

2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

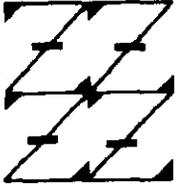


FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO
INDICADOR DE ESTABILIDAD PARA
FURAZOLIDONA EN SUSPENSION ORAL POR
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA
RESOLUCION

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
LETICIA CASTELLANOS CASTELLANOS

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO HUMANO ES
DE NUESTRAS REFLEXIONES

MEXICO, D.F.

271048

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1999



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

	PAGINA
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA.....	4
3. GENERALIDADES.....	5
3.1. Monografía de Furazolidona.....	5
3.1.1 Nomenclatura.....	5
3.1.2 Origen y química.....	5
3.1.3 Estructura química.....	5
3.1.4 Propiedades físicas.....	6
3.1.5 Solubilidad.....	6
3.1.6 Identificación.....	6
3.1.7 Espectroscopia de masas.....	7
3.2. Antisépticos urinarios.....	8
3.2.1 Farmacocinética.....	8
3.2.3 Farmacodinamia.....	8
3.2.4 Toxicidad.....	9
3.2.5 Preparados y dosis.....	9
3.3 CROMATOGRAFIA DE LÍQUIDOS.....	10
3.3.1 Desarrollo histórico.....	10
3.3.2 Conceptos básicos de cromatografía.....	11
3.3.3 Técnicas de separación.....	16
3.3.4 Cromatografía de partición.....	19
3.3.5 Instrumentos para cromatografía de líquidos de alta resolución.....	20
3.3.6. Estándar interno.....	23
3.4 VALIDACION DE MÉTODOS ANALITICOS.....	24
3.4.1 Definición.....	24
3.4.2 Linealidad y Precisión del sistema.....	24
3.4.3 Especificidad productos de degradación.....	24
3.4.4 Linealidad del método.....	25
3.4.5 Exactitud del método.....	25
3.4.6 Precisión del método.....	25
3.4.7 Repetibilidad del método.....	26
3.4.8 Reproducibilidad del método.....	26
3.4.9 Estabilidad de la muestra.....	26
3.4.10 Tolerancia del sistema.....	26

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
5. OBJETIVOS.....	28
6. HIPÓTESIS.....	29
7. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	30
7.1 Material.....	30
7.2 Reactivos y sustancias de referencia.....	31
7.3 Equipos e instrumentos.....	32
7.4 Método.....	33
7.4.1 Caracterización de la materia prima.....	33
7.4.2 Desarrollo del método.....	34
7.4.3 Especificidad del método.....	38
7.4.4 Selección de la sustancia de referencia interno.....	46
7.5 MÉTODO ANALITICO.....	49
7.5.1 Preparación de la sustancia de referencia interna de Diclofenac Sodico.....	49
7.5.2 Preparación de solución patron de referencia.....	49
7.5.3 Preparación de las muestras.....	49
7.6 VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	51
7.6.1 Linealidad y Precisión del sistema.....	51
7.6.2 Especificidad a productos de degradación.....	51
7.6.3 Linealidad del método.....	51
7.6.4 Exactitud y repetibilidad.....	52
7.6.5 Precisión.....	52
7.6.6 Estabilidad de la solución de la muestra.....	52
7.6.7 Tolerancia del sistema.....	52
8. TABLAS DE RESULTADOS.....	53
9. RESULTADOS.....	66
10. CONCLUSIONES.....	69
11. BIBLIOGRAFIA.....	70
12. ANEXOS.....	72

1. INTRODUCCIÓN

La Furazolidona es un derivado sintético de nitrofurano que ha sido utilizado ampliamente por más de 30 años en la medicina solo o en combinación con otros principios activos para el tratamiento de infecciones gastrointestinales en animales y humanos principalmente en tratamiento de diarrea , colitis y cólera causada por bacterias , protozoarios y giardiasis.(6).

El uso de nitrofuranos es estrictamente regulado en diversos países (11): Es por esto que es importante la determinación y cuantificación de los derivados de nitrofuranos y sus productos de degradación en la formulación de un producto.

Por tanto se propone como un método alternativo , la cromatografía de líquidos de alta resolución por sistema de gradiente, para la determinación del principio activo.

En este estudio se realizó el desarrollo del método analítico por HPLC con un sistema de gradiente que facilitó la separación de Furazolidona de una suspensión a través de extracción con dimetil formamida y logrando la separación de ésta y excipientes a través de una columna C18 μ Bondapak de (300 X 3.9 mm) y siendo detectada a través de un detector u.v. de longitud de onda variable se investigaron las diferentes proporciones útiles para la separación del principio activo, posibles productos de degradación y excipientes de la formulación obteniéndose una resolución adecuada que permite cuantificarlo de la manera más precisa.

Realizándose, posterior al desarrollo del método, la validación del mismo siguiendo los parámetros requeridos en la USP 23 para métodos de categoría I se describe que en esta categoría la validación de métodos analíticos y la cuantificación de los ingredientes activos en productos farmacéuticos terminados.

Los parámetros que se determinan son la exactitud, precisión , linealidad en el intervalo de trabajo, especificidad, estabilidad de la muestra y tolerancia del método.

Los resultados obtenidos aplicando los parámetros de validación antes mencionados cumplen satisfactoriamente los parámetros de validación descritos en USP 23, por lo que la metodología analítica desarrollada puede emplearse como método de rutina para control de calidad y como método indicador de estabilidad.

2. FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA.

Los problemas que se presentan en el campo del análisis farmacéutico son cada día mayores debido al incremento de nuevos productos con moléculas nuevas activas y excipientes novedosos considerados inertes, se ha comprobado que aceleran la degradación química del compuesto de interés de igual manera, factores tales como envasado, tipo de envase, condiciones de almacenamiento, de transporte y distribución pueden modificar absolutamente la estabilidad de una formulación líquida causando modificaciones en la disponibilidad biológica tales como absorción, distribución y excreción, así como cambios organolépticos indeseables, por lo que es necesario contar con una metodología sensible capaz de cuantificar y separar el compuesto de interés de los productos de degradación (5).

Dentro de los métodos más apropiados para cuantificar y separar los productos de degradación de un compuesto de interés encontramos la cromatografía de líquidos de alta resolución porque es una técnica rápida que proporciona alta sensibilidad y resolución, además utiliza pequeñas cantidades de muestra, columnas que son reutilizables, y detectores de longitud de onda variable que permiten identificar cantidades muy pequeñas de muestra proporcionando alta precisión y exactitud en la medición (16)

3. GENERALIDADES

Furazolidona es un derivado de nitofurano que es usado en medicina como único medicamento y o en combinación con otros medicamentos para el tratamiento de infecciones gastrointestinales de animales y humanos debidas a bacterias y protozoarios (giardiasis).(29)

3.1. MONOGRAFÍA DE FURAZOLIDONA.

3.1.1. Nomenclatura.

2-Oxazolidona.

3-[[[5-nitro-2-furanil)metileno]amino].

3-[[5-Nitrofurfurilideno)amino]-2-Oxazolidona.

Furoxana , Furoxona. (2,13)

3.1.2. Origen y química.

La Furazolidona (Figura No 1), derivado del furano, tiene un anillo heterocíclico con un átomo de oxígeno, el cual posee acción bactericida; además la adición de un grupo nitro en la posición 5 del anillo del furano, le confiere acción antibacteriana que son reforzadas por adición de distintas cadenas laterales en la posición 2. La modificación de la cadena lateral del furano de *Furazolidona* en la posición 2 da lugar a que se absorba poco en el intestino, y pueda ser utilizada como antiséptico intestinal, incluyendo algunas parasitosis como la giardiasis.(6,8)

3.1.3. Estructura química

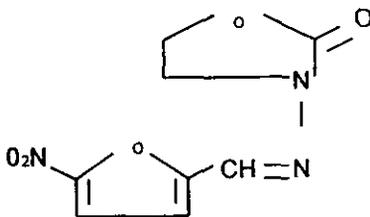


Figura No. 1 Estructura química de Furazolidona

3.1.4. Propiedades físicas.

El peso molecular de Furazolidona es de 225.16 gramos/mol. Se presenta en forma de cristales amarillos que funden a 259°C con descomposición. Debe guardarse en recipientes cerrados y resistentes a la luz . Es inodora y de sabor amargo. (2,3,13)

3.1.5. Solubilidad.

Una parte de Furazolidona es soluble en: 10 a 30 partes de soluciones acuosas a pH = 6, 100 partes de Dimetil formamida, 1000 partes de agua, metanol y cloroformo y 10,000 partes de éter. (2,3)

3.1.6. Identificación.

En espectroscopía infrarroja podemos determinar cuáles son los grupos funcionales que caracterizan a nuestra molécula y a través de ésta hacer comparaciones y verificar que el compuesto de interés exhibe los mismos picos que el compuesto de referencia.

El espectro infrarrojo de Furazolidona (Figura No 2) exhibe principales picos en 227 ,1739, 1015 ,1250 ,1101 y 738 (cm^{-1}),(3,20,22,26)

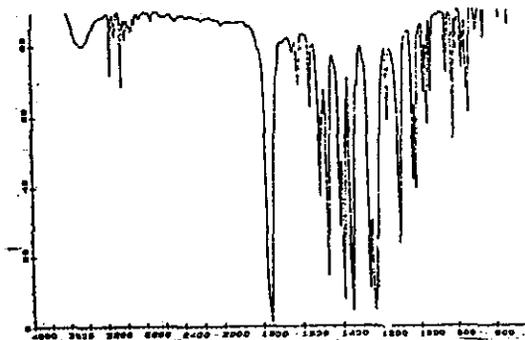


Figura No. 2 Espectro Infrarrojo de Furazolidona.

3.1.7. Espectroscopía de masas

Se encuentran picos principales en m/z 87, 79, 51, 225, 42, 50, 86, 80.

En espectroscopia ultravioleta podemos observar los máximos de absorción que son característicos de Furazolidona y poder hacer referencias con respecto a estas absorbancias.

Espectroscopia ultravioleta de Furazolidona (Figura No 3) : Presenta máximos de absorción a 259 y 367 nm en dimetilformamida con agua (50:1). (3 , 20, 26)

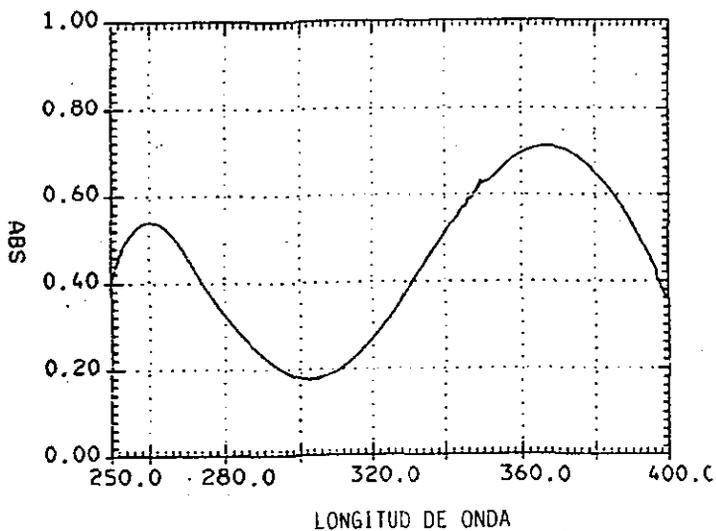


Figura No. 3 Espectro ultravioleta de Furazolidona.

