

5
2-9



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS METODOS
ANALITICOS PARA LA CUANTIFICACION
DE CLORHIDRATO DE TRIHEXIFENIDILO
EN TABLETAS.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A:

ANA MARIA BARRON VILLALOBOS

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

México; D. F.

Oct. 1989



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.

I N D I C E

CONTENIDO	PAGINA
I. INTRODUCCION	1
II. FUNDAMENTACION DEL TEMA	2
A. MONOGRAFIA DEL CLORHIDRATO DE TRIHEXIFENIDILIO	2
a) Nombres Quimicos y Sinónimos	
b) Fórmula Condensada	
c) Fórmula Desarrollada	
d) Peso Molecular	
e) Descripción	
f) Identificación	
g) Pérdida al Secado	
h) Residuo a la Ignición	
i) Metales Pesados	
j) Contenido de Cloruros	
k) Farmacología	
l) Preparados y Dosis	
m) Conservación	
B. CROMATOGRAFIA	4
1) DEFINICIONES	4
1.1 Cromatografía	
1.2 Fase Estacionaria	
1.3 Fase Móvil	
2) CLASIFICACION	4
2.1 Cromatografía Líquida o de Partición	
2.2 Cromatografía Líquido-Sólido o de Absorción	
2.3 Cromatografía de Intercambio iónico	
2.4 Cromatografía de Exclusión de Tamaño o Cromatografía de Gel	
2.5 Cromatografía de Fase Enlazada	
2.6 Cromatografía de Par Iónico	
2.7 Cromatografía Fase Normal	
2.8 Cromatografía Fase Inversa	
3) PARAMETROS CROMATOGRAFICOS	7
3.1 Tiempo de Retención	
3.2 Tiempo Muerto	
3.3 Tiempo de Retención Corregido	
3.4 Factor de Capacidad	

3.5	Número de Platos Teóricos	
3.6	Altura Equivalente de un Plato Teórico	
3.7	Factor de Selectividad	
3.8	Resolución	
4)	CARACTERIZACIONES DE LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA MODERNA	10
5)	LA FASE MOVIL	10
6)	LA FASE ESTACIONARIA	11
7)	INSTRUMENTACION	12
7.1	Bombas	
7.1.1	Bombas Mecánicas	
7.1.1.2	Bombas por desplazamiento continuo (jeringas)	
7.1.2	Bombas Neumáticas	
7.2	Dispositivos para la Inyección	
7.2.1	Inyección con Jeringa	
7.2.2	Inyección por medio de Válvulas	
7.3	Columnas	
7.4	Detectores	
7.4.1	Detector de Índice de Refracción	
7.4.1.1	Detectores de Desviación	
7.4.1.2	Detectores de Reflexión (Fresnel)	
7.4.2	Detectores de Ultravioleta	
7.4.2.1	Detectores de Longitud de Onda Fija	
7.4.2.2	Detectores de Longitud de Onda Variable	
7.4.3	Detectores de Fluorescencia	
7.4.4	Detectores Electroquímicos	
C.	VALIDACION	20
1)	EXACTITUD	21
1.1	Definición	
1.2	Determinación	
1.3	Criterios	
2)	LINEALIDAD	23
2.1	LINEALIDAD DEL SISTEMA	23
2.1.1	Definición	
2.1.2	Determinación	
2.1.3	Criterios	
2.2	LINEALIDAD DEL METODO	25
2.2.1	Definición	
2.2.2	Determinación	
2.2.3	Criterios	

3)	PRECISION	30
3.1	REPETIBILIDAD	30
3.1.1	Definición	
3.1.2	Determinación	
3.2.3	Criterios	
3.2	REPRODUCIBILIDAD	31
3.2.1	Definición	
3.2.2	Determinación	
3.2.3	Criterios	
4)	ESPECIFICIDAD	35
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
IV.	OBJETIVOS	38
V.	HIPOTESIS	39
VI.	MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS	40
VII.	METODO	42
VIII.	RESULTADOS	44
IX.	DISCUSION DE RESULTADOS	80
X.	CONCLUSIONES	81
XII.	BIBLIOGRAFIA	82

I. INTRODUCCION

El análisis de agentes terapéuticos, requiere de métodos funcionales para su uso en el laboratorio, ya que pueden presentarse, (debido a la complejidad y variabilidad de la composición de los medicamentos), interferencias por los excipientes de la formulación, otros principios activos, sustancias de descomposición y metabolitos en los análisis de fluidos biológicos.

Actualmente en la industria farmacéutica se buscan alternativas para la cuantificación de un mismo principio activo y por ello día a día se desarrollan métodos de análisis que con la ayuda de instrumentos permitan obtener métodos que cumplan satisfactoriamente los requisitos para su validación como son: exactitud, linealidad y precisión, demostrando además, que son específicos para distinguir los productos de degradación con respecto al compuesto de análisis. Es importante enfatizar que el poseer métodos alternos, confiables, dará como resultado una farmacovigilancia más segura y eficaz, cuando por motivos incontrolables no sea posible la aplicación de alguno de los métodos establecidos.

En los años más recientes la cromatografía de líquidos de alta resolución ha llegado a ser una técnica ampliamente usada en el campo de análisis de medicamentos. Teniendo aplicación en el análisis farmacéutico, química clínica y química forense. Dentro del análisis farmacéutico se incluyen; estudios de estabilidad de medicamentos, determinación de trazas y/o impurezas, productos de descomposición en muestras de lotes a granel, así como también en estudios de contaminación cruzada y por supuesto en el análisis de medicamentos y/o sus metabolitos en fluidos biológicos.

La cromatografía de líquidos de alta resolución ofrece muchas ventajas en el análisis de agentes terapéuticos como es versatilidad para elegir fase móvil, los tiempos de análisis que generalmente son de 10 a 30 min. y los procedimientos de extracción y limpieza de la muestra para inyectar los cuales son menores con respecto a otros métodos.

Existen en la literatura diversos métodos reportados para la cuantificación del Clorhidrato de Trihexifenidilo, entre los cuales se tiene: análisis espectrofotométrico y/o análisis por cromatografía de gases. El presente trabajo muestra el desarrollo de un método de análisis para la cuantificación de Clorhidrato de Trihexifenidilo por cromatografía de líquidos de alta resolución, con su validación, y la comparación estadística con respecto a un método espectrofotométrico ya validado.

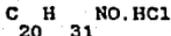
II. FUNDAMENTACION DEL TEMA

A. MONOGRAFIA DEL COLRHIDRATO DE TRIHEXIFENIDILO (1,2,3,5,6,7)

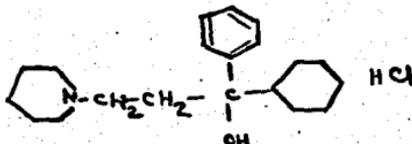
a) Nombres Químicos y Sinónimos:

1-Piperidinpropanol, α -ciclohexil- α -fenil clorhidrato.
 α -ciclonexil- α -fenil-1-piperidinpropanol clorhidrato.

b) Fórmula Condensada:



c) Fórmula Desarrollada:



d) Peso Molecular:

337.93 g/mol

e) Descripción:

Polvo blanco cristalino.

f) Identificación:

- 1) Solubilidad: 1 en 100 de agua, 1 en 22 de etanol, 1 en 15 de cloroformo y 1 en 10 de metanol.
- 2) Punto de fusión: aproximadamente 250 C con descomposición.
- 3) Características de absorción al IR. La absorción al IR exhibe máximos a las mismas longitudes de onda que una preparación similar de Clorhidrato de Trihexifenidilum USP.
- 4) Responde a los ensayos de cloruros.

g) Pérdida al Secado: no más de 0.5%

h) Residuo a la Ignición: no más de 0.1%

i) Metales Pesados: 0.002%

j) Contenido de Cloruros: no menos del 10.3 y no más de 10.7%.

k) Farmacología: El Trihexifenidilo es el prototipo de agentes anticolinérgicos usados en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, que generalmente aparece de manera insidiosa en las últimas décadas de la vida, produciendo una disminución lenta de la capacidad de movimiento. El trihexifenidilo influye notablemente en el temblor característico, mejora la rigidez y bradicinesis además de otros síntomas secundarios de la enfermedad.

Efectos Secundarios: En SNC son; confusión mental, delirio, somnolencia y alucinaciones. En vías urinarias se presenta ciclopejía, estreñimiento y retención urinaria, que molesta especialmente en ancianos.

l) Preparados y Dosis:

- Tabletas de 2 y 5 mg.
- Cápsulas de liberación prolongada de 5 mg.
- Elixir de 2 mg/5ml

Los límites de la dosis diaria promedio es de 1 a 10 mg.

m) Conservación: Se conserva en recipientes bien cerrados.

B. CROMATOGRAFIA (12,13,16)

1) DEFINICIONES

1.1 Cromatografía.

Es un procedimiento por el cual los componentes de una muestra son separados por un proceso de migración diferencial en un sistema consistente de 2 fases, una de las cuales se mueve continuamente en una dirección dada. En este sistema los compuestos individualmente exhiben diferentes comportamientos en su movilidad por razones de diferencias en adsorción, partición, solubilidad, presión de vapor, tamaño molecular o carga iónica.

1.2 Fase estacionaria.

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

1.3 Fase móvil.

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

2) CLASIFICACION (12, 18)

Los métodos cromatográficos pueden ser clasificados de acuerdo al tipo de fase móvil y fase estacionaria seleccionados. La cromatografía de gases involucra aquellos en los cuales la fase móvil es un gas; la cromatografía líquida moderna involucra aquellos donde la fase móvil es un líquido.

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

2.1 Cromatografía Líquida o de Partición.

Este tipo de cromatografía envuelve una fase estacionaria líquida de composición diferente a la fase móvil. En donde las moléculas de la muestra se distribuyen entre las 2 fases, como si fuera un proceso de extracción líquido-líquido en una separación con embudo. Las dos fases deben ser inmiscibles.

2.2 Cromatografía Líquido-Sólido o de Adsorción.

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

2.3 Cromatografía de Intercambio Iónico.

En este tipo de cromatografía la fase estacionaria contiene iones los cuales son capaces de ser cambiados con los iones del soluto de la fase móvil. El ión cambiador normalmente se encuentra unido a grupos de amonio cuaternario $[-(CH_2)_nNR_3^+X^-]$ para la separación de aniones, ó unido a grupos de ácido sulfónico $(-C_6H_4SO_3H)$ en la separación de cationes. En este tipo de cromatografía existen 2 variables importantes que deben tomarse en cuenta para una separación satisfactoria de los componentes de una muestra, que son la fuerza iónica de la fase móvil y la variación del pH en la misma.

2.4 Cromatografía de Exclusión de Tamaño ó Cromatografía de Gel

En este tipo de cromatografía el empaque de la columna es un material poroso con cierto tamaño. Las moléculas que son grandes quedan excluidas por los poros y solo cierto tipo de pequeñas moléculas podrán penetrar los poros, obteniéndose un movimiento rápido de las moléculas pequeñas y la retención de las de mayor tamaño. En éste tipo de cromatografía es estrictamente determinante el tamaño molecular.

Actualmente existen 2 métodos adicionales a los anteriores que se desarrollaron como resultados de modificaciones de la cromatografía líquido-líquido y cromatografía de intercambio iónico y son los siguientes:

2.5 Cromatografía de Fase Enlazada.

Es el tipo de cromatografía en la cual se usa una fase estacionaria orgánica que está químicamente enlazada a las partículas activas. El mecanismo aún es controversial.

2.6 Cromatografía de Par Iónico.

Su mecanismo de retención aún no está completamente elucidado, pero se acepta que existe absorción del soluto iónico en la fase estacionaria, formación de pares de iones soluto - contraión en el eluente y formación de pares iónicos soluto - contraión en la fase estacionaria.

