

6
2oj.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

" Z A R A G O Z A "

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN
METODO ANALITICO PARA CONTROL
DE CALIDAD, EN EL CUAL SE
CUANTIFIQUEN MEBENDAZOL,
NICLOSAMIDA Y TINIDAZOL EN
TABLETAS, MEDIANTE
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS
DE ALTA RESOLUCION.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:

VIOLETA LUZ MARIA BRAVO HERNANDEZ



MEXICO, D. F.

1992



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	<u>PAGINA</u>
I. INTRODUCCION	1
II. FUNDAMENTACION DEL TEMA	
A. Descripción de los principios activos	2
B. Antecedentes en la cuantificación de mebendazol, niclosamida y tinidazol	4
C. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)	7
D. El proceso de separación	10
E. El equipo en cromatografía líquida	13
F. Validación	17
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
IV. OBJETIVOS	22
V. HIPOTESIS	23
VI. PARTE EXPERIMENTAL	
A. Materiales	24
B. Metodo	24
VII. RESULTADOS	32
VIII. DISCUSION DE RESULTADOS	57
IX. CONCLUSIONES	60
X. RECOMENDACIONES	60
XI. FORMULARIO	61
XII. BIBLIOGRAFIA	64

I. INTRODUCCION

Mebendazol, Niclosamida y Tinidazol son principios activos que tienen propiedades farmacológicas que se aprovechan para integrar con ellos un medicamento antiparasitario de amplio espectro, útil en el tratamiento de parasitosis mixtas causadas por nemátodos, céstodos y protozoarios.⁽¹⁾

El propósito de este trabajo, está encaminado a desarrollar un método analítico empleando la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, para cuantificar niclosamida, mebendazol y tinidazol (tres principios activos contenidos en una tableta -polifármaco-).

Si bien, se cuenta actualmente con un método analítico para cuantificar cada uno de los principios activos ya mencionados (2), no es suficientemente satisfactorio el tiempo de análisis debido a la técnica analítica utilizada (cromatografía en capa delgada para separar cada uno de los principios activos, con posterior cuantificación de los mismos por espectrofotometría). Se requiere entonces, un método versátil que ofrezca CONFIABILIDAD Y RAPIDEZ DE ANALISIS.

Posterior al desarrollo del método analítico, se llevará a cabo la validación del mismo, con lo cual quedará establecido de manera clara y objetiva, que el método de estudio reúne los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

II. FUNDAMENTACION DEL TEMA

A. Descripción de los principios activos

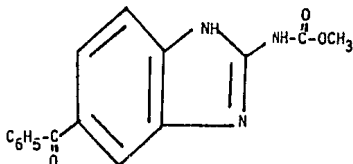
El medicamento que es objeto de estudio, incluye en su formulación los siguientes elementos:

Mebendazol	60	miligramos
Niclosamida	200	miligramos
Tinidazol	300	miligramos
Excipientes	c.b.p.	714 miligramos

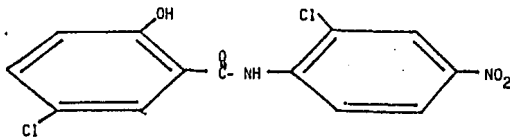
EL MEBENDAZOL es un agente antihelmíntico de amplio espectro. Es una sustancia sintética que se presenta como polvo amorfo amarillento, muy poco soluble en agua y en la mayor parte de los solventes orgánicos; conocido también como ester metílico del ácido 5-benzimidazolcarbámico, o bien, como el ester metílico del ácido (5-benzoil-1 H-benzimidazol-2- il)-carbámico. (3,4)

Es eficaz contra Trichuris trichiura, Ascaris lumbricoides, Enterobius vermicularis, Ancylostoma duodenale, Necator americano; también es efectivo aunque en menor grado contra Strangyloides stercoralis, y en infestaciones por tenias. Su actividad ante los helmintos se debe a su capacidad de inhibir de forma irreversible la captación de glucosa exógena por los helmintos. La inmovilización y muerte de los parásitos ocurre lentamente y su desaparición del intestino, puede no ser completa hasta tres días después del tratamiento. Los estudios de toxicología aguda y crónica indican un alto margen de seguridad entre la dosis terapéutica y la tóxica; sin embargo en ratas preñadas, este medicamento ha producido efectos teratogénicos. El mebendazol se absorbe muy poco, después de una dosis oral, aproximadamente el 0.5% pasa al torrente

sanguíneo, la cual se excreta por orina en forma de un derivado descarboxilado. A continuación se presenta la fórmula desarrollada del Mebendazol.^(3,4,5)

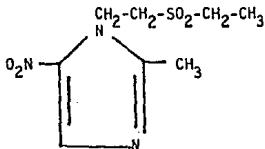


La NICLOSAMIDA es un polvo microcristalino, color crema, inodoro y sin sabor. Desde el punto de vista químico, es el N-(2-cloro-4-nitrofenil)-5-clorosalicilamida.⁽³⁾



Es prácticamente insoluble en agua, ligeramente soluble en etanol, metanol, cloroformo y éter. Su espectro antiparasitario incluye la mayoría de los céstodos (*Taenia saginata*, *T. solium*, *Diphyllobothrium latum* e *Hymenolepis nana*) de las cuales el hombre es huésped primario y le causan enfermedades. También afecta a *Enterobius vermicularis*. El fármaco es absorbido por el parásito a través de su tegumento y en su interior, la acción más importante es la inhibición de la producción anaeróbica del ATP, mecanismo fundamental de la obtención de energía en estos parásitos. La consecuencia de este efecto es la muerte con digestión parcial de los segmentos y del escólex. El grado de absorción por la pared intestinal del huésped es muy baja, por lo que se considera que la toxicidad es selectiva contra los parásitos susceptibles.^(6,7)

El TINIDAZOL, con nombre químico de 1-(2-(etilsulfonil)etil)-2-metil-5-nitroimidazol; etil-(2-(2-metil-5-nitro-1-imidazolil) etil)sulfona; son cristales poco coloridos a partir del benceno. Su fórmula estructural, se presenta a continuación.



El Tinidazol, tiene efectos amebicidas directos. La importancia de este medicamento radica en que es altamente efectivo en todas las formas de amebiasis, intra y extra intestinal. Se absorbe bien a través de la mucosa gastrointestinal y sus concentraciones plasmáticas más altas se observan una hora después de la administración oral. Alcanza concentraciones bajas en la saliva y en la leche materna. Está contraindicado en casos de discrasias sanguíneas, lesiones orgánicas activas del sistema nervioso central, durante el primer trimestre del embarazo y en casos de hipersensibilidad del fármaco. (5)

B. Antecedentes en la cuantificación de mebendazol, niclosamida y tinidazol

A continuación se presenta información referente a la cuantificación de mebendazol, niclosamida y tinidazol, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución y cromatografía de gases.

<u>Compuesto</u>	<u>Columna</u>	<u>Fase Móvil</u>	<u>Detector y longitud de onda</u>
TINIDAZOL	Bondapak/fenil	Solución amortiguadora de KH_2PO_4 -NaOH	UV a
(8, 9, 10,		0.05 M, pH= 7: Metanol (86:14)	313 nm
11, 12, 13)	ODS	Solución amortiguadora de fosfatos	UV a
		0.01 M, pH= 5.5: ACN (85:15)	320 nm
	ODS	Solución amortiguadora de acetatos,	UV a
		20 mM, pH=4: ACN (93:7)	320 nm
	ETH Per-	Cloroformo: Etanol: Hexano	UV a
	maphase	(15:0.5:90)	315 nm
	ODS	Solución amortiguadora de acetatos	UV a
		20 mM, pH=5: ACN (95:5)	320 nm
	3% OV-11 (CG)	Gas acarreador: Nitrógeno	PN
MEBENDAZOL	ODS	Metanol:agua (55:45), Bomba A	UV a
(14, 15)		Metanol: $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ (55:45), Bomba B	254 nm
		Bomba A: Bomba (67:33)	
	ODS	Solución amortiguadora de KH_2PO_4 -	UV a
		NaOH, 0.05 M, pH=6 : ACN (73:23)	313 nm
NICLOSAMIDA	5% OV-101 (CG)	Gas acarreador: Nitrógeno	Captura
(16, 17, 18)			de electrón
	ODS	Solución amortiguadora de KH_2PO_4	UV a
		(6.66 g/l), pH=2.3 : ACN (340g : 156g)	220
	AMINO	Metanol:agua (80 : 20)	UV a
		Acetonitrilo : Agua (60 : 40)	313 nm

De los métodos analíticos citados anteriormente, se puede observar que hay elementos comunes para la cuantificación simultánea de los tres principios activos, en cuanto a cromatografía de líquidos se refiere.

Los elementos importantes que se van a tomar en consideración para el desarrollo del método analítico son los siguientes:

1. Una fase estacionaria común a los tres principios activos de ODS (octadecil silano)
2. Una fase móvil de Solución Amortiguadora de KH_2PO_4 - NaOH 0.05M. pH=7 o bien, pH=6 : ACN y/o Metanol, para cuantificar Tinidazol y Mebendazol. En cuanto a Niclosamida se refiere, se pueden realizar combinaciones de acetonitrilo, metanol, agua.
3. Para los tres principios activos, se puede utilizar un detector ultravioleta con una longitud de onda de 313 nm.