3.9 ANTISEPTICOS URINARIOS.

La principal propiedad farmacológica de Furazolidona, es la de un antiséptico urinario con actividad antibacteriana; logrando la inhibición del crecimiento de especies de bacterias grampositivas y gramnegativas. En virtud de esta propiedad, se emplea también en el tratamiento de diarreas producidas por bacterias y protozoos. (8,17)

El mecanismo de acción no es conocido, pero se cree que actúa sobre la pared celular de las bacterias y sobre el ácido desoxirribonucleico, como lo hace la penicilina, lográndose una acción destructiva. Por tanto, se utiliza en el tratamiento de las infecciones intestinales; principalmente en giardiasis. (8,6)

3.9.1. Farmacocinética.

Para Furazolidona la absorción es escasa en el tracto digestivo. Después de su ingestión, se pueden encontrar residuos en la orina, sin alteración metabólica y productos de su biotransformación, la cual se tiñe de color café. Inhibe algunos sistemas enzimáticos, produciendo alteraciones bioquímicas, como bloqueo del ciclo de Krebs, interfiriendo en el metabolismo energético de los microorganismos susceptibles. (17,6)

3.9.2 Farmacodinamia.

Posee *in vitro* acción bacteriostática o bactericida, según la concentración utilizada, sobre bacterias grampositivas y gramnegativas tales como cocos grampositivos (*Staphylococcus sp. Streptococcus fecalis.*), bacilos grampositivos (*Clostridium sp. Escherichia coli*), bacilos gramnegativos (*Salmonella sp y Shigella sp*). Las especies de *Klebsiella* y *Enterobacter aerogenes*. son menos sensibles a la acción de los nitrofuranos, la cual se atenúa en medio ácido. (8,6)

3.9.3 Toxicidad.

Produce trastornos digestivos como náuseas, vómito y a veces diarrea, cediendo al disminuir la dosis o suprimir el medicamento. Ocasionalmente aparecen reacciones alérgicas que incluyen infiltración pulmonar, cefaléa, hipoglucemia y efectos indeseables como anemia hemolítica, sordera parcial y vértigo. (17)

3.9.4. Preparados y dosis.

En el cuadro oficial de medicamentos se encuentran las siguientes presentaciones de Furazolidona de monopreparados: Suspensión oral (4 mg/mL), Comprimidos (100 mg), Solución pediátrica (30 mg/mL).

Hasta 5 años la dosis es de 5 mg/Kg; para niños mayores de cinco años de 25 a 50 mg cada 6 horas, y para adultos 100 mg cada 6 horas. (17)

3.10. CROMATOGRAFIA DE LÍQUIDOS.

3.10.1. Desarrollo Histórico.

En el año de 1905, por primera vez se utilizaron técnicas cromatográficas para separar mezclas de gases y vapores. Posteriormente se empleó la cromatografía de elución para la separación de clorofila de extractos vegetales; observando que a medida que pasaba el extracto vegetal a través de la columna, se separaban en bandas de diversos colores que correspondían a carotenos, clorofilas y xantofilas. De aquí el origen de la palabra cromatografía que significa color escrito. (16)

No fue sino hasta 1968 que se produjo un avance considerable en esta técnica. Este fue gradual y se debió a la introducción de altas presiones de operación y de un sistema de detección continua. A partir de entonces, esta técnica ha evolucionado rápidamente dentro del campo farmacéutico debido a la versatilidad de su aplicación, el aumento considerable de avances en la instrumentación por su uso sencillo, tiempos de análisis cortos para realizarla, y la gran cantidad de publicaciones que aparecen día a día. En la actualidad, esta técnica constituye una herramienta indispensable en el área de control de calidad, desarrollo farmacéutico, control de procesos y química clínica. (18)

3.10.2. CONCEPTOS BÁSICOS DE LA CROMATOGRAFIA

Para lograr entender el proceso de separación cromatográfico es indispensable conocer los siguientes parámetros:

Tiempo de retención (t_r)

Es el tiempo en que la muestra permanece dentro de la columna y se mide desde el momento en que ésta se introduce en el sistema, hasta el momento en que se obtiene en el punto máximo de la señal. Es característico de cada soluto de la muestra. (4,24,25)

Tiempo muerto (t_0).

Es el tiempo requerido para eluir una muestra no retenida en la columna y se determina midiendo el tiempo de retención de la fase móvil o una muestra que no se retenga en la columna. (4,24,25)

Tiempo de retención total (t_r total)

Es la diferencia entre el t_r y t_0 (Figura 4). Es el tiempo que la muestra permanece retenida en el material de relleno de la columna. (16,24,25)

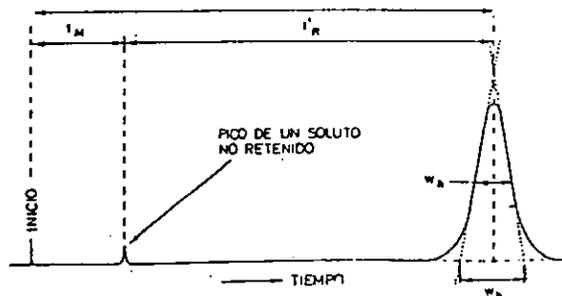


Figura No. 4 Espectro cromatográfico de Tiempo de Retención total.

Numero de platos teóricos (N)

Un plato teórico es un equilibrio de distribución del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria (Ver figura 5). El número de platos teóricos se calcula de la siguiente manera: (16,24,25)

$$N = 16 \left(\frac{tr}{Wb} \right)^2$$

Ecuación No 1

donde Wb es el ancho de pico medido en centímetros
 tr es el tiempo de retención del soluto.

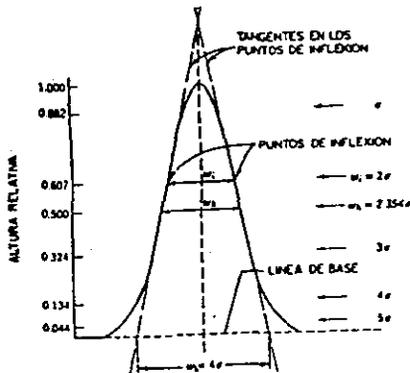


Figura No. 5 Cálculo de platos teóricos.

Coefficiente de distribución (K)

Es una propiedad física fundamental de cada sustancia, relaciona la concentración del soluto en las fases móvil y estacionaria; y es característica de cada soluto, de ambas fases, y es dependiente de la temperatura. (18,24,25)

$$K = \frac{\text{Cantidad de soluto / volumen de fase estacionaria}}{\text{Cantidad de soluto / volumen de fase móvil.}} \quad \text{Ecuación No 2.}$$

Resolución (R)

La Resolución es la medida cuantitativa de el grado de separación obtenido entre las señales de dos solutos adyacentes (Ver figura No 6).

Se calcula dividiendo la diferencia de sus tiempos de retención (tr1 y tr2) entre el promedio de sus anchos medidos en la línea base (W1 y W2). Se calcula con la ecuación 3.(18,24,25)

$$R = \frac{2 (tr 2 - tr 1)}{W1 + W2} \quad \text{Ecuación No 3.}$$

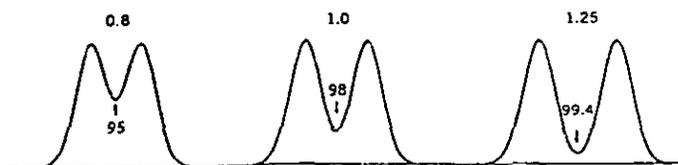


Figura No. 6 Diferentes grados de separación.

Selectividad relativa (α)

Es la medida de la solubilidad diferencial de dos solutos en la fase estacionaria. Una alternativa para calcular la selectividad es mediante la relación del tiempo de retención de un compuesto ($t_{r \text{ total } 1}$) y otro compuesto de referencia ($t_{r \text{ total } 2}$). (18,24,25)

$$\alpha = \frac{t_{r \text{ total } 1}}{t_{r \text{ total } 2}} \quad \text{Ecuación No. 4.}$$

Factor de coleo (T).

Es un parámetro que nos permite limitar el máximo de asimetría de un pico.

Está definido como la relación entre el ancho del pico, medido a una altura del 5% del largo total del pico, $W_{0.05}$, dividido entre el doble valor de la distancia f . Para un pico simétrico el factor de coleo es 1, de manera que el valor de T aumenta cuando el coleo es más pronunciado.(8,24,25)

$$T = \frac{W_{0.05}}{2 f} \quad \text{Ecuación No. 5}$$

donde $W_{0.05}$ es el ancho del pico al 5% de su altura.
 f es la distancia del inicio del pico al punto máximo.

Factor de capacidad (k')

Es aquel valor que incrementa o disminuye el tiempo de retención de bandas individuales con cambios en la fuerza del solvente y cuando todas las bandas están dentro del rango $1 < k' < 20$ la fase móvil esta cercana al punto óptimo de la fuerza del solvente.

Se calcula como el tiempo de retención en la fase estacionaria entre el tiempo de retención en la fase móvil (9). Se calcula el factor de capacidad con la ecuación 6. (4,24,25)

$$k' = \frac{t}{t_0} - 1 \quad \text{Ecuación No. 6.}$$

donde t es el tiempo de retención de la elución de un pico máximo.

t_0 es el tiempo muerto o tiempo de retención de un pico no retenido.

3.10.3 TÉCNICAS DE SEPARACIÓN.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) es una técnica de separación basada en la distribución de los compuestos de una muestra entre dos fases, una estacionaria con gran área de superficie y otra móvil líquida que fluye a través de la fase estacionaria. Cuando la mezcla de compuestos se incorpora a la fase móvil, cada uno de ellos establece equilibrios entre ambas fases, reteniéndose selectivamente en la fase estacionaria. Esto origina que el grado de movimiento de cada compuesto sea diferente dando como resultado la separación de los compuestos.(23,24)

Existen dos factores que determinan la eficiencia en la separación de los compuestos, la migración diferencial y la dispersión molecular.

La migración diferencial o movimiento individual depende del equilibrio de distribución de cada uno de los compuestos entre la fase móvil y estacionaria. Está determinada por todas aquellas variables que afectan el equilibrio como la composición de la fase móvil, la composición de la fase estacionaria y la temperatura de separación. Cuando se quiere alterar la migración diferencial, basta alterar una de estas tres variables. (18)

La segunda consideración para la separación cromatográfica es la dispersión de las moléculas a lo largo de la columna:

a) Difusión de Eddy: Es originada por los diferentes flujos microscópicos que sigue la fase móvil entre las partículas de empaque en la columna. Como resultado, las moléculas del soluto toman diferentes caminos entre el empaque, de manera que la difusión aumenta al aumentar la velocidad de la fase móvil (16, 18).

b) Transferencia de masa en la fase móvil: Este proceso físico se da por diferencias originadas en el flujo al pasar entre dos partículas vecinas del empaque.

c) Transferencia de masa en la fase móvil estancada: Las partículas empleadas para el empaque de la columna presentan poros, la fase móvil contenida en ellos se encuentra casi sin movimiento denominándose fase móvil estancada. (16)

d) Transferencia de masa en la fase estacionaria: Después de que las moléculas de la muestra difunden dentro del poro, establecen interacciones con la fase estacionaria y cuando las interacciones son muy fuertes las moléculas se retendrán una gran cantidad de tiempo retornando lentamente a la fase móvil de tal manera que viajarán una distancia corta en la columna . En contraste , las moléculas que interactúan en menor grado alcanzarán una distancia mayor. (18)

f) Teoría del efecto solvofóbico: En donde se explica que la retención interacción no es debida propiamente a fuerzas de atracción entre el soluto y la fase estacionaria sino que se origina en la repulsión neta que existe entre el agua y la parte apolar de la molécula del soluto y la cadena CH de la fase estacionaria. (16 , 18)

En general los compuestos no polares y poco polares se separan por cromatografía de partición de fase normal y los compuestos polares se separan por cromatografía de partición en fase inversa.

Existen dos formas de separación cromatográfica la separación isocrática en donde la composición y la concentración de los componentes de la fase móvil permanece inalterada, y la separación por gradiente en donde cambia la concentración de los componentes de la fase móvil (7)

Generalmente el sistema de gradiente es manejado como una respuesta para solución a la separación de muestras complejas que poseen una gran cantidad de compuestos y que se quieren separar. Es de gran utilidad como todo proceso de separación, y tiene sus ventajas como son.(5)

- a) Separaciones con factores de capacidad muy altos
- b) Separación de muestras complejas.
- c) Tiempos de elución cortos dependiendo de la complejidad de la muestra.
- f) Resolución adecuada.
- g) Disminución de los tiempos de retención.

No obstante, presenta las siguientes desventajas :

- a) Línea base inestable debido al cambio de porcentajes de solventes de la fase móvil durante la separación de la muestra. (5)
- b) Presencia de picos fantasmas que son consecuencia de las impurezas presentes en los solventes utilizados que en un sistema isocrático es difícil visualizar.
- c) Formación de burbujas durante el mezclado de los solventes debido a que se manejan altas presiones y solventes muy volátiles.
- d) Gran consumo de disolventes debido a que hay un cambio constante en los porcentajes de éstos en la fase móvil.
- e) Cambios en la velocidad de flujo.
- f) Cambio en el número de platos teóricos.
- g) Cambios en la selectividad.