En éstos dos últimos tipos de cromatografía no siempre se puede asegurar cual de los dos procesos implicados (adsorción o reparto) desempeña el papel más importante. Por ésta razón en la práctica se definen otros dos tipos según sea la polaridad de las fases.

2.7 Cromatografía en Fase Normal.

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

2.8 Cromatografía en Fase Inversa.

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

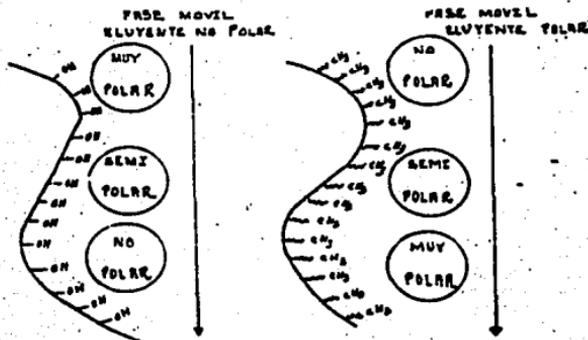


Fig. 1 Ilustración gráfica de la cromatografía líquida en fase normal y en fase inversa. Los círculos representan los tipos de compuestos presentes en la muestra y su posición relativa en la dirección del flujo de la fase móvil indica su orden de elución.

3) PARAMETROS CROMATOGRAFICOS (12,15,16,19)

3.1 Tiempo de Retención (tr).

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

3.2 Tiempo Muerto (to).

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

3.3 Tiempo de Retención Corregido (t'r).

Es la distancia entre tr y to, es decir la medida del tiempo en que la muestra permanece retenida en el material de relleno de la columna. Dicho de otra manera, tr es el tiempo total de permanencia en la columna, to el tiempo que la muestra permanece en la fase móvil y por lo tanto, t'r es el tiempo en que la muestra permanece retenida en la fase estacionaria.

$$t'r = tr - to$$

3.4 Factor de Capacidad (K).

El factor de capacidad es un término que indica el tiempo de retención de un soluto en la columna. Su cálculo es por medio de la siguiente fórmula:

$$K = \frac{t'r}{to} = \frac{tr - to}{to} = \frac{\text{tiempo en la fase estacionaria.}}{\text{tiempo en la fase móvil}}$$

Por otra parte conociendo el factor de capacidad, podemos calcular el tiempo de retención de un compuesto.

$$tr = to (1 + K)$$

En la práctica, hay que hacer lo posible para obtener un valor del factor de capacidad por lo menos igual a uno para el primer pico de interes, con el fin de asegurar su separación del solvente y sus posibles impurezas las cuales se eluyen generalmente a un tiempo to.

3.5 Número de Platos Teóricos (N).

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

$$N = 16 \left[\frac{tr}{W_b} \right]^2 \quad \text{o} \quad N = 5.545 \left[\frac{tr}{W_h} \right]^2$$

Donde:

- N = Número de platos teóricos
- tr = Tiempo de retención del pico
- W_b = Ancho del pico (obteniéndose por extrapolación de tangentes del punto de inflexión a la base línea como se muestra en la figura 2)
- W_h = Ancho del pico tomado a la mitad de la altura.

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

3.6 Altura Equivalente de un Plato Teórico (H).

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

$$H = L/N$$

Donde:

- L = Longitud de la columna
- N = Número de Platos Teóricos

Así se tiene que a menor altura de cada plato y mayor número de platos la columna cromatográfica será más eficiente.

3.7 Factor de Selectividad (α).

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

$$\alpha = \frac{t_r (B)}{t_r (A)} = \frac{K_B}{K_A}$$

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

3.8 Resolución (R).

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

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

Donde:

Δt = Diferencias de los tiempos de retención
 W_{b1}, W_{b2} = Ancho de los picos respectivamente

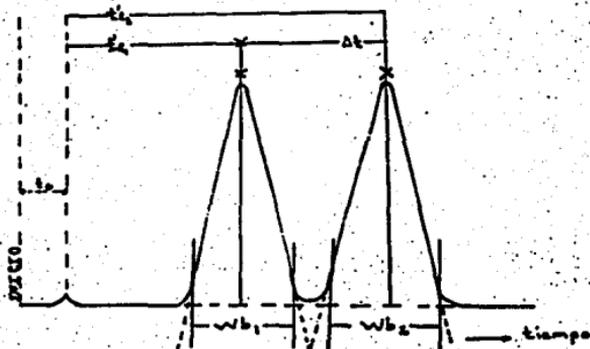


Fig. 2 Ilustración de un cromatograma con dos picos muy cercanos.

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

4) CARACTERIZACIONES DE LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA MODERNA (12,14,15)

La cromatografía líquida moderna se caracteriza por :

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

5) LA FASE MOVIL

Excepto para el caso de cromatografía de exclusión, la fase móvil desempeña, en general, una parte activa en cromatografía líquida. Se puede usar una única sustancia como fase móvil durante el análisis de una mezcla de dos o más sustancias, ajustando adecuadamente las características de la fase. También es posible mantener constante la composición de la fase móvil durante el análisis, o bien cambiarla. El primer método se llama operación isocrática, mientras que el segundo se conoce como elución por gradiente.

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

6) LA FASE ESTACIONARIA

La fase estacionaria puede ser un sólido poroso del tipo de los usados en la cromatografía de adsorción, intercambio iónico y exclusión. Las diferentes fases difieren en su composición química, estructura y tamaño de partícula. Otra posibilidad es usar una fase estacionaria líquida e impregnar con ellas la superficie de las partículas de un sólido que actúa únicamente como soporte. Sin embargo hoy en día estas columnas son muy poco frecuentes, ya que resulta difícil evitar que la fase estacionaria sea arrastrada por la fase móvil.

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

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

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

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

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

7) INSTRUMENTACION (12,13,15,16,18)

Para lograr que las separaciones sean más eficaces y rápidas empleando empaques de columna más finos se debe emplear equipo y presión especiales. Se requieren presiones de 1000 a 3000 psi para lograr velocidades de flujo de 1 a 2 ml/min. en columnas de 2-4 mm de diámetro y 10 a 15 cm de largo, aunque en ciertos casos pueden ser necesarias presiones de hasta 6000 psi.

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

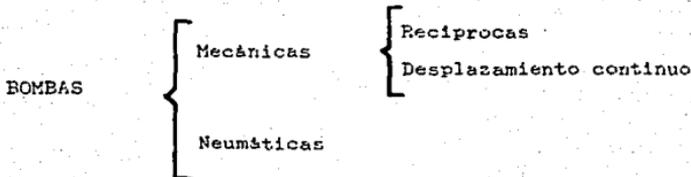
7.1 Bombas

La principal función del sistema de bombeo es proveer de fase móvil a la columna con un flujo constante y reproducible. Las columnas utilizadas en CLAR están rellenas de partículas muy pequeñas que presentan cierta resistencia al flujo de la fase móvil por lo tanto se requiere de un sistema de bombeo que haga fluir la fase móvil a un flujo razonable.

Los requisitos más importantes de un sistema de bombeo son:

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

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



7.1.1 BOMBAS MECANICAS.

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

VENTAJAS: - Depósito de disolvente ilimitado.
 - Rapidez del cambio de fase móvil.
 - Volúmen de flujo constante.
 - Facilidad de limpieza.

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

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

- Colocando un serpentín largo (15 m) entre la bomba y la cámara de inyección, para absorber las pulsaciones producidas por la bomba.
- El uso de un manómetro de presión con un gran tubo de Bourdon (normalmente intercalado, para evitar retención del líquido) que también se flexiona con cada pulso.
- Otra manera más eficaz es utilizando Bombas de Doble Pistón, donde existen 2 pistones gobernados por un mismo motor a través de un eje excéntrico. Este mecanismo permite que un pistón succione mientras el otro expulsa el líquido fuera de la bomba. Por lo tanto los perfiles de flujo se superponen el uno al otro reduciéndose apreciablemente las pulsaciones.

7.1.1.2 BOMBAS POR DESPLAZAMIENTO CONTINUO (JERINGAS). Son aquellas en las que un émbolo o pistón es desplazado en forma continua y uniforme por un motor de precisión, comprimiendo el líquido contenido en una cámara de cierto volúmen; el líquido fluye luego a través de una abertura en la misma cámara y se obtiene así un flujo de volúmen constante, que puede variar según se desplace el émbolo a mayor o menor velocidad.

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

- DESVENTAJAS:
- Limitada capacidad del depósito (250-500ml) y para llenar la cámara es necesario suspender su operación.
 - A altas presiones hay ligeros cambios en el flujo al comprimirse el disolvente (4% a 408 atm = 6000 psi)
 - Son de alto costo.

7.1.2 BOMBAS NEUMATICAS.

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

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

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

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

Algunos diseños tienen sistemas amplificadores de presión que pueden producir 400 atm (6000 psi) utilizando bajas presiones del gas. En estos sistemas se utiliza un pistón de gran diámetro para el gas que transmite su movimiento a otro de pequeño diámetro para el líquido. Así se obtiene que la presión en el líquido es proporcional al cociente del área de la sección de ambos pistones, proporcionando gran presión al líquido. Sin embargo el diseño es caro, complejo y de alto mantenimiento.

7.2 Dispositivos para la Inyección

Para la introducción de la muestra en la columna es necesario tener en cuenta el diseño del inyector, ya que se requiere de una zona de poco volumen impregnada por la fase móvil, con el fin de evitar la difusión de la muestra y la dilución exponencial.

Requisitos con los que debe cumplir un buen inyector:

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

7.2.1 Inyección con Jeringa

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

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

VENTAJAS: Resulta barato, flexible y fácil operación.

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

7.2.2 Inyección por medio de Válvulas

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

El instrumental moderno emplea en general válvulas inyectoras como la que se ilustra esquemáticamente en la figura 3 donde la muestra se introduce a la válvula mediante una jeringa, desplaza el líquido y llena el espacio interno de una pequeña porción del tubo capilar de acero (usualmente el volumen contenido en el tubo es de 10 a 50 ul). La muestra se inyecta en la columna accionando la válvula de forma tal que la disposición de entrada y salida se invierte, tal como se muestra en la figura 3.

De esta forma se logra inyectar a cualquier presión un amplio intervalo de tamaños de muestra (no es necesario llenar todo el volumen del tubo con la muestra) con un alto grado de reproducibilidad. Las válvulas inyectoras se fabrican de materiales inertes, como el teflón y acero inoxidable, y su diseño es tal que resisten presiones muy elevadas.

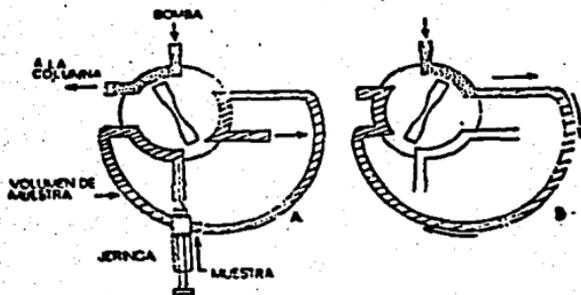


Figura 3. Válvula inyectora. A. toma de la muestra, B. inyección de la muestra.

7.3 Columnas

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

Básicamente la columna consiste de un segmento recto de tubo de acero inoxidable tipo 316, cuya longitud varía entre 10 y 50 cm, diámetros internos de 2.6-3 mm ó bien de 4.6-5 mm (al tener diámetros mas pequeños los análisis son mas rápidos) y diámetro externo de 1/4 pulgada.

