

49



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR DAPSONA EN TABLETAS POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

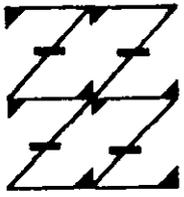
290818

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO PRESENTA: MARTHA LAURA MUÑOZ AGUILAR

DIRECTOR DE TESIS: Q.F.B. RUTH A. MEJIA SALAS
ASESOR DE TESIS: Q.F.B. IDALIA L. FLORES GOMEZ

UNAM FES ZARAGOZA



LO HUMANO EJE DE NUESTRA REFLEXIÓN

MEXICO, D.F.

2001



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Q.F.B. MAURO ARRIETA SÁNCHEZ
VOCAL	Q.F.B. RUTH ANGELICA MEJIA SALAS
SECRETARIO	Q.F.B. IDALIA LETICIA FLORES GOMEZ
SUPLENTE	Q.F.B. MARIA MARTHA UGALDE HERNÁNDEZ
SUPLENTE	Q.F.B. ROSA MARIA CRUZ HERNANDEZ

LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIOS TERRIER S.A. DE C.V., LAGO ALBERTO No. 369, COLONIA ANAHUAC. MÉXICO, D.F.

DIRECTOR DE TESIS

Q.F.B. RUTH A. MEJIA SALAS

ASESOR DE TESIS

Q.F.B. IDALIA L. FLORES GOMEZ

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES: LAURO Y ANGELES

POR EL CARIÑO Y APOYO QUE SIEMPRE HE RECIBIDO EN LOS MOMENTOS MAS DIFÍCILES DE MI VIDA.

A MI ESPOSO: JORGE SOLIS

POR EL EJEMPLO Y EL IMPULSO QUE SIEMPRE HE RECIBIDO DE SU PARTE, PERO SOBRETUDO POR EL AMOR QUE NOS TENEMOS.

A MIS HIJOS: JORGE ARTURO Y ALEJANDRO

POR SER LA MOTIVACIÓN DE MI SUPERACION PROFESIONAL.

A DOÑA FLOR:

POR TODO SU APOYO Y AYUDA QUE SIEMPRE NOS HA BRINDADO.

A MIS HERMANOS: ADRIANA, ANGELES, GABRIELA Y VICTOR
POR ESOS BELLOS RECUERDOS DE INFANCIA CON TODOS ELLOS.

A MI ESCUELA: FES ZARAGOZA - UNAM
POR LA FORMACIÓN PROFESIONAL QUE ME BRINDO.

A LABORATORIOS TERRIER, S.A. DE C.V.
POR HABERME PERMITIDO DESARROLLARME PROFESIONALMENTE

AGRADEZCO ESPECIALMENTE A LAS: Q.F.B. CATALINA HERNÁNDEZ, Q.F.B.
RUTH A. MEJIA Y Q.F.B. IDALIA L. FLORES POR EL APOYO Y LAS
FACILIDADES OTORGADAS PARA LA REALIZACION DEL PRESENTE TRABAJO.
ASI COMO A MIS COMPAÑEROS DEL DEPARTAMENTO DE CONTROL DE
CALIDAD Y PLANEACION DE LABORATORIOS TERRIER, S.A. DE C.V.

ZAMER
Graficos

**Instituto Técnico Industrial N°. 266
Col. Santo Tomas C.P. 11340
México, D.F.**

**5341 - 8450 5341 - 6391
zamer@prodigy.net.mx**

INDICE

JURADO ASIGNADO	ii
DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE	v
INDICE DE FIGURAS	viii
INDICE DE TABLAS	ix

INTRODUCCIÓN.....	1
-------------------	---

I FUNDAMENTACION TEORICA

I.1 DAPSONA

1.1.1 NOMBRE, FORMULA, PESO MOLECULAR.....	3
1.1.2 APARIENCIA, COLOR, OLOR.....	4
1.1.3 PROPIEDADES FÍSICAS.....	4
1.1.4 SINTESIS.....	6
1.1.5 RESEÑA HISTORICA DE LA DAPSONA.....	6

1.2 DESARROLLO DE METODOS ANALÍTICOS.....	10
---	----

I.3 CROMATOGRAFIA.

1.3.1 ANTECEDENTES.....	14
1.3.2 FUNDAMENTO.....	15
1.3.3 CLASIFICACION.....	16
1.3.4 EQUIPO DE CROMATOGRAPÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.....	29

1.4 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS	
1.4.1 DEFINICION.....	41
1.4.2 DEFINICION DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN PARA UN METODO EN CONTROL DE CALIDAD.....	43
1.5 TABLETAS	
1.5.1 DEFINICION.....	46
1.5.2 VENTAJAS.....	46
1.5.3 DESVENTAJAS.....	46
1.5.4 FORMULACION.....	47
II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	49
III OBJETIVO.....	52
IV HIPÓTESIS.....	54
V DESARROLLO DEL METODO	
5.1 DIAGRAMA DE FLUJO.....	56
5.2 REVISION BIBLIOGRAFICA.....	57
5.3 .DESARROLLO DE METODO.....	58
5.4 METODO DE ANALISIS A VALIDAR.....	63
VI RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL METODO ANALÍTICO PARA CONTROL DE CALIDAD	
6.1 LINEARIDAD DEL SISTEMA.....	67
6.2 PRECISION DEL SISTEMA.....	71

6.3 LINEARIDAD DEL METODO.....	72
6.4 ESPECIFICIDAD.....	77
6.5 EXACTITUD DEL METODO.....	78
6.6 PRECISION DEL METODO	
6.6.1 REPETIBILIDAD.....	80
6.6.2 REPRODUCIBILIDAD.....	82
6.7 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.....	84
6.8 RESUMEN DE RESULTADOS.....	87
VII CONCLUSIONES.....	89
BIBLIOGRAFÍA.....	90

INDICE DE FIGURAS

1	ESTRUCTURA DESARROLLADA DE LA DAPSONA.....	3
2	ESPECTRO ULTRAVIOLETA DE DAPSONA.....	5
3	SÍNTESIS DE LA 4,4'-DIAMINODIFENILSULFONA.....	6
4	CLASIFICACION DE LOS METODOS CROMATOGRAFICOS.....	17
5	EQUIPO DE CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.....	29
6	CROMATOGRAMAS DEL ESTANDAR, PLACEBO, ETANOL GRADO REACTIVO.....	62
7	GRAFICA DE LINEARIDAD DEL SISTEMA.....	69
8	GRAFICA DE LINEARIDAD DEL METODO.....	75
9	CROMATOGRAMAS DEL ESTANDAR, PLACEBO Y TABLETA DE DAPSONA..	77

INDICE DE TABLAS

1	SOLUBILIDAD DE LA DAPSONA A TEMPERATURA AMBIENTE.....	4
2	ANTECEDENTES DE LAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.....	14
3	PARÁMETROS A EVALUAR EN UNA VALIDACIÓN.....	42
4	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS REPORTADAS.....	57
5	RESULTADOS DE SOLUBILIDAD DE LA DAPSONA MATERIA PRIMA.....	58
6	RESULTADOS DE SOLUBILIDAD DE LOS EXCIPIENTES DE LA TABLETA.....	58
7	RESULTADOS DEL ESPECTRO DE LA DAPSONA SUSTANCIA DE REFERENCIA SECUNDARIA.....	59
8	BARRIDO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE LA DAPSONA SUSTANCIA DE REFERENCIA SECUNDARIA.....	59
9	RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DEL MÉTODO ANALÍTICO POR CLAR.....	61
10	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA LA LINEARIDAD DE SISTEMA.....	67
11	RESULTADOS OBTENIDOS EN LA LINEARIDAD DEL SISTEMA.....	68
12	CRITERIO DE ACEPTACIÓN PARA LA LINEARIDAD DEL SISTEMA Y RESULTADO DE LA PRUEBA.....	70
13	CRITERIO DE ACEPTACIÓN DE LA PRECISIÓN DEL SISTEMA.....	71
14	RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRECISIÓN DEL SISTEMA.....	71
15	CRITERIO DE ACEPTACIÓN PARA LA PRECISIÓN DEL SISTEMA Y RESULTADO DE LA PRUEBA.....	72
16	CRITERIO DE ACEPTACIÓN DE LA LINEARIDAD DEL MÉTODO.....	73
17	RESULTADOS OBTENIDOS EN LA LINEARIDAD DEL MÉTODO.....	74
18	CRITERIO DE ACEPTACIÓN PARA LA LINEARIDAD DEL MÉTODO Y RESULTADO DE LA PRUEBA.....	76
19	CRITERIO DE ACEPTACIÓN PARA LA ESPECIFICIDAD.....	77
20	CRITERIO DE ACEPTACIÓN PARA LA EXACTITUD DEL MÉTODO.....	78
21	RESULTADOS DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO.....	79

22	CRITERIO DE ACEPTACIÓN PARA LA EXACTITUD DEL METODO Y RESULTADO DE LA PRUEBA.....	79
23	CRITERIO DE ACEPTACIÓN PARA LA REPETIBILIDAD DEL METODO.....	80
24	RESULTADOS DE LA REPETIBILIDAD DEL METODO.....	81
25	CRITERIO DE ACEPTACIÓN PARA LA REPETIBILIDAD DEL METODO Y RESULTADO DEL PARÁMETRO.....	81
26	CRITERIO DE ACEPTACIÓN PARA LA REPRODUCIBILIDAD DEL METODO....	82
27	RESULTADO DE LA REPRODUCIBILIDAD DEL METODO.....	83
28	RESULTADO DEL ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REPRODUCIBILIDAD DEL METODO.....	83
29	CRITERIO DE ACEPTACIÓN DE LA REPRODUCIBILIDAD Y RESULTADO DE LA PRUEBA.....	84
30	CRITERIO DE ACEPTACIÓN PARA LA ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.....	85
31	RESULTADOS OBTENIDO EN LA ESTABILIDAD DE LA MUESTRA DE 24 Y 48 HORAS.....	85
32	RESULTADO DEL INTERVALO DE CONFIANZA	86

INTRODUCCION:

Los métodos analíticos para asegurar los niveles de calidad de los productos farmacéuticos requieren de técnicas capaces de determinar y cuantificar a cada uno de los activos, que constituyen a dicho medicamento.

Debido a la necesidad de un control de medicamentos más riguroso en nuestro país, la validación de los métodos analíticos es ahora un requisito que establece la Ley General de Salud en el Diario Oficial en 1994, donde marca los parámetros mínimos para ser validados cumpliendo estos con las características de linealidad, exactitud, especificidad, precisión, reproducibilidad y estabilidad de la muestra cuya finalidad es tener un medicamento seguro en todo aquello que pueda afectarlo en su fabricación además de ser eficaz en cuánto a su acción terapéutica.

Por lo anterior se desarrolló un método analítico por Cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación de Dapsona en tabletas, que puede ser empleado como método de rutina en control de calidad. Posteriormente se realizó la validación de dicho método, evaluando los siguientes parámetros: linealidad y precisión del sistema, linealidad del método, exactitud, reproducibilidad, estabilidad de la muestra y especificidad del método. Los resultados obtenidos mostraron que el método analítico es lineal, exacto, específico, preciso y reproducible para la cuantificación de dapsona, asegurando la calidad del medicamento con resultados confiables y aplicable para el análisis de Control de Calidad.

1.1 DAPSONA

1.1.1 NOMBRE, FORMULA, PESO MOLECULAR:

La dapsona (fig. 1) es conocida como 4,4'-diaminodifenilsulfona, p,p'-sulfonildianilina, ó bis (4-aminofenil) sulfona. En el índice del Chemical Abstracts la llaman 4,4'-sulfonibis-benzenamina, empieza con el volumen 76, anteriormente el index la llamaba 4,4'-sulfonildianilina.¹¹

El número de registro CAS es [80-08-0]

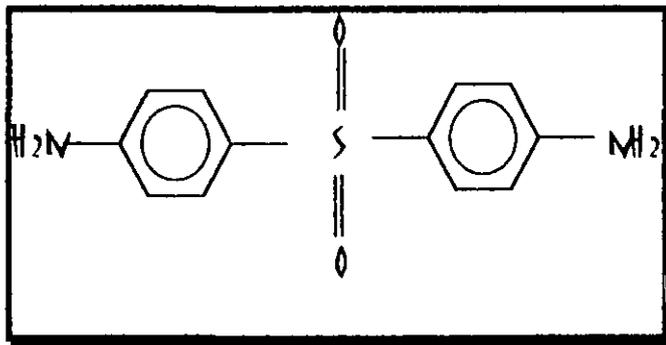


Fig. 1. Estructura desarrollada de la dapsona

$C_{12}H_{12}N_2O_2S$

Peso Molecular: 248.31

1.1.2. APARIENCIA, COLOR OLOR:

Polvo cristalino blanco o amarillo pálido, inodoro.^{9,24}

1.1.3 PROPIEDADES FISICAS:

A) Solubilidad¹¹.

Fácilmente soluble en acetona.

Soluble en alcohol y ácidos minerales diluidos.

Muy ligeramente soluble en agua.