3.10.4. CROMATOGRAFIA DE PARTICIÓN.

En la cromatografía de partición existen dos tipos de acuerdo a la polaridad de las fases móvil y estacionaria :

1.- Fase normal : el soporte está cubierto con una fase estacionaria polar, y la fase móvil está constituida por solventes de baja polaridad. La interacción de soluto-solvente es relativamente débil y muestra-adsorbente es fuerte.

2.- Fase inversa: Es contraria a la fase normal. Se caracteriza por interacciones fuertes entre la fase móvil polar y varias moléculas de la muestra , este efecto es por la interacción entre la muestra y moléculas del solvente que determinan la retención relativa y la separación en la fase reversa. Esta interacción entre solvente y muestra son grandes debido a la atracción de dipolo puentes de hidrogeno , dando la selectividad al solvente que puede ser caracterizado por el momento dipolar del solvente , basicidad del solvente y acidificidad.

Bajo cualquiera de sus formas, la retención y separación de los compuestos por cromatografía de partición se basa en las diferentes interacciones a las cuales se encuentran sometidos los solutos en la fase móvil y en la fase estacionaria , es decir depende de las diferencias de solubilidad de los solutos entre las dos fases. (7,18,23,24)

3.10.5. INSTRUMENTOS PARA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

Los instrumentos requeridos para CLAR incluyen gran versatilidad y complejidad, éstos continúan en el proceso de avance continuo y modernización. Los componentes básicos de un Cromatógrafo de líquidos son Bomba, Inyector, Columna, Detector y registrador.

Columnas para Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

Las columnas utilizadas en cromatografía de líquidos de alta resolución que proveen un mínimo de ensanchamiento de bandas en las muestras a separar, son el corazón del sistema cromatográfico.

En la columna se lleva a cabo la separación de los componentes de la muestra y debe cumplir con los siguientes requisitos :

- a) Resistir presiones muy altas aproximadamente de 4000 psi
- b) Alta eficiencia.
- c) No producir grandes caídas de presión.
- d) Tener máxima capacidad de muestra.
- e) Estabilidad química frente a la fase móvil.
- f) No reaccionar con la muestra.

La composición de la fase móvil es de gran importancia para tener separaciones adecuadas en tiempos cortos. La adecuada selección de la fase móvil dará mejores separaciones si se cumple con las características generales deseadas para la fase móvil. (16)

Las características generales deseadas de la fase móvil son :

- a) Ser capaz de disolver la muestra.
- b) No disolver ni degradar la fase estacionaria.
- c) Tener viscosidad baja.
- d) Ser de alta pureza.
- e) Ser compatible con el tipo de detector utilizado.
- f) Tener la polaridad adecuada para separar a los compuestos de interés.
- g) Encontrarse degasificada antes de su uso.
- h) No tener partículas que dañen la columna, por lo que se recomienda filtrar.

3.10.5.1 DETECTORES PARA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.

El detector es un instrumento que mide en forma continua algunas propiedades fisicoquímicas de los componentes de la mezcla y genera en esa forma una señal proporcional a la concentración del soluto conforme ésta eluye de la columna. Existen una gran cantidad de detectores dentro de los que se encuentran los de onda fija en donde sólo se maneja una longitud de onda, y detectores de longitud de onda variable en donde se puede manejar una gran cantidad de longitudes de onda pero no al mismo tiempo, como en el caso del detector de fotodiodos, el cual opera a longitudes de onda diferentes al mismo tiempo.⁽²⁴⁾

Los detectores de uv-visible se basan en la absorción de luz ultravioleta de la muestra al pasar a través de ella un haz de luz monocromática. Estos tienen alta sensibilidad para compuestos que absorben en la región uv (190 - 600 nm) y que pueden ser detectados. La concentración de la muestra en el flujo de la celda es relacionado a la fracción de luz transmitida dentro de la celda por la ley de Beer.

$$\log \frac{I_0}{I} = Ebc$$

donde I_0 es la intensidad de la luz incidente, I es la intensidad de la luz transmitida y E es la absorptividad molar de la muestra, b es la longitud de la celda en cm y c la concentración de la muestra en moles/L

Las características que deben poseer los detectores son: sensibilidad adecuada, producir el menor ruido posible, amplio intervalo lineal, exactitud, reproducibilidad, y estabilidad.

El proceso cromatográfico inicia por la inyección de la muestra al sistema. La separación ocurre cuando la fase móvil y la muestra disuelta entra a través de la columna, cada compuesto que eluye de la columna es detectada ya sea por un detector de Índice de refracción , detector de longitud de onda variable o por un detector de longitud de onda fija, dependiendo de las propiedades de los compuestos a analizar (24).

3.10.6. ESTÁNDAR INTERNO.

El estándar interno se utiliza para compensar los errores analíticos y los efectos de variación en los parámetros de separación , como tamaño de pico, incluyendo fluctuaciones en tamaño de muestra y los errores que se llegan a tener por el tratamiento de la muestra.(18)

Dentro de los requerimientos que se deben evaluar para elegir un estándar interno tenemos los siguientes:

Que sea completamente resuelto en el cromatograma.

Que no interfiera con los componentes de la muestra.

Que tenga similares valores de k' que los componentes de interés.

Que sea un compuesto equivalente al de interés.

Que se pueda adicionar a una conc. con área o altura similar a la de interés.

Que no se presente en la muestra original.

Que sea estable y no reaccione con los componentes de la muestra,

el empaque y la fase móvil y que tenga alta pureza.

3.11. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS (21,22,24,25)

De acuerdo a la USP XXIII todo método debe sujetarse a varios requerimientos como: ser validado para comprobar su confiabilidad, por tanto se realizará la validación considerando la categoría II que *menciona* para un método indicador de estabilidad los siguientes parámetros. (9,20)

3.11.1. Definición.

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece mediante estudios de laboratorio que el método cumple con los requerimientos para la aplicación analítica requerida (14)

3.11.2. Linealidad y precisión del sistema.

Es la capacidad del sistema para dar una relación lineal entre la concentración del principio activo y su respuesta en el intervalo dado de concentración.

Criterio de evaluación se realiza mediante una t de Student.

3.11.3 Especificidad a productos de degradación.

Es la capacidad del método analítico para dar respuesta de la sustancia de interés, de forma inalterada por la presencia de impurezas y productos de degradación.

Criterio de evaluación : Se realiza mediante coeficiente de variación.

3.11.4. Linealidad del método.

Es la habilidad del método analítico para obtener resultados que directamente o mediante una transformación matemática, sean proporcionales a la concentración del soluto dentro de un rango de concentraciones dado y en presencia del placebo.

Criterio de evaluación : Se realiza mediante una t de student.

3.11.5 Exactitud del método.

Es la aproximación de los resultados probados por el método al valor verdadero. La exactitud se expresa como el porciento de recobro obtenido del análisis de placebos cargados. Un placebo cargado es la cantidad exacta de excipientes con la cantidad correspondiente de compuesto de interés.

Criterio de evaluación : Se realiza mediante una t de Student.

3.11.6 Precisión del método.

Es el grado de concordancia entre resultados individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a muestras múltiples a partir de una muestra homogénea. Es una medida del grado de reproducibilidad y repetibilidad del método analítico bajo condiciones normales de operación. Y se divide en dos partes: Repetibilidad y Reproducibilidad.

Criterio de evaluación: Se realiza con el coeficiente de variación total.

3.11.7. Repetibilidad del método

Es la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista , aparatos, día, etc.).

3.11.8. Reproducibilidad del método.

Es la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (analista , aparatos, día, etc.).

Criterios de evaluación.

Se realizará mediante la evaluación del coeficiente de variación total.

3.11.9. Estabilidad de la muestra.

Es la propiedad de la muestra de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés después de haberse almacenado por un lapso dado y bajo condiciones específicas

Se evalúa con la diferencia del promedio de cada condición con respecto al valor del tiempo cero.

3.11.10. Tolerancia del sistema.

Es el grado de reproducibilidad de resultados de pruebas obtenidas por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación tales como laboratorios , analistas, instrumentos, días etc.

Parámetros que se evalúan cuando se modifica la columna.

Factor de capacidad.

Factor de selectividad.

Factor de coeio.

Factor de resolución.

4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Hoy en día existen numerosas técnicas analíticas tales como la polarografía, fluorometría, calorimetría, volumetría, espectrofotometría, etc, en donde la utilidad de cada una de ellas depende de las características físicas y químicas del compuesto a analizar para ser utilizadas. Las pruebas espectrofotométricas a diferencia de las anteriores, nos ofrecen una mayor rapidez en la valoración de los compuestos que absorben luz ultravioleta, siendo éstas de utilidad para el control de medicamentos, sin embargo no es tan útil cuando las formulaciones contienen excipientes que absorben a la misma longitud de onda del compuesto de interés, y de los productos de degradación que se pudieran presentar en cualquier momento.

Debido a que actualmente sólo se cuenta con método espectrofotométrico en la USP XXIII para la determinación de Furazolidona es necesario desarrollar un método indicador de estabilidad por Cromatografía de líquidos de alta resolución que permita separar a Furazolidona de los excipientes de la formulación y de sus posibles productos de degradación y proporcionando alta sensibilidad y capacidad de separar y cuantificar mediante un sistema de gradiente, Furazolidona de los componentes de la formulación sin interferencia asegurando la especificidad del método Y posteriormente realizar la validación para utilizarlo como método de rutina para control de calidad.

5. OBJETIVOS

5.1 Desarrollar un método para la cuantificación de Furazolidona en suspensión oral, en presencia de excipientes y sus productos de degradación, por cromatografía de líquidos de alta resolución por sistema de gradiente.

5.2 Aplicar los parámetros de linealidad y precisión del sistema, especificidad a excipientes, especificidad a productos de degradación, linealidad del método, exactitud del método, precisión del método, estabilidad de la muestra y tolerancia, para asegurar la confiabilidad del método analítico propuesto.

6. HIPÓTESIS.

Considerando las propiedades físicas, químicas, y la estabilidad de Furazolidona, es posible su separación y cuantificación a partir de una suspensión oral, separando por extracción a la Furazolidona de los excipientes de la formulación empleando la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución por sistema de gradiente se obtendrá un método indicador de estabilidad validado útil en Control de Calidad debido a su confiabilidad y precisión.

7. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

7.1. MATERIAL.

Pipetas KIMAX volumétricas de 5 y 10 mL.

Matraces PYREX volumétricos de 10 y 50 mL.

Papel filtro Whatman No. 40

Tubos de vidrio con tapón rosca (29 X 147 mm).

Magnetos de 0.5 cm.

Columna C18 μ Bondapak de 30 cm y diámetro interno de 3.9 mm, tamaño de partícula de 10 μ m.

Insertos de precolumna C18 μ Bondapak

Matraces Kitazato marca KIMAX de 500 mL.

Embudos de filtración de vidrio.

Embudos de filtración Millipore de 250 mL.

Pipetas pasteur.

Probetas de 250 y 500 mL marca KIMAX.

Vasos de precipitados de 50 , 100, 250 y 500 mL marca KIMAX.

7.2 REACTIVOS Y SUSTANCIAS DE REFERENCIA.

Reactivos.

Fosfato de potasio monobásico. Grado Reactivo Marca Baker.

Acetonitrilo. Grado CLAR. Marca Fischer

Ácido clorhídrico. Grado Reactivo. Marca Baker.

Agua. Grado CLAR.

Hidróxido de sodio. Grado Reactivo. Marca Merck.

Peróxido de hidrógeno (30%). Grado R.A.(Reactivo Analítico) Marca Baxter

Dimetilformamida. Grado R.A.(Grado Analítico) Marca Baker.

Sustancias de referencia

Furazolidona USP (Sustancia de Referencia Primaria).

Furazolidona Sustancia Referencia Secundaria.

7.3 EQUIPOS E INSTRUMENTOS.

Espectrofotómetro Infrarrojo Nicolet 205 con transformada de Furier.

Balanza analítica Mettler Modelo AE-260 delta range.

Espectrofotómetro de diodos Hewlett Packard 8552A.

Bomba Waters 600E.

Bomba Waters 610.

Inyector Waters 710.

Inyector Waters 712.

Detector de absorbancia de onda variable Waters 486 .

Detector de arreglo de Fotodiodos Waters 990.

Sistema controlador Waters 600E.

