

2156



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DEL CLORHIDRATO DE
LINCOMICINA EN COLUMNAS CAPILARES POR
CROMATOGRAFIA DE GASES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

Laura Imelda Labastida Michel



MEXICO, D. F.

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

	pág.
INTRODUCCION	1
I. ANTECEDENTES	2
II. FUNDAMENTOS DE LA TECNICA DESARROLLADA	8
II.1 Generalidades sobre Cromatografía de Gases	8
A) Definición	8
B) Teoría	8
II.2 Instrumentación	11
A) Gas Acarreador	12
B) Control y Medición del Flujo	14
C) Introducción de la Muestra	15
c) Técnicas de Inyección	16
c. 1) "Split"	18
D) Columnas	17
d) Tipos de Columnas	17
d. 1) Columnas Empacadas	17
d. 2) Columnas Capilares	19
E) Horno	20
F) Detector	21
G) Integrador	22
II.3) Formación de Derivados	22
A) Reactivos de Silanización	24
B) Silanización de la Lincomicina	26
III. PLANTEAMIENTO TEORICO	29
A) Linealidad	29
B) Exactitud	32
C) Precisión	33
D) Estabilidad de la Muestra	35
E) Especificidad	35
F) Tolerancia del Método	37
G) Efecto de la Matriz	37

IV.	PARTE EXPERIMENTAL	38
IV.1	Equipo, Material y Reactivos	38
A)	Técnica Desarrollada	38
a. 1)	Equipo	38
a. 2)	Material	38
a. 3)	Reactivos	38
IV.2	Preparación de la Muestra	39
A)	Preparación de las Soluciones	39
a. 1)	Solución del Estándar Interno	39
a. 2)	Solución de Cloroformo-Imidazol	39
a. 3)	Solución de Clorhidrato de Lincomicina Estándar de Referencia	39
a. 4)	Solución a valorar	39
a. 4. 1)	Cápsulas	39
B)	Optimización de las Condiciones de la Reacción de Silanización	39
C)	Ensayos para la Certificación del Método	40
c. 1)	Linealidad del Sistema	40
c. 2)	Precisión del Sistema	40
c. 3)	Linealidad y Exactitud del Método	41
c. 4)	Precisión del Método	41
c. 4. 1)	Repetibilidad	41
c. 4. 2)	Reproducibilidad	41
c. 5)	Estabilidad de la Muestra	41
c. 6)	Especificidad del Método	42
c. 6. 1)	Placebo sólo	42
c. 6. 2)	Placebo con Clorhidrato de Lincomicina estándar	42
c. 6. 3)	Clorhidrato de Lincomicina sólo	42
c. 6. 4)	Estándar interno sólo	42
c. 6. 5)	Clorhidrato de Lincomicina estándar con estándar interno	42
IV.3	Selección de la Columna	42
IV.4	Condiciones de Operación	50

V	RESULTADOS	58
V.1	Linealidad del Sistema	58
V.2	Precisión del Sistema	59
V.3	Precisión del Método	60
A)	Repetibilidad	60
B)	Reproducibilidad	60
b. 1)	Analista 1. Día 1	60
b. 2)	Analista 2. Día 2	61
V.4	Estabilidad de la Muestra	62
V.5	Linealidad y Exactitud del Método	63
V.6	Especificidad	64
VI	ANÁLISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES	69
VI.1	Linealidad del Sistema	69
VI.2	Precisión del Sistema	71
VI.3	Linealidad del Método	72
VI.4	Exactitud del Método	75
VI.5	Precisión del Método	76
A)	Repetibilidad	76
B)	Reproducibilidad	77
VI.6	Estabilidad de la Muestra	79
VI.7	Precisión del Método (Lincomición B)	80
A)	Repetibilidad	80
VI.8	Especificidad del Método	82
VI.9	Conclusiones Generales	83
VII	BIBLIOGRAFIA	85

INTRODUCCION

El objetivo principal de este trabajo es la modificación de un método farmacopeico para determinar clorhidrato de Lincomicina. Dicha modificación consiste en la utilización de columnas capilares en lugar de columnas empacadas en la técnica de cromatografía de gases.

Para escoger la columna capilar adecuada se deben probar columnas de diferente polaridad, longitud y espesor de película. Además es necesario optimizar las condiciones de operación y de preparación de la muestra.

Como se realizan varios cambios al método original es necesario certificarlo para asegurar que el método es confiable.

A pesar de que desde 1957 Golay desarrolló la teoría de las columnas capilares, no ha sido sino hasta años recientes cuando se ha observado un creciente interés en ellas. En nuestro país, y especialmente en la Industria Farmacéutica no se ha visto el uso generalizado de este tipo de columnas debido posiblemente al costo de las mismas. Cabe mencionar que con las columnas capilares el tiempo de análisis se acorta, los picos se resuelven mejor y es posible separar mezclas complejas que de otro modo no podrían separarse. En suma, las ventajas de estas columnas son muchas frente a las columnas empacadas.

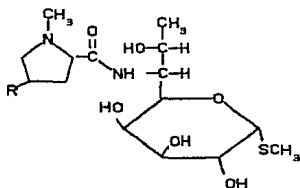
CAPITULO I . ANTECEDENTES

La Lincomicina A es un antibiótico antibacteriano que junto con la Lincomicina B es obtenida de los cultivos de *Streptomyces lincolnensis* variedad *lincolnensis* NRRL 2936. También es producida por el *Streptomyces spinosus* NRRL 3890, por el *Streptomyces pseudogriseolus chemovar linuoceticus* NRRL 3985 y el *S. variabilis linuabilis* NRRL 5618. Este último microorganismo no sintetiza la Lincomicina B. El antibiótico se purifica y se utiliza como clorhidrato. (4)

Esta constituida por dos partes de 9 átomos de carbono cada una unidas entre sí por un enlace amídico. Una de las partes es el trans-1-metil-4-propil-1-prolina conocido como ácido propilhidrico (PHAD) y la otra parte es el metil 6-amino-6,8-dideoxi-1-tio-D-eritro- α -D-galacto-octopiranosido ó metil α -tiolincoaminida (MTL).

La Lincomicina A siempre viene acompañada de un coproducto de la fermentación, llamada Lincomicina B por su gran parecido estructural. La proporción de Lincomicina B producida siempre es menor al cinco porciento. La única diferencia entre la Lincomicina A y la Lincomicina B o también denominado antibiótico U 21,899 es la presencia de un grupo etilo en lugar de un grupo propilo en la posición 4 del aminoácido. Se cree que la formación de la Lincomicina B es una aberración ya que el microorganismo la produce en mucho menor proporción que la Lincomicina A.