SOLVENTE	SOLUBILIDAD APROXIMADA, mg/ml
Metanol	52
Etanol (95%)	28
2-propanol	6
Acetato de etilo	34
Eter etílico	0.9
Cloroformo	3
Benzeno	0.5
Agua	0.2
2,2,4-trimetilpentano	< 0.2

Tabla 1. Solubilidad de la dapsona a temperatura ambiente.¹¹

B) Punto de fusión:

p.f. 175 -181°C.⁹

C) Espectro ultravioleta:

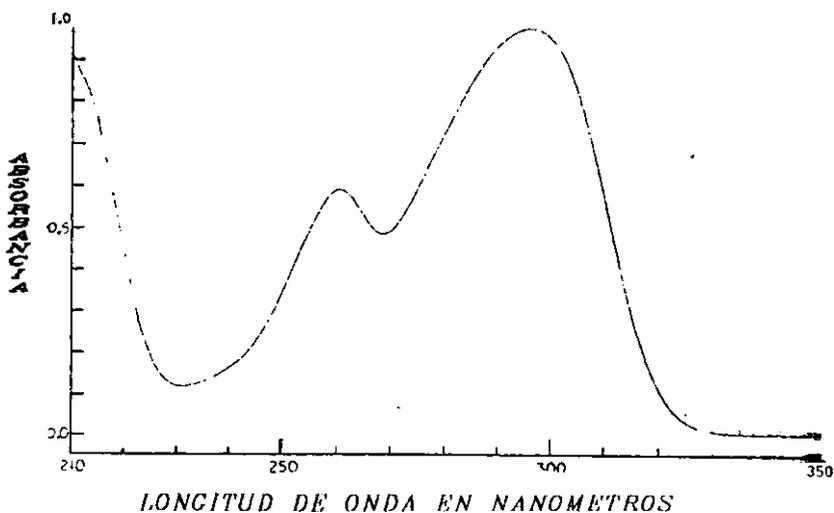


Fig. 2. Espectro ultravioleta de dapsona, 8 mg/ml en metanol, celdas 1cm ¹¹

De acuerdo a los espectros ultravioleta reportado por Maschka et. al. a varias condiciones de pH, los datos son los siguientes¹¹:

CONDICION	LONGITUD DE ONDA MÁXIMA, nm
PH 6.8	291, 259
PH 1.8	289.5

1.1.4 SINTESIS:

El benceno es condensado con ácido sulfúrico para producir fenil sulfona [$(C_6H_5)_2SO_2$], el cual es nitrado por procedimientos estándares para producir 4,4'-dinitro derivados. La reducción con estaño y ácido clorhídrico o con otros agentes reductores producen la dapsona²¹.

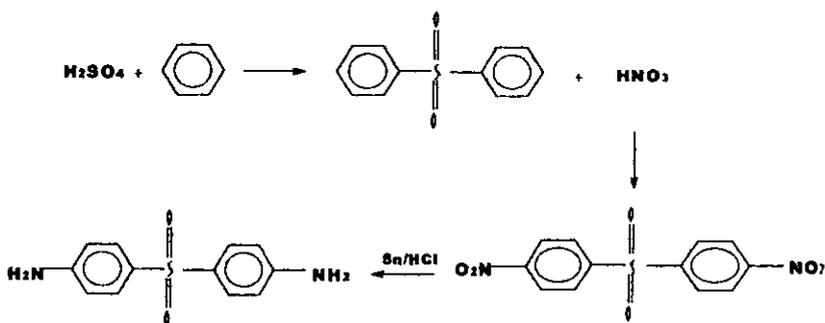


Fig. 3. Síntesis de la 4,4'-diaminodifenilsulfona.

1.1.5 RESEÑA HISTORICA DE LA DAPSONA:

A) Historia²⁶:

Este compuesto fue preparado por primera vez por Fromm y Wittmann, en 1908. En 1937, Fourneau y colaboradores, y Buttle y colaboradores, demostraron que la dapsona era eficaz en infecciones estreptocócicas experimentales. Sin

embargo, en esa época se consideró muy tóxica para ser utilizada en el hombre. En 1941 se observó que la dapsona y compuestos relacionados suprimían infecciones experimentales por bacilo tuberculoso. Sin embargo, no se utilizaron en esta enfermedad por el desarrollo de fármacos más potentes. Su actividad contra el bacilo acidorresistente de la tuberculosis hizo que se estudiaran en infecciones causadas por otros bacilos acidorresistentes, incluyendo *Mycobacterium leprae*. Hoy en día, son los fármacos más importantes para tratar la lepra.

B) Metabolismo:

La dapsona se absorbe lentamente por vía bucal. Se distribuye ampliamente y se excreta por la bilis, para reabsorberse luego. Como resultado de su circulación enterohepática persiste en el organismo durante una o dos semanas después de interrumpir su administración.

La dapsona se absorbe por vía oral. Su absorción es más eficiente con baja dosis que con alta dosis. 50 mg/día dará una concentración constante de 5 a 7 $\mu\text{g/ml}$ y 100 mg/día solamente de 7 a 9 $\mu\text{g/ml}$ ²¹.

C) Mecanismo de acción:

Suele pensarse que el mecanismo de acción de la dapsona contra *Mycobacterium leprae* es similar al de las sulfamidas²⁶.

Las sulfamidas son análogos estructurales del ácido p-aminobenzoico (PABA) que es parte de la molécula del ácido fólico necesario para la síntesis de DNA y RNA y, por lo tanto, necesario para el crecimiento y multiplicación de las bacterias; en los mamíferos sus funciones son esencialmente similares. Aunque estos no sintetizan folatos, son un constituyente indispensable de la dieta, y se absorben en el intestino y pasan a las células. Sin embargo, algunas bacterias no pueden absorber folato del medio en que crecen, tienen que sintetizarlo intracelularmente; el PABA es uno de los materiales iniciales y la enzima que participa es la dihidropteroato sintetasa.

Estas diferencias metabólicas entre los mamíferos y algunas bacterias rigen la toxicidad selectiva de las sulfamidas. Los microorganismos que no necesitan ácido fólico o que, como los mamíferos, utilizan el ácido fólico preformado, no son sensibles a las sulfamidas.

Las sulfamidas compiten con el PABA por la enzima dihidropteroato-sintetasa en algunas bacterias; en consecuencia, inhiben la síntesis del ácido fólico. Algunas sulfamidas pueden ser incorporadas, en lugar del PABA, es

un análogo de ácido fólico y este compuesto interfiere posteriormente reacciones en las que participa el ácido fólico (por ejemplo síntesis de timidina, purina, metionina y serina).

La inhibición de la síntesis de ácido fólico, y por lo tanto del crecimiento y la multiplicación celulares, por las sulfamidas se anula añadiendo un exceso de PABA. La inhibición del crecimiento y la multiplicación celular también se evita añadiendo un exceso de los productos finales en que participa el ácido fólico. Igual que el PABA, es probable que estas sustancias se encuentren en focos purulentos por la destrucción celular

D) Dosis y presentaciones:

Adulto: 50 a 100 mg ó 0.9 a 1.4 mg/Kg por día.

Para dermatitis herpetiformis iniciar 50 mg un día con un incremento gradual hasta 300 mg al día, si es necesario.

Niños: Lepra y dermatitis herpetiformis 0.9 a 1.4 mg/Kg por día.

Nota: El tratamiento necesariamente es prolongado (varios años). La mayor parte de los casos de lepra finalmente se curan.

Presentaciones: Tabletas de 50 y 100 mg.

1.2 DESARROLLO DE METODOS ANALITICOS

Dado que muchos de los métodos reconocidos consistían en series de pasos, y que en cada paso se podían producir errores, sólo se conseguían resultados correctos si el analista se apegaba cuidadosamente a procedimientos bien establecidos. Los análisis químicos requieren una gran destreza manual, una paciencia extrema, y una aplicación sistemática de los principios de la cuantificación⁵.

Sin embargo, los adelantos tecnológicos han dado más importancia al control de calidad y los fabricantes empezaron a buscar métodos de análisis más rápidos y simples. Simultáneamente, se produjo una demanda creciente de análisis de trazas (determinación de componentes presentes en cantidades de menos del 0.01%). Se encontró que los instrumentos que pueden comparar las propiedades físicas de las muestras con las de una muestra patrón dan la solución de ambos problemas⁵.

El resultado de ello ha sido una "revolución instrumental" y hoy probablemente se hacen más análisis basados en mediciones físicas que en reacciones químicas.

Parecería altamente probable que dentro de la década de los noventa la mayoría de los análisis químicos de rutina se llevarán a cabo mediante instrumentos automáticos o semiautomáticos. Indudablemente la mayoría de los instrumentos se basa en la

medición de fenómenos físicos, por ejemplo, emisión de rayos X o de otras radiaciones electromagnéticas⁵.

La realización de una revisión bibliográfica exhaustiva constituye una labor que puede consumir mucho tiempo y llegar a ser aburrida; no obstante muchos químicos han aprendido por experiencia que con frecuencia resulta que un día pasado en la biblioteca sirve para ahorrar el despilfarro de un mes de trabajo de laboratorio.

Sean cuales sean los medios utilizados para obtener la información de todos los métodos posibles de análisis para un proyecto dado, la etapa final consiste siempre en la evaluación de los procedimientos hallados.

Varias de las posibilidades encontradas se pueden excluir fácilmente al comparar los métodos de la bibliografía con la definición inicial del problema analítico, las alternativas restantes se sopesarán luego a la luz de cuestiones tales como las siguientes:

1. ¿Qué otras sustancias interferirían con este método particular, y qué medidas se recomiendan para solventar los problemas de interferencias?.
2. ¿Cuál es la exactitud máxima que se puede esperar del procedimiento publicado?
3. ¿Qué instrumental especial se necesita y cuál podría ser la duración total del análisis?

4. ¿Qué grado de habilidad técnica debe poseer el analista para obtener resultados confiables?

En la mayoría de los casos la revisión bibliográfica sugiere un procedimiento experimental adecuado. Hay ocasiones, sin embargo en las que no parece que ningún método satisfaga las especificaciones deseadas; en estas circunstancias hay que desarrollar un procedimiento nuevo que satisfaga los objetivos planteados.

Las propiedades químicas y físicas en las que se basan los métodos analíticos rara vez son completamente específicos. Por el contrario estas propiedades suelen ser compartidas por numerosas especies químicas. En consecuencia, la eliminación de interferencias en el análisis cuantitativo es más a menudo una regla que una excepción.

El método más general para tratar una interferencia, consiste en la separación física del analito. Entre los métodos bien conocidos para llevar a cabo estas separaciones se incluyen la destilación, cristalización, extracción con disolventes y la precipitación química o electrolítica. No cabe duda que el método más utilizado para eliminar interferencias es la cromatografía, un procedimiento de separación que ha encontrado aplicación en todas las ramas de la ciencia.

Las aplicaciones de la cromatografía han crecido en forma explosiva en las últimas cuatro décadas debido no sólo al desarrollo de

varios tipos diferentes de técnicas cromatográficas, sino también a la necesidad creciente de los científicos de disponer de mejores métodos para separar mezclas complejas.

En la cromatografía de líquidos de alta resolución, los componentes que se desea separar deben ser solubles en la fase móvil. Deben ser también capaces de interactuar con la fase estacionaria ya sea disolviéndose en ella, absorbiéndose, o reaccionando con ella en forma química. Como consecuencia durante la separación los componentes se distribuyen entre ambas fases, para que finalmente el analito de interés sea detectado y cuantificado.

1.3 CROMATOGRAFIA

La cromatografía es una técnica desarrollada a principios de siglo, que permite la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla. El nombre cromatografía se debe a que las primeras separaciones se llevaron a cabo con pigmentos de plantas, los cuales se observan como bandas coloridas. En general, la cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil, gas o líquido y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido⁹.

1.3.1 ANTECEDENTES:

Los comienzos de la cromatografía se sitúan a principios de siglo (1903) cuando Tswett, botánico ruso, mediante una forma primitiva de cromatografía líquido-sólido, aisló varios pigmentos de plantas ensayando unos 100 adsorbentes. No obstante, no existen datos sobre la utilización de esta técnica hasta 1930 cuando Kuhn y Lederer separaron también pigmentos de plantas usando como adsorbentes alúmina y carbonato cálcico. A partir de esta fecha se inició el verdadero desarrollo de la Cromatografía. En la tabla 2 se resumen las fechas de inicio de algunas técnicas cromatográficas y los autores responsables de las mismas.

Tipo de cromatografía	Autores	Fecha
En columna (de adsorción)	Tswett Jun y Lederer	1903 1930
En capa fina	Izmailov y Shraiber	1938
En columna (de partición)	Martin y Synge	1941
De papel	Consigen	1944
En fase invertida	Howaard y Martin	1950
De elución con gradiente	Tiselius	1952
De gases	James y martin	1952
De geles	Determann	1964
Líquida de alta resolución	Horvath	1964

Tabla 2. Antecedentes de las técnicas cromatográficas.

1.3.2 FUNDAMENTO:

El fundamento se encuentra en alguna (s) de las propiedades físicas o físico-químicas de los analitos: solubilidad (tendencia a disolverse), adsorción, tamaño de partícula, carga, reactividad química o bioquímica, etc.

Las propiedades de los componentes de una mezcla determinan su movilidad entre si y con respecto a la fase móvil. Se eligen las condiciones experimentales y las fases cromatográficas para que los componentes de la mezcla se muevan a distinta velocidad. La base de la separación cromatográfica será, por tanto, la diferencia en la velocidad de migración de los mismos.

La migración diferencial en la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) es el resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil. Dichos componentes se separan en la columna y al salir de ésta son conducidos por la fase móvil y en el orden en que emergieron, hacia un detector donde se registran sus concentraciones y sus tiempos de retención en la columna. El cromatograma resultante muestra cada compuesto que sale de la columna en forma de picos simétricos con un tiempo de retención característico por lo que este tiempo puede emplearse para identificar el compuesto. Este tiempo de retención (t_r), se mide desde el momento de la inyección de la muestra hasta

el momento en que aparece el máximo del pico en el cromatograma.