Graficadora de alta velocidad Waters 5200 e impresora NEC 5200.

Impresora NEC PRINWRITER CP6.

Parrilla eléctrica.

Horno con vacío Vacuum Oven PRECISIÓN.

Estufa Fischer Scientific Isotemp Programable Oven Model 838F

Potenciómetro Beckman 45 pH meter.

7.4. MÉTODO.

7.4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA.

Primeramente se realizó la caracterización y cuantificación de Furazolidona de acuerdo a la USP XXIII para posteriormente ser utilizada en todo el desarrollo y validación del método como patrón de Referencia Secundario.

Los resultados de la certificación son los siguientes:

CERTIFICACIÓN DEL PATRÓN DE REFERENCIA.

PRUEBA	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
IDENTIFICACIÓN		
A. (I.R.)	IGUAL AL DE REFERENCIA	CONFORME
B. (U.V.)	IGUAL AL DE REFERENCIA	CONFORME
C. (COLOR)	AZUL	CONFORME
PERDIDA POR SECADO	NO MÁS DEL 1%	0.05%
RESIDUOS DE IGNICIÓN	NO MÁS DE 0.05%	0.01%
VALORACIÓN	NO MENOS DE 97% Y NO MÁS DE 103%	99.8%

Resultados de la certificación de Furazolidona materia prima.

Tabla No.1

7.4.2 DESARROLLO DEL MÉTODO.

La adecuación del método nos debía asegurar que fuera confiable y específico para la posterior evaluación de la estabilidad de Furazolidona en suspensión. De los métodos existentes en los libros oficiales se encuentra en la USP XXII la descripción de un método de ensayo para cuantificar Furazolidona en suspensión por un método espectrofotométrico pero éste es muy sensible a interferencias, presentando por tanto problemas de especificidad.

Y como nuestro objetivo es el de desarrollar una técnica que nos asegure la especificidad de Furazolidona se seleccionó un método cromatográfico debido a que sus características son tener alta sensibilidad , exactitud y especificidad.

En la mayoría de los casos en donde se emplea una separación isocrática se ha observado que ésta es adecuada para muestras sencillas o aplicaciones particulares , sin embargo cuando se analizan mezclas más complejas se hace necesario utilizar un método de separación por gradiente para una suspensión debido a que la resolución obtenida es adecuada para todos los compuestos que pudieran estar presentes en la suspensión.

En la selección del gradiente adecuado se consideran tres aspectos importantes.

- 1) Composición inicial y final del gradiente.
- 2) El perfil del gradiente.
- 3) Pendiente del gradiente.

Los cuales fueron seleccionados de acuerdo a las características de fuerza del disolvente (Polaridad).

Se inició utilizando dos solventes siendo uno Fosfato de potasio 0.05M(Solvente débil) y Acetonitrilo (Solvente fuerte) comenzando con el solvente de Fosfato de potasio 0.05M el cual se considera que eluirá bandas no resueltas posteriormente se adiciona el solvente B fuerte (acetonitrilo al débil) variando la fuerza de elución progresivamente hasta que el solvente B sea el que se encuentre en mayor proporción. El acetonitrilo debe ser tan fuerte que todas las bandas de interés puedan eluirse durante el gradiente.(1,15,21)

La programación del solvente puede ser lineal , cóncava o convexa, en éste caso en particular se inicio con un programa lineal cambiando posteriormente el perfil del Gradiente.

De acuerdo a lo anterior se inició con un sistema con las siguientes características:

Columna C18 μ Bondapak de 30cm y diámetro interno de 3.9mm.

Tamaño de partícula de 10 μ m. Flujo 2mL /min. Longitud de onda 220nm.

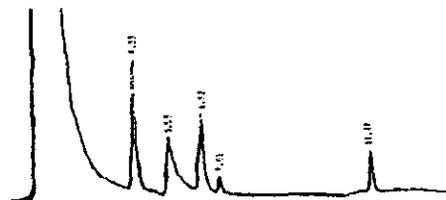
TABLA DE SISTEMA DE GRADIENTE I.

TIEMPO min	SOLVENTE A % FOSFATO DE POTASIO 0.05M pH 3.5	SOLVENTE B % ACETONITRILLO	GRAFICA
2.0	80	20	*
2.0	80	20	6
2.5	70	30	6
4.0	68	32	6
4.2	68	32	11
6.9	40	60	11
9.0	40	60	6
10.0	70	30	6
11.0	80	20	6
15.0	80	20	6

Sistema de gradiente inicial para la separación de Furazolidona en una Suspensión.

Tabla No.2

La resolución de los picos obtenidos con este sistema que se muestra en la figura No 7 no es adecuada debido a que no hay separación del activo de la formulación con respecto a uno de los excipientes , hay entonces que hacer los ajustes necesarios para lograr la separación adecuada.



Cromatograma inicial de la separación de Furazolidona con sistema de gradiente de Tabla No 2.
Figura No. 7

Se realiza nuevamente un cambio en la composición del Gradiente y el perfil de gradiente como se muestra en la siguiente tabla.

TABLA DE SISTEMA DE GRADIENTE II.

TIEMPO Min	SOLVENTE A % FOSFATO DE POTASIO 0.05M Ph 3.5	SOLVENTE B % ACETONITRILLO	GRAFICA
4.0	80	20	•
4.3	60	40	6
4.6	55	45	6
6.0	55	45	6
7.0	55	45	6
8.0	50	40	6
9.0	40	60	6
11.0	40	60	6
13.0	40	60	6
14.0	55	45	6

Segundo gradiente propuesto para la separación de Furazolidona de la Suspensión.

Tabla No.3.

Posterior a la nueva composición del Gradiente no se resolvió el problema de resolución por lo que se propuso cambiar el pH del solvente A a pH = 4.5 con el último gradiente utilizado, y no se resolvió el problema; posterior a lo anterior se decidió utilizar un guardacolumnas con el último gradiente y se observó que se movía ligeramente el bromuro de pipenzolato, por tanto lo que quedaba se cambió nuevamente el gradiente y el perfil del gradiente llegando a la siguiente composición.

TABLA DE SISTEMA DE GRADIENTE III.

TIEMPO Min	SOLVENTE A % FOSFATO DE POTASIO 0.05M pH 4.5	SOLVENTE B % ACETONITRILLO	GRAFICA
2.0	80	20	*
2.5	80	20	6
4.0	70	30	6
4.2	68	32	6
6.9	68	32	6
9.0	40	60	11
13.5	40	60	11
15.0	40	60	11
16.0	70	30	11
17.0	80	20	1
18.0	80	20	1

Tercer sistema de gradiente propuesto para la separación de Furazolidona de la Suspensión.

Tabla No.4.

Con esta composición de Gradiente se logró obtener la adecuada resolución de los picos por tanto se considera el gradiente de la tabla No. 4 como el definitivo para el método.

Establecido lo anterior se procedió a verificar si dicha metodología cumplía como método indicador de estabilidad y para llegar a tal fin se procedió a comprobar la selectividad del método a través del estudio de especificidad en donde se expuso al principio activo (Furazolidona materia prima) placebo y placebo cargado a degradación con las condiciones que se describen a continuación.

7.4.3. ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO.

TABLA DE CONDICIONES DE DEGRADACIÓN I.

Muestra	Degradante	Temperatura	Tiempo
Placebo Materia Prima Formulación	NaOH 0.5N	60°C	24 Hrs.
Placebo Materia Prima Formulación	H ₂ O ₂ al 30%	60°C	24Hrs
Placebo Materia Prima Formulación	HCL 0.5N	60°C	24 Hrs
Placebo Materia Prima Formulación	LUZ U.V.	AMBIENTE	24 Hrs

Condiciones iniciales de degradación.

Tabla No.5

Con las condiciones de degradación anteriores no se logró observar la señal de Furazolidona con el sistema de gradiente, debido a que las condiciones de degradación fueron muy drásticas que lograron eliminar por completo a Furazolidona.

Se procedió entonces a realizar modificaciones tomando en cuenta la degradación antes mencionada para obtener la degradación más adecuada.

Se analizó nuevamente por duplicado el placebo, Placebo cargado y materia prima de Furazolidona adicionando el agente degradante y sometiendo a las siguientes condiciones.

TABLA DE CONDICIONES DE DEGRADACIÓN II.

Muestra	Degradante	Temperatura	Tiempo
Placebo Materia Prima Formulación	NaOH 0.125N	27°C	24 Hrs.
Placebo Materia Prima Formulación	H ₂ O ₂ al 30%	45°C	3 Hrs.
Placebo Materia Prima Formulación	HCL conc.	27°C	24 Hrs
Placebo Materia Prima Formulación	LUZ U.V.	AMBIENTE	8 Hrs

Condiciones de degradación

Tabla No. 6.

7.4.3.1 FURAZOLIDONA SOMETIDA A DEGRADACIÓN.

TABLA DE % DE DEGRADACIÓN DE FURAZOLIDONA.

MUESTRAS	AGENTE DEGRADANTE	% FURAZOLIDONA DEGRADADA						% DIFERENCIA MAXIMA
		220	254	289	399	340	370	
Formulación	Hidroxido de Sodio	10.16	10.61	8.86	10.64	10.11	8.89	1.78
		10.6	11.25	10.95	11.18	10.97	10.76	0.65
	Acido Clohidrico	9.26	9.15	9.10	9.5	9.94	9.76	0.84
		9.23	9.03	9.05	9.73	9.71	10.0	0.97
	Peroxido de hidrogeno	27.16	27.73	26.0	27.21	26.44	26.16	1.73
		26.72	27.8	26.01	26.93	26.36	26.57	1.66
	Luz U.V.	10.75	10.87	10.62	11.22	10.95	11.69	1.07
		11.67	11.53	11.08	11.79	10.83	11.70	0.96
Placebo	Hidroxido de Sodio	---	---	---	---	---	---	
	Acido Clorhidrico	---	---	---	---	---	---	
	Peroxido de hidrogeno	---	---	---	---	---	---	
	Luz U.V.	---	---	---	---	---	---	
Materia Prima	Hidroxido de Sodio	10.87	11.66	10.92	11.18	11.37	10.66	1.00
		10.26	9.31	9.04	10.01	9.18	9.59	1.22
	Acido Clorhidrico	9.99	10.05	10.39	10.68	10.73	10.64	0.70
		10.10	10.60	10.09	9.62	10.66	11.13	1.51
	Peroxido	18.85	17.18	18.42	18.61	18.17	18.53	1.67
		18.36	17.11	18.43	18.75	17.95	18.06	1.64
	Luz U.V.	7.26	7.5	7.43	7.41	7.40	7.75	0.49
		6.87	7.61	6.91	6.13	7.23	7.91	1.78

Degradación de Furazolidona en diferentes longitudes de onda.

Tabla No.7.

Como se observa en la tabla 7 ,las diferencias en el porcentaje de degradación respecto a las cinco diferentes longitudes de onda es menor del 2% para cada muestra lo cual indica que la medición de la respuesta del área del pico cromatografico es debida exclusivamente a Furazolidona.

7.4.3.2 ANÁLISIS ESPECTRAL

Para verificar la pureza cromatográfica se realizó el análisis espectral correspondiente al pico cromatográfico de Furazolidona , de cada una de las muestras degradadas.