Las estructuras de las Lincomiínas A y B, se muestran en la figura 1.1:



R: CH₃-CH₂-CH₂- Lincomiína A.
 R: CH₃-CH₂- Lincomiína B.

Fig 1.1. ESTRUCTURAS QUIMICAS DE LA LINCOMIINA A y B.

El peso molecular de la Lincomiína A sola es de 406.53, del clorhidrato de Lincomiína monohidratado es de 481.01, su pka es de 7.6. El clorhidrato es totalmente soluble en agua entre 50°C y 150°C. Por encima de 200°C la descomposición se presenta con pérdida de metilmercaptano, ésta es una de las razones por lo cual es necesario silanizar la Lincomiína para poder analizarla por Cromatografía de Gases.

La Lincomiína A es estable a pH's mayores de 1.5 ya que en medio ácido la Lincomiína A sufre la hidrólisis del grupo

aminoglicósido y de la función amida, tal como se ilustra en la figura 1.2.(3):

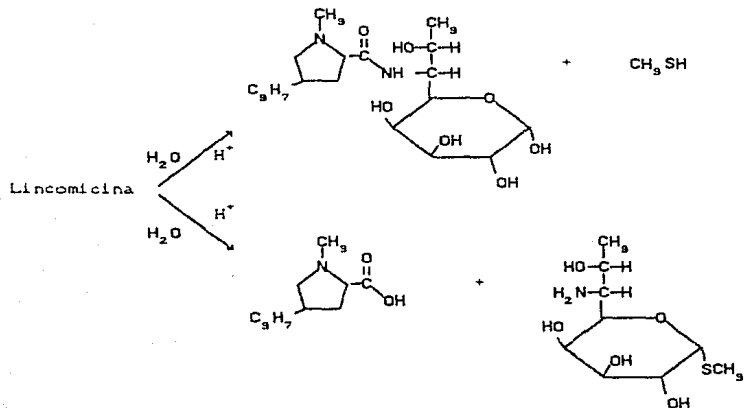


fig. 1.2. HIDROLISIS ACIDA DE LA LINCOMICINA

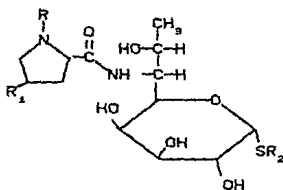
La Lincomicina cuando se encuentra como base libre es soluble en metanol, etanol, butanol, isopropanol, etilacetato, n-butilacetato, amilacetato, acetona, metiletilacetona, isopropil-n-butilcetona, cloruro de metileno, cloroformo, dicloruro de isopropilo.(4)

El clorhidrato de Lincomicina B es muy soluble en agua, soluble en metanol y etanol y relativamente insoluble en solventes orgánicos menos polares.

La Lincomicina B como base libre es soluble en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos. Su peso molecular como base libre es de 392. El pKa reportado es de 7.68.(5)

Se ha observado la producción de otros tres compuestos análogos a la Lincomicina (fig. 1.3) cuando se adicionan nutrientes específicos en el caldo de cultivo. Por ejemplo, los antibióticos U-11,973 y U-20,943 se forman al adicionar metil α-tiolincosaminida (MTL) y etil α-tiolincosaminida (ETL).

respectivamente. Estos dos compuestos son inhibidores de la metilación en el nitrógeno de la prolina (2). Al agregar DL-etionina es producido el antibiótico U-11,921, que únicamente difiere de la Lincomicina en el grupo etilo en lugar del grupo metilo que se une al átomo de azufre. (4)



U-11,973	R=H;	R ₁ =CH ₂ CH ₂ CH ₃ ;	R ₂ =CH ₃
U-20,043	R=H;	R ₁ =CH ₂ CH ₂ CH ₃ ;	R ₂ =CH ₂ CH ₃
U-11,921	R=CH ₃ ;	R ₁ =CH ₂ CH ₂ CH ₃ ;	R ₂ =CH ₂ CH ₃

Fig. 1.3. ANTIBIOTICOS ANALOGOS A LA LINCOMICINA.

La Lincomicina actúa principalmente sobre cocos grampositivos como son : estafilococos, estreptococos y neumococos. (7) Es especialmente útil contra el Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, grupo viridans, Streptococcus mitis, Bacillus anthracis, y contra algunos Bacteroides, erisipelas, infecciones estafilocócicas y actinomycetosis. Se han observado mejorías con su uso en la osteomielitis crónica y el acné vulgar. (8) Su uso se recomienda para infecciones debidas a pneumococci. El mecanismo de acción consiste en la unión a la subunidad 50S de los ribosomas bacterianos, suprimiendo así la síntesis de proteínas. Dentro de los efectos indeseables se encuentra la colitis pseudomembranosa por antibiótico que se presenta cuando cepas resistentes a la Lincomicina de C. difficile secretan una toxina. Los síntomas de esta enfermedad son diarrea, dolor abdominal, fiebre, moco y sangre en las heces. (9) Otros efectos secundarios que se han observado son hipersensibilidad y discrasias sanguíneas. (7)

La Lincomicina B tiene el mismo espectro antibacteriano que la Lincomicina A. (8)

El derivado 7-desoxi-7-cloro de la Lincomicina, es la llamada clindamicina que es más potente que la Lincomicina, pero es menos tóxica. (9)

La Lincomicina al igual que los otros antibióticos se valora microbiológica y químicamente. Anteriormente el ensayo químico consistía en el análisis por Cromatografía de Gases previa formación del silil derivado. El reactivo silanzante utilizado para la formación del derivado era una mezcla de hexametildisilazano y trimetilclorosilano en una proporción de 9:1. La piridina se empleaba como disolvente pues por su carácter básico permite la liberación de la Lincomicina, a partir del Clorhidrato de Lincomicina monohidratado. Como estándar interno se empleaba la tetrafenilciclopentadienona, la cual era agregada a la solución de Lincomicina después de la reacción de silanización. Esta técnica prácticamente ya no se emplea para el análisis de la Lincomicina debido a la alta toxicidad del disolvente empleado y a que no se obtenían los resultados cuantitativos esperados. (10)

Actualmente la Lincomicina se sigue analizando químicamente por Cromatografía de Gases, pero la reacción de derivatización es diferente. La USP XXI recomienda el uso de O-Bis(trimetil)sililacetamida (BSA) y trimetilclorosilano (TMCS) en una proporción 100:1, como el reactivo silanzante. En este caso el TMCS actúa como catalizador. El BSA actúa sobre las cuatro funciones alcoholílicas de la Lincomicina base libre. Para liberar a la Lincomicina se utiliza una solución básica de cloroformo-imidazol. Se utiliza el dotriacontano como estándar interno. La reacción se lleva a cabo a 85°C por 30 min.

