

49/20

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"ZARAGOZA"



DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO POR  
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA  
RESOLUCION (CLAR) PARA PROTERCICLINA.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
EDITH VENEGAS DOTOR



## **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.

## CONTENIDO .

1. Introducción .
2. Monografía .
  - 2.1. Nombre genérico .
  - 2.2. Nombre químico .
  - 2.3. Fórmula estructural .
  - 2.4. Fórmula empírica .
  - 2.5. Propiedades fisicoquímicas .
    - 2.5.1. Peso molecular .
    - 2.5.2. Descripción .
    - 2.5.3. Solubilidad .
    - 2.5.4. Humedad .
    - 2.5.5. pH .
    - 2.5.6. Ensayo .
  - 2.6. Propiedades farmacológicas .
    - 2.6.1. Toxicidad .
    - 2.6.2. Pirógenos .
    - 2.6.3. Esterilidad .
    - 2.6.4. Sustancias de tipo histamínico.
    - 2.6.5. Concentración mínima inhibitoria .

3. Antecedentes de la Cromatografía .
  - 3.1. Definición general de la cromatografía .
  - 3.2. Clasificación general de la cromatografía.
  
4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución ( CLAR ) .
  - 4.1. Definición de CLAR .
  - 4.2. Métodos de CLAR .
    - 4.2.1. Cromatografía líquido-líquido ( Partición ) .
    - 4.2.2. Cromatografía líquido-sólido ( Adsorción ) .
    - 4.2.3. Cromatografía de exclusión .
    - 4.2.4. Cromatografía de intercambio iónico .
  - 4.3. Proceso cromatográfico .
    - 4.3.1. La Migración Diferencial .
    - 4.3.2. La Propagación Molecular .
  - 4.4. Definiciones Básicas .
    - 4.4.1. Volúmen de Retención (  $V_R$  ) .
    - 4.4.2. Tiempo de Retención (  $t_R$  ) .
    - 4.4.3. Factor de Capacidad (  $K'$  ) .
    - 4.4.4. Número de Platos Teóricos (  $N$  ) .
    - 4.4.5. Factor de Selectividad o Factor de Separación (  $\alpha$  ) .
    - 4.4.6. Resolución (  $R_s$  ) .

4.5. Instrumentación .

4.5.1. Partes fundamentales de un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución .

4.5.2. Características básicas de los componentes de un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución .

5. Análisis Cuantitativo .

5.1. Métodos de medición de la banda cromatográfica .

5.1.1. Altura de la banda cromatográfica .

5.1.2. Area de la banda cromatográfica .

5.2. Métodos de calibración .

5.2.1. Método de estándar interno .

5.2.2. Método de estándar externo .

6. Validación Estadística de Métodos Analíticos .

6.1. Generalidades .

6.2. Tipos de errores .

6.2.1. Error sistemático o determinante .

6.2.2. Error aleatorio o indeterminante .

6.3. Definiciones Básicas en la Validación de Métodos Analíticos .

6.3.1. Exactitud .

- 6.3.2. Precisión .
- 6.3.3. Repetibilidad .
- 6.3.4. Reproducibilidad .
- 6.3.5. Linearidad .
- 6.3.6. Especificidad .
- 6.3.7. Sensibilidad .

7. Parte Experimental .

- 7.1. Equipo .
- 7.2. Material .
- 7.3. Reactivos .
- 7.4. Método .
  - 7.4.1. Preparación de la solución de referencia .
  - 7.4.2. Preparación de la solución muestra .
  - 7.4.3. Determinación de Succinato de cloranfenicol ( CAF ) y Pirrolidin-metil-tetraciclina ( PMT ) por CLAR .
  - 7.4.4. Forma de cálculo .
- 7.5. Validación Estadística .
  - 7.5.1. Especificidad .
  - 7.5.2. Exactitud, repetibilidad y linealidad ( PMT ).
  - 7.5.3. Reproducibilidad ( PMT ).
  - 7.5.4. Exactitud, repetibilidad y linealidad ( CAF ).

7.5.5. Reproducibilidad ( CAF ) .

8. Resultados .

8.1. Especificidad .

8.2. Evaluación estadística ( PMT ) .

8.2.1. Exactitud ( PMT ) .

8.2.2. Repetibilidad ( PMT ) .

8.2.3. Linealidad ( PMT ) .

8.2.3.1. Inferencias acerca de a  
( intercepto a la ordenada ) .

8.2.3.2. Inferencias acerca de b  
( pendiente ) .

8.2.4. Reproducibilidad ( PMT ) .

8.3. Evaluación estadística ( CAF ) .

8.3.1. Exactitud ( CAF ) .

8.3.2. Repetibilidad ( CAF ) .

8.3.3. Linealidad ( CAF ) .

8.3.3.1. Inferencias acerca de a  
( intercepto a la ordenada ) .

8.3.3.2. Inferencias acerca de b  
( pendiente ) .

8.3.4. Reproducibilidad ( CAF ) .

9. Conclusiones .
10. Bibliografía .
11. Apéndices de fórmulas aplicadas a la evaluación estadística .
  - 11.1. Apéndice I ( Exactitud ) .
  - 11.2. Apéndice II ( Repetibilidad ) .
  - 11.3. Apéndice III ( Linearidad ) .
  - 11.4. Apéndice IV ( Reproducibilidad ) .



## 1. INTRODUCCION.

En los últimos años se han introducido a la terapéutica numerosas asociaciones de antibióticos con resultados muy variables, y en algunos casos hasta negativos. ( 1 )

Sin embargo, algunas asociaciones, por las características de los componentes, alcanzan a prevenir la selección de cepas bacterianas resistentes y amplían el espectro antibacteriano de los antibióticos que la constituyen.

Una asociación antibiótica se puede considerar como realmente ventajosa en terapéutica, cuando su eficacia es mayor y su toxicidad menor respecto a los componentes administrados por separado.

Partiendo de lo anterior, y de la consabida limitación en el empleo por vía parenteral de antibióticos de amplio espectro del grupo de las tetraciclinas, existen formulaciones, en las que el componente tetraciclina está ligado a otro antibiótico, un ejemplo de este tipo; es la Proterciclina que es una combinación equimolecular obtenida mediante la salificación de Succinato de Cloranfenicol ( CAF ) y la Pirrolidín-metil-tetraciclina ( PMT ). Las dos sustancias están unidas entre sí con una ligadura salina y según una relación estequiométrica constante. ( 2 )

Actualmente la Proterciclina, se analiza por medio de un mé-

todo espectrofotométrico, en el que se hacen lecturas a dos longitudes de onda, estas son : 357.5 nm que es el máximo correspondiente a la Pirrolidín-metil-tetraciclina (PMT) y 273 nm que es el máximo correspondiente a Succinato de Cloranfenicol (CAF), pero a esta longitud de onda existe interferencia por parte de la PMT.

Este método no se puede considerar específico, debido a que el CAF por hidrólisis pasa a Cloranfenicol Levógiro (3), el que también posee el grupo p-nitrofenilo y es a este grupo al que se le deben las propiedades espectrofotométricas.

Considerando lo anterior, y sabiendo que la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), es una técnica de separación, identificación y cuantificación muy versátil, en este trabajo se desarrolló y validó estadísticamente un Método Analítico por CLAR para la separación, identificación y cuantificación de cada uno de los componentes de la Protetraciclina.

2. MONOGRAFIA .

2.1. Nombre Genérico :

Proterciclina (4) .

2.2. Nombre Químico :

Acido succínico  $\alpha$  - ester con  
 D (-) treo 2,2-dicloro-N ( $\beta$ -hi-  
 droxi-  $\alpha$  -(hidroximetil)-p-ni-  
 trofenil) - acetamida compues-  
 to con 4-(dimetil amino)-1, 4, 4a,  
 5, 5a, 6, 11, 12a-octahidro-3, 6, 10,  
 12, 12a-pentahidroxi-6-metil-1,  
 11-dioxo-N-(1-pirrolidinmetil)-  
 2-naftacencarboxamida. (4)

2.3. Fórmula Estructural :

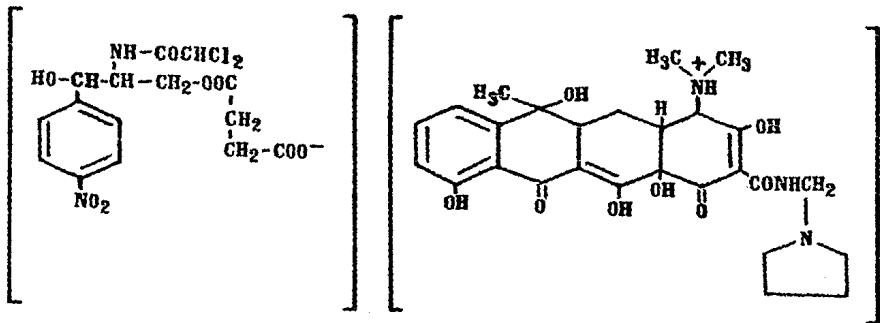


Figura No. 1

2.4. Fórmula Empírica :  $C_{42} H_{49} O_{16} N_5 Cl_2$  (4).

2.5. Propiedades Fisicoquímicas.

2.5.1. Peso Molecular : 950.30 (4).

2.5.2. Descripción : Polvo amarillo claro brillante , sabor amargo, olor característico, se descompone entre 140° y 144° C produciéndose una coloración café, es también descompuesto por la luz (4).

2.5.3. Solubilidad : Muy soluble en agua; poco soluble en alcohol; prácticamente insoluble en éter, ligroína y hexano (4).

2.5.4. Humedad : No debe ser mayor del 3% calculado por Karl-Fisher (4).

2.5.5. pH : Una solución al 1% esta entre 5.5 y 7.5 (4).

2.5.6. Ensayo : Por el método espectrofotométrico ( 5 ). Contiene entre el 90% - 110% de Pirrolidin-metil-tetraciclina (PMT) y de Succinato de Cloranfenicol (CAF) sobre producto seco.

## 2.6. Propiedades Farmacológicas .

2.6.1. Toxicidad : DL 50 : 126 mg / kg. de peso corporal. Técnica de M. Giorgi - A. Sardi ( 6 ).

2.6.2. Pirógenos : Ningún conejo debe presentar aumento de temperatura de más de 0.6 °C y la suma total de los aumentos de temperatura de tres conejos no debe ser mayor de 1.4 °C ( 4 ).

2.6.3. Esterilidad : Debe ser estéril , método utilizado Filtración por Membrana ( 4 ).

2.6.4. Sustancias de Tipo

Histamínico :

El problema es satisfactorio -  
si el efecto hipotensivo de éste  
no es mayor que el efecto hipog-  
tensivo obtenido con 0.1 mcg.  
de Histamina base por kg. de  
peso ( 4 ).

