de gases.
IR	Infrarojo.
U.V	Ultra-violeta
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución.
HPLC	En inglés significa High Performance Liquid Chromatography.
E.I.	Estandar interno.
K'	Factor de capacidad.
N	Numero de platos teóricos.
As	Asimetría.
As	Altura equivalente de un plato teórico.
AEPT	Resolución.
Rs	Tiempo de retención.
T _R	Metanol.
MeOH	Acetonitrilo.
CH ₃ CN	Acido acético.
CH ₃ COOH	Fosfato de potasio monobásico.
KH ₂ PO ₄	Tetrahidrofurano.
THF	Buenas Prácticas de Manufactura.
BMP	Food and Drug Administration.
FDA	Unidades de absorbancia.
UA	Longitud de onda.
λ	Tercera dimensión.
3D	Nanómetros
nm	Área de la sulfametazina sódica.
Asmz	Área de la sulfametazina base.
Asmzb	Área del sulfatiazol.
Astz	Concentración de la sulfametazina base.
Csmzb	Concentración de la sulfametazina sódica.
Csmz	Concentración del sulfatiazol.
Cstz	Respuesta
R	Grados celcius.
° C	

ÍNDICE DE TABLAS.	Páginas
I: Diferentes condiciones de análisis para cuantificación de la Sulfametazina por CLAR.	5
II: Fases enlazadas más comunes.	12
III: Variables analíticas típicas en validación de métodos analíticos.	26
IV: Selección de la fase móvil adecuada para el desarrollo del análisis.	34
V: Resultados obtenidos para estimar la pureza de la sulfametazina sódica.	42
VI: Estadísticos reportados para cada uno de los ensayos adición patrón, en base húmeda y en base seca.	43
VII: Criterios de aceptación establecidos por el colegio de Q.F.B. (s), para validación de métodos analíticos.	46
VIII: Resultados para determinar la linealidad y precisión del sistema.	47
IX: Parámetros estadísticos estimados para la linealidad del sistema.	48
X: Ecuación de regresión que explica la relación lineal en el sistema.	48
XI: Análisis de variancia para evaluar la relación lineal en el sistema.	50
XII: Prueba del intercepto (en el sistema).	50
XII: Parámetros estadísticos determinados para evaluar la precisión del sistema.	51
XIV: Resultados para determinar la linealidad del método.	52
XV: Parámetros estadísticos estimados para evaluar la linealidad del método.	52
XVI: Análisis de variancia para determinar la relación lineal en el método.	54
XVII: Prueba del intercepto (en el método).	54
XVIII: Resultados para determinar la precisión, exactitud y repetibilidad (analista 1) del método.	55
XIX: Parámetros estadísticos determinados para evaluar la precisión del método.	56
XX: Prueba de t student para determinar la exactitud del método.	56
XXI: Parámetros estadísticos estimados para evaluar la repetibilidad del método.	57
XXII: Resultados para determinar la reproducibilidad del método.	58
XXIII: Análisis de variancia para determinar la reproducibilidad del método.	59
XXIV: Parámetros estadísticos determinados para evaluar la reproducibilidad del método.	59
XXV: Resumen de resultados de la validación del método.	60
XXVI: Resultados obtenidos (Analista 1) para evaluar la reproducibilidad del método.	67
XXVII: Resultados obtenidos (Analista 2) para evaluar la reproducibilidad del método.	68
XXVIII: Temperaturas registradas durante la determinación de la reproducibilidad del método.	69

ÍNDICE DE FIGURAS.

	Páginas
1. Fórmula estructural de la sulfametazina.	2
2. Comportamiento espectrofotométrico de la sulfametazina.	3
3. Síntesis de la sulfametazina.	4
4. Sistema cromatográfico.	7
5. Inyector "loop".	10
6. Componentes de una columna.	10
7. Estructura de una fase enlazada ODS (C ₁₈).	13
8. Esquema de un DAD UV/Visible.	15
9. Efectos de K', α y N, en la Rs.	18
10. Ecuación para determinar la cantidad de analito, por el método de normalización interna.	21
11. Ecuación para determinar la cantidad de analito, por el método de estándar interno.	22
12. Ecuación para determinar la cantidad de analito, por el método de estándar externo.	23
13. Ecuación para determinar la cantidad de analito, por el método de estándar agregado.	24
14. Pasos a seguir en el desarrollo de métodos por CLAR.	25
15. Estrategía seguida en el desarrollo del método para determinar la pureza de la SMZ sódica.	29
16. Selección del estándar interno.	30
17. Cromatograma "SMZ y STZ".	32
18. Cromatograma "SMZ y SXZ".	32
19. Cromatograma "SMZ y TPM".	33
20. Cromatograma "SMZ y STZ" proporción de f.m 85:15, (2.5%).	35
21. Cromatograma "SMZ y STZ" proporción de f.m 75:25, (1.5%).	35
22. Cromatograma "SMZ" proporción de f.m 80:20, (1.5%).	36
23. Cromatograma "SMZ" proporción de f.m 85:15, (1.5%).	36
24. Cromatograma "SMZ" proporción de f.m 90:10, (1.5%).	37
25. Cromatograma "SMZ" proporción de f.m 80:20, (1.0%).	37
26. Cromatograma "SMZ" proporción de f.m 85:15, (1.0%).	38
27. Cromatograma "SMZ" proporción de f.m 90:10, (1.0%).	38
28. Cromatograma "SMZ" proporción de f.m 80:20, (0.5%).	39
29. Cromatograma "SMZ" proporción de f.m 85:15, (0.5%).	39
30. Cromatograma "SMZ" proporción de f.m 90:10, (0.5%).	40
31. Cromatograma "SMZ" proporción de f.m 80:20, (0.25%).	40
32. Espectro de absorción del E.I y la SMZ en NaOH 0.01N.	43
33. Análisis cualitativo de pureza para la SMZ.	44
34. Gráfico en 3D en donde se observa el espectro de adsorción de la SMZ y el STZ.	45
35. Representación gráfica de la linealidad del sistema.	49
36. Representación gráfica de la linealidad del método.	53

INTRODUCCIÓN.

El desarrollo de nuevos productos requiere de resultados analíticos, significativos y seguros, que sean generados a través de diferentes análisis farmacéuticos, siendo uno de éstos el análisis de pureza del nuevo componente propuesto como farmacéutico.

De ahí que el interés primordial de la realización de éste proyecto es determinar la pureza de la Sulfametazina sódica, la cual será utilizada en la fabricación de una forma farmacéutica para combatir la coccidiosis en cabras. Dicha cuantificación debe ser mediante una técnica analítica que sea altamente sensitiva, selectiva y que permita el uso de métodos analíticos que puedan ser apropiados para la determinación de microcantidades.

Una variedad de métodos pueden ser usados para determinar la pureza (Cromatografía líquida, espectroscopia UV, fluorescencia, Cromatografía de gases, espectrometría de masas, Infrarojo, etc.). De estos métodos, la Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) ha revolucionado el campo de la separación y cuantificación, en cortos periodos de tiempo de análisis, ofreciendo eficiencia, confiabilidad, selectividad y sensibilidad en la separación de los componentes.

La CLAR es una herramienta invaluable en el desarrollo de metodologías para evaluar medicamentos. Ha llegado a ser la técnica de elección para la determinación de potencia, uniformidad de dosis y pureza de un producto ó fármaco, y acoplada a un detector UV con arreglo de diodos (DAD) ofrece una visión más amplia de la degradación de productos, identidad e impurezas del fármaco.

Dada la importancia que tienen los métodos analíticos en la Industria farmacéutica, en éste proyecto se pretende adaptar las condiciones de operación de una técnica por CLAR, reportada por Goeth T., para determinar la pureza de la Sulfametazina sódica y posteriormente validar el método.

Para validar el método analítico es necesario generar la documentación que permita obtener resultados analíticos confiables, a partir de características de eficiencia del método, que serán evaluados por medio de pruebas estadísticas.

Para determinar la pureza de la sulfametazina sódica por CLAR, y validar el método analítico, el trabajo experimental se dividió en tres partes:

- I Optimización de condiciones cromatográficas.*
- II Determinación de pureza de la sulfametazina sódica.*
- III Validación del método analítico.*

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR), PARA DETERMINAR LA PUREZA DE LA SULFAMETAZINA SÓDICA.

OBJETIVOS.

GENERAL:

Desarrollar y validar un método por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) para determinar la pureza de la sulfametazina sódica.

PARTICULARES:

Seleccionar y optimizar las condiciones de análisis cromatográfico para la sulfametazina.

Determinar la pureza de la sulfametazina sódica.

Validar el método cromatográfico.

CAPÍTULO I

*MARCO
TEÓRICO.*

1. SULFAMETAZINA

1.1. Características físico-químicas (Florey Klaus, 1978, pp. 401-419)

La sulfametazina también es conocida como sulfadimerazina, sulfadimidina, sulfamidina o sulfadimetilpirimidina, su fórmula molecular es $C_{12}H_{14}N_4O_2S$ y presenta un peso molecular de 278.33 g/mol. (figura 1).

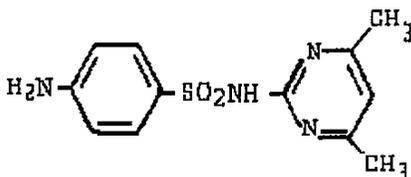


Figura 1. Fórmula estructural de la sulfametazina

Es un polvo blanco cristalino de sabor amargo e inodoro, que tiende a oscurecerse por exposición a la luz.

En la figura 2 se presenta el espectro de absorción de la sulfametazina en el intervalo de longitud de onda de 220 a 340 nm. En medio acuoso (pH= 6.6 en agua) presenta un máximo a 240 nm con un coeficiente de absorptividad molar de $670 [g/100 ml]^{-1} cm^{-1}$. En medio alcalino (0.01 N NaOH) presenta dos picos, a 243 y 257 nm, con coeficientes de absorptividad de 765 y $776 [g/100 ml]^{-1} cm^{-1}$ respectivamente. Disuelta en medio ácido (0.01 N HCl) se observan dos picos, a 241 y 279 nm, con coeficientes de absorptividad de 561 y $266 [g/100 ml]^{-1} cm^{-1}$ respectivamente.

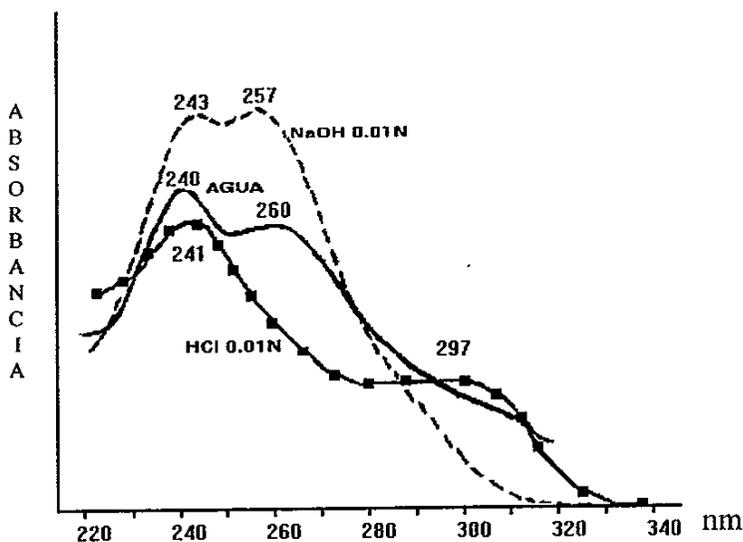
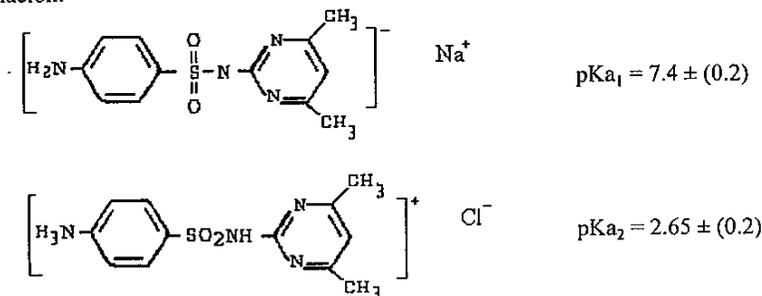


Figura 2. Espectro de absorción de la sulfametazina.

La sulfametazina presenta fluorescencia en solución acuosa a cualquier pH. Además presenta fosforescencia a 410 nm. Es muy escasamente soluble en agua y en 0.1 N NaOH; insoluble en benceno; soluble en: 0.1 N HCl, 1 en 20 de etanol, 1 en 3 de acetona, 1 en 600 de cloroformo y 1 en 2500 de éter (Moffat, A.C., 1986:, pp. 984-985). Soluble en ácido mineral diluido y soluciones acuosas alcalinas (hidróxidos y carbonatos).

Su punto de fusión se encuentra entre 197-200 °C.

El comportamiento de la sulfametazina es el de un anfótero y presenta dos constantes de disociación:



1.1.1. Sulfametazina sódica.

También llamada sulfametazina soluble, presenta un peso molecular de 300.2 g/mol y su fórmula molecular es: $C_{12}H_{14}N_4NaO_2S$.

Es un polvo de color blanco, altamente higroscópico, que tiende a descomponerse por exposición a la luz, en contacto con el aire absorbe dióxido de carbono disminuyendo su solubilidad en agua.

Su solubilidad es 1 en 2.5 de agua y 1 en 60 de etanol ^(Moffat A.C., 1986, pp. 984-985).

1.2. Síntesis de la sulfametazina base.

La sulfametazina es preparada por reacción de cloruro acetil-sulfanílico con 2-amino -4,6-dimetilpirimidina suspendida en pirimidina húmeda o en acetona/ pirimidina, seguida por una hidrólisis alcalina de la 2(N-4-, acetilsulfanilamida)-4,6- dimetilpirimidina, el resultado es una sal neutralizada con dióxido de azufre (SO_2).

La 2-amino -4,6- dimetilpirimidina es preparada por condensación de cantidades equimolares de sulfanilguanidina y acetilcetona. Esta es precipitada en presencia de agua en la forma de cristales de color amarillo pálido. (Figura 3).

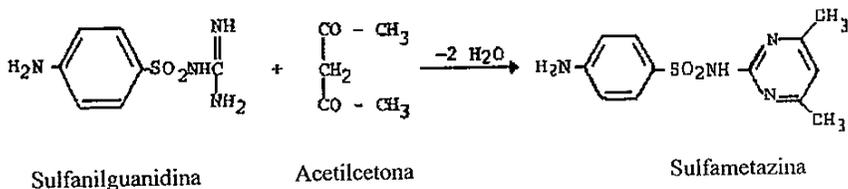


Figura 3. Síntesis de la Sulfametazina.

1.3. Métodos de análisis.

Existen diferentes métodos de análisis para la sulfametazina, entre ellos se encuentran: análisis volumétricos, colorimétricos y cromatográficos en ensayos microbiológicos y en fluidos biológicos.

En cuanto a los métodos de analíticos para la sulfametazina, por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), se han reportado diferentes condiciones de análisis, las cuales se mencionan en la tabla I.

TABLA I. Diferentes condiciones de analisis para la cuantificación de la sulfametazina por CLAR.

REFERENCIA	DIMENSIONES DE LA COLUMNA	MATERIAL DE EMPAQUE	DETECTOR	VELOCIDAD DE FLUJO	VOLUMEN DE INYECCIÓN	FASE MÓVIL
Boison, J. 1995: 651-658	250 x 4,6 mm id	C ₁₈ de 5 µm	UV a 265 nm	1.2 ml/min	20-50 µl	0.05 M de NaH ₂ PO ₄ - acetonitrilo (7:2 +28 v/v)
Boison, J. 1994: 538-564	250 x 4,6 mm id	C ₁₈ de 5 µm	UV a 265 nm	0.8 ml/min	20-50 µl	0.05 M de NaH ₂ PO ₄ - MeOH (7+3 v/v)
Carignan, G. 1991: 479-482	250 x 4,6 mm id	C ₁₈ de 5 µm	UV a 265 nm	1.5 ml/min	850 µl	600 ml de metanol con 1400 ml de agua
Honil, S. 1990: 990-992	250 x 4,6 mm id	Nucleosil 100® C ₁₈ de 5 µm	UV a 265 nm	1 ml/min	10 µl	KH ₂ PO ₄ - acetonitrilo (78:22)
Parks O. 1982: 632-634	30 cm x 4 mm id	C ₁₈ µBondapack®	UV a 254 nm	1 ml/min	-----	Agua- metanol- ác. Acético (80+20+0.5) con 0.1% de hidróxido de tetrabutlamonio.
McGary, E. 1986: 1341-1342	30 cm x 3.9 mm id	C ₁₈ de 10 µm µBondapack®	UV a 254 nm	1 ml/min	20 µl	25% de acetonitrilo +75% (0.5% ac. acético-0.05% octano-1% Sal sódica de Ac sulfónico en agua).
Long, A. 1990: 423-426	30 cm x 4 mm	Octadecil silica derivada ODS	UV a 270 nm	1 ml/min	20 µl	0.017 M H ₃ PO ₄ / Acetonitrilo (70:30 v/v)
Johnson, K. 1975: 1657-1660	0.61 m (2 ft) x 2 mm	Silica porosa octadecil	UV a 254 nm	0.6 ml/min	50 µl	KH ₂ PO ₄ (pH= 7.7) : Alcohol Isopropilico (97.5:2.5 v/v)
Cox, B. 1982: 1311-1315	4.6 mm x 25 cm	C ₁₈	UV a 254 nm	Hasta obtener una presión de 1100 psi	20 µl	250 ml de Acetonitrilo · 750 ml de agua

(Continuación)

REFERENCIA	DIMENSIONES DE LA COLUMNA	MATERIAL DE EMPAQUE	DETECTOR	VELOCIDAD DE FLUJO	VOLUMEN DE INYECCIÓN	FASE MÓVIL
Snedley, M 1994: 1112-1122	250 x 4.6 mm	C ₁₈ de 5 µm	UV a 265 nm	1.5 ml/min	100 µl	(1) 12% MeOH : KH ₂ PO ₄ 0.1 M (12:88 v/v)
Snedley, M 1990: 875-879	300 x 3.9 mm	C ₁₈ de 10 µm	Fluorescente 390 y 475 nm	1 ml/min	50 µl	(2) 30% MeOH : KH ₂ PO ₄ 0.1 M (30:70 v/v)
Tsai, C. 1995: 674-6678	4 6 x 250 mm	Supelcosil®-C ₁₈ -DB de 5 µm	UV 265 nm	1 ml/min	20 µl	Una mezcla de 300 ml de acetronitrilo y 700 ml de 10 M de KH ₂ PO ₄
Larocque, L 1990: 365-367	1 m x 2.1 mm id	Intercambio aniónico	UV a 254 nm	0.8 ml/min	-----	Metanol:0.1M KH ₂ PO ₄ (30:70)
Kram, T. 1972: 254-256	30 cm x 3.9 mm	C ₈	UV a 257 nm	2.0 ml/min	20 µl	0.01M de borato de sodio (pH 9.2), conteniendo nitrato de sodio en varias concentraciones (0.01, 0.04, 0.07, y 0.1M)
Parasrampur, J. 1986: 2511-2519	0.5 m x 2.6 mm id	Fase enlazada amino	UV a 254 nm	1.5 ml/min	5 µl	16%(v/v) de Metanol y 0.02M KH ₂ PO ₄ en agua
Sharma, J. 1976: 1606-1608	100 mm x 4 mm	C ₁₈ 5 µm	UV a 265 nm	0.8 ml/min	20 µl	Metanol:Buffer de fosfate(0.05M, pH 6.67) 10:90.
Van 't Klooster, 1991: 157-168	150 mm x 4.6 mm id	C ₈ 5 µm	UV a 272 nm	2.0 ml/min	100 µl	Mezcla de acetato de sodio 0.02M, Ác. Acético 0.2M, metanol, acetronitrilo y agua (50:3.6:15:4:27.4)
Noon, J 1985: 177:186	125 cm x 4 mm id	C ₁₈	UV a 262 nm	0.9 ml/min	20 µl	Metanol-buffer de fosfatos (0.03M pH 6.4):25:75
Hübner, P 1993: 53-60	3.9 mm x 30 cm id	C ₁₈ 10 µm	UV a 254 nm	1.5 ml/min	5 µl	Acetonitrilo-1% de ac acético (13:87)

2.0 DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO.

2.1 Introducción.

En esta sección se nombran los diversos principios implicados en la conformación de lo que puede llamarse un Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR). El notorio avance que la cromatografía líquida moderna ha experimentado en los últimos años, ha permitido acceder a un nivel instrumental de alta precisión compuesto por bombas para impulsar el eluyente (fase móvil), un dispositivo para la inyección que permite la aplicación de la muestra, una columna para llevar a cabo la separación y un detector para determinar la separación, además de otros accesorios para simplificar, amplificar o aumentar la eficiencia de los componentes fundamentales ^(Qualtrocchi, O., 1992, pp.10). El sistema de cromatografía de líquidos se considera como un conjunto de partes o módulos cuya instalación sigue el orden presentado en la figura 4.