La USP XXI establece el uso de una columna de vidrio de 3 mm. por 122 cm empacada con 3% de OV-17 en Chromosorb WHP 100/120, el empleo de Helio como gas acarreador a un flujo de 45 ml/min. (11)

En la técnica desarrollada se utiliza la misma reacción de silanización recomendada por la USP XXI, aunque el procedimiento experimental es distinto. Además se emplea una columna capilar de sílica fundida de RSL-150 de 0.2 mm de diámetro interno y 12 m. de

longitud. Por ser una columna capilar el gas acarreador es hidrógeno y el flujo es de 3 ml/min.

CAPITULO II. FUNDAMENTOS DE LA TECNICA DESARROLLADA

II.1 Generalidades sobre Cromatografía de Gases

A) Definición

La técnica de Cromatografía de Gases fue desarrollada por James Martin en 1952 y desde entonces ha sido utilizada como herramienta en la Química Analítica.

La Cromatografía de Gases es una técnica de separación que se basa en la distribución de los componentes de la muestra entre una fase estacionaria y una fase móvil por adsorción, partición o por ambos mecanismos. En la Cromatografía de Gases la fase estacionaria puede ser un sólido adsorbente (Cromatografía Gas-Sólido) o bien una fase líquida impregnada sobre un soporte sólido (Cromatografía Gas-Líquido) y la fase móvil es un gas que se denomina gas portador o gas acarreador. En el caso de la cromatografía Gas-Sólido la separación se realiza por adsorción diferencial, mientras que en el caso de la Cromatografía Gas-Líquido la separación se logra por una combinación de adsorción y partición. A nivel molecular las principales interacciones que se llevan a cabo son: dispersión, orientación, inducción, complejación donador-aceptor (incluyendo enlaces de hidrógeno).⁽¹⁾

Dentro de las ventajas de la Cromatografía de Gases se encuentra su alto poder de resolución, su sensibilidad, su rapidez y su utilidad en la obtención de resultados cuantitativos.⁽²⁾

Sin embargo, la Cromatografía de Gases presenta como limitantes que la muestra o su derivado sean volátiles y además térmicamente estables a la temperatura de operación. Estas limitantes restringen su uso para compuestos orgánicos volátiles de pesos moleculares menores de 1,000 y a temperaturas de operación menores de 400°C.⁽³⁾

B) Teoría

Toda la información que se puede obtener de cualquier proceso cromatográfico queda registrada gráficamente en un cromatograma. Para poder utilizar dicha información se han desarrollado relaciones matemáticas que definen a los parámetros cromatográficos.

Dentro de los parámetros más importantes y que van a ser utilizados en el presente trabajo, se encuentran: el tiempo de retención (t_r), el tiempo de retención ajustado (t_r'), el tiempo muerto (t_m), área del pico (A), ancho de la base (W_b), número de platos teóricos (n), altura equivalente a un plato teórico (AEPT), coeficiente de reparto (K), factor de capacidad (k'), retención relativa o selectividad (α), razón de fases (β), resolución (R), velocidad lineal promedio del gas (\bar{v}).

El Tiempo de Retención (t_r) es el tiempo transcurrido desde la introducción de la muestra hasta que el detector registre el máximo del pico. Es característico para un soluto dado siempre y cuando se conserven las mismas condiciones de operación.

El Tiempo Muerto (t_m) es el tiempo en que cualquier componente permanece en la fase móvil (gas acarreador). Para medirlo se utiliza una sustancia inerte (aire, metano, etc.) que no interaccione con la fase estacionaria y que únicamente sea arrastrada por la fase móvil.

El Tiempo de Retención Ajustado (t_r') es el tiempo que permanece el soluto en la fase estacionaria.

Los tres parámetros anteriores se encuentran relacionados por la siguiente ecuación:

$$t_r = t_r' + t_m$$

La eficiencia de la columna se mide con el Número de Platos Teóricos (n), o bien con la Altura Equivalente a un Plato Teórico (AEPT). Un Plato Teórico se define como un equilibrio del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria y se calcula mediante cualquiera de las siguientes ecuaciones:

$$N = 18 \left[\frac{t_r'}{W_b} \right]^2 = 5.54 \left[\frac{t_r'}{W_{1/2}} \right]^2$$

Donde $W_{1/2}$, es el ancho a la mitad de la altura del pico.

La Altura Equivalente a un Plato Teórico es la longitud de la columna requerida para un Plato Teórico. La longitud generalmente se expresa en mm.

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

Se observa fácilmente que a mayor número de Platos Teóricos, menor AEPT y por tanto más eficiente es la columna.

El Coeficiente de Reparto (K) es una constante termodinámica característica para cada soluto a una temperatura dada, y relaciona la concentración del soluto en la fase gaseosa.

A una K grande mayor será la solubilidad de la muestra en la fase líquida y por tanto, permanecerá más tiempo en ella.

$$K = \frac{\text{Conc. del soluto fase líquida}}{\text{Conc. del soluto fase gaseosa}}$$

El Factor de Capacidad (k') relaciona la cantidad (en g.) del soluto en las dos fases :

$$k' = \frac{\text{g. del soluto fase líquida}}{\text{g. del soluto fase gaseosa}}$$

Es posible relacionarlo con el Coeficiente de Reparto, mediante la ecuación :

$$K = k' \beta$$

Donde β es la Razón de Fases :

$$\beta = \frac{\text{Volumen del gas}}{\text{Volumen del líquido}}$$

La Retención Relativa o Factor de Separación (α) está dada por :

$$\alpha = \frac{t_{r'(B)}}{t_{r'(A)}} = \frac{K_B}{K_A} = \frac{k'_B}{k'_A}$$

Donde $t_{r'(B)} > t_{r'(A)}$

Es la relación de los tiempos en que dos componentes de la muestra permanecen en la fase líquida.

Por definición tiene valores iguales o mayores de la unidad y es una medida de la selectividad del sistema cromatográfico, independiente del tipo y de las dimensiones de la columna. Es constante para una temperatura dada. (18)

La resolución es el grado de separación de dos picos. Se

calcula, mediante la ecuación :

$$R_s = \frac{\Delta t}{\frac{1}{2} (W_1 + W_2)}$$

Donde Δt es la diferencia entre el t_{r_2} y el t_{r_1} , y W_i es el ancho en la base del pico.

La resolución también se puede relacionar con los siguientes parámetros cromatográficos :

$$R_s = \frac{\sqrt{n}}{4} \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \left[\frac{k_2}{1 + k_2} \right]$$

De la misma se deduce que se requiere un valor de α grande para que se lleve a cabo una buena separación, y valores de k_2 dentro del rango de 3 a 10.