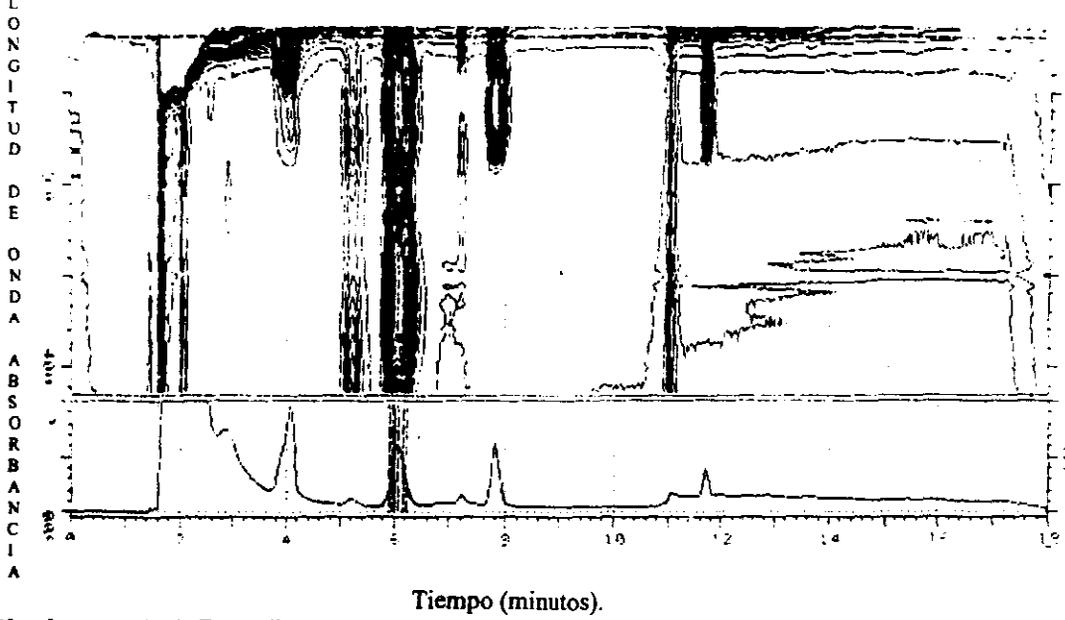
Los espectros U.V. fueron tomados a diferentes tiempos de elución y distribuidos a lo largo del pico de interés.

Se compararon los espectros obtenidos con el de Furazolidona Solución Patrón de Referencia Secundario sobreponiendo los espectros para comparar los contornos y establecer la existencia de diferencias y así determinar si el pico cromatografico es puro y si corresponde a Furazolidona.

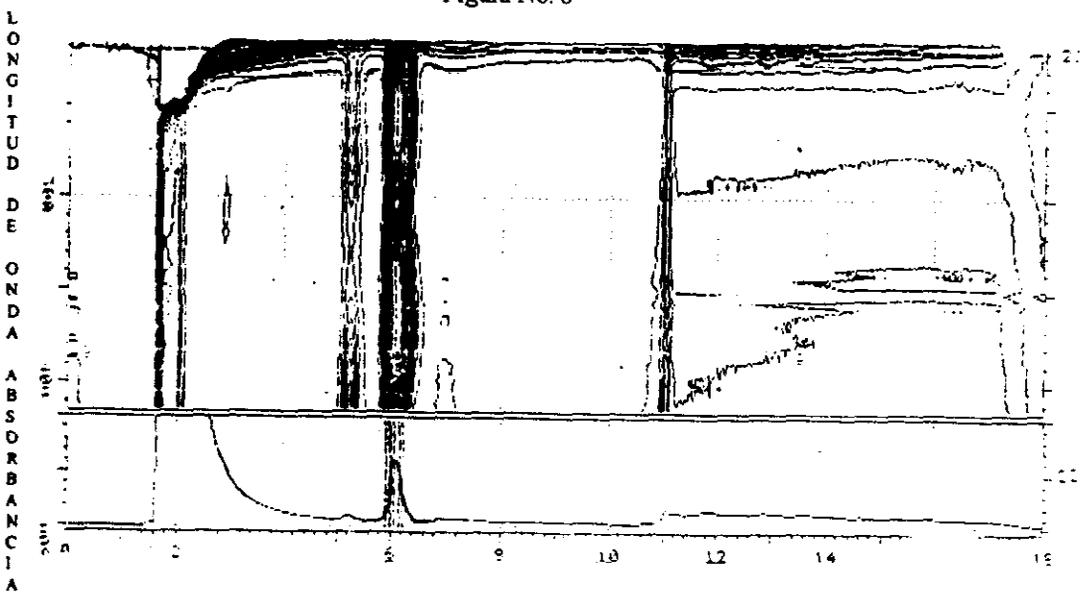
7.4.3.3 RESULTADOS DE ANALISIS ESPECTRAL

A continuación se presentan los análisis espectrales de las muestras sometidas a degradación.

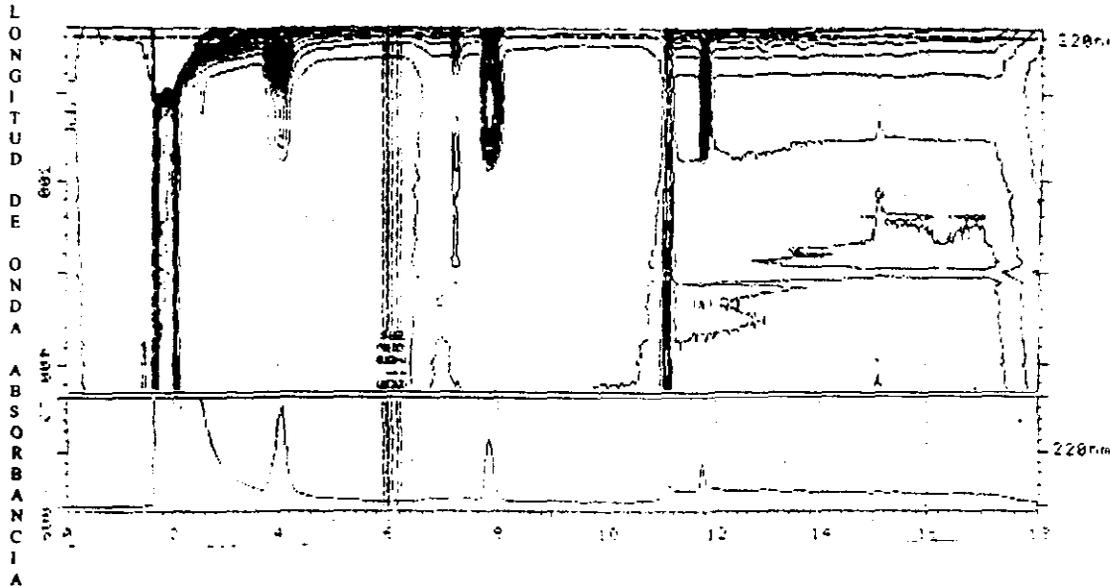
En la parte superior se muestra el contorno espectral en el intervalo de longitudes de onda de 200 a 400nm, el cual es un plano en el eje de las Y presenta el tiempo de elución del pico cromatografico , y en el de las X la longitud de onda y en el eje de la Z la absorción del compuesto.



Placebo cargado de Furazolidona, sometido a condiciones de degradación alcalina con NaOH.
 Figura No. 8



Análisis de contorno de Furazolidona en la Formulación.
 Figura 9



Tiempo (minutos).
Placebo sometido a condiciones de degradación alcalina con NaOH.
Figura No. 10

Las muestras de Furazolidona (Materia prima) y Formulación sometidas a las condiciones de degradación Oxidativa, Hidrólisis ácida y fotólisis presentan igual análisis de contorno.

Posteriormente se muestra la sobreposición de los seis espectros tomados anteriormente ajustados al mismo nivel de absorbancia con el propósito de anular el de concentración y así observar posibles diferencias a lo largo de todo el espectro figuras 11 y 12 .

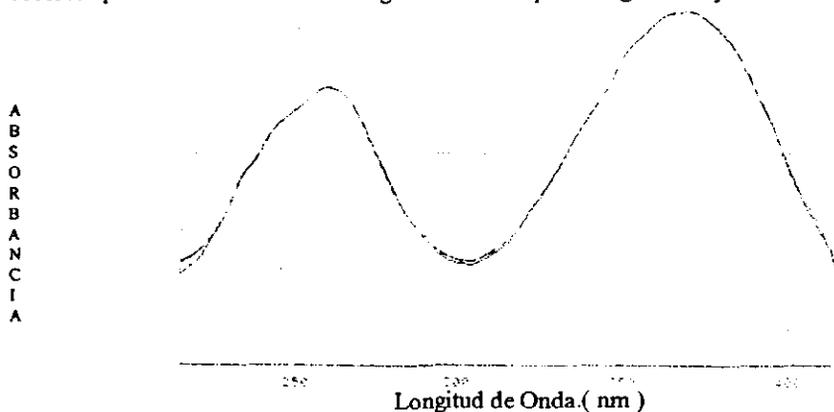


Figura 11

Sobreposición de los espectros correspondientes a cada uno de los tiempos de elución seleccionados en el cromatograma de materia prima degradada en medio alcalino.

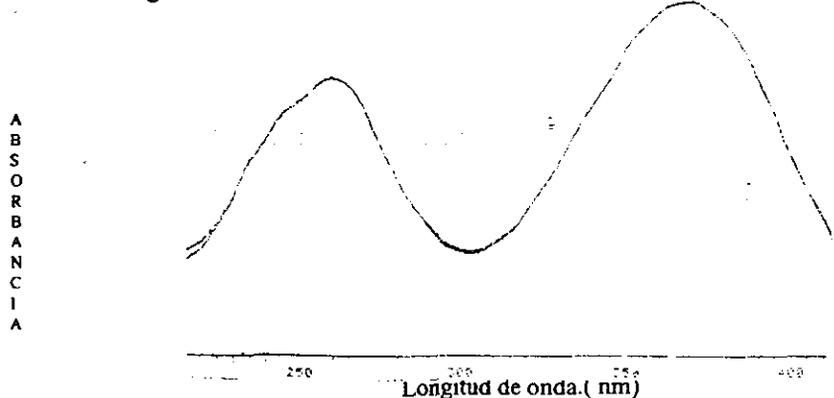


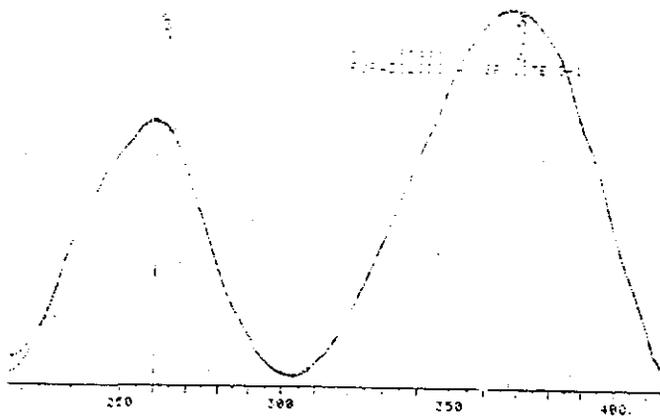
Figura 12

Sobreposición de los espectros correspondientes a cada uno de los tiempos de elución seleccionados en el cromatograma de Placebo cargado degradado en medio alcalino.

Las muestras de materia prima y formulación sometidas a las condiciones de degradación Oxidativa, Hidrólisis ácida y fotólisis presentan igual sobreposición de sus espectros.

Finalmente, se demuestra la comparación de los espectros de Furazolidona USP y un espectro característico de las muestra sometidas a cada una de las condiciones de degradación Figura 13 y 14.

A
B
S
O
R
B
A
N
C
I
A

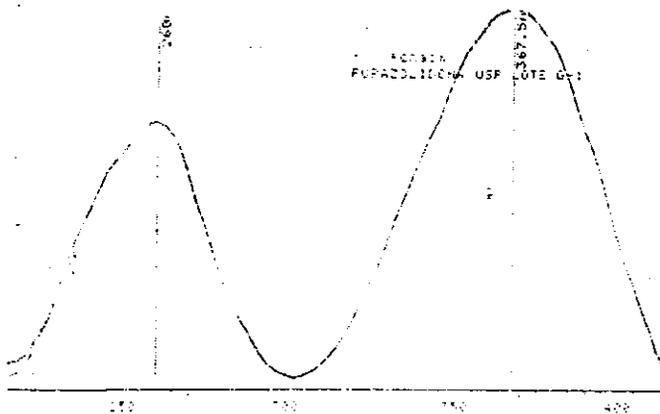


Longitud de Onda (nm)

Figura 13

Comparación de espectros de Furazolidona USP y Materia prima.

A
B
S
O
R
B
A
N
C
I
A



Longitud de Onda (nm)

Figura 14

Comparación de espectros de Furazolidona USP y la formulación (Placebo cargado).

Las muestras de materia prima y formulación sometidas a las condiciones de degradación oxidativa, hidrólisis ácida y fotólisis presentan igual sobreposición de sus espectros con el espectro del, USP.

En el análisis espectral de los picos de Furazolidona tratada a las distintas condiciones de degradación , no se encontraron señales pertenecientes a la presencia de otro compuesto a cada tiempo de elución en el intervalo de longitudes de onda estudiado ya que el contorno de cada uno de los espectros sobrepuestos es igual). Además de encontrarse una identidad espectral entre Furazolidona USP y Furazolidona Sustancia Patrón de Referencia secundario sometido a reacciones de degradación en la formulación y en la materia prima , por lo que da evidencia para decir que en la respuesta no hay interferencia por ningún excipiente, impureza o producto de degradación.