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

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

7.4 Detectores

Un detector ideal sería aquel que satisficiera los siguientes requisitos:

- Altamente sensible
- Estable
- Lectura continua
- Respuesta universal

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

7.4.1 Detector de Índice de Refracción

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

DESVENTAJAS: En mezclas complejas los índices de refracción de los componentes pueden cubrir un amplio rango de valores y algunos de ellos pueden ser tan cercanos a los de la fase móvil que no pueden ser detectados. Existe la necesidad de equilibrar el detector cada vez que se produce un pequeño cambio en la composición de la fase móvil. No se puede trabajar en gradiente.

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

7.4.1.1 Detectores de Desviación

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

VENTAJAS: Baja sensibilidad frente a partículas sólidas y burbujas de aire.
Intervalos de índice de refracción 1.000 - 1.75

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

7.4.1.2 Detectores de Reflexión (Fresnel)

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

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

VENTAJAS: Alta sensibilidad, opera a flujos muy bajos con celdas de poco volumen fácil acceso a la celda, bajo costo.

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

7.4.2 Detectores Ultravioleta

7.4.2.1 Detectores de Longitud de Onda Fija

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

Espectro del Visible 380 - 800 nm

Espectro Ultravioleta 210 - 380 nm

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

VENTAJAS: Estables, sensibles (<1 ng), económico, sencillo.

La mayoría de los compuestos que absorben en UV presentan cierta absorción en 254 nm. Muchos detectores presentan filtros también de otras longitudes de onda, sin embargo la estabilidad de la línea base y la intensidad de la sensibilidad no son comparables como la de 254 nm.

7.4.2.2 Detectores de Longitud de Onda Variable

Este tipo de detectores son útiles en 3 casos:

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

7.4.3 Detectores de Fluorescencia

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

7.4.4 Detector Electroquímico

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

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

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

C. VALIDACION (24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 y 31)

Cuando se inicia el desarrollo de un nuevo método analítico se requiere de parámetros que permitan la selección de la técnica mas apropiada para el análisis de un compuesto determinado, así como la seguridad de la confiabilidad de la misma.

La validación de métodos analíticos puede definirse como el proceso por el cual a través de estudios de laboratorio, se establece que las capacidades del método satisfacen los requisitos necesarios para las aplicaciones analíticas deseadas.

El proceso de validación verifica que una metodología en particular este basada sobre principios técnicos y que ha sido optimizada para los propósitos prácticos de medición. Más que una simple medida de un procedimiento la validación de métodos es una medida de la efectividad total de un sistema analítico, ya que los estudios deben de asegurar que el método, los instrumentos, disolventes, reactivos y todo lo usado durante el ensayo es adecuado para el compuesto a analizar. Obviamente que un método que es válido en una situación determinada puede ser inválido para otra. Las características de rendimiento se expresan generalmente por términos de parámetros analíticos.

Las validaciones deben ser hechas tomando en cuenta una serie de consideraciones como son: método de análisis, compuesto a analizar, forma farmacéutica y/o matriz donde se localiza el compuesto, niveles de concentración, etc. Por lo que es lógico suponer que diferentes métodos de ensayo requieran diferentes esquemas de evaluación. Sin embargo los parámetros de evaluación mas comunes para la validación de métodos analíticos son los siguientes:

- A. EXACTITUD
- B. LINEALIDAD
 - 1. Linealidad del Sistema
 - 2. Linealidad del Método
- C. PRECISION
 - 1. Repetibilidad
 - 2. Reproducibilidad
- D. ESPECIFICIDAD

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

1) EXACTITUD

1.1 Definición:

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

La estimación de la exactitud de un método esta asociado con el error total (Et = Ed + Ei) que es la suma del error indeterminado y el error determinado. El error determinado se debe a una falta de control en la técnica analítica (errores de operación, calibración, reactivos, etc) y es controlable. El error indeterminado permanece, aún cuando se han hecho todos los esfuerzos por eliminarlo, es incontrolable pero puede medirse con una validación adecuada.

1.2 Determinación:

Se determina al aplicar el método a placebos cargados ya sea al 100% (mínimo 6 análisis). ó a diferentes concentraciones arriba y abajo de la concentración teórica, por el mismo analista y en las mismas condiciones de operación.

- 1. Tabular los resultados del porciento recuperado (R), con base al siguiente formato:

$$X_1, X_2, X_3, \dots, X_n$$

- 2. Cálculos preliminares:

$$\Sigma X = X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n$$

$$\Sigma X^2 = X_1^2 + X_2^2 + X_3^2 + \dots + X_n^2$$

Cálculo de la Media

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

Cálculo de la Desviación Estándar

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

3. Cálculos Finales:

a) Determinación de la tcalc

$$H_0: \bar{X} = \mu_0$$

$$H_a: \bar{X} \neq \mu_0$$

$$\mu_0 = 100\%$$

H₀ : Hipótesis NulaH_a : Hipótesis Alternativa

$$t_{\text{calc}} = \frac{\bar{X} - \mu_0}{DE/\sqrt{n}}$$

b) Determinación del Coeficiente de Variación

$$CV = (DE/\bar{X}) * 100$$

c) Intervalo de Confianza para la Media:

$$\bar{X} \pm t_{\text{tab}} \frac{DE}{\sqrt{n}}$$

t_{tab} = Valor de la t de Student con n-1 grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975

1.3 Criterios:

- a) Si $t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$ No se rechaza H₀
 Si $t_{\text{calc}} > t_{\text{tab}}$ Se rechaza H₀

- b) El Coeficiente de Variación debe cumplir con los criterios establecidos en la linealidad del método.

- c) El Intervalo de Confianza para la Media debe incluir el 100%

2) LINEALIDAD

2.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

2.1.1 Definición:

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

2.1.2 Determinación:

Se determina, construyendo una curva de calibración de la concentración contra la respuesta, de una misma solución patrón utilizando cuando menos 5 diluciones y haciendo análisis por duplicado para cada dilución.

El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método; para propósitos de control de calidad y de seguimiento de la estabilidad de un fármaco en una forma farmacéutica, deberá estar incluido el 100% de la dosis.

1. Tabular los resultados con base al siguiente formato:

I Concentración de la I dilución de la solución I patrón (X)		I I I	I Propiedad Medida (Y)	I I I
I	X	I	Y ₁₁ , Y ₁₂ , ..., Y _{1n}	I
I	1	I		I
I	X	I	Y ₂₁ , Y ₂₂ , ..., Y _{2n}	I
I	2	I		I
I	.	I	.	I
I	.	I	.	I
I	X	I	Y _{t1} , Y _{t2} , ..., Y _{tn}	I
I	t	I		I

t = Número de diluciones

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

2. Cálculos Preliminares:

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

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

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

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

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

3. Cálculos Finales:

PENDIENTE

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

ORDENADA AL ORIGEN

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

COEFICIENTE DE CORRELACION

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

2.1.3 Criterios:

PENDIENTE $m = 1$, ORDENADA AL ORIGEN $b = 0$,

COEFICIENTE DE DETERMINACION $r^2 = 0.98$

2.2 LINEALIDAD DEL METODO

2.2.1 Definición:

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

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

2.2.2 Determinación:

La linealidad puede evaluarse por ensayos de placebos cargados, cuando menos a 3 diferentes concentraciones alrededor del valor teórico que se va a analizar, haciendo los análisis por triplicado de cada concentración.

La amplitud del estudio dependerá del uso y aplicaciones del método (control de calidad y estabilidad) y preferentemente deberá llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

1. Tabular los resultados en base al siguiente formato:

I	Cantidad Adicionada (X)	I	Cantidad Recuperada (Y)	I
I	X	I	Y ₁₁ , Y ₁₂ , ..., Y _{1n}	I
I	1	I	11 12 ... 1n	I
I		I		I
I	X	I	Y ₂₁ , Y ₂₂ , ..., Y _{2n}	I
I	2	I	21 22 ... 2n	I
I		I		I
I	.	I	.	I
I	.	I	.	I
I	.	I	.	I
I	X	I	Y _{t1} Y _{t2} ... Y _{tn}	I
I	t	I	t1 t2 ... tn	I

t = Número de cantidades adicionadas.

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

2. Cálculos Preliminares:

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

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

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

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

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

Cálculo del Error Típico de Estimación

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{(\Sigma Y) - b(\Sigma X) - m(\Sigma XY)}{n}}$$

Cálculo del Error Típico de Estimación Modificado

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{n}{n-2}} * S_{y/x}$$

3. Cálculos Finales

a) PENDIENTE:

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

b) ORDENADA AL ORIGEN:

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

c) INFERENCIAS:

i) Inferencia de la Pendiente

$$\begin{aligned} H_0: m &= M & M_0 &= 1 \\ H_a: m &\neq M \end{aligned}$$

$$t_{\text{calc}} = \frac{(m - M_0) \text{DEX} \sqrt{n-1}}{\hat{S}_{y/x}}$$

Intervalo de Confianza:

$$m - t_{\text{tab}} \frac{\hat{S}_{y/x}}{\text{DEX} \sqrt{n-1}} < M < m + t_{\text{tab}} \frac{\hat{S}_{y/x}}{\text{DEX} \sqrt{n-1}}$$

t_{tab} = Valor de la t de Student, con n-2 grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975

ii) Inferencia de la Ordenada al Origen

$$\begin{aligned} H_0: b &= B & B_0 &= 0 \\ H_a: b &\neq B \end{aligned}$$

$$t_{\text{calc}} = \frac{b - B_0}{\hat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X}{n \sum (X - \bar{X})^2}}}$$

Intervalo de Confianza

$$b - t_{\text{tab}} \hat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X}{n \sum (X - \bar{X})^2}} < B < b + t_{\text{tab}} \hat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X}{n \sum (X - \bar{X})^2}}$$

t_{tab} = Valor de la t de Student, con $n-2$ grados de libertad y una probabilidad de 0.975

2.2.3 Criterios:

a) PENDIENTE $m = 1$

b) ORDENADA AL ORIGEN $b = 0$

c) INFERENCIAS:

i) Inferencia de la Pendiente

Si $t_{\text{tab}} > t_{\text{calc}} > t_{\text{tab}}$ Se rechaza H_0

Si $t_{\text{tab}} < t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$ No se rechaza H_0

El intervalo de confianza debe de incluir el valor de uno.

ii) Inferencia de la Ordenada al Origen

Si $t_{\text{tab}} > t_{\text{calc}} > t_{\text{tab}}$ Se rechaza H_0

Si $t_{\text{tab}} < t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$ No se rechaza H_0

El intervalo de confianza debe incluir el valor de cero.

3) PRECISION

La Precisión es una medida del grado de concordancia entre mediciones repetidas de una misma propiedad. El término puede expresarse como REPETIBILIDAD y como REPRODUCIBILIDAD.

3.1 REPETIBILIDAD

3.1.1 Definición:

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

3.1.2 Determinación:

Se determina por el análisis correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema.

1. Tabular los resultados

$$Y_1, Y_2, Y_3, \dots, Y_n$$

2. Cálculos Preliminares

$$\Sigma Y = Y_1 + Y_2 + Y_3 + \dots + Y_n$$

$$\Sigma Y^2 = Y_1^2 + Y_2^2 + Y_3^2 + \dots + Y_n^2$$

Cálculo de la Desviación Estándar

$$DE = \left[\frac{n \sum (Y) - (\sum Y)^2}{n(n-1)} \right]^{1/2}$$

Cálculo de la Media

$$\bar{Y} = \frac{DE}{n}$$

3. Cálculos Finales:

Determinación del Coeficiente de Variación

$$CV = \frac{DE}{\bar{Y}} * 100$$

3.1.3 Criterios:

El Coeficiente de Variación dependerá del tipo de método y de muestra, tomando en cuenta la forma farmacéutica y la concentración.

MÉTODOS	COEFICIENTE DE VARIACION
Químicos y Espectrofotométricos	< 3 %
Cromatográficos	< 2 %
Microbiológicos	< 5 %
Fluidos Biológicos	Dependerá de la cantidad mínima y máxima esperada.