La velocidad lineal promedio del gas (\bar{v}) es la relación de la longitud de la columna, generalmente en cm y el tiempo muerto:

$$\bar{v} = \frac{L}{t_m} \quad (13)$$

II.2 Instrumentación

En general, un cromatógrafo de gases (fig 2.1) está constituido por : A) un cilindro de gas acarreador, B) un medidor del flujo del gas, C) la entrada de la muestra, D) la columna, E) el horno F) un detector y G) un registrador y/o un integrador.

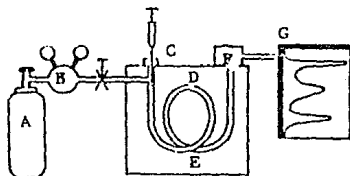


Fig 2.1. ESQUEMA CON LOS PRINCIPALES COMPONENTES DE UN CROMATOGRÁFO

No obstante, que los principales componentes de un cromatógrafo son los mismos cuando se trabaja con columnas capilares, es necesario realizar algunas modificaciones. Estas modificaciones obedecen al hecho de que la cantidad de muestra introducida en las columnas capilares es muy pequeña, a que el flujo del gas acarreador es muy bajo y a que la respuesta del detector debe ser más rápida.

Es posible modificar un cromatógrafo de gases para columnas empacadas en uno para columnas capilares siempre y cuando haya la seguridad de que no existan gradientes de temperatura en el horno que puedan afectar grandemente la eficiencia de la columna capilar y de que la respuesta del detector sea constante y rápida.

Los cambios que se realizan se llevan a cabo principalmente en la parte neumática del cromatógrafo de gases. Estos cambios son: un regulador eficaz de presión del gas acarreador para que ésta siempre se mantenga estable, un sistema de división de muestra, una entrada de gas auxiliar para el detector, y un nuevo inyector que pueda ser usado para cualquiera de las técnicas de inyección elegida (split, splitless e inyección on column). También es necesario realizar cambios menores en la tubería, en los accesorios, etc. para poder acomodar los nuevos aditamentos. (13)

A) Gas acarreador

El gas acarreador se emplea para transportar a la muestra a través de la columna, efectuando la separación.

El gas acarreador debe ser inerte, es decir, no debe reaccionar con la muestra, ni con la fase estacionaria. Además debe tomarse en cuenta para la elección: su costo, su eficiencia, su disponibilidad, su pureza, su seguridad y la compatibilidad con el detector. Considerando lo anterior, los principales gases empleados en cromatografía de gases son: el nitrógeno, el hidrógeno, el helio y raramente el argón.

El gas acarreador puede influir sobre la resolución, también afecta el tiempo del análisis, ya que los gases más ligeros como el hidrógeno y el helio presentan velocidades lineales óptimas mayores que los gases más pesados como el nitrógeno. (14)

Las gráficas de Van Deemter son de gran utilidad para la elección del gas acarreador, ya que relacionan la eficiencia de la columna (AEPT) con la velocidad lineal media del gas, de acuerdo a la siguiente ecuación :

$$AEPT = A + B/\bar{\mu} + C\bar{\mu}$$

Donde los términos involucrados representan:

A: la difusión parásita o efecto de camino múltiple.

B: la difusión molecular.

C: la resistencia a la transferencia de masa.

$\bar{\mu}$: la velocidad lineal media del gas.

Para el caso de las columnas capilares, la ecuación de Van Deemter se conoce como ecuación de Golay, en la que el primer término (A) es igual a cero.

La importancia de estas gráficas radica en que brindan información sobre el flujo óptimo del gas acarreador al cual se obtiene la máxima eficiencia de la columna. Las curvas de Van Deemter de los principales gases acarreadores se muestra en la figura 2.2:

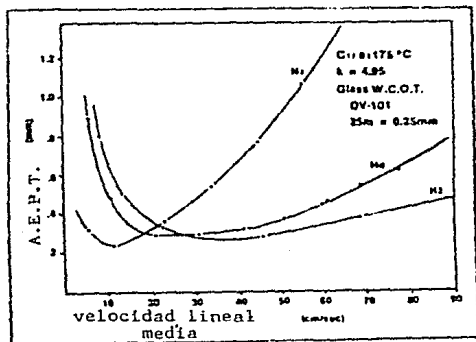


fig 2. 2. CURVAS DE VAN DEEMTER PARA HIDROGENO, HELIO Y NITROGENO.

De las gráficas se observa que el nitrógeno presenta una altura equivalente al plato teórico menor, es decir una mayor eficiencia a velocidades de flujo bajas, prolongándose así los tiempos de análisis. En cambio, tanto el hidrógeno como el helio presentan una mayor eficiencia a velocidades de flujo mayores. Además las pendientes de las curvas después del mínimo del hidrógeno y del helio son menos pronunciadas en comparación con el nitrógeno, permitiéndose una pequeña pérdida de la eficiencia, pero logrando una reducción notable en el tiempo de análisis.

La pureza del gas acarreador es importante porque impurezas como agua, oxígeno o hidrocarburos provocan la aparición de "picos fantasmas" en el cromatograma o pueden llegar a interaccionar con la fase líquida de la columna. Por ello se recomienda la utilización de gases de alta pureza y de filtros con tamices moleculares. (12)

Para columnas capilares hay una gran preferencia por el hidrógeno. La única desventaja del hidrógeno es el peligro de una posible explosión en caso de una fuga dentro del horno del cromatógrafo. (13)

BD Control y Medición del Flujo

El gas acarreador está contenido en un cilindro presurizado y la presión se controla mediante un regulador de dos etapas. (12)

En el caso de cromatógrafos sencillos que únicamente trabajan a temperatura constante, el flujo se controla con válvulas de aguja, las cuales permiten un flujo constante del gas acarreador en la columna y el detector, siempre y cuando haya una caída de presión adecuada en la columna.

Sin embargo, para el caso de aparatos más complejos que tengan la posibilidad de programar la temperatura es necesario un controlador diferencial del flujo, ya que a medida que aumenta la temperatura, aumenta la viscosidad del gas y disminuye el flujo, a pesar de que se mantenga la presión constante.

La forma más usual de medir el gasto del gas acarreador es mediante un caudalímetro de película de jabón. Con este dispositivo se mide el tiempo que tarda en desplazarse la película

de jabón en un volumen dado. (12)

C) Introducción de la Muestra

En general, la muestra se introduce mediante una jeringa que atraviesa un sello (septum) de silicona contenido en un bloque metálico caliente, el cual es barrido constantemente por el gas acarreador que transporta la muestra por la columna. Es necesario precalentar el gas acarreador para evitar la condensación de la muestra.