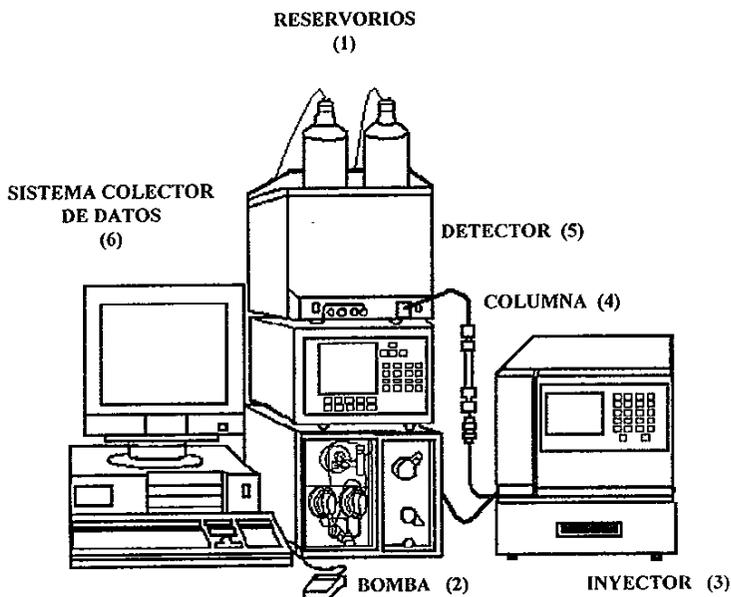


Figura 4. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR).

2.2 Reservorio de la fase móvil.

El reservorio tiene la misión de contener los disolventes que se emplean como fase móvil (Quattrocchi, O., 1992, pp. 11). Puede ubicarse a algunos centímetros sobre el nivel de la bomba para que la fuerza de gravedad dirija el solvente hacia esta, manteniendo llenas las conexiones.

Puede emplearse como reservorio de fase móvil cualquier frasco de laboratorio de buena calidad (de vidrio o polímero resistente), con una tapa adecuada para prevenir el ingreso de partículas ambientales al sistema.

Al extremo del tubo de salida del solvente se conecta un filtro de acero (buzo) con 2 o 10 μm de porosidad que impide el ingreso de partículas a la bomba. La capacidad del frasco depende, lógicamente, del consumo esperado. Los sistemas que necesitan procesos de desgasificación continua están provistos de una tapa especialmente diseñada para tal fin, en la cual podemos encontrar un orificio para la entrada de un gas inerte (comúnmente helio de alta pureza) para desgasificación, otro para la salida del solvente y una válvula que permita una presión positiva del gas sobre el solvente.

Características de un reservorio:

- Capacidad mínima de 500 ml.
- Resistencia a los disolventes empleados.
- Boca delgada.
- No contamine la fase móvil
- Capacidad de ser tapado convenientemente.

2.3. Bomba.

La función de las bombas en CLAR es impulsar la fase móvil proveniente del reservorio del solvente al inyector y, desde ahí, hacia la columna. Su caudal de trabajo puede ser muy variable, según la escala de trabajo escogida. Básicamente existen dos tipos de bomba: Las de presión constante y las de flujo constante.

Las de presión constante, se basan en el empuje constante que ejerce un gas sobre la fase móvil haciéndola pasar por la columna, por lo que el flujo de la fase móvil depende de la resistencia que a su paso opone la columna. La desventaja que presentan dichas bombas en CLAR, es la variación en la velocidad de flujo ya que puede modificarse la retención del soluto y obtenerse datos imprecisos. (Lindsay Sandie, 1992, pp.17-26)

Las de flujo constante, varía la presión para alcanzar un flujo determinado (éstas son las más empleadas). (Osuna Arce, M. 1997, pp. 15)

La resistencia del flujo en el sistema puede cambiar con el tiempo debido a daños en la columna, pequeños cambios en la temperatura y/o fugas de solvente en el sistema.

Requerimientos de una bomba cromatográfica:

- El modulo debe estar hecho de materiales resistentes tanto al ataque químico como al desgaste mecánico.
- Los componentes en contacto con el solvente son de acero inoxidable, zafiro, rubí o teflón.
- Debe ser capaz de resistir altas presiones de salida.
- Disponibilidad y facilidad de un cambio de velocidad de flujo.
- Facilidad de cambiar de un solvente a otro.
- En el caso de bombas cuaternarias, facilidad en realizar cambios en el modo de operación (isocrático, gradiente o flujo programado).
- Debe estar libre de pulsaciones o contar con un atenuador de pulsos.
- Debe ser capaz de bombear la cantidad de flujo adecuada por análisis.
- Debe surtir fase móvil en forma reproducible.
- Deseable que el volumen muerto sea pequeño y constante, por si se desea hacer mezcla de disolventes.
- Exactitud en el flujo. (Manual de operación multisolvent delivery system, 1997, pp. 321-326)

2.4. Inyector.

Módulo del sistema cromatográfico que tiene la función de introducir la muestra en solución a través del sistema, sin interrumpir el flujo del solvente.

Existen cuatro tipos de inyección básicamente: En setup de alta presión, parando el flujo, por "loop" y por "jeringa loop".

La inyección por jeringa-"loop" o válvulas inyectoras es la que ha alcanzado mayor popularidad debido a su versatilidad, fácil operación y durabilidad. Estas válvulas de diseñan para resistir presiones altas y se fabrican solo de material inerte como acero inoxidable y de teflón.

Los inyectores automáticos utilizan "loop-microjeringas" que se pueden programar desde 0.5 hasta 500 μ l de muestra. (Osuna Arce, 1997, pp. 17)

Características:

- Introducir cualquier muestra, tan pequeña como sea posible, a la columna.
- Reproducible.
- Capacidad de operar a alta presión.
- No contribuir a ensanchamientos de bandas.
- Inerte al ataque químico.
- Debe ser preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida en el sistema.
- No debe provocar diluciones importantes en la solución inyectada. (Arrellín R 1996)

En la figura 5 se muestra el diagrama de un inyector de muestra por "loop", donde la muestra, con ayuda de una microjeringa es cargada, (posición load) en el interior del puerto de la microjeringa (4), llenando el contenedor de la muestra ("loop") de acuerdo al volumen determinado, que se encuentra conectado entre los puertos 1 y 4. El exceso de volumen de la muestra se desecha por la salida 6. Al realizar la inyección de la muestra (posición inject), el contenido en el loop fluye hacia la columna por el puerto 3. (Linsay Sandie, 1992, pp. 57)

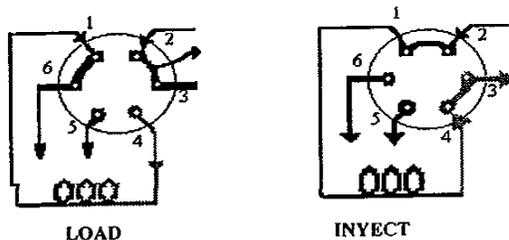


Figura 5. Inyector "Loop".

2.5. Columnas.

Las características más importantes de las columnas para CLAR se integran de dos elementos importantes que son: el material de empaque (naturaleza y tamaño de la partícula) y el contenedor (altura, diámetro y material), que junto con las propiedades de ambas se determina el desempeño de la misma. Cada uno de los anteriores elementos agrupan características que modulan a los parámetros cromatográficos que describen una separación (Figura 6).

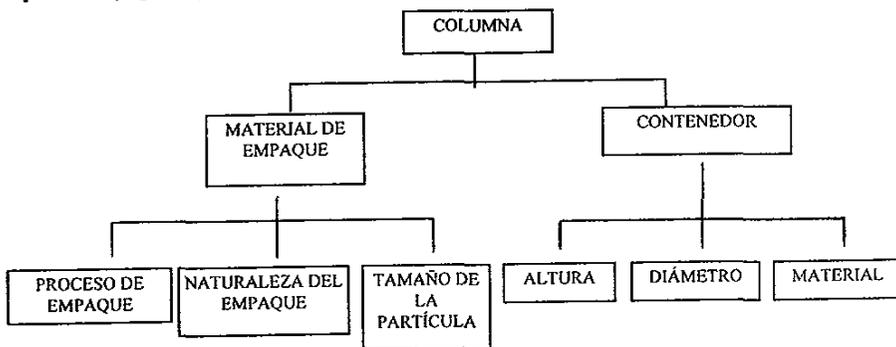


Figura 6. Componentes de una columna.

Los aspectos de interés que deben tomarse en cuenta para el buen desempeño de la columna son:

- Material de construcción del empaque.
 - Polímeros inorgánicos (Sílica y alúmina).
 - Polímeros orgánicos (Estireno-divinilbenceno y polimetacrilato).
- Forma, tamaño y distribución de partícula.
 - Forma: Esférica o irregular.
Las partículas esféricas son mas eficientes que las partículas irregulares, permiten mayor sensibilidad en el análisis y poseen mayor resistencia al paso del liquido generando mayor presión.
 - Tamaño de partícula: 3-10 μm para columnas analíticas y 10-40 μm para columnas preparativas.
 - Distribución:
Mientras mas estrecha sea la distribución del tamaño de partícula, mas eficiente será el material y de igual forma generará mayor presión.
- Fases enlazadas (procedimientos químicos).
La partícula de fase ligada esta compuesta por un material base(silicagel, alúmina, divinilbenceno, etc.), al cual se une químicamente un compuesto que tiene un grupo funcional determinado, por medio de un enlace covalente de tipo siloxano. Ver tabla II.

FASE ESTACIONARIA	GRUPO FUNCIONAL	ESTRUCTURA DEL GRUPO UNIDO COVALENTEMENTE	APLICACIONES
FASE NORMAL	Amino	-NH ₂	Aminas, fenoles, vitaminas hidrosolubles
	Ciano	-CN	Catecolaminas, esferóides, aceites esenciales
	Glicidoxietilmetoxi-silano (Diol)	$\begin{array}{c} \text{Si} - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{OH}) - \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{Si} - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{OH}) - \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{Si} - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{OH}) - \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	Analgésicos, ftalatos, aromáticos polinucleares
FASE REVERSA	Dimetilsilano (C ₂)	Si - O - (CH ₃) ₂	Azúcares, esferóides, nitroderivados
	Octilsilano (C ₈)	Si - O - (CH ₂) ₇ - CH ₃	Nitroderivados, aminoácidos
	Octadecilsilano (ODS - C ₁₈)	Si - O - (CH ₂) ₁₇ - CH ₃	Proteínas, péptidos, tensoactivos acuosos

TABLA II. Fases enlazadas más comunes.

La sílica gel puede definirse como un óxido de silicio hidratado (SO₂ H₂O), en el cual sus átomos metálicos internos están ligados entre sí por átomos de oxígeno (puentes siloxano Si-O-Si) y los superficiales a grupos hidroxilo (constituyendo los grupos silanos Si-OH). Estos silanoles pueden ser de tipo libre, vecinales o geminales. La sílica es fuertemente higroscópica, la presencia de agua es debida a la humedad adsorbida por los grupos activos o como agente de constitución (formando parte del material). El agua fijada por puentes de hidrógeno es la responsable de su bloqueo y pérdida de actividad ^(Quattrocchi O., 1992, pp. 96-101).

La retención del analito depende de la concentración de grupos silanol por unidad de área superficial del material de relleno, cantidad variable según el tipo de sílice empleado, del método de obtención del material, de las condiciones de elaboración y de las condiciones de almacenamiento.

Diferentes clases de fases enlazadas pueden ser hechas dependiendo de la naturaleza del grupo funcional y existen diferentes métodos para su preparación, siendo el más utilizado el método de silanización (Figura 7).

La silanización se lleva a cabo por reacción de los grupos silanoles con un agente silantante (comúnmente clorosilano), en presencia de una amina para eliminar el HCl liberado y catalizar la reacción.

Para eliminar o reducir el efecto de los grupos silanoles superficiales muchas veces se realiza una segunda silanización con moléculas más grandes de agente silantante, este proceso es conocido como "end capping" o "capping off". Sin embargo pueden quedar grupos silanoles sin reaccionar que pueden generar la asimetría de los picos.

Cada molécula de agente silantante (HCl) puede reaccionar únicamente con un grupo silanol. (Linsay Sandie, 1997, pp.25)

La elección que el analista debe hacer entre los tipos de fase ligada, depende del tipo de muestra. En general, a mayor carga carbonada o a mayor lipofiliidad del sustituyente, corresponde mayor retención.

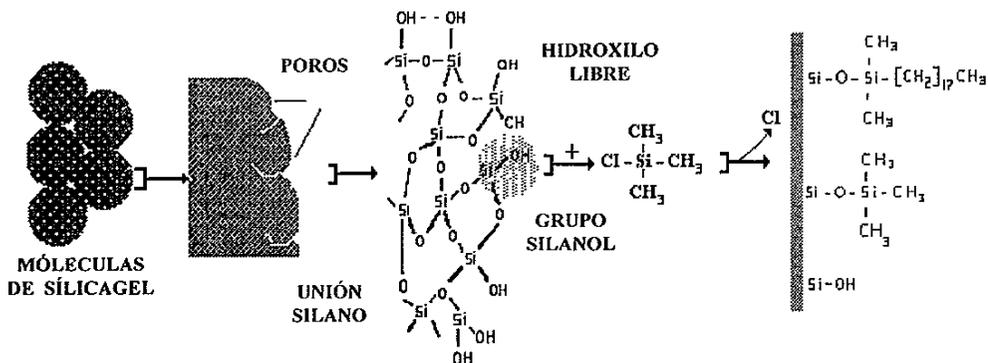


Figura 7. Estructura de la superficie de la fase enlazada ODS (C₁₈).

- **Carga de carbono.**
A mayor carga carbonada (gramos de carbono/100 gramos de cantidad de empaque) o a mayor lipofilia del sustituyente, corresponde mayor retención.
- **Dimensiones.**
 - Columnas de longitudes superiores, incrementa la eficiencia a costa de un incremento en el tiempo de análisis y de la presión del sistema.
 - Columnas de diámetro pequeño requieren menor cantidad de masa para obtener respuestas de alta sensibilidad.
- **Eficiencia.**
Deben obtenerse picos agudos lo cual garantiza una adecuada resolución, el parámetro para evaluar la eficiencia, es número de platos teóricos. (Arrellín R., 1996).

2.6. Detector.

Modulo del sistema cromatográfico que tiene la función de generar una respuesta en presencia de la muestra.

Características:

- No contribuir al ensanchamiento de bandas extracolumnares.
- No destruir la muestra.
- Poseer una buena relación señal/ruido.
- Generar información cualitativa.
- Tener respuesta rápida.
- Alta sensibilidad y especificidad para la detección de solutos.
- Amplio intervalo de linealidad.
- No ser afectado por cambios de temperatura o flujo.
- Alta reproducibilidad.

Los detectores en cromatografía de líquidos se clasifican en dos categorías: Detectores universales y en detectores selectivos.

Los detectores universales son aquellos que miden una propiedad general, determinan propiedades físicas de la fase móvil más las del soluto (por ejemplo: el detector de índice de refracción).

Y los detectores selectivos son los que consideran una propiedad de soluto (por ejemplo: absorción UV.)

El detector a utilizar depende de la muestra, la sensibilidad, selectividad y versatilidad requerida para el análisis.

2.6.1. Detector con Arreglo de diodos (DAD).

Uno de los avances más importantes en sistemas de cuantificación es el acoplamiento del detector de arreglo de diodos (DAD) a la cromatografía de líquidos de alta resolución, lo cual hace que además de ser una técnica cuantitativa sea cualitativa y resolutive a la identidad y pureza de compuestos. (Lindsay Sandie, 1992, pp. 80)

En la figura 8 se muestra un diagrama simplificado de la óptica para un arreglo de diodos, donde la luz policromática de una lámpara de deuterio y es enfocada a través de un sistema de lentes acromáticos hasta llegar a la celda de flujo. La luz existente en la celda de flujo es dispersada por una rejilla de difracción hacia el arreglo de diodos, el cual consiste de 512 diodos. Al empezar cada rastreo el capacitor es asociado con el diodo, el cual descarga una fotocorriente y el diodo es iluminado. La intensidad de luz captada por el diodo es proporcional a la cantidad de corriente necesaria para recargar el capacitor y la lectura del diodo sea leída por la computadora. (Fong G., 1997, pp 125)

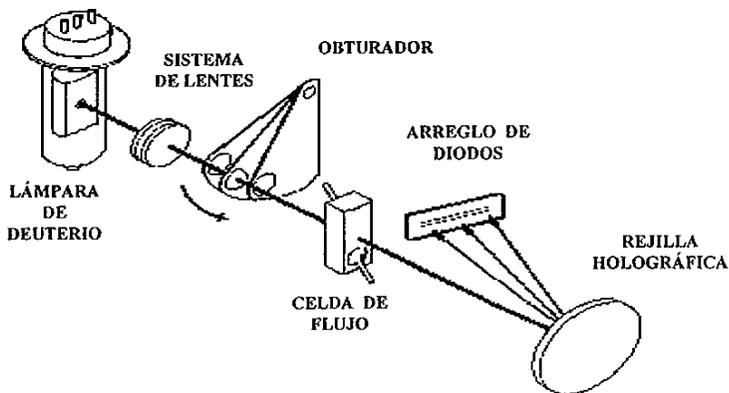


Figura 8. Esquema de un DAD UV/Visible.