2.6.5. Concentración Mínima

Inhibitoria :

Según técnica ( 6 ) ; Cepa u-  
tilizada : Sarcina lutea ; con-  
centración : 0,225 mcg./ml.

### 3. ANTECEDENTES DE LA CROMATOGRAFIA.

La Cromatografía es una técnica que el hombre ha utilizado - desde años atrás, I. Smith ( 7 ), comenta que Plinio el viejo menciona una técnica que se podría llamar " Cromatografía en Papiro " empleando papiro, describe como los pigmentos de una tintura pueden separarse, extendiéndola en solución sobre papiro.

Pero fué hasta el siglo XIX cuando la Cromatografía empezó - realmente a desarrollarse, en el año de 1850 F.F. Runge comprueba que los cationes inorgánicos, se separan por migración diferencial sobre papel, es entonces cuando se puede decir que nace la Cromatografía en Papel , la cual se desarrolla durante la década de los años 40's. En el año de 1900 D.T. Day en el primer congreso del petróleo, comunicó, que al pasar el petróleo por un lecho de tierras adsorbentes, el líquido resultante presenta distinta composición que el líquido inicial, siendo esta la primera información de Cromatografía en Columna. Posteriormente en el año de 1903 Tswett utilizó - la Cromatografía en Columna para separar extractos vegetales coloreados, de lo cual parece ser que derivó el término " Cromatografía " . ( 8 )

En el año de 1941, cuando Martin y Synge esbozan la idea de Cromatografía de Gases , esta técnica se empieza a desarrollar -

teórica y prácticamente y se aplica a la investigación de muchas especies orgánicas e inorgánicas, lograndose un avance vertiginoso durante los años 50's y principios de los años 60's .

Antes del año de 1967, las separaciones cromatográficas en columna no se habían desarrollado en forma óptima, por esta razón la técnica se había visto como lenta e ineficiente ( 9 , 10 ), pero a mediados del año de 1968 y principios de 1969 la Cromatografía en Columna sufrió cambios dramáticos, al grado que se volvió un rival de la Cromatografía de Gases.

Los cambios que sufrió la Cromatografía Líquida en Columna se debieron al gran desarrollo técnico ( 11 , 12 , 13 , 14 , 15 , 16 y 17 ), así como por el avance técnico en el tipo de material de empaque de las columnas cromatográficas ( 18 , 19 , 20 y 21 ), por el uso de detectores como el fotómetro de U.V. , el detector de fluorescencia, detector de ionización de flama, detectores polarográficos, detectores radioactivos, de índice de refracción, etc., y por el uso de varios tipos de bombas. ( 22 )

Hoy en día la técnica que vino a revolucionar es llamada Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución ( CLAR ).

Ambas, Cromatografía de Gases y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución son este tiempo dos técnicas eficientes y rápidas. Sin embargo, muchas muestras simplemente no se pueden analizar por Cromatografía de Gases, debido a que no son lo sufi --



cientemente volátiles y no pueden pasar a través de la columna ó son térmicamente inestables y descomponen bajo las condiciones de operación. De acuerdo a lo anterior se observan ciertas ventajas de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) sobre la Cromatografía de Gases, debido a que en CLAR las dos fases cromatográficas (fase móvil y fase estacionaria) se seleccionan de acuerdo a las propiedades de la muestra, ya que existe una gran variedad de tipos de material de empaque y con respecto a la fase móvil se pueden seleccionar varios solventes adecuados ó mezclas de estos, por otro lado las temperaturas de operación son relativamente bajas.

Debido al gran desarrollo técnico y teórico que ha sufrido la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), esta técnica ha logrado una importancia amplia en la Industria Farmacéutica, Alimenticia y Petroquímica en los últimos años.

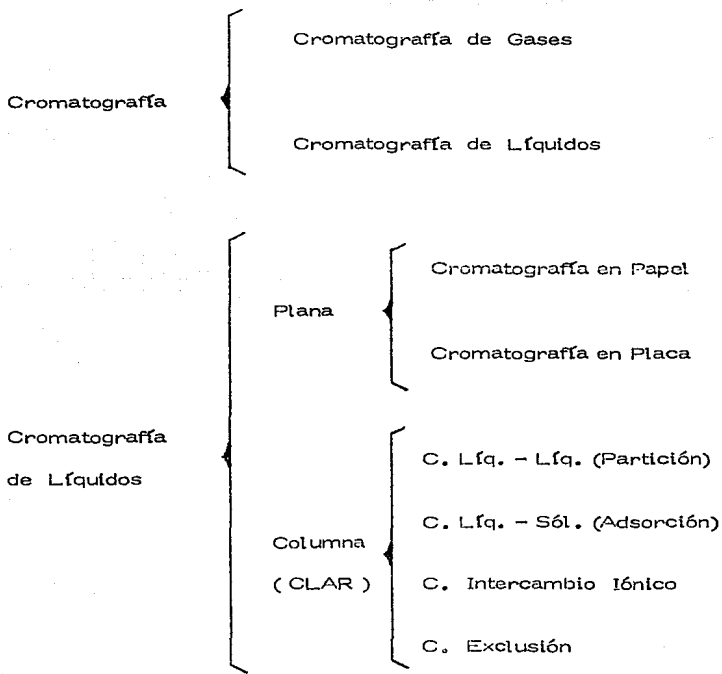
Existe un gran número de trabajos reportados que se han desarrollado por CLAR con resultados favorables (23), siendo hoy en día la técnica que presenta mayor versatilidad.

### 3.1. DEFINICION GENERAL DE LA CROMATOGRAFIA.

" La Cromatografía es un método físico de separación en el que los componentes a desglosar se distribuyen entre dos fases, una

de las cuales constituye un lecho estacionario de gran desarrollo superficial y la otra es un fluido que pasa a través o a lo largo del lecho estacionario " . ( 24 )

### 3.2. CLASIFICACION GENERAL DE LA CROMATOGRAFIA.



#### 4. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION ( CLAR )

##### 4.1. DEFINICION DE CLAR.

" La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) es una técnica de separación, identificación y cuantificación en la que - los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una fase estacionaria que esta formada por partículas de diámetro pequeño y una fase móvil que es un líquido ó mezcla de líquidos, la que es impulsada hacia la fase estacionaria por medio de altas presiones ".

##### 4.2. METODOS DE CLAR.

###### 4.2.1. CROMATOGRAFIA LIQUIDO - LIQUIDO ( PARTICION ).

En 1941 Martin y Synge describen una nueva técnica de separación : Cromatografía Líquido - Líquido, también llamada Cromatografía de Partición.

En la Cromatografía Líquido - Líquido (CLL), las moléculas -

de la muestra, se distribuyen entre dos líquidos inmiscibles de acuerdo a solubilidades relativas. Un líquido es la fase móvil; el otro líquido ( fase estacionaria ) es dispersado sobre un soporte muy fino e inerte. Existen dos tipos de CLL , basados sobre las polaridades relativas de la fase móvil y la fase estacionaria :

1. CLL en fase normal.

El soporte, es cubierto con una fase estacionaria polar, y la fase móvil es un solvente relativamente no polar.

2. CLL en fase reversa.

El soporte, es cubierto con una fase estacionaria menos polar, y la fase móvil es un solvente polar.

#### 4.2.2. CROMATOGRAFIA LIQUIDO - SOLIDO ( ADSORCION ),

La Cromatografía Líquido - Sólido ( CLS ), es el método más antiguo de la Cromatografía Líquida , fué desarrollado por Tswett - en una columna abierta, posteriormente en los años 50's Kirchner introduce la Cromatografía en Capa Fina , la cual ha perdido fuerza frente a la Cromatografía Líquida en Columna moderna ( CLAR ) debido a ciertas limitaciones que presenta, tales como el tiempo, el uso de sustancias oxidantes tóxicas usadas como reveladores, además, de

la versatilidad que presenta la CLS moderna. Por otro lado, ambas son ampliamente usadas, la Cromatografía en Capa Fina - por su parte se utiliza para una primera exploración y los valores de  $R_f$  obtenidos, se pueden usar para predecir los valores de factor de capacidad ( $K'$ ), en CLS, utilizando el mismo sistema cromatográfico.

El fundamento de la selectividad en CLS, puede expresarse en términos de Adsorción, entendiéndose como Adsorción, el fenómeno en el cual el componente retenido queda en la superficie interfacial.

El proceso de Adsorción en CLS, puede explicarse como sigue:

1. La retención de un soluto  $X$ , en CLS requiere del desplazamiento de un número equivalente de moléculas del solvente (E) adsorbidas (fig. no. 2).

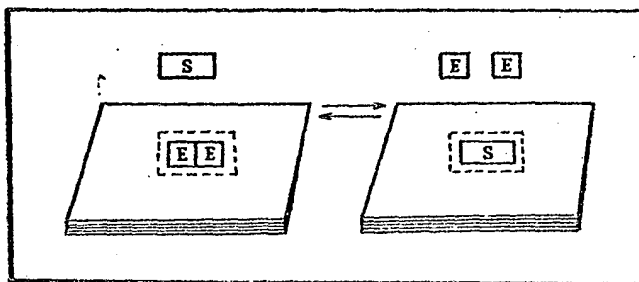


Figura No. 2

2. Supongase que se tiene una molécula de muestra, con grupos no polares de hidrocarburos, la molécula es débilmente atraída por la superficie adsorbente polar, por otra parte muchos solventes tienden a desplazar tales grupos no polares de la superficie; por lo que este tipo de moléculas contribuyen poco a la retención .  
( fig. no. 3 ) .