1.3.3 CLASIFICACION:

a) Basándose en la naturaleza de la fase móvil se divide en: si la fase móvil es un gas, se habla de cromatografía de gases; si la fase móvil es un líquido, la técnica se llama cromatografía de líquidos o cromatografía de Fase Líquida (fig. 4).

b) Considerando los procesos de separación se divide en:

Adsorción: En este tipo de separación, los solutos son retenidos como resultado de la capacidad de la fase estacionaria para unirse a ellas temporalmente, a nivel de superficie activa. Los adsorbentes son sólidos porosos de alta superficie específica en CLAR se usa casi exclusivamente sílice. La sílice está constituida por una red tridimensional de enlaces siloxano (Si-O-Si) con grupos silanol (Si-OH) de superficie.

Los grupos silanol de superficie son los principales responsables de la adsorción de los solutos. Las interacciones serán pues más fuertes con los solutos más polares y en particular con los solutos que pueden formar puente de hidrógeno. La fase estacionaria corresponde a la

capa monomolecular en la superficie del adsorbente y las moléculas de soluto y de eluente van a competir para fijarse en esta capa.

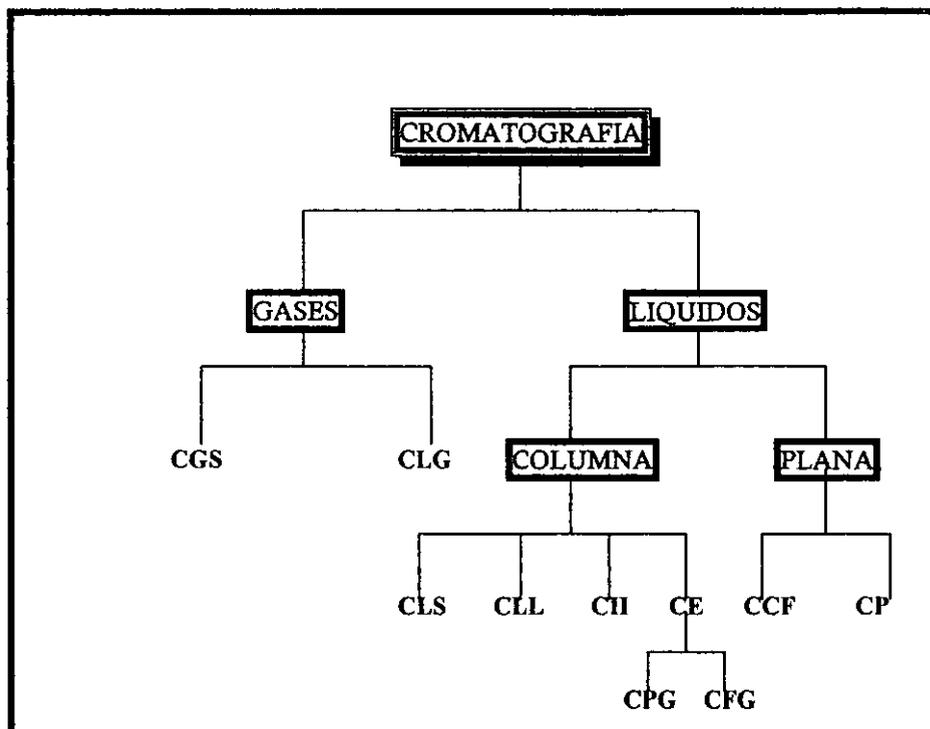


Fig.4. Clasificación de los métodos cromatográficos: CGS= Cromatografía de Gas Sólido; CLG= Cromatografía de Gas Líquido; CLS= Cromatografía de Líquido Sólido; CLL= Cromatografía de líquido-líquido; CII= Cromatografía de Intercambio Iónico; CE= Cromatografía de Exclusión; CCF= Cromatografía de Capa Fina; CP= Cromatografía de Papel; CPG= Cromatografía de Permeación en Gel; CFG= Cromatografía de Filtración en Gel¹.

Los solutos de mayor polaridad tendrán mayor retención de la misma manera que el aumento de polaridad del eluente producirá una disminución de la retención. Uno de los solventes de mayor fuerza eluente es el agua debido a su habilidad para formar puentes de hidrógeno con los silanoles de superficie. La cantidad de agua adsorbida en la superficie del adsorbente corresponde a una cantidad baja de agua adsorbida y corresponde a una retención mayor de los solutos.

Aunque la afinidad del agua por los silanoles sea muy grande, hay un equilibrio de reparto del agua entre las dos fases; es decir que el contenido de agua del eluente va a modificar la actividad del adsorbente hasta llegar a la concentración de equilibrio. Para eluentes polares, que contienen mayores cantidades de agua, el equilibrio se puede alcanzar rápidamente, pero para disolventes apolares, puede ser necesario esperar varios días para alcanzarlo.

Aunque la sílice permita lograr excelente selectividad y eficiencia para moléculas orgánicas apolares y de polaridad intermedia, experimentalmente tiene la deficiencia del tiempo para alcanzar el equilibrio, por lo que en la actualidad los métodos desarrollados con esta fase son reemplazados por métodos utilizando fases modificadas.

Partición: En este tipo de separación la mezcla de los solutos se separa de acuerdo con las tendencias relativas de sus componentes para unirse ya sea a la fase móvil o a la fase estacionaria que consta de una capa de líquido colocada sobre la superficie del soporte sólido. Para que la solubilidad mutua de las fases fuera lo más débil posible, se escogió una de las fases polar y la otra apolar. Es así como aparecieron dos formas distintas para la cromatografía de reparto:

- Cromatografía en fase "normal" en donde la fase estacionaria es polar y la fase móvil apolar.
- Cromatografía en fase "reversa" en donde la fase estacionaria es apolar y la fase móvil polar.

•

Estas fases se obtienen por silanización de los grupos silanol de superficie de la sílice por un cloro o un etoxi silano conteniendo la función química deseada según la siguiente reacción:



En general $\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3$ es una cadena conteniendo la función química deseada.

Esta reacción de modificación permite un recubrimiento eficiente de la superficie de la sílice. Cuando se usa un

monoclorosilano, la superficie de la sílice esta cubierta con una capa monomolecular y tiene un aspecto de cepillo; se dice entonces que la fase estacionaria es monomérica. Mientras si se usa un di o tri-clorosilano, se formará una capa multimolecular reticulada gracias a la reacción de todos los Si-Cl, se dice entonces que la fase es polimérica.

Cuando se modifica con un grupo apolar (C1, C6, C8, C18, fenil), se usa un cloro silano y se obtiene una fase estacionaria de tipo fase "inversa".

Cuando se modifica con un grupo polar (NO₂, NH₂, CN, diol), se usa en general un metoxi o etoxi silano y se obtiene una fase estacionaria tipo fase "normal".

La capacidad de estas fases estará ligada a la cantidad de grupos funcionales modificados que se puede expresar en moles por gramo o en % de carbón en el caso de la fase inversa. La sílice modificada presenta muchas ventajas:

- buena estabilidad química
- desaparición del problema de la actividad de la sílice.
- Grandes posibilidades de polaridades compatibles con todos los solventes.

En la fase "reversa" las fases estacionarias modificadas por una función apolar se usa en general como fase móvil una mezcla de agua con disolvente orgánico polar por ejemplo:

metanol, acetonitrilo, isopropanol, tetrahidrofurano, dioxano. La retención del soluto no se puede explicar entonces por una mayor interacción con la fase estacionaria porque las únicas interacciones posibles con grupos apolares son de tipo dispersión y son mucho menos fuertes que las interacciones de tipo dipolo-dipolo y puente de hidrógeno. La técnica está regida por el efecto hidrofóbico que se puede explicar de la siguiente manera:

- Una molécula apolar o poco polar tiene más repulsión que atracción por el agua.
- Las cadenas hidrocarburadas de la fase estacionaria también tienen una repulsión con respecto a la fase móvil.

Resulta de estos estados de repulsión que si la molécula de soluto se fija en la superficie de las cadenas hidrocarburadas la superficie de contacto global cadena-soluto con respecto a la fase móvil acuosa va a disminuir, lo que baja el estado de repulsión y conduce a un estado energético menor. La retención se explica entonces no por un estado de mayor interacción en la fase estacionaria sino por un estado de menor repulsión.

El mecanismo exacto de la retención en fase inversa todavía no se conoce de manera precisa.

Para esos dos mecanismos, las reglas generales que rigen la retención son muy parecidas y se pueden resumir de la siguiente manera:

- La retención del soluto aumenta cuando la parte apolar de su molécula aumenta y disminuye cuando su polaridad aumenta.

- El aumento de concentración del solvente orgánico en la fase móvil hace bajar la retención del soluto.

Para un mismo eluente, la retención es mayor cuando la fase estacionaria contiene más carbón, esto permite explicar, en parte las diferencias entre fases comerciales.

Una molécula ionizada tiene una retención menor que su forma neutra (mayor solubilidad de la forma ionizada en agua), por lo cual es importante la regulación del pH del eluente.

Con esto se le da la importancia a la fase “reversa” ya que:

- El orden de fuerza de los eluentes es aproximadamente el inverso de orden observado en adsorción y fase normal, lo que explica también que el término fase reversa haya sido conservado.
- La fase inversa permite separar homólogos funcionales que difieren por la longitud de cadena

hidrocarburada, lo que no se puede hacer en general en cromatografía de adsorción.

- La fase inversa no permite separar fácilmente familias funcionales.
- La selectividad de la fase inversa no es muy buena para la separación de isómeros de posición.

Intercambio iónico: Los dominios principales de aplicación de esta técnica son en las áreas de los productos inorgánicos, aniones y cationes minerales y en bioquímica.

La técnica conocida como intercambio iónico ha sido ampliamente estudiada en el pasado bajo su forma clásica, es decir utilizando resinas de intercambio iónico de granulometría relativamente grande como fases estacionarias. En la actualidad, el intercambio iónico se ha adaptado a la cromatografía de líquidos moderna mediante la introducción de resinas de granulometría fina entre 5 y 15 μ m, una matriz de poliestireno/divinilbenceno y una estructura macroporosa a diferencia de las resinas clásicas microporosas con estructura de gel. Eso permite disminuir la tasa de hinchamiento de las resinas que es variable según el solvente y la naturaleza del ión utilizado y también obtener una estructura porosa con canales internos de mayor diámetro, lo que mejora la cinética de intercambio y entonces la eficiencia.

La matriz de poliestireno tiene grupos funcionales intercambiadores de cationes (sulfonatos carboxilato) o de aniones amonio cuaternario o amina).

Para el equilibrio de cationes, el soluto compite con el catión del eluente por los sitios de intercambio iónico.

El mismo mecanismo ocurre con el intercambio de aniones.

En todos los casos, la influencia del pH es grande cuando los solutos son ácidos o bases débiles y que se puede modificar el estado de ionización.

Las resinas de intercambio iónico se usan en particular para la separación de los aniones y cationes minerales, los ácidos carboxílicos biológicos y de los aminoácidos. Las resinas de granulometría fina son más caras que las fases estacionarias tipo sílice.

La cromatografía de pares de iones surge a mediados de la década de los setenta como una alternativa en la separación de los compuestos iónicos, dadas las limitaciones prácticas que presentaban las columnas de intercambio iónico y la ventaja que presenta en la posibilidad de extender el uso de las columnas de fase inversa.

Para hacer cromatografía de pares de iones, se usa una columna de fase inversa clásica de tipo C_8 o C_{18} .

La fase móvil está constituida por una mezcla agua/disolvente orgánico y contiene además un buffer que permita fijar el pH del medio de manera que los solutos y los contra-iones se encuentren ionizados en esta fase.

La fase móvil contiene también una sal de contra-ión que se pretende utilizar para la realización de pares de iones con los solutos.

El contra-ión es en general un ión orgánico cuya molécula contiene una parte hidrocarbonada importante como por ejemplo:

Contra-ión aniónico: alquisulfonatos

Contra-ión catiónicos: tetralquilamonios o aminas terciarias.

Al agregar un contra-ión de signo opuesto, se observa en general un aumento de la retención del soluto ionizado. Este aumento de retención va a depender de la naturaleza del contra-ión, de su concentración, y la composición del eluente y de la tasa de carbono de la fase estacionaria según el siguiente mecanismo.

Gracias, a su parte hidrocarbonada importante, el contra-ión se va a adsorber en la fase estacionaria según las reglas del efecto hidrofóbico, es decir, al equilibrio existe una constante de reparto que fija las concentraciones relativas en las dos fases, también, la constante de reparto es más grande cuando la parte hidrocarbonada es más importante y

por último la constante de reparto disminuye cuando la concentración del solvente orgánico aumenta en el eluyente. Este efecto permite pues realizar lo que se llama un intercambiador de iones dinámico porque se obtiene por equilibrio de reparto reversible y que es posible cambiar la capacidad modificando la constante de reparto.

La amplitud del aumento de retención del soluto va a depender de la constante de equilibrio de formación del par de iones y de la concentración del contra-ión en la fase estacionaria.

Se ve entonces que la cromatografía de pares de iones permite ampliar el uso de la fase inversa a moléculas que tendrían una retención demasiado limitada, lo que explica su éxito.

Permeación o exclusión: Es aplicada particularmente para la separación de sustancias de peso molecular elevado mas de 2,000 g/mol, se utiliza para estudios de la distribución de pesos moleculares en polímeros sintéticos y también para separación de mezclas donde los constituyentes son de pesos moleculares muy diferentes y finalmente en estudios iniciales de muestras desconocidas. Ya que la cromatografía de permeación indica en este caso, rápidamente, si la muestra es simple o complicada y el rango de pesos moleculares en que se sitúan sus constituyentes.

La cromatografía de permeación se basa en la retención selectiva de las moléculas de solutos en función de su talla debido a la mayor o menor penetración e incluso a la exclusión de dichas moléculas de los poros de una fase estacionaria apropiada. Las moléculas grande migran rápidamente pues son excluidas de la totalidad o de una parte de los poros de la fase estacionaria mientras que las moléculas más pequeñas pueden entrar en todos los poros y viajan más lentamente.