Generalmente la temperatura del inyector debe estar por encima de la temperatura de la columna para evitar que la muestra se condense al llegar a la columna.

Frecuentemente las temperaturas de operación son altas y puede haber sangrado del septum. Para evitar este problema se utilizan septa de bajo sangrado, o bien un sistema de purga. Este último se emplea especialmente en inyectores usados para columnas capilares. (13)

Es conveniente inyectar poca cantidad de la muestra para mejorar la forma del pico y la resolución. (12)

Las muestras se introducen en el inyector con la ayuda de jeringas. Las muestras gaseosas se introducen con jeringas herméticas o mediante válvulas rotativas. Las muestras sólidas generalmente se disuelven antes de inyectarlas.

En el momento de realizar la introducción de la muestra con una jeringa se presenta el fenómeno de "discriminación" que consiste en que los componentes más volátiles de la muestra y el disolvente se evaporan más rápidamente y al llegar a la columna la composición de la muestra no es la misma que la muestra original. Este problema no ocurre en el caso de las columnas empacadas, ya que el total de la muestra se introduce en la columna. Además debido al gradiente térmico que existe en la aguja de la jeringa pueden presentarse degradación térmica y adsorción, sobretodo en los componentes más lábiles de la muestra. Debido a lo anterior y a que el flujo en la columna capilar es bajo y hay poca cantidad de fase estacionaria es vital utilizar técnicas de inyección mejores que para columnas empacadas.

c) Técnicas de Inyección

Las técnicas de inyección empleadas para columnas capilares son "split", "splitless", e inyección "on column".

c.1) "Split" (Fig 2.4)

Es la técnica más utilizada. En él, la muestra se vaporiza en el inyector y se divide en dos partes, una que va a la columna y otra que se escapa a la atmósfera. La proporción entre la corriente que va a la columna y la que se elimina puede ser desde 1:10 hasta 1:10,000, siendo el rango más utilizado entre 1:20 y 1:200. Sin embargo, la relación del split que se establece antes de inyectar la muestra, no es la relación que realmente se lleva a cabo dentro del inyector, ya que esta relación depende de la temperatura y volumen del inyector, del volumen inyectado de la muestra, del disolvente, de la diferencia entre los puntos de ebullición de los componentes de la muestra y de la técnica de inyección. La temperatura afecta la relación de división debido a que la columna tiene una temperatura de operación menor que el inyector favoreciéndose la condensación de la muestra a la entrada de la columna, lo que provoca una zona de presión reducida que succiona el vapor de la muestra.

Para obtener resultados reproducibles en un análisis cuantitativo con inyector "split", se debe inyectar el mismo volumen, rápidamente, usando el mismo disolvente para todas las muestras. (13)

Dentro de las ventajas del inyector "split" se encuentran : 1) es fácil de usar, 2) se obtienen picos delgados, 3) no hay "efecto del disolvente", 4) se pueden usar precolumnas empacadas con tierra de diatomeas y lana de vidrio para mejorar la eficiencia de la evaporación de todos los componentes de la muestra, evitando así la discriminación.

Las principales desventajas de esta técnica son : la razón de división que se establece antes de empezar el análisis no es realmente la que se lleva a cabo, la degradación térmica de la muestra debido a las superficies metálicas calientes, lo cual se puede minimizar con el uso de insertos de vidrio y la discriminación de la muestra debido al gradiente de temperatura

existente en la aguja de la jeringa. (14)

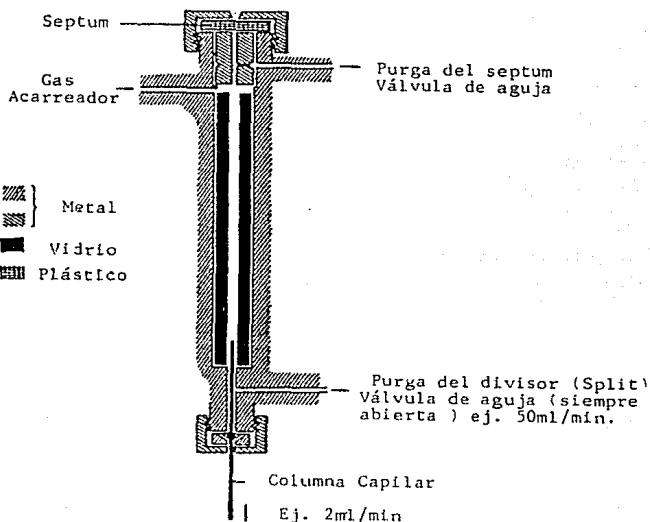


fig 2.3. INYECTOR SPLIT/SPLITLESS.

D) Columnas

En la columna es donde se realiza la separación de los componentes de la muestra.

d) Tipos de Columnas

Hay dos tipos de columnas: las columnas empacadas y las capilares.

d.1) Columnas Empacadas

Las columnas empacadas tienen un diámetro externo de 0.3 a 0.6 cm y una longitud de 1 a 3 m., aunque puede haber más largas. En general, las columnas son de acero inoxidable o de vidrio. Las

columnas de vidrio son empleadas para compuestos lábiles y se recomiendan para el análisis de fármacos como son aminoácidos, esteroides y enervantes.

Para el análisis por Cromatografía Gas-Líquido se utiliza una fase líquida impregnada en un soporte sólido.

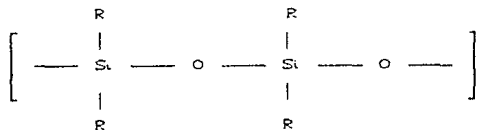
Los requisitos que debe cumplir una fase líquida son: ser químicamente estable, tener una presión de vapor baja, tener baja viscosidad a las temperaturas de operación normales, debe ser soluble en los disolventes más comunes y deben mostrar capacidad de disolución diferencial para poder separar a los solutos de la muestra y tener buena capacidad de mojado en los soportes empleados. (12)

Para escoger una fase líquida es necesario tomar en cuenta la temperatura máxima y mínima, la solubilidad absoluta, el costo y la disponibilidad. (13)

La mínima temperatura de una fase está dada por su punto de fusión y su viscosidad, y la temperatura máxima por la temperatura a la cual la fase se mantiene sin descomposición y sin sangrar apreciablemente.

Para la elección de una fase líquida se utiliza el método de Mc. Reynolds/Rohrschneider que se basa en la comparación de los índices de retención obtenidos al evaluar una serie de sustancias de prueba en las fases líquidas usando el escualano, una fase no polar, como referencia. El fundamento de este método es la consideración de las principales interacciones moleculares que son responsables de la retención de los solutos por la fase líquida.