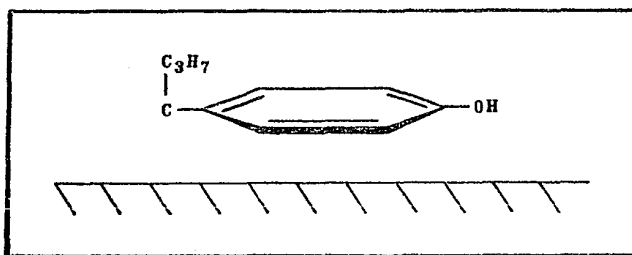


Figura No. 3

3. Otra característica, es la presencia de sitios discretos de adsorción, sobre la superficie adsorbente. La interacción óptima entre moléculas de soluto y la superficie de adsorción, ocurre - cuando los grupos funcionales del soluto se sobreponen a estos - sitios de adsorción. La sobreposición es fácil para solutos monofuncionales, pero para solutos polifuncionales puede ser - que sea más difícil, sin embargo, muchos solutos polifunciona- les pueden sobreponerse más sobre la superficie adsorbente, re

sultando una retención preferencial . ( fig. no. 4 )

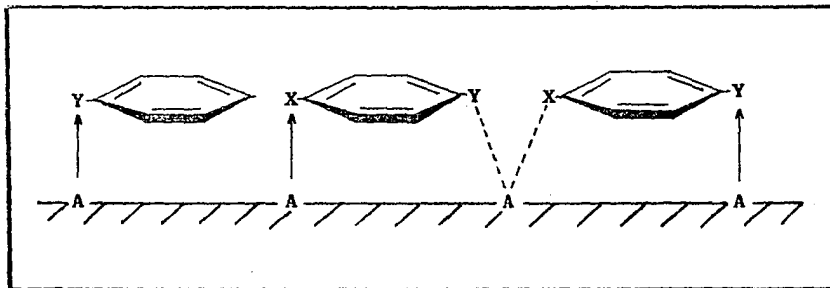


Figura No. 4

#### 4.2.3. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION .

La Cromatografía de Exclusión de Tamaño, es también llamada Cromatografía de Gel, Filtración en Gel, o Cromatografía de Permeación en Gel . Se utiliza principalmente para separar compuestos de alto peso molecular (  $PM \geq 2000$  ) particularmente no iónicos. Por medio de este método se separan las moléculas de acuer

do a su tamaño efectivo en solución, utilizando una columna con el tamaño de poro adecuado. La retención ocurre cuando moléculas pequeñas, entran en el poro y moléculas grandes se mueven a través de la columna y aparecen primero en el cromatograma.

El método es ampliamente usado para obtener distribuciones de peso molecular de polímeros sintéticos. Sin embargo, macromoléculas individuales como proteínas y ácidos nucleicos han sido bien separados.

#### 4.2.4. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO (CII).

La Cromatografía de Intercambio Iónico, fué el primer método que se usó bajo condiciones modernas de Cromatografía Líquida.

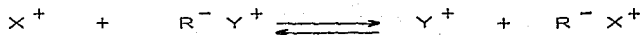
El mecanismo de retención por el cual opera la Cromatografía de Intercambio Iónico (CII), es simplemente un intercambio de iones, iones X de la muestra, iones Y de la fase móvil y grupos cargados R de la fase estacionaria :

Intercambio Aniónico :





Intercambio Catiónico :



Iones de la muestra que interactúan débilmente con el grupo cargado R de la fase estacionaria, son débilmente retenidos y eluyen fácilmente.

La CII es comunmente utilizada para separar compuestos iónicos, tales como sales, ácidos orgánicos y bases que pueden existir en forma ionizada bajo condiciones especiales de pH, se ha utilizado para el análisis de fluidos biológicos como suero y orina, así como en el análisis de proteínas.

#### 4.3. PROCESO CROMATOGRAFICO.

En todo proceso cromatográfico, existe una distribución de las moléculas en cuestión (X), entre dos fases (una fase estacionaria y una fase móvil).

Por otra parte, el proceso cromatográfico se ve afectado por dos características básicas :

#### 4.3.1. LA MIGRACION DIFERENCIAL . ( 25 )

La migración diferencial, depende del equilibrio de distribución de cada compuesto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

Suponemos que se tiene una mezcla de compuestos A y B , al ser inyectados en una columna cromatográfica, se va a observar que ambos compuestos A y B , van a distribuirse de manera diferente entre las dos fases cromatográficas ( fase móvil y fase estacionaria ), supóngase que el compuesto A , tiene mayor afinidad por la fase estacionaria, y que, el compuesto B , por la fase móvil, la velocidad que adquiere el compuesto B , dentro de la columna cromatográfica depende de la velocidad de la fase móvil ( $V_m$ ), por lo que el compuesto A , se va a mover a una velocidad diferente a la del compuesto B.

Entonces diremos que la migración diferencial es la velocidad con la que cada compuesto X , se mueve a través de la columna cromatográfica, y es determinada por el número de moléculas de este compuesto X , en la fase móvil en un instante, las moléculas que no se mueven a través de la columna cromatográfica pasan a la fase estacionaria.

#### 4.3.2. LA PROPAGACION MOLECULAR. (25)

Quando la fase móvil se va desplazando dentro de la columna cromatográfica, su velocidad va cambiando a través del tiempo, debido a que, el flujo de la fase móvil no es constante, porque el líquido se adhiere a las partículas de la fase estacionaria, ocasionando así que las partículas de muestra que van al centro de la corriente, se muevan más rápidamente que las que tienen contacto con la fase estacionaria, por otro lado cuando el material de empaque es poroso, la fase móvil pasa a través de estos poros, lo que hace que las partículas de muestra que caen dentro de los poros tarden más en difundir que las que no caen dentro del poro.

De lo dicho anteriormente se deduce, que si la fracción de las moléculas  $X$  en la fase móvil es cero, no existe migración diferencial y por consiguiente la retención es igual a cero y la velocidad ( $V_x$ ) de las moléculas  $X$  es cero, por lo tanto, si todas las moléculas  $X$  se encuentran en la fase móvil, existe migración diferencial y la retención será igual a la unidad y la velocidad ( $V_x$ ) de las moléculas  $X$  será igual a la velocidad de la fase móvil ( $V_m$ ).

Retención es la velocidad de migración relativa del compuesto  $X$  y puede expresarse por la siguiente fórmula :

$$V_x = V_m R$$

Donde :  $V_x$  = Velocidad de las moléculas X.

$V_m$  = Velocidad de la fase móvil.

$R$  = Fracción de moléculas en la fase móvil.

#### 4.4. DEFINICIONES BASICAS .

##### 4.4.1. VOLUMEN DE RETENCION ( $V_R$ ).

Volúmen de retención, es el volúmen total de la fase móvil requerido para eluir el centro de una banda dada X ; esto es, el flujo total del solvente en el tiempo desde que se inyecta hasta que aparece el centro de la banda.

##### 4.4.2. TIEMPO DE RETENCION ( $t_R$ ).

Tiempo de retención, es el tiempo que transcurre desde que se -

inyecta, hasta que eluye una determinada banda, tomando como referencia el máximo de esta.

El tiempo de retención, puede usarse para identificar un compuesto X, tentativamente, por comparación con un valor de tiempo de retención de un compuesto conocido, en el mismo sistema cromatográfico (fig. no. 5).

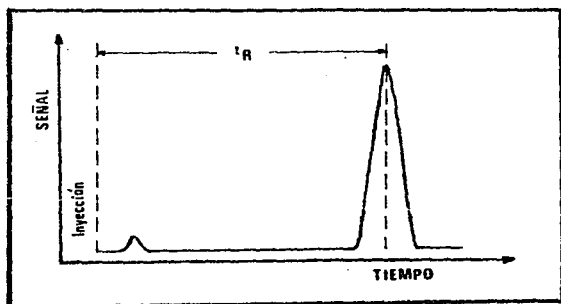


Figura No. 5

#### 4.4.3. FACTOR DE CAPACIDAD ( $K'$ ).

La definición fundamental del factor de capacidad  $K'$ , es dada por la siguiente ecuación ;

$$K' = \frac{n_s}{n_m}$$

Donde :  $n_s$  = número de moles totales de X, en la fase estacionaria.

$n_m$  = número de moles totales de X, en la fase móvil.

El factor de capacidad  $K'$ , es una medida sencilla de retención, y es el término que se usa más frecuentemente para identificar o localizar una banda cromatográfica.

En términos de retención, el factor de capacidad  $K'$ , puede estimarse por simple inspección del cromatograma ( ver fig. no. 6 ), por medio de la siguiente ecuación :

$$K' = \frac{t_{RA} - t_0}{t_0}$$

Donde :  $K'$  = Factor de Capacidad.

$t_{RA}$  = Tiempo de retención de la banda A.

$t_0$  = Tiempo que transcurre, en el que la fase móvil y la muestra se separan.

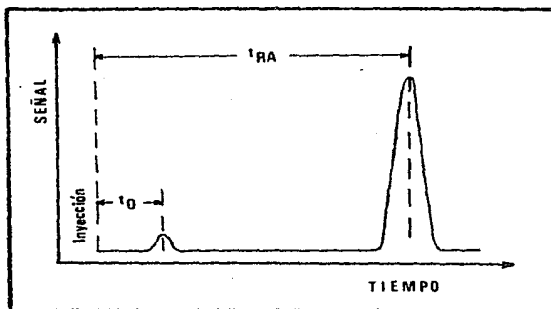


Figura No. 6

#### 4.4.4. NUMERO DE PLATOS TEORICOS ( N ).

El ancho de la banda  $t_W$  en Cromatografía Líquida en columna es comunmente expresado en términos del número de platos teóricos de la columna. :

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{t_W} \right)^2$$

La eficiencia de una columna es la capacidad que tiene esta, pa-

ra dar bandas estrechas y es descrita por la altura equivalente de un plato teórico ( H ), bajo condiciones específicas de operación, por unidad de longitud de la columna ( L ).

$$H = \frac{L}{N}$$

#### 4.4.5. FACTOR DE SELECTIVIDAD O FACTOR DE SEPARACION ( $\alpha$ ).

Es la relación de tiempo, en el cual las dos bandas, permanecen en la fase estacionaria.

$$\alpha = \frac{t_{RB} - t_0}{t_{RA} - t_0} = \frac{K'_B}{K'_A}$$

El factor de separación  $\alpha$  nos dice cuando una banda eluye relativamente de otra, y se ve afectado por cambios en la composición - de la fase móvil y/o en la fase estacionaria, es decir que se refiere a la química envuelta en todo el sistema cromatográfico.



#### 4.4.6. RESOLUCION (Rs) .

" El término resolución es generalmente usado en Cromatografía, para medir la separación de dos componentes sucesivos ". ( 26 )

En términos cromatográficos Resolución se define :

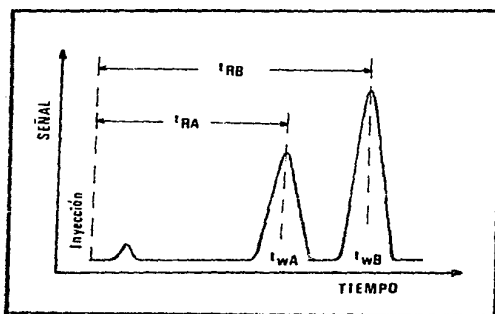


Figura No. 7

$$R_s = \frac{t_{RB} - t_{RA}}{1/2 (t_{wA} + t_{wB})}$$

Donde :  $t_{RA}$  = Tiempo de retención de la banda A .

$t_{RB}$  = Tiempo de retención de la banda B .

$t_{wA}$  = Ancho de la banda A .

$t_{wB}$  = Ancho de la banda B .