Es decir que la separación no está basada en interacciones físico-químicas con la fase estacionaria sino solamente en la dimensión de las moléculas en solución.

Por otra parte, como las moléculas del disolvente son generalmente pequeñas y penetran en todos los poros, la fase móvil migra más lentamente que toda la muestra, es decir que todos los compuestos son eluidos antes del tiempo t_0 que corresponde a la salida de los volúmenes intersticial y poroso, al contrario de lo que sucede en las demás técnicas cromatográficas de interacciones.

Esas características dan lugar a varias ventajas como:

- Se obtienen bandas estrechas de los solutos, lo que facilita la detección.
- La capacidad de la fase estacionaria es en general superior, lo que permite el uso del refractómetro para la mayoría de los polímeros sintéticos.

- Las separaciones son rápidas para cualquier tipo de soluto sin necesidad de efectuar gradiente de elusión
- El tiempo de análisis es fácilmente predecible. Todos los compuestos son eluidos entre el tiempo que tardan en migrar las moléculas completamente excluidas y t_0 .
- Se facilita la identificación de los picos correspondientes a los diferentes compuestos de la muestra ya que la retención depende únicamente de la talla de la molécula
- No hay pérdidas o alteraciones químicas de la muestra durante la separación.
- La columna acumula menos impurezas por lo que se degrada o se desactiva menos rápidamente.

Por el contrario, las desventajas principales de la cromatografía de exclusión son:

- Es inaplicable para la separación de compuestos de talla similar. Se requiere al mínimo 10 % de diferencia en los pesos moleculares de los solutos.
- La capacidad de picos es limitada. Esto quiere decir que solo algunos picos separados pueden ser acomodados en el cromatograma total porque este es muy corto.
- Dependiendo de la solubilidad de las muestras, se requerirán fases móviles acuosas u orgánicas, lo cual a su vez, condiciona material de que está hecha la

fase estacionaria. Esto ha dado origen a una división, un poco artificial, en la cromatografía de exclusión en:

- a) Cromatografía de permeación de gel para los disolventes orgánicos.
- b) Cromatografía de filtración de gel para los disolventes acuosos.

1.3.4 EQUIPO DE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION:

El equipo de CLAR, cuenta con las siguientes partes (fig. 5): recipiente para fase móvil, bomba, indicador de presión, inyector, columna, detector, registrador.

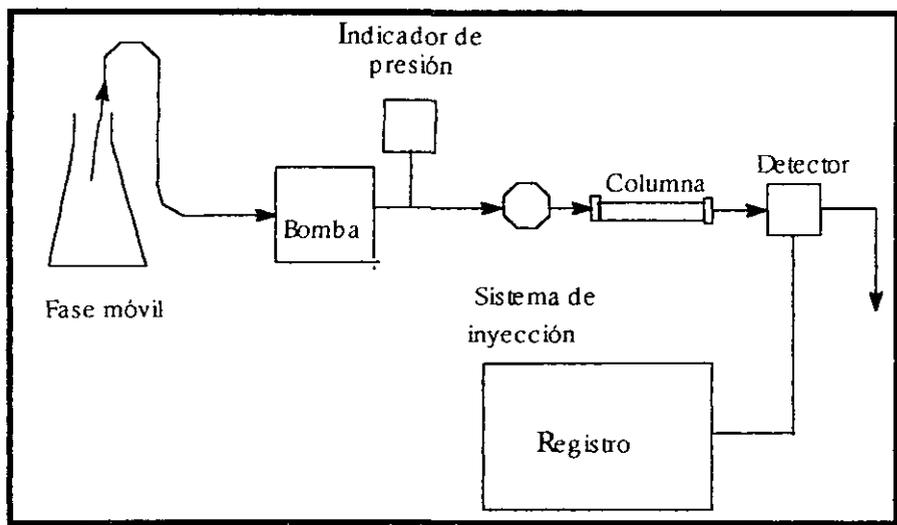


Fig. 5. Equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución³.

FASE MÓVIL:

Los requisitos de la fase móvil para tener una buena cromatografía son los siguientes:

- 1) La muestra debe ser soluble en la fase móvil porque de no ser así, puede precipitarse y tapan la columna.

- 2) La polaridad del solvente debe producir valores de K' de entre 1 y 10. K' es el factor de capacidad que mide la distribución de la muestra entre la fase estacionaria y la fase móvil (constante de Nerst distribución entre dos disolventes). Los valores de K' menores de 1 indican que la muestra casi no es retenida por la fase estacionaria y da como resultado separaciones muy pobres. Los valores de K' mayores de 10 indican que la muestra se retiene excesivamente por la fase estacionaria de la columna y dará como resultado un tiempo de análisis muy largo. Por estas razones es necesario ajustar la polaridad de la fase móvil, mezclando varios solventes.

- 3) Los solventes deben ser de gran pureza para no dañar la columna ni provocar la interferencia con el análisis. Deben ser filtrados y desgasificados previamente al análisis.

- 4) Otras consideraciones importantes son: su viscosidad, toxicidad, punto de ebullición y costo del solvente.

FILTRO DE LA FASE MOVIL:

El cual es de acero inoxidable y de 2 a 5 micras de porosidad. La función de este filtro es evitar el paso de partículas que pudieran tapar la columna, por lo que nunca debe quitarse.

Con el uso, este filtro llega a taparse provocando la formación e introducción de burbujas al sistema de cromatografía, por lo que es muy recomendable lavarlo frecuentemente en baño ultrasónico con ácido acético al 10%.

Otra buena recomendación es usar un filtro para fases móviles orgánicas.

Para verificar si el filtro del solvente está tapado, por lo que se forman burbujas, se quita momentáneamente para observar el flujo y la desaparición de dichas burbujas.

BOMBA:

Los requisitos de una bomba ideal son los siguientes:

- A) Debe ser químicamente inerte y capaz de manejar los diferentes tipos de solventes.

- B) Debe soportar una alta presión con velocidad de flujo entre 0.5 y 10 ml/min.
- C) No debe generar impulsos que se traduzcan en ruido.
- D) La velocidad de flujo debe ser reproducible para poder obtener tiempos de retención también reproducibles.

En una bomba debe verificarse:

Flujo.- Se realiza colocando una probeta graduada a la salida de la columna. Es muy importante que la columna se encuentre en buen estado y que se recolecten por lo menos 5 ml si se ha escogido un flujo de 1 ml/min o menor.

Reproducibilidad de Flujo.- Esta verificación se lleva a cabo de la misma manera que la anterior cada vez que se encienda la bomba.

INYECTOR:

El propósito de tener un sistema de inyección es colocar la muestra dentro de la columna en forma de una banda delgada y no de dispersarla sobre ella.

Los problemas que suelen presentarse con el inyector son: de fugas de líquido, de sifoneo y de obstrucción.

En un inyector con problemas de fugas hay que verificar primero si la aguja de inyección tiene el diámetro apropiado.

Si el diámetro es el apropiado, verificar entonces el sello del rotor y el sello del puerto de inyección.

Los problemas de sifoneo en el inyector se presentan cuando la línea de desperdicio no se encuentra por arriba de la línea de drenaje. Verificar que estas líneas se encuentren conectadas en forma adecuada es importante para resolver este tipo de problemas.

La obstrucción en el inyector puede encontrarse tanto en la línea de drenaje como en el loop, y generalmente es debido a la precipitación de muestra, así como a los residuos sólidos que pueden irse depositando con el uso de amortiguadores. Para evitar la obstrucción del inyector es recomendable lavarlo diariamente con la misma fase móvil usada para la cromatografía o con metanol, y en caso de usar soluciones amortiguadoras es indispensable lavarlo con suficiente agua.

COLUMNA:

Con objeto de tener una guía en la optimización de la separación de los componentes a analizar, se deben tener en cuenta los términos usados en la cromatografía para

relacionar la eficiencia de la columna con su funcionamiento y así, llevar a cabo un buen análisis cualitativo y cuantitativo.

A) Resolución.- como una medida de la eficiencia de la separación de dos componentes en una mezcla, la resolución, R, se determina por la siguiente ecuación:

$$R = 2 \left(\frac{t_2 - t_1}{W_2 + W_1} \right)$$

Donde t_2 y t_1 son los tiempos de retención para los componentes y, W_2 y W_1 son los anchos correspondientes de las bases de los picos obtenidos extrapolando los lados de los picos hasta la línea base.

B) Número de platos teóricos.- una medida de la eficiencia de una columna en particular se puede conocer calculando el número de platos teóricos (n) en la columna con la siguiente ecuación:

$$n = 16 \left(\frac{t}{W} \right)^2$$

En donde t es el tiempo de retención de la sustancia y W es el ancho de la base del pico obtenido extrapolando los lados del pico hasta la línea base. El valor de n es

dependiente de la sustancia que esta siendo analizada y de las condiciones de operación tales como la velocidad de flujo, la temperatura, la cantidad del empaque de la columna y la uniformidad de éste.

C) Factor de capacidad K' .- esta determinado bien sea por la cantidad o por el tiempo de residencia de la sustancia en cuestión entre las fases respectivas:

$$K' = \frac{\text{cantidad de la sustancia en el fase estacionaria}}{\text{cantidad de la sustancia en la fase móvil}}$$

$$K' = \frac{\text{tiempo en la fase estacionaria}}{\text{tiempo en la fase móvil}}$$

Mientras mayor tiempo pase el soluto en la fase estacionaria, mayor será el valor de K' y, por lo tanto, mayor el tiempo de retención, por lo que el valor de K' dependerá del soluto, la cantidad y la composición de la fase móvil, la temperatura y la velocidad de flujo de la fase móvil.

D) Factor de coleo.- se define como la relación de la distancia de uno a otro lado del pico. $W_{0.05}$ dividido entre dos veces la distancia f , del máximo del pico hacia el lado izquierdo del pico. Esta distancia debe medirse a un punto que corresponda a un 5 por ciento de la altura

partiendo de la línea base. Para un pico simétrico el factor de coleo es la unidad.

$$\text{Factor de coleo} = T = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

Los problemas que pueden presentarse con la columna pueden ser:

De fuga: que pueden deberse:

- a) Férula o tuerca mal apretada
- b) Presencia de empaque en la columna
- c) Uso de un Frit inadecuado

De obstrucción: generalmente son localizados en los Frits de entrada y salida donde se han acumulado partículas que provienen de la fase móvil, de la misma muestra o del empaque de la columna; o bien dentro de la misma columna ocasionados por precipitación y suciedad de la misma muestra, o formación de emulsiones al usar solventes inadecuados.

Para verificar si una columna se encuentra obstruida, basta observar el medidor de presión de la bomba con la columna conectada y sin ella.

Si la obstrucción de la columna es localizada en los Frits, el problema se soluciona con lavarlos; si es ocasionada

por suciedad de la muestra la columna debe lavarse correctamente o regenerarse.

De cromatograma: se deben principalmente al comportamiento de la columna. La presencia de picos fantasmas y el coleo de los picos, generalmente se deben a una obstrucción en los Frits o dentro de la columna. La variación de los tiempos de retención en muchas ocasiones es debida a una deficiencia en el equilibrio de la columna.

La verificación de los parámetros de la columna N y R, se hace indispensable cuando se empiezan a tener este tipo de problemas.

DETECTOR:

La finalidad es medir la concentración de los componentes de la muestra, eluidos con la fase móvil.

Los detectores más comúnmente usados son:

- a) Detector UV
- b) Detector de índice de Refracción
- c) Detector Electroquímico
- d) Detector de Infrarrojo
- e) Detector de Fluorescencia
- f) Detector de Radioactividad

Cada uno difiere en sensibilidad y selectividad.

Los problemas que suelen presentarse en los detectores pueden ser:

De fugas de líquido: generalmente son ocasionadas por la generación de una alta presión al obstruirse la línea de salida del detector. Esta línea de salida suele bloquearse por acumulación de depósitos de sales cuando se usan soluciones amortiguadoras como fase móvil, o bien por partículas de empaque de la columna.

La generación de una alta presión al obstruirse la línea de salida del detector, además de ocasionar fugas a través de las conexiones y empaques, ocasiona también la ruptura de las ventanas de las celdas en el detector, por lo que es sumamente importante mantener en buen estado las líneas de entrada y salida del detector, lavando con suficiente agua cada vez que se usen soluciones amortiguadoras como fase móvil.

De ruido electrónico: generalmente son ocasionados por la presencia de burbujas de aire en las celdas que provienen de la fase móvil que no ha sido desgasificada. Añadiendo un restrictor de presión después de la celda del detector suele solucionarse este problema.

Los problemas estáticos o de conexión a tierra, así como de mal funcionamiento de la lámpara en los detectores, se traducen también en ruido electrónico.

Las lámparas en los detectores UV, generalmente tienen una vida media de 2500 horas, por lo que es muy recomendable llevar un registro sobre el tiempo de uso de la misma. El tener una lámpara del detector de repuesto siempre es de gran ayuda, ya que representa un gran ahorro de tiempo y problemas cuando la que está en uso falla. Cambiar una lámpara de un detector es relativamente fácil para cualquier operador si se tienen las siguientes precauciones:

- 1) Desconectar la línea de voltaje del detector.
- 2) No tomar la lámpara por la cubierta de vidrio para evitar dejar grasa y huellas que ocasionarían redispersión de la luz.
- 3) Colocar la lámpara siguiendo las recomendaciones de su manual.
- 4) Alinear la lámpara para lograr la máxima energía.

La conexión a tierra es muy importante para cualquier equipo con circuitos lógicos para garantizar su buen funcionamiento.

REGISTRADOR:

Su propósito es registrar de manera permanente los resultados del análisis por medio de un cromatograma.