3.2. REPRODUCIBILIDAD

3.2.1 Definición:

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

3.2.2 Determinación:

Se debe de llevar a cabo cuando menos por 2 analistas en 2 diferentes días y por triplicado cada una de las muestras. Trabajar de manera independiente partiendo de una muestra homogénea del producto cercana al 100% de la concentración teórica.

El procedimiento mas utilizado es el de 2 analistas, 2 días y 3 determinaciones. En base a esto se da el siguiente formato:

1. Tabular los resultados con base al siguiente formato:

		A N A L I S T A S	
		(i)	
		1	2
		Y	Y
		111	211
		Y	Y
D	1	112	212
		Y	Y
		113	213
I		-----	-----
		Y	Y
		11.	21.
A	(j)		
		Y	Y
		121	221
		Y	Y
		122	222
		Y	Y
		123	223
S	2	-----	-----
		Y	Y
		12.	22.
		-----	-----
		Y	Y
		1..	2..
			= Y...

2. Cálculos Preliminares:

$$Y_{...} = Y_{111} + \dots + Y_{113} + Y_{121} + \dots + Y_{123} + Y_{211} + \dots + Y_{213} + Y_{221} \\ + \dots + Y_{223}$$

$$Y = Y_{111} + \dots + Y_{113} + Y_{121} + \dots + Y_{123} + Y_{211} + \dots + Y_{213} + Y_{221} \\ + \dots + Y_{223}$$

3. Cálculos Finales:

Determinación del Coeficiente de Variación

$$CV = (DE/\bar{Y}) * 100$$

Si se desea determinar la reproducibilidad inter-analista, inter-día, es entonces necesario efectuar el siguiente procedimiento:

1. Cálculos Preliminares:

Determinación de la Suma de Cuadrados

$$SC_{analista} = \frac{Y_{1..} + Y_{2..}}{a c} - \frac{(Y_{...})}{a b c}$$

$$SC_{\text{dia}} = \frac{Y_{11.} + Y_{12.} + Y_{21.} + Y_{22.}}{c} - \frac{Y_{1.} + Y_{2.}}{bc}$$

$$SC_{\text{Error}} = Y_{ijk} - \frac{Y_{11.} + Y_{12.} + Y_{21.} + Y_{22.}}{c}$$

Donde:

- a = Número de Analistas
- b = Número de Dias
- c = Número de Determinaciones

3. Cálculos Finales:

Construcción de la Tabla de ANADEV A

TABLA DE ANADEV A (método Anidado)

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	S U M A DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	Fcalc	F
ANALISTA (i)	(a - 1)	SC analista	SCa/gla	MCa/MCd	Igla/gi
D I A (j)	(b-1)a	SC dia	SCd/gld	MCd/MCē	Igld/gj
ERROR	(c-1)sb	SC error	SCe/gle		

3.2.3 Criterios:

Si Fcalc \geq Ftab (0.975) No existe efecto que se deba al factor evaluado.

4) ESPECIFICIDAD

La especificidad es un término que indica que la respuesta analítica obtenida después de un ensayo, se debe única y exclusivamente a la sustancia que se desea determinar y no a otras sustancias que pudieran estar presentes en el material por analizar.

Las posibles interferencias pueden ser:

- Compuestos que están siempre presentes (excipientes, otros activos o sustancias semejantes al activo).
- Compuestos que se encuentran ocasionalmente (productos de degradación).
- Compuestos que no se encuentran con frecuencia (productos de degradación obtenidos en condiciones extremas)

La especificidad del método para estudios de estabilidad es un aspecto importante de los métodos analíticos para evaluar la estabilidad de un compuesto en su forma farmacéutica. Un método analítico debe demostrar su capacidad para separar el activo de aquellos productos de degradación que puedan interferir con el análisis.

Para evaluar la especificidad de un método analítico se pueden seguir los siguientes pasos:

- 1) Investigar el o los posibles productos de degradación del activo en cuestión y si es posible obtenerlos. Si se cuenta con ellos, probar el método en estos.
- 2) Probar el método con placebo del producto para asegurarse que no existe interferencia de los excipientes con el activo.
- 3) Someter el activo, placebo y formulación completa a condiciones de degradación suaves (ejemplo: luz solar, luz U.V., temperatura) y si no se encuentran degradantes a estas condiciones, entonces someter el activo, placebo y formulación a condiciones severas de degradación (hidrólisis ácida, hidrólisis básica, oxidación, etc)

Cuando se desarrolla una técnica analítica se requiere que la detección distinga eficazmente el producto de degradación del fármaco original; que tenga gran sensibilidad puesto que generalmente el porcentaje del fármaco degradado será bajo. Los métodos analíticos más utilizados para determinaciones de estabilidad son: cromatográficos, espectrofotométricos, microbiológicos.

Los métodos cromatográficos son muy utilizados para indicar estabilidad de medicamentos, los principales tipos de cromatografía son de capa delgada, de gases y de líquidos, los cuales muestran ser métodos muy precisos y específicos.

Los métodos espectrofotométricos más utilizados son los que son cuantificados en la región visible y ultravioleta. La espectroscopia infrarroja y de resonancia magnética nuclear son muy útiles para estos fines cuando el producto de degradación presenta un grupo funcional de señal intensa que no existía en el fármaco original.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA :

En la práctica farmacéutica industrial es necesario contar con métodos alternativos para la cuantificación de los principios activos y debido a esto, en la actualidad se han desarrollando métodos mucho más sensibles con la ayuda de aparatos e instrumentos que permiten obtener resultados más precisos, en menor tiempo de análisis, obteniendo también ventajas con respecto a los métodos tradicionales de análisis.

Para controlar adecuadamente los medicamentos que contienen cantidades pequeñas de principio activo se requiere de métodos analíticos sensibles, exactos y precisos capaces de detectar bajas concentraciones. Actualmente el método de elección es la cromatografía de líquidos la cual tiene una extensa variedad de aplicaciones, como son: los análisis de rutina en los laboratorios de control de calidad; el desarrollo de métodos específicos para llevar a cabo estudios de estabilidad o de biodisponibilidad durante la etapa de desarrollo de un nuevo medicamento e incluso tiene también aplicaciones fisicoquímicas como en la determinación de la constante de acidez de algunas sustancias.

El método de Control de Calidad utilizado normalmente para el análisis del Clorhidrato de Trihexifenidilo en tabletas, es una técnica que se basa en la formación estequiométrica de un complejo par-iónico entre la molécula de trihexifenidilo y el colorante púrpura de bromocresol en medio acuoso a un pH de 4.5, seguida de una extracción con cloroformo y posteriormente lectura al espectro. Los resultados de la validación del método demostraron que es exacto, preciso y lineal, sin embargo no es lo suficientemente sensible y específico como para poder ser utilizado en estudios de estabilidad.

Por lo tanto se propone el desarrollo de un método analítico específico utilizando la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, para la cuantificación del Trihexifenidilo en tabletas, el cual se comparará estadísticamente con el método anterior para determinar si son equiparables y conocer las ventajas y desventajas que presenta el uno del otro. Este estudio comparativo se realizó en una formulación de tabletas que contienen 5 mg de clorhidrato de trihexifenidilo.

IV. OBJETIVOS :

1) Desarrollar y validar un método para la cuantificación del Clorhidrato de Trihexifenidilo en tabletas por una técnica de Cromatografía de líquidos de alta resolución

2) Realizar la comparación estadística del método espectrofotométrico con respecto al desarrollado por CLAR.

V. HIPOTESIS :

Al realizar el estudio comparativo del método espectrofotométrico con respecto al de CLAR, se determinará que tan equiparables resultan ambos métodos y además dependiendo de las necesidades y recursos del laboratorio seleccionará el que más le convenga a éste, para la cuantificación del clorhidrato de trihexifenidilo en tabletas.

DETERMINACION DE CLORHIDRATO DE TRIHEXIFENIDILLO POR CLAR.

VI. MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS.

A. MATERIAL

- Matraces volumetricos 10 y 100 ml
- Pipetas volumétricas 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 ml
- Viales para cromatógrafo 4.0 ml
- Matraces erlenmeyer 25 ml
- Embudos de filtración de vidrio de tallo corto
- Papel filtro Whatman No 42

B. EQUIPO

- Cromatógrafo de líquidos de Alta Resolución equipado con:
 - + Bomba Waters modelo 510
 - + Inyector automático WISP Waters modelo 712
 - + Detector de longitud de onda variable Waters modelo 490
 - + Procesador de datos Waters modelo 745
- Columna Micro-Forasil de 10 micras, 30 cm de longitud por 3.9 mm de diámetro interno.
- Baño de ultrasonido Equipar modelo 8851
- Potenciómetro Beckman modelo 45
- Balanza analítica Mettler AE-100

C. REACTIVOS

Metanol	HPLC	Merck
Metanol	RA	Merck
Isopropanol	HPLC	Merck
Nitrato de Amonio	RA	Baker
Hidróxido de Sodio	RA	Baker
Clorhidrato de Ciproheptadina	sustancia de referencia	
Clorhidrato de Trihexifenidilo	sustancia de referencia	

VII. METODO

SOLUCIONES:

- Fase Móvil
Metanol:Isopropanol (70:30) con Nitrato de Amonio $2.5 \cdot 10^{-3}$ M
pH 7.5

Disolver 25 mg (por cada 100 ml de fase móvil) de nitrato de amonio en 70 ml de metanol, adicionarle 30 ml de isopropanol y llevar a pH de 7.5 con una solución 0.1 M de hidróxido de sodio en metanol. Filtrar a través de una membrana para solventes orgánicos millipore tipo FA 0.2 μ y desgasificar en el baño de ultrasonido durante 5 min.

- Solución de Estándar Interno

Pesar con exactitud alrededor de 5.5 mg de Clorhidrato de Ciproheptadina sustancia de referencia y transferir a un matraz volumétrico de 100 ml, disolver y llevar a volumen con metanol RA (concentración \pm 55 mcg/ml de Clorhidrato de Ciproheptadina)

- Solución Estándar de Clorhidrato de Trihexifenidilo

Pesar con exactitud alrededor de 20 mg de Clorhidrato de Trihexifenidilo estándar de referencia en un matraz volumétrico de 10 ml, disolver y llevar a volumen con metanol. Transferir una alícuota de 1 ml a un matraz volumétrico de 10 ml, adicionar 0.5 ml de la solución de estándar interno y llevar a volumen con metanol (concentración \pm 2.75 mcg/ml de Clorhidrato de Ciproheptadina y \pm 200 mcg/ml de Clorhidrato de Trihexifenidilo)

- Preparación de la Muestra

Determinar el peso promedio de 20 tabletas, pulverizarlas y homogenizar en un mortero. Pesar el equivalente a 2 mg de Clorhidrato de Trihexifenidilo y transferir a un matraz volumétrico de 10 ml, adicionar una alícuota de 0.5 ml del estándar interno, agregar 6 ml de metanol y ponerlo en el baño de ultrasonido durante 5 min, llevar a volumen con metanol y filtrar a través de papel whatman No 42 en un matraz erlenmeyer de 25 ml (concentración \pm 2.75 mcg/ml de Clorhidrato de Ciproheptadina y \pm 200 mcg/ml de Clorhidrato de Trihexifenidilo)

Transferir a los viales de inyección las soluciones estándar y las muestras, inyectando alternadamente al cromatógrafo de líquidos bajo las siguientes condiciones:

FASE MOVIL : Metanol:Isopropanol (70:30) con nitrato
 de amonio 2.5×10^{-2} M, pH 7.5
 LONGITUD DE ONDA : 254 nm
 SENSIBILIDAD : 0.01 AUFS
 VOLUMEN DE INYECCION : 40 μ l
 VELOCIDAD DE FLUJO : 1.0 ml/min
 VELOCIDAD DE CARTA : 0.25 cm/min
 ATENUACION : 32

CALCULOS

$$AR_{st} = \frac{\text{AREA DE TRIHEXIFENIDILO EN SOLUCION ESTANDAR}}{\text{AREA DE CIPROHEPTADINA EN SOLUCION ESTANDAR}}$$

$$AR_{mta} = \frac{\text{AREA DE TRIHEXIFENIDILO EN SOLUCION DE LA MUESTRA}}{\text{AREA DE CIPROHEPTADINA EN SOLUCION DE LA MUESTRA}}$$

$$\begin{array}{l} \text{mg de Clorhidrato de} \\ \text{Trihexifenidilo} \\ \hline \text{Tableta} \end{array} = \frac{AR_{mta} * P_{st} * P_p}{AR_{st} * P_{mta}}$$

Donde:

AR_{mta} = Area relativa de la muestra
 AR_{sr} = Area relativa del estándar
 P_{st} = Peso del estándar (mg)
 P_{mta} = Peso de la muestra (mg)
 P_p = Peso promedio (mg)

VIII. RESULTADOS

VALIDACION DEL METODO POR CLAR

LINEALIDAD DEL SISTEMA

Para evaluar la linealidad del sistema de medición se efectuó una curva de calibración de una misma solución patrón contando con 5 niveles diferentes cada una de ellos analizados por triplicado.