Ventajas de un espectro UV-Visible con arreglo de diodos:

- Se obtienen espectros de barrido electrónico.
- Alta sensibilidad y especificidad a mínimas concentraciones de analito e impurezas.
- Resolución espectral de 1.2 nm por diodo (512 diodos).
- Respuesta a concentraciones mínimas de analito e impurezas.
- Disposición de barridos espectrales de la sustancia al mismo tiempo que eluyen de la columna.
- Genera el perfil del soluto durante su elución proporcionando información en tres dimensiones (X-tiempo, Y-absorbancia y Z-longitud de onda).
- Los barridos espectrales comprenden el rango de longitud de onda de 190-800 nm y requieren de 0.5 segundos para ser procesados y almacenados.
- Proporciona información tanto espectral como cromatográfica que permite definir la identidad y pureza de los compuestos. (Manual PDA, 1997)

2.7. Administrador de sistema.

El resultado del ensayo cromatográfico es, por un lado, la obtención de fracciones de los componentes de la muestra y, por otro, la de un gráfico o cromatograma de cuya interpretación puede extraerse conclusiones cualitativas y cuantitativas. Este registro y la eventual manipulación se obtiene a partir de un módulo capaz de recibir la señal proveniente del detector por medio de un sistema de toma y procesamiento de datos para generar un perfil cromatográfico.

El sistemas de colección de datos, se encuentra constituido por:

- Registrador. Que convierte la señal en un gráfico del tipo X-Y.
- Integrador. Permite no solo obtener un registro gráfico (cromatograma) sino también su tratamiento matemático para el calculo de concentraciones.
- Computadora. Permite con el software apropiado tanto el registro gráfico del cromatograma como los cálculos apropiados, la manipulación de datos, almacenamiento de ensayos, generación de reportes e incluso el manejo global de varios cromatógrafos. Como todas las computadoras necesitan señales digitalizadas, se necesita una interfase analógica digital que convierta la señal entregada por el detector. (Quattrocchi, O. 1992, pp 33-36)

3. CRITERIOS PARA LA SELECCIÓN DE CONDICIONES DE OPERACIÓN EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.

Un paso previo a la validación de métodos analíticos consiste en la selección y optimización de condiciones de operación, a dicha etapa de selección de condiciones de operación se le denomina proceso de adecuabilidad del sistema (System Suitability). El proceso de adecuabilidad permite al usuario seleccionar las condiciones de operación para demostrar que el sistema sea capaz de llevar a cabo el propósito propuesto.

El proceso de adecuabilidad del sistema fue propuesto por algunos químicos analistas a la mitad de los años setentas (King et al., 1974). Posteriormente en la USP fueron descritos varios parámetros para determinar la adecuabilidad de un método cromatográfico (United States Pharmacopoeia, 1990). Este criterio incluye: reproducibilidad para replicas de inyecciones, factor de coe de picos (asimetría), resolución (Rs), número de platos teóricos (N), factor de capacidad (K') y factor de selectividad (α). (Adamovics, J., 1990, pp 15-19)

Para optimizar un método es necesario conocer métodos ya existentes para el análisis de la muestra en cuestión, y así elegir las condiciones adecuadas de trabajo, tomando en cuenta, además, el material y equipo disponibles, la utilidad analítica que se pretende dar al método, el intervalo de concentraciones a utilizar, la sensibilidad y selectividad del método.

La optimización de un método analítico por CLAR se ve reflejada en la resolución, la forma de los picos y separación de los componentes así como en la disminución del tiempo y costo de análisis.

3.1. Resolución (Rs).

El objetivo primordial de la cromatografía es la separación de los componentes de una mezcla y el grado de separación se mide por un parámetro, la resolución (Rs). Para mejorar la Rs, los picos deberán alejarse tanto como sea posible y sus anchos de base deberán ser pequeños. Un valor de $R_s = 1.5$ nos indica que hay separación hasta la línea base de los dos picos, mientras que una $R_s = 1.0$ significa que la separación es aproximadamente del 90%, y una R_s menor a 1 indica una pobre separación.

Los parámetros relacionados con la Rs son: el factor de selectividad (α), el factor de eficiencia (dependiente de N y AEPT) y el factor de capacidad (K'). Por consiguiente al modificar cada uno de estos factores se modificará también la Rs. La ecuación que la define es la siguiente:

$$R_s = 0.25 \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'}{1 + k'} \right) N^{1/2}$$

La influencia de cada uno de los tres factores, α , K' o N, en la Rs es independiente el uno del otro. Si se asume como una constante la selectividad y el número de platos teóricos, entonces la Rs es proporcional al factor $K'/(1 + K')$ (la variación es mostrada en la figura 9 (i)). El valor límite para $K'/(1 + K')$ es de 1. Si se incrementa K' , la Rs entre los picos incrementa significativamente al inicio, pero casi se hace constante el efecto a altos valores de K' . El valor aceptable para K' se encuentra en el rango de 1-10, a valores mayores de K' se alarga el tiempo de análisis reflejado en el ensanchamiento de picos con reducción de la sensibilidad (mayor tiempo de retención, igual área, menor altura), y dificultad de cuantificación.

Manteniendo constante el factor de capacidad y el número de platos teóricos, el valor límite en términos de $(\alpha - 1)/\alpha$ es igual a 1, el término se incrementa moderadamente cuando se incrementa α (ver figura 9 (ii)) por lo que al aumentar α se incrementa la Rs.

La variación en términos de N, es en función de su raíz cuadrada, en la figura 9 (iii) se observa que dicha función se incrementa rápidamente desde cero, lo que nos indica que al aumentar el N aumenta la Rs.

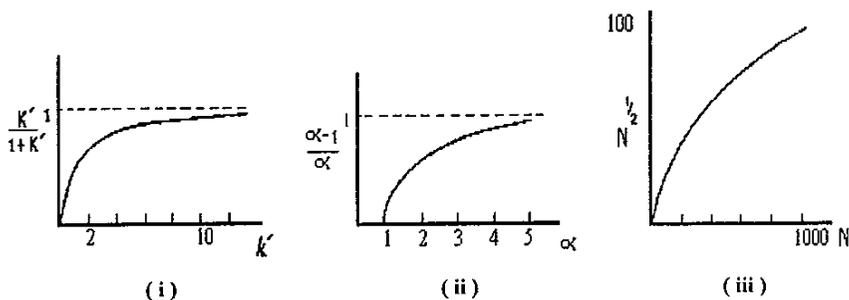


Figura 9. Efectos de K' , α y N, en la Rs.

3.2. Factor de capacidad (K').

El factor de K' para los compuestos retenidos tiene un valor diferente de cero, es el parámetro más sencillo de modificar se varía simplemente ajustando la fuerza de elución de la fase móvil. Es convenientemente recordar las siguientes reglas, válidas para cromatografía en fase reversa:

- A mayor proporción de agua mayor K' , o sea mayor retención.
- A mayor proporción de modificador (MeOH, CH₃CN, THF) menor K' , es decir menor retención.
- Cambios en el pH de la fase móvil no modifican la retención de compuestos neutros.
- Cambios en el pH de la fase móvil producen enormes modificaciones en la retención de solutos disociables.

La R_s aumenta al aumentar K' , sin embargo la R_s no varía linealmente con K' sino con $K'/(1+K')$, de tal modo que un aumento en la retención produce importantes modificaciones en la R_s .

Los intervalos de K' apropiados: $2 < K' < 6$ para sistemas simples, con 2-3 picos, $2 < K' < 10$ para muestras con mayor número de picos, y $0.5 < K' < 20$ para muestras muy complejas.

3.3. Factor de eficiencia (N).

La eficiencia aumenta al aumentar el número de platos teóricos.

N puede aumentar de varias formas:

- Disminuyendo la velocidad de flujo.
- Empleando columnas más largas y de menor diámetro.
- Usando partículas de empaque de menor diámetro.
- Empleando más columnas (acopladas).
- Aumentando la temperatura.
- Empleando columnas nuevas o regeneradas.
- Optimizando el equipo (menor longitud de tuberías). (Quattrocchi, O., 1992. pp. 281)

3.4. Factor de selectividad (α).

La selectividad de un sistema depende de la naturaleza de cada uno de sus componentes, la fase móvil, la columna y la muestra, de su afinidad mutua y del modo en que interaccionan entre sí.

Dicho de otro modo, la variación de la resolución deberá ser provista por una modificación más o menos profunda en uno de los componentes fundamentales del sistema cromatográfico, columna o fase móvil, y el resultado del cambio puede ser completamente imprevisto: la R_s puede ser mejor, pero también peor.

No existe separación cuando el valor de α es igual a la unidad, es decir, mientras mayor sea α a la unidad, será mayor la selectividad y por lo tanto habrá mayor separación de los componentes.

Habitualmente las modificaciones de α se consiguen cambiando la polaridad de los solventes de elección para la fase móvil. Así el cambio de MeOH por el CH₃CN o THF (constante dieléctrica = 32.7, 37.5 y 7.6 respectivamente) puede causar en grandes diferencias en la separación. Fundamentalmente en este punto la CLAR se diferencia de la CG. En la CG un cambio de α implica necesariamente un cambio de columna, mientras que en CLAR solo recién después de agotar toda gama previsible de solventes, pH y pH aparentes, se recurre al cambio de columna. La variación incorporada puede ser aleatoria, recurriendo a ensayos prueba-error. (memorias del curso).

3.5. Factor de coleo (Asimetría) .

Uno de los problemas frecuentemente encontrados en cromatografía es el coleo o asimetría de los picos, que puede ser anterior o posterior al máximo del tiempo de retención ($As < 1$ o $As > 1$, respectivamente).

La asimetría de los picos es muy común en cromatografía, un comportamiento gaussiano es realmente infrecuente pero la magnitud de la desviación de ese ideal es la que determina que pueda o no tolerarse.

El efecto derivado por el factor de coleo se reduce a:

- Separaciones pobres.
- Baja precisión.
- Baja reproducibilidad entre ensayos.

El ensanchamiento de la base de los picos es consecuencia de separaciones deficientes, y esto dificulta la integración de los picos por indefinición de los límites del mismo provocando una baja precisión en la cuantificación. En general no debe aceptarse un método que presente picos con asimetría superior a 1.5 tomado al 10% de altura o 2.0 tomado al 5% de altura.

La solución del coleo de los picos depende de la(s) causa(s) que lo origina(n), entre éstas se encuentran:

- Efectos secundarios de retención, por los silanoles residuales de la columna.
- Sobresaturación de la columna por inyectar una masa considerable de muestra.
 - Solvente inapropiado. Falta de capacidad reguladora o fuerza iónica de la fase móvil.
 - Solvente de disolución de la muestra inadecuado.
- Columna deficiente. Disolución parcial de la columna o precolumna, formación de canales intracolumnares, taponamiento parcial de filtros.
- Columna dañada o contaminada.
- Amortiguador no adecuado.
- Efectos extracolumnares.
- Contaminación por metales pesados. (Quattrocchi, O. 1992, pp 297)

4.- MÉTODOS DE ANÁLISIS CUANTITATIVO EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).

Después de la obtención del área de cada uno de los picos, la siguiente etapa consiste en establecer la cantidad o concentración de los componentes de la muestra que corresponden a estos picos ^{(Yost, W., 1981, 222-246).}

La concentración del analito en la muestra se puede calcular por diferentes métodos los cuales son .:

- * Normalización o estandarización interna.
- * Estándar interno.
- * Estándar externo.
- * Estándar agregado.

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

4.1. Normalización interna.

La normalización interna consiste en referir el contenido del analito al total de áreas en el cromatograma, sin incluir el pico de la fase móvil, y se expresa como (figura 10):

$$\% A = \left[\frac{X}{\sum X} \right] [100] \quad \text{Donde.}$$

A = Porcentaje del componente en mezcla
 X = Área de la muestra
 $\sum X$ = Sumatoria de todas las áreas de los componentes en el cromatograma.

Figura 10. Ecuación para determinar la concentración de analito en la muestra por el método de normalización interna.

Ventajas.

- No requiere de un estándar de referencia y es muy preciso.

Desventajas.

- La separación de los componentes debe ser en el mismo sistema cromatográfico elegido.
- Todas las sustancias deben tener el mismo valor de absortividad a la longitud de onda elegida.

4.2. Estándar interno.

Dicha técnica consiste en agregar cantidades exactamente medidas de una sustancia denominada estándar interno tanto a la muestra como al estándar de referencia, preparado a la misma concentración que la muestra. Se calcula de la siguiente forma (figura 11):

$$\% A = \left[\frac{R_m C_s}{R_s} \right] [D] [100] \quad \text{Donde.}$$

% A = Porcentaje del analito en la muestra
 R_m = Relación de área del analito a estándar interno en la muestra.
 R_s = Relación de área del estándar a estándar interno en la muestra referencia.
 C_s = Concentración del estándar.
 D = Factor de dilución.

Figura 11. Ecuación para determinar la concentración de analito en la muestra por el método de estándar interno.

El estándar interno debe cumplir con ciertos requisitos:

- Debe ser estable (a las condiciones de análisis), de alta pureza, inerte y disponible fácilmente.
- Debe tener propiedades físicoquímicas similares al analito.
- No debe reaccionar con los componentes de la muestra.
- Debe dar una respuesta en el detector similar a los analitos.
- Debe eluir cerca de los analitos.
- Debe resolverse completamente de los componentes de la muestra.
- No lo debe de contener la muestra. (Mehta, A C; 1989, pp. 472)

Ventajas.

- Permite corregir las variaciones por volumen de inyección.
- Corrige la recuperación en extracciones líquido-líquido, perdidas por derrames, incompletas recuperaciones de la fase orgánica en extracciones, corrige por solubilidad parcial de la fase orgánica en la fase acuosa, evaporaciones del disolvente.
- Corrección recuperaciones en extracciones por Soxhelt, pérdida por derrames, evaporación de disolventes volátiles.

- Desempeño de la columna, monitor de la forma de los picos, áreas y tiempos de retención en análisis rutinarios.
- En control de calidad, disminuye los errores relacionados con el procedimiento.
- Corrige variaciones instrumentales. (Osuna A., 1997, pp 37)

Desventajas.

- Separación más compleja a medida que aumente el número de picos en el cromatograma.

4.3. Estándar externo.

Dicha técnica consiste en la preparación de un estándar de concentración semejante al analito en la muestra, realizado bajo las mismas condiciones de operación del ensayo cromatográfico.

Se calcula de la siguiente forma (figura 12):

$\% A = \left[\frac{AmCs}{As} \right] [D] [100$	<p>Donde.</p> <p>% A = Porcentaje del analito en la muestra. Am = Área de la muestra. As = Área del estándar. Cs = Concentración del estándar. D = Factor de dilución.</p>
--	--

Figura 12. Ecuación para determinar la concentración de analito en la muestra por el método de estándar externo.

Desventajas.

- La precisión y exactitud de los datos dependerá tanto de la calidad del estándar, de la preparación de la muestra así como de la inyección.

4.4. Estándar Agregado.

Esta técnica 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, siendo esta última utilizada como estándar. Se calcula de la siguiente forma (figura 13):

$$\% A = \left[\frac{AmCs}{Ams - Am} \right] [D] [100] \quad \text{Donde:}$$

% A = Porcentaje del analito en la muestra.
 Am = Área del analito en la muestra.
 Ams = Área de la muestra a la que se le agrega estándar.
 Cs = Concentración del estándar.
 D = Factor de dilución.

Figura 13. Ecuación para determinar la concentración de analito en la muestra por el método de estándar agregado.

Ventajas:

- Método de elección para matrices de muestra compleja.

Desventajas:

- La precisión dependerá de la calidad del estándar de referencia.
- Sensible a errores de inyección y preparación de la muestra. (Quattrocchi, O., 1992, pp. 264)

5.- REQUISITOS PARA DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS EN CLAR.

Con el fin de garantizar, dentro del interés de la salud pública, que los medicamentos que se distribuyen tengan la calidad requerida para el uso destinado, estos deben ser aprobados bajo ciertas normas regulatorias y para ello se requiere de documentación a partir de métodos analíticos validados que evalúen su identidad, calidad, pureza, potencia y estabilidad, para evidenciar la seguridad y eficiencia del producto.

La relevancia del control regulatorio en los últimos años dentro del desarrollo de métodos analíticos ha forzado a la Industria farmacéutica a obtener productos de alta calidad que adopten nuevas tecnologías y estándares de eficiencia, para minimizar el costo y el tiempo de ensayo y obtener resultados confiables.

El desarrollo de un método analítico hace referencia a obtener procedimientos capaces de calificar o cuantificar una sustancia mediante un sistema de control de calidad que evalúe la calidad de un producto.

Dado que el desarrollo de métodos analíticos es costoso e insume mucho tiempo, es preferible emplear caminos sistemáticos (figura 14), efectuando los ensayos en una dirección segura o al menos con buenas posibilidades de éxito, evitando ensayos innecesarios y documentando los resultados, no sólo para el desarrollo mismo sino para futuras revisiones.

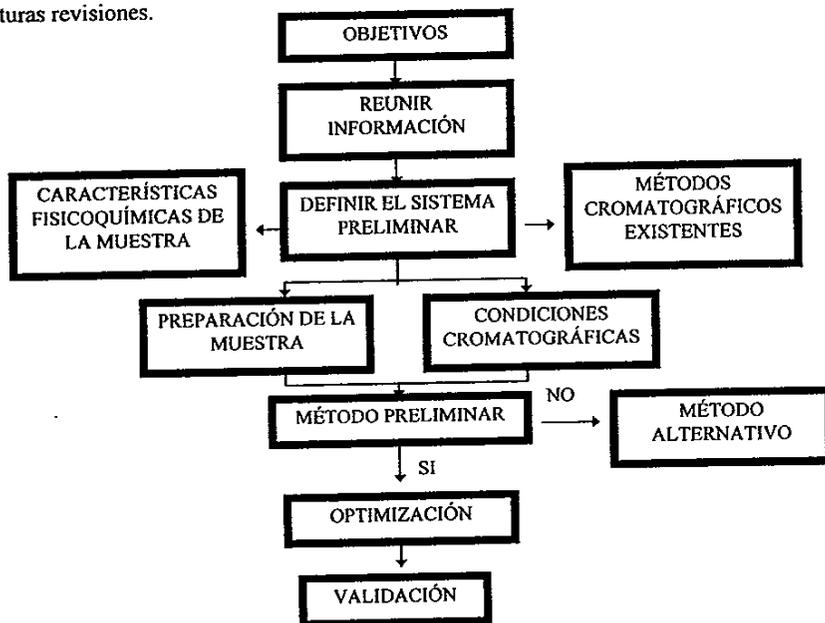


Figura 14. Pasos a seguir en el desarrollo de métodos analíticos por CLAR.

Una parte integral del desarrollo de métodos analíticos es su validación, la cual nos permite generar la documentación regulatoria necesaria que aprueba la calidad de los productos.

En la USP XXIII la validación de un método analítico es definida como el proceso por el cual queda establecido, mediante estudios de laboratorio, que las características funcionales del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas^{(Riley .C., 1994, pp 313-315).}

Las características de eficiencia de un método analítico son expresadas en términos de variables analíticas y las que son típicamente consideradas en la validación de métodos analíticos, son: precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud, linealidad, selectividad, robustez, límite de detección y límite de cuantificación.^(USP XXIII, y Paul L., 1991, pp. 132)

El procedimiento de ensayos y pruebas compendiales varían en el tipo de método analítico empleado y el tipo de información requerida para ser validado, de ahí que dependiendo de la finalidad del método la USP XXII clasifica los métodos analíticos en tres categorías, las cuales son :

Categoría I: Métodos analíticos para cuantificar la pureza de principios activos y productos farmacéuticos.