Uno de los principales grupos utilizados como fases líquidas son los polisiloxanos, debido a su gran estabilidad térmica. El esqueleto básico está dado por :



Ejemplos de estas fases líquidas son el OV-17 (50% metil 50% fenilpolisiloxano) que es la fase propuesta por la USP XXI para

cuantificar el clorhidrato de Lincomicina, y el RSL-150 (Polidimetilsiloxano) que es la fase de la columna capilar elegida para realizar el análisis en el presente trabajo. El OV-17 tiene una densidad de 1.092 g/ml, una viscosidad de 1.300 cp y un peso molecular promedio de 4×10^3 , mientras que el RSL-150 tiene una viscosidad de 1.500 y un peso molecular promedio de 3×10^4 .

Un soporte ideal para Cromatografía Gas-Líquido debe reunir los siguientes requisitos: 1) debe tener un gran área superficial para poder retener a la fase líquida, 2) debe ser un buen conductor del calor, 3) debe ser mecánica y térmicamente estable, 4) debe tener una baja actividad superficial, para evitar interacciones químicas y adsorptivas con la muestra, 5) debe tener un diámetro de poro uniforme y 6) las partículas deben ser de forma regular y tamaño uniforme para preparar columnas de alta eficiencia.

El soporte establecido en la USP XXI para la columna empacada es el WHP que significa que es un soporte de diatomita desactivado por lavado ácido y silanizado.

d.2) Columnas Capilares

Existen varios tipos de columnas capilares: las columnas de tubo vacío con pared impregnada (Wall-Coated Open Tubular, W.C.O.T.), las columnas de tubo vacío cubiertas con soporte sólido (Support-Coated Open Tubular, S.C.O.T.), y las columnas de tubo vacío de fase porosa (Porous-Layer Open Tubular, P.L.O.T.)

Las columnas de tubo vacío o capilares se basan en la teoría de Golay, desarrollada en 1957, que establece que columnas con un diámetro interno pequeño y recubiertas con una película delgada de fase líquida son capaces de generar 100 veces más platos teóricos que las columnas empacadas.

Las columnas WCO (Wall-Coated Open Tubular) son aquellas que tienen una película delgada de fase líquida sobre la pared de la columna. En el caso de las columnas SCOT (Support-Coated Open Tubular) la fase líquida se encuentra retenida en un soporte. Dentro de las columnas SCOT, se encuentran las columnas PLOT (Porous-Layer Open Tubular) en las cuales se deposita sobre la pared interna de la columna sílica fundida o cristales

elongados. (13)

Las columnas capilares tienen un diámetro interno menor de 1.0 mm. Las columnas WCOT tienen un diámetro interno de 0.05 a 0.53 mm y las columnas SCOT de 0.5 mm. Su longitud varía desde 5 a 100 m. (14)

A continuación se muestra un cuadro comparativo entre las columnas capilares y las empacadas :

	<u>Columnas Empacadas</u>	<u>Columnas Capilares</u>
Longitud (m)	1.5 - 6.0	5 - 100
Flujo (ml/min)	10.0 - 60.0	0.5 - 10
Platos Teóricos Efectivos (2m, 50m)	5,000	150,000
Platos Efectivos por m	2,500	3,000 - 4,000
Capacidad	10µg/pico	50-500 ng/pico
Grosor de Película (µm)	10	0.1 - 5.0

tabla 2.1

En general, las columnas capilares son más caras que las columnas empacadas. Sin embargo, debido a su mayor eficiencia, se requieren menor cantidad de columnas capilares que de empacadas para resolver los mismos problemas.

Las principales desventajas del empleo de columnas capilares son: 1) la baja capacidad de muestra, 2) el costo de las columnas, 3) las modificaciones instrumentales que se requieren. No obstante, dentro de las ventajas más importantes, se tiene: poder realizar separaciones que no son posibles con columnas empacadas, y las separaciones se realizan más rápido y con una mejor resolución. (14)

E) Horno

El horno permite mantener a la columna a una temperatura óptima para lograr la separación en un tiempo de análisis razonable. Para ello tiene un termostato que permite un intervalo grande de temperaturas. (12)

Existen 2 modos de temperatura : el isotérmico y el de temperatura programada. Como su nombre lo indica el modo isotérmico es cuando la temperatura de análisis se mantiene constante. Mientras que la temperatura programada es cuando hay un

aumento lineal de la temperatura en función del tiempo. Se recomienda utilizar la temperatura programada cuando haya más de 100°C de separación entre los puntos de ebullición de los componentes de la muestra. Con el uso de la temperatura programada se resuelve el " el problema general de la elución ", que es el incremento en el tiempo de retención y el ancho del pico de los últimos componentes de una serie homóloga, debido a que la relación entre el tiempo de retención y el punto de ebullición es logarítmica. Es posible utilizar varios programas de temperatura si la muestra es compleja. Las principales limitaciones del uso de la temperatura programada son la estabilidad térmica de la fase estacionaria y los cambios que sufre el flujo del gas acarreador durante el programa. Esto último es debido a que conforme aumenta la temperatura, aumenta la viscosidad del gas acarreador, y por tanto disminuye la velocidad de flujo. Por ello, en cromatografos con temperatura programada se necesita un controlador diferencial del flujo.

F) Detector

Un detector es un dispositivo capaz de medir alguna propiedad de los componentes de la muestra que pueda relacionarse directamente con la concentración de los mismos.

Los parámetros que deben tomarse en cuenta para la elección de un detector son: 1) la sensibilidad, 2) el ruido, 3) la respuesta (universal o selectiva), 4) la linealidad, 5) la simplicidad, 6) el costo y 7) la disponibilidad.⁴²⁾ Experimentalmente los parámetros operacionales que se evalúan son: 1) la cantidad mínima detectable, 2) la proporción de respuesta selectiva entre los estándares de diferente composición o estructura y 3) el intervalo en el cual la respuesta del detector es directamente proporcional a la concentración.

La concentración mínima detectable está relacionada con el ruido del detector y con su sensibilidad, ya que por definición ⁴²⁾ es la concentración de la muestra capaz de producir una respuesta del doble del nivel del ruido.

El presente trabajo se desarrolló usando el detector de ionización de llama, por ser el más útil, debido a su gran

sensibilidad, a su estabilidad, rápida respuesta, a su bajo volumen muerto y a su amplio intervalo lineal. La respuesta de este detector se basa en la medición de la conductividad eléctrica generada por los iones de los componentes de la muestra al ser arrastrados por el gas acarreador hacia la llama del detector. La corriente eléctrica producida es proporcional a la cantidad de iones formados.