Actualmente se cuenta en el departamento de control de calidad con un método analítico espectrofotométrico para la cuantificación de los tres principios activos, el problema es la separación cuantitativa de cada uno de ellos, el químico analista se ve obstaculizado primero por un tiempo de análisis muy largo y después, con la manipulación de la muestra en extremo cuidadosa en cualquiera de las siguientes etapas:

1. La completa solubilización de los principios activos en el sistema de disolventes ya establecido.
2. La separación de los excipientes y de los principios activos, por medio de filtración.
3. La aplicación de un volumen determinado de estándar y muestras a la placa cromatográfica de la manera más exacta posible.

4. El raspado de la zona, una vez realizada la elución de la placa cromatográfica.
5. La separación de la sílica gel y de los principios activos por filtración.

Es necesario por tanto, contar con un método analítico rápido y confiable, con el cual se minimicen los errores debidos a la manipulación de la muestra. Se piensa emplear la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución para tales fines, porque se cuenta en el laboratorio con los recursos necesarios (equipo de cromatografía y reactivos) para desarrollar un método analítico por HPLC; y lo más importante es, que en cualquier otra técnica analítica (potenciométrica, tritrimétrica, espectrofotométrica, etc.) sería necesaria la separación de los tres principios activos contenidos en la tableta de manera CUANTITATIVA, situación que implica una manipulación excesiva de la muestra.

C. Cromatografía de Líquidos de alta resolución

1. HISTORIA DE LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA⁽¹⁹⁾

Esta técnica fué desarrollada en primer lugar por el botánico ruso M.S. Tswett, para la separación y aislamiento de los pigmentos de las plantas. Tswett eligió el nombre de las palabras griegas que significan "escritura en color" refiriéndose a las bandas de las diferentes sustancias coloreadas que logró separar sobre columnas de yeso pulverizado.

Posteriormente en 1930 y 1931, Kuhn y E. Lederer revitalizaron el método en los laboratorios de Heidelberg, Alemania. En pocos años la cromatografía líquida en columna se convirtió en una técnica utilizada universalmente.

Un logro importante lo constituyó el desarrollo de la cromatografía de reparto gas-líquido por parte de Martin y James en 1952. Al mismo tiempo se extendía el interés por la cromatografía líquida (1960-1970), por lo cual se generalizó la teoría, fructificando en una nueva expansión de la moderna cromatografía líquida en columna, actualmente conocida como cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, High Performance Liquid Chromatography).

2. DEFINICION⁽¹⁹⁾

Cromatografía es un término general aplicado a una amplia gama de técnicas de separación que esencialmente se basan en la distribución de los componentes a separar entre dos fases, una de ellas es una fase móvil, la cual puede ser un gas o un líquido, y la otra es una fase estacionaria, la cual a su vez puede ser un líquido o un sólido. El proceso cromatográfico tiene lugar como resultado de repetidas adsorciones o repartos durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo del lecho estacionario, alcanzándose la separación gracias a las diferencias en los coeficientes de distribución de los distintos componentes de las muestras.

3. CLASIFICACION Y GENERALIDADES^(19,20,21)

Basándose en la naturaleza de la fase móvil, la cromatografía se divide en cromatografía de gases y en cromatografía de líquidos, las cuales a su vez se subdividen al tomar en cuenta la naturaleza de la fase estacionaria, tal y como se muestra en la figura siguiente.

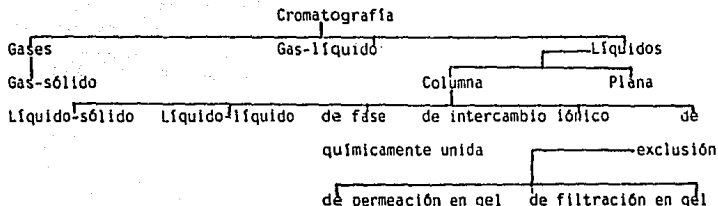


Figura 1. Clasificación de la cromatografía

Existen muchas maneras de clasificar la cromatografía líquida en columna, otro tipo de clasificación es el siguiente:

- Cromatografía de adsorción. Líquido-sólido, la fase estacionaria es un adsorbente y la separación se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción.
- Cromatografía de partición. Líquido-líquido, la separación no se basa en la adsorción, sino en una verdadera partición entre la fase móvil y la fase estacionaria.
- Cromatografía de intercambio iónico. El lecho estacionario tiene una superficie cargada iónicamente, con carga contraria a la de la muestra. La fase móvil es una solución amortiguadora, en la que el pH y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de elución.
- Cromatografía de exclusión. Se rellena la columna con un material que posee poros de dimensiones comprendidas entre ciertos límites, con lo que la muestra es retenida o filtrada según sea su tamaño molecular.

En cuanto a los dos primeros tipos de cromatografía, no siempre puede asegurarse cuál de los procesos implicados (adsorción o reparto) desempeña el papel más importante. Por esta razón en la práctica se definen dos o más tipos, según sea la polaridad relativa de las dos fases: cromatografía en

fase normal y cromatografía en fase inversa.

En la cromatografía en fase normal, el lecho estacionario es de naturaleza fuertemente polar (por ejemplo sílice) y la fase móvil es apolar (por ejemplo n-hexano o tetrahidro furano), las muestras polares quedan retenidas en la columna durante tiempos mayores que los materiales menos polares.

En la cromatografía en fase inversa, el lecho estacionario es de naturaleza no polar (hidrocarburo), mientras que la fase móvil es un líquido polar, normalmente agua o alcohol. En este caso, cuanto más no polar sea la muestra, mayor será su retención.

D. El proceso de separación

1. TERMINOS MAS USUALES EMPLEADOS EN CLAR (19,20)

a. Tiempo de retención

El tiempo de retención es el tiempo que transcurre desde la inyección hasta el ápice del pico.

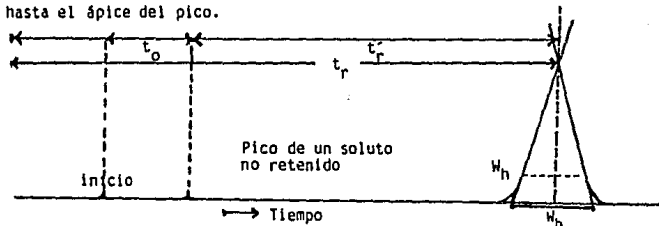


Figura 2. Esquema que muestra un cromatograma típico, en donde t_r es el tiempo de retención, t_0 es el tiempo muerto, t'_r es el tiempo de retención corregido o relativo.

En la figura 2 se puede observar que el tiempo de retención absoluto t_r es el tiempo que permanece la muestra interaccionando con la fase estacionaria más el tiempo que permanece en la fase móvil (tiempo muerto).

$$t_r = t_0 + t'_r$$

b. Factor de capacidad

Es una medida de la retención de un componente. Es el coeficiente de reparto común a todos los procedimientos de distribución.

$$K = \frac{\text{conc. de la muestra en la fase estacionaria}}{\text{conc. de la muestra en la fase móvil}}$$

Mide la solubilidad de la muestra en la fase estacionaria. Este valor indica el tiempo durante el cual puede retenerse cada componente de una muestra en la columna. La fase estacionaria retarda la muestra al interaccionar con ella en un tiempo t'_r y el t_0 es el tiempo que permanece en la fase móvil; el cociente entre ambos da el valor de K.

$$K = \frac{t'_r}{t_0} = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

c. Factor de selectividad (factor de separación o retención relativa - α -)

El factor de selectividad es la relación del tiempo en que dos picos permanecen en la fase estacionaria. Si el valor de alfa es igual a uno, los dos picos tienen solubilidades iguales con respecto a la fase estacionaria y no se realiza la separación.

$$\alpha = \frac{t'_r (B)}{t'_r (A)} = \frac{K_B}{K_A}$$

El valor que corresponde al pico con mayor tiempo de retención, se coloca siempre en el numerador.

d. Número de platos teóricos y altura del plato

La anchura de un pico, es decir, la desviación estándar, indica cuán agudo es un pico. Sin embargo este valor depende de varios parámetros, entre ellos el caudal, por tanto es mejor considerar un valor relativo para expresar la calidad del pico. Una expresión aparentemente adecuada es el cociente entre la desviación estándar y el tiempo de retención, también llamado desviación estándar relativa, σ/t_r , sin embargo, resulta ser un valor muy pequeño y poco práctico. Su inverso, t_r/σ es adecuado. En la práctica, lo que se utiliza para la expresión de la eficacia de una columna es el cuadrado del cociente anterior: $N = (t_r/\sigma)^2$.

La razón para el uso del cuadrado es teórica y está relacionada con el hecho de que desde un punto de vista matemático, la medida básica de una distribución normal es la varianza (σ^2); N representa el número de platos teóricos.

Existen varios métodos para cuantificar el número de platos teóricos dependiendo de la altura a la que se tome la anchura del pico; uno de ellos es el método al 0.5 de la anchura del pico, cuya fórmula es:

$$N = 5.54 (t_r/w_h)^2$$

El número de platos teóricos depende de la longitud de la columna. En consecuencia se ha introducido otro término que relaciona el número de platos con la longitud de la columna, es la altura de plato o altura equivalente a un plato teórico, cuya dimensión es la longitud.

$$H = 1/N$$

A menor altura del plato y mayor número de platos, corresponde más eficacia de la columna cromatográfica.

e. Resolución

La resolución es una medida de la capacidad que tiene una columna para separar dos picos y es definida como la distancia que hay entre el centro de picos dividida entre el promedio de las anchuras de los mismos.