Categoría II: Métodos analíticos para detección de impurezas o detección de productos de degradación en formas farmacéuticas, incluyendo ensayos cuantitativos y pruebas de límite.

Categoría III: Métodos analíticos para la detección de características funcionales.
En la tabla III se listan las variables analíticas que son normalmente requeridas para la validación de métodos analíticos en cada una de las categorías antes mencionadas:

VARIABLE ANALÍTICA	CATEGORÍA I	CATEGORÍA II		CATEGORÍA III
		CUANTITATIVO	PRUEBAS LIMITE	
Precisión	Si	Si	No	Si
Exactitud	Si	Si	+	+
Límite de detección	No	No	Si	+
Límite de cuantificación	No	Si	No	+
Linealidad	Si	Si	No	+
Robustez	Si	Si	Si	Si
Selectividad	Si	Si	Si	+

+ Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza de la prueba.

TABLA III. Variables analíticas típicas en validación de métodos analíticos.

CAPITULO II

*DESARROLLO
EXPERIMENTAL*

6. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO.

MATERIAL:

Material de vidrio de uso común en el laboratorio.

Membranas para solventes orgánicos tipo HVLP de 0.45 µm (Millipore).

Membranas para filtrar muestras preparadas para análisis, tipo HV de 13mm de diámetro con 0.45 µm de tamaño de poro (Millipore).

Papel aluminio.

REACTIVOS:

Sulfametazina estándar (Helm de México, No. de lote: 0.0001).

Sulfametazina sódica (Internacional Química Carter, No. de lote: 9506061.319).

Sulfatiazol estándar (Helm de México, No. de lote: 12519).

Sulfametoxazol estándar (Donado por Industria Manufacturera Bruluart).

Trimetoprim estándar (Donado por Industria Manufacturera Bruluart).

Acetonitrilo (CH₃CN) grado HPLC (Merck, Omnisolv 99.99%).

Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄ 0.05 M) reactivo analítico (Productos químicos Monterrey).

Ácido acético glacial (CH₃COOH glacial-99.8%) (Merck).

Agua grado HPLC .

Helio 99.995% de pureza (Aga).

EQUIPO:

Balanza analítica Ohaus, modelo AP250D-0 (Equipar, No. de serie: 1115481240).

Bomba cuaternaria Waters 616 (No. de serie: MX6CM8678M).

Controlador de la bomba Waters 600S (No. de serie: SX5KM0096M).

Automuestreador Waters 717 Plus (No. de serie: MX6DM1948M).

Columna Nova Pak C₁₈® de 3.9 x 150 mm (Waters, No. de parte: WATO36975).

Columna Simmetry C₁₈® de 3.9 x 150 mm (Waters, No. de parte: WATO54205).

Detector UV Waters 996 PDA (No. de serie: MX5NM6889M).

Bomba de vacío CENCO (No. de serie: 9128).

Equipo de filtración para fases móviles (Millipore).

Purificador de agua, Milli Q (Millipore, No. de serie: F6MN12661L).

Termo-balanza (Mettler Toledo, Modelo: HR73).

Termo-higrómetro electrónico (Boeckel, No. de serie: BOE-330).

Sistema de agua de alta pureza Milli Q Plus (Millipore, No. de serie F6MN12661L).

7. DESARROLLO DEL MÉTODO PARA SELECCIONAR CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.

7.1. ESTRATEGIA SEGUIDA EN EL DESARROLLO DEL MÉTODO.

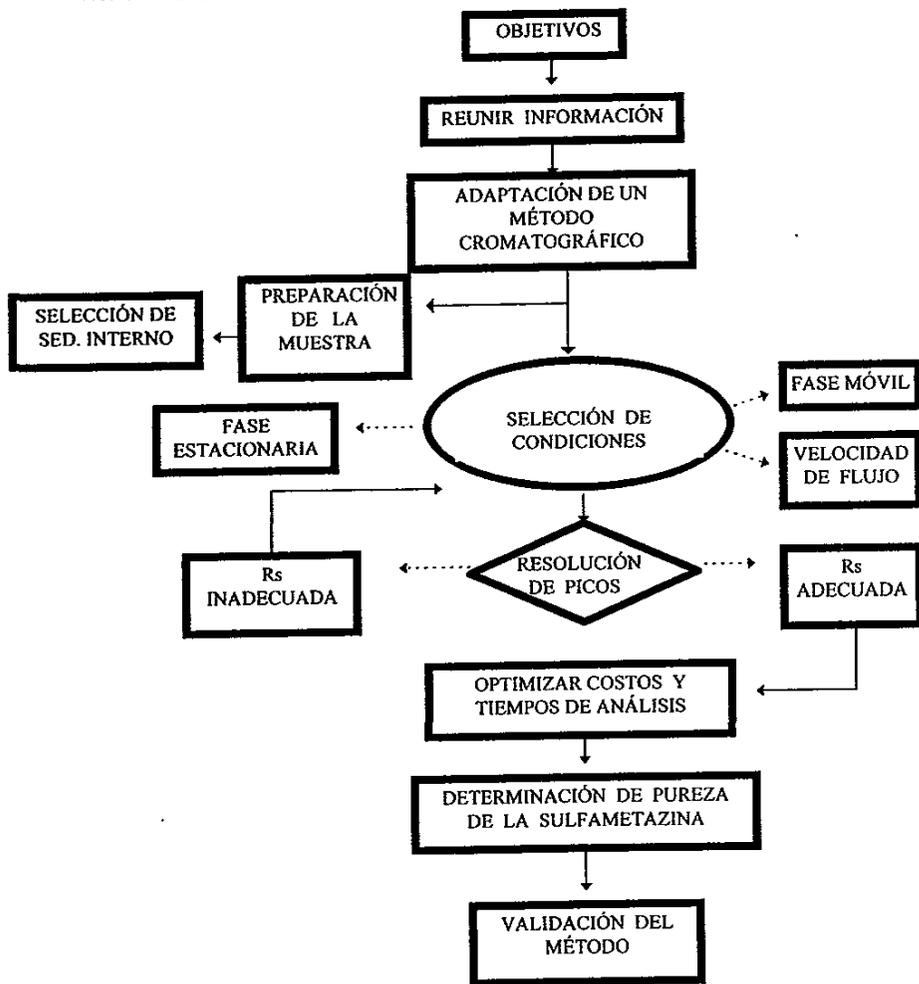


Figura 15. Metodología empleada para el desarrollo del método analítico, para determinar la pureza de la sulfametazina sódica por CLAR.

7.2. SELECCIÓN DEL ESTÁNDAR INTERNO.

El estándar interno es utilizado como parte integral del método analítico para la cuantificación de la SMZ. Su uso presenta la ventaja de minimizar errores aleatorios y proporcionar precisión en los resultados.

La elección del estándar interno se hizo de entre varias sustancias disponibles en el laboratorio, cuyas propiedades fisicoquímicas son similares a las de la SMZ (ver figura 16).

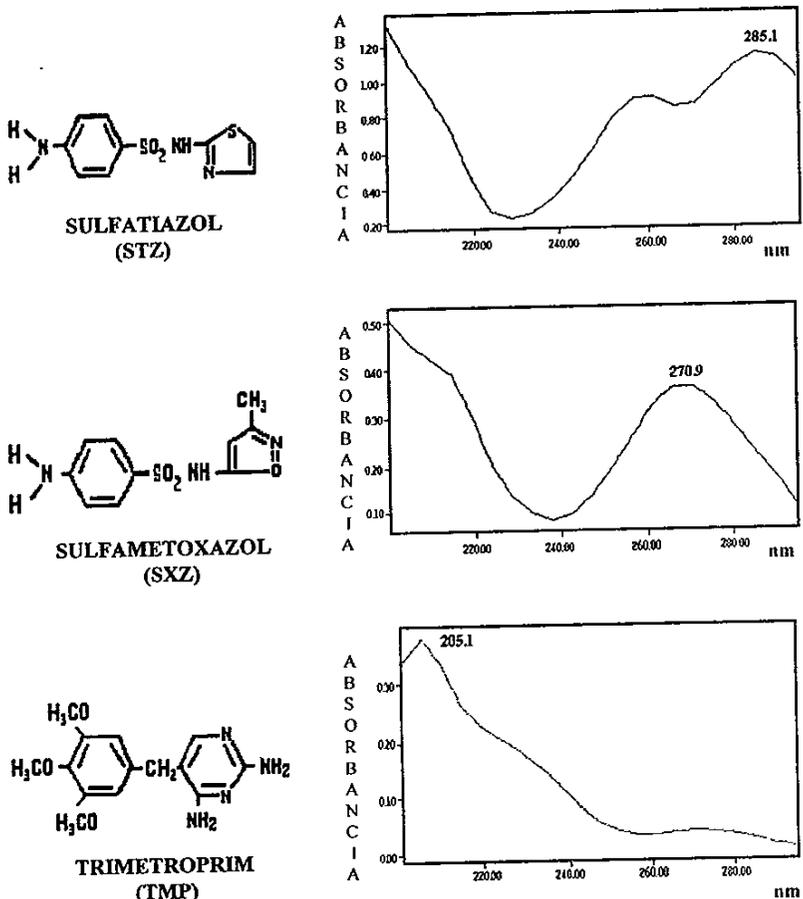


Figura 16. Sustancias propuestas a ser utilizadas como posible estándar interno.

7.2.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Cada una de las sustancias propuestas para ser utilizadas como estándares internos (STZ, SXZ y TMP) se sometieron a un análisis cromatográfico (ver figuras 17, 18 y 19), con el cual se decidió que el STZ era la sustancia adecuada para ser usada como estándar interno. Las características por las cuales se eligió fueron: la resolución y simetría del pico, y su tiempo de retención corto muy cercano al de la SMZ, sin provocar interferencia en la cuantificación.

Cabe mencionar que para dicho análisis cromatográfico se utilizó una columna C_{18} Nova-Pack y como fase móvil KH_2PO_4 (0.05 M) y CH_3CN en una proporción 80:20 (Parasrampur, J. 1986. 2511-2519), con estas condiciones se pretendía trabajar todo el desarrollo del método, pero se presentaron problemas por el uso del buffer de fosfatos - tiempo excesivo de lavado del sistema por la acumulación de sales-, por lo consiguiente se cambió de columna (Symmetry C_{18}) y de fase móvil.

CROMATOGRAMAS DE LOS CANDIDATOS A ESTÁNDAR INTERNO

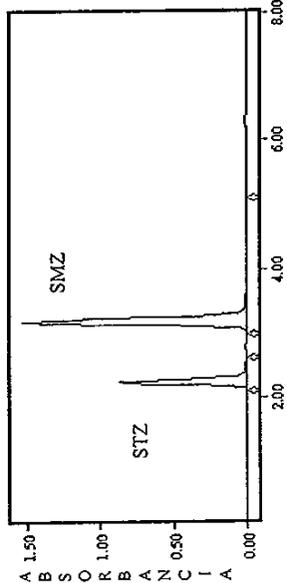


Figura 17. Cromatograma SMZ y STZ.
 Fase móvil: Acetonitrilo y KH_2PO_4 (0.05 M)
 Proporción de la fase móvil: 20:80
 Columna: Nova-Pack C_{18}
 Caudal: 1 ml/min
 Longitud de onda: 262.6 nm
 Volumen de inyección: 20 μl
 Concentración ($\mu\text{g/ml}$): 150 (SMZ) y 100 (STZ)
 Tiempo de retención (min): 3.2 (SMZ) y 2.2 (STZ)
 Resolución: 5.8 (SMZ)

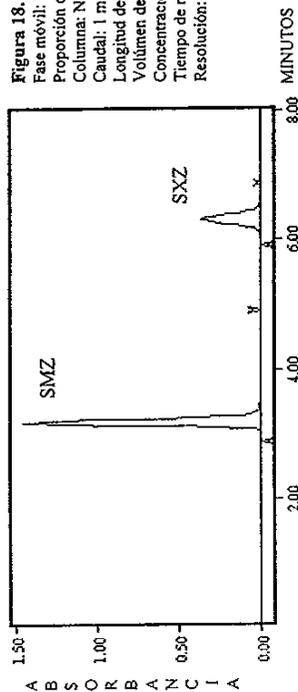


Figura 18. Cromatograma SMZ y SXZ.
 Fase móvil: Acetonitrilo y KH_2PO_4 (0.05 M)
 Proporción de la fase móvil: 20:80
 Columna: Nova-Pack C_{18}
 Caudal: 1 ml/min
 Longitud de onda: 262.6 nm
 Volumen de inyección: 20 μl
 Concentración ($\mu\text{g/ml}$): 150 (SMZ) y 100 (SXZ)
 Tiempo de retención (min): 3.2 (SMZ) y 6.3 (SXZ)
 Resolución: 13.4 (SMZ)

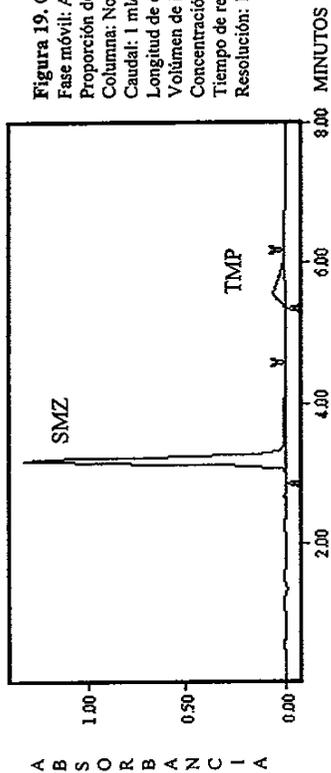


Figura 19. Cromatograma SMZ y TMP.
 Fase móvil: Acetonitrilo y KH_2PO_4 (0.05 M)
 Proporción de la fase móvil: 20:80
 Columna: Nova-Pack C_{18}
 Caudal: 1 ml/min
 Longitud de onda: 262.6 nm
 Volumen de inyección: 20 μl
 Concentración ($\mu\text{g/ml}$): 150 (SMZ) y 100 (TMP)
 Tiempo de retención (min): 3.2 (SMZ) y 5.6 (TMP)
 Resolución: 13.4 (SMZ)

A
B
S
O
R
B
A
N
C
I
A

7.3.OPTIMIZACIÓN DE LA FASE MÓVIL.

La fase móvil en CLAR juega un papel importante en los procesos de separación. Esta influye en los tiempos de retención del soluto sobre la columna y por lo tanto en la separación de los compuestos y la selectividad.

En CLAR, en fase inversa, la fase móvil generalmente está constituida de agua o una solución amortiguadora con uno o dos solventes orgánicos los más utilizado son: el acetonitrilo (CH_3CN), metanol (MeOH), 2-propanol y tetrahidrofurano (THF), la proporción de estos depende de la polaridad del compuesto.

Se adaptó una técnica cromatográfica reportada por Goeth T. (1978. 404-406), para la cuantificación de la SMZ, en la cual la fase móvil utilizada es una mezcla de ácido acético diluido (CH_3COOH) y acetonitrilo (CH_3CN). El CH_3COOH tiene la función de mantener el pH de la fase móvil y evitar la asimetría de los picos.

Para la optimización de la fase móvil, se utilizaron diferentes proporciones de CH_3COOH (a diferentes concentraciones: 2.5%, 1.5%, 1%, 0.5% y 0.25% v/v) y CH_3CN , tal como se muestra en la tabla IV.

CROMATOGRAMA	CONCENTRACIÓN DE CH_3COOH (% V/V)	PROPORCIÓN DE FASE MÓVIL (%)		TIEMPO DE RETENCIÓN DE LA SMZ (MIN)
		CH_3COOH	CH_3CN	
4	2.5	85	45	6.5
5	1.5	75	25	6.4
6	1.5	80	20	4.0
7	1.5	85	15	5.8
8	1.5	90	10	9.8
9	1.0	80	20	4.0
10	1.0	85	15	5.9
11	1.0	90	10	10.3
12	0.5	80	20	4.2
13	0.5	85	15	6.3
14	0.5	90	10	11.7
15	0.25	80	20	4.3

TABLA IV. Resumen de las fases móviles probadas para determinar la adecuada para el desarrollo del análisis.

En las figuras de la 20 a la 31 se observa en los cromatogramas, que presentan buena resolución (picos simétricos) los picos de interés, por lo que pueden ser utilizadas cualquiera de las proporciones de fase móvil, pero, tomando en cuenta el costo y el tiempo de análisis, se seleccionó la proporción 80:20 de CH_3COOH (0.25%) y CH_3CN , con dicha fase móvil se obtiene un tiempo de retención de 4.3 para la SMZ y de 2.9 para el STZ, con una aceptable resolución y separación de los componentes, además con dicha concentración de CH_3COOH se evita el desgaste de la columna y de las tuberías del sistema cromatográfico.

CROMATOGRAMAS PARA SELECCIONAR LA PROPORCIÓN DE FASE MÓVIL.