Los sistemas de registro generalmente no presentan ningún problema si se ha conectado adecuadamente al detector. La mayoría de los detectores tienen salidas de 1 a 10 mV y actualmente ya viene incluida una salida para computadora.

Normalmente los errores en el sistema de registro sobre todo cuando se usa un integrador electrónico, se presentan en la forma de integrar.

La forma de integración debe ser similar para la mezcla estándar y para la muestra en cuestión.

Con respecto a la verificación del funcionamiento del integrador en sí estos actualmente cuentan con una corrida de prueba la cual viene especificada para cada integrador en el manual respectivo. Con esta corrida de prueba se verifican todas las funciones del integrador.

1.4 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

Debido al gran incremento de nuevos productos (químico-farmacéutico y químico alimentario) y a la gran competitividad comercial, se requiere que el producto que salga a la venta sea de la más alta calidad es por ello que el laboratorio de control de calidad debe garantizar la buena calidad del producto y para ello requiere de un laboratorio en óptimas condiciones de funcionamiento (equipos calibrados y todas sus técnicas analíticas validadas).¹⁵

Una parte complementaria del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir, el método debe probarse para determinar su efectividad, además por ser un requisito ante la Secretaria de Salud y por otra parte porque debe probar que funciona para las aplicaciones analíticas deseadas.

La validación de métodos analíticos tiene como objetivo el certificar la validez de los métodos analíticos mediante análisis estadísticos de acuerdo a parámetros a evaluar (tabla 3).

1.4.1 DEFINICION:

Es un proceso por el cual queda establecido por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones deseadas. La capacidad se expresa, en este caso en términos de parámetros analíticos.

Los parámetros a valorar dependiendo de la aplicación del método se encuentra en la tabla 3.

PARAMETRO	C. CALIDAD	INDICADORES DE ESTABILIDAD		BIODISPO- NIBILIDAD	REVALIDACION DEL METODO	
		BAJAS CONC.	ALTAS CONC.		SIN CAMBIO EN CONDICIONES DE OPERACION	CON CAMBIO EN CONDICIONES DE OPERACION
LINEARIDAD Y PRECISION DEL SISTEMA	X	X	X	X	X	X
LIMITE DE DETECCION		X		X		
LIMITE DE CUANTIFICACION		X		X		
EXACTITUD Y REPETIBILI- DAD AL 100%	X	X	X	X	X	X
LINEARIDAD DEL METODO	X	X	X	X	X	X
PRECISION (REPRODUCIBILIDAD)	X	X	X	X		X
ESPECIFICIDAD (CONTROL DE CALIDAD)	X	X	X	X	X	X
ESPECIFICIDAD (ESTABILIDAD)		X	X			
TOLERANCIA DEL SISTEMA		X	X	X		X
ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	X	X	X	X		

Tabla 3. Parámetros a evaluar dependiendo de la aplicación del método¹⁸.

1.4.2 DEFINICION DE LOS PARAMETROS DE VALIDACIÓN PARA UN METODO EN CONTROL DE CALIDAD¹⁸:

LINEARIDAD DEL SISTEMA:

Es la relación que se establece mediante un modelo lineal entre una propiedad física, química y/o biológica con la cantidad del fármaco.

PRECISION DEL SISTEMA:

Es el grado de concordancia entre mediciones analíticas individuales obtenidas bajo las mismas condiciones de medición, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea de la solución patrón.

LINEARIDAD DEL METODO:

Es la relación que se establece mediante una recta, entre una propiedad medible (cantidad de fármaco recuperad) y el valor real de la propiedad (cantidad recuperado).

PRECISION DEL METODO:

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar. La precisión es la medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico, bajo condiciones normales de operación.

- A) REPETIBILIDAD:** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos aparatos, técnicas, laboratorio, etc).

- B) REPRODUCIBILIDAD:** Es la precisión de un método analítico expresada como concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc.)

EXACTITUD:

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

ESPECIFICIDAD:

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

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA:

Son las condiciones en las cuales la muestra mantiene constante su propiedad medible en un lapso determinado.

1.5 TABLETAS

1.5.1 DEFINICION:

Es una preparación que contiene una dosis por unidad de uno o más fármacos, adicionados o no de aditivos y que se obtienen por compresión uniforme de las partículas o moldeo.⁹

1.5.2 VENTAJAS:

- Posología inequívoca, versátil, exacta
- Fácil de enmascarar su olor, sabor y color empleando técnicas de recubrimiento o microencapsulación, compresión en multicapa.
- Atractivas al consumidor
- Fácil administración
- Fácilmente de transformar los comprimidos en suspensión o solución
- Estabilidad superior a las formas líquidas

1.5.3 DESVENTAJAS:

- Lactantes y pacientes en estado de coma, no lo pueden ingerir
- Manufactura compleja

- Los fármacos activos deben disolverse en fluidos entéricos para que se produzca la transferencia al medio interno.

1.5.4 FORMULACIONº:

- **ACTIVO:** Sustancia natural o sintética que tiene alguna actividad farmacológica.
- **DILUYENTE:** Los diluyentes se agregan cuando la cantidad de ingrediente activo es pequeña o se dificulta la compresión.
- **AGLUTINANTE:** Los aglutinantes dan adhesividad al polvo durante la granulación preliminar y la compresión, pueden agregarse secos pero son más efectivos cuando se agregan en solución.
- **DESINTEGRANTE:** Sirven como auxiliar en la fragmentación de los comprimidos después de su administración.
- **LUBRICANTES:** Reducen la fricción y le ciclo de expulsión durante la compresión, auxilian previniendo la adherencia del material de los comprimidos a las matrices y punzones.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A medida que crece nuestra sociedad aumenta el número de personas, que compran productos industriales y cada una, desea obtener más de dichos productos. La industria farmacéutica no es la excepción, pero a medida que se produce mayor cantidad de mercancías y servicios, surge un problema diferente: la tendencia del fabricante a volverse descuidado. Una de las primeras soluciones al problema de controlar la calidad, es inspeccionar el producto en cada una de las etapas de su fabricación. Debido al gran incremento de nuevos productos y la gran competitividad comercial, se requiere que el producto que salga a la venta sea de la más alta calidad, la cual se construye a lo largo de todo su proceso de fabricación y con la validación de los métodos analíticos apoyamos una parte importante en el aseguramiento de la calidad.

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir, el método debe probarse para asegurar que realice lo que se pretende que cuantifique. La validación generalmente incluye una evaluación de la: linealidad, precisión, exactitud, reproducibilidad, especificidad, y estabilidad de la muestra. De aquí se obtiene información sobre la confiabilidad del método analítico que se emplea en el análisis de los activos presentes en una forma farmacéutica.

La dapsona tabletas es un medicamento elaborado por Laboratorios Terrier, producto con el cual no se contaba con un método analítico validado.

Siendo la Cromatografía de líquidos de alta resolución una técnica de separación de amplio uso por las premisas en que se basa, por el gran desarrollo que ha tenido y por los beneficios en valorar un gran número de sustancias con exactitud, rapidez y alta resolución. Es por ello que se requiere por un lado encontrar las condiciones idóneas de un método analítico en donde se aísle el compuesto de interés para poder cuantificarlo, así el problema se traduce en desarrollar y validar un método analítico para control de calidad para cuantificar a la dapsona en tabletas, que para fines legales (Norma 059) es un requisito hoy en día.

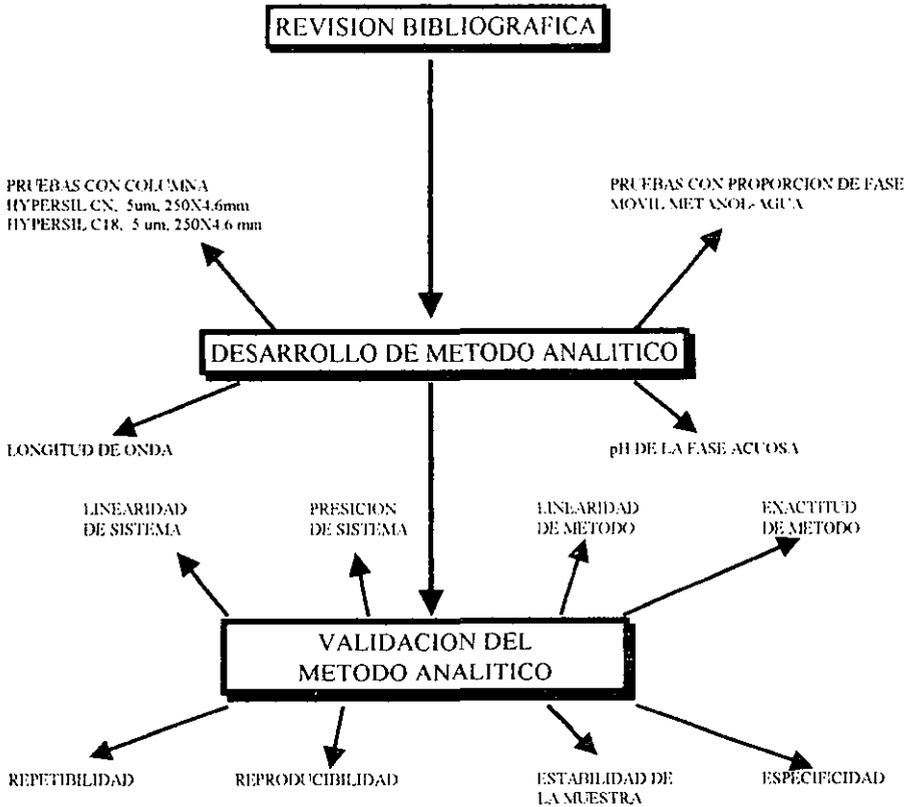
OBJETIVO

1. Desarrollar un método analítico por Cromatografía de líquidos de Alta Resolución ya que posee un detector de U.V., aprovechando las características de absorción ultravioleta del activo.
2. Validar el método evaluando los parámetros de linealidad y precisión del sistema, linealidad de método, exactitud, especificidad, repetibilidad, reproducibilidad y estabilidad de la muestra para cuantificar el principio activo dapsona en tabletas y emplear este método analítico en control de calidad.

HIPOTESIS

Gracias a que la técnica de Cromatografía de Líquidos de alta resolución es una técnica de separación para sustancias que se encuentran en una mezcla y aprovechando la propiedad de absorción por ultravioleta de la sustancia de interés, se establecerán las condiciones analíticas para cuantificar la dapsona en tabletas y se evaluarán los parámetros de validación: linealidad de sistema, precisión de sistema, linealidad de método, exactitud, especificidad, repetibilidad, reproducibilidad, y estabilidad de la muestra.

5.1.- DIAGRAMA DE FLUJO:



5.2 REVISION BIBLIOGRAFICA:

REFERENCIA	METODOLOGÍA PARA CUANTIFICAR DAPSONA.
8, 26	TITULACION POTENCIOMETRICA CON NITRITO DE SODIO.
25	CLAR (CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN). COLUMNA: L3, 4mm X 30 cm, 10 micras LONGITUD DE ONDA: 254 nm. FASE MOVIL: ALCOHOL ISOPROPILICO: ACETONITRILLO: ACETATO DE ETILO: PENTANO (100: 100: 100: cbp 1000).
10	FLUOROMETRIA.
10	CROMATOGRAFÍA EN PAPEL.
10	CROMATOGRAFÍA DE GASES.

Tabla 4. Revisión bibliografica de metodologías analíticas reportadas.

Comentarios:

Se elige la técnica por cromatografía de líquidos de alta resolución por ser una técnica empleada para separar el analito de interés, otras de las razones por las que se elige este método es porque se cuenta con el equipo y medios para desarrollar un método.

5.3 DESARROLLO DE METODO:

Elección del solvente para disolver la muestra:

PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DE LA DAPSONA	RESULTADO
1 mg/ ml metanol	SOLUBLE
1 mg/ ml etanol	SOLUBLE
1 mg/ ml agua	NO SE SOLUBILIZA COMPLETAMENTE
1 mg/ ml agua:metanol (80:20)	SOLUBLE

Tabla 5. Resultados de solubilidad de la dapsona materia prima, en solventes propuestos para disolver la muestra.

PRUEBAS DE SOLUBILIDAD EN ETANOL DE EXCIPIENTES	RESULTADO
DAPSONA	SOLUBLE
ACDISOL	INSOLUBLE
AEROSIL 200	INSOLUBLE
ALMIDON DE MAIZ	INSOLUBLE
ESTEARATO DE MAGNESIO	INSOLUBLE
FOSFATO DIBASICO DE CALCIO	INSOLUBLE
LACTOSA	LIGERAMENTE SOLUBLE

Tabla 6. Resultados de solubilidad de cada uno de los excipientes de la tableta de dapsona.

Comentarios:

Debido a las propiedades de solubilidad de cada uno de los componentes de la fórmula se eligió el etanol para disolver la muestra. Solvente en el que es soluble la sustancia de interés para cuantificar y en donde los excipientes son insolubles, con la excepción de la lactosa.

Elección de la longitud de onda del detector UV:

ENSAYO	RESULTADO					
BARRIDO ESPECTROFOTOMETRICO DE LA DAPSONA	DISOLVENTE: ETANOL					
	CONCENTRACIÓN: 8 µg/ml.					
	<table> <thead> <tr> <th>λ (nm)</th> <th>absorbancia</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>295.6</td> <td>0.946</td> </tr> <tr> <td>229.8</td> <td>0.099</td> </tr> </tbody> </table>	λ (nm)	absorbancia	295.6	0.946	229.8
λ (nm)	absorbancia					
295.6	0.946					
229.8	0.099					

Tabla 7. Resultado del barrido espectrofotométrico de la dapsona sustancia de referencia sec. en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160.

