

302827



UNIVERSIDAD MOTOLINIA A. C.

ESCUELA DE QUIMICA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO POR
C. L. A. R. PARA LA CUANTIFICACION DE BUMETANIDA EN
TABLETAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

PRESENTA
JUAN CARLOS ALVARADO CASTAÑEDA

México D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

INDICE

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1- Planteamiento del problema	1
1.2- Objetivo	2
1.3- Hipótesis	2

CAPITULO II

ANTECEDENTES	3
2.1 GENERALIDADES	3
2.1.1 Monografía de la Bumetanida	
2.1.2 Métodos analíticos para la determinación de la Bumetanida	4
2.1.3 Farmacología	6
2.2. CROMATOGRAFIA	9
2.2.1 Equipo utilizado en CLAR	13
2.2.2 Parámetros cromatográficos	17
2.2.3 Métodos de cuantificación en CLAR	19
2.3. VALIDACION	22
2.3.1 Parámetros de validación	25

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DIAGRAMA DE FLUJO	27
3.1.1. Diagrama de flujo para la validación del método	27
3.1.2. Diagrama de flujo para la preparación de la muestra	28
3.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO	
3.2.1. Material	29
3.2.2. Reactivos	29
3.2.3. Equipo	30
3.3 METODOLOGIA	
3.3.1. Fase Móvil	30
3.3.2. Preparación del Estándar	30
3.3.3. Preparación de la Muestra	31
3.3.4. Procedimiento de Análisis	32
3.3.5. Parámetros a evaluar	
3.4- ANALISIS ESTADISTICO	37

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUCION	44
4.1 RESULTADOS	44
4.2 DISCUCION	56

CAPITULO V

CONCLUSIONES	58
BIBLIOGRAFIA.	59

AGRADECIMIENTOS

**A MIS PADRES, CON CARIÑO Y PROFUNDO AGRADECIMIENTO
POR EL APOYO QUE ME HAN DADO EN CADA MOMENTO.**

**A MIS HERMANOS ANGELICA, ADRIANA, CRISTY, Y ALEJANDRO,
QUIENES SON PARTE MUY IMPORTANTE EN MI VIDA.**

A MI ABUELA, SIEMPRE PRESENTE EN MI CORAZON.

**A LOS LABORATORIOS SENOSIAIN S.A. DE C.V. POR TODAS LAS
FACILIDADES PROPORCIONADAS PARA LLEVAR AL CABO ESTE
TRABAJO EXPERIMENTAL.**

**A LA Q.F.B. GRACIELA SOSA GARCIA POR SU VALIOSA
COLABORACION EN ESTE TRABAJO.**

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La validación de métodos analíticos es parte fundamental del desarrollo de una nueva formulación y de la técnica de análisis de control de calidad de una forma farmacéutica, ya que es durante esta secuencia de pruebas y análisis, en donde el químico se da cuenta si el estudio, el cual esta siendo evaluado sistemáticamente, cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado. (16)

El principal objetivo de toda industria farmacéutica sin lugar a dudas es la de fabricar productos de buena o excelente calidad al más bajo costo y para lograr este objetivo los principales departamentos involucrados son, producción, aseguramiento de la calidad, control de calidad, desarrollo farmacéutico y validación departamentos médulares de toda industria farmacéutica.

En particular, el concepto validación enfocado a métodos analíticos se refiere a establecer mediante pruebas experimentales realizadas en el laboratorio, que un procedimiento cumple satisfactoriamente con los requisitos establecidos para poder considerarse adecuado para los fines o aplicaciones analíticas que se pretenden, es decir, que validar es evaluar la capacidad analítica del método expresada dicha capacidad en parámetros estadísticos. (16)

La Bumetanida es un potente diurético que se encuentra dentro de los llamados diuréticos del asa. Debido a su potencia la presentación de este fármaco es en tabletas conteniendo 1 mg del activo, y en solución inyectable conteniendo 0.5 mg/ml.

Aunque se reportan métodos analíticos para su control, estos adolecen de algunas fallas por lo que se vió la necesidad de desarrollar uno, completamente confiable y que quedará debidamente validado.

1.2 OBJETIVO

Comprobar por medio de análisis estadísticos de los resultados y de las pruebas de laboratorio, que el método analítico desarrollado y validado es adecuado para el control de calidad del producto y cumple con los requisitos mínimos necesarios para los cuales fue diseñado.

1.3 HIPOTESIS

El método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución desarrollado para la determinación y cuantificación de Bumetanida en tabletas cumple con los requisitos mínimos necesarios para considerarse válido, de acuerdo a las condiciones establecidas.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1 GENERALIDADES

2.1.1 Monografía de la Bumetanida

Químicamente la Bumetanida es el 3-Butilamino-4-fenoxi-5-acido sulfaminobenzoico. (1)

Peso molecular: 364.4 (1)

Formula condensada: $C_{17}H_{20}N_2O_5S$ (1)

Descripción: Físicamente es un polvo de color blanco, sin olor característico y de sabor amargo. (1)

Valoración o ensayo: Contiene no menos de 95.0% y no más de 105% de Bumetanida cuando se valora por CLAR. (1)

Solubilidad: Es soluble en agua y soluciones alcalinas. (1)

Perdida al secado: Al ser sometido a una temperatura de 105°C por cuatro horas pierde como máximo el 0.5% de su peso (1)

2.1.2 Se han reportado los siguientes métodos para la determinación de Bumetanida.

a) Análisis de Bumetanida en orina humana por CLAR con detección por fluorescencia y cromatografía de gases-espectrofotometría de masas.-

Muestras de orina y estándar en orina libre conteniendo bumetanida (1000 ng mL min) fue acidificada con HCl 0.01M (1mL), y se adiciona como estándar interno bendroflumetiazida. El fármaco se extrae con acetato de etilo (5 mL), la mezcla se centrifuga a 3000 rpm por 5 minutos y la fase orgánica se seca bajo atmósfera de nitrógeno a 40°C. El residuo fue disuelto con metanol (100 µl) y una porción de (2µl) fue analizada por CLAR en una columna Hypersil ODS (10 cm X 2.1 mm, 5 micras) operada a 40°C. La fase móvil (0.3 mL/min) fue en gradiente lineal de acetato de amonio 0.05M:Acetonitrilo (9:1 cambiando a 2:3 en 10 min) con elución isocrática de 10 minutos; la detección fluorimétrica fue a 426 nm (excitación a 231 nm) para fluorescencia y a 426 nm (excitación a 223 nm) para cromatografía de gases-espectrofotometría de masas. Para esta última fue disuelta en cloroformo y metilada con iodometano en presencia de tetrabutilamonio hidrogensulfato y sosa para su determinación en una columna de sílica (12.5 cm X 0.25 mm) de DB-1| (0.25 micras) temperatura programada de 80°C a 200°C. (10)

b) Determinación coulométrica de Bumetanida y Furosemida.-

La Bumetanida y Furosemida fue determinada por titación coulométrica con cloro electrogenerado en un soporte electrolítico de ácido sulfúrico 0.5M y cloruro de sodio 0.2M y anaranjado de metilo como indicador. El método es exacto y reproducible y puede ser aplicado a productos farmacéuticos. (13)

c) Determinación de Bumetanida en plasma humano y orina por CLAR con detector de fluorescencia.-

La Bumetanida fue extraída de las muestras citadas con acetato de etilo a pH ácido. El extracto orgánico se evaporó, y el residuo fue disuelto en metanol. La separación se realizó en una columna (10 cm X 5mm) de empaque cubierto con ODS (4 micras) con metanol-agua-ácido acético concentrado (700:300:1) como fase móvil (1.2 mL/min) y detección fluorimétrica a 418 nm (228 nm de excitación). El ácido 4-bencil-3-butilamino-5-sulfamolbenzoico fue el estándar interno. Las gráficas de calibración fueron rectilíneas para Bumetanida en concentraciones de 2.5 a 100 ng/mL/min en plasma y 20 a 500 ng/mL/min en orina. Los coeficientes de variación fueron de 6% para plasma y 4% para orina. (20)

d) Métodos espectrofotométricos para determinación de algunos diuréticos usando 3-metil benzotiazolin-2-1 hidrazona.-

Amilorida, Bumetanida y Furosemida fueron determinados con el uso de 3-metil benzotiazolin-2-1 hidrazona como reactivo espectrofotométrico. Los diuréticos mencionados fueron hidrolizados con un álcali como oxidante antes de la reacción con el reactivo. La absorbancia fue medida a 545, 660, y 630 nm para Amilorida, Bumetanida, y Furosemida respectivamente, el color fue estable por 2 horas. Los métodos descritos fueron aplicados a formas de dosificación. Los resultados fueron tabulados.(21)

e) Detección de diuréticos en orina de caballo por Cromatografía de gases -

Orinz de caballo fué ajustada a pH de 5 con ácido fosfórico 1.0M aplicado a una columna de Extrelut 3 con elución de acetato de etilo. El eluato fué aplicado a una columna de Kieselghur seguido por una elución con acetato de etilo y evaporación hasta secado del eluato. El residuo fue mezclado en un vortex con uno de dos reactivos (hidroxido de N-trimetilamina o N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida) o una mezcla de ambos. Una porción de 2 microlitros de solución fué analizada por cromatografía de gases en una columna (12.5m 10.2 mm) de HP-1 (0.33 micras) operada a 90° a 200°C por minuto con helio como gas acarreador. Las gráficas de calibración fueron rectilíneas de 1.25 a 10 ng ml/min de Bumetanida, Furosemida y ácido etacrínico. Los límites de detección fueron de 40 ng ml/ min y los recobros fueron de 31 a 48%. (22)

2.1.2 Farmacología:

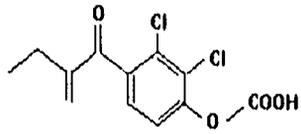
DIURETICOS:

Los diuréticos son drogas que se emplean para aumentar el volumen de orina excretado por los riñones. Se usan principalmente para aliviar el edema y la ascitis que pueden presentarse en enfermedades cardíacas, renales y hepáticas.