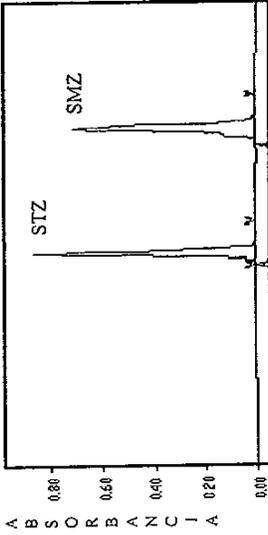


Figura 20.
 Fase móvil: Acido acético (2.5%) y Acetonitrilo
 Proporción de la fase móvil: 85:15
 Columna: Shimmetry C₁₈
 Caudal: 1 ml/min
 Longitud de onda: 262.6 nm
 Volumen de inyección: 20 μ ls
 Concentración (μ g/ml): 80 (SMZ) y 160 (STZ)
 Tiempo de retención (min): 6.5 (SMZ) y 4.14 (STZ)
 Resolución: 9.9 (SMZ) y 3.84 (STZ)

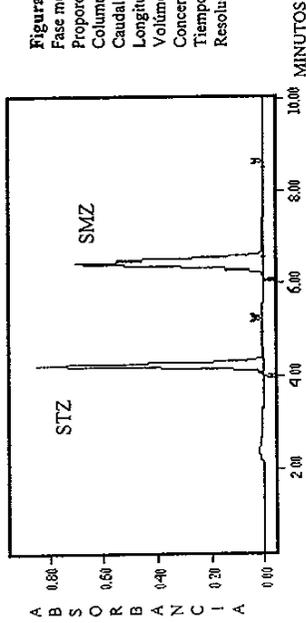


Figura 21.
 Fase móvil: Acido acético (1.5%) - Acetonitrilo
 Proporción de la fase móvil: 75:25
 Columna: Shimmetry C₁₈
 Caudal: 1 ml/min
 Longitud de onda: 262.6 nm
 Volumen de inyección: 20 μ ls
 Concentración (μ g/ml): 80 (SMZ) y 160 (STZ)
 Tiempo de retención (min): 6.4 (SMZ) y 4.1 (STZ)
 Resolución: 9.19 (SMZ) y 7.5 (STZ)

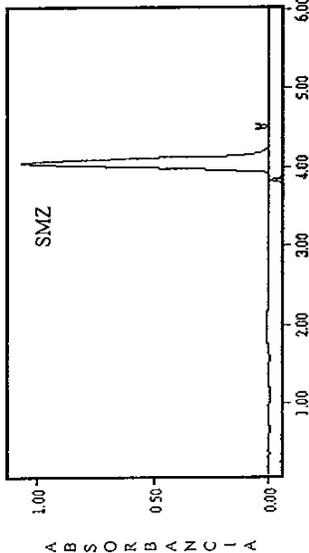


Figura 22.
 Fase móvil: Acido acético (1.5%) y acetoneitrilo
 Proporción de la fase móvil: 80:20
 Columna: Symmetry C₁₈
 Caudal: 1 ml/min
 Longitud de onda: 262.6 nm
 Volumen de inyección: 20 µl
 Concentración (µg/ml): 80
 Tiempo de retención (min): 4.0 (SMZ)
 Resolución: 11.3 (SMZ)

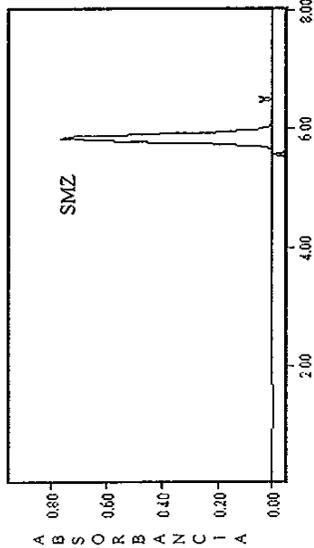


Figura 23.
 Fase móvil: Acido acético (1.5%) y acetoneitrilo
 Proporción de la fase móvil: 85:15
 Columna: Symmetry C₁₈
 Caudal: 1 ml/min
 Longitud de onda: 262.6 nm
 Volumen de inyección: 20 µl
 Concentración (µg/ml): 80
 Tiempo de retención (min): 5.8 (SMZ)
 Resolución: 19.5 (SMZ)

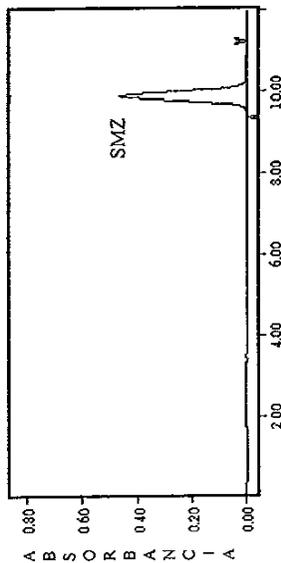


Figura 24.
 Fase móvil: Acido acético (1.5%) y acetonitrilo
 Proporción de la fase móvil: 90:10
 Columna: Simmetry C₁₈
 Caudal: 1 ml/min
 Longitud de onda: 262.6 nm
 Volumen de inyección: 20 µl
 Concentración (µg/ml): 80
 Tiempo de retención (min): 9.8 (SMZ)
 Resolución: 28.4 (SMZ)

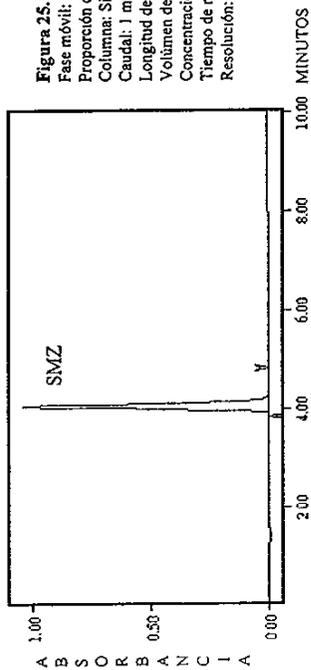


Figura 25.
 Fase móvil: Acido acético (1%) y acetonitrilo
 Proporción de la fase móvil: 80:20
 Columna: Simmetry C₁₈
 Caudal: 1 ml/min
 Longitud de onda: 262.6 nm
 Volumen de inyección: 20 µl
 Concentración (µg/ml): 80
 Tiempo de retención (min): 4.0 (SMZ)
 Resolución: 7.3 (SMZ)

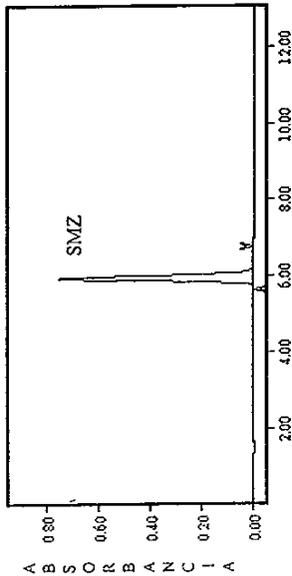


Figura 26.
 Fase móvil: Acido acético (1%) y acetonitrilo
 Proporción de la fase móvil: 85:15
 Columna: Symmetry C₁₈
 Caudal: 1 ml/min
 Longitud de onda: 262.6 nm
 Volumen de inyección: 20 µl
 Concentración (µg/ml): 80
 Tiempo de retención (min): 5.9 (SMZ)
 Resolución: 19.7 (SMZ)

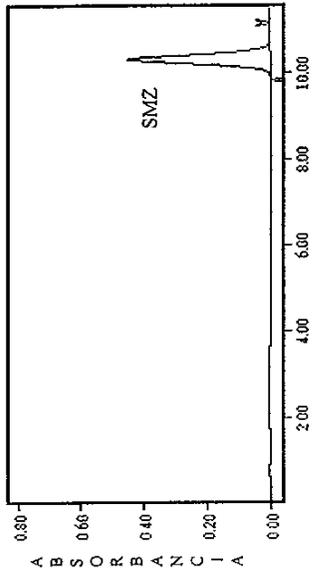


Figura 27.
 Fase móvil: Acido acético (1%) y acetonitrilo
 Proporción de la fase móvil: 90:10
 Columna: Symmetry C₁₈
 Caudal: 1 ml/min
 Longitud de onda: 262.6 nm
 Volumen de inyección: 20 µl
 Concentración (µg/ml): 80
 Tiempo de retención (min): 10.3 (SMZ)
 Resolución: 29.5 (SMZ)

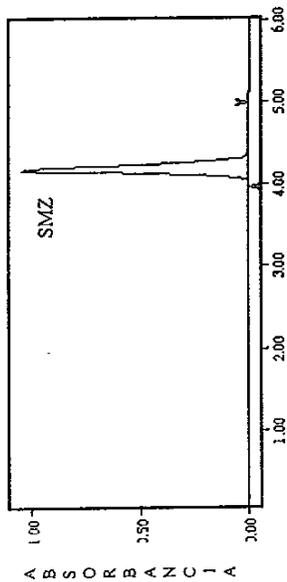


Figura 28.
 Fase móvil: Acido acético (0.5%) y acetonitrilo
 Proporción de la fase móvil: 80:20
 Columna: Symmetry C₁₈
 Caudal: 1 ml/min
 Longitud de onda: 262.6 nm
 Volumen de inyección: 20 µl
 Concentración (µg/ml): 80
 Tiempo de retención (min): 4.2 (SMZ)
 Resolución: 5.7 (SMZ)

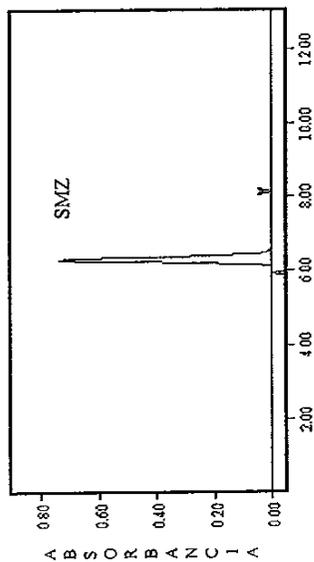


Figura 29.
 Fase móvil: Acido acético (0.5%) y acetonitrilo
 Proporción de la fase móvil: 85:15
 Columna: Symmetry C₁₈
 Caudal: 1 ml/min
 Longitud de onda: 262.6 nm
 Volumen de inyección: 20 µl
 Concentración (µg/ml): 80
 Tiempo de retención (min): 6.3 (SMZ)
 Resolución: 14.3 (SMZ)

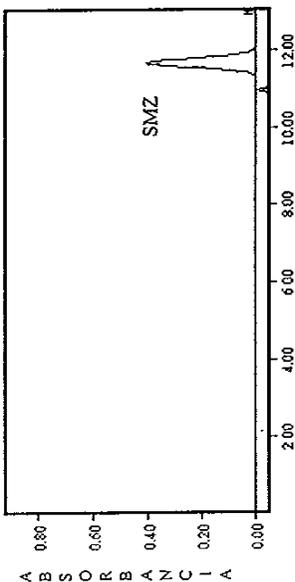


Figura 30.
 Fase móvil: Acido acético (0.5%) y acetonitrilo
 Proporción de la fase móvil: 90:10
 Columna: Simmetry C₁₈
 Caudal: 1 ml/min
 Longitud de onda: 262.6 nm
 Volumen de inyección: 20 µl
 Concentración (µg/ml): 80
 Tiempo de retención (min): 11.7 (SMZ)
 Resolución: 29.6 (SMZ)

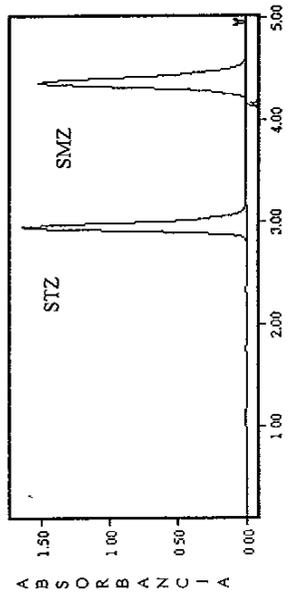


Figura 31.
 Fase móvil: Acido acético (0.25%) y acetonitrilo.
 Proporción de la fase móvil: 80:20
 Columna: Simmetry C₁₈
 Caudal: 1 ml/min
 Longitud de onda: 262.6 nm
 Volumen de inyección: 20 µl
 Concentración (µg/ml): 160 (SMZ) y 160 (STZ)
 Tiempo de retención (min): 4.3 (SMZ) y 2.9 (STZ)
 Resolución: 13.4 (SMZ)

8.DETERMINACIÓN DE PUREZA DE LA SULFAMETAZINA SÓDICA.

8.1. ESTRATEGÍA, RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Para que la SMZ pueda ser utilizada como principio activo en una forma farmacéutica, es necesario que se encuentre libre de sustancias dañinas que puedan intervenir en la eficacia del medicamento.

Por lo cual se determinó cuantitativamente su pureza en base húmeda y en base seca, mediante una curva adición patrón, la cual para mayor confiabilidad en los resultados se realizó por sextuplicado (ver anexo 1). En cada uno de los ensayos adición patrón se toman volúmenes iguales de la solución de SMZ sódica, pero todas salvo una fueron tratadas por separado con cantidades conocidas y diferentes de SMZ base (más el estándar interno en concentración constante), y todas fueron llevadas al mismo volumen de aforo. A partir del análisis de regresión se determinó la cantidad de SMZ sódica, mediante la razón entre el cociente de la ordenada al origen y la pendiente de la recta.

Los resultados obtenidos de dichos ensayos adiciones patrón se muestran en la tabla V, como se notará tales resultados han sido reportados como porcentaje de recobro.

La pureza determinada en base húmeda no es un dato muy confiable, por lo que se tuvo que secar la SMZ, bajo condiciones farmacopéicas (USP XXIII. 1995.1458), y se determinó su pureza en base seca.

Conc. de SMZ base (µg/ml)	No. En-sayo	BASE HÚMEDA			BASE SECA		
		R=(Asmz/Astz) *Cstz	R/Csmz base	Pureza (%)	R=(Asmz/Astz) *Cstz	R/Csmz base	Pureza (%)
0	1	151.151203			158.9703437		
30		184.9508143	6.165027		197.7005915	6.57949253	
60		221.9932317	3.699887		231.2447913	3.84792318	
90		254.1370485	2.823745	101.0438	267.0483736	2.96246421	102.7108
0	2	148.3046317			161.9207935		
30		185.6885011	6.189617		198.1857421	6.59563838	
60		221.439547	3.690659		234.3396225	3.8994213	
90		251.1211072	2.790235	100.7822	269.4578024	2.98919287	101.8095
0	3	146.3513647			160.0303823		
30		186.4639402	6.215465		198.1655089	6.59496502	
60		222.7389319	3.712316		232.6646886	3.87155033	
90		254.0654391	2.822949	95.5481	267.0481129	2.96246132	102.4437
0	4	147.1150934			160.5769845		
30		186.3393878	6.211313		199.1395827	6.62738228	
60		222.6359364	3.710599		234.1972057	3.89705148	
90		256.026513	2.844739	94.6549	266.809386	2.95981303	104.0910
0	5	147.5191707			161.8054669		
30		186.7114468	6.223715		200.2369234	6.66390187	
60		221.3720589	3.689534		232.4529176	3.86802645	
90		256.4501841	2.849446	95.1954	268.2098386	2.97534876	105.0784
0	6	144.6911141			161.2537014		
30		183.2255982	6.10752		200.842818	6.68406609	
60		215.7885203	3.596475		234.045185	3.89452185	
90		249.7972543	2.775525	97.1743	267.3306669	2.96559579	105.8036
PROMEDIO =		97.3998 % de pureza en base húmeda			103.6562 % de pureza en base seca		

TABLA V. Resultados obtenidos para estimar la pureza de la SMZ sódica.

A continuación se reporta en la siguiente tabla, los estadísticos correspondientes para cada uno de los ensayos adición patrón:

Ensayo	BASE HÚMEDA				BASE SECA			
	m	b	r^2	C.V. (%) σ	m	b	r^2	C.V. (%) σ
1	1.1533	151.1581	0.9993	0.4322	1.1907	160.0743	0.9992	0.4471
2	1.1473	150.0084	0.9973	0.4409	1.1940	162.1613	0.9999	0.4411
3	1.1981	148.4923	0.9970	0.4372	1.1833	161.1443	0.9993	0.4470
4	1.2101	148.5746	0.9987	0.4335	1.1773	162.1176	0.9986	0.4490
5	1.2048	148.7952	0.9992	0.4359	1.1696	162.9619	0.9989	0.4529
6	1.1596	146.1934	0.9987	0.4411	1.1696	163.1531	0.9981	0.4545

TABLA VI. Estadísticos reportados para cada uno de los ensayos adición patrón, en base húmeda y en base seca.

Como se puede observar dichos ensayos adición patrón (tanto en base húmeda como en base seca) siguen una tendencia lineal y es mínima la dispersión de los datos.

También se realizó un análisis de pureza cualitativo, haciendo uso de las ventajas que presenta el trabajar con un detector de arreglo de diodos (DAD) vinculado a un software (Millennium 2001, versión 2.1). Como se observa en la figura 33, se realizaron 4 cortes en el pico correspondiente, tanto al estándar de referencia como a la muestra de SMZ, y en dichos cortes aparece el mismo espectro para ambos, siendo su máximo de absorbancia a 266.2 nm, lo cual indica la identidad y pureza de la SMZ.

Para mayor apreciación, en la figura 16 se muestra el comportamiento, tanto del estándar interno como el de la SMZ, en NaOH 0.01 N.

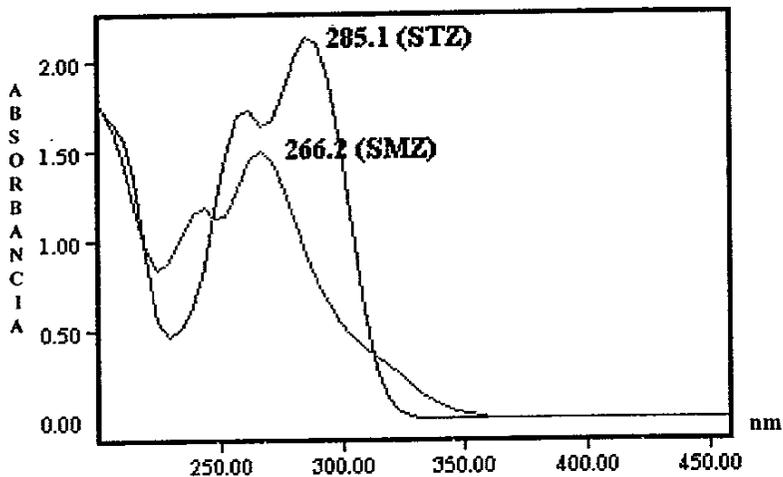


Figura 32. Comportamiento del estándar interno y la SMZ en NaOH 0.01 N, en el intervalo de longitud de onda de 250-450 nm.

En la figura 34 se muestra un gráfico en tercera dimensión (3D), el cual nos permite visualizar, desde diferentes ángulos, la pureza de la SMZ, proporcionando información del tiempo de retención (eje x), absorbanza (eje y) y longitud de onda (eje z).