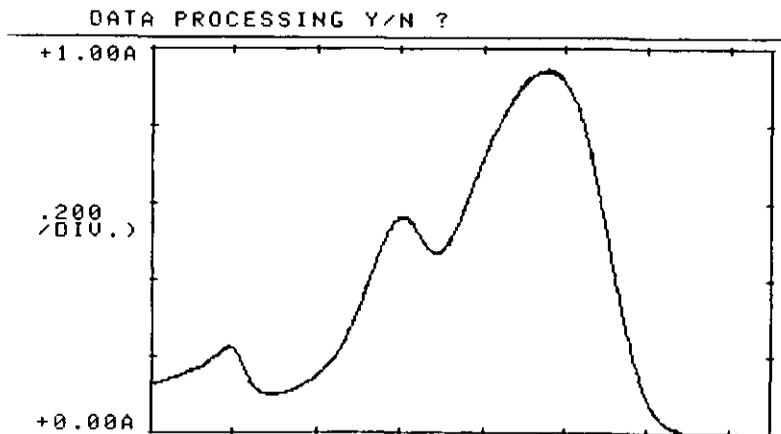


Tabla 8. Barrido espectrofotometrico de la dapsona sustancia de referencia secundaria en Equipo: Espectrofotómetro Shimadzu UV-160, celda de 1 cm, 8 µg/ml (metanol). Rango de longitud de onda: de 200 a 350 nm.

Comentarios:

Tomando en cuenta que el análisis de interés presenta un máximo de absorción en un medio ácido alrededor de 290 nm se elige esta longitud de onda que posteriormente se definirá en base a los ensayos por CLAR, la longitud de onda del método analítico.

Elección de fase móvil:**Comentarios:**

Con apoyo en los ensayos de solubilidad, en donde la dapsona es muy soluble en metanol y en mezcla de metanol-agua (80:20) no existe precipitación, se inicia con esta proporción.

Se elige esta fase móvil por la solubilidad del activo, por sus características para ser usado como componente de fases móviles y por su costo.

Elección de columna:**Comentarios:**

Con el apoyo de la referencia 27, se elige la siguiente columna para separar y cuantificar la dapsona.

COLUMNA

HYPERSIL CN, 5 MICRAS;
250 x 4.6 mm.

Otras condiciones cromatográficas:

Velocidad de flujo: 1.7 ml/min.

RESULTADOS DEL DESARROLLO DE METODO ANALÍTICO POR CLAR:

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	TIEMPO RETENCIÓN	FACTOR COLEO	EFICIENCIA	AREA	COMENTARIOS
Fase móvil : agua pH 3, metanol (80:20)	_____	_____	_____	_____	PICO DEFORME
Fase móvil: agua pH 4, metanol (80:20)	8.9	0.84	2894	114.2	PICO BIEN DEFINIDO, SE CONTINUA CON MODIFICACIÓN EN LA PROPORCIÓN DE FASE ORGÁNICA PARA REDUCIR EL TIEMPO DE RETENCIÓN
Fase móvil: agua pH 4-metanol (80:20)	9.11	0.84	3035	107.6	
Fase móvil: agua pH 4-metanol (80:30)	6.49	0.88	2843	107.9	
Fase móvil: agua pH 4-metanol (80:40)	5.1	0.89	2857	108.8	SE SELECCIONA ESTA PROPORCIÓN DE FASE MOVIL, PORQUE EL FACTOR DE COLEO ES EL MAS CERCANO A 1 Y PORQUE EL TIEMPO DE RETENCIÓN ES MENOR.
Longitud de onda: 280 nm	4.4	0.87	2368	85.7	
Longitud de onda: 285 nm	4.4	0.88	2347	95.6	
Longitud de onda: 290 nm	5.1	0.89	2857	108.8	SE SELECCIONA ESTA LONGITUD DE ONDA PORQUE CON ELLA EL AREA DEL PICO DE INTERES ES MAYOR, Y EL F. COLEO TIENDE MAS AL VALOR DE 1 Y EL VALOR DE LA EFICIENCIA ES MAYOR.
Longitud de onda: 295 nm	4.5	0.88	2391	102.6	
Longitud de onda: 300 nm	4.4	0.88	2381	93.5	

Tabla 9. Resultados de los ensayos de la cromatografía de líquidos de alta resolución, bajo las condiciones establecidas.

CROMATOGRAMAS:

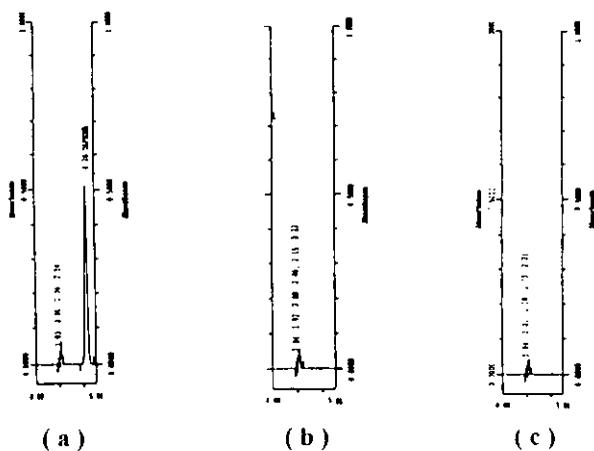


Fig. 6. (a) Cromatogramas del estándar, (b) placebo, (c) etanol grado reactivo obtenidos bajo las condiciones del método a validar.

COMENTARIOS:

Las condiciones del sistema cromatográfico de las últimas pruebas se consideran convenientes para cuantificar la dapsona en tabletas debido a que se demostró que no existe ninguna interferencia de los excipientes, el tiempo de corrida es corto (aproximadamente 6 minutos), y el factor de colco es muy cercano a uno.

V.4 METODO DE ANALISIS A VALIDAR.

REACTIVOS:

- Metanol Grado CLAR, J.T.Baker.
- Agua desmineralizada
- Acido fosfórico 85%, J. T. Baker.
- Etanol Grado reactivo, J.T. Baker.
- Acido clorhídrico 2 %, J.T. Baker.
- Hidróxido de sodio 6 N, J. T. Baker.
- Dapsona (estándar de referencia secundario). No. de lote 012/97.
- Placebo
- Producto terminado No. de lote: 702017

MATERIAL:

- Matraces volumétricos de 25 ml. Kimax
- Matraces volumétricos de 500 ml. Kimax
- Pipetas volumétricas de 1 ml. Kimax
- Pipetas volumétricas de 2 ml. Kimax
- Pipetas volumétricas de 4 ml. Kimax
- Pipetas volumétricas de 10 ml. Kimax
- Probetas de 100 ml. Kimax
- Probetas de 250 ml. Kimax.
- Kitazato de 500 ml. Pyrex
- Filtros de nylon 0.45 micras, 25 mm de diámetro. Titan. -
Membranas de filtración de nylon 0.45 micras, 45 mm de diámetro.
Proveedor Leacsa.

EQUIPO:

- Sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución Beckman.
- Detector de longitud de onda variable. Modelo: 168; serie 386-1615
- Inyector Beckman. Modelo 507E; serie 6600
- Sistema de bombeo Beckman. Modelo 126; serie : 526-1454
- Columna Hypersil ciano (CN) de 5 micras, 250 X 4.6 mm .

- Computadora personal. Unidad central de proceso. Marca: Compaq. Modelo: M5120/1200 L/A; serie: 6649HVS4US4U575
- Monitor. Marca: Compaq. Modelo: 629AF19JA615.
- Teclado. Marca compaq. Modelo: RT6656TWLA. Serie: 121739-016A
- Mouse. Marca: compaq. Modelo: BO4ABOG5BDW23V1. Serie: 141189-401.
- Impresora. Marca: Hewlett Packard. Modelo: Laser Jet 5MP C3155A; No. serie : Ushb020635.
- Potenciómetro Orión. Modelo 811
- Baño ultrasonido. Mettler ELECTRONICS CORP. ULTRASONIC CLEANER CAVITATOR
- Bomba de vacío. Marca klemm

CONDICIONES DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO.

Fase móvil: Solución acuosa: Metanol HPLC (67:33)

Columna: Hypersil ciano: de 25 cm de longitud, 4.6 mm de diámetro, 5 micras de tamaño de partícula.

Velocidad flujo: 1.7 ml/min.

Detector: 290 nm.

Volumen de inyección: 20 µl.

Tiempo de retención de dapsona: 4.2 min.

PREPARACIÓN DE FASE MOVIL:

Agua acidulada pH 4 : Metanol HPLC (67:33)

Agua acidulada pH 4: ajustar el pH del agua a 4.0 ± 0.1 con ácido fosfórico al 10%. Filtrar a través del equipo de filtración de solventes, utilizando membrana de 0.45 micras.

Metanol HPLC

Filtrar a través del equipo de filtración de solventes, Metanol HPLC utilizando membrana de 0.45 micras.

Mezclar los solventes en la proporción (67:33) agua acidulada: metanol, y desgasificar en el ultrasonido.

SOLUCION STOCK DE DAPSONA:

Pesar con exactitud el equivalente a 100 mg de dapsona y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 500 ml, disolver con 400 ml de etanol grado reactivo y llevar a volumen con el mismo disolvente y agitar.

PREPARACIÓN DEL ESTANDAR:

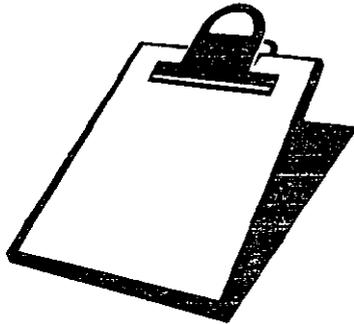
Pesar con exactitud 25 mg de dapsona estandar de referencia y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 ml, disolver con 20 ml de etanol grado reactivo y llevar a volumen con el mismo disolvente. Tomar una alícuota de 2 ml con una pipeta volumétrica de esta solución y colocarla en otro matraz volumétrico de 25 ml, llevar a volumen con el mismo disolvente. (conc. de dapsona 80 µg/ml)

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

Macerar en un mortero 20 tabletas hasta obtener un polvo fino. Pesar aproximadamente 65 mg de muestra en un matraz volumétrico de 25ml, disolver con 20 ml de etanol grado reactivo, sonicar por 10 minutos y llevar a volumen con el mismo disolvente. Tomar una alícuota de 2 ml con una pipeta volumétrica de esta solución y colocarla en un matraz volumétrico de 25 ml, llevar a volumen con el mismo disolvente. Filtrar con membrana de nylon de 0.45 micras. (conc. de dapsona 80 µg/ml)

VI

RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL METODO ANALÍTICO PARA CONTROL DE CALIDAD



6.1 LINEARIDAD DEL SISTEMA:

A) METODOLOGIA

Realizar una curva de estándar de concentración contra área bajo la curva utilizando un rango de concentraciones de 60, 80, 100, 110 y 120 % de dapsona sustancia de referencia, partiendo de una misma solución stock.. Analizar por triplicado cada nivel de concentración.

B) CRITERIO DE ACEPTACION

El método analítico se designará lineal cuando la curva encontrada en el sistema demuestre ser una línea recta a través de los siguientes parámetros^{18, 20}:

CRITERIO DE ACEPTACION	
- Intercepto (b)	$b \approx 0$
- Coeficiente de correlación (r)	$r \geq 0.99$
-Coeficiente de determinación (r ²)	$r^2 \geq 0.98$
- Pendiente relativa (MR)	$0.98 \leq MR \leq 1.02$
-Intervalo de confianza para el intercepto	Se considera lineal el intervalo de trabajo establecido si dentro del intervalo de confianza para la ordenada al origen se encuentra el cero.
-Prueba de hipótesis para el intercepto	Si $t_{CAL} < t_{TEO(0.975, n-2)}$: la hipótesis nula ($H_0: b = 0$) no se rechaza por lo que el intercepto no es significativamente diferente de cero.

Tabla 10. Criterios de aceptación para la linealidad de sistema.

C) RESULTADOS

NIVEL (%)	CONC. (mg/ml)	RESPUESTA (AREAS)
60	0.048	61.19653
60	0.048	62.12271
60	0.048	61.19860
80	0.064	80.90739
80	0.064	80.99397
80	0.064	81.05533
100	0.080	101.77996
100	0.080	102.44086
100	0.080	100.89863
110	0.088	111.28509
110	0.088	111.60498
110	0.088	112.46785
120	0.096	122.05968
120	0.096	122.28121
120	0.096	121.53799

Tabla 11. Resultados obtenidos en la linealidad del sistema, concentración de la dapsona sustancia de referencia (mg/ml) contra respuesta obtenida (Area).