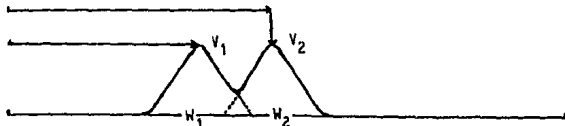


Figura 3. Picos cromatográficos, en los cuales V expresa altura y W anchura del pico.

$$R = \frac{V_2 - V_1}{0.5 (W_1 + W_2)}$$

Para el cálculo de la resolución, se utilizan los picos más difíciles (los más juntos), y si éstos se pueden separar con éxito, todos los demás que estén contenidos en la muestra lo harán.

Tanto la selectividad, como la eficiencia y el factor de capacidad están estrechamente ligadas a la resolución al utilizar la siguiente fórmula:

$$R = (\alpha - 1/\alpha) (\sqrt{n}) (K/1 + K)$$

E. El equipo en cromatografía líquida (19,20,21,22,23,24)

Normalmente un cromatógrafo de líquidos cuenta con los componentes que se representan en la figura número 4.

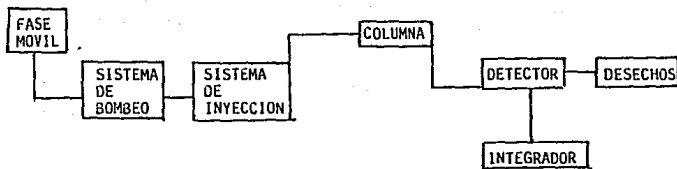


Figura 4. Componentes de un sistema típico de cromatografía de líquidos.

Primero se tiene el reservorio del disolvente (fase móvil), una bomba para impulsar el disolvente, un dispositivo para la inyección que permita la aplicación de la muestra, una columna para llevar a cabo la separación de los componentes contenidos en la muestra, un detector que mida en forma continua alguna propiedad fisicoquímica de los componentes de la muestra, generando una señal proporcional a la concentración de los mismos. En seguida se tiene el integrador que transforma la intensidad de las señales emitidas por el detector, en números digitales que puedan relacionarse con la cantidad de muestra.

La verificación del buen funcionamiento de un cromatógrafo de líquidos se lleva a cabo analizando cada uno de los componentes que forman parte del equipo.

1. FASE MOVIL

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

- La muestra debe ser soluble en la fase móvil.

- 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. 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.

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

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

2. FILTRO DE LA FASE MOVIL

Es de acero inoxidable o de teflón y de 2 a 5 micras de porosidad. Es muy recomendable lavarlo frecuentemente en baño ultrasónico con ácido acético al 10%. Como una precaución adicional se puede colocar un segundo filtro en la línea del solvente, justo antes de entrar a la columna.

3. BOMBA

Los requisitos de una bomba ideal, son los siguientes:

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

- Debe soportar una alta presión con velocidades de flujo entre 0.5 y 10 ml/min.

- No debe generar pulsos que se traduzcan en ruido.

- La velocidad de flujo debe ser reproducible para poder obtener tiempos de retención también reproducibles.

a. Flujo y reproducibilidad de flujo

Se verifican 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.

c. Fluctuaciones en la línea base por generación de pulsos

Con la bomba y el integrador encendidos, observar las desviaciones de la línea base.

4. 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 pueden presentarse con el inyector son: de fugas de líquido, de sifoneo y de obstrucción.

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 buffer es indispensable lavarlo con suficiente agua.

5. COLUMNA

Siempre que se adquiera una columna nueva es necesario llevar un registro de la selectividad, del número de platos teóricos y de la resolución para el sistema de separación para el que fué adquirida. De esta manera puede llevarse un control de vida de la columna.

Los problemas que pueden presentarse con la columna pueden ser: de fuga, de obstrucción, de cromatograma (éste se debe principalmente al comportamiento de la columna; la presencia de picos fantasmas y el coleo de los picos se deben a una obstrucción 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).

6. DETECTOR

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

Los tres detectores más comúnmente usados son el de ultravioleta de longitud de onda fija, de ultravioleta de longitud de onda variable, y el detector de índice de refracción; cada uno difiere en sensibilidad para varios tipos de muestra. Los problemas que pueden presentarse en los detectores son: de fugas de líquido, de ruido electrónico.

7. INTEGRADOR

Su propósito es registrar de manera permanente los resultados del análisis por medio de un cromatograma. Los sistemas de registro no presentan ningún problema si se ha conectado adecuadamente al detector.

(25,26,27)

F. VALIDACION

1. DEFINICION

La validación de un método analítico, se define como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

La capacidad se expresa, en términos de parámetros analíticos.

El proceso de validación de un método en particular está basado en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos prácticos de medición.

En la aplicación de los criterios de evaluación de un método analítico prevalecerá ante todo la experiencia y el criterio de la persona que lleve a cabo la validación.

2. PARAMETROS A EVALUAR

a. Especificidad

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

b. Linearidad

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

c. Exactitud

La exactitud de un método analítico 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.

d. Precisión

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 o del coeficiente de variación. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

1) Repetibilidad. Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.).

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

e. Estabilidad de la muestra

Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Los parámetros a valorar dependiendo de la aplicación del método analítico del que se trate, se encuentran en la tabla 1.

PARAMETRO	INDICADORES DE ESTABILIDAD		REVALUACION DEL METODO	
	CONTROL DE CALIDAD	BAJAS CONCEN-TRACIONES	ALTAS CONCEN-TRACIONES	SIN CAMBIO EN CONDI-CIONES DE OPERACION
LINEARIDAD Y PRECISION DEL SISTEMA	X	X	X	X
LIMITE DE DETECCION		X	X	
LIMITE DE CUANTIFICACION		X	X	
EXACTITUD Y REPEATIBILIDAD AL 100%	X	X	X	X
LINEARIDAD DEL METODO	X	X	X	X
PRECISION (REPRODUCIBILIDAD)	X	X	X	X
ESPECIFICIDAD (CONTROL DE CALIDAD)	X	X	X	X
ESPECIFICIDAD (ESTABILIDAD)		X	X	
TOLERANCIA DEL METODO		X	X	
ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	X	X	X	X

Tabla 1. Parámetros a evaluar dependiendo de la aplicación del método ²⁵

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las parasitosis intestinales, por los efectos nocivos que ocasionan en el desarrollo físico y mental, especialmente del niño, como por la forma negativa con que inciden sobre la economía de la población, constituyen un importante e ineludible problema de orden sanitario y social.⁽²⁾

La frecuencia con que se manifiestan estos cuadros patológicos, es sumamente variable, aún dentro del mismo país o región, pues depende en particular, de la zona geográfica que se tome en consideración. Dos razones son las determinantes: por un lado, las diferentes condiciones climáticas requeridas para cumplir el ciclo evolutivo de cada especie; y por otro, las distintas circunstancias económicas, sociales, sanitarias y culturales, que específicamente, gravitan en cada área geográfica.

Además, es tan elevada la frecuencia con que se presentan las parasitosis intestinales en el hombre, que puede inferirse sin caer en exageración, que es muy raro encontrar una persona adulta, que actualmente no albergue parásitos o que no los haya albergado, por lo menos, una vez en la vida, y preferentemente en su niñez.⁽²⁾

Es importante entonces, contar con medicamentos que asocien en su fórmula los elementos necesarios para erradicar rápida y definitivamente las infestaciones producidas por protozoarios, nemátodos y céstodos (parasitosis mixtas).⁽¹⁾ Su gran demanda en el mercado exige una producción en gran escala y por lo consiguiente, métodos de análisis rápidos y confiables para liberar el producto en el menor tiempo posible.

IV. OBJETIVOS

A. Objetivo General

Desarrollar y validar un método analítico para control de calidad por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para la cuantificación de mebendazol, niclosamida y tinidazol, contenidos en una tableta.

B. Objetivos Específicos

1. Probar experimentalmente, la fase móvil y la fase estacionaria óptimas para la adecuada separación de los principios activos en la formulación.
2. Seleccionar las condiciones analíticas y operativas adecuadas para la cuantificación de mebendazol, niclosamida y tinidazol, por CLAR.
3. Validar el método analítico desarrollado, evaluando al sistema y al método a través de los parámetros de Especificidad para control de calidad, Linearidad, Exactitud, Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad).

V. HIPOTESIS

Utilizando las propiedades fisicoquímicas del mebendazol, la niclosamida y el tinidazol, se logra una separación cuantitativa, en base al equilibrio que se establece entre la fase estacionaria y la fase móvil con cada una de las moléculas; de tal forma que la separación de cada componente obedece principalmente a la resolución del sistema cuando se han manejado convenientemente los factores químicos (selectividad y factor de capacidad) y mecánicos (número de platos teóricos o eficiencia de la columna).

Una vez desarrollado el método analítico, se llevará a cabo la validación del mismo para poder utilizarlo como método de rutina para control de calidad.