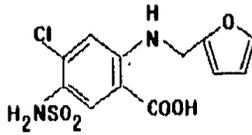
DIURETICOS DEL ASA:

El término techo alto o elevado o similares se ha usado para determinar un grupo de diuréticos de acción característica sobre la función tubular renal. Estas drogas logran una diuresis máxima mucho mayor que la observada con otros agentes. El principal sitio de acción es la rama ascendente gruesa del asa de Henle. Por ende, estos agentes también se denominan diuréticos del asa. En los Estados Unidos hay tres drogas de esta clase aprobadas para su uso clínico: Acido Etacrínico, Furosemida y Bumetanida. Hay cierto número de otros compuestos de esta tipo, algunos de los cuales se usan clínicamente en otros países como la Muzolimina y Etozolina. (6)

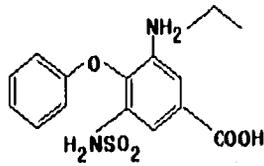
Estos agentes tienen la siguiente estructura química:



ACIDO ETACRINICO



FUROSEMIDA



BUMETANIDA (6)

La Bumetanida tiene mayor potencia por miligramo que la Furosemida y el Acido Etacrínico, pero en otros aspectos los componentes son similares. Los diuréticos de techo alto actúan principalmente inhibiendo la reabsorción de electrólitos en la rama ascendente gruesa del asa de Henle. Hay tres líneas principales de evidencia que avalan esta afirmación. En primer lugar, estos agentes virtualmente eliminan la producción positiva y negativa del agua libre, en la cual la rama ascendente desempeña un papel central. En segundo lugar, experimentos con micropunción demuestran un aporte mucho mayor de sodio y cloro a la parte inicial del túbulo distal. En tercer lugar, en experimentos con microperfusión in vitro hay una total inhibición del transporte de cloruro de sodio en la rama ascendente gruesa con concentraciones lumbales de la droga en el espectro esperado in vivo. Las drogas actúan en la cara luminal de las células epiteliales inhibiendo el mecanismo de contranporte para la entrada de sodio y cloro. Estos agentes tienden a aumentar el flujo sanguíneo renal sin incrementar la tasa de filtración, especialmente luego de la inyección intravenosa. (6)

Los diuréticos del asa se absorben rápidamente por vía oral, aunque con grados variables. Por ejemplo, la biodisponibilidad de la Furosemida es de aproximadamente un 65%, mientras que la de la Bumetanida es de casi 100%. El Acido Etacrínico, Furosemida y Bumetanida se unen ampliamente a las proteínas plasmáticas, pero son rápidamente secretadas por el sistema de transporte de ácidos orgánicos del túbulo proximal. De esta forma llegan al líquido tubular y finalmente a su sitio de acción. (11)

En base a la dosis, la Bumetanida es de 40 a 60 veces más potente que la Furosemida. Cuenta con excelente absorción por vía oral alcanzando niveles hemáticos superiores a la Furosemida. Muestra su efectividad desde los primeros 30 minutos, alcanza su máxima actividad a los 90 minutos y esta desaparece de 4 a 6 horas después de su administración. Proporciona mayor potencia y menor pérdida de potasio. A diferencia de la Furosemida y Tiacidas, no produce efectos tetragénicos en animales, así como lesión hepática renal. (11)

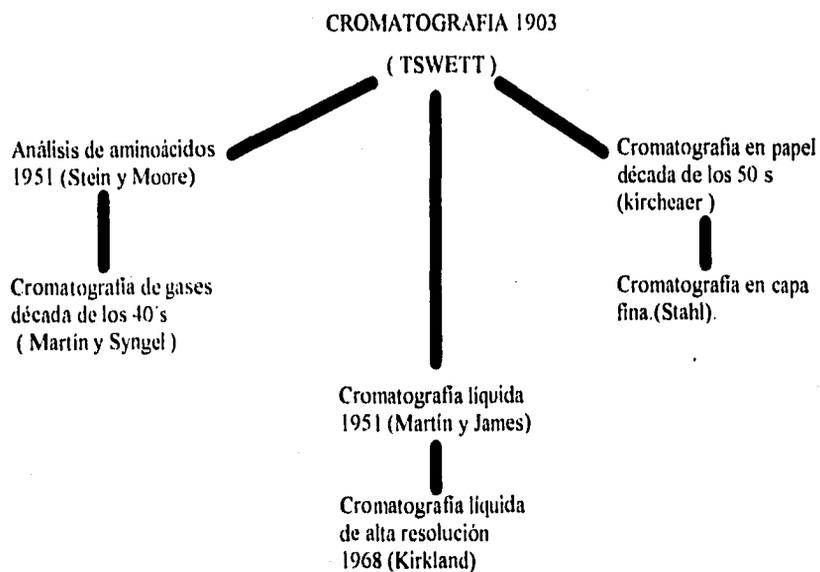
2.2 CROMATOGRAFIA

La CLAR o cromatografía líquida de alta resolución ha tenido una creciente difusión desde comienzos de la década del 70, y hoy representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio analítico moderno, ya sea éste dedicado a la investigación básica o aplicada, industrial biológico o bromatológico. (3)

Según define la IUPAC "la Cromatografía es un método, usado principalmente para la separación de los componentes de una muestra, en donde los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra se mueve. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La fase estacionaria puede estar extendida como una capa o distribuida como una película. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa". (4)

La cromatografía puede clasificarse en modalidades de afinidad y por tamaño molecular. Entre las primeras se encuentran la cromatografía en fase normal, en fase ligada y la de intercambio iónico. El proceso mediante el cual el solvente de la fase móvil arrastra finalmente al soluto, se llama elución. La separación de los componentes de una mezcla en un sistema cromatográfico se debe a que la fase estacionaria retiene con mayor fuerza a los componentes más afines a ella, y por lo tanto, estos componentes tardarán más en eluir. (4)

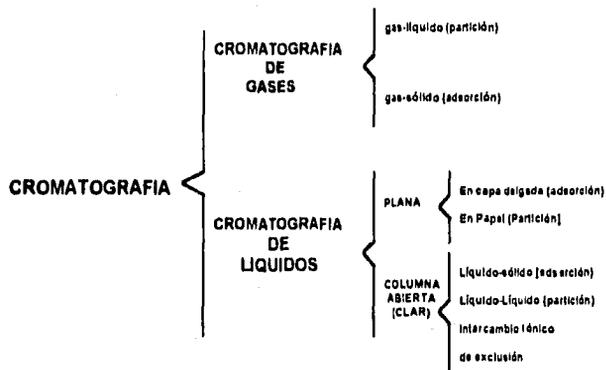
En un principio se pensó que la cromatografía de fase líquida tendría un desarrollo técnico más rápido, sin embargo la cromatografía de gases se comercializó primero, debido principalmente a los problemas en diseño que era necesario superar para desarrollar los instrumentos de la fase líquida de alta resolución. En el cuadro 1 se enumeran los principales hechos históricos en el desarrollo de la cromatografía.



CUADRO I

Como se observa en el cuadro anterior, se incluyeron separaciones por cromatografía tanto en fase líquida como gaseosa, sin embargo en la actualidad se estima que el 70-80% de las separaciones son más fáciles de realizar por cromatografía líquida. (5)

En general, los métodos cromatográficos se clasifican según la naturaleza de la fase móvil:



(5)

Tipos de cromatografía en CLAR

TIPO DE SAPARACION	MECANISMO	MOLÉCULAS QUE SE SEPARAN (algunos ejemplos)	SOLVENTES UTILIZADOS (algunos ejemplos)
Cromatografía de exclusión	separa moléculas por tamaños. Las más grandes eluyen primero.	desde proteínas y carbohidratos hasta metacrilatos y neopreno	tolueno dioxano acetona, H ₂ O
Cromatografía líquido-líquido	Adsorción. - separa en base a polaridad. La menos polar eluye primero.	Hidrocarburos y aromáticos isómeros y compuestos no polares.	orgánicos no ionizables (hexano)
Cromatografía líquido-líquido	Partición del soluto entre 2 solventes inmiscibles "fase estacionaria más polar"	Monosacáridos catecolaminas y aromáticos	polar no polar H ₂ O- acetonitrilo
Cromatografía líquido-líquido (fase reversa)	partición del soluto 2 solventes inmiscibles "fase móvil más polar"	Herbicidas ácidos grasos	H ₂ O con modificadores orgánicos.MEOH
Cromatografía por intercambio iónico	Iones de las muestras se intercambian con un contra-ión	Antibióticos	diversos amortiguadores orgánicos

(5)