Las concentraciones empleadas son las mismas que se analizan en la linealidad del método. Con esto se obtuvieron los siguientes parámetros:

$$\begin{aligned} r &= 0.99911 \\ r^2 &= 0.9982 \\ m &= 0.99995 \\ b &= 2.06 \times 10^{-3} \end{aligned}$$

Por lo tanto la ecuación que describe la linealidad del sistema de medición es la siguiente:

$$Y = 2.06 \times 10^{-3} + 0.99995X$$

Para la evaluación de Exactitud y Linealidad del Método se analizaron 30 muestras que representaban los porcentajes de 40, 60, 80, 100 y 120% por sextuplicado, tomando como 100% la concentración final de 200 mcg/ml. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

TABLA No. 1 Resultados obtenidos para la evaluación de Exactitud y Linealidad del método.

I	mg adicionados	I	mg recuperados	I	% de recobro	I
I	0.8	I	0.8031	I	100.39	I
I	0.8	I	0.7956	I	99.45	I
I	0.8	I	0.8084	I	101.06	I
I	0.8	I	0.8011	I	100.14	I
I	0.8	I	0.7987	I	99.84	I
I	0.8	I	0.8016	I	100.20	I
I	1.2	I	1.1954	I	99.62	I
I	1.2	I	1.2009	I	100.08	I
I	1.2	I	1.2072	I	100.60	I
I	1.2	I	1.1986	I	99.89	I
I	1.2	I	1.2009	I	100.08	I
I	1.2	I	1.2038	I	100.32	I
I	1.6	I	1.6048	I	100.30	I
I	1.6	I	1.6096	I	100.60	I
I	1.6	I	1.6254	I	101.59	I
I	1.6	I	1.6148	I	100.93	I
I	1.6	I	1.6123	I	100.77	I
I	1.6	I	1.5929	I	99.56	I
I	2.0	I	2.0026	I	100.13	I
I	2.0	I	2.0020	I	100.10	I
I	2.0	I	1.9908	I	99.54	I
I	2.0	I	1.9988	I	99.94	I
I	2.0	I	1.9992	I	99.96	I
I	2.0	I	2.0066	I	100.33	I
I	2.4	I	2.3530	I	98.25	I
I	2.4	I	2.3829	I	99.29	I
I	2.4	I	2.3964	I	99.85	I
I	2.4	I	2.4002	I	100.01	I
I	2.4	I	2.4081	I	100.34	I
I	2.4	I	2.4429	I	101.79	I

EXACTITUD

n = 30
 DE = 0.6826
 \bar{X} = 100.20
 CV = 0.68%

H₀: $\mu = 100\%$
 H_a: $\mu \neq 100\%$ $\mu_0 = 100\%$

$$t_{\text{calc}} = \frac{100.20 - 100}{0.6826 / \sqrt{30}} = 1.64$$

$$t_{(29\text{gl}; 0.05)} = \pm 2.045$$

Area de Aceptación :

$$- 2.045 < 1.64 < 2.045$$

Intervalo de Confianza:

$$100.20 - (2.045) \frac{0.6826}{\sqrt{30}} < 100 < 100.20 + (2.045) \frac{0.6826}{\sqrt{30}}$$

$$99.9451 < 100 < 100.4548$$

LINEALIDAD DEL METODO

DATOS DE Y

$$\begin{aligned} \Sigma Y^2 &= 86.5740 \\ \Sigma Y &= 48.0644 \\ \Sigma DE &= 0.5744 \\ Y &= 1.6021 \\ \Sigma XY &= 86.4842 \end{aligned}$$

DATOS DE X

$$\begin{aligned} \Sigma X^2 &= 86.4 \\ \Sigma X &= 48.0 \\ \Sigma DE &= 0.5753 \\ X &= 1.6 \\ \Sigma (X_i - X)^2 &= 9.6 \end{aligned}$$

-Cálculo del Coeficiente de Correlación:

$$r = \sqrt{\frac{30(86.4842) - 48.0(48.0644)}{30(86.4) - (48.0)^2 \quad 30(86.5740) - (48.0644)^2}}$$

$$r = 0.99972$$

$$r^2 = 0.99944$$

- Cálculo de la Ordenada al Origen:

$$b = \frac{(48.0644)(86.4) - (48.0)(86.4842)}{30(86.4) - (48.0)} = 5.27 \cdot 10^{-3}$$

- Cálculo de la Pendiente:

$$m = \frac{30(86.4842) - (48.0)(48.0644)}{30(86.4) - (48.0)} = 0.9980$$

- Cálculo del Error Estándar de Regresión:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{(86.5740) - 5.2746 \cdot 10^{-3}(48.0644) - 0.9980(86.4842)}{30}}$$

$$S_{y/x} = 0.01332$$

- Cálculo del Error Estándar de Regresión Estimado:

$$\hat{S}_{y/x} = \sqrt{\frac{30}{28}} * (0.01332) = 0.01379$$

INFERENCIAS:

a) Ordenada al Origen:

$$H_0: b = E$$

$$R_0 = 0$$

$$H_a: b \neq E$$

$$t_{\text{calc}} = \frac{5.2746 \cdot 10^{-3} - 0}{0.01379 \sqrt{\frac{86.4}{30(9.6)}}} = 0.6982$$

$$t_{\text{tab}} = \pm 2.048$$

Área de Aceptación:

$$-2.048 < 0.6982 < 2.048$$

Intervalo de Confianza:

$$5.27 \cdot 10^{-3} - 2.048(0.1379) \sqrt{\frac{86.4}{30(9.6)}} < 0 < 5.2746 \cdot 10^{-3} + 2.048(0.1379) \sqrt{\frac{86.4}{30(9.6)}}$$

$$-0.0102 < 0 < 0.0207$$

b) Pendiente:

$$H_0: m = M$$

$$M = 1$$

$$H_a: m \neq M$$

$$t_{\text{calc}} = \frac{(0.998045 - 1) 0.5753 \sqrt{29}}{0.01379} = -0.4394$$

$$t_{\text{tab}} = \pm 2.048$$

Area de Aceptación:

$$-2.048 < -0.4394 < 2.048$$

Intervalo de Confianza:

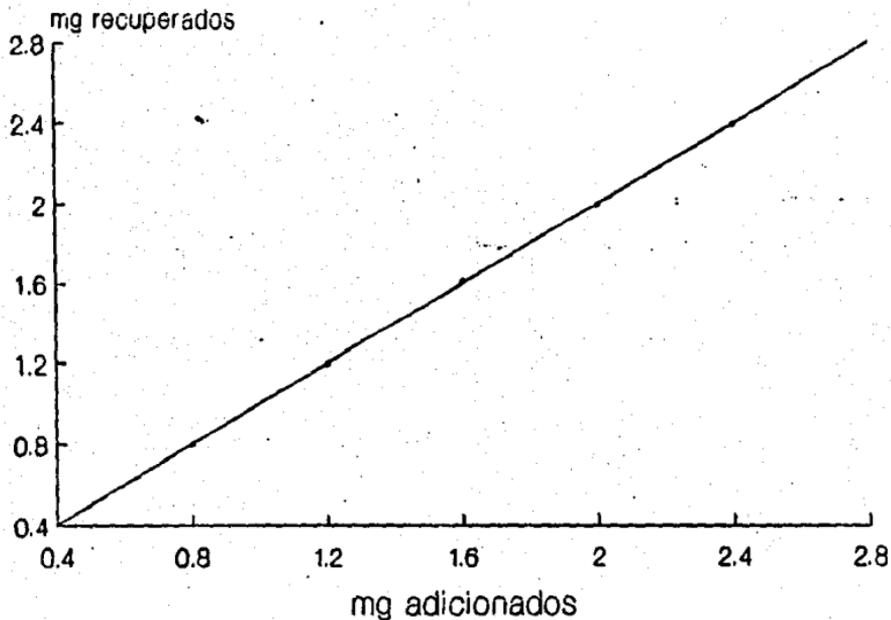
$$0.9980 - (2.048) \frac{0.01379}{0.5753 \sqrt{29}} < 1 < 0.9980 + (2.048) \frac{0.01379}{0.5753 \sqrt{29}}$$

$$0.9889 < 1 < 1.0072$$

Por lo tanto la ecuación que rige al método es:

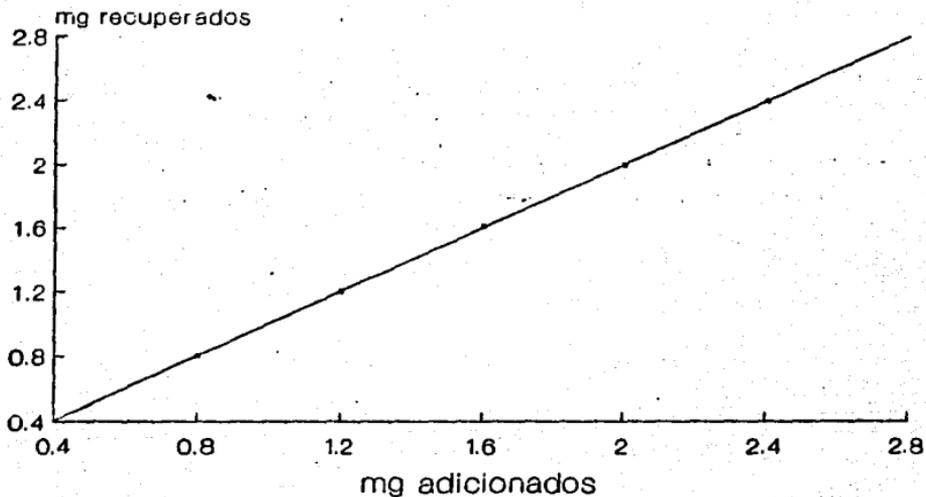
$$Y = 5.27 \cdot 10^{-3} + 0.9980X$$

GRAFICA DE LINEALIDAD PARA EL CORHIDRATO DE TRIHEXIFENIDILO



METODO POR CLAR

GRAFICA DE LINEALIDAD PARA EL CORHIDRATO DE TRIHEXIFENIDILO



METODO POR CLAR

PRECISION

a) REPRODUCIBILIDAD

A N A L I S T A S

		1	2
D		98.17	100.97
I	1	101.72	99.37
		99.93	102.08
A		101.57	99.27
S	2	100.24	99.75
		101.39	98.26

$n = 12$
 $\bar{X} = 100.22$
 $CV = 1.32\%$

TABLA DE ANADVA

I	FUENTE DE VARIACION	I	GRADOS DE LIBERTAD	I	SUMA DE CUADRADOS	I	MEDIA DE CUADRADOS	I	Fcalc	I	Ftab	I
I	ANALISTA	I	1	I	0.9219	I	0.9219	I	0.29	I	18.51	I
I	D I A	I	2	I	6.3203	I	63.1602	I	2.07	I	4.4	I
I	ERROR	I	8	I	12.209	I	1.5261	I		I		I