VI. PARTE EXPERIMENTAL

A. Materiales

1. EQUIPO

- a. Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución, marca Beckman
- b. Columna, marca Beckman, Ultrasphere ODS, de 7 cm de longitud X 4.5 mm de diámetro interno.
- c. Membranas tipo HVLP 04700 de 0,45 micras de diámetro de poro, marca Millipore o equivalente.
- d. Bomba de vacío
- e. Equipo de ultrasonido
- f. Potenciómetro
- g. Material de vidrio

2. REACTIVOS

Acetonitrilo	(Merck)
Metanol grado HPLC	(Merck)
Acido Fórmico R.A.	(Baker)
Fosfato de Potasio Monobásico	(Merck)
Hidróxido de Sodio, lentejas	(Merck)

B. Método

1. CUANTIFICACIÓN DE NICLOSAMIDA

a. Preparación de la fase móvil

Se preparó la fase móvil Agua: Acetonitrilo (ACN): Metanol en la proporción

10:30:60, como se indica a continuación:

Se midieron los disolventes por separado en probetas graduadas de vidrio, se mezcló y filtró a través de una membrana tipo HVLP de 0.45 micras de diámetro de poro. Se degasificó en baño ultrasónico durante 15 min.

b. Preparación de la solución estándar

Se pesó con exactitud 34 mg de nicosamida estándar de referencia y se transfirió a un matraz volumétrico de 100 ml, se agregó 3 ml de ácido fórmico R.A. y 50 ml de metanol R.A., se disolvió y aforó con metanol. Se transfirió una alícuota de 2 ml a un matraz volumétrico de 50 ml y se llevó a volumen final con fase móvil.

c. Preparación de la muestra

Se trituraron 20 tabletas en un mortero de porcelana hasta polvo fino y se pesaron 0.12 gramos del polvo, se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 ml, se agregaron 3 ml de ácido fórmico y 50 ml de metanol R.A., se sonicó por 15 minutos, se dejó enfriar y se llevó a volumen final con metanol R.A., se transfirió una alícuota de 2 ml a un matraz volumétrico de 50 ml y se llevó a aforo con fase móvil.

Se filtraron las soluciones estándar y muestra a través de una membrana tipo HVLP de 0.45 micras de diámetro de poro.

Se inyectó la solución estándar por duplicado hasta que la relación del área de los picos no presentó una variación mayor del 2%, se continuó de la misma manera con las soluciones de la muestra.

Se inyectó la solución estándar cada seis inyecciones de la solución de la muestra para asegurar la estabilidad del sistema.

d. Condiciones cromatográficas

1) Para el cromatógrafo de líquidos

- Columna: Beckman Ultrasphere ODS, 7 cm de long X 4.5 mm de diámetro
- Fase móvil: Metanol: Acetonitrilo: Agua (60:30:10)
- Flujo: 0.5 ml/min
- Detector: 313 nm
- Volúmen de inyección: 20 µl
- Presión: 1.0 Kpsi
- Sensibilidad: 0.05 AUF

2) Para el Integrador

- Atenuación: 64
- Velocidad de carta: 0.5 cm/min
- Area mínima de rechazo: 50 000
- Amplitud del pico (PW): 2

e. Cálculos

Se calculó la cantidad en miligramos de niclosamida en la tableta con la fórmula siguiente:

$$\text{mg/tab} = \frac{A_m}{A_{\text{est}}} \times \frac{W_s}{W_{\text{in}}} \times P_{\text{est}} \times P_p$$

en donde:

- mg/tab= miligramos por tableta
- A_m = Area de la muestra
- A_{est} = Area del estándar

- W_s = peso del estándar en gramos
- W_m = peso de la muestra en gramos
- P_{est} = potencia del estándar
- P_p = peso promedio de las tabletas, en miligramos

2. CUANTIFICACION DE MEBENDAZOL Y TINIDAZOL

a. Preparación de la fase móvil

Se preparó la fase móvil KH_2PO_4 0.025 M* pH=6: Acetonitrilo: Metanol en la proporción 65:30:5, como a continuación se indica:

Se midieron los disolventes por separado en probetas graduadas de vidrio, mezclando y filtrando a través de una membrana tipo HVLP de 0.45 micras de diámetro de poro. Se degasificó en baño ultrasónico durante 15 minutos.

*Previa a la preparación de la fase móvil, se preparó la solución de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), 0.025 M a pH=6, como a continuación se indica:

Se pesó 1.7 gramos de fosfato de potasio monobásico R.A., transfiriéndolos a un matraz volumétrico de 500 ml, disolviendo con agua destilada y llevando a volúmen final con agua; ajustando el pH=6 con solución de hidróxido de sodio 1:10.

b. Preparación de la solución estándar

Se pesó con exactitud 0.01 gramos de mebendazol, y 0.05 gramos de tinidazol estándares de referencia y se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 ml, agregando 3 ml de ácido fórmico R.A., disolviendo perfectamente. Se llevó a volúmen final con agua. Se transfirió una alícuota de 2 ml a un matraz volumétrico de 50 ml y se llevó a aforo con fase móvil.

c. Preparación de la muestra

Se trituraron 20 tabletas (conteniendo 60 mg de mebendazol, 200 mg de nicosamida y 300 mg de tinidazol) en un mortero de porcelana hasta polvo fino y se pesó 0.12 gramos del mismo, transfiriéndolos a un matraz volumétrico de 100 ml, se agregó 3 ml de ácido fórmico R.A. y se sonicó 15 minutos; llevando a volúmen final con agua. Se filtró con papel Whatman del número 4, descartando las primeras porciones del filtrado. Se transfirió una alícuota de 2 ml a un matraz volumétrico de 50 ml, llevando a volúmen final con fase móvil.

Se filtró la solución estándar y muestra a través de una membrana tipo HVLP de 0.45 micras de diámetro de poro.

Se inyectó la solución estándar por duplicado hasta que la relación del área de los picos no presentó una variación mayor de 2%, continuando de la misma manera con las soluciones de la muestra.

Se inyectó la solución estándar cada 6 inyecciones de la solución de la muestra para asegurar la estabilidad del sistema.

d. Condiciones cromatográficas

1) Para el cromatógrafo de líquidos

- Columna: Beckman Ultrasphere ODS, de 7 cm de longitud X 4.5 mm de diámetro interno.
- Fase móvil: KH_2PO_4 0.025 M. pH=6: Acetonitrilo: Metanol (65:30:5)
- Flujo: 0.5 ml/min
- Detector: 313 nm
- Volúmen de inyección: 20 μ l
- Presión: 1.0 Kpsi
- Sensibilidad: 0.05 AUF

2) Para el integrador

- Atenuación: 128 para el tinidazol, 34 para el mebendazol
- Velocidad de carta: 0.25 cm/min
- Area mínima de rechazo: 50 000
- Amplitud del pico (PW): 2

e. Cálculos

Se Calculó la cantidad en miligramos de tinidazol y mebendazol en la tableta con la fórmula siguiente:

$$\text{mg/tab} = \frac{A_m}{A_{\text{est}}} \times \frac{W_s}{W_m} \times P_{\text{est}} \times P_p$$

en donde:

- mg/tab = miligramo por tableta
- A_m = Area de la muestra
- A_{est} = Area del estándar
- W_s = peso del estándar en gramos
- W_m = peso de la muestra en gramos
- Potencia del estándar : P_{est}
- P_p = Peso promedio de las tabletas, en miligramos

3. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

a. Determinación de la especificidad para control de calidad

Se inyectó de manera independiente, bajo las mismas condiciones de operación, una muestra de las mezclas de placebo con cada uno de los principios activos (también se inyectó una muestra de placebo sólo).

CRITERIO: No debe existir respuesta alguna, de no ser por la sustancia de interés.

b. Determinación de la exactitud del método

Para el caso de Niclosamida, se manejaron tres niveles de concentración del 75%, 100% y 125%, mediante el análisis de 6 muestras de placebo adicionado de estándar para cada una de las tres diferentes concentraciones.

Para tinidazol y mebendazol, se manejaron cuatro niveles de concentración del 80, 100, 110 y 125%, mediante el análisis de 6 muestras de placebo adicionado de estándar para cada una de las cuatro diferentes concentraciones.

CRITERIO: C.V. < 2%

t student calculada < t (n-1, 0.95) en tablas

c. Determinación de la linealidad del método

Tanto para niclosamida, mebendazol y tinidazol, se manejaron 5 niveles de concentración del 60, 80, 100, 110 y 120%, se analizaron placebos a los que se les adicionó cantidades conocidas del principio activo (pesadas independientes). El análisis se realizó por triplicado siguiendo al pié de la letra el método analítico.

d. Determinación de la linealidad del sistema

Para tinidazol, mebendazol y niclosamida se manejaron 5 niveles de concentración del 60, 80, 100, 110 y 120%, analizando 2 muestras de cada nivel, preparadas con soluciones estándar (a partir de una solución patrón y realizando diluciones).

CRITERIO: m aproximadamente 1

b aproximadamente 0

t calculada $b < t (n-1, 0.95)$ en tablas

e. Determinación de la precisión

- 1) Precisión del sistema. Este parámetro se determinó realizando 6 inyecciones de una misma solución estándar al 100% del nivel normal ensayado.

CRITERIO: C.V. $< 2\%$

- 2) Repetibilidad del método. Se utilizaron los resultados obtenidos en la exactitud del método pero con diferente tratamiento estadístico.

CRITERIO: C.V. $< 2\%$

- 3) Reproducibilidad. Se realizó con una muestra homogénea del producto a un nivel de concentración del 100%, con dos fuentes de variación: analista y día de análisis.