2.2.1 Equipo utilizado en CLAR

El notorio avance que la cromatografía líquida moderna ha experimentado en los últimos años, en especial en lo referente al desarrollo de nuevas fases estacionarias, ha permitido al analista acceder a un nivel instrumental de alta precisión compuesto por bombas que permiten entregar (en un solo instrumento) volúmenes muy estables que varían entre el microlitro y varios mililitros, detectores con celdas intercambiables en las cuales el volumen puede escogerse, generalmente entre 1 y 15 microlitros válvulas accionadas por microprocesadores que permiten direccionar la fase móvil para automatizar procesos, integradores versátiles, aislados o conectados a una computadora que puede permitir no solo el control global de uno o más equipos cromatográficos sino la libre manipulación y almacenamiento de datos, generación de reportes e incluso el desarrollo automático de métodos. Básicamente, los equipos de CLAR pueden clasificarse en integrados y modulares. En los primeros, cada una de sus partes (reservorio de solventes, bomba, inyector y detector) están reunidas en un gabinete y su intercambio o conexión con otros componentes de la misma o diferente marca es difícil. Permiten en cambio un mejor aprovechamiento del espacio, menos cables, tuberías y conexiones expuestas y quizás menores riesgos frente a operadores ocasionales poco experimentados. En los segundos, los módulos son instrumentos individuales que permiten no solo armar el equipo según la necesidad del analista sino aumentar la complejidad según esa necesidad varíe. Esta conformación es además una buena defensa ante el "síndrome de la caja negra" dicho de otro modo, la visualización de cada componente permite no solo el mejor conocimiento y control visual del equipo, sino el mejor aislamiento y resolución de problemas cuando estos se producen. (4)

Reservorio de la fase móvil:

El reservorio es el recipiente que contiene la fase móvil. Puede ubicarse "dentro de la caja negra" de un equipo integrado o externamente en un equipo modular, y en general algunos centímetros sobre el nivel de la bomba para que la fuerza de gravedad dirija el solvente hacia ésta, manteniendo llenas las conexiones. puede emplearse como reservorio de fase móvil cualquier frasco de laboratorio de buena calidad (de vidrio o polímero resistente), con una tapa adecuada para prevenir el ingreso de partículas ambientales al sistema. Los sistemas que necesitan procesos de desgasificación están provistos de una tapa especialmente diseñada para tal fin, en el cual podemos encontrar un orificio para la entrada de gas inerte de desgasificación, otro para la salida del solvente y una válvula que permite una presión del gas sobre el solvente venteadando el exceso. (15)

Columnas:

Consisten en un tubo cilíndrico empacado con la fase estacionaria; el material de construcción de la columna, su forma y sus dimensiones, el material de empaque y otras características de las columnas son de mucha importancia para el desempeño del sistema cromatográfico. Existen en el mercado una gran cantidad de columnas listas para utilizarse, y su elección depende de las necesidades específicas de cada caso. (15)

Bombas:

Las características más importantes con las cuales debe contar un sistema de bombeo para CLAR pueden ser la reproducibilidad, velocidad de flujo, presión media adecuada y componentes resistentes a solventes. En general los sistemas de bombeo se pueden dividir en dos grupos: de presión constante y de flujo constante. Las bombas de CLAR impulsan la fase móvil proveniente del reservorio de solvente hacia el inyector, y desde allí hacia la columna. Existen bombas capaces de entregar caudales muy pequeños, del orden de los microlitros/minuto para la cromatografía microbore, pasando a los caudales de unos pocos mililitros/minuto para la cromatografía analítica convencional hasta valores mucho mayores para las separaciones semipreparativas y preparativas. (15)

Inyectores:

El inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal de solvente a través del sistema. Se dividen en dos, manuales y automáticos. La precisión obtenida con los inyectores automáticos en general es superior a la de los inyectores manuales, por que no dependen de la habilidad del operador. Los inyectores automáticos deben contener, además de la válvula de inyección y del mecanismo que permite su llenado, un dispositivo para colocar las muestras a inyectar, en general un carrusel que aloja viales donde se colocan las muestras. Las válvulas se accionan con motores eléctricos o por medios neumáticos ya sea empleando aire comprimido, nitrógeno o helio. Algunos equipos permiten controlar el avance y el retroceso del carrusel. de esta manera es posible que el vial conteniendo solución estándar sea inyectada al principio del análisis e intercalarse tantas veces como sea necesario entre las soluciones muestra ya sea para el control de la precisión o para recalibrar el instrumento. (15)

Detectores:

El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite "ver" y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica. El detector ultravioleta es el más empleado en HPLC. Posee buena sensibilidad y rango lineal, y permite detectar analitos en el orden de los nanogramos. No es destructivo y puede emplearse con gradientes de solventes, con la única limitación de que éstos sean transparentes en la longitud de onda de trabajo. En general permiten cambiar el volumen de su celda. típicamente con volúmenes de 1 a 12 microlitros. Es un detector muy poco sensible a los cambios de caudal y temperatura. El detector UV opera en el rango de 190 a 350 nm, y en algunos equipos se puede extender a la zona del visible del espectro (350 a 700 nm) recibiendo así el nombre de detector UV/Visible. La concentración del analito en la muestra se determina por la aplicación de la ley de Beer:

$$A = (a) (b) C$$

Donde A es la absorbancia, a es la absortividad del analito, b es el camino óptico de la celda medido en centímetros y C es la concentración del analito muestra expresada en moles/l.

Existen dos tipos de detectores UV: de longitud de onda fija y de longitud de onda variable (21)

Sistema de toma y procesamiento de datos:

El resultado del ensayo es, por un lado, la obtención de fracciones separadas de los componentes de la muestra, y por otro, la de un gráfico o cromatograma, de cuya interpretación pueden extraerse conclusiones cualitativas y cuantitativas. Este registro y la eventual manipulación se obtienen a partir de la señal proveniente del detector por medio de un sistema de toma y procesamiento de datos, entre los que se citan:

Registrador gráfico, que convierte la señal de un gráfico del tipo X-Y.

Integrador. que permiten no sólo obtener un registro gráfico (cromatograma) sino también su tratamiento matemático para el cálculo de concentraciones.

Computadora. Básicamente, el integrador es una computadora de uso muy específico. Permite con el Software apropiado tanto el registro gráfico del cromatograma como los cálculos apropiados, la manipulación de datos el almacenamiento de ensayos, generación de reportes, e incluso el manejo global de varios cromatógrafos. Como las computadoras necesitan señales digitalizadas, se necesita una interface analógica-digital que convierta la señal analógica entregada por el detector. (15)

2.2.2 Parámetros cromatográficos

La cromatografía, como cada rama de la ciencia química, tiene un lenguaje particular. Evidentemente, como cada laboratorio no constituye una isla independiente y sus ensayos son compartidos, publicados y discutidos en los medios que correspondan, se hace necesario unificar lenguaje y estandarizar los términos empleados. Así, la nomenclatura en cromatografía fue estandarizada por la American Society For Testing and Materials, y la International Unión of Pure and Applied Chemistry, y es naturalmente, materia de constante debate y actualización. La elución de un compuesto a través de un sistema cromatográfico idealmente da origen a una curva de tipo gaussiana al graficar la respuesta del detector, que es proporcional al número de moléculas que salen de la columna, contra el tiempo de elución.

Las principales características o parámetros de los picos cromatográficos son:

-Tiempo muerto: Es el tiempo requerido por un compuesto no absorbido o no retenido, para migrar desde su entrada a la columna hasta el fin de la misma, sin ningún retardo por efecto de la fase estacionaria.

-Tiempo de retención: Es el tiempo medido entre la inyección y la elución de la concentración máxima del soluto enésimo (máxima señal), la distancia entre este máximo de la señal y la línea de base es la altura del pico en cuestión.

-Area bajo la curva: Representa la cantidad de moléculas obtenidas de cada soluto de la muestra.(3)

-Resolución: Nos va a expresar cuantitativamente la calidad de separación, y si el sistema cromatográfico es capaz de separar a dos compuestos entre si. Se define como la diferencia entre los tiempos de retención de dos picos dividida entre el promedio del ancho de la base, expresado en términos de tiempo.

-Número de platos teóricos: La eficiencia de una columna cromatográfica y por la tanto su poder separativo se mide en función de su número de platos teóricos. El concepto de plato teórico es un modelo físico capaz de reproducir lo que sucede en el interior de la columna cromatográfica, según se va produciendo la separación. Si consideramos que el interior de la columna está constituido no por partículas, sino por una serie de tamices sucesivos, en los que la luz del tamiz es el paso libre y su zona impenetrable es la retención, cada uno de estos tamices constituirá un plato teórico. Por lo tanto, al aceptar que la separación cromatográfica se realiza en torno a zonas transversales imaginarias, entre más platos posea la columna, más eficiente será.

Al número de platos teóricos se le asigna el concepto de eficiencia de la separación cromatográfica, pues entre mayor sea el número, la capacidad separativa de la columna será mayor. El número de platos teóricos, esta en función de la distribución estadística de las moléculas respecto al tiempo que tardan en salir de la columna. Cuanto mayor sea el número, la agudeza del pico será mayor.

-Factor de coe: La asimetría es una de las formas más comunes de alejamiento de la curva gaussiana y su medición es importante puesto que puede llevar, de acuerdo a su magnitud, a errores considerables de cuantificación, e incluso a oscurecer picos adyacentes. El lenguaje comúnmente empleado en CLAR, utiliza términos y símbolos característicos como son: tiempo de retención, tiempo muerto, tiempo de retención ajustado, factor de capacidad, resolución, factor de selectividad, etc., por lo que resulta importante señalar su definición, la importancia operacional y la forma en que se evalúa cada uno de ellos.