#### 4.5. INSTRUMENTACION .

##### 4.5.1. PARTES FUNDAMENTALES DE UN CROMATOGRAFO DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION .

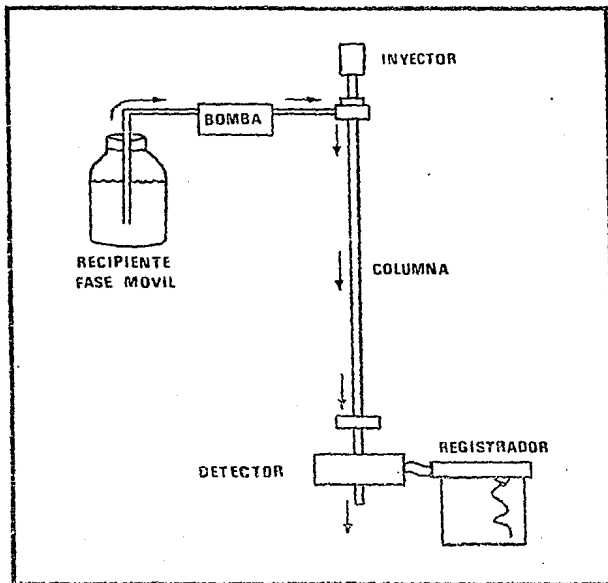


Figura No. 8

El cromatógrafo de líquidos de alta resolución, consta de las siguientes partes fundamentales : recipiente de la fase móvil, bomba, inyector, columna, detector, registrador y algunos modelos más sofisticados poseen un sistema de manejo de datos. ( fig. no. 8 )

#### 4.5.2. CARACTERISTICAS BASICAS DE LOS COMPONENTES DE UN CROMATOGRFO DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION .

##### Bombas :

Deben cumplir con los siguientes requisitos :

- Que sea químicamente inerte.
- Que alcance altas presiones ( 5000 lb/plg<sup>2</sup> ) .
- Alta reproducibilidad de flujo.
- Que sea exacta ( flujo constante ).
- Pulsaciones suaves ( ruido de la bomba mínimo ).

##### Columnas :

El incremento exponencial en la tecnología de columnas, ha sido una parte fundamental en el avance de la CLAR, debido a que la columna no solamente ha aumentado la velocidad, resolución y sensibilidad -

de la técnica, sino que ha influido en el desarrollo de la instrumentación. Las columnas empacadas para CLAR, se pueden clasificar en dos categorías :

- 1 ) Lecho de capa porosa ( 30 - 40 micras ).
- 2 ) Micropartículas ( 5 - 10 micras ).

Existen hoy en día una gran variedad de empaques, para cada uno de los métodos de CLAR, que se pueden seleccionar de acuerdo a las necesidades existentes.

Para estar seguro de contar con una columna adecuada deben evaluarse los siguientes puntos :

- Eficiencia de la columna (  $N$ , número de platos teóricos ).
- Parámetros de retención (  $t_R$ ,  $K'$  ).
- Factor de separación (  $\alpha$  ).
- Simetría de bandas cromatográficas .
- Presión del goteo ( bajo condiciones específicas de velocidad de flujo, fase móvil y temperatura ) .
- Concentración de la fase orgánica empacada .

Detectores :

El detector es una parte importante del cromatógrafo de líquidos de alta resolución, ya que, cuantifica la magnitud de los componentes

que se hace pasar como una señal eléctrica hacia un registrador que da el cromatograma.

Existen varios tipos de detectores que se usan en CLAR algunos de estos son : detector de absorción de U.V. y visible, de fluorescencia, de ionización de flama, polarográfico, radioactivo e índice de refracción entre otros. Un detector eficiente debe cumplir con los siguientes requisitos :

- Alta sensibilidad.
- Alta precisión.
- Responder a todos los solutos, tener especificidad.
- Amplio rango de linealidad.
- Relativa insensibilidad a cambios de temperatura y flujo de la fase móvil.
- Que no contribuya al ensanchamiento de la banda.
- Que no destruya la muestra.
- Que de información cualitativa sobre la banda cromatográfica deseada.
- Respuesta rápida.
- Que sea redituable y conveniente para su uso.
- Fácil de operar.

## 5. ANALISIS CUANTITATIVO.

El aspecto más importante de la CLAR, es la capacidad de analizar cuantitativamente una amplia variedad de muestras, siendo esta técnica muy versátil. En la Industria Farmacéutica se le ha dado gran importancia y se ha desarrollado grandemente, tal es el caso que, se requiere de esta para el análisis de rutina en el laboratorio de control de calidad.

Por otra parte, la precisión y exactitud de un análisis cuantitativo, solo puede obtenerse cuando se realizan cada una de las fases del análisis con mucho cuidado y dedicación, desde el muestreo hasta los cálculos finales.

### 5.1. METODOS DE MEDICION DE LA BANDA CROMATOGRAFICA . ( 25 )

#### 5.1.1. ALTURA DE LA BANDA CROMATOGRAFICA .

En este método, se mide la altura del pico desde la línea base - hasta el punto máximo del pico. ( fig. no. 9 )

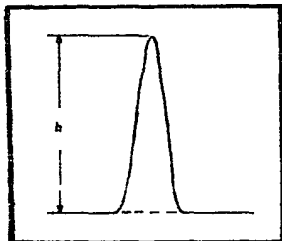


Figura No. 9

5.1.2. AREA DE LA BANDA CROMATOGRAFICA .

Para medir el área del pico existen varios métodos.

- a ) Una técnica simple, es medir la altura del pico y multiplicar la por el ancho del pico a la mitad de la altura del pico .

( fig. no. 10 )

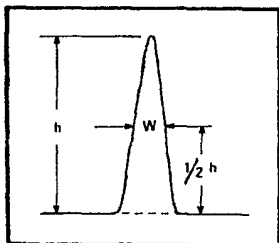


Figura No. 10

- b) Técnica de la triangulación. Por medio de esta técnica, se calcula una cantidad proporcional al área, midiendo la altura del pico y multiplicándola por el ancho de la base del pico. ( fig. no. 11 )

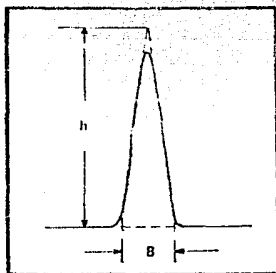


Figura No. 11

- c) Técnica de cortar y pesar. La precisión de este método depende del peso constante del papel. ( fig. no. 12 )

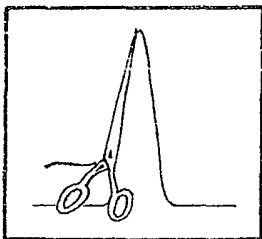


Figura No. 12



- d ) Planimetría. Por medio de un instrumento, mecánicamente se integra el área del pico por medio del perímetro del pico ; es usado para picos no simétricos. ( fig. no. 13 )

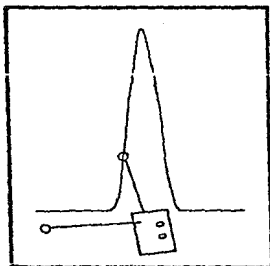


Figura No. 13

- e ) Por medio de un integrador mecánico, que algunos equipos ya tienen integrado, automáticamente produce la indicación del área del pico . ( fig. no. 14 )

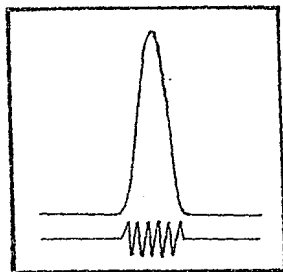


Figura No. 14

f) Integrador electrónico digital ; es más sofisticado, la exactitud depende de la buena resolución.

## 5.2. METODOS DE CALIBRACION .

Los métodos para determinar la exactitud y precisión de una técnica analítica, están sujetos a la comparación con un estándar de pureza y concentración conocidas. Existen dos métodos de calibración:

### 5.2.1. METODO DE ESTANDAR INTERNO .

Se adiciona un compuesto conocido a la muestra desconocida, en una concentración fija, esto da un pico separado en el cromatograma.

Se determinan las alturas o las áreas de ambos; se grafica el cociente de la altura o área del pico de interés entre la altura o área del pico del estándar interno v. s. la concentración del compuesto de interés.

### 5.2.2. METODO DE ESTANDAR EXTERNO .

En este método se construye una curva de calibración utilizando muestras estándares del compuesto de interés a diferentes concentraciones y volumen fijo. Para construir la curva de calibración se grafica el tamaño del pico ( altura o área ) v.s. concentración ; si la curva de calibración es lineal y se intercepta al origen, se calcula el factor de calibración  $S$  , como la pendiente de la curva a través del origen.

## 6. VALIDACION ESTADISTICA DE METODOS ANALITICOS .

### 6.1. GENERALIDADES .

Un método o técnica analítica, se fundamenta en la medición de una o varias propiedades del material de estudio, de esta forma, para validar cualquier método o técnica analítica es indispensable el empleo

de la estadística, que hace posible obtener de un número conocido de datos obtenidos experimentalmente, estimadores válidos de los "valores verdaderos" de la propiedad medida; esto se logra por la introducción de modelos matemáticos que constituyen abstracciones de la realidad, que solo representan las propiedades relevantes para la hipótesis planteada, ignorando el resto de las propiedades presentes.

## 6.2. TIPOS DE ERRORES.

Cualquier proceso de medición esta sujeto a error, el que podemos definir como la diferencia entre un valor observado o medido y el "valor verdadero" (más probable). El error se puede dividir en dos tipos :

### 6.2.1. ERROR SISTEMATICO O DETERMINANTE .

Este tipo de error es introducido por el uso de un método analítico inadecuado, pobre juicio o vías inconsistentes de parte del analista, e influye en la exactitud del método, y se divide en :

a ) Error constante ( absoluto ) .

Se refiere a un error sistemático independiente de la concentración verdadera de la sustancia ; es originado por selectividad insuficiente, interferencias e inadecuadas correcciones con blanco entre otros.

b ) Error proporcional ( relativo ) .

Es un error sistemático que depende de la concentración de la sustancia y se expresa en unidades relativas, tales como porcentaje; es causado por la suposición incorrecta de linealidad, y por diferencias en las pendientes de las líneas de calibración de la muestra y el estándar.

Existen varios métodos para estimar el error sistemático como ejemplo tenemos : experimentos de recobro y chequeo de linealidad.

## 6.2.2. ERROR ALEATORIO O INDETERMINANTE .

Este error permanece aún cuando todos los errores sistemáticos han sido eliminados. La variabilidad es la manifestación de errores aleatorios, es causado por limitaciones inherentes en el método -

observacional ; esto puede minimizarse pero no eliminarse, y da lugar a la imprecisión del método.