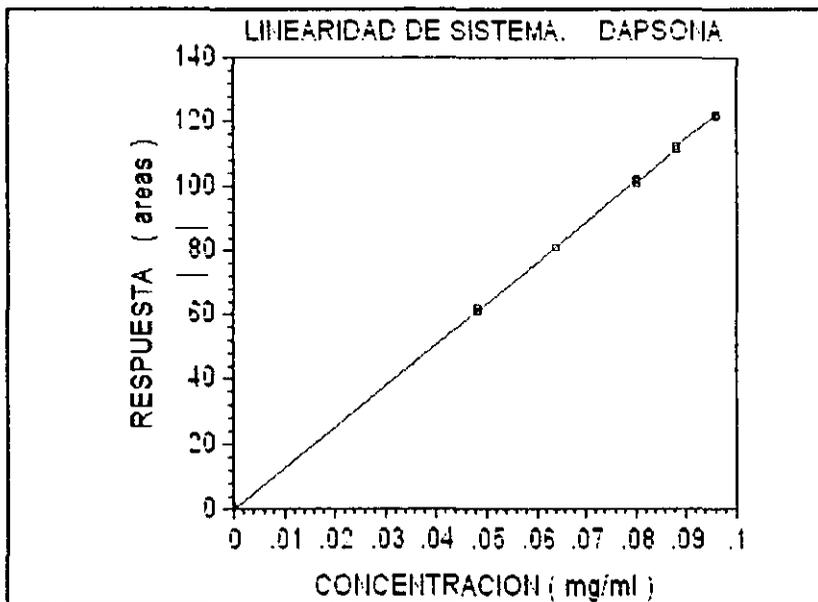


Fig. 7. Gráfica de linearidad del sistema.

$$n = 15$$

$$\bar{x} = 0.0752$$

$$\bar{y} = 95.5887$$

$$\sum x = 1.128$$

$$\sum x^2 = 0.08928$$

$$\sum y = 1433.8308$$

$$\sum y^2 = 144171.137$$

$$\sum xy = 113.4515$$

$$S_x = 0.0178$$

$$S_y = 22.5406$$

$$\text{ERROR ESTANDAR DE REGRESION } (S_{y/x}) = 0.5341$$

ANÁLISIS	CRITERIO	RESULTADO
- Intercepto	$b \approx 0$	0.5853
-Coeficiente de correlación	$r \geq 0.99$	0.9997
-Coeficiente de determinación	$r^2 \geq 0.98$	0.9995
- Pendiente relativa	$0.98 \leq MR \leq 1.02$	0.9939
-Intervalo de confianza para el intercepto al 95%.	Se considera lineal el intervalo de trabajo establecido si dentro del intervalo de confianza para la ordenada al origen se encuentra el cero y se acepta el valor de la pendiente relativa.	0.5853 ± 1.3336 (-0.7483 a 1.9189)
-Estadígrafo de contraste para el intercepto.	Si $t_{EXP} < t_{TEO(0.975, n-2)}$: la hipótesis nula ($H_0 \quad b = 0$) no se rechaza por lo que el intercepto no es significativamente diferente de cero.	$t_{EXP} = 0.9481$ $t_{TEO(0.975, 13)} = 2.16$

Tabla 12. Criterio de aceptación para la linealidad del sistema y resultado de la prueba^{18, 20}.

D) ANÁLISIS DE RESULTADO

Cumple con el criterio de aceptación lo que significa que existe una relación lineal entre la cantidad de fármaco y la respuesta

6.2 PRECISION DEL SISTEMA:

A) METODOLOGÍA

Analizar por sextuplicado de manera independiente soluciones patrón de referencia, preparadas a una concentración correspondiente al 100 % propuesto en el método, a partir de una misma solución stock.

B) CRITERIO DE ACEPTACION

Método cromatográfico	$CV \leq 1.5 \%$
-----------------------	------------------

Tabla 13. Criterio de aceptación de la precisión del sistema^{18, 20}.

C) RESULTADOS

NIVEL (%)	CONC. (mg/ml)	RESPUESTA (areas)
100%	0.080	101.77996
100%	0.080	102.44086
100%	0.080	100.89863
100%	0.080	101.30688
100%	0.080	101.40170
100%	0.080	100.76180

Tabla 14. Resultados obtenidos en la precisión del sistema.

No. OBSERVACIONES: 6

MEDIA (\bar{x}) = 101.43

COEFICIENTE DE VARIACION (CV) = 0.61

ANÁLISIS	CRITERIO	RESULTADO
-Coeficiente de variación (CV)	$CV \leq 1.5 \%$	0.61 %

Tabla 15. Criterio de aceptación para la precisión del sistema y resultado de la prueba^{18, 20}.

D) ANÁLISIS DE RESULTADOS

Cumple con este parámetro de la validación, por que el coeficiente de variación es menor a 1.5 %, lo cual quiere decir que existe un alto grado de concordancia entre mediciones analíticas individuales obtenidas bajo las mismas condiciones de medición.

6.3 LINEARIDAD DE METODO:

A) METODOLOGIA

Adicionar a una cantidad correspondiente al 100 % de placebo, cantidades conocidas del principio activo de dapsona de 5 diferentes concentraciones: 60, 80, 100, 110 y 120%.

Analizar cada nivel por triplicado de manera independiente.

B) CRITERIO DE ACEPTACIÓN

El método analítico se designará lineal cuando la curva de cantidad del fármaco adicionado, contra cantidad de fármaco recuperado demuestre ser una línea recta a través de los siguientes parámetros^{18, 20}:

		CRITERIO DE ACEPTACIÓN
-PENDIENTE (m)		m = 1
-INTERCEPTO (b)		b = 0
-COEFICIENTE DE CORRELACION (r)	DE	r = 0.99
-COEFICIENTE DETERMINACION (r ²)	DE	r ² = 0.98
-INTERVALO DE CONFIANZA PARA EL INTERCEPTO Y LA PENDIENTE:	DE EL LA	Si dentro del intervalo de confianza para el intercepto se encuentra comprendido el cero y dentro del intervalo de confianza para la pendiente esta comprendido el uno, el método se considera lineal en el intervalo de concentración establecido.
-Prueba de hipótesis para el intercepto		Si $t_{CAL} < t_{TEO(0.975, n-2)}$: la hipótesis nula (H_0 b = 0) no se rechaza por lo que el intercepto no es significativamente diferente de cero.
-Prueba de hipótesis para la pendiente		Si $t_{CAL} < t_{TEO(0.975, n-2)}$: la hipótesis nula (H_0 m = 1) no se rechaza por lo que la pendiente no es significativamente diferente de uno.

Tabla 16. Criterio de aceptación de la linealidad del método.

C) RESULTADOS

NIVEL	mg/ml ADICIONADOS	mg/ml RECUPERADOS	% RECUBRO
60	0.048	0.0484	100.83
60	0.048	0.0482	100.47
60	0.048	0.0481	100.20
80	0.064	0.0639	99.98
80	0.064	0.0641	100.18
80	0.064	0.0639	99.82
100	0.080	0.0797	99.65
100	0.080	0.0804	100.50
100	0.080	0.0795	99.32
110	0.088	0.0879	99.92
110	0.088	0.0878	99.82
110	0.088	0.0878	99.85
120	0.096	0.0958	99.86
120	0.096	0.0957	99.73
120	0.096	0.0962	100.20

Tabla 17. Resultados obtenidos en la linealidad del método, cantidad adicionada (mg/ml) contra cantidad recuperada (mg/ml).

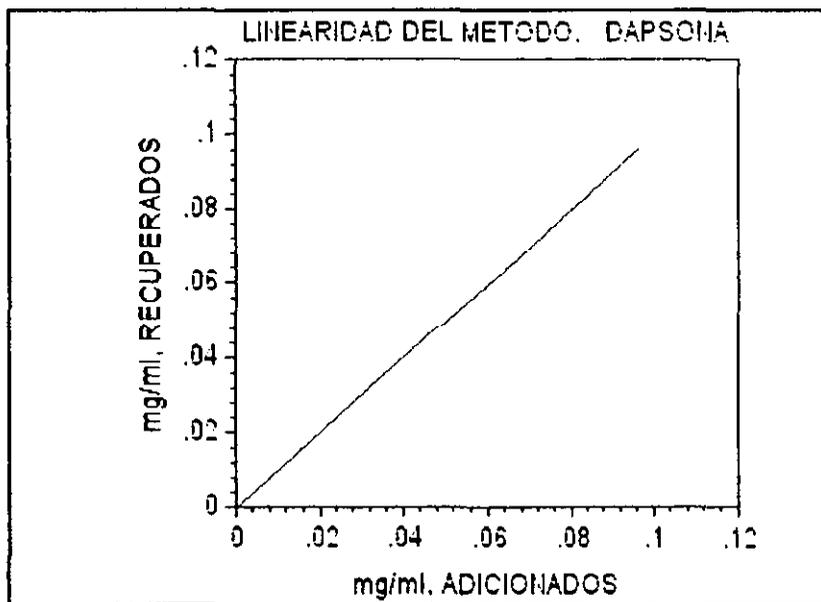


Fig. 8. Gráfica de la linealidad del método.

$$n = 15$$

$$\bar{x} = 0.0752$$

$$\bar{y} = 0.0752$$

$$\sum x = 1.128$$

$$\sum x^2 = 0.0892$$

$$\sum y = 1.128$$

$$\sum y^2 = 0.0892$$

$$\sum xy = 0.0892$$

$$S_x = 0.0178$$

$$S_y = 0.0177$$

$$\text{ERROR ESTANDAR DE REGRESION } (S_{y/x}) = 0.0002$$

- Pendiente (m)	$m = 1$	0.9931
- Intercepto (b)	$b = 0$	0.00049
-Coeficiente de correlación (r)	$r \geq 0.99$	0.9999
-Coeficiente de determinación (r^2)	$r^2 \geq 0.98$	0.9998
-Intervalo de confianza para la pendiente al 95 %.	Si dentro del intervalo de confianza para la pendiente esta comprendido el uno, el método se considera lineal en el intervalo de concentración establecido.	0.9931 \pm 0.0077 (0.9854 a 1.0008)
-Intervalo de confianza para el intercepto al 95 %.	Si dentro del intervalo de confianza para el intercepto se encuentra comprendido el cero, el método se considera lineal en el intervalo de concentración establecido.	4.9698 x 10 ⁻⁴ \pm 5.95 x 10 ⁻⁴ (-9.802 x 10 ⁻⁵ a 1.09198 x 10 ⁻³)
-Estadígrafo de contraste para la pendiente.	Si $t_{EXP} < t_{TEO(0.975, n-2)}$: la hipótesis nula (H_0 $m = 1$) no se rechaza por lo que la pendiente no es significativamente diferente de uno.	$t_{EXP} = 1.80$ $t_{TEO(0.975, 13)} = 2.16$
-Estadígrafo de contraste para el intercepto.	Si $t_{EXP} < t_{TEO(0.975, n-2)}$: la hipótesis nula (H_0 $b = 0$) no se rechaza por lo que el intercepto no es significativamente diferente de cero.	$t_{EXP} = 1.93$ $t_{TEO(0.975, 13)} = 2.16$

Tabla 18. Criterio de aceptación para la linealidad del método y resultado de la prueba ^{18, 20}.

D) ANALISIS DE RESULTADOS

Cumple con el criterio de linealidad del método, relación en que se establece una recta, entre la cantidad de fármaco adicionado y la cantidad de fármaco recuperado.

6.4 ESPECIFICIDAD

A) METODOLOGÍA

Analizar la solución muestra de placebo preparado de acuerdo al tratamiento de la muestra del método propuesto y obtener su respuesta. Compararlos con la solución estándar.

B) CRITERIO DE ACEPTACIÓN

Porcentaje de respuesta de excipientes	$\leq 2\%$
--	------------

Tabla 19. Criterio de aceptación para la especificidad^{18, 20}.

C) RESULTADOS

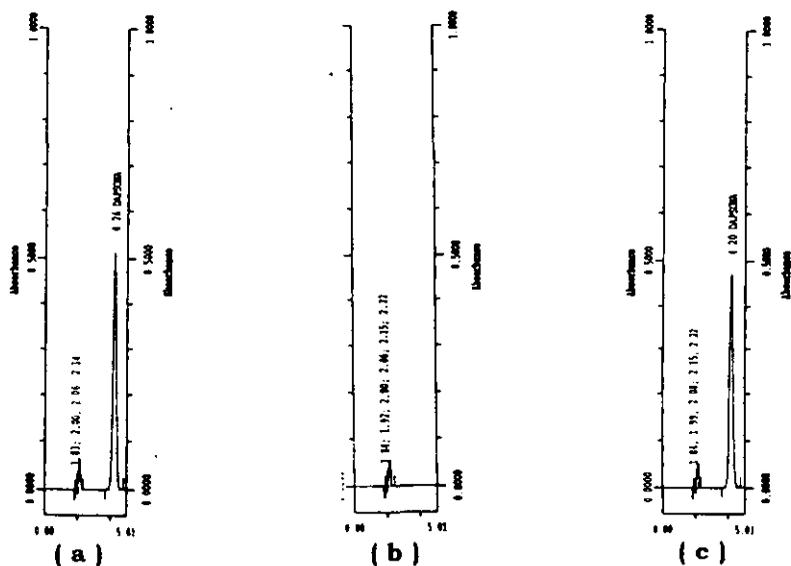


Fig. 9. (a) Cromatograma del estándar de dapsona, (b) placebo y (c) tableta de dapsona número de lote: 702017.

D) ANÁLISIS DE RESULTADOS

No hay respuesta para el placebo en el método establecido y la respuesta es única para el principio activo.

6.5 EXACTITUD DEL METODO

A) METODOLOGÍA

Analizar seis muestras con placebo adicionado al 100 %, preparadas de manera independiente .

B) CRITERIO DE ACEPTACIÓN

Media (\bar{x}) Método cromatográfico	98 A 102 %
Coefficiente de variación (CV) Método cromatográfico	$CV \leq 2.0 \%$
Intervalo de confianza para la media	Debe incluir el 100 %
Prueba de hipótesis para la media	Si $t_{CAL} < t_{TEO}_{(0.975, n-2)}$: la hipótesis nula ($H_0 \bar{x} = 100 \%$) no se rechaza y el método se considera exacto.

Tabla 20. Criterio de aceptación para la exactitud del método^{18, 20}.

C) RESULTADO

NIVEL	% RECUPERADO
100%	100.12
100%	100.47
100%	100.10
100%	99.65
100%	100.12
100%	99.32

Tabla 21. Resultados de la exactitud del método, por ciento de recobro.