2.2.3 Métodos de cuantificación en CLAR

La cuantificación de los picos cromatográficos puede realizarse midiendo su área o altura. Como la concentración de un analito es directamente proporcional al área que genera, cualquier factor que modifique el valor del ancho del pico influirá sobre la cuantificación por altura. A eficiencia constante, un aumento en los tiempos de retención va acompañado de un aumento en el valor del ancho del pico, y consecuentemente, de una disminución de la altura. Asimismo, cualquier parámetro que modifique la eficiencia de la columna modificara el valor del ancho del pico. En contrapartida, las mediciones de área resultan poco precisas cuando no se puede definir exactamente la línea base. Así resulta más conveniente medir alturas en caso de picos parcialmente resueltos, de picos con Tailing muy severo, y en el análisis de trazas si la línea de base es muy ruidosa. La concentración del analito en la muestra se puede calcular por diferentes métodos, la selección de estos depende del tipo de muestra, del nivel de precisión requerido y de la existencia o no de sustancias de referencia. Los métodos más utilizados son:

-Estándar interno: El método del estándar interno consiste en agregar cantidades exactamente medidas de una sustancia así denominada, tanto a la muestra como a un estándar que contiene al analito, preparado con la misma concentración que la muestra. Para determinar la concentración del analito en la muestra se calcula la relación de áreas de analito y estándar interno tanto en la muestra y como en el estándar y se efectúa el cociente entre ambas es decir:

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

P= Es el porcentaje del analito en la muestra.

R_m y R_s= Son las relaciones de área de analito a estándar interno en la muestra y el estándar respectivamente.

C_s= Es la concentración del estándar.

D= Es un factor de dilución.

Este método requiere de patrones de referencia, al igual que el método del estándar externo, por lo cual su exactitud dependerá de la pureza de los mismos.

El método del estándar interno no es sensible a los errores de inyección debido a que estos errores se compensan al utilizar relaciones de áreas y, en algunos casos, pueden compensarse los errores generados en la preparación de la muestra como ser dilución extracción y derivatización. La utilidad del estándar interno para compensar los errores de dilución es innegable, aunque en el caso de la derivatización y extracción, los resultados deben manejarse con cuidado porque es posible empeorar los resultados en lugar de mejorarlos.

-Estándar externo: El estándar externo es, sin lugar a dudas, el método de cuantificación más utilizado en CLAR. consiste en la preparación de estándares de concentración semejante al analito en la muestra y en el ensayo cromatográfico de ambas, muestra y estándar, en las mismas condiciones operativas. La concentración del analito en la mezcla se determina comparando el área correspondiente al estándar de referencia. Es decir:

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

P= Es el porcentaje del analito en la muestra.

A_m Y A_s= Son las áreas de las muestras y estándar respectivamente.

C_s= Es la concentración del estándar.

D= Es un factor de dilución.

Este método requiere, obviamente, la utilización de un estándar de referencia y la exactitud dependerá ampliamente de la calidad del estándar utilizado. La precisión de los datos que se obtienen depende tanto de la preparación de la muestra y el estándar como de la inyección de ambos, ya que utilizando esta modalidad de trabajo, ninguna de las dos operaciones se compensa. De hecho, la precisión de esta metodología es muy sensible a los errores de inyección. Por ello, para mejorarla se suelen realizar varias inyecciones de cada muestra. Además, para evitar la falta de precisión originada en las variaciones ambientales se pueden correr alternativamente muestras y estándar o intercalar estándares después de un grupo de muestras.

2.3 VALIDACION

La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requerimientos para las aplicaciones analíticas deseadas; así como de establecer un procedimiento general para asegurar la adecuabilidad y efectividad de los métodos cromatográficos. (7)

El empleo de una técnica analítica implica un riesgo si dicha técnica no ha demostrado ser confiable. En muchas ocasiones se presenta el problema de seleccionar la técnica analítica más apropiada para la determinación de un compuesto. Consecuentemente, el desarrollo de procedimientos analíticos tiene que ser evaluado para seleccionar el más adecuado, esta evaluación se representa por medio de cantidades como precisión, exactitud, límites de detección y linealidad. (7)

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir, el método debe probarse para determinar su efectividad. El proceso de validación de un método en particular está basado en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos prácticos de medición. En la aplicación de los criterios de evaluación de un método analítico prevalecerá ante todo la experiencia y el criterio de la persona que lleve al cabo la validación. (19)

Todas las medidas analíticas cuantitativas están sujetas a errores. Es importante que en la validación del método analítico se obtengan resultados de manera que el error pueda ser estimado y de significancia establecida. Es de gran importancia distinguir entre el error aleatorio y error sistemático, ya que sus causas y efectos son diferentes. El error aleatorio puede deberse a diversas causas, y provoca una desviación de los resultados hacia ambos lados del valor real. Los errores sistemáticos tienen en general una causa constante, por ejemplo, la liberación incompleta del principio activo, y

Las etapas importantes que se deben de considerar para la validación de métodos analíticos son las siguientes:

-DISEÑO

Comprende una revisión bibliográfica exhaustiva, con la finalidad de conocer las propiedades físicas, químicas, estabilidad, interacciones del principio activo, así como referencias para la cuantificación del mismo principalmente por CLAR. (7)

-ADAPTACION PARCIAL

En esta etapa, como su nombre lo dice, comprende una adaptación parcial, esto es parte de las condiciones de preparación de las muestras, así como de las condiciones cromatográficas reportadas en la literatura se adaptan en el diseño del método analítico objeto de estudio. (7)

-ADAPTACION TOTAL

Es la reproducibilidad fiel de un método analítico reportado en la literatura. En otras palabras, es la adaptación absoluta de las condiciones de operación que nos especifica un método analítico que se toma como referencia. (7)

-DESARROLLO

Tomando como antecedente que se va a realizar una adaptación parcial del método analítico, en primera instancia, la etapa de desarrollo cubrirá los siguientes puntos:

- * Condiciones cromatográficas preliminares
- * Optimización
- * Fase móvil
- * pH
- * Fuerza iónica
- * Flujo
- * Columna analítica
- * Tipo de detección
- * Solvente de elección
- *Tiempo de agitación

2.3.1 Parámetros de validación

Linealidad: La linealidad del sistema o método analítico es su capacidad para asegurar que la respuesta analítica es directamente proporcional a la concentración de la sustancia, dentro de un intervalo determinado que incluye el 100%. (18)

Especificidad: Es la propiedad del método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra, ya sean excipientes o productos de degradación. (18)

Recobro: Es la medida de la eficacia de la extracción del analito de la matriz. Se puede determinar analizando placebos añadidos con diferentes concentraciones del principio activo, comparando la cantidad adicionada con la cantidad recuperada por el método analítico. (18)

Precisión: Es el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una misma fuente; se ve afectada por errores aleatorios. (18)

Exactitud: Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se ve afectada por los errores sistemáticos. (18)

Reproducibilidad: Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes como son incluir tanta variables como se pudieran encontrar en el uso normal del método; los resultados obtenidos deben interpretarse estadísticamente (18).

Estabilidad de la muestra analítica: Es la propiedad de una muestra preparada para su análisis, de conservar su integridad física y la concentración de la sustancia de interés, ya que esta se puede descomponer antes de ser cuantificada, durante la preparación de las muestras o en su almacenamiento cuando ya han sido preparadas. Se determina evaluando el periodo de tiempo en el cual la muestra puede permanecer, en determinadas condiciones de almacenamiento, sin que pierda precisión en los resultados de análisis. (18)

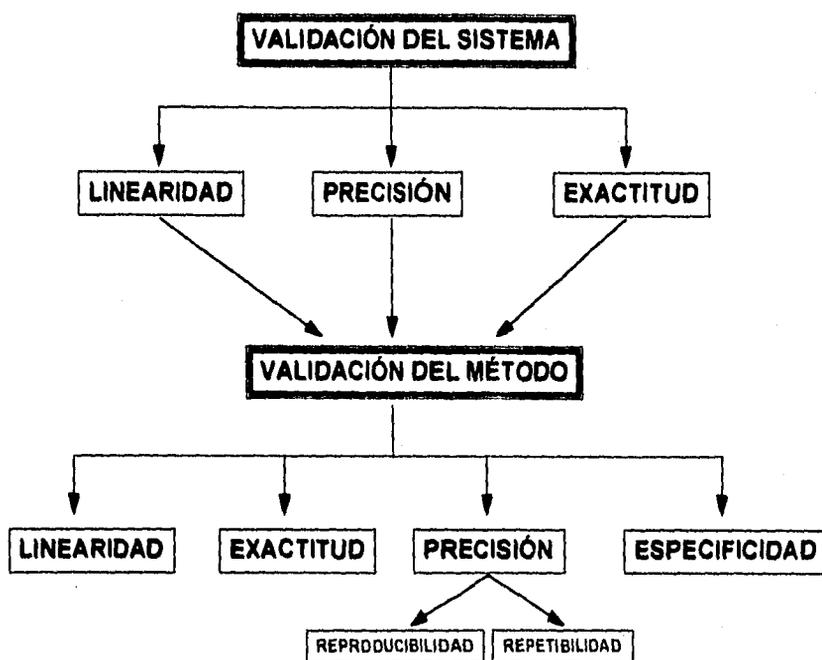
Límite de detección y de cuantificación: El límite de detección se define como la mínima cantidad del analito de una muestra cuya respuesta se puede distinguir de la respuesta del blanco. El límite de cuantificación es la mínima cantidad del analito que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas. (18)