ESPECIFICIDAD

Para evaluar la especificidad del método se sometió materia prima, formulación y placebo a las siguientes condiciones:

MUESTRA	CONDICIONES	TIEMPO DE EXPOSICION
Materia prima	Luz	30
Formulación		
Placebo	Solar	días
Materia prima	Luz	30
Formulación		
Placebo	U. V.	días
Materia prima	Temperatura	30
Formulación		
Placebo	(80 C)	días
Materia prima	Acidas	5 horas
Formulación		2 horas
Placebo	Reflujo	5 horas
Materia prima	Básicas	5 horas
Formulación		2 horas
Placebo	Reflujo	5 horas
Materia prima		5 horas
Formulación	Oxidación	2 horas
Placebo		5 horas

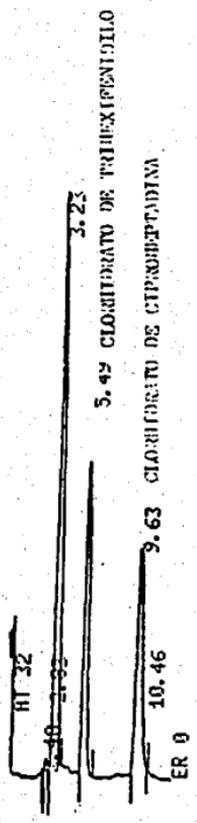
Las muestras obtenidas de las degradaciones se analizaron utilizando 2 métodos de cromatografía que fueron: por capa fina y de alta resolución. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

A) Cromatografía de Alta Resolución

El método utilizado fué el mismo ya descrito para la validación.

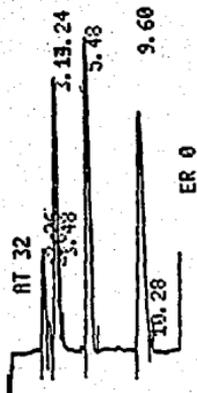
MUESTRA	CONDICIONES	APARIENCIA FISICA	% RECOBRO	FIG. No
Materia prima	Luz	Polvo blanco	99.06	1
Formulación		" amarillo	95.93	7
Placebo	Solar	" "	-----	13
Materia prima	Luz	Polvo blanco	93.16	2
Formulación		" amarillo	99.03	8
Placebo	U. V.	" "	-----	14
Materia prima	Temperatura	polvo crema	93.40	3
Formulación		" crema	95.07	9
Placebo		polvo cafe	-----	15
Materia prima	Acidas	Sol. transp.	90.47	4
Formulación		" c/ppI	77.00	10
Placebo	Reflujo	" "	-----	16
Materia prima	Basicas	Sol. transp.	85.91	5
Formulación		" c/ppI	96.62	11
Placebo	Reflujo	" "	-----	17
Materia prima	Oxidación	Sol. transp.	53.81	6
Formulación		" c/ppI	94.13	12
Placebo	Reflujo	" "	-----	18

A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos para estas muestras:



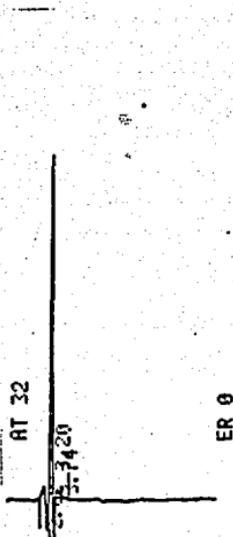
CROMATOGRAMA A

Cromatograma obtenido para la Muestra Estandar de Clorhidrato de Trihexifenidilo a condiciones normales.



CROMATOGRAMA B

Cromatograma obtenido para la muestra de la formulacion del Clorhidrato de Trihexifenidilo en condiciones normales.

**CROMATOGRAMA C**

Cromatograma obtenido para la Muestra del placebo de la formulacion del Clorhidrato de Trihexifenidilo en condiciones normales.

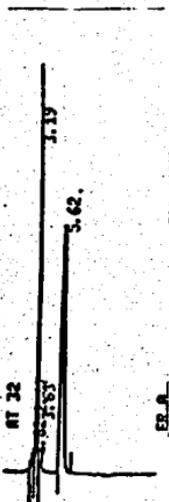


FIGURA No. 1
Cromatograma de la
degradación de materia
prima por luz Solar.

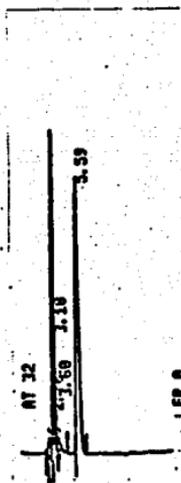


FIGURA No. 2
Cromatograma de la
degradación de materia
prima por luz U.V.

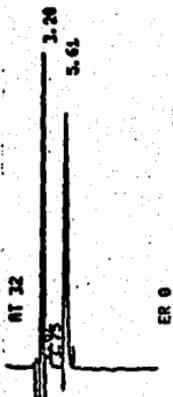


FIGURA No. 3
Cromatograma de la
degradación de materia
prima temperatura 80 C.

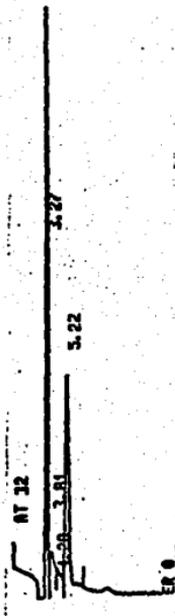


FIGURA No. 4
Cromatograma que muestra
la degradación de materia
prima en condiciones áci-
das.

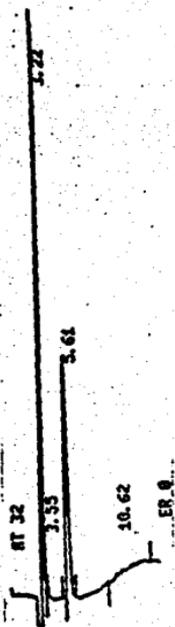


FIGURA No. 5
Cromatograma que muestra
la degradación de materia
prima en condiciones básic-
cas.

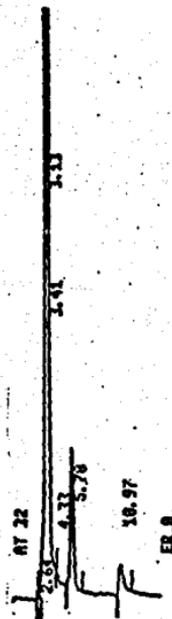


FIGURA No. 6
Cromatograma que muestra
la degradación de materia
prima en condiciones de
oxidación.

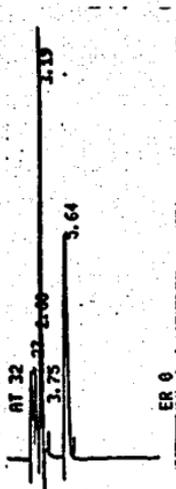


FIGURA No. 7
 Cromatograma que muestra
 la degradación de la for-
 mulación con luz Solar.

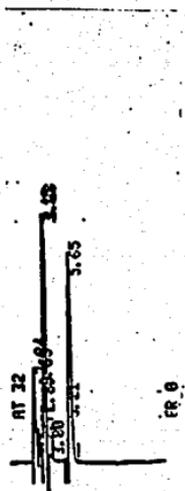


FIGURA No. 8
 Cromatograma que muestra
 la degradación de la for-
 mulación con luz U.V.

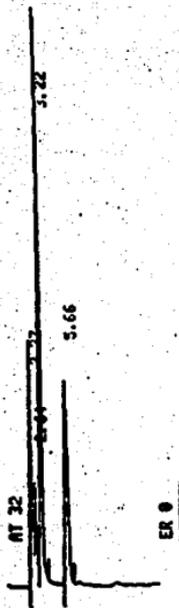


FIGURA No. 9
Cromatograma que muestra
la degradación de la for-
mulación a 80 C.

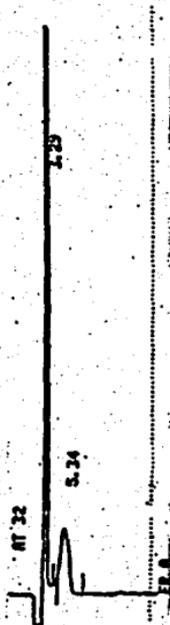


FIGURA No. 10
Cromatograma que muestra
la degradación de la for-
mulación en condiciones
ácidas.



FIGURA No. 11
Cromatograma que muestra
la degradación de la for-
mulación en condiciones
básicas.

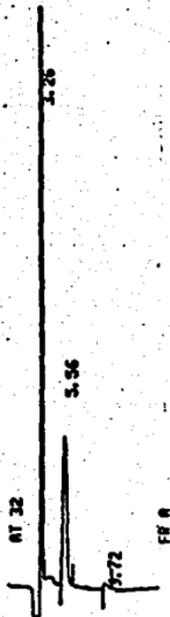


FIGURA No. 12
Cromatograma que muestra
la degradación de la for-
mulación en condiciones de
oxidación.

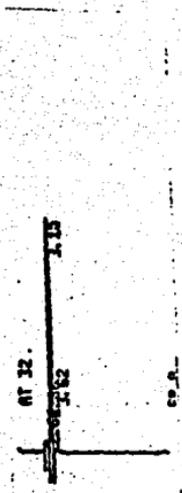


FIGURA No. 13
 Cromatograma que muestra
 el efecto de la Luz
 Solar en el placebo.



FIGURA No. 14
 Cromatograma que muestra
 el efecto de la Luz U.V.
 en el placebo.



FIGURA No. 15
 Cromatograma que muestra
 el efecto de la
 temperatura en el
 placebo.

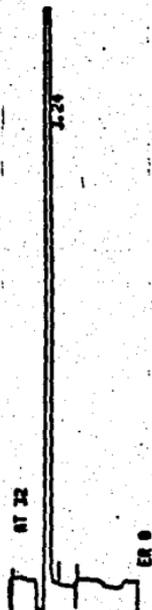


FIGURA No. 16
 Cromatograma que muestra
 el efecto del medio
 ácido en el placebo.

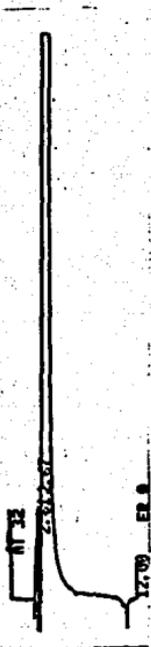


FIGURA No. 17
Cromatograma que muestra
el efecto del medio
básico en el placebo.

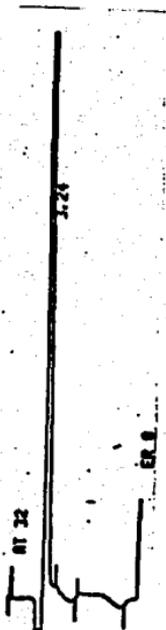


FIGURA No. 18
Cromatograma que muestra
el efecto de oxidación en
el placebo.

B) Cromatografía en Capa Fina

El método de cromatografía en capa fina se realizó en:

- Cromatoplasmas de silicagel 60F 254 de 20 * 20 cm, espesor de la capa 0.2 mm
- Eluyente: Cloroformo:Metanol (90:10)
- Voltmen de aplicación: 10 mcl
- Concentración de la muestra: 600 mcg/ml
- Revelador: Iodo

Se obtuvieron en la cromatoplasma manchas correspondientes al Clorhidrato de Trihexifenidilo con un Rf de 0.63. En la mayoría de las muestras se presentaba una mancha en el sitio de aplicación y solo para las muestras sometidas a condiciones de oxidación se presentaba una muy ligera mancha de degradación superior al Rf de la mancha principal.