### 6.3. DEFINICIONES BASICAS EN LA VALIDACION DE METODOS ANALITICOS .

#### 6.3.1. EXACTITUD .

Concordancia entre un valor determinado experimentalmente ( estimador ) y un valor de referencia.

#### 6.3.2. PRECISION .

Concordancia entre mediciones repetidas que se dispersan alrededor de un valor central y se expresa en términos de repetición y/o reproducibilidad.

#### 6.3.3. REPETIBILIDAD .

Es la precisión de un método expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes establecidas por un solo analista usando el mismo aparato y técnica.

#### 6.3.4. REPRODUCIBILIDAD .

Es la precisión de un método expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones obtenidas por el mismo método o material de prueba idéntico, pero bajo diferentes condiciones ( analista, aparato, laboratorio y/o diferente tiempo ) .

#### 6.3.5. LINEARIDAD .

Grado en el que una curva de calibración se aproxima a una línea recta.

#### 6.3.6. ESPECIFICIDAD .

La medición se debe solo a la sustancia por determinar y no a otras sustancias que puedan estar presentes en el material por analizar.

#### 6.3.7. SENSIBILIDAD .

Mínima cantidad detectable del compuesto por analizar.

7. PARTE EXPERIMENTAL .

7.1. EQUIPO .

- Balanza analítica Mettler H35AR .
- Espectrofotómetro U.V. - VIS Perkin - Elmer Mod. 552 .
- Bomba de vacío Koblenz Mod. CGP 134 .
- Equipo para filtración ; Solvent Clarification Kits Millipore.
- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Waters Ass. equipado con ;  
Bomba para Cromatografía ; Waters Ass. Mod. 6000A Solvent - Delivery System .  
Inyector ; Mod. U6K Waters Ass.  
Columna ; Módulo de compresión radial Z - Module<sup>TM</sup> con cartucho radial Pack C<sub>18</sub> ( 10 cm x 4 mm ) Waters Ass.  
Detector ; U.V. de onda variable Lambda Max. Mod. 481 Waters Ass.  
Procesador de Datos ; Waters 730 Data Module .  
Jeringa ; Hamilton de 25 mcl. de capacidad.



## 7.2. MATERIAL .

Matraces volumétricos	25 ml. Pyrex .
Matraces volumétricos	10 ml. Pyrex .
Pipetas volumétricas	1 ml. Pyrex .
Probeta graduada	25 ml. Pyrex .
Membrana de filtración acuosa	0.45 $\mu$ m. Millipore .
Membrana de filtración orgánica	0.50 $\mu$ m. Millipore .

## 7.3. REACTIVOS .

Agua bidestilada.

Metanol Lichrosolv grado Cromatográfico (Merck).

Fosfato de Dibutilamina 0.05 M ( $D_4$ ).

Proterciclina sustancia de referencia .

## 7.4. METODO .

#### 7.4.1. PREPARACION DE LA SOLUCION DE REFERENCIA .

Pesar aproximadamente 50 mg. de Proterciclina de referencia y colocarlos en un matraz volumétrico de 25 ml., disolver y aforar a volúmen con agua, tomar una alícuota de 1 ml. de esta solución y colocarla en un matraz volumétrico de 10 ml. aforar a volúmen con agua, la solución que resulta tiene una concentración de 0.2 mg./ml.

#### 7.4.2. PREPARACION DE LA SOLUCION MUESTRA .

Pesar aproximadamente 50 mg. de Proterciclina muestra y colocarlos en un matraz volumétrico de 25 ml., disolver y aforar con agua hasta el volúmen, tomar una alícuota de 1 ml. de esta solución y colocarla en un matraz volumétrico de 10 ml. aforar a volúmen con agua, la solución que resulta tiene una concentración aproximada de 0.2 mg./ml.

7.4.3. DETERMINACION DE SUCCINATO DE CLORANFENI  
COL (CAF) Y PIRROLIDIN-METIL-TETRACICLINA  
(PMT) POR CLAR .

Injectar 5 mcl. de la solución de referencia y 5 mcl. de la so  
lución muestra, bajo las siguientes condiciones cromatográficas :

Fase móvil :	Agua ; Metanol Lichrosolv ; D <sub>4</sub> ( 40 : 60 : 1 )
Columna :	Módulo de compresión radial. Cartucho Radial Pack C <sub>18</sub> .
Longitud de Onda :	U.V. 269 nm.
Sensibilidad :	0,05 AUFS .
Velocidad de Flujo :	2.0 ml./min.
Velocidad de Carta :	0.5 cm./min.

7.4.4. FORMA DE CALCULO .

Método : Estándar Externo .

Fórmulas :

$$\frac{ARM}{ARE} \times C_E = C_M$$

$$\frac{C_{EM}}{C_{TM}} \times 100 = \% \text{ Recuperado}$$

Donde :

ARM = Area Relativa de la Muestra.

ARE = Area Relativa del Estándar.

$C_E$  = Concentración del Estándar.

$C_{EM}$  = Concentración Experimental de la Muestra.

$C_{TM}$  = Concentración Teórica de la Muestra.

7.5. VALIDACION ESTADISTICA .

7.5.1. ESPECIFICIDAD .

Para demostrar la especificidad del método analítico por CLAR para Proterciclina, se analizarón muestras de Proterciclina, bajo las siguientes condiciones :

---

Temperatura ( °C )	Tiempo ( días )
37	71
45	54
45	59
60	52
60	70
60	99
70	41

---

7.5.2. EXACTITUD , REPETIBILIDAD Y LINEARIDAD  
( PMT ) .

Con objeto de evaluar la exactitud, repetibilidad y linealidad del método analítico por CLAR , para la cuantificación de Pirrolidín-me-  
til-tetraciclina ( PMT ) , se analizarón 15 muestras independientes,  
a 5 niveles de concentración diferentes (placebo cargado) .

7.5.3. REPRODUCIBILIDAD ( PMT ) .

Para la evaluación de la reproducibilidad del método analítico por  
CLAR para PMT , se realizó por dos analistas sobre muestras reales,  
haciendo cada uno tres análisis de un mismo lote en dos días .

7.5.4. EXACTITUD , REPETIBILIDAD Y LINEARIDAD  
( CAF ) .

Con objeto de evaluar la exactitud, repetibilidad y linealidad del método analítico por CLAR , para la cuantificación de Succinato de cloranfenicol ( CAF ) , se analizarón 15 muestras independientes , a 5 niveles de concentración diferentes ( placebo cargado ) .

7.5.5. REPRODUCIBILIDAD ( CAF ) .

Para la evaluación de la reproducibilidad del método analítico - por CLAR para CAF , se realizó por dos analistas sobre muestras reales, haciendo cada uno tres análisis de un mismo lote en dos días.

8. RESULTADOS .

8.1. ESPECIFICIDAD .

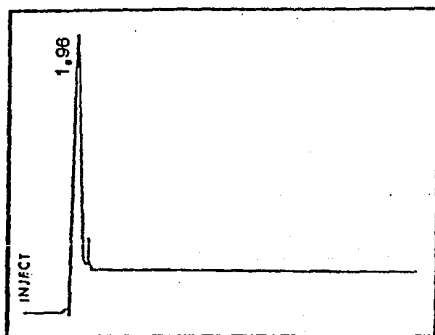


FIGURA No. 15

Cromatograma de Pirrolid(metil)-tetraciclina  
(PMT) estándar, con un  $t_R = 1.96$  min.



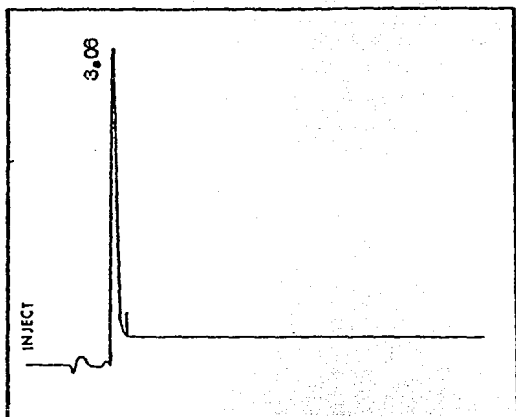


FIGURA No. 16

Cromatograma de Succinato de Cloranfenicol  
(CAF) estándar,  $t_R = 3.06$  min.

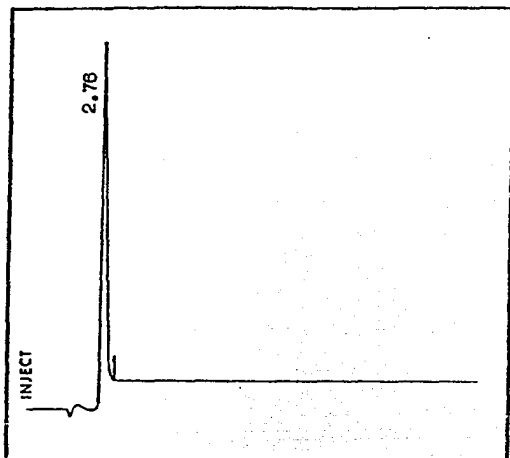


FIGURA No. 17

Cromatograma de Cloranfenicol Levógiro -

(CL) estándar,  $t_R = 2.76$  min.

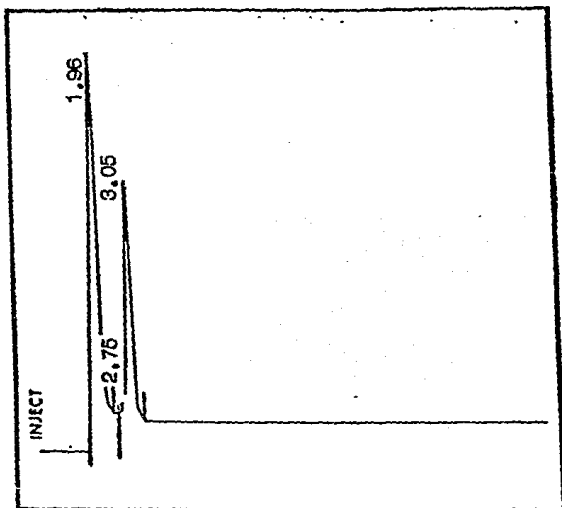


FIGURA No. 18

Cromatograma de Proterciclina estándar con  
 $t_R = 1.96$  min. ;  $t_R = 2.75$  min. y  
 $t_R = 3.05$  min. , correspondientes a :  
PMT, Cloranfenicol Levógiro , y CAF -  
respectivamente.