CAPITULO III

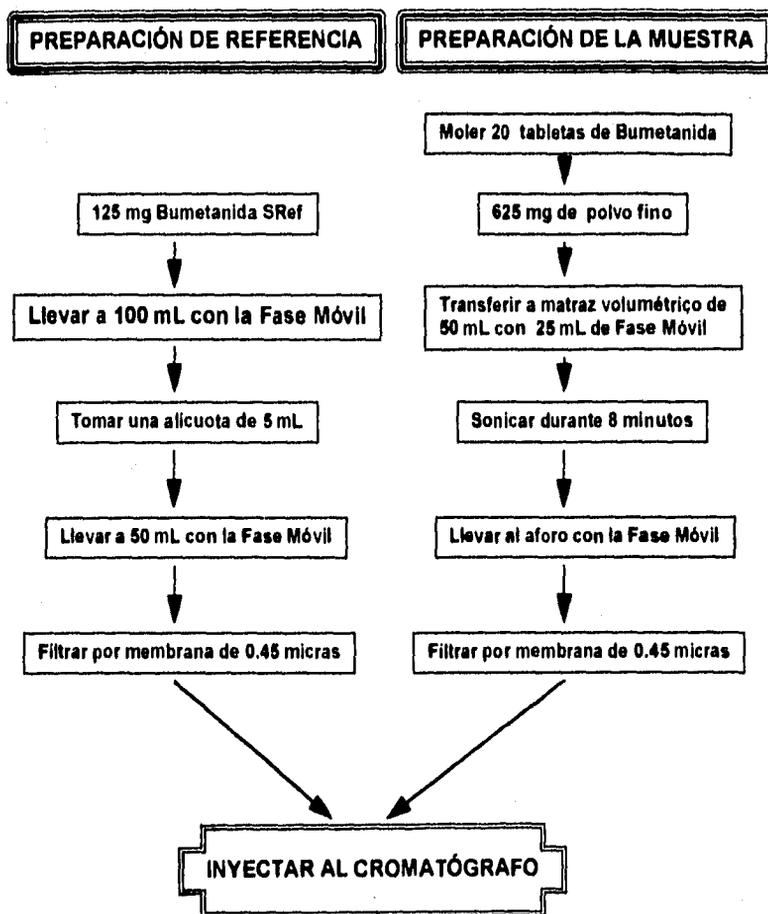
PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DIAGRAMAS DE FLUJO

3.1.1 Diagrama de flujo para la validación del método



3.1.2 Diagrama de flujo para la preparación de la muestra



3.2 MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS

3.2.1 Material

Matraces volumétricos de 50 ml.

Pipetas volumétricas de 5 ml.

Matraces volumétricos de 100 ml.

Probetas graduadas de diversas capacidades.

Membranas Millipore HV de 0.45 micras

Membranas Millipore FH de 0.5 micras

Mortero

Tubos de ensayo de 25 ml.

3.1.2 Reactivos

-Patrón de referencia de Bumetanida U S P.

-Metanol grado CLAR (MALLINCKRODT)

-Tetrahidrofurano grado CLAR (MERCK S.A)

-Acido acético glacial (MERCK S.A)

-Agua purificada U S P.

3.2.3 Equipo

- Balanza analítica Mettler AT-400
- Baño de Ultrasonido NEY-300
- Potenciometro Beckman-72pH Meter
- Columna de acero inoxidable Hypersil ODS, (200 X 4.6 mm) empacada con microparticulas de silica porosa de 5 micras de diámetro, recubiertas con octadecilsilano.
- Bomba cuaternaria marca Hewlett Packard serie 1050
- Inyector automático marca Hewlett Packard serie 1050
- Detector con longitud de onda variable marca Hewlett Packard serie 1050
- Computadora Hewlett Packard modelo Vectra Q5/165 equipada con Software para cromatografía Chemm-Station HP.

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 Fase móvil

Preparar una mezcla de METANOL:AGUA:TETRAHIDROFURANO (65:30:5) filtrar y desgasificar por medio de una válvula de helio integrada en el equipo

NOTA: El agua se ajusta a pH de 3 con ácido acético glacial.

3.3.2 Preparación del estándar.-

Pesar con exactitud, aproximadamente 125 mg del patrón de referencia de Bumetanida USP, transferir a un matraz volumétrico de 100 ml, disolver y llevar a volumen con la fase móvil, transferir una alícuota de 5 ml, de esta solución a un matraz volumétrico de 50 ml, mezclar y llevar a volumen con la fase móvil. (Esta solución contiene aproximadamente 125 µg/ml de Bumetanida).

3.3.3 Preparación de la muestra

Pesar no menos de 20 comprimidos, calcular su peso promedio y triturarlos hasta polvo fino. Pesar aproximadamente el equivalente a 6.25 mg de Bumetanida y transferir a un matraz volumétrico de 50 ml agregar 25 ml de la fase móvil, sonicar durante 8 minutos y llevar a volumen con la fase móvil, mezclar y filtrar a través de una membrana con tamaño de poro de 0.45 micras de diámetro eliminando la primera porción del filtrado. (Esta solución contiene aproximadamente 125 µg/ml de Bumetanida).

3.3.4 Procedimiento de análisis:

Flujo: 1 ml/min

Volumen de inyección: 10 µl

Longitud de onda: 254 nm.

Injectar por quintuplicado volúmenes iguales de la preparación del patrón de referencia, calcular el coeficiente de variación el cual no debe ser mayor del 1.5%.

Una vez cumplidas las condiciones anteriores se inyecta por separado volúmenes iguales de la muestra, medir la repuesta del pico (AREA) correspondiente a la bumetanida mediante la formula:

$$\% \text{ de contenido} = \frac{A_m \cdot W_x \cdot P_s}{A_s \cdot W_m \cdot 200} \cdot W_s$$

DONDE:

A_m: Area relativa obtenida en el cromatograma de la preparación de la muestra.

A_s: Area relativa obtenida en el cromatograma de la preparación del patrón de referencia.

P_s: Pureza del patrón de referencia

W_s: Peso del patrón de referencia en mg

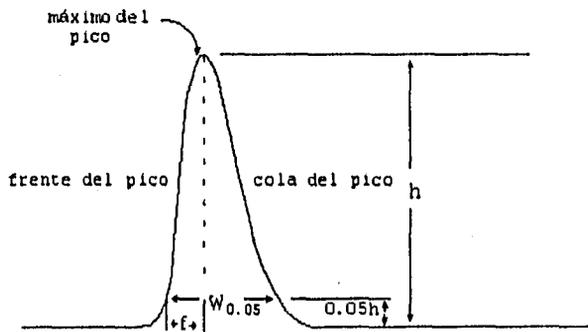
W_m: Peso de la muestra en mg

W_x: Peso medio de una tableta.

3.3.5 Parámetros a evaluar

ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

Es generalmente deseable asegurar la adecuabilidad y efectividad de los sistemas de operación cuando se emplean métodos cromatográficos, por lo que es conveniente hacer ajustes en las condiciones de operación para obtener cromatogramas y operaciones aceptables. Para asegurar la efectividad del sistema de operación final, éste debe estar sujeto a pruebas de adecuabilidad previo a su uso. La esencia de ésta prueba es el concepto de que la electrónica, el equipo, las muestras y las operaciones analíticas constituyen un sistema analítico único, que es responsable de las funciones de todo sistema. Los datos específicos son colectados de inyecciones replicadas de la preparación de la muestra o preparación del estándar. Estos son comparados con valores máximos y mínimos, tales como eficiencia, precisión interna, factor de coleo, resolución, tiempo de retención, naturaleza de la curva de calibración, respuesta y recobro, como se especifica en la monografía individual



DETERMINAR:

A) Número de platos teóricos de la columna para la bumetanida, según la fórmula:

$$n = \frac{T^2}{W} \cdot 16$$

Donde:

T= Tiempo de retención en segundos

W= Ancho de la base del pico.

B) Factor de coileo del pico de la Bumetanida según la fórmula:

$$T = \frac{W \cdot 0.05}{2 F}$$

Donde:

W 0.05= Ancho de la base del pico al 5.0% de su altura total.

F= Distancia medida del máximo del pico al borde trasero del mismo al 5.0% de su altura total.

PRECISION DEL SISTEMA

Analizar por sextuplicado una misma solución estándar correspondiente al 100% de Bumetanida. El sistema será considerado preciso si el coeficiente de variación de las áreas bajo la curva del pico correspondiente a la Bumetania es menor o igual a 1.5%.

LINEARIDAD DEL SISTEMA

Preparar a partir de una misma solución patrón de Bumetanida, muestras correspondientes al; 50, 75, 100, 125 y 150% analizando estas concentraciones por duplicado. Realizar el análisis estadístico con los resultados obtenidos de los miligramos adicionados contra los miligramos recuperados. Calcular el coeficiente de regresión y el coeficiente de determinación. El sistema será considerado lineal si el coeficiente de correlación es mayor a 0.99. El coeficiente de determinación es mayor a 0.98. Y el coeficiente de variación es menor a 1.5%.

ESPECIFICIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO

Analizar soluciones estándar correspondientes al 100% de Bumetanida, así como muestras de producto terminado y placebo. Someter las muestras durante 10 días en medio ácido, básico y por oxidación a 60°C. Identificar la respuesta analítica del principio activo y de los excipientes. El método será considerado específico si no hay ninguna interferencia con los productos de degradación en la determinación de la Bumetanida.