Para asegurar que no existía algún compuesto de degradación que pudiera interferir con el análisis del trihexifenidilo, se realizó otra cromatografía en capa fina con una cromatoplasma de mayor espesor (0.25mm) y tomando en cuenta el Rf obtenido en las cromatoplasmas anteriores se rasparon por separado las manchas principales que contenían al trihexifenidilo y el resto de la sílica de cada carril en donde se encuentran los compuestos de degradación de una de las muestras, se reconstituyeron en metanol nuevamente y se inyectaron al sistema cromatográfico.

Los cromatogramas mas representativos se presentan a continuación:

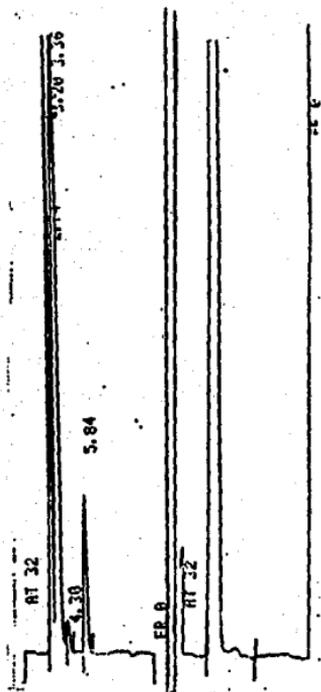


FIGURA No. 19

Cromatogramas obtenidos a partir de una muestra de materia prima degradada en condiciones ácidas. En la parte izquierda se localiza la mancha principal que contiene al trihexifenidilo y la parte derecha representa el resto de silica gel.

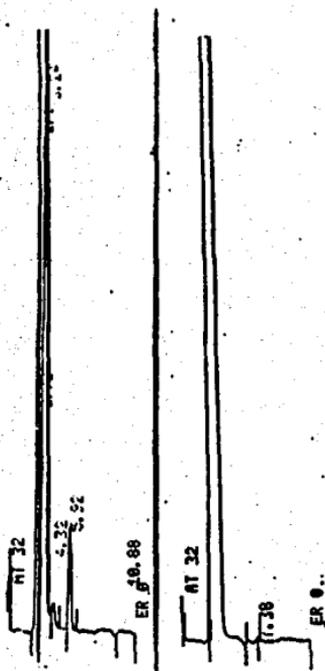


FIGURA No 20

Cromatogramas obtenidos a partir de una muestra de materia prima sometidas a condiciones básicas. En la parte izquierda se encuentra la mancha principal que contiene al trihexifenidilo y en la parte derecha se encuentran al resto de la silica gel.

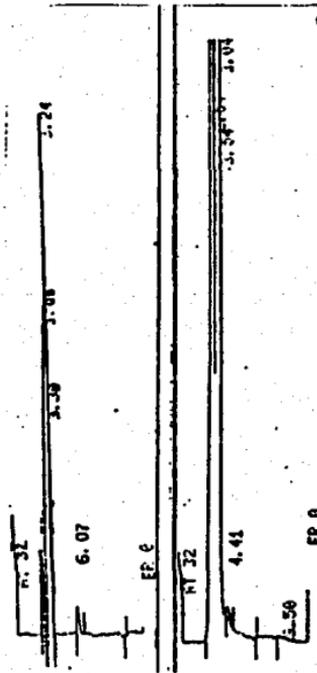


FIGURA No. 21

Cromatogramas que representan a una muestra de materia prima sometida a condiciones de oxidación. En la parte derecha se localiza el trihexifenidilo que pertenece a la mancha principal. En la parte derecha se pueden encontrar al resto de los degradantes.

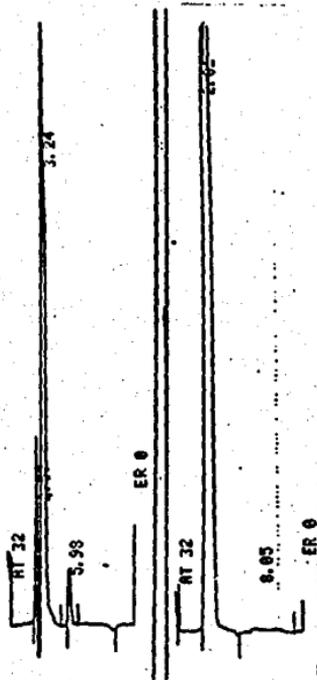


FIGURA No 22

Cromatogramas que se obtuvieron para una muestra de formulación sometida a condiciones ácidas. En la parte izquierda se localiza el trihexifenidilo que se encontraba en la mancha principal. En la parte derecha representa al resto de los degradantes.

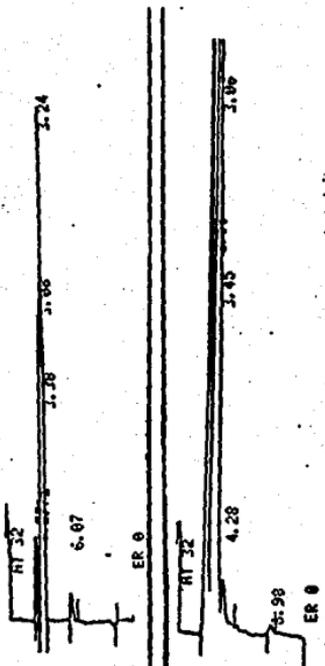


FIGURA No. 24

Cromatogramas que se obtuvieron de una muestra de la formulación sometida a condiciones de oxidación. En la parte izquierda se localiza al trihexifenidilo que se encontraba en la mancha principal y en la derecha el resto de los degradantes.

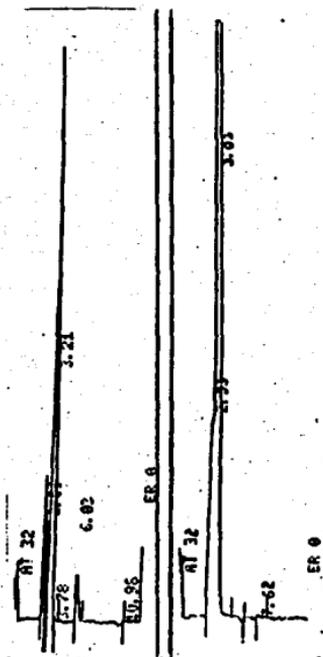


FIGURA No. 23

Cromatogramas que representan una muestra de la formulación sometida a condiciones básicas. En la parte izquierda se localiza el pico de trihexifenidilo que contenía la mancha principal de la cromatoplaça y la parte derecha representa al resto de degradantes.

VALIDACION DEL METODO ANALITICO POR FORMACION DE PAR IONICO PARA CUANTIFICAR CLORHIDRATO DE TRIHEXIFENIDILO EN TABLETAS.

A continuación se muestra la validación del método analítico que se emplea en los análisis rutinarios de Control de Calidad en el que como se explicó anteriormente dentro del planteamiento del problema es una técnica que se basa en la formación estequiométrica de un complejo par-iónico.

Para la evaluación de exactitud, precisión y linealidad se analizaron 15 muestras, los porcentajes que se utilizaron para la evaluación fueron: 80, 90, 100, 110 y 120% tomando como 100% la concentración final de 5.5 mcg/ml. Se pesaron diferentes cantidades de clorhidrato de trihexifenidilo y se hicieron las mismas diluciones para todas las muestras para obtener los porcentajes antes mencionados.

EXACTITUD

-
X = 100.28
DE = 1.75
n = 15

Ho: $\mu = 100\%$
Ha: $\mu \neq 100\%$

tcalc = 0.619
ttab = + 2.145

PRECISION

Xcalc = 19.055
Xtab = 23.685

Ho: = 1.5%
Ha: > 1.5%

LINEALIDAD DEL METODO

$$\begin{aligned}
 m &= 1.0074 \\
 b &= -0.254 \\
 r &= 0.9994 \\
 r^2 &= 0.9989
 \end{aligned}$$

i) Inferencias de la Ordenada al Origen (bo)

$$\begin{aligned}
 t_{\text{cal}} &= -0.0395
 \end{aligned}$$

$$H_0: b = B$$

$$B = 0$$

$$\begin{aligned}
 t_{\text{tab}} &= \pm 2.142
 \end{aligned}$$

$$H_a: b \neq B$$

ii) Inferencias de la Pendiente (mo)

$$\begin{aligned}
 t_{\text{cal}} &= 0.0649
 \end{aligned}$$

$$H_0: m = M$$

$$m_0 = 1$$

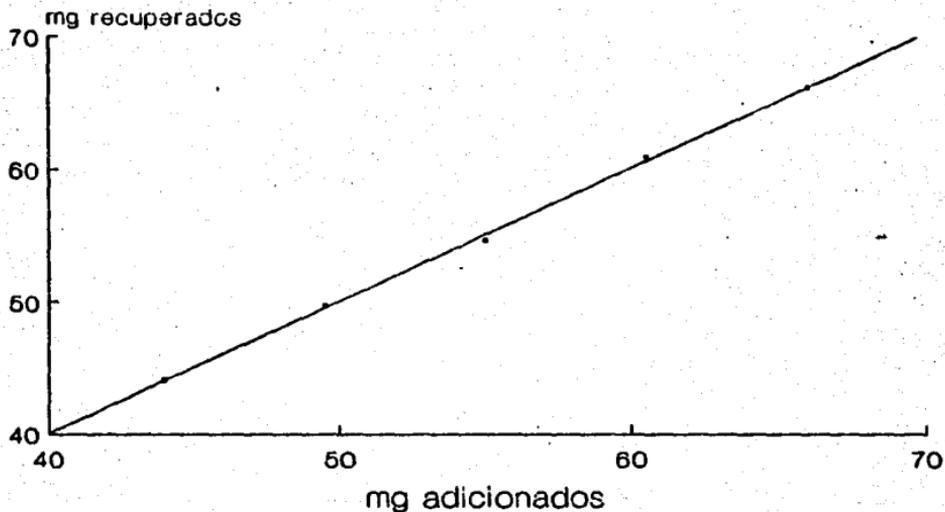
$$\begin{aligned}
 t_{\text{tab}} &= \pm 2.142
 \end{aligned}$$

$$H_a: m \neq M$$

Por lo tanto la ecuación que describe el método es la siguiente:

$$Y = -0.25 + 1.0074X$$

GRAFICA DE LINEALIDAD PARA EL CLORHIDRATO DE TRIHEXIFENIDILO



METODO POR FORMACION DE PAR IONICO

Comparación Estadística de los dos métodos

Para evaluar si ambos métodos analíticos que sirven para determinar clorhidrato de trihexifenidilo en una formulación de tabletas de 5 mg, son estadísticamente equivalentes se compararon los resultados obtenidos en ambos métodos:

Método No. 1: Formación Par-iónico
Método No. 2: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

REPETIBILIDAD

a). Tabla de comparación:

I	VARIABLES	I	METODO No. 1	I	METODO No. 2	I
I	n	I	15	I	30	I
I	\bar{X}	I	100.28	I	100.20	I
I	DE	I	1.75	I	0.6822	I

b). Contraste de Hipótesis

$$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$$

$$H_a: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$$

c). Estadígrafo de contraste

$$F_{calc} = \frac{DE_1^2}{DE_2^2} = \frac{(1.75)^2}{(0.6822)^2} = 6.572$$

d). Región crítica bilateral a nivel de significancia 0.025

$$F_{calc} > F_{\frac{\alpha}{2}}(n_1-1, n_2-1) \text{ y } F_{calc} < F_{\frac{\alpha}{2}}(n_2-1, n_1-1)$$

$$F(0.975); (14, 29) = 2.075 \text{ y } \frac{1}{F(0.025); (29, 14)} = 0.4932$$

Siendo : $0.4932 < 6.57 > 2.0275$, por lo tanto se rechaza H_0 , indicando que los métodos no tienen la misma repetibilidad.