CRITERIO: C.V. $< 2\%$

F calculada $< F(0.95)$ en tablas de distribución

VII. RESULTADOS

A. Especificidad para Niclosamida

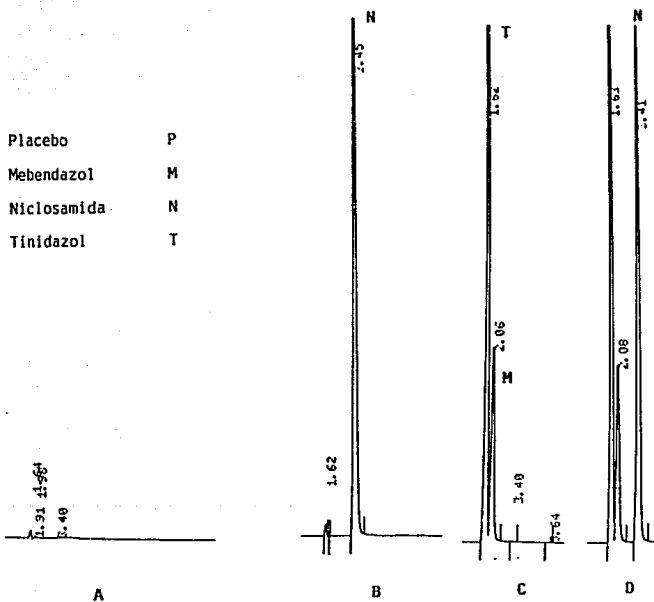


Figura 5. Cromatogramas obtenidos en la especificidad para Niclosamida,

en donde, A= P, B=P+N, C=P+T+M, D=P+T+M+N

Columna: Ultrasphere ODS, de 7 cm X 4.5 mm

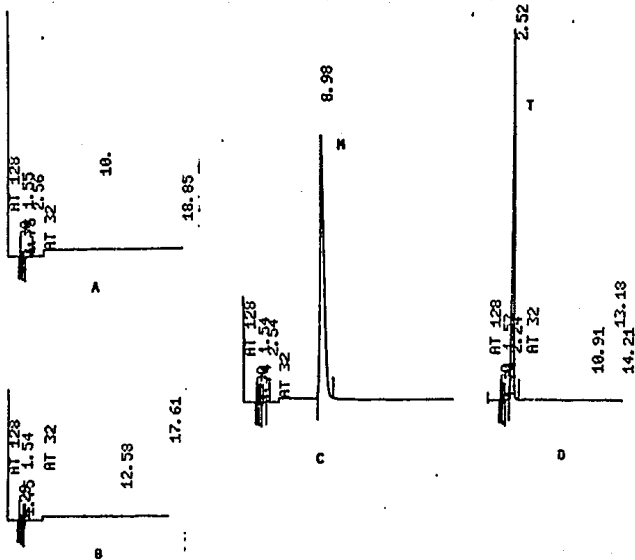
Fase móvil: Metanol : Acetonitrilo : Agua (60: 30: 10)

Flujo de 0.5 ml/min, detector UV a 313 nm, volúmen de inyección

20 ml, sensibilidad 0.05 AUF

B. Especificidad para Mebendazol y Tinidazol

Placebo	P
Mebendazol	M
Nicosamida	N
Tinidazol	T



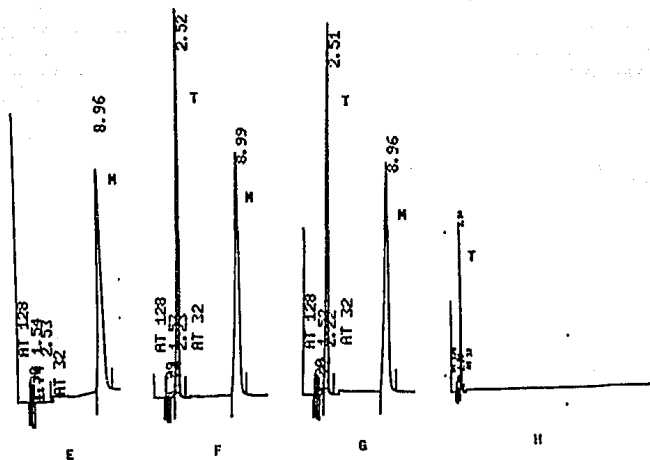


Figura 6. Cromatogramas obtenidos en la especificidad para Mebendazol y Tinidazol, en donde A=P, B=P+N, C=P+M, D=P+T, E=P+M+N, F=P+T+M, G=P+T+M+N, H=P+T+N
 Columna; Ultrasphere ODS, de 7 cm X 4.5 mm
 Fase móvil: KH_2PO_4 0.025 M, pH=6:ACN:Metanol (65: 30: 5)
 Flujo de 0.5 ml/min, detector UV a 313 nm, volúmen de inyección 20 μl , sensibilidad 0.05 AUF

C. Exactitud y Repetibilidad del Método
para Niclosamida

<u>mcg</u> <u>Adicionados</u>	<u>mcg</u> <u>Recuperados</u>	<u>%</u> <u>Recobro</u>
10.10	10.16	100.59
10.10	10.31	102.08
10.10	10.18	100.79
10.10	10.18	100.79
10.10	10.08	99.80
10.10	10.22	101.19
13.40	13.24	98.80
13.40	13.49	100.67
13.40	13.52	100.89
13.40	13.49	100.67
13.40	13.41	100.07
13.40	13.36	99.70
16.75	16.50	98.51
16.75	16.34	97.55
16.75	16.49	98.45
16.75	16.11	96.18
16.75	16.37	97.73
16.75	16.51	98.57
	Media	99.61
	Desviación estándar	1.540
	Coefficiente de variación	1.546
	T calculada	1.074
	EN TABLAS:	
	T (n-1, 0.95)	1.7396

CRITERIO:

Coefficiente de variación < 2.0%

REGLA DE DECISION:

T calculada < T (n-1, 0.95) en tablas

CONCLUSION: El método es exacto y Preciso

D. Exactitud y Repetibilidad del Método

para Mebendazol

<u>mcg</u> <u>Adicionados</u>	<u>mcg</u> <u>Recuperados</u>	<u>%</u> <u>Recobro</u>
3.40	3.44	101.18
3.40	3.43	100.88
3.40	3.42	100.59
3.40	3.41	100.29
3.40	3.41	100.29
4.00	4.07	101.75
4.00	4.08	102.00
4.00	4.06	101.50
4.00	4.06	101.50
4.00	4.05	101.25
4.00	4.05	101.25
4.40	4.44	100.91
4.40	4.41	100.23
4.40	4.38	99.54
4.40	4.38	99.54
4.40	4.37	99.32
4.40	4.37	99.32
4.69	4.64	98.93
4.69	4.63	98.72
4.69	4.66	99.36
4.69	4.63	98.72
4.69	4.63	98.72
4.69	4.65	99.15
	Media	100.21
	Desviación estándar	1.08
	Coefficiente de variación	1.08
	T calculada	0.9312
	EN TABLAS:	
	T (n-1, 0.95)	1.7171

CRITERIO:

Coefficiente de variación < 2%

REGLA DE DECISION:

T calculada < T (n-1, 0.95)

CONCLUSIONES:

El método es exacto y preciso

E. Exactitud y Repetibilidad del Método

para Tinidazol

<u>mcg Adicionados</u>	<u>mcg Recuperados</u>	<u>% Recobro</u>
17.00	17.05	100.29
17.00	17.02	100.12
17.00	16.94	99.65
17.00	17.05	100.29
17.00	17.00	100.00
20.90	21.06	100.76
20.90	20.96	100.29
20.90	20.97	100.33
20.90	20.95	100.24
20.90	20.93	100.14
20.90	21.00	100.48
23.00	22.59	98.22
23.00	23.12	100.52
23.00	23.11	100.48
23.00	23.05	100.22
23.00	22.98	99.91
23.00	23.07	100.30
24.70	24.71	100.04
24.70	24.70	100.00
24.70	24.69	99.96
24.70	24.69	99.96
24.70	24.57	99.47
24.70	24.91	100.85
	Media	100.11
	Desviación estándar	0.52
	Coefficiente de variación	0.52
	T calculada	1.016
	EN TABLAS:	
	T (n-1, 0.95)	1.7171

CRITERIO:

Coefficiente de variación < 2%

REGLA DE DECISION:

T calculada < T (n-1, 0.95)

CONCLUSIONES:

El método es exacto y preciso

F. Linealidad del Sistema
para Niclosamida

<u>mcg</u> <u>Adicionados</u>	<u>Area</u>
8.16	1136349
8.16	1138120
8.16	1140150
10.88	1515132
10.88	1516130
10.88	1517120
13.60	1893915
13.60	1895011
13.60	1896012
14.96	2083306
14.96	2084130
14.96	2093120
16.32	2272698
16.32	2273740
16.32	2280693

Pendiente	139462.41
Ordenada al origen	-512.34
Coefficiente de correlación	0.999976
Coefficiente de determinación	0.999952

CRITERIO :

Ordenada al origen: valor cercano a 0

Coefficiente de correlación > 0.99

Coefficiente de determinación > 0.98

CONCLUSION :

El modelo lineal es correcto

Inferencia para b

$$H_0: b_0 = 0$$

$$H_a: b \neq 0$$

$$t_{cal} = -0.3310$$

$$t_{tab} (15-1, 0.95) = 1.7613$$

Criterio de aceptación: El sistema se considera con una ordenada al origen
igual a cero si se cumple que $|t_{cal}| < t_{tab}$

Conclusión: $|-0.3310| < 1.7613$, por lo tanto H_0 se acepta.