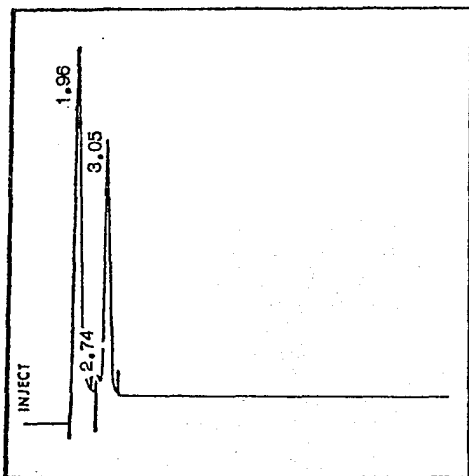


FIGURA No. 19

Cromatograma de Proterciclina muestra con  
 $t_R = 1.96$  min. ;  $t_R = 2.74$  min. y  
 $t_R = 3.05$  min. , correspondientes a :  
PMT , Cloranfenicol Levógiro y CAF -  
respectivamente ; en condiciones normales.

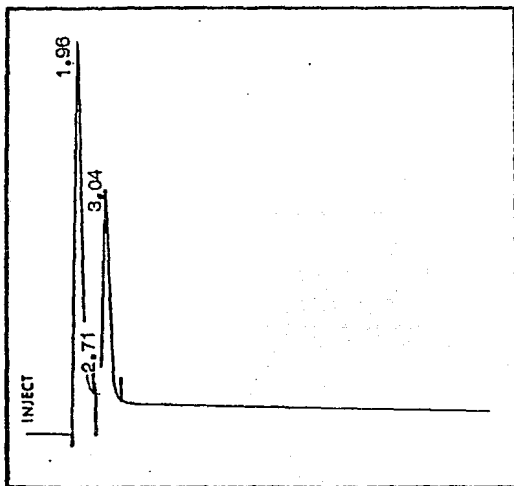


FIGURA No. 20

Cromatograma de Proterciclina sometida a -  
 37°C por 71 días, en el que se observan -  
 los siguientes resultados :

PMT	100.03 %	( $t_R$ = 1.96 min. )
CL	7.39 %	( $t_R$ = 2.71 min. )
CAF	100.00 %	( $t_R$ = 3.04 min. )

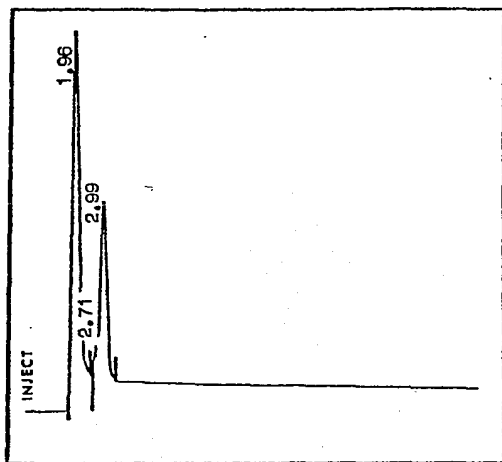


FIGURA No. 21

Cromatograma de Proterciclina sometida a -  
45°C por 54 días :

PMT	93.45 %	( $t_R$ = 1.96 min. )
CL	13.80 %	( $t_R$ = 2.71 min. )
CAF	83.68 %	( $t_R$ = 2.99 min. ) .

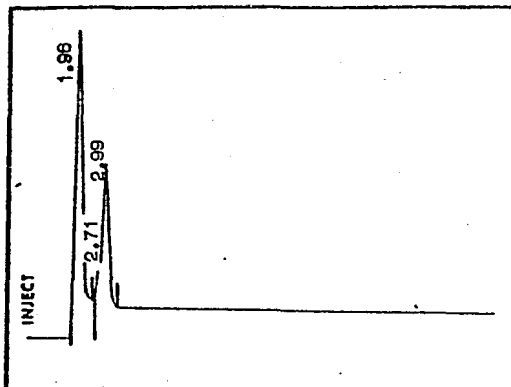


FIGURA No. 22

Cromatograma de Proterciclina sometida a -  
45°C por 69 días :

PMT	75.97 %	( $t_r$ $\bar{x}$ = 1.96 min. )
CL	14.99 %	( $t_r$ $\bar{x}$ = 2.71 min. )
CAF	67.44 %	( $t_r$ $\bar{x}$ = 2.99 min. ) .

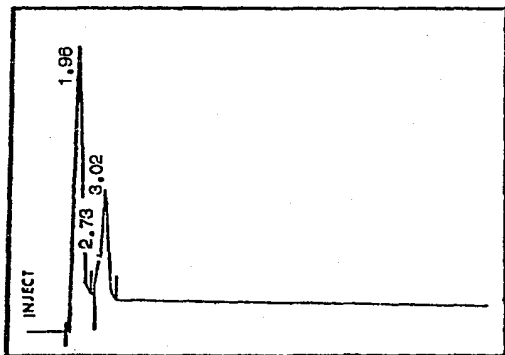


FIGURA No. 28

Cromatograma de Proterciclina sometida a -  
60°C por 52 dias :

PMT	69,70 %	( $t_R$ = 1.96 min. )
CL	14,48 %	( $t_R$ = 2.43 min. )
CAF	55,53 %	( $t_R$ = 3.02 min. ) .



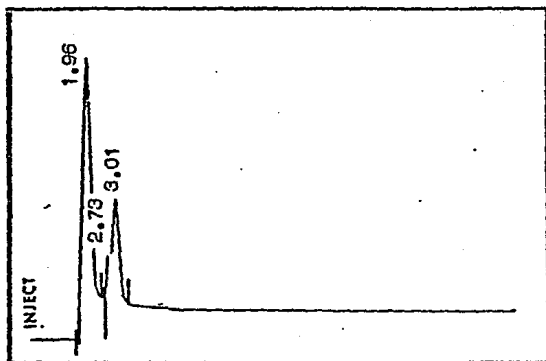


FIGURA No. 24

Cromatograma de Proterciclina sometida a -  
60°C por 70 días :

PMT	64.55 %	( $t_R$ = 1.96 min. )
CL	16.71 %	( $t_R$ = 2.73 min. )
CAF	50.54 %	( $t_R$ = 3.01 min. ) .

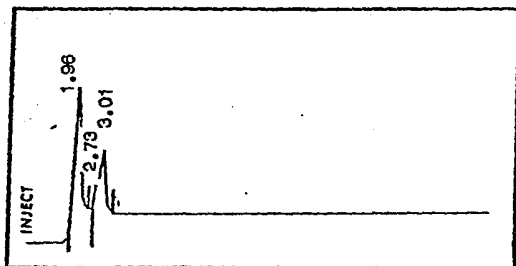


FIGURA No. 25

Cromatograma de Proterciclina sometida a -  
30°C por 99 días :

PMT	63.23 %	( $t_R$ = 1.96 min. )
CL	17.18 %	( $t_R$ = 2.73 min. )
CAF	50.64 %	( $t_R$ = 3.01 min. )

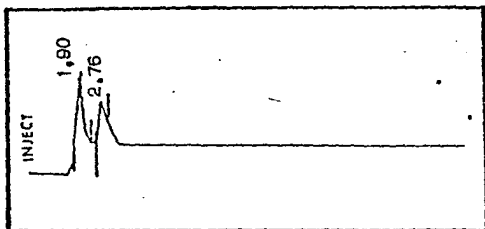


FIGURA No. 26

Cromatograma de Proterciclina sometida a -  
70°C por 41 días :

FMT 22.36 % (  $t_R$  = 1.90 min. )

CL 13.71 % (  $t_R$  = 2.76 min. ) .

De acuerdo a los cromatogramas obtenidos ,  
se observa que no existe interferencia del CL  
en la determinación de FMT y CAF , ya que  
solo se observa un aumento en el % de CL  
y una disminución en el % de CAF .

8.2. EVALUACION ESTADISTICA ( PMT ).

TABLA No. I . Resultados obtenidos para la evaluación estadística de la exactitud, repetibilidad y linealidad del método analítico por CLAR para la PMT .

mg. adicionados ( x )	mg. recuperados ( y )	% recobro ( Y% )
0.10	0.1005	100.50
0.10	0.0995	99.50
0.10	0.0994	99.40
0.15	0.1493	99.53
0.15	0.1485	99.00
0.15	0.1486	99.06
0.20	0.2019	100.95
0.20	0.2019	100.95
0.20	0.2036	101.80

TABLA No. I . ( Continuación ) .

mg. adicionados ( x )	mg. recuperados ( y )	% recobro ( y% )
0.25	0.2496	99.84
0.25	0.2485	99.40
0.25	0.2491	99.64
0.30	0.3041	101.36
0.30	0.3001	100.03
0.30	0.2988	99.60

Media  $\bar{y} = 100.03733$

Desviación Estándar  $S_{y\%} = 0.86661$

Número de Datos  $n = 15$

8.2.1. EXACTITUD ( PMT ).

Fórmula de Cálculo Apéndice I.

- Prueba de Hipótesis :

$$H_0 : \mu = 100 \%$$

$$H_1 : \mu \neq 100 \%$$

- Resultados :

$$t_{\text{calc.}} = 0.16683$$

$$t_{(0.95, 14)} = 1.7613$$

$t_{(0.95, 14)} > t_{\text{calc.}}$  ; no se rechaza  $H_0$ , por lo que se concluye que el método es exacto.

- Intervalo de Confianza ( 95 % ).

$$99.55741 \leq \mu \leq 100.51725$$

8.2.2. REPETIBILIDAD (PMT).

Fórmula de Cálculo Apéndice II.

- Prueba de Hipótesis :

$$H_0 : \sigma \leq 2\%$$

$$H_1 : \sigma > 2\%$$

- Resultado :

$$\chi^2_{\text{calc.}} = 2.62855$$

$$\chi^2_{(0.95, 14)} = 23.685$$

$\chi^2_{(0.95, 14)} > \chi^2_{\text{calc.}}$  ; no se rechaza  $H_0$  ,

y se concluye que el método es repetible.

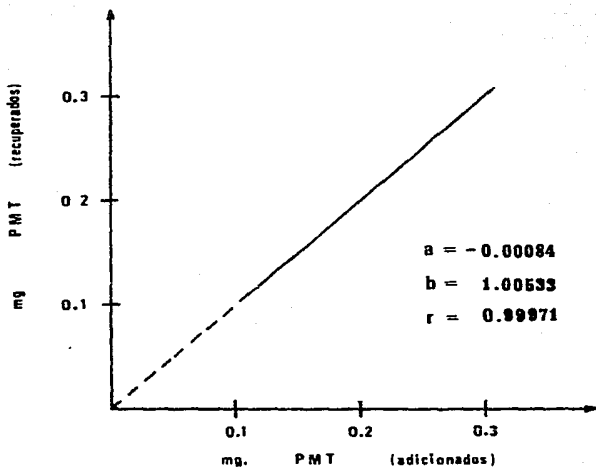
- Intervalo de Confianza (95 %).

$$0.63447 \leq \sigma \leq 1.36670$$

8.2.3. LINEARIDAD (PMT).

Fórmula de Cálculo Apéndice III.