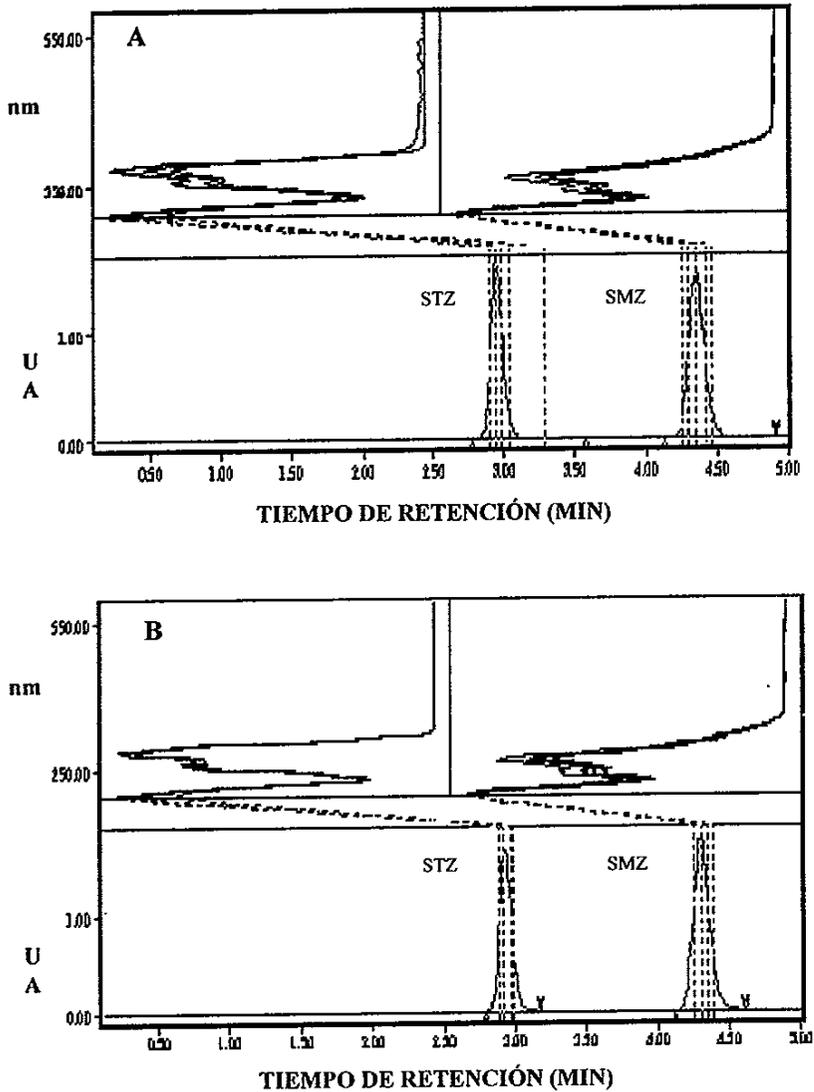


Figura 33. Análisis cualitativo de pureza de la SMZ (A= SMZ muestra y B= SMZ estándar)

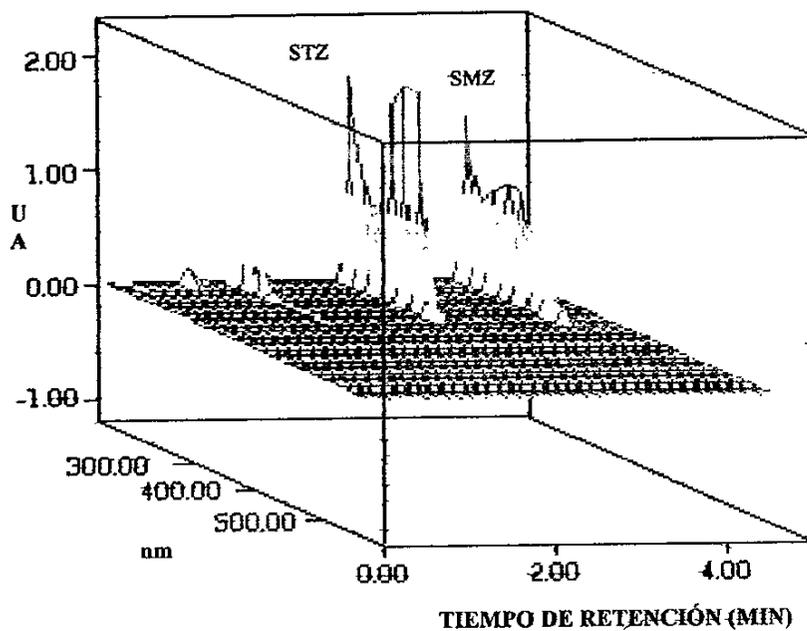


Figura 34. Gráfico en 3D para la SMZ y el STZ.

9. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

9.1. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

CARACTERÍSTICA A MEDIR	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
Linealidad del sistema	Pendiente (m) = 1 Ordenada al origen (b) = 0 Coeficiente determinación (r^2) > 0.98 Coeficiente correlación (r) > 0.99 C.V < 1.5 %
Precisión del sistema	C.V < 1.5 %
Linealidad del método	Pendiente (m) = 1 Ordenada al origen (b) = 0 Coeficiente determinación (r^2) > 0.98 Coeficiente correlación (r) > 0.99 C.V < 1.5 %
Precisión	C.V < 1.5 %
a) Repetibilidad	$t_{cal} < t_{crítica} (\alpha=0.05)$ C.V < 1.5 %
b) Reproducibilidad	$f_{cal} < f_{crítica} (\alpha=0.05)$ C.V < 1.5 %
Exactitud	$t_{cal} < t_{crítica} (\alpha=0.05)$

TABLA VII . Criterios de aceptación establecidos por el colegio de Q.F.B.(s), para validación de métodos analíticos,

9.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

LINEALIDAD Y PRECISIÓN DEL SISTEMA.

Nivel de concentración	CURVA 1			CURVA 2		
	Csmz Base (µg/ml)	Respuesta (R) = (Asmzb/Asztz)*Cstz	R/Csmz Base	Csmz Base (µg/ml)	Respuesta (R) = (Asmzb/Asztz)*Cstz	R/Csmz Base
50 %	80.008	95.3362	1.1916	80.006	97.5536	1.2193
	80.008	97.0593	1.2131	80.006	97.5661	1.2195
	80.008	96.7549	1.2093	80.006	99.0609	1.2382
75 %	120.012	144.5696	1.2046	120.009	145.3692	1.2113
	120.012	145.9042	1.2157	120.009	144.5725	1.2047
	120.012	144.8746	1.2072	120.009	144.9772	1.2081
100 %	160.016	194.2634	1.2140	160.012	193.2771	1.2079
	160.016	194.2509	1.2139	160.012	193.8962	1.2118
	160.016	194.6960	1.2167	160.012	195.0213	1.2188
	160.016	193.8337	1.2113	160.012	195.5098	1.2218
	160.016	194.4401	1.2151	160.012	194.1882	1.2136
	160.016	193.9218	1.2119	160.012	194.4135	1.2150
125 %	200.020	242.1649	1.2107	200.015	241.5226	1.2075
	200.020	242.1636	1.2107	200.015	242.7311	1.2136
	200.020	241.9972	1.2099	200.015	243.0618	1.2152
150 %	240.024	286.9879	1.1957	240.018	288.2742	1.2011
	240.024	290.4458	1.2101	240.018	292.6813	1.2194
	240.024	286.4289	1.1933	240.018	284.7249	1.1863

TABLA VIII. Resultados para determinar la linealidad y precisión del sistema para SMZ base.

La linealidad del sistema se determinó mediante la construcción de una curva de calibración (concentración vs respuesta) utilizando cinco diferentes niveles de concentraciones de SMZ base (al 50, 75, 100, 125 y 150%) , preparadas por dilución a partir de la misma solución patrón, haciendo el análisis por triplicado para cada concentración y se realizó la curva estándar en dos días diferentes.

Los resultados puntuales obtenidos de las curvas estándares para determinar la linealidad y precisión del sistema, se muestran en la tabla VIII.

Los parámetros estadísticos estimados para dichas curvas estándares, son los siguientes:

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	CURVA 1	CURVA 2	GLOBAL
Coefficiente de correlación (r)	0.9998	0.9997	0.9997
Coefficiente de determinación (r ²)	0.9996	0.9993	0.9994
Intercepto (b)	1.2850	2.4140	1.8495
Pendiente (m)	1.2002	1.1961	1.1981
Error estándar de regresión (S _{y/x})	1.3204	1.7233	1.5125
C. V (%)	0.6274	0.8692	0.8564

TABLA IX. Parámetros estadísticos estimados para la linealidad del sistema.

Se puede observar a partir del análisis estadístico de regresión, que existe una relación lineal altamente significativa entre los niveles de concentración de SMZ base y su respectiva respuesta (para cada una de las curvas), explicada por la siguiente ecuación:

CURVA	ECUACIÓN
1	$(A_{smz} / A_{stz})C_{stz} = 1.2002[C_{smz}] - 1.2850$
2	$(A_{smz} / A_{stz})C_{stz} = 1.1961[C_{smz}] - 2.4140$
Global	$(A_{smz} / A_{stz})C_{stz} = 1.1981[C_{smz}] - 1.8495$

TABLA X. Ecuación de regresión que explica la relación lineal existente entre los niveles de concentración de SMZ base y su respectiva respuesta, para cada una de las curvas realizadas.

Aunado a esto se observa en la figura 35, la relación lineal que existe entre la concentración y la respuesta evaluada, en el intervalo de concentraciones de 80 - 240 µg/ml.

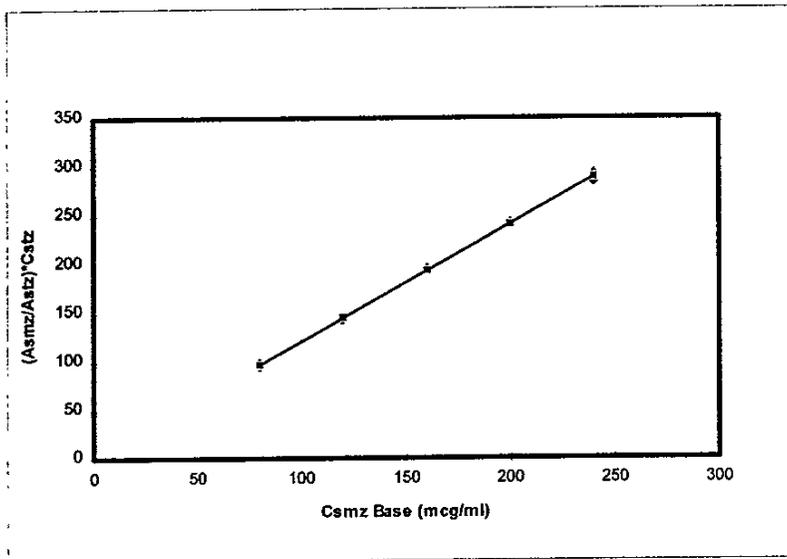


Figura 35. Representación gráfica que muestra la relación lineal entre la concentración de la SMZ base y su respectiva respuesta $((Asmz/Astz)*Cstz)$.

También se estableció una hipótesis para determinar, mediante un análisis de variancia, si la relación existente entre las variables (concentración y respuesta) es lineal. Se determinó que existe evidencia estadística, con un 95 % de confianza, de que hay relación lineal entre la concentración de la SMZ base y su respectiva respuesta, así como también se demuestra que la pendiente es diferente de cero.

Prueba de hipótesis:

H₀: No existe relación lineal entre la concentración de SMZ base y su respectiva respuesta.

H₁: Existe relación lineal entre la concentración de SMZ base y su respectiva respuesta.

Criterio de aceptación: Si $f_{cal} > f_{crítica}$ se rechaza *H₀*, y por lo tanto existe relación lineal entre la concentración de SMZ base y su respectiva respuesta.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F cal	F crítico ($\alpha = 0.05$)
Desviación de medias debida a la regresión	5	137854.0913	27570.8183	12278.6782	2.6207
Desviación debida a la media	24	53.8901	2.2454		
Desviación total	29	137907.9814			

TABLA XI. Análisis de variancia para evaluar la relación existente entre la concentración de SMZ base y su respectiva respuesta.

Para determinar si existe una respuesta cero cuando la SMZ no se encuentra presente en la muestra, se estableció una hipótesis para ser evaluada por medio de la prueba de t de student, como se puede observar en dicha prueba global se comprobó que en un 95% de los casos el intercepto no es igual a cero.

Prueba de hipótesis:
<i>H₀ : Existe una respuesta cero cuando la SMZ no se encuentra presente en la muestra.</i>
<i>H₁ : No existe una respuesta cero cuando la SMZ se encuentra presente en la muestra.</i>
Criterio de aceptación: Si $t_{cal} < t_{crítica}$, no se rechaza <i>H₀</i> , y por lo tanto el intercepto es igual a cero.

	Intercepto (b)	Error estándar (S _b)	t calculada	t crítica ($\alpha=0.05$, g.l = 35)	Intervalo de confianza	
					Inferior 95%	Superior 95%
Curva 1	1.2850	1.0132	1.2682	2.0301	-0.8630	3.4329
Curva 2	2.4140	1.3224	1.8254	2.0301	-0.3895	5.2174
Global	1.8495	0.8207	2.2535	2.0301	0.1816	3.5174

TABLA XII. Prueba del intercepto.

Sin embargo se estimó que para cada una de las curvas (1 y 2), el intercepto puede considerarse igual a cero, por lo que al trabajar de manera global en ambas curvas existen errores indeterminados del sistema, debido a causas comunes de variación (temperatura, humedad, variaciones de voltaje de los equipos, etc.).

La precisión del sistema se determinó analizando seis muestras preparadas por dilución a partir de la misma solución patrón, de una concentración correspondiente al nivel de concentración del 100% (160 µg/ml).

A partir de los datos que se muestran en la tabla VIII, se evaluó la precisión del sistema al nivel de concentración del 100%, y se obtuvo un CV. menor al especificado para métodos cromatográficos (tabla XIII), por lo que se demostró que el sistema es preciso, ya que es mínima la dispersión que existe entre el conjunto de datos.

Media = 1.2143
Desv. std. = 0.0036
CV.(al nivel de concentración del 100%) = 0.3001 %

TABLA XIII. Parámetros estadísticos (globales) determinados para evaluar la precisión del sistema.

LINEALIDAD DEL MÉTODO

La linealidad del método se determinó a partir de cinco niveles de concentración de SMZ sódica (equivalente a base), en el intervalo al 80, 90, 100, 110 y 120 % del nivel de concentración, cada una preparada de forma independiente, y se realizó el análisis por triplicado para cada nivel de concentración.

Para determinar la linealidad del método se utilizaron los datos de la tabla XIV.

Nivel de concentración	C smz Base (µg/ml)	Cantidad adicionada de smz base (µg)	Cantidad determinada de smz base(µg)	Porcentaje recuperado (%)
80 %	128	323172.7473	316068.4651	97.8017
		322987.3993	314097.1940	97.2475
		323293.2234	310893.3730	96.1645
90 %	144	242574.1758	234978.8753	96.8689
		242481.5018	237034.9785	97.7538
		242500.0366	235475.5716	97.1033
100 %	160	202057.1062	197161.3057	97.5770
		202075.6410	196639.4568	97.3098
		202047.8388	196108.0751	97.0602
110 %	176	177906.2637	175375.3438	98.5774
		177822.8571	173580.4754	97.6143
		177776.5201	173282.3940	97.4720
120 %	192	161725.3846	156504.3251	96.7717
		161725.3846	158838.4279	98.2149
		161632.7106	157130.6315	97.2146

TABLA XIV. Resultados para determinar la linealidad del método.

y se evaluó mediante los siguientes parámetros estadísticos de regresión:

Coeficiente de correlación (r) = 0.9997 Coeficiente de determinación (r^2) = 0.9995 Intercepto (b) = 1.8590 Pendiente (m) = 0.9649 Error estándar de regresión ($S_{y/x}$) = 1.3699 CV = 0.6068 %
--

Tabla XV. Parámetros estadísticos estimados para evaluar la linealidad del método.

Los resultados obtenidos para la linealidad del método fueron sometidos a un análisis de regresión. Dicho análisis demostró que existe una relación lineal altamente significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad determinada de SMZ, la cual es explicada por la siguiente ecuación:

$$\text{Cantidad adicionada SMZ} = 0.9649[\text{Cantidad determinada SMZ}] - 1.8589$$

Como se observa en la figura 36, la relación existente entre la cantidad adicionada y la cantidad determinada, es lineal en el intervalo de cantidades de 150 al 324 mg.

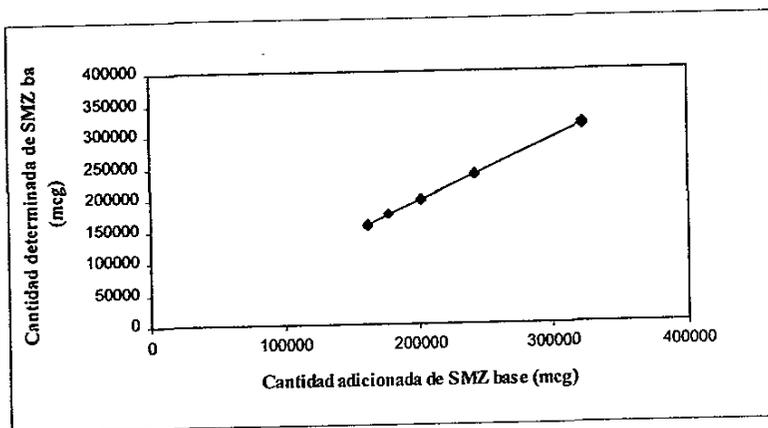


Figura36. Representación gráfica que muestra la relación lineal entre la cantidad adicionada de SMZ y la cantidad determinada de SMZ en μg .

También se estableció una hipótesis para determinar, mediante un análisis de variancia (tabla XVI), si la relación existente entre las variables (concentración y respuesta) es lineal. Se determinó que en un 95 % de los casos, existe relación lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad determinada, así como también se demuestra que la pendiente es diferente de cero.

Prueba de hipótesis:

Ho : No existe relación lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad determinada.

H₁ : Existe relación lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad determinada.

Criterio de aceptación: Si $f_{cal} > f_{crítica}$ se rechaza H_0 , y por lo tanto existe relación lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad determinada.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F cal	F crítica ($\alpha = 0.05$)
Desviación de medias debida a la regresión	2	47693399021.00	23846699510.00	3051.1983	3.8853
Desviación debida a la media	12	93786232.1400	7815519.3450		
Desviación total	14	47787185253.00			

TABLA XVI. Análisis de variancia para determinar la relación existente entre la cantidad adicionada de SMZ y cantidad determinada de SMZ

Para determinar si la cantidad determinada de SMZ es igual a cero cuando no se encuentra presente la cantidad adicionada de SMZ, se estableció una hipótesis para ser evaluada por medio de la t de student y se comprobó que en un 95% de los casos el intercepto pasa por cero.

Prueba de hipótesis:

Ho : Si la cantidad determinada es igual a cero no se encuentra presente la SMZ en la muestra.

H₁ : Si la cantidad determinada no es igual a cero se encuentra presente la SMZ en la muestra.

Criterio de aceptación: Si $t_{cal} < t_{crítica}$ no se rechaza H_0 , y por lo tanto el intercepto pasa por el origen.

	Coeficientes	Error estándar (S_b)	t calculada	t crítica ($\alpha = 0.05, g.l. = 14$)	Intervalo de confianza	
					Inferior 95%	Superior 95%
Intercepto (b)	1.8590	1.4032	1.3248	2.1448	-1.1725	4.8905

Tabla XVII. Prueba del intercepto.

PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO.

Nivel de concentración	C smz Base (µg/ml)	DÍA 1			DÍA 2		
		Cantidad adicionada de smz base (µg)	Cantidad determinada de smz base(µg)	Porcentaje recuperado (%)	Cantidad adicionada de smz base (µg)	Cantidad determinada de smz base(µg)	Porcentaje recuperado (%)
97.5 %	154	259180.243	256611.272	99.0088	238887.086	235064.090	98.5233
		259171.532	259995.548	100.3179	258956.738	259075.499	100.0459
		259162.821	259884.403	100.2784	258965.445	259634.333	100.2583
		259171.532	257578.475	99.3853	258860.967	254285.397	98.2324
		259162.821	256539.424	98.9877	258956.738	257652.344	99.4963
		259180.243	256371.306	98.9162	258895.793	257489.836	99.4569
100 %	160	199463.903	200366.309	100.4524	198794.984	199205.000	100.2063
		199463.903	199732.401	100.1346	198882.049	200613.288	100.8705
		199472.614	202964.124	101.7504	198864.636	201254.997	101.2020
		199463.903	200059.681	100.2987	198942.994	199978.231	100.5204
		199463.903	198878.596	99.7066	198768.864	198508.247	99.8689
		199455.191	198505.359	99.5238	198855.929	197843.341	99.4908
102.5 %	164	163294.355	164878.063	100.9698	162784.996	162626.472	99.9026
		163285.644	162755.776	99.6755	162680.518	163070.585	100.2398
		163294.355	162831.757	99.7167	162784.996	162582.006	99.8753
		163311.778	162545.636	99.5309	162706.638	163118.355	100.2530
		163285.644	163691.794	100.2487	162741.464	161252.597	99.0851
		163303.067	162281.896	99.3747	162663.105	162407.397	99.8428

TABLA XVIII. Resultados para determinar la precisión, exactitud y repetibilidad (Analista 1) del método.