EXACTITUD

Se selecciona el método II, ya que fue rechazada H_0 de la repetibilidad.

a). Tabla de Comparación:

I	VARIABLES	I	METODO No. 1	I	METODO No. 2	I
I	n	I	15	I	30	I
I	\bar{X}	I	100.28	I	100.20	I
I	DE	I	1.75	I	0.6826	I

b) Contraste de Hipótesis:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_2$$

c) Estadígrafo de Contraste:

$$t_{\text{calc}} = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{\sqrt{\frac{DE_1^2}{n_1} + \frac{DE_2^2}{n_2}}} = \frac{(100.28 - 100.20)}{\sqrt{\frac{(1.75)^2}{15} + \frac{(0.6826)^2}{30}}}$$

$$t_{\text{calc}} = 0.1706$$

- d) Región Crítica Bilateral a nivel de significancia 0.025 y con los siguientes grados de libertad:

$$g1 = \frac{\left[\frac{DE_1^2}{n_1} + \frac{DE_2^2}{n_2} \right]^2}{\frac{DE_1^2}{n_1} + \frac{DE_2^2}{n_2}} = \frac{\left[\frac{(1.75)^2}{15} + \frac{(0.6826)^2}{30} \right]^2}{\frac{(1.75)^2}{15} + \frac{(0.6826)^2}{30}} = \frac{\left[\frac{DE_1^2}{n_1} \right]^2 + \left[\frac{DE_2^2}{n_2} \right]^2}{\frac{DE_1^2}{n_1} + \frac{DE_2^2}{n_2}} = \frac{\frac{DE_1^2}{n_1 + 1} + \frac{DE_2^2}{n_2 + 2}}{\frac{DE_1^2}{n_1} + \frac{DE_2^2}{n_2}}$$

$$g1 = 82.077 \text{ Se aproxima a } 60$$

$$t_{calc} < t_{-\frac{\alpha}{2}, 60} \quad \text{y} \quad t_{calc} > t_{+\frac{\alpha}{2}, 60}$$

$$t_{(0.975), 60} = \pm 2.000$$

$$\text{Siendo:} \quad - 2.000 < 0.1706 < + 2.000$$

Por lo tanto se acepta H_0 , que indica que no existe diferencia significativa entre la exactitud de ambos métodos.

LINEALIDAD

a). Tabla de Comparación:

I	VARIABLES	I	METODO No. 1	I	METODO No. 2	I
I	n	I	15	I	30	I
I	b	I	- 0.25	I	5.27*10 ⁻³	I
I	m	I	1.0074	I	0.9980	I
I	Sy/x	I	1.1243	I	0.01379	I
I	(ΣX ²)	I	46282.5	I	86.4	I
I	ΣX	I	825	I	48	I

b) Contraste de Hipótesis:

$$H_0: m_1 = m_2$$

$$H_a: m_1 \neq m_2$$

c) Estadígrafo de Contraste:

$$t_{\text{calc}} = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{S_{y/x}(1) + S_{y/x}(2) \left[\frac{(\sum X_1)^2}{n_1} - \frac{(\sum X_2)^2}{n_2} \right]}}$$

$$\text{con } g_l = (n_1 - 2) + (n_2 - 2)$$

$$t_{\text{calc}} = \frac{1.0074 - 0.9950}{(1.1243 + 0.01379) \sqrt{\frac{(825)^2}{15} - \frac{(48)^2}{30}}}$$

$$t_{\text{calc}} = 0.02608$$

d) Región Crítica Bilateral a Nivel de Significancia 0.025

$$t_{\text{calc}} < t_{\frac{\alpha}{2}} \quad \text{y} \quad t_{\text{calc}} > t_{-\frac{\alpha}{2}}$$

$$- 2.021 < 0.02608 < + 2.021$$

Por lo tanto se acepta H_0 , indicando que no hay diferencia significativa entre las rectas de regresión.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA.**

IX. DISCUSION DE LOS RESULTADOS

1. La Evaluación estadística de la técnica desarrollada por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, demostró ser exacta, precisa, reproducible y lineal en el rango de concentraciones ensayadas

2. Especificidad

- El método desarrollado por CLAR, al igual que la técnica de Formación de Par Iónico, mostró ser capaz de separar, identificar y cuantificar al Clorhidrato de Trihexifenidilo sin que los demás componentes de la formulación interfirieran con el análisis.

- Con respecto a las condiciones de degradación aceleradas se puede observar que con Luz Solar, Luz U.V. y Temperatura no se encontraron cantidades significativas de los productos de degradación. Por lo que entonces para forzar a la formulación, materia prima y excipientes a la producción de grandes cantidades de productos de degradación fue necesario trabajar en condiciones exageradamente severas como son hidrólisis ácida, hidrólisis básica y oxidación; en las cuales a través de los porcentajes de recobro y cromatogramas se observa la producción de grandes cantidades de degradantes así como la buena resolución que ellos presentan con respecto al principio activo, pero en el medio de oxidación se observa que uno de los productos de degradación formado llega a interferir con la respuesta del estándar interno, sin embargo hay que tomar en cuenta que esta fue una condición que se forzó demasiado y que difícilmente podrá llegar a alcanzarse en los estudios de estabilidad de la formulación.

Con la ayuda del raspado de las manchas principales (principio activo) y degradantes obtenidos en la cromatografía de capa fina e inyección posterior al cromatógrafo se demostró que no existía interferencia alguna de los degradantes con el activo. Con lo que se apoya la especificidad del método.

3. De los resultados obtenidos por la comparación estadística de los métodos, se observa que existe una diferencia significativa entre ambos métodos, esto es obvio ya que el método por CLAR presenta mucha menor variabilidad en sus datos que el método por formación de par iónico. Sin embargo en el resto de los parámetros no hay diferencias entre los métodos por lo que se puede considerar que son estadísticamente equivalentes pero con repetibilidad diferentes.

X. CONCLUSIONES

En base a los resultados y discusión de los mismos obtenidos se puede concluir lo siguiente:

1. Ambos métodos sirven para cuantificar el Clorhidrato de Trihexifenidilo rutinariamente en los análisis de Control de Calidad.
2. El método desarrollado por Cromatografía de Líquidos de Alta Presión es Exacto, Preciso, Lineal, Reproducible y Específico.
3. Los dos métodos son estadísticamente equivalentes por lo que podrán ser usados indistintamente.
4. El método desarrollado por CLAR presenta ciertas ventajas con respecto al de formación de par iónico como: tiempos de análisis cortos, sencillez y facilidad de la técnica, mayor rapidez de preparación de las muestras, menor cantidad de reactivos empleados, y menor manipulación de la muestra. Sin embargo el uso de una u otra técnica dependerá de las fuentes y recursos con las que disponga el laboratorio para analizar dicho compuesto.
5. Por todo lo anterior y de acuerdo a los objetivos planteados es claro establecer que estos se cumplieron.

XII. BIBLIOGRAFIA

1. Remington's Pharmaceutical Sciences, 16 th edition. Mack Publishing Co. Easton Pennsylvania. 1980.
2. Martindale. The Extra pharmacopeia. 27 th edition. Ainhey Wode. The Pharmaceutical Press. London. 1976.
3. The United States Pharmacopeia XXI. Mack Publishing Co. Convection Inc. Rockville Md. 1985.
4. Merck Index. Ninth edition. Merck & Co. Rahway New Jersey. USA. 1976.
5. Goodman g. A., Goodman L. S. y Gilman A. "Las Bases Farmacologicas de la Terapeutica" 6a edicion. Panamericana. Mexico. 1982.
6. Meyers H.F., Jawetz E., Goldfren A. "Manual de Farmacologia Clinica. 3a edicion. El Manual Moderno. mexico. 1977.
7. Clarke E.G.C. "Isolation and identification of Drugs " The Pharmaceutical Press. London. 1975.
8. Dick J. G., "Analytical Chemistry" International Student Mc Graw-Hill Inc. Kogakusha. 1973.
9. Skoog D. A., West D. M. "Analisis Instrumental" Ed. Interamericana. Mexico.1975.
10. Connors K., "Textbook Pharmaceutical Analysis" 2nd edition. Wiley Interscience Publication. USA. 1975.
11. Siggia S. P., "Quantitative Organic Analysis" third Edition. John Wiley and Sons. New York. 1979.
12. Snyder L. R. & Kirkland J. J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography" 2o. edition. Wiley-Interscience. USA. 1979.
13. Pryde A., Gilbert M. T., "Applications of High Performance Liquid Chromatography" John Wiley & Sons. New York. 1978.
14. Kirkland J. J., "Modern Practice of Liquid Chromatography " . Wiley-Interscience. New York. 1971.yy
15. Parris N. A., "Instrumental Liquid Chromatography" J. of Chromatography.27. 2o. edition. Elsevier Science Publishers. New York. 1985.

16. Tsuji K., Morozowich W., "GLC and HPLC Determination of Therapeutic Agents" Chromatographic Science. New York USA 1978.
17. Wainer I. W., "Liquid Chromatography in Pharmaceutical Development " Aster Publishing Corporation. Washington D.C. USA. 1985.
18. Yost R. W., Etre L. S. and Conlon R. D., "Introduccion a la Cromatografia Liquida Practica" Perkin-Elmer. USA. 1980.
19. Esquivel B., Harol M., "Cromatografia Liquida de Alta Presion" Secretaria General de la OEA. Segunda edicion. USA. 1980.
20. Michaelis A. F., Cornish D. W. and Vivilecchia R., " High Pressure Liquid Chromatography " J. of Pharmaceutical Sciences. 62. (9). September. 1973. 1399-1416.
21. Howard B. Christensen, "Estadistica Paso a Paso" Trillas. 1a. edicion. Mexico. 1983.
22. Daniel L. W., "Bioestadistica, Base para el Analisis de la Ciencias de la Salud" Limusa. Mexico. 1979.
23. McKinnon J. J., Flanagan R. J., " High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Basic Drugs on Silica Columns using non-aqueous ionic eluents" J. of Chromatography. 323. 1985. 195-225.
24. Inman E. L., Fishman J. K., et al "General Method Validation Guidelines for Pharmaceutical Samples" J. of Chromatography Science. 25. June. 1987. 252-256.
25. Sheinin E. B. "Laboratory Evaluation of Proposed NDA Analytical Methodology" Pharmaceutical Technology. September. 1986. 82-86.
26. Guerra J., Finkelson M. J. " Validation of Analytical Methods by FDA Laboratories" Pharmaceutical Technology. March. 1986. 74-84.
27. Cavenaghi L., Gallo G. G., Ledi G. M. "Statistical Evaluation of the Results Obtained with the Analytical Methods Used for the Quality Control of Medicines" Drug Development and Industrial Pharmacy. 13. (14). 1987. 2571-2615.
28. Taylor J. K. "Validation of Analytical Methods Analytical Chemistry" 55. (6). 1983. 601A-608A.
29. The United States Pharmacopeia Convection Inc. "Current Concepts for the Validation of Compendial Assays" Pharmacopeial Forum. Stimuli to the Revision Process. May-Ago. 1986. 1241-1245.

30. Berry I. R. "Process Validation: Practical Applications to Pharmaceutical Products" Drug Development and Industrial Pharmacy 14. (283). 1988. 377-389.
31. Curso Validacion de Metodos Analiticos. SEBIOFAR AP. Instructor QFB Alejandro Alcantara Pineda. 1988.