Gráfica No. 1



$$\bar{x} = 0.20000$$

$$S_x = 0.07319$$

$$\bar{y} = 0.20023$$

$$S_y = 0.07360$$

$$S_{y/x} = 0.00195$$



8.2.3.1. INFERENCIAS ACERCA DE  $a$   
( INTERCEPTO A LA ORDENADA ).

- Prueba de Hipótesis :

$$H_0 : a = 0$$

$$H_1^e : a \neq 0$$

- Resultado :

$$t_{\text{calc.}} = -0.14306$$

$$t_{(0.95, 13)} = 1.7709$$

$t_{(0.95, 13)} \nabla t_{\text{calc.}}$  ; no se rechaza  $H_0$ , y se  
concluye que  $a = 0$ .

- Intervalo de Confianza ( 95 % ).

$$- 0.00410 \triangleleft a \triangleleft 0.00242$$

8.2.3.2. INFERENCIAS ACERCA DE  $b$   
( PENDIENTE ).

- Prueba de Hipótesis :

$$H_0 : b = 1$$

$$H_1 : b \neq 1$$

- Resultado :

$$t_{\text{calc.}} = 0.74853$$

$$t_{(0.95, 13)} = 1.7709$$

$t_{(0.95, 13)} > t_{\text{calc.}}$  ; no se rechaza  $H_0$ , por lo que se concluye que  $b = 1$ .

- Intervalo de Confianza (95 %).

$$0.98995 \leq b \leq 1.02071$$

8.2.4. REPRODUCIBILIDAD (PMT).

TABLA No. II. Datos obtenidos para el estudio del efecto de analista, día y analista-día para la reproducibilidad del método analítico por CLAR para la determinación de PMT.

Fórmula de Cálculo Apéndice IV.

A N A L I S T A

D I A

	( j = 1 )	( j = 2 )
( i = 1 )	100,74 101,24 101,88	100,82 100,03 98,58
( i = 2 )	101,26 100,81 99,84	100,16 100,42 99,27

$$\frac{\sum Y_{i..}^2}{6} = 121012.3203$$

$$\frac{\sum \sum Y_{tj.}^2}{3} = 121016.2984$$

$$\frac{Y_{...}^2}{12} = 121012.1252$$

$$\frac{\sum Y_{.j.}^2}{6} = 121015.6352$$

$$\sum \sum \sum Y_{ijk}^2 = 121021.3135$$

De acuerdo a los valores de F calculada menores a los valores de F teórica ; se infiere que no existe ningún efecto de alguna de las fuentes de variación en la determinación de PMT por CLAR .  
( Ver Tabla No. Iia ).

TABLA No. IIa

- ANALISIS DE VARIANZA -

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Sumatoria de cuadrados	Media cuadrada	F calculada	F teórica
D <sub>i</sub>	1	0.19510	0.19510	0.41679	161.4
A <sub>j</sub>	1	3.51000	3.51000	7.49840	161.4
DA <sub>ij</sub>	1	0.46810	0.46810	0.74670	5.32
E (tj) <sub>k</sub>	8	5.01510	0.62689		

8.3. EVALUACION ESTADISTICA ( CAF ).

TABLA No. III. Resultados obtenidos para la evaluación estadística de la exactitud, repetibilidad y linealidad del método analítico por CLAR para el CAF.

mg. adicionados ( x )	mg. recuperados ( y )	% recobro ( y% )
0.10	0.1013	101.30
0.10	0.1027	102.70
0.10	0.0991	99.10
0.15	0.1506	100.40
0.15	0.1488	99.20
0.15	0.1474	98.26
0.20	0.2000	100.00
0.20	0.2036	101.80
0.20	0.1979	98.95

TABLA No. III . ( Continuación )

mg. adicionados ( x )	mg. recuperados ( y )	% recobro ( y % )
0.25	0.2472	98.88
0.25	0.2501	100.04
0.25	0.2515	100.60
0.30	0.2992	99.73
0.30	0.2987	99.56
0.30	0.3012	100.40

Media  $\bar{y} \%$  = 100.06133

Desviación Estándar  $S \%$  = 1.19362

Número de Datos n = 15

8.3.1. EXACTITUD (CAF).

Fórmula de Cálculo Apéndice I.

- Prueba de Hipótesis :

$$H_0 : \mu = 100 \%$$

$$H_1 : \mu \neq 100 \%$$

- Resultado :

$$t_{\text{calc.}} = 0.19900$$

$$t_{(0.95, 14)} = 1.7613$$

$t_{(0.95, 14)} > t_{\text{calc.}}$  ; no se rechaza  $H_0$  , y se concluye que el método es exacto.

- Intervalo de Confianza ( 95 % ).

$$99.40032 \leq \mu \leq 100.72234$$



8.3.2. REPETIBILIDAD ( CAF ).

Fórmula de Cálculo Apéndice II .

- Prueba de Hipótesis :

$$H_0 : \sigma \leq 2 \%$$

$$H_1 : \sigma > 2 \%$$

- Resultado :

$$\chi^2_{\text{calc.}} = 4,98655$$

$$\chi^2_{(0.95, 14)} = 23,685$$

$\chi^2_{(0.95, 14)} > \chi^2_{\text{calc.}}$  ; no se rechaza  $H_0$  , y  
se concluye que el método es repetible.

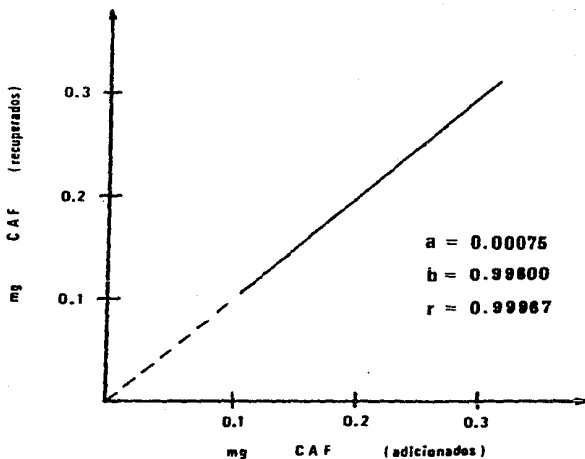
- Intervalo de Confianza ( 95 % ) .

$$0,87388 \leq \sigma \leq 1,88241$$

8.3.3. LINEARIDAD (CAF).

Fórmula de Cálculo Apéndice III.

Gráfica No. 2



$\bar{X} = 0.20000$

$S_x = 0.07319$

$\bar{Y} = 0.19995$

$S_y = 0.07292$

$S_{y/x} = 0.00213$

8.3.3.1. INFERENCIAS ACERCA DE  $a$   
( INTERCEPTO A LA ORDENADA ).

- Prueba de Hipótesis :

$$H_0 : a = 0$$

$$H_1 : a \neq 0$$

- Resultado :

$$t_{\text{calc.}} = 0.11694$$

$$t_{(0.95, 13)} = 1.7709$$

$t_{(0.95, 13)} > t_{\text{calc}}$  ; no se rechaza  $H_0$  , y se  
concluye que  $a = 0$  .

- Intervalo de Confianza ( 95 % ) ,

$$- 0.00281 \leq a \leq 0.00431$$

8.3.3.2. INFERENCIAS ACERCA DE b

( PENDIENTE ).

- Prueba de Hipótesis :

$$H_0 : b = 1$$

$$H_1 : b \neq 1$$

- Resultado :

$$t_{\text{calc.}} = -0.51428$$

$$t_{(0.95, 13)} = 1.7709$$

$t_{(0.95, 13)} > t_{\text{calc.}}$  ; no se rechaza  $H_0$  , y se  
concluye que  $b = 1$  .

- Intervalo de Confianza ( 95 % ).

$$0.97920 \leq b \leq 1.01280$$

8.3.4. REPRODUCIBILIDAD ( CAF ).

TABLA No. IV. Datos obtenidos para el estudio del efecto de analista, día y analista-día para la reproducibilidad del método analítico por CLAR para la determinación de CAF.

Fórmula de Cálculo Apéndice IV.

A N A L I S T A

	( j = 1 )	( j = 2 )	
D I A	( i = 1 )	101,39	100,36
	( i = 1 )	99,44	101,59
	( i = 1 )	101,94	100,78
D I A	( i = 2 )	99,45	100,85
	( i = 2 )	98,51	100,62
	( i = 2 )	100,83	99,39

$$\frac{\sum Y_{i..}^2}{6} = 121035.0621$$

$$\frac{\sum \sum Y_{ij.}^2}{3} = 121035.7765$$

$$\frac{\sum Y_{...}^2}{12} = 121032.2102$$

$$\frac{\sum Y_{.j.}^2}{6} = 121032.5536$$

$$\sum \sum \sum Y_{ijk}^2 = 121043.9659$$

De acuerdo a los valores de F calculada menores a los valores de F teórica ; se infiere que no existe ningún efecto de alguna de las fuentes de variación en la determinación de CAF por CLAR. ( Ver Tabla No. IVa ).

TABLA No. IVa - ANALISIS DE VARIANZA -

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Sumatoria de cuadrados	Media cuadrada	F calculada	F teórica
$D_t$	1	2,85190	2,85190	7,68706	161,4
$A_j$	1	0,34340	0,34340	0,92561	161,4
$DA_{tj}$	1	0,37100	0,37100	0,36242	5,32
$E_{(t)k}$	8	8,18940	1,02368		

## 9. CONCLUSIONES .

- Se concluye que el Método Analítico por CLAR para Proterciclina es específico para los dos componentes de esta ; CAF y PMT , ya que se logra una buena separación entre ambos. Con respecto a Cloranfenicol levógiro, también se separó, que en un momento dado se puede considerar como producto de degradación, y no existe interferencia alguna en la cuantificación de los tres.
- Con respecto a la Validación Estadística del Método Analítico por CLAR para Proterciclina, se concluye que : es Exacto, Preciso ( Repetible y Reproducible ) y Lineal - ( en el intervalo de concentraciones probado ), para cada uno de los componentes de la Proterciclina ( CAF y PMT ) .
- Se logró al objetivo de este trabajo que era : Desarrollar un Método Analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución ( CLAR ) , para separar y cuantificar cada uno de los constituyentes de la Proterciclina .