Los datos para determinar la exactitud y precisión del método, se muestran en la tabla XVIII.

La precisión y exactitud del método se determinó analizando seis muestras independientes, para tres niveles de concentración correspondientes al 97.5, 100 y 102.5%, realizadas por un analista, en un mismo día y bajo las mismas condiciones de análisis. Se registró y se calculó la respuesta obtenida en porcentaje de recobro.

Los datos obtenidos para dicho análisis se evaluaron a partir del C. V. y la prueba de t de student.

Se puede observar que el CV (Tabla XIX) determinado, es menor al estimado para métodos cromatográficos (1.5%), por lo que se afirma que la dispersión de datos es mínima y por lo tanto el método es preciso.

Media = 99.8765
Desv. std. = 0.7255
CV. = 0.7264 %

.Tabla XIX: Parámetros estadísticos determinados para evaluar la precisión del método.

Mediante la prueba de t de student se determinó la exactitud del método a tres niveles de concentración (97.5, 100 y 102.5%), y se demostró con un 95% de confianza que el método es exacto.

Prueba de hipótesis :
<i>H₀ : El método es exacto.</i>
<i>H₁ : El método no es exacto.</i>
Criterio de aceptación: Si $t_{cal} < t_{crítica}$ no se rechaza <i>H₀</i> , y por lo tanto el método es exacto.

	Cantidad adicionada de smz base (µg)	Cantidad determinada de smz base(µg)
Media	207071.7052	206725.9399
Variancia	1613301990	1563112744
No. de Observaciones	36	36
Grados de libertad	70	-----
t calculada	0.036809853	-----
t crítica (α=0.05, g.l.=69)	1.994435479	-----

Tabla XX. Prueba de t student para determinar la exactitud del método.

REPETIBILIDAD ENTRE DÍAS.

La repetibilidad se determinó dos días diferentes por un analista, mediante el análisis de seis muestras independientes, para los niveles de concentración al 97.5, 100 y 102.5% bajo las mismas condiciones de análisis.

Los datos utilizados para determinar la precisión entre días son reportados en la tabla XVIII.

Los parámetros estadístico que se evaluaron para determinar si existía diferencia entre los porcentajes recuperados obtenidos en diferentes días, fue la prueba de t de student (ver anexo 3) y el CV., los resultados se muestran en la tabla XXI.

Prueba de hipótesis:

H₀ : No existe efecto del día en el análisis.

H₁ : Si existe efecto del día en el análisis.

Criterio de aceptación: Si $t_{cal} < t_{crítica}$ no se rechaza *H₀*, y por lo tanto el método es repetible entre días.

Concentración de SMZ base (µg/ml)	Nivel de concentración	Media	Desv. stand.	C.V (%)	t cal	t crítica (α=0.05, g.l= 18)
156	97.5 %	99.4044	0.7051	0.7093	0.2848	2.1009
160	100 %	100.3312	0.6830	0.6807	-0.0833	
164	102.5 %	99.8907	0.4926	0.4932	0.1137	

Tabla XXI. Parámetros estadísticos estimados para evaluar la repetibilidad del método.

Con los resultados generados en la tabla XXI, se determina con un 95% de confianza, que no existe diferencia estadística significativa del método desarrollado entre diferentes días, en ninguna de las concentraciones evaluadas. También se evaluó la precisión entre días mediante un análisis de variancia (ver tabla XXIII), cuyos resultados se discuten más adelante.

REPRODUCIBILIDAD ENTRE ANALISTAS.

La reproducibilidad se determinó en dos días diferentes y por dos diferentes analistas, mediante el análisis de seis muestras independientes en los niveles de concentración del 97.5, 100 y 102.5 %, bajo las mismas condiciones de análisis.

En la tabla XXII se muestran los datos correspondientes a la reproducibilidad (también ver anexo 2), que se evaluaron mediante un análisis de variancia y el CV.

Concentración de SMZ base (µg/ml)	Nivel de concentración	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
		Porcentaje recuperado (%)		Porcentaje recuperado (%)	
		DIA 1	DIA 2	DIA 1	DIA 2
156	97.5 %	99.0088	98.5233	100.8935	100.3241
		100.3179	100.0459	102.1474	101.0174
		100.2784	100.2583	101.6317	101.7621
		99.3853	98.2324	102.0360	100.7009
		98.9877	99.4963	102.2477	100.2154
		98.9162	99.4569	101.4689	100.3566
160	100 %	100.4524	100.2063	101.8739	101.4029
		100.1346	100.8705	102.6297	101.4625
		101.7504	101.2020	103.2693	101.2070
		100.2987	100.5204	101.1372	101.8471
		99.7066	99.8689	102.9178	100.7075
		99.5238	99.4908	101.0178	101.0795
164	102.5 %	100.9698	99.9026	102.3551	101.1555
		99.6755	100.2398	101.9402	101.0117
		99.7167	99.8753	102.7001	101.2111
		99.5309	100.2530	101.0400	100.6347
		100.2487	99.0851	101.5456	100.5269
		99.3747	99.8428	101.8022	99.8785

TABLA XXII. Resultados para determinar la reproducibilidad del método.
Csmz Base = concentración de SMZ base.

Para determinar si existía diferencia significativa entre los resultados de los porcentajes recuperados, obtenidos por dos analistas, se evaluó mediante un análisis de variancia anidado o jerárquico (anexo 3), para cada nivel de concentración, tomando en cuenta que el día esta anidado en el analista (tabla XXIII). También se determinó la media, la desviación estándar y el CV (tabla XXIV)

Prueba de hipótesis para reproducibilidad entre analistas:*H₀ : No existe efecto del analista en el análisis.**H₁ : Existe efecto del analista en el análisis.***Criterio de aceptación:** Si $f_{cal} < f_{crítica}$ no se rechaza H_0 , y por lo tanto el método es reproducible entre diferentes analistas.

Para el nivel de concentración al 97.5 % :

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F cal	F crítica ($\alpha = 0.05$)
Analista	1	19.97305068	19.97305068	12.8304	18.5128
Día	2	3.113399446	1.556699723	3.6912	3.4928
Error	20	8.43466314	0.421733157		

Para el nivel de concentración al 100 % :

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F cal	F crítica ($\alpha = 0.05$)
Analista	1	11.38106261	11.38106261	10.3088	18.5128
Día	2	2.208020266	1.104010133	2.1390	3.4930
Error	20	10.32274849	0.516137424		

Para el nivel de concentración al 102.5 % :

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F cal	F crítica ($\alpha = 0.05$)
Analista	1	12.16444047	12.16444047	6.0062	18.5128
Día	2	4.050657911	2.025328955	7.1666	3.4930
Error	20	5.652113901	0.282605695		

Tabla XXIII. Análisis de variancia para determinar la reproducibilidad del método a diferentes concentraciones.

Nivel de concentración	Media	Desv. stand.	CV. (%)
95.7 %	100.3081	1.1707	1.1671
100 %	101.0142	1.0552	1.0449
102.5 %	100.5958	0.9751	0.9693

Tabla XXIV. Parámetros estadísticos determinados para evaluar la reproducibilidad del método.

Como se puede observar, en el análisis de variancia realizado para cada una de las concentraciones, la $f_{cal} < f_{crítica}$, por lo que no se rechaza H_0 y se afirma con un 95% de confianza que no existe diferencia significativa entre analistas, para ninguno de los tres niveles de concentración evaluados.

También mediante este análisis de variancia se puede evaluar más estrictamente la repetibilidad entre días, como se puede observar existe una diferencia significativa ($f_{cal} > f_{crítica}$) del método efectuado en diferentes día. Sin embargo de forma práctica se puede asegurar que el método es repetible y reproducible a los niveles de concentración de 97.5, 100 y 102.5%, ya que los CV. son muy pequeños.

Posiblemente estas variaciones son debidas a la temperatura de trabajo a la cual se efectuó el ensayo, lo cual afecta el coeficiente de partición del soluto en la columna así como la viscosidad de la fase móvil. También puede ser a causa de la alta higroscopicidad de la SMZ.

DETERMINACIÓN DE PUREZA DE LA SULFAMETAZINA POR CLAR.

CARACTERÍSTICA A MEDIR	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN	RESULTADOS OBTENIDOS
Linealidad del sistema	Pendiente (m) = 1 Ordenada al origen (b) = 0 Coeficiente determinación (r^2) > 0.98 Coeficiente correlación (r) > 0.99 C.V. < 1.5 %	Pendiente (m) = 1.1981 Ordenada al origen (b) = 0 Coeficiente determinación (r^2) = 0.9994 Coeficiente correlación (r) = 0.9997 C.V. = 0.8564 %
Precisión del sistema	C.V. < 1.5 %	C.V. = 0.3001 %
Linealidad del método	Pendiente (m) = 1 Ordenada al origen (b) = 0 Coeficiente determinación (r^2) > 0.98 Coeficiente correlación (r) > 0.99 C.V. < 1.5%	Pendiente (m) = 0.9649 Ordenada al origen (b) = 0 Coeficiente determinación (r^2) = 0.9995 Coeficiente correlación (r) = 0.9997 C.V. = 0.6068%
Precisión	C.V. < 1.5%	C.V. = 0.7264%
a) Repetibilidad	$t_{cal} < t_{critica}$ ($\alpha=0.05$) C.V. < 1.5%	<input type="checkbox"/> (97.5%) 0.2848 < 2.1009 ($\alpha=0.05$, g.l =18) <input type="checkbox"/> (100%) -0.0833 < 2.1009 <input type="checkbox"/> (102.5%) 0.1137 < 2.1009 C.V. = 0.7093, 0.6807 y 0.7059% (Para <i>cl</i> nivel de concentración)
b) Reproducibilidad	$f_{cal} < f_{critica}$ ($\alpha=0.05$) C.V. < 1.5%	<input type="checkbox"/> Entre analista-día (97.5%): 12.8304 < 18.5128 <input type="checkbox"/> Entre analista-día (100%): 10.3088 < 18.5128 <input type="checkbox"/> Entre analista-día (110%): 6.0060 < 18.5128 ($\alpha=0.05$, g.l=1) C.V.=1.1671, 1.0449 y 0.9693% (para <i>ch</i> nivel de concentración)
Exactitud	$t_{cal} < t_{critica}$ ($\alpha=0.05$)	0.3681 < 1.9844 ($\alpha=0.05$, g.l=70)

TABLE XXV. Tabla comparativa entre los criterios de aceptación del método analítico y resultados obtenidos en la validación.

CONCLUSIONES

1. La CLAR es una técnica que ofrece eficiencia, confiabilidad, selectividad y sensibilidad para evaluar la pureza de la sulfametazina sódica.
2. El método analítico fue desarrollado y optimizado bajo las siguientes condiciones cromatográficas:
Fase móvil: Acido acético (0.25%) y acetonitrilo (80:20)
Columna: Simmetry C₁₈
Caudal: 1 ml/min
Longitud de onda: 262.6 nm
Volumen de inyección: 20 μ l
3. Se determinó la pureza de la sulfametazina sódica , en base húmeda (97.3998%) y en base seca (103.6562%).
4. El método analítico fue validado y se determinó que es lineal, preciso, exacto, repetible y reproducible, bajo las condiciones de trabajo establecidas durante el análisis.
5. Este estudio nos permitió evidenciar que la sulfametazina es altamente higroscópica, y por lo tanto se recomienda determinar la humedad de la muestra antes de ser analizada para hacer las correcciones necesarias en los cálculos de pureza correspondientes.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Adamovics, Jonh A. 1990. Chromatography Analysis of Pharmaceuticals. Vol. 49, Editorial Dekker, USA, pp. 9-19, p. 661.
2. Ahuja Satinder. 1992. Chomatography of Pharmaceuticals. Editorial Difusión científica. E. U. A. pp. 1-54, p 211.
3. Anderson, L. Robert. 1987. Practical statistics for analytical chemists. Editorial Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 103, p. 316.
4. Arrellin Rosas, O. 1996. Memorias del curso básico de Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Waters.
5. Farmacopea USP XXIII. 1995, pp. 1982-1984, 1458, p. 2391..
6. Florey ,Klaus. 1978. Analytical Profiles of Drug Substances. Vol. 7 . Editorial Academic Press. Londres. pp. 401-419. p 504.
7. Fong, Godwin W. 1991. HPLC in the Pharmaceutical Industry. Vol. 47. editorial Dekker. E.U.A. pp. 123-126. p.309.
8. Goehl, Thomas J. (1978). Simple High-Pressure Liquid Chromatographic Determination of Trisulfapyrimidines in Human Serum. J. Of Pharm. Sci., vol. 67, No.3, pp. 404-406.
9. Guerra, J. 1986. Validation of analitycal methods by FDA laboratories. Pharm. Thechonol., 10: 74-84.
10. Lindsay, Sandie. 1992. High Performance Liquid Chomatography. 2a. Edición. Editorial ACOL. Londres. pp..17-26,57-58,80-85 y 149-153. p 337.
11. Mehta. 1989. The validation for analytical methods use in pharmacy practice research. J. Clin. Pharm. Therap., 14: 465-473.
12. Moffat. A.C. 1986. Clarke's Isolation and identification of Drugs. 2a. edición, Editorial The Pharmaceutical Press, Londres, pp. 984-985, p. 1223.
13. Manual de operación Multisolvant Delivery Syatem. 1997. Waters. pp. 321-326.

14. Osuna, Arce M. 1997. Memorias de un desempeño profesional: Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. pp. 15, 17 y 37, p. 123.
15. Paraşrampuria, J. 1986. Quantitation of Sulfacetamide, Sulfadiazine, Sulfamerazine and Sulfamethazine in various combinations using High-Performance Liquid Chromatographic. Drug Develop. and Ind. Pharm., Vol. 12, No.14, pp. 2511-2519.
16. Paul. 1991. USP perspectives an analytical methods validation. Pharm. Technol., 15: 130-141.
17. Quattrocchi, Oscar Alberto. 1992. Introducción a la Cromatografía Líquida de alta Resolución. Argentina, pp. 10-11, 35-36, 96-101, 261-264 , 281 y 297, p. 320.
18. Riley, Christopher M. 1994. Pharmaceutical and Biomedical Application of Liquid Chromatography. Editorial Pergamon, Alemania, pp. 313-321 y 337-343, p. 379.
19. Wayne W., Daniel. 1995. Bioestadística, bases para el análisis de las ciencias de la salud. 5a. edición, Editorial Limusa, México, pp. 183, 280-296 y 361-365, p.878.
20. Yost, R. W. 1981. Introducción a la cromatografía líquida. Perkin-Elmer, USA, pp. 222-246 ,p. 261.

ANEXOS

ANEXO 1

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y DEL ESTÁNDAR INTERNO

1. Pesar exactamente alrededor de 200 mg de sulfametazina base (SMZ) y vertirlos en un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar 1 ml de hidróxido de sodio 1.0 N y llevar al aforo con hidróxido de sodio 0.01 N (Solución A).
2. Pesar exactamente alrededor de 200 mg de sulfatiazol base (STZ, sustancia de referencia interna) y vertirlos en un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar 1 ml de Hidróxido de sodio 1.0 N y llevar al aforo con hidróxido de sodio 0.01 N (Solución B).
3. Tomar 4 ml de la solución A y 4 ml de la solución B, vertirlos en un matraz volumétrico de 50 ml y llevar al aforo con hidróxido de sodio 0.01N.
4. Filtrar en un vial, 1 ml de la solución anterior utilizando una membrana tipo HV de 13 mm de diámetro con 0.45 μ m de tamaño de poro, adaptada a una jeringa de vidrio de 10 ml.

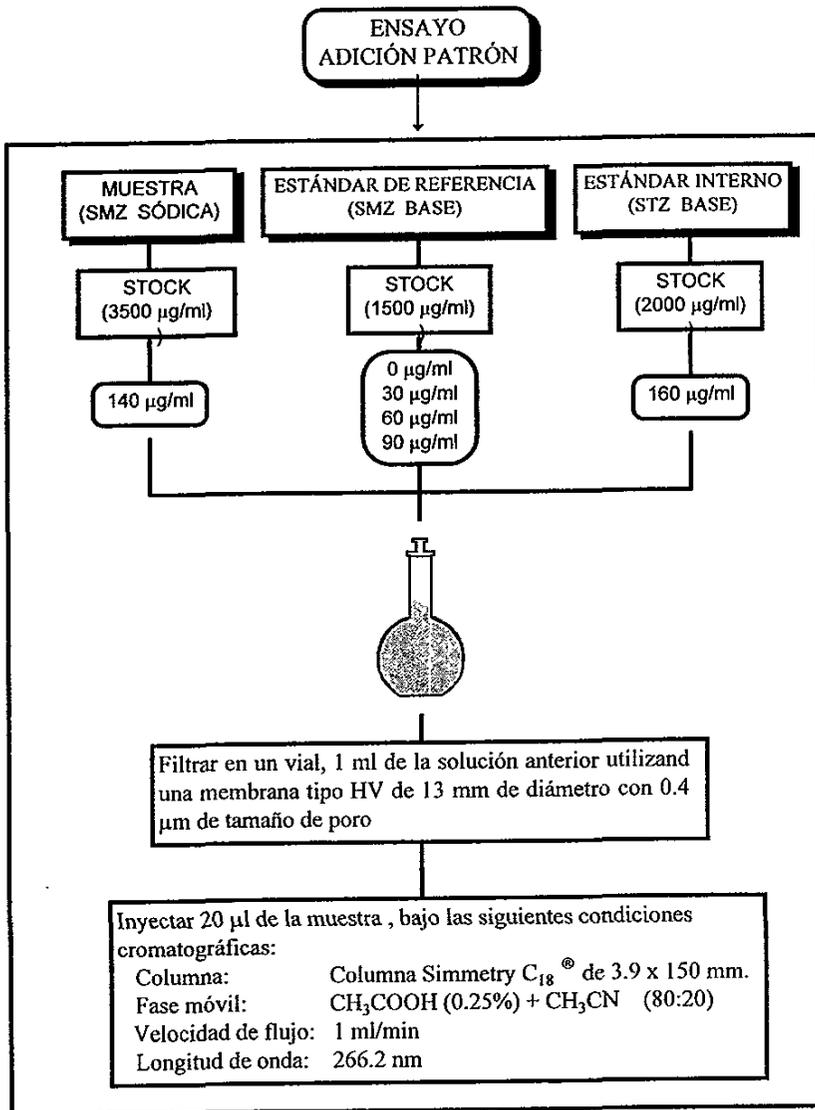
5. Inyectar 20 μ l de la muestra , bajo las siguientes **condiciones cromatográficas:**

Columna:	Columna Nova Pack C ₁₈ ® de 3.9 x 150 mm.
	Columna Simmetry C ₁₈ ® de 3.9 x 150 mm.
Fase móvil:	K ₂ HPO ₄ (0.5 M) + CH ₃ CN (80:20)
	CH ₃ COOH (0.25%) + CH ₃ CN (80:20)
Velocidad de flujo:	1 ml/min
Longitud de onda:	266.2 nm

PREPARACIÓN DE LA FASE MÓVIL
 ÁCIDO ACÉTICO (0.25%) + ACETONITRILLO
 PROPORCIÓN 80:20 RESPECTIVAMENTE

1. Tomar con una pipeta graduada 1.25 ml de ácido acético glacial, y vertirlos en un matraz aforado de 500 ml, llevar al aforo con agua desionizada (Solución de CH₃COOH al 0.25%).
2. Filtrar por separado los componentes de la fase móvil (CH₃COOH al 0.25% y CH₃CN) utilizando membranas del tipo HVLP de 0.45 μ m.
3. Desgasificar con helio los componentes de la fase móvil, por 10 minutos.