El gas acarreador se mezcla con hidrógeno y se quema en presencia de aire o de oxígeno que fluye a través del detector. Tanto la punta del "jet" como el colector cilíndrico funcionan como electrodos, y se encuentran convenientemente separados. El colector se localiza arriba de la llama. Cuando únicamente fluye el gas acarreador a una velocidad constante, se genera una corriente constante, llamada "corriente de fondo". En el momento de que algún componente de la muestra pasa por la llama, se ioniza, generando una corriente eléctrica, que a su vez produce una señal. Esta señal es amplificada en un electrómetro o amplificador de precisión y es alimentada a un registrador o integrador. (2)

G) Integrador

La señal producida en el detector pasa al registrador, el cual la imprime y da lugar al cromatograma. Actualmente se emplean integradores, que son dispositivos capaces de proporcionar directamente las áreas de los picos, de hacer cálculos, e imprimir resultados, además de graficar el cromatograma, señalando los tiempos de retención de cada pico. Entre las ventajas principales de los integradores, se encuentran su gran recorrido lineal, su alta velocidad de recuento. La señal que sale del detector entra a un convertidor de frecuencia, el cual produce un impulso a una velocidad de conteo proporcional al área del pico. (2)

II.3 Formación de Derivados

La formación de derivados es muy importante porque aumenta la volatilidad y la estabilidad, mejora la separación y detectabilidad de compuestos que de otra forma no podrían ser analizados por Cromatografía de Gases

Las reacciones de formación de derivados son reacciones orgánicas, pero a microescala. Estas reacciones deben ser: 1) rápidas, 2) cuantitativas, 3) de producto final único y 4) sin traslapamiento de los picos del reactivo y del producto. (17)

Las moléculas grandes presentan, en general, menor volatilidad que las moléculas pequeñas. No obstante, existen moléculas pequeñas de baja volatilidad debido a la formación de puentes de hidrógeno entre sí, por poseer cualquiera de los siguientes grupos funcionales: NH, OH ó SH. Para favorecer la volatilización de estas moléculas se reemplaza el hidrógeno por algún grupo no polar, ya sea por silanización, alquilación o acilación. Por otra parte, la formación de derivados evita la adsorción de las muestras polares en la superficie de la columna y del soporte, que de otro modo, produciría la aparición de picos asimétricos en el cromatograma.

La formación de derivados brinda estabilidad térmica a compuestos que son volátiles, pero que sufren descomposición dentro del cromatógrafo. Entre otras aplicaciones de las reacciones de derivatización, se encuentran: la separación de mezclas complejas y de isómeros ópticos y la de conferir sensibilidad a compuestos para el detector de captura de electrones. (18)

Los reactivos para la formación de derivados están constituidos por dos partes: una parte orgánica, cuya longitud determina la volatilidad del derivado y una parte reactiva que como su nombre lo indica es mediante ella como se une el reactivo de derivatización al compuesto. (19)

Para asegurar la cuantitatividad de las reacciones de formación de derivados, se utilizan reactivos puros y en gran exceso. (20) Los parámetros primordiales que deben tomarse en cuenta en este tipo de reacciones son: 1) el disolvente, 2) la temperatura, 3) el tiempo, 4) si requiere o no catálisis y 5) realizarse en condiciones anhidras.

La mayoría de los reactivos utilizados son sensibles a la humedad atmosférica y al oxígeno, por tanto, se recomienda almacenarlos en frascos ampolla herméticamente cerrados. La toma

del reactivo se realiza con jeringas, para evitar el contacto del reactivo con la atmósfera. Es aconsejable emplear jeringas con émbolos recubiertos con teflón, ya que los émbolos metálicos sufren corrosión y si no son adecuadamente lavados pueden reaccionar con la jeringa.

Las reacciones de formación de derivados se lleva a cabo en recipientes herméticamente cerrados. Estos recipientes pueden ser frascos viales con tapones de hule o discos de teflón y una sobretapa con rosca o engargolada.

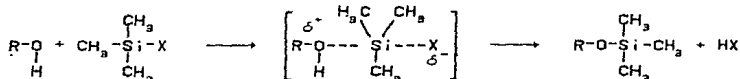
Si la reacción requiere calentamiento, éste puede proporcionarse mediante canastos calefactores, baños de agua o de arena.

A) Reactivos de Silanización

Los reactivos alquilsilil son los agentes derivatizantes más empleados debido a la facilidad de uso y a su gran versatilidad.⁽¹³⁾ Los productos de cualquier reacción de silanización son éteres o ésteres alquilsilil, de acuerdo a la reacción general:



El mecanismo involucra un ataque nucleofílico sobre el silicio:



Para que X sea un buen grupo saliente debe ser poco básico y ser capaz de estabilizar la carga negativa parcial en el estado de transición.

Los principales reactivos de silanización en orden creciente de donación del grupo silil son: (16)


Reactivo	Abreviatura	Estructura
Hexametildisilazano	HMDS	$(\text{CH}_3)_3\text{-Si-N-Si-(CH}_3)_3$ H
Trimetilclorosilano (con catalizador básico)	TMCS	$(\text{CH}_3)_3\text{-Si-Cl}$
N-metil-N-trimetilsilil-acetamida	MSA	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3\text{-C-N-Si-(CH}_3)_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
N-trimetilsilildietilamina.	TMSDEA	$(\text{CH}_3)_3\text{-Si-N-(C}_2\text{H}_5)_2$
N-trimetilsilildimetilamina	TMSDMA	$(\text{CH}_3)_3\text{-Si-N-(CH}_3)_2$
N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida	MSTFA	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CF}_3\text{-C-N-Si(CH}_3)_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
N,O-Bis(trimetilsilil)-acetamida	BSA	$\begin{array}{c} \text{O-Si(CH}_3)_3 \\ \\ \text{CH}_3\text{-C-N-Si-(CH}_3)_3 \end{array}$
N,O-Bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida	BSTFA	$\begin{array}{c} \text{O-Si(CH}_3)_3 \\ \\ \text{CF}_3\text{-C-N-Si-(CH}_3)_3 \end{array}$
N-trimetilsililimidazol	TMSI	$(\text{CH}_3)_3\text{-Si-N}$ 

Tabla 3.11

El trimetilclorosilano es un agente de silanización débil, y por ello requiere un catalizador básico como es la piridina o la dietilamina. El trimetilclorosilano puede promover la formación del éter-enol-TMS (trimetilsilano) con compuestos que posean grupos cetónicos desprotegidos. El éter-enol-TMS es un producto secundario indeseable debido a su inestabilidad y fácil

hidrólisis. El TMCS es empleado como catalizador de los otros agentes silanizantes.