Las cuantificaciones de Furazolidona en las diferentes longitudes de onda fueron similares lo que nos hace concluir que el método es específico para cuantificar Furazolidona en Suspensión.

7.4.3.5. SELECCIÓN DE LA SUSTANCIA DE REFERENCIA INTERNO.

Para la cuantificación de métodos por CLAR es un auxiliar muy importante el empleo de una sustancia de Referencia Interna.

Debido a que su utilización nos ayudaría a optimizar la precisión del método haciéndolo menos susceptible a errores técnicos como fallas en las que se hayan incurrido durante la preparación de la muestra compensando errores aleatorios asociados a la toma de alícuotas debidas a variaciones instrumentales.

Por las razones antes mencionadas resulta necesario seleccionar una sustancia de referencia interna además de cumplir con las características mencionadas en página 22 y que tuvieran un tiempo de retención alrededor de 14min. Primeramente se utilizó un compuesto con cierta analogía a Furazolidona, uno de ellos fue el Ácido Nalidixico, Metronidazol y Naproxen, los cuales tuvieron los siguientes tiempos de retención.

Naproxen 12.03 min

Ac Nalidixico 11.27 min

Metronidazol 2.78 min

Valores que no se encuentran dentro del tiempo que consideraremos como aceptable. De tal manera que se probaron una serie de compuestos que no eran estructuralmente iguales a Furazolidona de tal manera que se realizó una elección basada en prueba y error.

Las sustancias probadas fueron 35 de las cuales sólo Ácido salicílico, Diclofenac Sodico, Etilnil estradiol, 17,2 metil testosterona y Diclofenac son los que presentan posibilidades de ser estándar interno dando los tiempos de retención que se indican a continuación.

TABLA DE ESTANDARES INTERNOS SELECCIONADOS.

SUSTANCIA	Tr
Acido salicilico	2.75
Diclofenac sodico	13.42
Etilnil estradiol	12.61
Diclofenac	13.5
17-2 metil testosterona	13.05

Tabla No. 8.

Ninguna de las sustancias probadas presentó interferencias con el pico de interés , pero debido a que algunas de las sustancias probadas son esteroides caros y de difícil acceso se seleccionó aquel que proporcionó las mejores características como el Diclofenac Sódico que presentó un tiempo de retención de 13.42 minutos como se observa en la figura No 15.

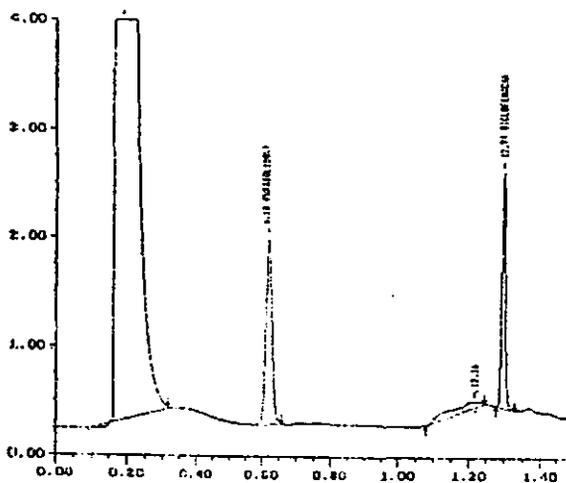


Figura No 15 Cromatograma típico de Furazolidona con Diclofenac Sódico

7.5. MÉTODO ANALÍTICO.

7.5.1. PREPARACIÓN DE LA SUSTANCIA DE REFERENCIA INTERNA DE DICLOFENAC SODICO.

Pesar aproximadamente 50 mg de Diclofenac sódico y transferir a un matraz volumétrico . Adicionar Dimetilformamida , sonicar durante 10 minutos , llevar a volumen con Dimetilformamida y mezclar, concentración final de 1.0 mg/mL.

7.5.2. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PATRÓN DE REFERENCIA.

Pesar aproximadamente 21 mg de Furazolidona , transferir a un matraz volumétrico de 50 mL . Adicionar Dimetilformamida y agitar hasta disolución, adicionar una solución de Diclofenac sódico llevar a volumen y mezclar.

Transferir una alícuota a un matraz volumétrico de 10 mL , llevar a volumen con mezcla de Dimetilformamida agua. Concentración final de Furazolidona de 0.168 mg/mL y de Diclofenac sodico de 0.04 mg/mL.

7.5.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Homogenizar la suspensión , agitándola con barra magnética durante 10 minutos .

Transferir exactamente con una pipeta volumétrica 5 mL de la suspensión a un matraz volumétrico de 50 mL. Enjuagar la pipeta la pipeta que sirvió para tomar la alícuota.

Adicionar Dimetilformamida y Diclofenac sodico agitando hasta disolución con ayuda de una barra magnética.

Llevar a volumen con Dimetil formamida y mezclar. De éste matraz tomar una alícuota y centrifugar a 3000 rpm. Del sobrenadante transferir una alícuota de 4 mL a una matraz de 10 mL y llevar a volumen con mezcla de Dimetilformamida agua. Concentración de Furazolidona 0.168 mg/mL y 0.040 mg/mL de Diclofenac sódico.

Sistema cromatográfico para la separación de Furazolidona (Ver figura 16).

Velocidad de flujo	2mL/min.
Volumen de inyección	20µl
Sensibilidad del detector	005 AUFS.
Detector	U.V. 220 nm.
Fase móvil	Gradiente de la mezcla binaria. Solución reguladora de fosfatos pH 4.5 y Acetonitrilo.

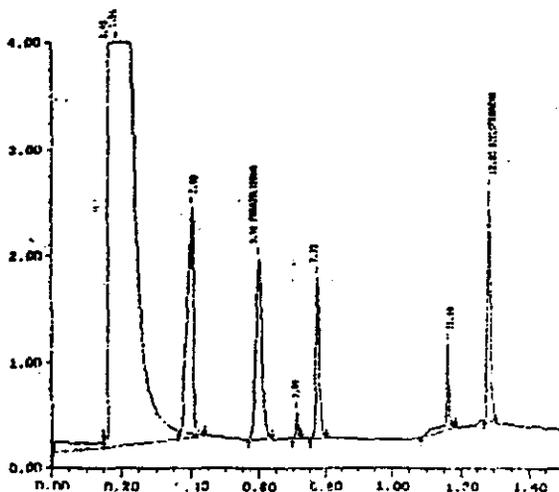


Figura No 16 Cromatograma de la separación de Furazolidona en una suspensión.

7.6. VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

7.6.1. LINEALIDAD Y PRECISIÓN DEL SISTEMA.

Se determina obteniendo una gráfica de respuesta contra concentración determinada a por lo menos 5 concentraciones de patrón de referencia , dos arriba dos abajo y el 100% de la cantidad indicada por el método, utilizando los siguientes niveles de 0, 25, 50,75, 100, 125, y 150. La precisión del sistema puede analizarse con por lo menos 6 muestras de manera independiente de la solución de referencia patrón preparada a la concentración de 100% de lo establecido por el método a partir de una misma solución patrón concentrada y bajo las mismas condiciones establecidas por el método analítico propuesto. (9, 10,).

7.6.2. ESPECIFICIDAD A PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN.

Degradar el compuesto de interés, placebo y placebo cargado con peróxido de hidrogeno al 30%, hidróxido de sodio 1M, ácido clorhídrico 1M a 60 °C durante 6 horas, luz ultravioleta durante 24 horas hasta obtener entre el 10 y 30 % de degradación del compuesto de interés y que además no interfieran los productos de degradación con el compuesto de interés

MÉTODO.

7.6.3. LINEALIDAD DEL MÉTODO.

En esta prueba se adiciona una cantidad correspondiente al 100% de placebo, cantidades conocidas de la sustancia de interés cuando menos a 2 diferentes concentraciones arriba, abajo y al 100% de lo establecido por el método, simulando la manera más aproximada posible las condiciones en las que se encuentra el producto utilizando los siguientes niveles de 0, 80, 90, 100, 110 y 120

7.6.4. EXACTITUD Y REPETIBILIDAD.

La exactitud se evaluará con por lo menos 6 placebos adicionados manteniendo el 100% del compuesto a analizar , simulando las condiciones a las que se encuentra el producto final, y con los mismos datos de exactitud se evalúa la repetibilidad tabulando los resultados de exactitud del método en todo el intervalo estudiado y en el 100%.

7.6.5. PRECISIÓN.

REPRODUCIBILIDAD.

Para evaluar este parámetro se utiliza una muestra representativa del producto, analizándolo por triplicado, dos analistas en dos días diferentes bajo diferentes condiciones.

7.6.6. ESTABILIDAD DE LA SOLUCIÓN DE LA MUESTRA.

Este parámetro se evalúa utilizando por lo menos 3 muestras de la formulación iniciando con tiempo cero.

Se dividen alícuotas de cada muestra y se almacenan bajo condiciones ambientales, refrigeración y obscuridad durante 24, 72 y 96 horas. Analizándolas al tiempo programado con el patrón de referencia recién preparado.

7.6.7. TOLERANCIA DEL SISTEMA.

Ya contando con la metodología y parámetros descritos se realiza la variación de éstos en este caso en particular se realiza el cambio de columna.

8. TABLA DE RESULTADOS

8.1. EVALUACIÓN DEL SISTEMA.

- 1.- Linealidad
- 2.- Precisión.

TABLA DE LINEALIDAD DEL SISTEMA DE FURAZOLIDONA

NIVEL	MILIGRAMOS ADICIONADOS	RESPUESTA EN	FACTOR
		AREAS	RESPUESTA
25	0.04	476869	11921725
	0.04	474903	11872575
	0.04	473466	11836650
	0.04	471582	11789550
50	0.08	1000639	12507988
	0.08	998322	12479025
	0.08	1010909	12636363
	0.08	1010809	12635113
75	0.12	1502539	12521158
	0.12	1499981	12499842
	0.12	1497487	12479058
	0.12	1499519	12495992
100	0.16	2005965	12537281
	0.16	2006227	12538916
	0.16	2037367	12733544
	0.16	2006289	12539303
	0.16	2002252	12514075
	0.16	2002790	12517438
125	0.2	2516912	12584560
	0.2	2517971	12589855
	0.2	2498461	12492305
	0.2	2506291	12531455
150	0.24	2998282	12492842
	0.24	2997667	12490279
	0.24	3018004	12575017
	0.24	3009606	12540025

Resultados de Linealidad del sistema

Tabla No.9.

8.1.1 CÁLCULOS PARA COMPROBAR LA PRECISIÓN DEL SISTEMA DE FURAZOLIDONA

TABLA DE RESULTADOS DE LINEALIDAD DEL SISTEMA

RESPUESTA	
EN	
AREAS	
2005965	n = 6
2006227	X = 2010148
2037367	S = 13454.55
2006289	C.V = 0.67%
2002252	
2002790	

Precisión del sistema.

Tabla No. 10

8.1.2 RESULTADOS PARA DETERMINAR LA LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA FURAZOLIDONA

PENDIENTE RELATIVA	B = 1.009725
ORDENADA RELATIVA	A = -0.0003740
ERROR ESTÁNDAR DE REGRESIÓN RELATIVO	0.0000016
COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	0.9999

8.1.3 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DE LINEALIDAD DEL SISTEMA.

HIPÓTESIS CONTRASTADA
PARA LA PENDIENTE

$$\begin{aligned} H_0 : B &= 1 & \alpha &= 0.05 \\ H_a : B &\neq 1 & \text{gl} &= 28 \end{aligned}$$

de donde $t_{\text{cal}}_{95\%, 28\text{gl}} = 0.0011 < t_{\text{teórica}} 1.7109.$

HIPÓTESIS CONTRASTADA
PARA LA ORDENADA

$$\begin{aligned} H_0 : A &= 0 & \alpha &= 0.05 \\ H_a : A &\neq 0 \end{aligned}$$

de donde $t_{\text{cal}}_{95\%, 28\text{gl}} = 0.0057 < t_{\text{teórica}} 1.7109.$

Debido a que $t_{\text{cal}} < t_{95\% 28 \text{ gl}}$ para el intercepto es suficiente afirmar que el intercepto no es significativamente diferente de cero, para el sistema. (Ver anexo A).