EXACTITUD DEL METODO CROMATOGRAFICO

Analizar por triplicado, diferentes cantidades de Bumetanida, adicionadas al placebo, correspondientes al; 50, 75, 100, 125 y 150% y realizar un análisis estadístico respecto a la distribución "t" de Student a partir de los datos obtenidos para el porcentaje de recobro en la relación entre miligramos adicionados contra miligramos recuperados.

EXACTITUD PRECISION Y LINEARIDAD DEL METODO

Analizar por triplicado, diferentes cantidades de Bumetanida, adicionados al placebo, correspondientes al 50, 75, 100, 125 y 150%. Comparar los resultados obtenidos con un estándar preparado de la misma manera para cada concentración, pero sin agregar placebo. El método se considerará preciso si el coeficiente de variación de los porcentajes de recobro obtenidos de la relación entre miligramos adicionados y miligramos recuperados es menor a 1.5% y la media de los mismos se encuentra entre 98 y 102%. Así mismo el intervalo de confianza debe incluir el 100%.

La exactitud del método se determinará de acuerdo a la prueba "t" de student. El método será considerado exacto si "t" calculada es menor que la "t" teórica.

La linealidad del método se determinará tabulando los miligramos adicionados contra los miligramos recuperados.

Calcular el coeficiente de regresión (r), el coeficiente de regresión (r^2), la pendiente (b) y la ordenada al origen (a). El método se considerará lineal si $r = 0.99$, $r^2 = 0.98$, $b = 1$ y $a = 0.0$.

REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

Analizar por triplicado muestras de Bumetanida al 100% adicionados al placebo por dos analistas en dos días diferentes. Con los datos obtenidos realizar un análisis de varianza para demostrar la reproducibilidad del método. El método se considerará reproducible si las "F" calculadas son menores que las "F" teóricas.

3.3. ANALISIS ESTADÍSTICO

3.3.1- LINEARIDAD DEL SISTEMA Y METODO

Con los datos obtenidos, plantear la ecuación para el método en estudio, con la ecuación de la forma:

$$Y = A + BX + E$$

Donde:

Y= Cantidades recobradas

A= Ordenada al origen

B= Pendiente de la recta

X= Cantidad adicionada

E= Error experimental

Utilizando las siguientes expresiones:

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

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

C) Para determinar la dispersión alrededor de la recta de regresión por medio del error estándar de regresión.

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

D) Para determinar las estimaciones para "A", y su intervalo de confianza se utilizan las siguientes expresiones:

$$T_{exp} = \frac{A - 0}{\Sigma Y/X \sqrt{\frac{X^2}{(\Sigma X^2) - \frac{(\Sigma X)^2}{n}} + \frac{1}{n}}}$$

Si $T_{exp} \leq T$ tablas utilizando n-2 grados de libertad se acepta.

INTERVALO DE CONFIANZA

$$A \pm \text{TABLAS } \Sigma Y/X = \sqrt{\frac{X^2}{(\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2} + \frac{1}{n}}$$

E) Para determinar las estimaciones para "B" y su intervalo de confianza se utilizan las siguientes expresiones.

$$T_{exp} = \frac{B - l}{\Sigma Y/X \sqrt{\frac{1}{(\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2}}}$$

Si $T_{exp} \leq T$ utilizando $n-2$ grados de libertad se acepta.

$$B \pm \text{TABLAS } \Sigma Y/X = \sqrt{\frac{1}{(\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2}}$$

F) Para determinar la correlación existente entre los resultados obtenidos, se utiliza la siguiente expresión.

r = Coeficiente de correlación

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

r^2 = Porcentaje de variabilidad

3.3.2- PRECISION DEL SISTEMA

Se determina por el análisis por sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema.

$$C.V. \leq 1.5\%$$

3.3.3- PRECISION DEL METODO (REPRODUCIBILIDAD)

Determinar si existe efecto por el analista en la variabilidad del método, mediante un análisis de Barinas para dos factores con efectos aleatorios. Utilizar un diseño experimental en donde el modelo estadístico lineal que explica las fuentes de variación es la siguiente.

$$Y_{jik} = U + A_j + D_i + AD_{ji} + E(j)k$$

Donde.

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

U = Valor real del porcentaje de recobro en el que no existe efecto por analista.

A_j = Efecto del j-esimo analista en el porcentaje cuantificado.

D_i = Efecto del i-esimo analista en el porcentaje cuantificado.

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

$E(j)k$ = Error experimental

Tabular los resultados de acuerdo a la siguiente tabla.

	ANALISTA 1	ANALISTA 2
DIA 1	Y^{111}	Y^{211}
	Y^{112}	Y^{212}
	Y^{113}	Y^{213}
DIA 2	Y^{121}	Y^{221}
	Y^{122}	Y^{222}
	Y^{123}	Y^{223}

DONDE:

$$\frac{Y^2}{jik} = \frac{\Sigma(Y^{111} + Y^{112} + \dots + Y^{223})^2}{2 \times 2 \times 3}$$

$$\frac{\Sigma Y^2}{ik} = \frac{\Sigma (Y^{111} + Y^{112} + Y^{113} + Y^{121} + Y^{122} + Y^{123})^2}{6} + \frac{\Sigma (Y^{211} + Y^{212} + Y^{213} + Y^{221} + Y^{222} + Y^{223})^2}{6}$$

$$\frac{\sum Y^2_i}{k} = \frac{\sum (Y^{111} + Y^{112} + Y^{113})^2}{3} + \frac{\sum (Y^{211} + Y^{212} + Y^{213})^2}{3} + \frac{\sum (Y^{121} + Y^{122} + Y^{123})^2}{3} + \frac{\sum (Y^{221} + Y^{222} + Y^{223})^2}{3}$$

$$\sum Y^2_{jik} = \sum (Y^{111} + Y^{112} + \dots + Y^{223})$$

Utilizar la siguiente tabla para el análisis de varianza.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRADA	F CALCULADA	FTABLAS
Aj	(j-1)	$\sum \frac{Y^2_j - Y^2}{ik \cdot jk}$	$\sum \frac{C_A}{J-1}$	$\frac{MC_A}{MC_{AD}}$	38.51
ADji	(j-1) i	$\sum \frac{Y^2_{ji} - \sum Y^2_j}{k \cdot ik}$	$\sum \frac{C_{AD}}{(J-1)_i}$	$\frac{MC_{AD}}{MC_E}$	6.06
E(jik)	j i (k-1)	$\sum Y^2_{jik} - \frac{\sum Y^2_{ji}}{k}$	$\sum \frac{C_E}{ji (k-1)}$		

En donde el cuadrado medio del error (MCE), es un estimador de la reproducibilidad. una vez obtenidos los resultados para F calculada, se debe plantear la regla de decisión como: Si $F_{calc} < (gl_{FV}, gl_E; 0.95)$. No existe efecto por las fuentes de variación con lo cual quede demostrado, que el método lineal es correcto para describir la relación entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. RESULTADOS

ADECUBILIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO

Se desarrolló un cromatograma del estándar de Bumetanida. Se calculó el número de platos teóricos y el factor de coe. los resultados obtenidos fueron.