Intervalo de Confianza: $(-3832.32 < -512.38 < 2807.56)$

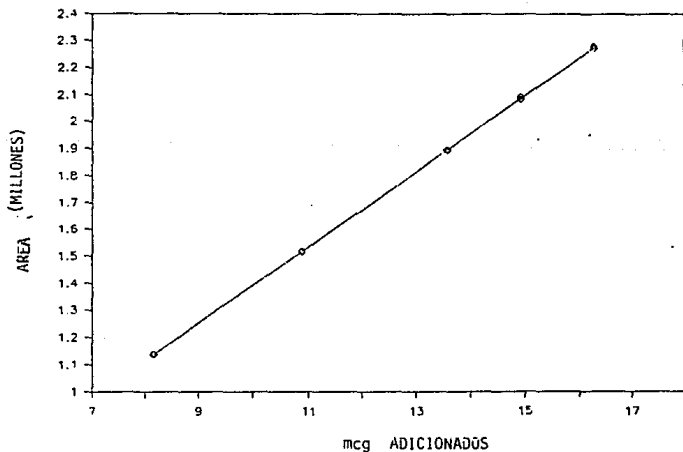


Figura 7. Gráfica de linealidad del sistema correspondiente a Niclosamida

G. Linearidad del Sistema

para Mebendazol

<u>mcg Adicionados</u>	<u>Area</u>
2.4	390708
2.4	390613
3.2	520944
3.2	520839
4.0	651180
4.0	651170
4.4	716298
4.4	716199
4.8	781416
4.8	780998

Pendiente	162752.9095
Ordenada al origen	85.56
Coeficiente de correlación	0.9999
Coeficiente de determinación	0.9999

CRITERIO:

Ordenada al origen: valor cercano a 0

Coeficiente de correlación > 0.99

Coeficiente de determinación > 0.98

CONCLUSION:

El modelo lineal es correcto

Inferencia para b

$$H_0 : b_0 = 0$$

$$H_a : b_0 \neq 0$$

$$t_{cal} = 0.000029$$

$$t_{tab} (10 - 1, 0.95) = 1.8331$$

Criterio de aceptación: El sistema se considera con una ordenada al origen
igual a cero si se cumple que $t_{cal} < t_{tab}$

conclusión: $0.000029 < 1.8331$, por lo tanto H_0 se acepta.

Intervalo de Confianza: $(-67.44 < 85.56 < 674.50)$

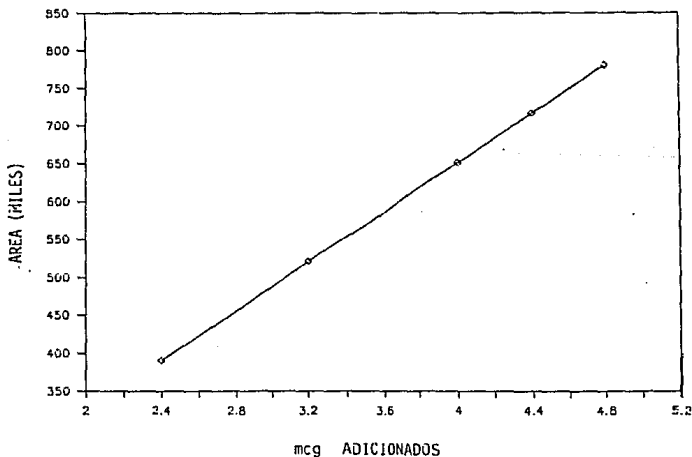


Figura 8. Gráfica de linealidad del sistema, correspondiente a Mebendazol

H. Linealidad del Sistema
para Tinidazol

mcg
Adicionados

Area

12	1160915
12	1160812
16	1547887
16	1547312
20	1934859
20	1934211
22	2128344
22	2127112
24	2321831
24	2319115

Pendiente	96653.888
Ordenada al origen	1146.71
Coefficiente de correlación	0.9999
Coefficiente de determinación	0.9999

CRITERIO:

Ordenada al origen: valor cercano a 0
 Coeficiente de correlación > 0.99
 Coeficiente de determinación > 0.98

CONCLUSION:

El modelo lineal es correcto

Inferencia para b

$$H_0: b_0 = 0$$

$$H_a: b_0 \neq 0$$

$$t_{\text{cal}} = 0.4171$$

$$t_{\text{tab}} (10-1, 0.95) = 1.8331$$

Criterio de aceptación: El sistema se considera con una ordenada al origen
 igual a cero si se cumple que $t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}}$

Conclusión: $0.4171 < 1.8331$, por lo tanto H_0 se acepta

Intervalo de Confianza: $(-5072.57 < 1146.71 < 7365.99)$

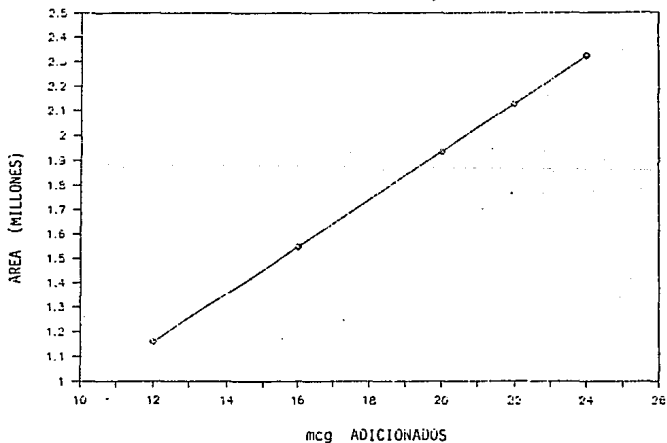


Figura 9. Gráfica de linealidad del sistema, correspondiente a Tinidazol

I. Linealidad del Método
para Niclosamida

mcg
Adicionados

21.30
 21.30
 21.30
 27.60
 27.60
 27.60
 33.50
 33.50
 33.50
 36.30
 36.30
 36.30
 39.30
 39.30
 39.30

mcg
Recuperados

21.29
 21.28
 21.25
 27.56
 27.63
 27.62
 33.62
 33.43
 33.48
 36.51
 36.33
 36.16
 39.10
 39.29
 39.47

$$\sum x = 474$$

$$\sum y = 474.02$$

$$\sum xy = 15\ 601.27$$

$$\sum x^2 = 15\ 599.64$$

$$\sum y^2 = 15\ 603.04$$

$$S_x = 6.66$$

$$m = 1.002$$

$$b = -0.0497$$

$$\text{Ecuación de la recta corregida: } y = 1.002x - 0.0497$$

$$r = 0.9999$$

$$r^2 = 0.9997$$

$$S_{y/x} = 0.6258$$

$$\hat{S}_{y/x} = 0.6722$$

$$f = 1.49$$

Inferencia para b

$$H_0 = b_0 = 0$$

$$H_a = b \neq 0$$

$$t_{cal} = -0.0571$$

$$t_{tab} (15-1, 0.95) = 1.7613$$

$|-0.0571| < 1.7613$, por lo tanto el método presenta una ordenada al origen
igual a cero.

$$\text{Intervalo de confianza: } (-1.9151 < -0.0497 < 1.8157)$$

Inferencia para m

$$H_0 = m = 1$$

$$H_a = m \neq 1$$

$$t_{cal} = 0.07414$$

$$t_{tab} (15-1, 0.95) = 1.7613$$

$0.07414 < 1.7613$, por lo tanto el método presenta una pendiente igual a 1.

$$\text{Intervalo de Confianza: } (0.9442 < 1.002 < 1.0598)$$

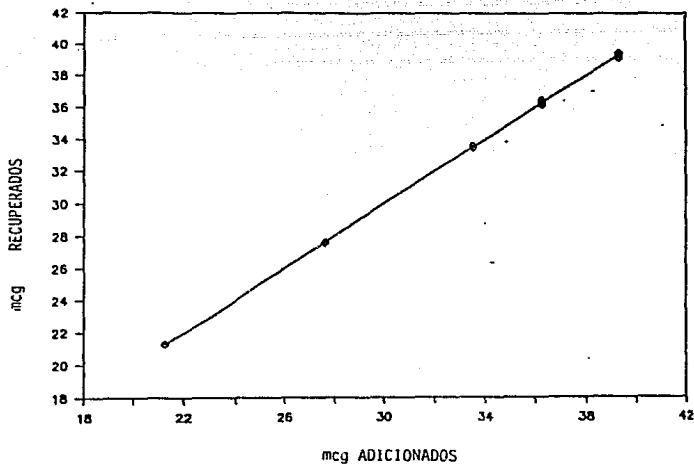


Figura 10. Gráfica de linealidad del método analítico para niclosamida

J. Linearidad del Método

para Mebendazol

mcg
Adicionados

2.750
2.750
2.750
3.400
3.400
3.400
4.130
4.130
4.130
4.450
4.450
4.450
4.850
4.850

mcg
Recuperados

2.810
2.741
2.729
3.404
3.396
3.405
4.128
4.112
4.150
4.436
4.437
4.458
4.836
4.808
4.867

$$\sum x = 58.74$$

$$\sum y = 58.717$$

$$\sum xy = 238.3388$$

$$\sum x^2 = 238.5132$$

$$\sum y^2 = 238.1723$$

$$S_x = 0.7785$$

$$m = 0.9901$$

$$b = 0.03728$$

$$\text{Ecuación de la recta corregida: } y = 0.9901x + 0.03728$$

$$r = 0.9996$$

$$r^2 = 0.9992$$

$$S_{y/x} = 0.0165$$

$$\hat{S}_{y/x} = 0.01772$$

$$f = 55.87$$

Inferencia para b

$$H_0 : b_0 = 0$$

$$H_a: b \neq 0$$

$$t_{cal} = 0.3968$$

$$t_{tab} (15-1, 0.95) = 1.7613$$

$0.3968 < 1.7613$, por lo tanto el método presenta una ordenada al origen
igual a cero.