Siendo que $0.98 < PR < 1.02$ para Furazolidona se dice que existe una relación proporcional de pendiente igual a 1.

Siendo que $r^2 > 0.98$ se dice que el modelo representa correctamente la relación entre la concentración y el área en el intervalo estudiado. Siendo $EERR < 0.03$ para Furazolidona es suficiente para aceptar la variabilidad en el intervalo estudiado.

Siendo el coeficiente de variación $0.67\% < 2.0\%$ para Furazolidona se dice que el sistema de medición es preciso para las condiciones experimentales.

GRÁFICA DE LINEALIDAD DEL SISTEMA

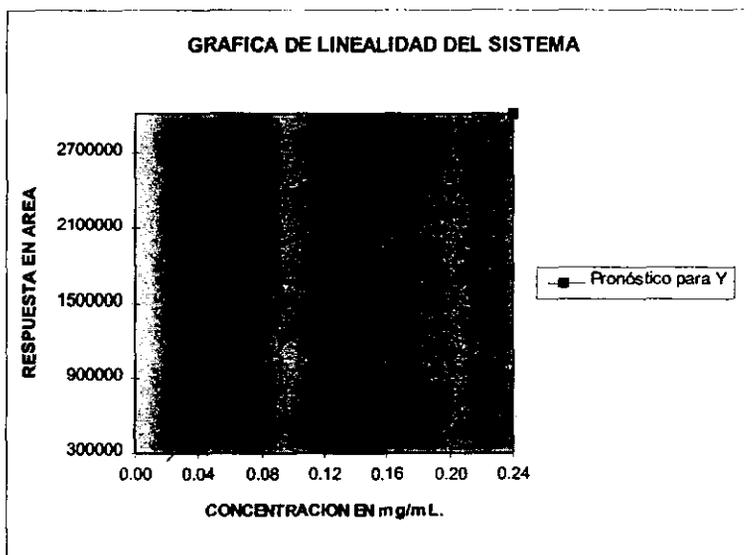


Figura No 16 Gráfica de Linealidad del sistema.

3. TABLA DE LINEALIDAD Y EXACTITUD DEL MÉTODO INDICADOR DE ESTABILIDAD

FURAZOLIDONA

LINEALIDAD DEL METODO

NIVEL	MILIGRAMOS ADICIONADO	MILIGRAMOS RECUPERADOS	% DE RECOBRO
0	0.00	0.00	0.00
	0.00	0.00	0.00
	0.00	0.00	0.00
	0.00	0.00	0.00
	0.00	0.00	0.00
80	16.8	16.77	99.82
	16.8	16.78	99.88
	16.8	16.91	100.65
	16.8	16.66	99.17
	16.8	16.57	98.63
90	18.9	18.97	100.37
	18.9	18.90	100.00
	18.9	18.93	100.16
	18.9	18.99	100.48
	18.9	18.96	100.32
100	20.1	20.09	99.95
	20.1	20.07	99.85
	20.1	20.68	102.89
	20.1	20.12	100.10
	20.1	20.15	100.25
110	23.1	23.09	99.96
	23.1	22.99	99.52
	23.1	23.18	100.35
	23.1	23.08	99.91
	23.1	23.08	99.91
120	25.2	25.26	100.24
	25.2	25.33	100.52
	25.2	25.26	100.24
	25.2	25.20	100.00
	25.2	25.29	100.36

Linealidad del sistema.

Tabla No. 11

3.1. CALCULOS DE LINEALIDAD Y EXACTITUD DEL METÓDO PARA FURAZOLIDONA.

PENDIENTE RELATIVA	$B = 1.0057371$
ORDENADA RELATIVA	$A = -0.0057371$
ERROR ESTÁNDAR DE REGRESIÓN RELATIVO	$S_{y/x \text{ rel}} = 0.1409787$
COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	0.9997

3.1.1 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

HIPÓTESIS CONTRASTADA PARA LA PENDIENTE	$H_0 : B = 1$	$\alpha = 0.05$
	$H_a : B \neq 1$	$gl = 24$

de donde $t_{\text{cal } 95\%, 25gl} = 0.7747686 < t_{\text{teórica } 1.7139}$.

HIPÓTESIS CONTRASTADA PARA LA ORDENADA	$H_0 : A = 0$	$\alpha = 0.05$
	$H_a : A \neq 0$	$gl = 24$

de donde $t_{\text{cal } 95\%, 25gl} = 0.6034599 < t_{\text{teórica } 1.7139}$.

3.1.2 EXACTITUD AL 100%

$N = 6$
 $X = 100.61$
 $S = 1.284$
 $C.V = 1.27\%$

HIPÓTESIS CONTRASTADA	$H_0 : \mu = 100$	$\alpha = 0.05$
	$H_a : \mu \neq 100$	$gl = n-1$

con t student al 95%

de donde $t_{\text{cal } 95\%, 5gl} = 1.0588 < t_{\text{teórica } 2.1318}$.

3.1.3 EXACTITUD DEL MÉTODO PARA TODOS LOS NIVELES

$N = 25$
 $X = 100.1412$
 $S = 0.7178517$
 $C.V = 0.72 \%$

HIPÓTESIS CONTRASTADA

$$H_0 : \mu = 100 \alpha = 0.05$$

$$H_a : \mu \neq 100 \quad gl = n-1$$

con t student al 95%

de donde $t_{cal} 95\%, 24gl = 0.9834903 < t_{teórica} 1.7909.$ (Ver anexo B)

Siendo $r^2 > 0.98$ se dice que hay una relación lineal $y = mx + b$ entre la cantidad cuantificada.

Siendo $t_{cal} < t_{95\%}$, con 24 gl para el intercepto se dice que éste no es significativamente diferente de cero.

Siendo $t_{cal} < t_{95\%}$ con 24 gl para la pendiente se dice que la pendiente no es significativamente diferente de uno.

Siendo $EERR < 0.03$ se acepta la variabilidad en todo el intervalo estudiado.

Ya que en la exactitud al 100% y en todo el intervalo estudiado $t_{cal} < t_{95\%}$, $n-1$ g.l.y la media de los recobros se encuentra dentro del intervalo de 98 a 102% se dice que el método es exacto y repetible al ser el coeficiente de variación menor al 2%.

GRÁFICA DE LINEALIDAD DEL MÉTODO

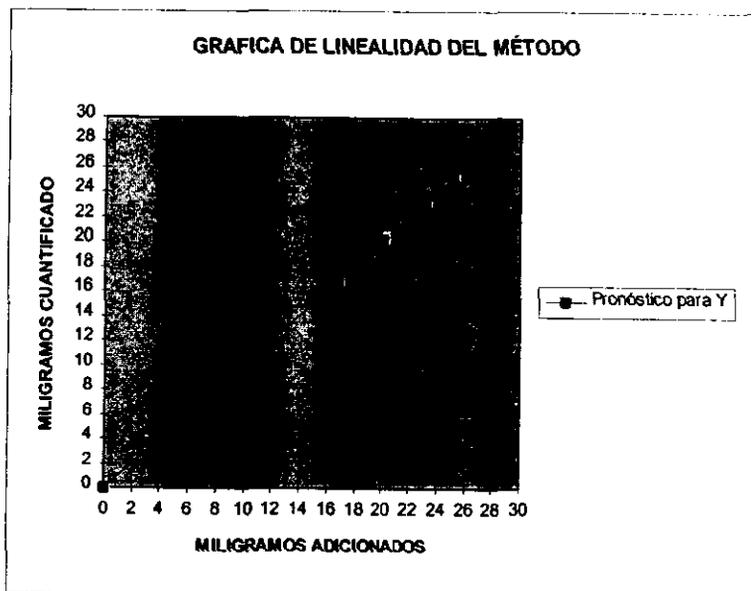


Figura 17 Gráfica de linealidad del método.

PRECISIÓN

REPRODUCIBILIDAD DE FURAZOLIDONA.

TABLA REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO

RESULTADOS DE REPRODUCIBILIDAD	
ANALISTA 1	ANALISTA 2
100.01 99.81 100.24	98.20 98.60 98.94
99.94 100.03 99.94	100.03 100.21 100.22
Media Total	99.68%
Desviación estandar Total	0.6939
Coefficiente de variación	0.6961%

Resultados de dos Analistas.

Tabla No. 12.

La tabla muestra los resultados obtenidos al realizar los recobros de la cantidad de Furazolidona

Siendo el coeficiente de variación total menor al 2% se considera que no hay influencia del Analista ni del Día en la determinación de Furazolidona en dos días diferentes y con dos analistas diferentes, por tanto es reproducible por cualquier analista en cualquier día (Ver anexo C).

**ESTABILIDAD DE LA SOLUCIÓN DE LA
MUESTRA DE FURAZOLIDONA**

**RESULTADOS DE LA ESTABILIDAD DEL MÉTODO
CON EL PORCIENTO DE RECOBRO.**

TABLA DE CONDICIONES DE TEMPERATURA AMBIENTE

TIEMPO EN HORAS	MUESTRA				
	M1	M2	M3	PROMEDIO	DIFERENCIAS RESPECTO AL CONTROL
T0a	99.94	100.03	99.94	99.97	-----
T24	100.11	99.76	99.79	99.89	0.08
T72	100.44	99.69	99.5	99.88	0.09
T96	100.28	100.21	99.95	100.15	-0.18

Resultados de estabilidad de temperatura ambiente a 96 horas.

Tabla No. 13.

TABLA DE CONDICIONES DE TEMPERATURA DE REFRIGERACIÓN

TIEMPO EN HORAS	MUESTRA				
	M1	M2	M3	PROMEDIO	DIFERENCIAS RESPECTO AL CONTROL
T0a	99.94	100.03	99.94	99.97	-----
T24	100.29	100.17	99.21	99.89	0.08
T72	100.63	100.17	100.19	100.33	-0.36
T96	99.27	99.64	100.37	99.76	0.21

Resultados de estabilidad de temperatura de refrigeración a 96 horas.

Tabla No. 14.

TABLA DE CONDICIONES DE OBSCURIDAD

TIEMPO EN HORAS	MUESTRA				
	M1	M2	M3	PROMEDIO	DIFERENCIAS RESPECTO AL CONTROL
To	99.94	100.03	99.94	99.97	-----
T24	100.11	99.76	99.79	99.89	0.08
T72	100.44	99.69	99.5	99.88	0.09
T96	100.28	100.21	99.95	100.15	-0.18

Resultados de estabilidad en condiciones de oscuridad a 96 horas.

Tabla No. 15.

TOLERANCIA DEL SISTEMA

TABLA DE PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS PARA FURAZOLIDONA.

COLUMNA	N	T	α	k	%
COLUMNA μ Bondapack Beckman	12012.16	1.09	1.0	3.58	99.18
μ Bondapack C18 waters	10855.66	1.21	1.0	3.61	99.92
Columna C18 Beckman	10072.86	1.18	1.0	3.59	99.56
Columna C18 waters	10109.39	1.24	1.0	3.16	99.45
Columna C18 Beckman	10825.57	1.13	1.0	3.23	99.82

Resultados de los parámetros de tolerancia para Furazolidona.

Tabla No. 16.

TABLA DE PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS PARA DICLOFENAC SÓDICO.

COLUMNA	N	T	α	k
COLUMNA μ Bondapack Beckman	11902.23	1.20	1.30	4.01
μ Bondapack C18 waters	10567.77	1.18	1.12	3.61
Columna C18 Beckman	11023.62	1.29	1.40	3.46
Columna C18 waters	13042.11	1.25	1.28	4.37
Columna C18 Beckman	10891.05	1.31	1.37	4.23

Resultados de los parámetros de tolerancia para Diclofenac sódico (Ver anexo C)

Tabla No. 17.

TABLA DE RESOLUCIÓN ENTRE FURAZOLIDONA Y DICLOFENAC SODICO.

COLUMNA	RESOLUCIÓN FURAZOLIDONA/DICLOFENAC SODICO
μBondapack Beckman	19.48
μBondapack C18 waters	18.20
Columna C18 Beckman	20.72
Columna C18 waters	19.02
Columna C18 Beckman	17.89

Resultados de resolución entre Furazolidona y Diclofenac sodico.