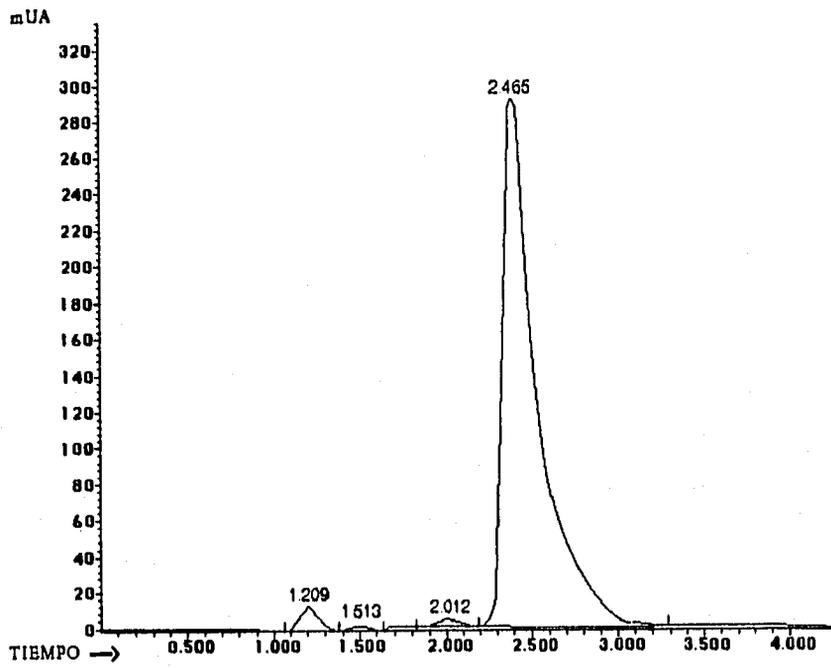
A) Número de platos teóricos.- 3184

B) Factor de coe.- 1.0625

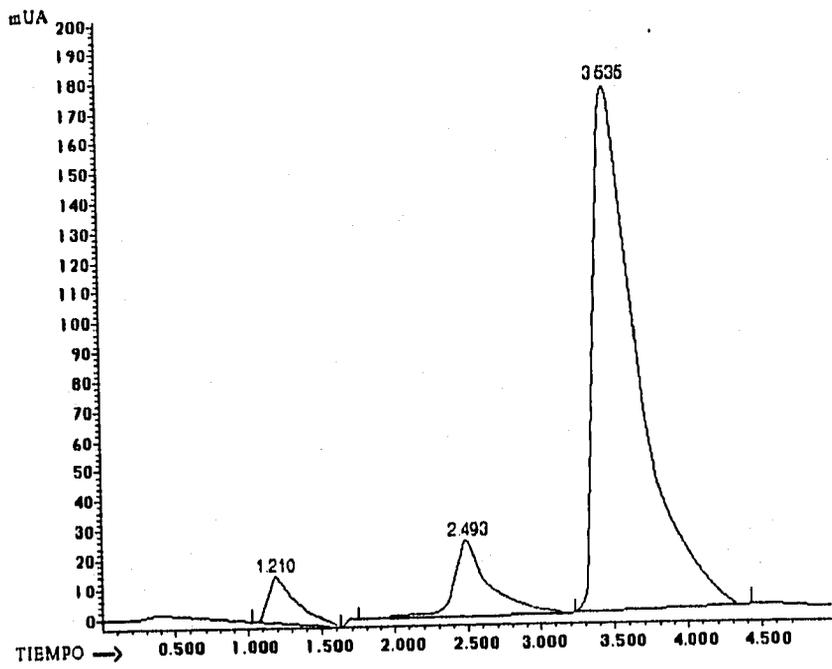
ESPECIFICIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO

Este objetivo se cumplió, al someter las muestras de Bumetanida a degradación durante una semana en medio ácido, básico y por oxidación. Los cromatogramas siguientes, demuestran que no hay interferencia de los productos de degradación en la determinación de Bumetanida, al igual que el cromatograma correspondiente al placebo.

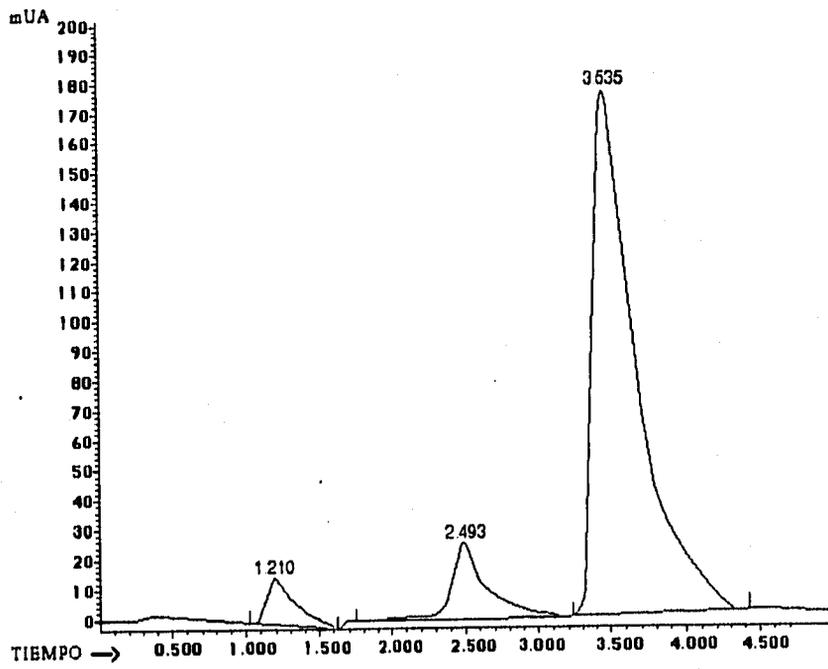
ESTANDAR



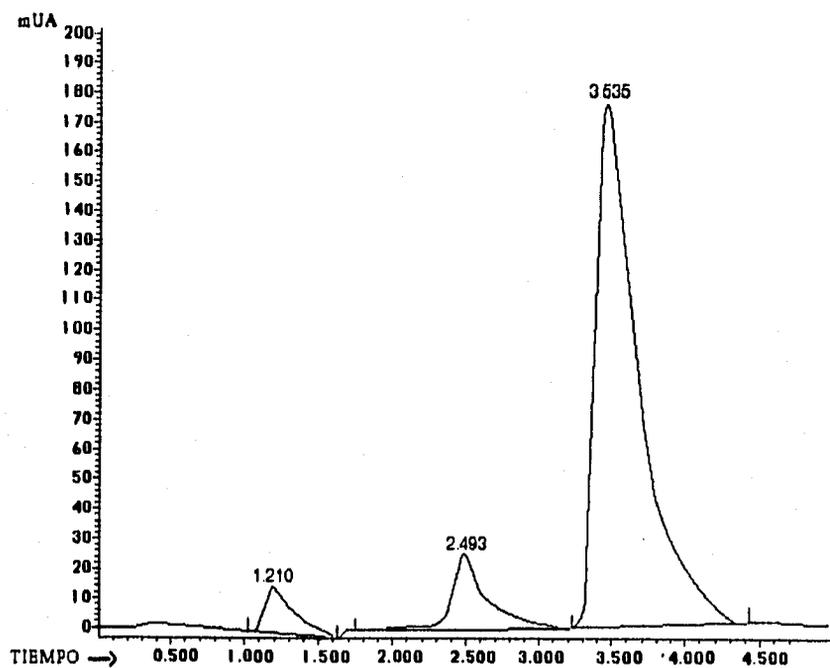
DEGRADACION ACIDA



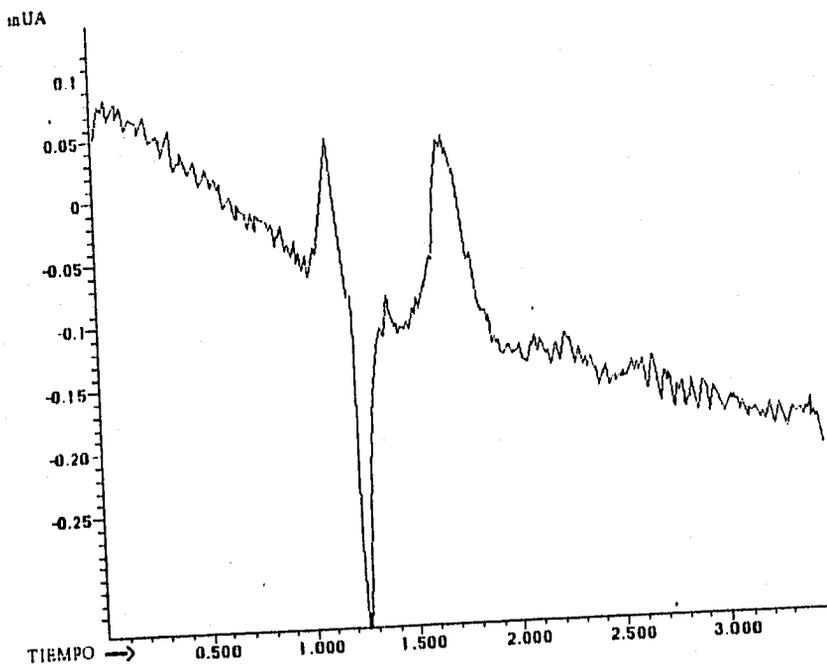
DEGRADACION BASICA



DEGRADACION POR OXIDACION



PLACEBO



PRECISION DEL SISTEMA

Se analizó por sextuplicado una solución estándar de Bumetanida, se calculó el coeficiente de variación de las áreas bajo la curva obtenidas.

AREAS

1.- 31443

2.- 31508

3.- 31493

4.- 31503

5.- 31485

6.- 31463

Media aritmética (X)= 31482

Desviación estándar (σ)= 25

Coefficiente de variación (C.V.)= 0.079

LINEARIDAD DEL SISTEMA

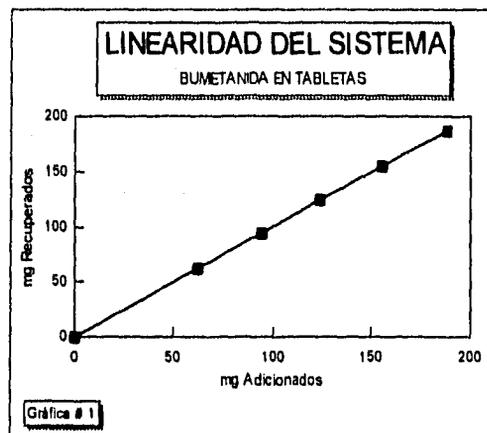
Se demostró al construir una curva de calibración y evaluar por duplicado muestras correspondientes al, 50, 75, 100, 125 y 150% de la cantidad establecida en el procedimiento normal de análisis para la bumetanida, preparadas a partir de una misma solución patrón, y realizando un análisis estadístico de las mismas.

mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS	% DE RECOBRO
62.50	61.25	98.00
62.50	62.00	99.20
93.70	93.80	100.10
93.70	93.51	99.79
125.00	124.21	99.36
125.00	126.80	101.44
156.50	156.10	99.74
156.50	157.00	100.31
187.50	186.90	101.28
187.50	186.60	99.52

Coefficiente de variación (C.V)= 1.0040

Coefficiente de correlación= 0.9998

Coefficiente de determinación= 0.9996



EXACTITUD DEL MÉTODO

Se demostró al evaluar por triplicado, diferentes cantidades de Bumetanida, adicionadas al placebo, correspondientes al 50, 75, 100, 125 y 150 % de la cantidad establecida en el procedimiento normal del análisis y realizando un análisis estadístico con respecto a la distribución "T" a partir de los datos obtenidos para el porcentaje de recobro.