PREPARACIÓN DE LA CURVA ADICIÓN PATRÓN.



ANEXO 2
REPRODUCIBILIDAD (ANALISTA 1)

		DÍA 1			DÍA 2		
Nivel de concentración	C smz Base (µg/ml)	Cantidad adicionada de smz base (µg)	Cantidad determinada de smz base(µg)	Porcentaje recuperado (%)	Cantidad adicionada de smz base (µg)	Cantidad determinada de smz base(µg)	Porcentaje recuperado (%)
97.5 %	156	259180.243	256611.272	99.0088	258887.086	255064.090	98.5233
		259171.532	259995.548	100.3179	258956.738	259075.499	100.0459
		259162.821	259884.403	100.2784	258965.445	259634.333	100.2583
		259171.532	257578.475	99.3853	258860.967	254285.397	98.2324
		259162.821	256539.424	98.9877	258956.738	257652.344	99.4963
100 %	160	259180.243	256371.306	98.9162	258895.793	257489.836	99.4569
		199463.903	200366.309	100.4524	198794.984	199205.000	100.2063
		199463.903	199732.401	100.1346	198882.049	200613.288	100.8705
		199472.614	202964.124	101.7504	198864.636	201254.997	101.2020
		199463.903	200059.681	100.2987	198942.994	199978.231	100.5204
102.5 %	164	199463.903	198878.596	99.7066	198768.864	198508.247	99.8689
		199455.191	198505.359	99.5238	198855.929	197843.341	99.4908
		163294.355	164878.063	100.9698	162784.996	162626.472	99.9026
		163285.644	162755.776	99.6755	162680.518	163070.585	100.2398
		163294.355	162831.757	99.7167	162784.996	162582.006	99.8753
		163311.778	162545.636	99.5309	162706.638	163118.355	100.2530
		163285.644	163691.794	100.2487	162741.464	161252.597	99.0851
		163303.067	162281.896	99.3747	162663.105	162407.397	99.8428

TABLA XXVI. Resultados obtenidos por el analista 1, para evaluar la reproducibilidad del método.

REPRODUCIBILIDAD (ANALISTA 2)

Nivel de concentración	C smz Base (µg/ml)	DÍA 1			DÍA 2		
		Cantidad adicionada de smz base (µg)	Cantidad determinada de smz base(µg)	Porcentaje recuperado (%)	Cantidad adicionada de smz base (µg)	Cantidad determinada de smz base (µg)	Porcentaje recuperado (%)
97.5 %	156	259355.4676	261672.7394	100.8935	259854.8701	260697.1528	100.3241
		259372.8402	264942.4957	102.1474	259846.2011	262489.9556	101.0174
		259312.0361	263543.2081	101.6317	259880.8773	264460.2128	101.7621
		259390.2128	264671.3682	102.0360	259837.532	261658.8537	100.7009
		259303.3498	265131.6563	102.2477	259889.5463	260449.3808	100.2154
		259312.0361	263121.0772	101.4689	259828.8629	260755.4255	100.3566
100 %	160	199515.5649	203254.2015	101.8739	199873.6909	202677.7948	101.4029
		199472.1334	204717.6409	102.6297	199977.7196	202902.3811	101.4625
		199550.3101	206074.2183	103.2693	199943.0433	202356.4229	101.2070
		199446.0745	201714.1809	101.1372	199943.0433	203636.2442	101.8471
		199489.5060	205310.2709	102.9178	199891.029	201305.2787	100.7075
		199524.2512	201555.1048	101.0178	199847.6838	202005.028	101.0795
102.5 %	164	163510.8622	167361.6566	102.3551	163905.7891	165799.7365	101.1555
		163502.1759	166674.3696	101.9402	163888.4510	165546.5043	101.0117
		163493.4896	167908.0252	102.7001	163940.4653	165925.9248	101.2111
		163554.2937	165255.2467	101.0400	163940.4653	164981.0306	100.6347
		163571.6663	166099.7731	101.5456	163914.4582	164778.1489	100.5269
		163502.1759	166448.7522	101.8022	163871.1129	163671.9279	99.8785

TABLA XXVII . Resultados obtenidos por el analista 2, para evaluar la reproducibilidad del método .

Nivel de concentración	ANALISTA 1 Temperatura (° C)		ANALISTA 2 Temperatura (° C)	
	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 1	DÍA 2
	23	26	28	26
	23	26	18	26
97.5 %	23	26	28	25
	24	26	28	25
	24	26	28	25
	24	26	28	25
	24	26	28	25
	24	26	28	25
100 %	24	26	28	25
	24	26	28	25
	24	26	28	25
	24	26	28	25
	24	26	28	25
	24	26	28	25
	24	26	28	25
102.5 %	24	26	28	25
	23	26	28	25
	23	26	28	25

TABLA XXVIII : Temperaturas registradas en los cuatro diferentes días, durante la reproducibilidad del método.

ANEXO 3

FORMULARIO

- Validación de métodos analíticos.

Para determinar los parámetros estadísticos de regresión se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$r = \frac{\sum_i [(X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})]}{\left\{ \left[\sum_i (X_i - \bar{X})^2 \right] \left[\sum_i (Y_i - \bar{Y})^2 \right] \right\}^{1/2}}$$

$$r^2 = \left[\frac{\sum_i [(X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})]}{\left\{ \left[\sum_i (X_i - \bar{X})^2 \right] \left[\sum_i (Y_i - \bar{Y})^2 \right] \right\}^{1/2}} \right]^2$$

$$m = \frac{\sum_i [(X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})]}{\sum_i (X_i - \bar{X})^2}$$

$$b = \bar{Y} - m\bar{X}$$

r = Coeficiente de regresión
 r² = Coeficiente de correlación
 m = Pendiente.
 b = Intersección

Para evaluar que la recta pase por el origen y que cualquier desviación pueda adjudicarse al error aleatorio se establece una de hipótesis para el intercepto estimado su valor con las siguientes ecuaciones:

$$S_{y/x} = \left\{ \frac{\sum_i (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{n-2} \right\}^{1/2}$$

$S_{y/x}$ = Error típico de la regresión.

S_b = Error típico del intercepto.

I.C (b) = intervalo de confianza del intercepto.

b = Intercepto.

t_{cal} = t calculada.

$$S_b = S_{y/x} \left\{ \frac{\sum_i X_i^2}{n \sum_i (X_i - \bar{X})^2} \right\}^{1/2}$$

$$I.C = b \pm t_{cal} (n-2, 0.05) S_b$$

$$t_{cal} = \frac{b}{S_b}$$

Se realiza un análisis de variancia para estudiar las variaciones en la recta, y se construye la siguiente tabla:

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F cal	F crítica $\alpha = 0.05$
Desviación de medias debido a la regresión	r - 1	q ₁	q ₁ / (r-1)	CM ₁ / CM ₂	-----
Desviación debida a la media	n - r	q ₂	q ₂ / (n-r)	CM ₂ / CM ₃	-----
Desviación total	n - 1	q			

Donde:

$q = u - g$	Desviaciones totales al cuadrado.
$u = \sum_{i=1}^r \sum_{k=1}^{ni} X_{ik}^2$	Suma de cuadrados de todos los valores.
$g = g^2 / n$	Suma de los valores del i-ésimo grupo
$g = g_1 + g_2 + g_3 + \dots + g_r$	Suma de todos los valores.
$q_1 = \frac{g_1^2}{r_1} + \frac{g_2^2}{r_2} + \dots + \frac{g_r^2}{r_n} - g$	Desviaciones de los puntos con respecto a la recta.
$q_2 = q - q_1$	Desviaciones de cada punto con respecto a su propia media.

El análisis que se realiza para conocer la exactitud del método, es mediante la comparación de datos con un valor estándar, y se realiza calculando el promedio aritmético y la desviación estándar mediante las siguientes ecuaciones:

$$t_{cal} = \frac{\bar{X} - 100}{S / (n)^{1/2}}$$

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

$$I.C. = \bar{X} \pm t_{critica} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Para evaluar la precisión se determina el C.V., mediante la siguiente fórmula:

$$C.V. = \left[\frac{S}{\bar{X}} \right] [100]$$

Para determinar si existe diferencia entre los resultados obtenidos en diferentes días, se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$S = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{(n_1 + n_2) - 2}}$$

$$t_{cal} = \frac{(x_1 - x_2)}{s\sqrt{(1/n_1) + (1/n_2)}}$$

$$t_{critica} \Rightarrow \alpha = 0.05, g.l. = n - 1$$

Donde:

n_1 = Total de datos del día 1.

n_2 = Total de datos del día 2.

n_T = Número total de datos.

X_1 = Valor promedio del día 1.

X_2 = Valor promedio del día 2.

S_1 = Desviación estándar del día 1.

S_2 = Desviación estándar del día 2.

La tabla de análisis de variancia para determinar la reproducibilidad entre analistas, se construyó de la siguiente manera:

Análisis de variancia anidado o jerárquico

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F(Calculada)	F(Crítica) $\alpha = 0.05$
Analista	gl _A	SC _A	SC _A /gl _A = CM _A	CM _A /CM _D	-----
Día	gl _D	SC _D	SC _D /gl _D = CM _D	CM _D /CM _E	-----
Error	gl _E	SC _E	SC _E /gl _E = CM _E		

$$Y_{(ijk)} = \mu + A_{(i)} + D_{[j(i)]} + E_{[k(i)]}$$

Donde:

μ = Promedio de la respuesta

$A_{(i)}$ = Efecto del analista

$D_{(j)}$ = Efecto del día

E = Error

Determinación de los grados de libertad:

$$A_i \Rightarrow a - 1$$

a = Total de analistas

$$D_{[j(i)]} \Rightarrow (b - 1) a$$

b = Total de días

$$E_{[k(i)]} \Rightarrow (r - 1) a b$$

r = Número de repeticiones

$$n_T = (n - 1)$$

n_T = Número total de ensayos

Determinación de la suma de cuadrados:

$$SC_A = \frac{\sum [Y_i]^2}{br} - \frac{Y^2}{abr}$$

Suma de cuadrados del analista

$$SC_D = \frac{\sum [Y_j]^2}{r} - \frac{[Y]^2}{br}$$

Suma de cuadrados de los días

$$SC_E = [Y_{ijk}]^2 - \frac{[Y_j]^2}{r}$$

Suma de cuadrados del error

- Adecuabilidad del sistema.

Los parámetros utilizados como prueba de adecuabilidad del sistema, conocidos también como System Suitability, Son:

Resolución (Rs).

La eficiencia de la columna para separar dos compuestos, esta definida por la resolución (Rs), que es la relación entre la distancia de los máximos de dos picos y el valor medio de la anchura en la base del pico, que se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$Rs = \frac{T_{RB} - T_{RA}}{\frac{1}{2} (w_B + w_A)}$$

Donde: T_{RA} = Tiempo de retención del soluto A

T_{RB} = Tiempo de retención del soluto B

w_A = Ancho de la base del pico A

w_B = Ancho de la base del pico B

Factor de capacidad (K')

Este valor nos indica el tiempo de retención del soluto en la columna. Por lo tanto el cociente entre el tiempo de retención corregido (T_R') y el tiempo en que el soluto permanece en f.m nos da el valor llamado factor de capacidad, K' :

$$K' = \frac{T_R'}{T_M} = \frac{T_R - T_M}{T_M}$$

Donde: T_R' = Tiempo de retención corregido

T_R = Tiempo de retención del soluto en la f.e

T_M = Tiempo que permanece el soluto en la f.m (tiempo muerto)

Con el factor de capacidad se puede calcular el T_R de un soluto, para ello es importante conocer el T_M , con ayuda de un compuesto que no se retenga en la f.c.

Factor de separación (α).

En cromatografía se analizan muestras con muchos componentes e independientemente del número de componentes, el problema puede implicar la separación de dos picos adyacentes, de aquí que el factor de separación nos indique la selectividad en la separación de dos compuestos en un sistema cromatográfico:

$$\alpha = \frac{K_B'}{K_A'} = \frac{T_{RB}'}{T_{RA}'} = \frac{T_{RB} - T_M}{T_{RA} - T_M}$$

Donde: K_A' = Factor de capacidad del pico A

K_B' = Factor de capacidad del pico B

T_{RA}' = Tiempo de retención corregido para el pico A

T_{RB}' = Tiempo de retención corregido para el pico B

Factor de coleo o asimetría (A_s) del pico.

Un pico cromatográfico ideal presenta una distribución normal, pero debida a causas como : columna dañada, columna contaminada, sobrecarga de muestra, disolvente inapropiado para la muestra, efectos extracolumnares, amortiguador no adecuado, contaminación por metales pesados y efectos químicos o secundarios de retención; ocasionan que el pico sea asimétrico, lo cual de acuerdo a la magnitud del coleo, puede provocar considerables errores en la cuantificación.

Las fórmulas empleadas para calcular la A_s de un pico, son:

$$A_{s(10\%)} = B/A$$

$$A_{s(5\%)} = B'/A'$$

Donde : A y B son las medidas entre la línea que une al máximo del pico con la línea base y los extremos anterior y posterior del pico, tomados al 10 % de la altura, y, A' y B' son los mismos parámetros pero al 5% de dicha altura.

Plato teórico (N) y altura equivalente del plato teórico (AEPT).

Un plato teórico se puede definir como la región en la que la concentración del soluto se encuentra en equilibrio entre las dos fases (estacionaria y móvil), cuya expresión matemática es:

$$N = 16 (T_R / W)^2$$

Donde: T_R = Tiempo de retención

W = Anchura del pico sobre la línea base.

N = Plato teórico

La altura equivalente a un plato teórico (AEPT) es la relación existente entre la longitud de la columna y el número de platos teóricos:

$$AEPT = L / N$$

Donde : L = longitud de la columna

N = Número de platos teóricos.

El N nos ayuda a determinar la eficiencia de la columna por lo que a mayor número de platos teóricos mayor eficiencia de la columna.

ANEXO 4

GLOSARIO DE TÉRMINOS.

Cromatografía: Método de separación física o química de una mezcla de solutos, usando un disolvente como fase móvil y un medio separador (fase estacionaria).

Fluorescencia: Luminiscencia presentada por ciertas sustancias después de haber sido iluminadas por rayos visibles o UV, cuya luminiscencia persiste después de haber cesado la radiación excitante.

Fosforescencia: Luminiscencia presentada por ciertas sustancias después de haber sido iluminadas por rayos visibles o UV.

Resolución (Rs): Es una medida de la eficiencia que tiene la columna para separar dos compuestos.

Factor de capacidad (K'): El número de volúmenes muertos en que tarda en ser eluída una muestra.

Factor de separación o de selectividad (α): Es el número que describe que también se separan dos compuestos en un sistema cromatográfico.

Factor de coeio o asimetría (As): Es una expresión que nos indica la simetría de un pico.

Plato teórico (N): La región en la que la concentración del soluto se encuentra en equilibrio entre las dos fases (estacionaria y móvil).

Altura equivalente del plato teórico (AEPT): Es la relación existente entre la longitud de la columna y el número de platos teóricos.

Tiempo de retención: Tiempo durante el cual el soluto permanece en la f.e.

Linealidad: La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o mediante una transformación matemática, son directamente proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado. Es decir, mide el grado en que la respuesta del método se aproxima a una función lineal del tipo $y = mx + b$ al trabajar con diferentes concentraciones.

Exactitud: Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia, bajo las mismas condiciones (analista, equipo, tiempo, etc.).

Precisión: Es el grado de concordancia entre resultados individuales cuando el método se aplica repetidamente a una muestra homogénea.

Reproducibilidad: Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas en diferentes laboratorios, bajo condiciones diferentes (analista, tiempo, equipo).

Repetibilidad: Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizada bajo las mismas condiciones de análisis (analista, tiempo, laboratorio, etc.).

Especificidad o selectividad: Habilidad de un método para cuantificar exactamente y de manera exclusiva los principios activos en presencia de los componentes de la muestra (impurezas, componentes endógenos de la matriz biológica, metabolitos, excipientes), el método debe separar y cuantificar sólo los compuestos de interés.

Sensibilidad: Concentración mínima necesaria para producir una respuesta.

Límite de detección: Es la concentración mínima de analito que puede ser detectada con precisión pero no necesariamente con exactitud, bajo condiciones normales de operación. Se expresa normalmente como la concentración del analito en la muestra.

Límite de cuantificación: Es la concentración mínima de analito en una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud en matriz de muestras, tales como impurezas en el caso de materias primas (principios activos), o productos de degradación en productos farmacéuticos finales. Bajo condiciones normales de operación.

Tolerancia del sistema: Es una medida de la capacidad del procedimiento analítico para no ser afectado en sus resultados por pequeñas variaciones en los parámetros del método y da una buena indicación de su confiabilidad durante el trabajo rutinario del laboratorio.

Robustez (Ruggedness): es sólo parte integral del amortiguamiento contra excesos típicos, esto es, contra diferentes técnicas, equipo y condiciones.

Cromatograma: Representación gráfica de la concentración de un soluto en función de su tiempo de elución en la columna cromatográfica.

Estándar de referencia: Son productos de uniformidad conocida, destinados para utilizarse en comprobaciones analíticas físicas, químicas o microbiológicas, cuya evaluación se basa en la comparación de sus propiedades con respecto a la sustancia que está en examen. Su finalidad es disminuir errores en el laboratorio.

Estándar interno: Compuesto químico puro presente en o adicionado en cantidad conocida a muestras, que sirve como referencia de medición.

Sistema isocrático: Modo cromatográfico donde la bomba mantiene constante la composición de fase móvil durante el análisis.

Sistema gradiente: Modo cromatográfico donde la bomba permite variar la composición de fase móvil durante el análisis.

Fase normal: Proceso cromatográfico que se caracteriza por la naturaleza polar del lecho estacionario (fase estacionaria) y la naturaleza apolar de la fase móvil.

Fase reversa: Proceso cromatográfico que se caracteriza por la naturaleza apolar del lecho estacionario (fase estacionaria) y la naturaleza polar de la fase móvil.

Unión covalente: Enlace químico ordinario entre átomos, cada uno de los cuales cede un electrón al par compartido.

Diodos: Dispositivos fotosensibles que transforman la información luminosa (absorbancia a cada una de las longitudes de onda del intervalo) en una señal eléctrica, cada uno de ellos proporciona una señal.

Acromático: Sin color

Constante dieléctrica: Índice de capacidad de un material para almacenar energía de un campo electrostático en presencia de un campo eléctrico.

Polaridad: Característica fisicoquímica del solvente empleado como fase móvil, dada por la concentración de moléculas disociadas en iones con carga eléctrica y la electronegatividad de los mismos.

Analito: Compuesto químico a ser caracterizado y cuantificado en una muestra.

t calculada: Valor calculado estadísticamente para comparación entre medias.

t crítica: Valor determinado estadísticamente para comparación entre medias.

F calculada: Valor calculado estadísticamente para comparación entre variancias.

F crítica: Valor calculado estadísticamente para comparación entre variancias.