1. Fiori , G. P., Giorgi , M. and Carco' , P. F., Archivio di Medicina Interna , 18 , 1 ( 1966 ) .
2. Laurini , F. and Galli , V. , Archivio Italiani di Laringologia , fasc. 60. , 431 ( 1965 ) .
3. Burke , J. T. , Wargin , W. A. and Blum , M. R. , J. Pharm. Sci. , 69 , 909 ( 1980 ) .
4. Gorgonio , P. A. , Determinación de la pureza de Protarcicina ( Succinato de rolitetraciclina - cloranfenicol ) por el método de solubilidad. , tesis profesional U.N.A.M. , ( 1980 ) .
5. Técnica de Laboratorios Senosiain S.A. de C.V.
6. Giorgi , M. and Sardi , A. , Boll. Chim. Farm. , 106 , 94 ( 1967 ) .
7. Smith , I. , Feinberg , J. G. , Cromatografía sobre papel y capa fina. Electroforesis. , Editorial Alhambra , 2a. ed. , London ( 1972 ) .

8. Storch de Gracia y Asencio , J. M. , Fundamentos de la Cromatografía de Gases , Editorial Alhambra , 2a. ed. , España ( 1975 ) .
9. Snyder , L. R. , Anal. Chem. , 39 , 705 ( 1967 ) .
10. Snyder , L. R. , Anal. Chem. , 39 , 698 ( 1967 ) .
11. Waters , J. L. , Little , J. N. and Horgan , D. F. , J. Chromatogr. Sci. , 7 , 293 ( 1969 ) .
12. Huber , J.F.K. and Hulsman , J.A.R.J. , Anal. Chem. Acta , 38 , 305 ( 1967 ) .
13. Huber , J.F.K. , J. Chromatogr. Sci. , 7 , 85 ( 1969 ) .
14. Giddings , J. C. , Anal. Chem. , 35 , 2215 ( 1963 ) .
15. Giddings , J. C. , Anal. Chem. , 35 , 1338 ( 1963 ) .
16. Giddings , J. C. , Anal. Chem. , 37 , 61 ( 1965 ) .
17. Locke , D. C. , Anal. Chem. , 39 , 921 ( 1967 ) .
18. Scott , C. D. , Chilcote , D. D. and Lee , N. E. , Anal. Chem. , 44 , 85 ( 1972 ) .

19. Scott, C. D., and Lee, N. E., J. Chromatogr., 42, 263 (1969).
20. Burtis, C. A., J. Chromatogr., 52, 79 (1970).
21. Majors, R. E., J. Chromatogr., 15, 333 (1977).
22. Michaelis, A. F., Cornish, D. W. and Vivilecchia, R., J. Pharm. Sci., 62, 1399 (1973).
23. Tsuji, K., GLC and HPLC Determination of Therapeutic Agents, (in three parts), vol. 9, Marcel Dekker, Inc., New York, New York, (1978).
24. Keulemans, A.I.M., Gas Chromatography, 2a. ed., Reinold, New York (1959).
25. Snyder, L. R. and Kirkland, J. J., Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2a. ed., John Wiley and Sons, Inc., New York, New York (1979).
26. Jones, W. L. and Kieselbach, R., Anal. Chem., 30, 1590 (1958).
27. Massart, L.D., Dijkstra, A. and Kaufman, L., Evaluation and Optimization of Laboratory Methods and Analytical Procedures, vol. I, Elsevier Scientific Publi --

shing Company , Amsterdam - Oxford - New York ,  
( 1978 ) .

28. Stimuliti to the Revision Process. Guidelines for the Analytical Validation of HPLC Methods. Report of the PMA Quality Control Section Comitte on Pressurized Liquid Chromatography , U.S.A. ( 1983 ) .
29. Connors , K. A. , A Texbook of Pharmaceutical Analysis , 2a. ed. , Wiley - Interscience , U.S.A. , ( 1975 ) .

11. APENDICES DE FORMULAS APLICADAS A LA  
EVALUACION ESTADISTICA .

11.1. APENDICE I .

EXACTITUD .

- Modelo Probabilístico :

$$t_{\text{calc.}} = \frac{\bar{y} - \mu}{s / \sqrt{n}}$$

- Hipótesis a contrastar :

$$H_0 : \mu = 100 \%$$

$$H_1 : \mu \neq 100 \%$$

- Inferencia :

Si  $t_{\text{calc.}} \leq t_{(0.95, n-1)}$  , no se rechaza  $H_0$  y se puede concluir que el método es exacto ( $\mu = 100 \%$ ).

- Intervalo de Confianza para el 95 % de probabilidad ,  
con  $n - 1$  grados de libertad :

$$I.C._{95\%} = \bar{x} \pm E$$

- Fórmulas :

$$\text{Media Aritmética : } \bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$\text{Desviación Estándar : } S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$\text{Error Estándar Aproximado : } E.S. = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Error Máximo de Estimación  
para el 95 % de probabilidad con  
 $n - 1$  grados de libertad :

$$E = E.S. \cdot t_{(0.975, n-1)}$$

11.2 APENDICE II .

REPETIBILIDAD .

- Modelo Probabilístico :

$$x_i^2 \text{ calc.} = \frac{(n-1) S^2}{\sigma^2}$$

- Hipótesis a contrastar :

$$H_0 : \sigma \leq 2 \%$$

$$H_1 : \sigma > 2 \%$$

- Inferencia :

Si  $x_i^2 \text{ calc.} \leq x_i^2 (0.95, n-1)$  , no se rechaza  $H_0$   
y se puede concluir que el método es repetible ( $\sigma \leq 2 \%$ ) .

- Intervalo de Confianza para el 95% de probabilidad, con  $n - 1$  grados de libertad :

$$\frac{(n - 1) S^2}{\chi^2_{(0.975, n-1)}} \leq \sigma^2 \leq \frac{(n - 1) S^2}{\chi^2_{(0.025, n-1)}}$$

- Fórmulas :

Varianza :

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



## LINEARIDAD .

Inferencias acerca de la Ordenada al Origen ( a ) .

- Modelo Probabilístico :

$$t_{\text{calc.}} = \frac{a - A_0}{S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\sum x)^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}}}$$

- Hipótesis a contrastar :

$$H_0 : a = A_0$$

$$H_1 : a \neq A_0$$

$$\text{Donde : } A_0 = 0$$

- Inferencia :

Si  $t_{\text{calc.}} < t_{(0.95, n-2)}$  , no se rechaza  $H_0$  y se puede concluir que  $a = 0$  .

- Intervalo de Confianza para el 95 % de probabilidad , con  $n - 2$  grados de libertad :

$$a \pm t_{(0.975, n-2)} S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{x_i^2}{(n-1) S_x^2}}$$

Inferencias acerca de la Pendiente ( b ) .

- Modelo Probabilístico :

$$t_{\text{calc.}} = \frac{(b - B_0) S_x \sqrt{(n-1)}}{S_{y/x}}$$

- Hipótesis a contrastar :

$$H_0 : b = B_0$$

$$H_1 : b \neq B_0$$

$$\text{Donde : } B_0 = 1$$

- Inferencia :

Si  $t_{\text{calc.}} > t_{(0.95, n-2)}$ , no se rechaza  $H_0$  y se puede concluir que  $b = 1$ .

- Intervalo de Confianza para el 95 % de probabilidad, con  $n - 2$  grados de libertad :

$$b \pm t_{(0.975, n-2)} \frac{S_{y/x}}{S_{xx} \sqrt{(n-1)}}$$

- Fórmulas :

$$\text{Recta de Regresión : } y = a + b x$$

Ordenada al Origen :

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

Pendiente de la Recta :

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

Coefficiente de Correlación Muestral :

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

Error Estándar de Regresión :

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{(\sum y^2) - a \sum y - b \sum (xy)}{n - 2}}$$

#### 11.4. APENDICE IV .

##### REPRODUCIBILIDAD .

- Modelo Matemático ( 2 Factores Aleatorios ) . :

$$Y_{jik} = \mu + A_j + D_i + AD_{ji} + E_{(ji)k}$$

- Notación :

$Y_{jik}$  = Porcentaje cuantificado con el j-ésimo analista en el i-ésimo día en la k-ésima repetición.

$A_j$  = Efecto del j-ésimo analista en el % cuantificado.

$D_i$  = Efecto del i-ésimo día en el % cuantificado.

$AD_{ji}$  = Efecto debido a la interacción analista - día.

$E_{(ji)k}$  = Error experimental.

- Inferencias :

A ) Efecto por Analista .

$$\text{Si } F_{\text{calc. A}} \leq F_{(0.95)} \text{ con } \frac{\text{G.L.A.}}{\text{G.L.AD.}} = \frac{(j-1)}{(l-1)(j-1)}$$

No existe efecto por analista .

B ) Efecto por Dfa .

$$\text{Si } F_{\text{calc. D}} \leq F_{(0.95)} \text{ con } \frac{\text{G.L.D.}}{\text{G.L.AD.}} = \frac{(l-1)}{(j-1)(l-1)}$$

No existe efecto por dfa .

C ) Efecto por Interacción Analista - Dfa .

$$\text{Si } F_{\text{calc. AD}} \leq F_{(0.95)} \text{ con } \frac{\text{G.L.AD.}}{\text{G.L.E.}} = \frac{(j-1)(l-1)}{(j-1)(k-1)}$$

No existe efecto por interacción analista - dfa .

TABLA DE ANADEV A . - ANALISIS DE VARIANZA -

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Sumatoria de Cuadrados ( S.C. )	Media Cuadrada ( M.C. )	F calculada
$A_j$	$(j-1)$	$\frac{\sum Y_j^2}{lk} - \frac{Y^2}{jlk}$	$\frac{SC_A}{(j-1)}$	$\frac{MC_A}{MC_{AD}}$
$D_l$	$(l-1)$	$\frac{\sum Y_l^2}{jk} - \frac{Y^2}{jlk}$	$\frac{SC_D}{(l-1)}$	$\frac{MC_D}{MC_{AD}}$
$AD_{jl}$	$(j-1) \cdot (l-1)$	$\frac{\sum Y_{jt}^2}{k} - \frac{\sum Y_j^2}{lk} - \frac{\sum Y_l^2}{jk} + \frac{Y^2}{jlk}$	$\frac{SC_{AD}}{(j-1)(l-1)}$	$\frac{MC_{AD}}{MC_E}$

TABLA DI: ANADEVIA ( Continuación ).

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Sumatoria de Cuadrados ( S.C. )	Media Cuadrada ( M.C. )	F calculada
E <sub>(j)k</sub>	(j-1) (k-1)	$\sum y_{jik}^2 - \frac{\sum y_{jt}^2}{k}$	$\frac{SC_E}{jt (k-1)}$	

ESTADÍGRAFO DE CONTRASTE : F ( DISTRIBUCION DE FISHER ).