Tabla No.18

9. RESULTADOS

El contar con un método analítico indicador de estabilidad conduce a la evaluación de la selectividad del método dándonos la habilidad que tiene éste de medir exactamente y específicamente Furazolidona en presencia de los diferentes componentes de la formulación así como de sus productos de degradación y esto se demuestra mediante el análisis espectral que se lleva a cabo mediante el análisis de contorno, sobreposición espectral y comparación contra el espectro de la sustancia de referencia como lo podemos ver en la figura 8 , la cual consiste en un cromatograma de longitud de onda de trabajo de 220 nm con un contorno espectral donde se muestra la selección de los diferentes tiempos de elución del pico de interés.

En la figura 13 se muestra la sobreposición espectral de los cortes realizados al pico eluido y la comparación del espectro de Furazolidona sustancia de referencia contra el de la muestra degradada.

Como se observa no existen señales atribuibles a la presencia de otros compuestos en los mismos tiempos de elución , existe entonces una identidad espectral entre Furazolidona materia prima degradada con Furazolidona sustancia de referencia lo cual constituye la evidencia para establecer que no hay interferencia ocasionada por algún producto de degradación.

Además de que la cuantificación de Furazolidona a las distintas longitudes de onda fueron similares por lo que se dice que éste método es específico para la cuantificación de Furazolidona suspensión.

En la determinación de la linealidad del sistema se demostró la relación concentración respuesta obtenida por la ecuación de la recta, de donde la desviación de los datos de la recta de regresión ajustada, no es significativamente diferente de cero y el valor de la pendiente relativa obtenida es 1.0097, valor no diferente a uno.

Es decir que el comportamiento del sistema (detector) es lineal en el intervalo de concentraciones estudiadas.

Con los resultados del coeficiente de variación de 0.67% y desviación estándar de 13454.55 el método satisface los requisitos para ser considerado preciso al obtener un C.V. menor al 2%.

Por lo que el valor del coeficiente de determinación de 0.9999 muestra que existe una fuerte correlación entre la cantidad adicionada y la cantidad cuantificada, además de obtener recobros que no son significativamente diferentes al 100%, en un nivel de confianza del 95% por lo que se dice que el método es lineal, debido a que el intercepto obtenido de -0.005737 no es diferente de 0 y la pendiente cuyo valor obtenido es 1.0057 no es estadísticamente diferente de 1.

Dado que los resultados de reproducibilidad bajo diferentes condiciones de trabajo (es decir en dos días diferentes y con dos analistas diferentes) muestran un coeficiente de variación global menor al 2% se considera que el método es reproducible por cualquier analista en cualquier día.

El valor obtenido del coeficiente de variación entre los porcentajes de recobro de las diferentes muestras sometidas a estudios de estabilidad permite asumir que pueden éstas conservarse hasta 78 horas sin perder su identidad , pureza e integridad, además de la existencia de confiabilidad en los resultados cuando son almacenadas en refrigeración, obscuridad y temperatura ambiente.

Con respecto a la tolerancia del sistema se observa que al realizar las diferentes modificaciones en éste la diferencia en los porcentajes cuantificados de Furazolidona son menores al 2% por lo que se considera que éstas modificaciones al sistema cromatográfico son tolerables y que el sistema es adecuado.

10. CONCLUSIONES

1. La metodología desarrollada por CLAR para Furazolidona se logró gracias a la consideración de las propiedades del principio activo con la que se logró obtener una resolución adecuada de Furazolidona respecto a los demás componentes de la formulación
2. Así mismo el método desarrollado por el sistema de gradiente fue adecuado para lograr la resolución aceptable del activo respecto al patrón de referencia interno Diclofenac Sódico el cual demostró que no interfiere con Furazolidona además de ser útil para la cuantificación del activo.
3. Además la degradación realizada del 10% en condiciones aceleradas demuestra que al realizársele un análisis de contorno demuestra que la cuantificación del activo a 5 diferentes longitudes de onda se observa similitud en tiempos de retención de las muestras degradadas respecto a Furazolidona sustancia patrón de referencia concluyendo que el método es específico y capaz de garantizar con un alto grado de confianza el desarrollo de un método para estudios de estabilidad.
4. La evaluación estadística del método desarrollado por CLAR resultó ser lineal en el intervalo de concentraciones evaluados, exacto, preciso y reproducible.
5. Las muestras sometidas a estudio de estabildades demostraron ser estables hasta por 78 horas en las condiciones manejadas, además el sistema es tolerante a las modificaciones realizadas sin afectar la resolución y cuantificación de Furazolidona.
6. Por tanto el método analítico puede ser utilizado en análisis de materia prima, producto en proceso, producto terminado y para estudios de estabilidad dando un alto grado de confianza.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aerts, M.M.L. Determination of nitrofurán residues in edible Products. J.Chromatogr. 500[22], (1990) 453-67.
- 2.- Budavari S., The Merck Index. 1 edition , Editor. Merck & Co., Inc. New Jersey, U.S.A., 4210 (1989).
- 3.- Clarke's. Isolation and Identification of Drugs. 2 edition Moffar, A., Editor. The Pharmaceutical Press. London. 635 (1986).
- 4.- Debesis Eileen. Submitting HPLC method to the compendia and regulatory agencies. Pharmaceutical Technology. Sep (1982), 121-136.
- 5.- Dolan W. J. " Gradient Elution Separation Problems", Liquid Chromatography-Gas Chromatography 5 [5] (1987) 387-88.
- 6.- Goodman, A.; Gilman , A.. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 6 th. Mc Millan Publishing Co. Inc. New York, U.S.A., 1100. (1980).
- 7.- Joy R. Miksic. Validation Procedures that test for Matrix Effects. LC-GC. 10, 4 (1992) 516-519.
- 8.- Litter, M.. Farmacología Experimental y Clínica. 7a. El Ateneo. Argentina, 1424-25.(1988).
- 9.- Lual. Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos. Pharma News. 4 , 7 (1993) 32-44.
- 10.-Lual. Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos. Pharma News. 4 , 9 (1993) 24-25.
- 11.-Lual. Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos. Pharma News. 4 , 10 (1993) 16-19.
- 12.-Lual. Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos. Pharma News. 4 , 11 (1993)26-28.
- 13.- Martindale. The Extra Pharmacopeia. 29th edition, The Pharmaceutical Press London, 103.(1989).
- 14.- Nelson, A. Interpretation of research data , regression analisis. Am. J. of Hospital Pharmacy, 38 (1981) 224-30.

- 15.- Nickos A. Botsoglou. Determination of Furazolidone in eggs by High Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 36 (1988), 1224-1227.
- 16.- Organización de los Estados Americanos. *Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.* 2,(1981).
- 17.- Rodríguez C. R. *Vademécum académico de medicamentos.* 1 edición. Dirección General de Publicaciones. México. 375-76. (1980).
- 18.- Snyder, L. R.; Kirklan, J.J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography.* 2 edition. John Wiley & Sons, Inc.. U.S.A. , 17, 21, 137, 552. (1978).
- 19.- Taylor, J.K. *Validation of Analytical Methods.* *Anal. Chem.* 55[6], 600 - 608.(1983).
- 20.- *The United States Pharmacopeia . 22nd. USP XXII-NF.* United States Pharmacopeial Convention , Inc.. 452, 1711 , 1712(1989).
- 21.- Thorpe V. A. *Sample preparation of carbadox, furazolidone, nitrofurazone and atropabate in medicated feeds for high pressure liquid chromatography.* *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63 [5], (1980), 981-984.
- 22.- “ *The Pharmacopeia of Japon*”, 11 th ed, Japon (1987).
- 23.- Hamilton, R.J., Sewell P.A., “*Introduction to high performance and liquid chromatography*”, J Willey & Sons Ind., USA., (1977).
- 24.- Snyder, L.R, and Kikland “ *Practical HPLC metods develoment*”, Ed John Wily & Sons. USA, 16-50,125-142 (1988).
- 25.- Yost R.W., L.S: *Ettre and R:D: Colons*, “ *Introducción a la cromatografía líquida práctica*”, Pelkin-Elmer, USA.32-105(1980).
- 26.- U:S: *Pharmacopeia 23, National Formulary* (1925).
- 27.- Fontani, F. “ *Validación de métodos analíticos* “, *Boll, Chim,Farm.*, 126-2, (1987).
- 28.- J.J. Laurensen and J.F.M. Nows. “ *J Chromatogr.*, 472 (1989) 321.
- 29.- A.Guiberteau and T. Galeano Díaz “ *Determination of Furaltadone and Nitrofurantoince by HPLC with Electrochemical Detection* <http://www.dc-ja.org/dcabstract/96122.htm>.

ANEXO A.

Criterios de evaluación de Linealidad del sistema.

Pendiente :

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

Criterio de aceptación.

Se evalúa la significancia estadística a través de una prueba t de Student a un 95% de confianza

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$
 donde $b_0 = 1$

Estadígrafo de contraste

t cal para la pendiente.

$$t \text{ cal} = \frac{(b - b_0)(S_x)(n-1)}{S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum \bar{x}}{\sum x^2 - (\sum x)^2/n} + 1/n}}$$

Criterio de aceptación. $t_{cal} < t_{teórica}$

Se prepara con la evaluación de la t de tablas.

Intervalo de confianza para la pendiente.

Pendiente relativa:

$$b \text{ rel} = \frac{(\sum x)}{(\sum y)} * b$$

Criterio de aceptación $0.98 < b \text{ rel} < 1.02$

EVALUACIÓN DE LA ORDENADA

Ordenada: $(\sum y) (\sum x^2) - (\sum x) (\sum xy)$

$$a = \frac{\text{Ordenada}}{n (\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

Criterio de aceptación

Se evalúa la significancia estadística a través de una prueba t de Student a un 95% de confianza bilateral.

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$
donde $a = 0$

Estadígrafo de contraste.

t cal para la ordenada al origen:

$$t \text{ cal} = \frac{a - a_0}{S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} \left(\frac{1}{\sum x^2} - \frac{(\sum x)^2}{n^3} \right) + \frac{1}{n}}}$$

Criterio de aceptación $t_{\text{cal}} < t_{95\%}$

Ordenada al origen relativa:

$$a_{\text{rel}} = \frac{a}{y}$$

Criterio de aceptación $-0.02 < a_{\text{rel}} < 0.02$

Coefficiente de determinación.

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

Coefficiente de determinación.

$$\sqrt{r} = r^2$$

Criterio de aceptación $r^2 > 0.98$

Error estándar de la recta de regresión.

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

Error estándar de la recta de regresión relativa (EERR)

$$EERR = \frac{S_{y/x}}{y}$$

Desviación estándar relativa de la recta de regresión

$$S_{y/x \text{ rel}} = \frac{S_{y/x}}{y}$$

Criterio de aceptación $S_{y/x} r < 0.02$

FORMULAS PARA EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN DEL SISTEMA.

$$\text{Media } \bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

$$\text{Desviación estándar } S = \frac{(\sum \bar{X} - X_i)}{n-1}$$

$$\text{Coeficiente de variación. } C.V. = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

ANEXO B.

CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD.

Media.
$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

Desviación estándar:
$$S_{n-1} = \frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}$$

Coefficiente de variación.
$$C.V. = \frac{S_{n-1}}{\bar{X}} * 100$$

Criterio de aceptación.

Estadístico de prueba.
$$t_{cal} = \frac{\bar{x} - \mu}{S_{n-1} / \sqrt{n - 1}}$$

donde $\mu = 100\%$.

Se evalúa la significancia estadística a través de una t Student a un 95% de confianza con n-1 g.l

Criterios de aceptación. $t_{cal} < t_{teórica}$.

Nivel de significancia. $\alpha = 0.05$

ANEXO C

LA REPRODUCIBILIDAD SE EVALÚA CON EL C.V. TOTAL

Media.
$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

Desviación estándar:
$$S_{n-1} = \frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}$$

Coefficiente de variación.
$$C.V. = \frac{S_{n-1}}{\bar{X}} * 100$$

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

La estabilidad de la solución de la muestra se evalúa con la diferencia del promedio de cada condición con respecto al promedio del tiempo cero y esta diferencia no debe ser mayor al 2%.

PARA TOLERANCIA DEL SISTEMA.

Factor de capacidad.	$K' = 1 - 10$
Factor de selectividad	$\alpha = 1 - 2$
Factor de coleo	$T = 0.8 - 1.3$
Factor de resolución	$R = >1.5$