Intervalo de confianza: $(-0.0147 < 0.03728 < 0.08931)$

Inferencia para m

$$H_0: m = 1$$

$$H_a: m \neq 1$$

$$t_{cal} = -1.6274$$

$$t_{tab} (15-1, 0.95) = 1.7613$$

$|-1.6274| < 1.7613$, por lo tanto el método presenta una pendiente igual a 1.

Intervalo de confianza: $(0.9770 < 0.9901 < 1.0031)$

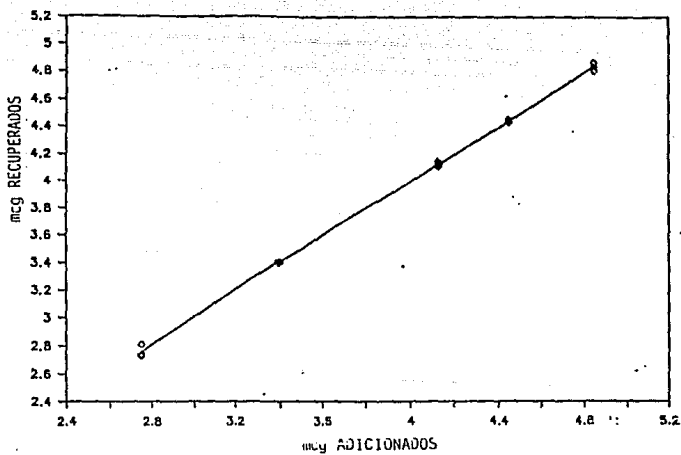


Figura 11. Gráfica de linealidad del método analítico para mebendazol

K. Linearidad del Método
para Tinidazol

mcg
Adicionados

mcg
Recuperados

12.300
 12.300
 12.300
 16.150
 16.150
 16.150
 22.980
 22.980
 22.980
 21.800
 21.800
 21.800
 23.650
 23.650
 23.650

12.509
 12.294
 12.296
 16.162
 16.152
 16.147
 22.953
 22.992
 23.036
 21.689
 21.795
 21.815
 23.522
 23.760
 23.676

$$x = 290.64$$

$$y = 290.798$$

$$xy = 5925.82$$

$$x^2 = 5924.25$$

$$y^2 = 5927.44$$

$$S_x = 4.57$$

$$m = 0.9949$$

$$b = 0.1102$$

$$\text{Ecuación de la recta corregida: } y = 0.9949x + 0.1102$$

$$r = 0.9999$$

$$r^2 = 0.9998$$

$$S_{y/x} = 0.1167$$

$$\hat{S}_{y/x} = 0.1253$$

$$f = 7.94$$

Inferencia para b

$$H_0 = b_0 = 0$$

$$H_a: b \neq 0$$

$$t_{cal} = 0.7573$$

$$t_{tab}(15-1, 0.95) = 1.7613$$

$0.7573 < 1.7613$, por lo tanto el método presenta una ordenada al origen igual a cero.

Intervalo de confianza: $(-0.2019 < 0.1102 < 0.4223)$

Inferencia para m

$$H_0: m = 1$$

$$H_a: m \neq 1$$

$$t_{cal} = -0.696$$

$$t_{tab}(15-1, 0.95) = 1.7613$$

$|-0.696| < 1.7613$, por lo tanto el método presenta una pendiente igual a 1.

Intervalo de confianza: $(0.9792 < 0.9949 < 1.0106)$

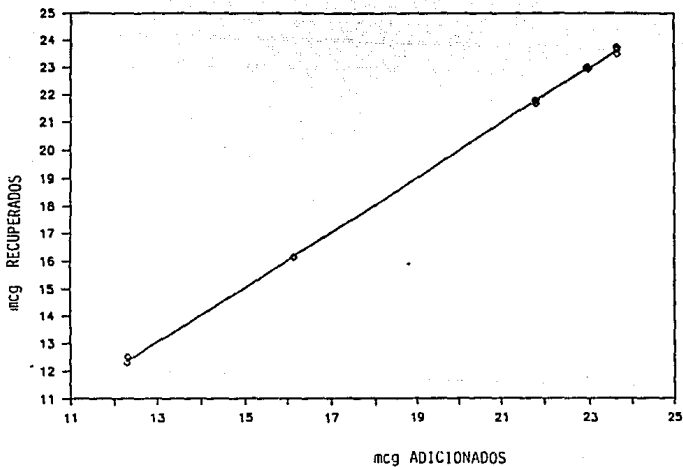


Figura 12. Gráfica de linealidad del método analítico para tinidazol

L. Reproducibilidad de Niclosamida

		ANALISTA	
		1	2
D	1	97.71	97.15
		97.5	96.98
		97.8	98.07
I	2	97.87	96.89
		97.53	98.32
		96.12	97.09

Media = 97.42 %
 Desviación estándar = 0.60
 Coeficiente de variación = 0.62 %

ANALISIS DE LA VARIANZA

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F CALC.	F (0.95) TABLAS
DIA	0.161008	1	0.161008	0.764249	161.45
ANALISTA	0.000075	1	0.000075	0.000355	161.45
INTERACCION	0.210675	1	0.210675	0.460928	5.32
ERROR	3.656533	8	0.457066		
TOTAL	4.028291	11			

CRITERIO:

F calculada < F (0.95) de tablas de distribución.

CONCLUSIONES:

El metodo analitico es reproducible.

M. Reproducibilidad de Mebendazol

		ANALISTA	
		1	2
D	1	99.55	100
		99.96	99.4
		100.48	99.21
I	2	100	99.08
		99.03	100.2
		98.99	99.39

Media	=	97.42 %
Desviación estándar	=	0.60
Coefficiente de variación	=	0.62 %

ANALISIS DE LA VARIANZA

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F CALC.	F (0.95) TABLAS
DIA	0.448533	1	0.448533	0.904058	161.45
ANALISTA	0.1083	1	0.1083	0.218288	161.45
INTERACCION	0.496133	1	0.496133	2.153122	5.32
ERROR	1.8434	8	0.230425		
TOTAL	2.896366	11			

CRITERIO:

F calculada < F (0.95) de tablas de distribución.

CONCLUSIONES:

El metodo analitico es reproducible.

N. Reproducibilidad de Tinidazol

		ANALISTA	
		1	2
D	1	99.9	99.96
		100.4	99.92
		99.81	100.2
A	2	100.1	100.14
		100.08	100.35
		99.88	99.51

Media	=	97.42 %
Desviación estándar	=	0.60
Coefficiente de variación	=	0.62 %

ANALISIS DE LA VARIANZA

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F CALC.	F (0.95) TABLAS
DIA	0.001875	1	0.001875	9.000000	161.45
ANALISTA	0.000408	1	0.000408	1.960000	161.45
INTERACCION	0.000208	1	0.000208	0.002535	5.32
ERROR	0.657333	8	0.082166		
TOTAL	0.659825	11			

CRITERIO:

F calculada < F (0.95) de tablas de distribución.

CONCLUSIONES:

El método analítico es reproducible.

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

Se desarrollaron dos métodos cromatográficos, uno para la determinación cuantitativa de Niclosamida por CLAR (columna: ODS, Fase móvil: metanol-acetonitrilo-agua 60: 30: 10) y otro para mebendazol y tinidazol por CLAR (columna: ODS, fase móvil: KH_2PO_4 0.025 M, pH=6 - acetonitrilo- metanol 65: 30: 5). Los tres principios activos se encuentran formulados en una tableta, en las concentraciones siguientes:

Mebendazol	60 miligramos
Niclosamida	200 miligramos
Tinidazol	300 miligramos

Cada método analítico se validó estadísticamente con el fin de conocer su confiabilidad, evaluando para ello su especificidad para control de calidad, la exactitud y repetibilidad del método; linealidad del sistema; linealidad del método y reproducibilidad.

La especificidad para control de calidad -figura 5 y 6- reveló que ambos métodos analíticos son capaces de dar respuesta únicamente por la sustancia de interés.

Para la exactitud y repetibilidad del método, se obtuvieron los siguientes resultados:

	Coefficiente de variación	t_{cal}	t_{tab}
Niclosamida	1.59	0.5695	1.7396
Mebendazol	1.08	0.9312	1.7171
Tinidazol	0.52	1.0160	1.7171

El criterio aplicado fué que el coeficiente de variación presentara un valor menor del 2% y que t_{cal} fuese menor que t_{tab} .

Se llegó a la conclusión de que en todos los casos, la regla se cumplía y por lo tanto los métodos eran exactos y precisos.

La linealidad del sistema y del método se evaluaron con los siguientes estadísticos: pendiente (m), ordenada al origen (b), coeficiente de correlación (r), coeficiente de determinación (r^2), anexando las inferencias para m y b, con sus respectivos intervalos de confianza.

Para el sistema:

	m	b	r	r^2
Niclosamida	139462.41	-512.34	0.999	0.99
Mebendazol	162752.91	85.56	0.999	0.99
Tinidazol	96653.888	1146.71	0.999	0.99

El criterio utilizado fué una ordenada al origen con un valor cercano a cero y su respectiva inferencia; la pendiente no se evaluó porque se trabajó con respuesta medida (AREAS); un coeficiente de correlación mayor de 0.99 y un coeficiente de determinación mayor de 0.98.

Analizando los resultados obtenidos, se concluye que el modelo lineal es correcto para el sistema.

Para el método:

	m	b	r	r^2
Niclosamida	1.002	-0.0497	0.9999	0.9997
Mebendazol	0.9901	0.0372	0.9996	0.9992
Tinidazol	0.9949	0.1102	0.9999	0.9998

Estos resultados, aunados a las inferencias para la ordenada al origen y la pendiente, dan la certeza de concluir que el modelo lineal es correcto para el método.