- Media (\bar{x}) Método cromatográfico.	98 A 102 %	99.96 %
-Coeficiente de variación (CV)	CV \leq 2.0 %	0.41 %
-Intervalo de confianza para la media	Debe incluir el 100 %	99.96 % \pm 0.43 (99.53 A 100.39)
-Prueba de hipótesis para la media	Si $t_{CAL} < t_{TEO(0.975, n-1)}$: la hipótesis nula ($H_0 \bar{x} =$ 100 %) no se rechaza y el método se considera exacto.	$t_{EXP} = 0.24$ $t_{TEO(0.975, 5)} =$ 2.57

Tabla 22. Criterio de aceptación para la exactitud del método y resultado de la prueba^{18, 20}.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

El método se considera exacto por que el intervalo para la media se incluye el 100 %, el estadígrafo de contraste experimental es menor al teórico, el coeficiente de variación es menor del 2.0 %, y la media se haya dentro del rango especificado para métodos cromatográficos.

6 PRECISION DEL METODO

6.6.1 REPETIBILIDAD

A) METODOLOGÍA

Emplear los resultados de por ciento recuperados de la linealidad, calculados en base a la cantidad adicionada.

B) CRITERIO DE ACEPTACIÓN

Coefficiente de variación (CV) Método cromatográfico	$CV \leq 2.0 \%$
--	------------------

Tabla 23. Criterio de aceptación para la repetibilidad del método^{18, 20}.

C) RESULTADOS

NIVEL	mg/ml ADICIONADOS	% RECOBRO
60	0.048	100.83
60	0.048	100.47
60	0.048	100.20
80	0.064	99.98
80	0.064	100.18
80	0.064	99.82
100	0.080	99.65
100	0.080	100.50
100	0.080	99.32
110	0.088	99.92
110	0.088	99.82
110	0.088	99.85
120	0.096	99.86
120	0.096	99.73
120	0.096	100.20

Tabla 24. Resultados de la repetibilidad del método, por ciento de recobro.

MEDIA (\bar{x}) = 100.1 %
 DESVIACIÓN ESTANDAR (S) = 0.30 %

-Coeficiente de variación (CV)	CV ≤ 2.0 %	0.30 %
--------------------------------	------------	--------

Tabla 25. Criterio de aceptación para la repetibilidad del método y resultado del parámetro^{18,20}.

D) ANÁLISIS DE RESULTADOS

Cumple con el criterio de aceptación para la repetibilidad del método, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, empleando el mismo aparato y la misma técnica.

6.6.2 REPRODUCIBILIDAD

A) METODOLOGÍA

Analizar el contenido de dapsona en la tableta por dos diferentes analistas por triplicado en 2 diferentes días (el mismo día para ambos).

B) CRITERIO DE ACEPTACIÓN

Coeficiente de variación (CV) Método cromatográfico	$CV \leq 2.0 \%$
Análisis de varianza	$F_{CAL} \leq F_{TEO}$

Tabla 26. Criterio de aceptación para la reproducibilidad del método^{18, 20}.

C) RESULTADO

	ANALISTA 1	ANALISTA 2
1er DIA	98.75 %	99.62 %
	98.66 %	97.60 %
	98.34 %	98.45 %
2° DIA	101.93 %	100.75 %
	102.00 %	100.36 %
	98.84 %	100.45 %

Tabla 27. Resultados de la reproducibilidad del método, 2 analistas en dos días diferentes.

Media (\bar{x}) = 99.65 %

Desviación Estandar (S) = 1.4

Coficiente de Variación (C.V.) = 1.4

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADROS	GRADO DE LIBERTAD	MEDIA DE CUADROS	F CALCULADA	F (0.95) TEORICA
DIA	13.88900	1	13.88900	130.5255	161.45
ANALISTA	0.138675	1	0.138675	1.303234	161.45
INTERACCIO N	0.106408	1	0.106408	0.097327	5.32
ERROR	8.7464	8	1.0933		
TOTAL	22.88049	11			

Tabla 28. Resultados del análisis de varianza de la reproducibilidad del método.

-Coeficiente de variación (CV)	$CV \leq 2.0 \%$	1.4 %
- Análisis de varianza	$F_{CAL} \leq F_{TEO}(0.95, 11)$	$F_{CAL} = 0.097 < F_{TEO}(0.95, 11) = 5.32$

Tabla 29. Criterio de aceptación de la reproducibilidad y resultado de la prueba^{18,20}.

D) ANÁLISIS DE RESULTADOS

El método es reproducible.

6. 7 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

A) METODOLOGÍA

Analizar y comparar los resultados de los análisis iniciales de 3 muestras diferentes de dapsona tabletas por cromatografía de líquidos de alta resolución con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo de 24 y 48 horas.

Almacenar las muestras analizadas bajo distintas condiciones
 1) temperatura ambiente, 2) refrigeración 3) protegidas de la luz. Reanalizarlas bajo las mismas condiciones de operación,

utilizando una solución de referencia recientemente preparada, para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido en el método analítico.

B) CRITERIO DE ACEPTACIÓN

La muestra es estable si el Intervalo de confianza para la diferencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero.

Tabla 30. Criterio de aceptación para la estabilidad de la muestra^{18, 20}.

C) RESULTADOS

INICIAL (%)	T.A. LUZ / 24 hrs (%)	T.A. LUZ / 48 hrs (%)	REFRIGERACION / 24 hrs (%)	REFRIGERACION / 48 hrs (%)	T.A. OSCURIDAD / 24 hrs (%)	T.A. OSCURIDAD / 48 hrs (%)
100.75	100.51	101.36	100.73	100.65	103.18	98.19
100.36	100.32	103.05	102.81	103.61	100.48	102.35
100.45	100.19	100.19	98.46	100.15	98.19	98.43

Tabla 31. Resultados obtenidos en la estabilidad de la muestra de 24 hrs y 48 hrs.

Condición	Media Inicial	Intervalo de Confianza	Resultado
- Inicial	100.52		
- 24 Hrs.T.A.Luz	100.34	-0.53 a 0.17	CERO INCLUIDO
24Hrs.Refrigeración	100.62	-2.8 a 3.1	CERO INCLUIDO
- 24 Hrs. T.A.Oscuridad	100.67	-3.28 a 3.48	CERO INCLUIDO
- 48 Hrs. T.A. Luz	101.53	-0.95 a 2.97	CERO INCLUIDO
- 48 Hrs.Refrigeración	101.47	-1.59 a 3.49	CERO INCLUIDO
- 48 Hrs.T.A. Oscuridad	99.66	-4.02 a 2.30	CERO INCLUIDO

T.A.= Temperatura ambiente

Tabla 32. Resultado del intervalo de confianza para la diferencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial.

D) ANÁLISIS DE RESULTADOS

La muestra se considera estable hasta las 48 horas, conservada bajo cualquiera de las tres condiciones, ya que dentro del intervalo de confianza se encuentra incluido el cero.

PARAMETROS	CRITERIOS DE ACEPTACION	RESULTADO
Linealidad del sistema	<ul style="list-style-type: none"> - Coeficiente de relacion (r) ≥ 0.99 - Coeficiente de determinacion (r²) ≥ 0.98 - Pendiente relativa (MR) $0.98 \leq MR \leq 1.02$ - En el intervalo de confianza para el intercepto se encuentra el cero. - En la prueba de hipotesis para el intercepto $t_{EXP} \leq t_{TEORICA(0.975,13)}$ 	<p>0.9997 0.9995 0.9939 CUMPLE 0.948 < 2.16</p>
Precisión del sistema	<ul style="list-style-type: none"> - Coeficiente de variación $\leq 1.5 \%$ 	0.61 %
Especificidad A) Excipientes	<ul style="list-style-type: none"> - Respuesta de excipientes $\leq 2.0 \%$ 	CUMPLE
Linealidad del Método	<ul style="list-style-type: none"> - Coeficiente de relacion (r) ≥ 0.99 - Coeficiente de determinacion (r²) ≥ 0.98 - Pendiente (m) $0.98 \leq m \leq 1.02$ - Intercepto (b) ≈ 0 - En el intervalo de confianza para el intercepto se encuentra el cero. - En la prueba de hipotesis para el intercepto $t_{EXP} \leq t_{TEORICA(0.975,13)}$ - En el intervalo de confianza para la pendiente se encuentra el valor 1 - En la prueba de hipotesis para la pendiente $t_{EXP} \leq t_{TEORICA(0.975,13)}$ 	<p>0.9999 0.9998 0.9931 0.00049 CUMPLE 1.80 < 2.16 CUMPLE 1.93 < 2.16</p>
Precisión del Método	<ul style="list-style-type: none"> - Coeficiente de variación $\leq 2.0 \%$ 	0.30 %
Exactitud del Método	<ul style="list-style-type: none"> - Media (\bar{x}) = 98 a 102 % - Coeficiente de variación $\leq 2.0 \%$ - En el intervalo de confianza para la media se encuentra el valor de 100 - En la prueba de hipotesis para la media $t_{EXP} \leq t_{TEORICA(0.975,14)}$ 	<p>99.96% 0.41 % CUMPLE 0.24 < 2.57</p>
Reproducibilidad	<ul style="list-style-type: none"> - Coeficiente de variación $\leq 2.0 \%$ - En el análisis de la varianza $F_{CAL} \leq F_{TEORICA(0.95,11)}$ 	<p>1.4 % 0.097 < 5.32</p>
Estabilidad de la muestra	<ul style="list-style-type: none"> - En el intervalo de confianza debe estar incluido el cero. 	CUMPLE

CONCLUSIONES

1. Se desarrollo un método analítico por Cromatografía de líquidos de alta resolución y las condiciones del sistema cromatográfico son las siguientes:

- Fase móvil: Solución acuosa: Metanol HPLC (67:33)
- Columna: Hypersil ciano: de 25 cm de longitud, 4.6 mm de diámetro, 5 micras de tamaño de partícula.
- Velocidad flujo: 1.7 ml/min.
- Detector: 290 nm.
- Volumen de inyección: 20 µl.

2. La validación del método desarrollado fue lineal en el rango de 48 a 96 µg/ml con una pendiente de 0.9931 y un intercepto de 0.00049; fue exacto en el intervalo de 99.53% a 100.39 %; en especificidad no hubo respuesta por parte del placebo; fue preciso con un coeficiente de variación del 0.30% y la reproducibilidad mostró un coeficiente de variación del 1.4%; con respecto a la estabilidad de la muestra fue estable a luz natural, refrigeración y oscuridad por 48 horas ya que se incluye el cero en el intervalo de confianza. Por lo tanto el método es recomendable para control de calidad en la cuantificación de la dapsona en tabletas.

BIBLIOGRAFIA

1. Arenas, M; et. al. Cromatografía de gases. UAM-Xochimilco. Cuadernos CBS, 1985.
2. Bello, G. *Pharma News.* **2**, 19-29, (1991).
3. Bender T. Métodos Instrumentales de Análisis en Química Clínica. Editorial Acribia, S. A de C.V. Zaragoza, 1992.
4. Brouet, G; Marche, J; et. al. Observations on the antituberculosis effectiveness of alpha-ethyl-thiosonicotinamida in tuberculosis in humans. *Am. Rev. Tuberc.* **6**, 79 , (1959).
5. Casassas, E. et. al., Modern analytical chemistry. Editorial reverté, S. A., España, 1980.
6. Ellard, G., Gammon, P. *Int. J. Leprosy.* **37**, 398-405 (1969).
7. Farmacología médica. Clark, W; et. al. 13th de. España, 1992.
8. Farmacología Médica Drill. 2a. ed., La prensa médica mexicana. México, D.F., 1971.
9. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 6a. ed., 1994, pag. 101-112.
10. Fishbein, L., and Fawkes, *J. Chromatogr.* **22**, 323-329 (1966).
11. Orzich, CH., Nash, N. and Daley, R. Analytical profiles of drug substances. Klaus Florey. Vol. 5. pag. 87-114.
12. Galen, E. Instrumental Methods of Chemical Analysis. 15 ed., Mc Graw-Hill Book Company. 1985.
13. Garrido, F. Y Juarez, *J. Pharma News.* **1**, 18-22 , (1991)
14. Gordon, G. *J. Chromatogr.* **47**, 269-271, (1970).
15. Huber, L. Buenas Prácticas de Laboratorio y Buenas Prácticas de fabricación actuales. Hewlett--Packard. Holanda. 1994, pag. 38.

16. Kennedy, John. *Analytical Chemistry Principles*. Harcourt Brace Jovanvich Publishers.
17. Maschka, A; et. al., *Chemical analytical*. **85**, 168-181, (1954).
18. Métodos analíticos. Comité de elaboración de guías oficiales de validación de la dirección de control de insumos para la salud. S.S.A.
19. Murray, J., Gordon, G; et. al., *J. Chromatogr.* **107**, 67-72, (1975).
20. Procedimiento general para la validación de métodos analíticos. Laboratorios Columbia; Clave: DF-06-01.
21. Remington's pharmaceutical sciences, 17 th. ed., Mack Publishing company, Easton, Pennsylvania. 1985.
22. Robson, J. And Keele, C. Recent advances in Pharmacology. 2nd. ed. J. And A. Churchill Ltd., London, 1959.
23. Skoog, D. Análisis Instrumental. Nueva editorial Interamericana, S. A. de C. V., México, D. F. 1986.
24. The Merk Index, 11 th ed., Merck and CO., Inc. Rahway, N. J., U:S.A.,1989.
25. Wiley, J. and sons, *Organic Syntheses*. New York, N.Y., **22**, 31-34 (1942).
26. Bowman, W. et.al., Farmacología bases bioquímicas y patológicas, aplicaciones clínicas. Nueva editorial interamericana, S.A. de C.V. México, D. F. 1980.
27. USP XXIII, 1995. pag. 443-444.
28. Farmacopea British, 1980. **II** pag 755.
29. Manual práctico de cromatografía en el análisis de alimentos. Merck. 1976. pag. 16-18.