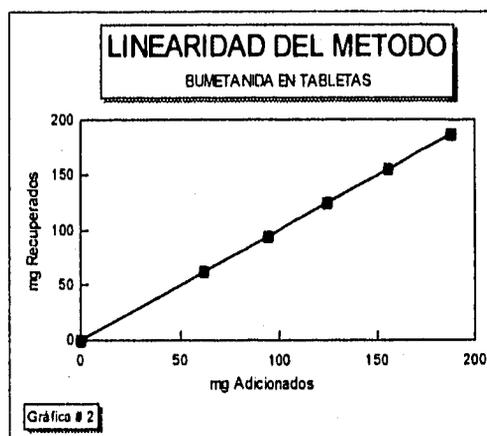
mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS	% DE RECOBRO
62.50	62.23	101.17
62.50	60.71	97.14
62.50	62.40	99.84
93.70	93.91	100.17
93.70	94.43	100.72
93.70	93.50	99.73
125.00	123.50	98.83
125.00	123.25	98.60
125.00	125.54	100.43
156.50	153.57	98.28
156.50	156.01	99.84
156.50	156.37	100.08
187.50	187.23	99.86
187.50	190.81	101.76
187.50	185.43	98.90

Media aritmética (X)=	99.69%
Coefficiente de variación (C.V)=	1.1864
Desviación estándar (σ)=	1.1840
"T" Teórica (0.95,14)=	± 2.1450
"T" Calculada=	0.9997
Limite superior de confianza=	100.35
Limite inferior de confianza=	99.03

LINEARIDAD DEL METODO

Se demostró agregando al placebo, diferentes cantidades de Bumetanida correspondientes al 50, 75, 100, 125 y 150 % de la cantidad establecida en el procedimiento normal de análisis, y realizando un análisis estadístico de las mismas.

Ordenada al origen (a)=	-0.3718
Pendiente (b)=	0.9999
Coefficiente de correlación (r)=	0.9890
Error estándar de regresión (E)=	1.5660
"t" Teórica (0.95,13)=	± 2.1600
"t" Calculada sobre la ordenada al origen (a)=	-0.3067
Limite superior de confianza=	2.2474
Limite inferior de confianza=	-2.9911
"t" Calculada sobre la pendiente (b)=	-0.0062
Limite superior de confianza=	1.0197
Limite inferior de confianza=	0.0902



REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

Este objetivo se logro al analizar por triplicado las muestras de Bumetanida por dos analistas, en dos días diferentes. Con los datos obtenidos se realizo un análisis de varianza para demostrar la reproducibilidad del método. Se obtuvieron los siguientes resultados.

	ANALISTA 1	ANALISTA 2
DIA 1	101.20	99.80
	100.80	102.00
	101.70	100.10
DIA 2	99.40	99.90
	98.90	100.01
	101.80	99.90

Número de observaciones (N)=	12
"F" teórica (0.05:1,8)=	5.32
"F" Experimental (analista)=	0.282
"F" Experimental (día/analista)=	0.168
"F" Experimental (día)=	±2.429
Error experimental=	0.999

4.2 DISCUSION

ADECUABILIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede decir que el sistema cromatográfico para la determinación de Bumetanida es adecuado. Ya que el número de platos teóricos obtenidos indica la buena eficiencia de la columna, el factor de coeolo del pico obtenido indica una asimetría muy ligera.

ESPECIFICIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO.

El sistema cromatográfico es específico para determinar Bumetanida en tabletas. Ya que se demostró que no hay interferencia de los productos de degradación con el pico correspondiente a la Bumetanida.

PRECISION DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO.

De acuerdo a los resultados obtenidos, y tomando en cuenta que el coeficiente de variación es menor a 1.5%. Se considera que el sistema cromatográfico es preciso para la determinación de Bumetanida en tabletas.

LINEARIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO.

Según los resultados obtenidos, se puede considerar que el sistema se comporta linealmente al cuantificar Bumetanida a diferentes concentraciones, ya que el coeficiente de correlación y de determinación son mayores de 0.99, también se observa en la gráfica el comportamiento lineal del sistema y se puede observar que la ordenada al origen es muy cercana a cero, lo cual indica una relación directa entre la cantidad de principio activo y el área bajo la curva detectada por el sistema.

PRECISION DEL METODO.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el método es preciso, ya que el coeficiente de variación del porcentaje de recobro es menor de 1.5%, la media aritmética obtenida es de 99.69% y el intervalo de confianza es de 99.03% a 100.35%.

EXACTITUD DEL METODO.

Debido a que en todos los casos las "F" calculadas fueron menores a las "F" teóricas se puede concluir que no existe efecto de las fuentes de variación en las determinaciones. Con lo cual el método es reproducible.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1.- El control de calidad en los productos farmacéuticos es cada vez más estricto y requiere de métodos más confiables, por eso la importancia de la validación de métodos analíticos. El método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución desarrollado para cuantificar Bumetanida en tabletas, es lineal, exacto, preciso y específico, por la cual queda validado para las condiciones en que fue establecido.

2.- El método analítico para determinación de Bumetanida en tabletas cumple con los requisitos mínimos que exige la Secretaría de Salud para considerarse como válido, siempre y cuando se realice de acuerdo a las especificaciones establecidas por este trabajo.

3.- El método analítico es adecuado para el control de calidad rutinario del producto, lo cual permite la determinación de el principio activo de interés en un menor tiempo y a menor costo.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- U.S. Pharmacopeial Convention Inc. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA 22th, NATIONAL FORMULARY. Rockville MD XVII Ed. 1186, 1562 - 1568.
- 2.- Secretaría de Salud. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS, 5ª Ed. 106 -120, 848 - 849, (1988).
- 3.-Synder L.R. and Kirkland E. INTRODUCTION TO MODERN LIQUID CHROMATOGRAPHY. John Wiley & Sons Inc. 2th edition. 542 - 50 U.S.A. (1979).
- 4.- Bello G. La Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Pharma News 2(1). 19-21.(1991). México D.F.
- 5.-La Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Beckman Instruments Inc. Latinoamérica, México D.F. Memorias 1990.
- 6.- Goodman S.L. Gilman A. BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA. Edit. Interamericana 7ª Ed. 210-214. (1985).
- 7.- Castañeda, Pedro, IBQ, et. Al. "GUIAS OFICIALES DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS". Comité de Elaboración de Guías oficiales de Validación de la dirección General de Control de insumos para la Salud. S.S.A. México. 1991.
- 8.-Ficaro MS. Kirit AS. Validation of High performance liquid chromatography and Gaschromatography assays. Pharmaceutical Manufacturing. Sept. (1984).

9.-Cavenaghi L. Gallo G. and Leali G. Statistical Evaluation of the results obtained with the analytical methods used for the quality control of medicines. Drug Development and Industrial Pharmacy 13(14). 2571-2615. (1987).

10.-Gradeen, C.Y. Billay, D.M. Chan, S.C. Analysis of Bumetanide in human urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and gas chromatography-mass spectrometry. J. Anal. Toxicol. Mar-Apr 1990, 14 (2), 123-124.

11.-Brendel E. Meineke e. Henne M. Zschunke M. and Mey de C. Sensitive high-performance liquid chromatography determination of Bumetanide in plasma and urine Journal of Chromatography. 426. 406-411. (1988).

12.-Clark's ISOLATION AND IDENTIFICATION OF DRUGS. The pharmaceutical press 2th Editi. 525 The pharmaceutical society of Great Britain. (1986).

13.-Nikolic, K.I. Velasevic, -K. Coulometric determination of bumetanide and furosemide. J. Pharm Belg, 1989, 44 (6), 387-390.

14.-DIPALMA, JOSEPH R. "BASIC PHARMACOLOGY IN MEDICINE". Second Edition. Mc. Graw Hill Book Company. U.S.A. 1982.

15.- Bello G. La cromatografía líquida de alta resolución. Pharma News, actualización en tecnología farmacéutica. 2(5). 28-25 (1990). México D.F.

16.- Jiménez V. E. Un acercamiento a la validación de los métodos analíticos. Pharma news, actualización en tecnología farmacéutica. Nov. 1(5), 16-17 (1990). México D.F.

17.-Garrido V. Juárez A. Parámetros estadísticos y procedimientos de validación, criterios de aceptación. Pharma news, actualización en tecnología farmacéutica. Dic. 1(6). 14-20(1990). México D.F.

18.-Alcántara P. Validación de Métodos Analíticos. Pharma News. Oct. 1(4). 19-20. (1990). México, D.F.

19.- Comité de Elaboración de guías oficiales de validación de la Secretaría General de Control de Insumos para la Salud S. SA. Métodos Analíticos de Validación.

20.- Ameer, B. Burlingame, M.-B. Determination of Bumetanide in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. Anal Lett, Sep 1988, 21 (9), 1589-1601.

21.- Sastry, C.S.P. Prasad, T.N.V. Dastry, B.S. Rao, E.V. Spectrophotometric methods for determination of some diuretics using 3-methylbenzothiazolin-2-one hydrazone. Analyst (London), Feb 1988, 113 (2), 255-258.

22.- Hagedorn, H.W. Schultz, R. Detection of diuretics in horse by GC-MS. J. Anal. Toxicol May-Jun 1992, 16 (3), 194-198