Para la evaluación de reproducibilidad, se manejaron dos fuentes de variación: día y analista. Los resultados fueron los siguientes:

Se obtuvo tanto para niclosamida, mebendazol y tinidazol, una media de 97.42, una desviación estándar de 0.60 y un coeficiente de variación del 0.62%.

En el análisis de varianza se obtuvieron los siguientes resultados:

	F_{cal} día	F_{cal} analista	F_{tab} (0.95) día y analista
Niclosamida	0.764249	0.000355	161.45
Mebendazol	0.904058	0.218288	161.45
Tinidazol	9.000000	1.960000	161.45

	F_{cal} interacción	F_{tab} (0.95) interacción
Niclosamida	0.460928	5.32
Mebendazol	2.153122	5.32
Tinidazol	0.002535	5.32

El criterio utilizado fué que $F_{cal} < F_{tab}$ (0.95) en tablas de distribución. analizando los resultados anteriores, se puede concluir que para los tres principios activos, el método analítico es reproducible.

Cabe mencionar que idealmente se pretendía cuantificar con un sólo método analítico los tres principios activos, sin embargo, no fué posible dada la fuerte afinidad de la Niclosamida por la fase estacionaria. Se buscó entonces una fase móvil tal, que incrementara la polaridad de la Niclosamida, permitiendo obtenerla a un tiempo de retención adecuado y sin coleos en el pico cromatográfico.

IX. CONCLUSIONES

Los objetivos planteados al inicio del trabajo, se cumplieron satisfactoriamente. La hipótesis planteada se confirmó como verdadera y se concluye de manera general -dado el análisis de resultados llevado a cabo- que el método analítico desarrollado y validado, se puede utilizar como método de rutina para control de calidad.

X. RECOMENDACIONES

En ambos métodos analíticos desarrollados, si se requiriera almacenar las muestras para su posterior análisis, se recomienda realizar experimentalmente la estabilidad de la muestra, mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de tres muestras, con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones de almacenaje.

XI. FORMULARIO

CALCULO DE LA EXACTITUD

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

$$H_a: \mu \neq 100\%$$

$$t_{\text{cal}} = \frac{\bar{x} - \mu}{s / \sqrt{n}}$$

$$t_{\text{tab}} \quad (\text{g.l.} = n-1, \alpha = 0.05)$$

$$\text{Criterio de aceptación: } t_{\text{cal}} \leq t_{\text{tab}}$$

$$\text{Límites de confianza: } \bar{x} \pm t_{1-\alpha/2} \cdot s/\sqrt{n}$$

CALCULO DE LA LINEARIDAD

$$\text{Pendiente: } m = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n(\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

$$\text{Ordenada al origen: } b = \frac{\sum y - m \sum x}{n}$$

$$\text{Ecuación de la recta corregida: } y = mx + b$$

Inferencia para m

$$H_0: m = 1$$

$$H_a: m \neq 1$$

$$t_{\text{cal}} = \frac{(m - m_0) \cdot S_s \cdot \sqrt{n-1}}{\hat{S}_{y/x}}$$

$$t_{\text{tab}} \quad (\text{g.l.} = n-1, \alpha = 0.05)$$

Criterio de aceptación; $t_{cal} \leq t_{tab}$

Límites de confianza; $m \pm t_{1-\alpha/2} \cdot \frac{\hat{S}_{y/x}}{S_x \sqrt{n-1}}$

Inferencia para b

$$H_0 = b_0 = 0$$

$$H_a = b \neq 0$$

$$t_{cal} = \frac{b - b_0}{\hat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}}}$$

Intervalo de confianza; $b \pm t_{1-\alpha/2} \cdot \hat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}}$

Cálculo de la Sensitividad; $f = \frac{m}{\hat{S}_{y/x}}$

Error típico de Estimación: $S_{y/x} = \sqrt{\frac{(\sum y^2) - b \sum y - m (\sum xy)}{n}}$

Error típico de estimación modificado: $\sqrt{\frac{n-1}{n-2}} \cdot S_{y/x} = \hat{S}_{y/x}$

CALCULO DE LA REPRODUCIBILIDAD

Dos analistas y dos días diferentes, utilizando determinaciones independientes.

TABLA DE ANADEVIA

	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F calculada	F tablas
g.i.	$\frac{\sum y_i^2}{jk}$			
Analista i-1	$\frac{\sum y_{i.}^2}{k}$	SC An/(i-1)	MC An/ MC Dfa	F g.i.An/g.i. dfa
Dfa (i,j-1)	$\frac{\sum \sum y_{ij.}^2}{lk}$	SC dfa/(ij-1)	MC dfa/MC error	F g.i. dfa/g.i. error
Error (k-1)ji	$\frac{\sum \sum \sum y_{ijk} - \sum y_{ij.}}{k}$	SC Error/(k-1)ji		

Criterio de aceptación:

Si $F_{cal}(\text{analista}) < F_{tab}$ El método analítico es reproducible por los analistas

Si $F_{cal}(\text{dfa}) < F_{tab}$ El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista

XII. BIBLIOGRAFIA

1. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, ediciones PLM S.A., 37a. edición, 1991, p. 641
2. Rosales Robles R., "Métodos Analíticos para la separación y valoración de tinidazol, niclosamida y mebendazol en un polifármaco", UNAM F.Q., México D.F. 1988.
3. Rodríguez Carranza R., " Vademécum Académico de Medicamentos", edit. UNAM México D.F., 1984, p.514 y 605
4. Florey K., "Analytical Profiles of Drugs Substances", Academic Press Inc., 16, (1987), pp. 293-326
5. E.C.G. Clarke, " Isolation and Identification of Drugs", The Pharmaceutical Press, 2, (1975), p. 1056
6. M. Katz, Drugs, 13, (1977), p. 124
7. H. Most, New Eng. J. Med., 287 (1972). p. 495
8. K.B. Alton, J.E. Patrick, " High-Performance Liquid Chromatographic Assay for the Antiprotozoal Agent, Tinidazole, in Human Plasma", J. Pharm. Sci., 68, 5 (1979) pp. 599-601
9. K. Lanbeck, B. Lindström, " Determination of metronidazole and tinidazole in plasma and feces by high-performance liquid chromatography", J. Chromatography., 162 (1979) pp. 117-121
10. L.P. Hackett. , L.J. Disci, " Determination of metronidazole and tinidazole in human plasma using high performance liquid chromatography", J. Chromatogr., 175 (1979) pp. 347-349
11. J. Nachbaur, H. Joly, " Rapid assay of tinidazole in plasma by high-performance liquid chromatography", J. Chromatogr., 145 (1978) pp. 325-327

12. A.R. Zoest, et. al., " Application of central composite desing to the optimization of HPLC analysis of Nitroimidazoles", J.L. Chromatogr., 11, 11(1988) pp. 2241-2253
13. H. Laufen, F. Scharpf, G. Bartsch, "Sensitive gas chromatographic assay of tinidazole in tissue and plasma ", J. Chromatogr., 163 (1979) pp. 217-220
14. R.J. Allan, H.J. Goodman, T.R. Watson, "Two high-performance liquid chromatographic determinations for mebendazole and its metabolites in human plasma using a rapid sep pak C18 extraction", J. Chromatogr., 183 (1980) pp. 311-319
15. K.B. Alton, J.E. Patrick, J.L. McGuire, "High-Performance liquid chromatographic assay for the anthelmintic agent mebendazole in human plasma", J. Pharm. Sci., 68, 7 (1979) pp. 880-882
16. F.C. Churchill, D.N. Ku, "Extractive alkylation of 5,2^c dichloro-4^c nitrosalicylanilide (NICLOSAMIDE) for gas-liquid chromatographic analysis", J. Chromatogr., 189 (1980) pp. 375-388
17. T. Daldrup, P. Michalke, "A screening test for pharmaceuticals, drugs and insecticides with reversed phase liquid chromatography- retention data of 560 compounds", Chromatography Newsletter, 10 1(1982) pp. 1-7
18. D.C.G. Muir, N.P. Grift, "Determination of Niclosamide (Bayer 2353) in water and sediment samples", Intern. J. Environ Anal. Chem., 8 (1980) pp. 1-14
19. R.W. Yost, et al, "Introducción a la cromatografía líquida práctica", Perkin Elmer, 1980
20. Introducción a la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, Curso Teórico Práctico, ENEP Zaragoza UNAM, 1989

21. Bello G., "La Cromatografía Líquida de Alta Resolución", Pharma News, 1, 5 (1990) pp. 28-32
22. Calibración y Verificación del Funcionamiento de Equipos Varios de Laboratorio, Tópicos de Instrumentación IAI, p. 1-9
23. J. Algaba, J. Ruiz, P. Tarín; "Comprobación de un sistema isocrático de cromatografía líquida", Spectrum, 1 (1991) pp.4-7
24. Sánchez G.S., "Patrones de inyección en cromatografía de líquidos", Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 22, 4(1991) pp. 40-41
25. Guía de Validación de Métodos Analíticos, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, Dirección General de Control de Insumos para la Salud S.S.A., México A.C., 1991 pp. 1-73
26. Guerra J., "Validación de Métodos Analíticos por la FDA", Pharm. Tech., 10 (1986) pp. 74-80
27. Jiménez Vargas E. "Un acercamiento a la validación de métodos analíticos" Pharma News, 1, 6 (1990) pp. 15-20