El N-metil-N-trimetilsililfluoroacetamida (MSTFA) es utilizado para la separación de compuestos de bajo peso molecular.

El N-O-Bis(trimetilsilil)acetamida (BSA) tiene como principal aplicación, al igual que el BSTFA formar los trimetilsilil derivados, sin embargo, promueve la formación de éteres enol-TMS en compuestos con grupo cetónicos desprotegidos.

El N-trimetilsililimidazol es uno de los agentes silanizantes más potentes, no obstante, no reacciona con los grupos amino. Dentro de las propiedades más apreciadas de este reactivo se encuentran: 1) La de no formar los éteres enol-TMS y 2) silanizar a los carbohidratos en solución acuosa.

La mezcla formada por TMSI-BSTFA-TMCS (1:1:1 v/v) es el reactivo de silanización más poderoso.

El orden de aceptación del grupo silil está dado por:

hidroxilo > hidróxilo
alcohólico > fenólico > carboxilo > amina > amida

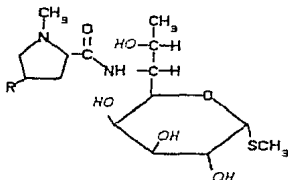
Para cada compuesto en particular es necesario considerar el impedimento estérico porque es el paso limitante en cualquier reacción de silanización. Por ello, es más fácil silanizar un alcohol primario que uno secundario, y este a su vez es más reactivo que un alcohol terciario.

La desventaja de los agentes silanizantes es la formación de depósitos de silica en los detectores de ionización de llama. La formación de estos depósitos se ven disminuidos con el uso de reactivos silanizantes con alto contenido de fluor, como el BSTFA y el MSHFBA (N-metil-N-trimetilsililheptafluorobutiramida).

B) Silanización de la Lincomicina

Las Lincomicinas A y B presentan cuatro grupos hidroxilos alcohólicos secundarios susceptibles de reaccionar con algún

reactivo de silanización, según se observa en las estructuras;



R: $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ Lincomicina A

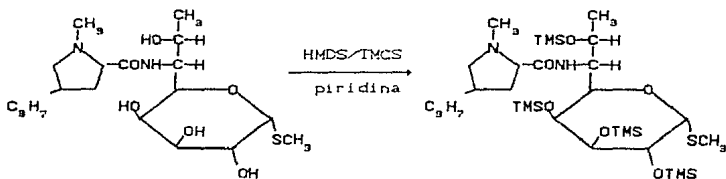
R: CH_2CH_3 Lincomicina B

Debido a que los grupos hidroxilo se encuentran impedidos estericamente se requiere un reactivo silanizante poderoso.

Anteriormente se empleaba una mezcla de hexametildisilazano (HMDS) y trimetilclorosilano (TMCS) en piridina.

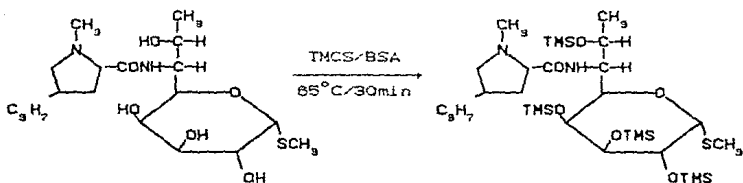
El procedimiento consistía en disolver 10 mg de la muestra en 1 ml de piridina, añadir 200 μl de HMDS y 100 μl de TMCS y dejar reaccionar por 30 min a temperatura ambiente.

La reacción que se lleva a cabo es: (10)



Actualmente la Lincomicina se silaniza con el método propuesto por la USP XXI. En este método el reactivo silanizante está compuesto por una solución de trimetilclorosilano como catalizador en bis(trimetilsilil)acetamida en una proporción 1 a 100 respectivamente. La técnica consiste en agregar 1 ml de la solución anterior a 4 ml de una solución que contiene 4.4 mg de Lincomicina y 3.4 mg de dotriacontano, este último es el estándar

interno. Se calienta a 65°C por 30 min. La reacción involucrada es: (11)



La volatilidad de la Lincomicina se ve incrementada grandemente por la silanización de los cuatro grupos hidróxilo.

Los dos métodos anteriormente citados son adecuados para el análisis por Cromatografía de Gases de materia prima, diferentes formas farmacéuticas que contengan Lincomicina, muestras de fermentación y separación de compuestos similares a la Lincomicina. (16)

CAPITULO III. PLANTEAMIENTO TEORICO

A continuación se presenta el planteamiento teórico de cada uno de los ensayos de la certificación del método propuesto y los parámetros estadísticos utilizados.

Cualquier método que sea nuevo, o bien, que se haya modificado deberá ser certificado para comprobar su efectividad.

Los parámetros de la certificación se eligen en base a la concentración del analito dentro de la matriz y al tipo de forma farmacéutica que se este estudiando.

En general, los parámetros que se evalúan son: linealidad, exactitud, precisión (reproducibilidad y repetibilidad), estabilidad de la muestra, especificidad y límite de detección. Este último parámetro se calcula cuando la concentración del analito se encuentra dentro del nivel de trazas.

A) Linealidad

La linealidad es una medida del grado en que la curva de respuesta en función de la concentración se aproxima a una línea recta. Es necesario especificar el intervalo en el cual la curva de calibración es una línea recta. Puede calcularse tanto la "linealidad del sistema" (cuando se usan estándares) como la "linealidad del método" (cuando se adicionan estándares a los placebos).

Para materia prima y formas farmacéuticas donde la concentración del analito es grande (>10%) se puede utilizar un intervalo de concentración estrecho (del 50 al 150%) del principio activo para evaluar la linealidad del sistema y del método.

Experimentalmente, la linealidad del sistema se obtuvo analizando por duplicado soluciones estándares al 50, 80, 100 y 120% del valor esperado (1.1mg/ml).

Por otra parte, la linealidad del método se determinó usando placebos adicionados del estándar de principio activo a diferentes concentraciones 50, 80, 100 y 120% del valor esperado. Es posible evaluar la exactitud y la precisión del método con los mismos resultados experimentales.

Para ambos casos se debe probar que la variable dependiente es directamente proporcional a la variable independiente y por

ello se hace una regresión lineal usando el método de mínimos cuadrados. En la linealidad del sistema, la variable dependiente es la "señal" o "respuesta" y la variable independiente es la cantidad adicionada, mientras que en la linealidad del método, la variable dependiente es la cantidad recuperada y la variable independiente es la cantidad adicionada. (6)

Es posible establecer pruebas de hipótesis sobre la pendiente y la ordenada al origen para confirmar que los resultados experimentales se ajustan a una línea recta, cuya ecuación es:

$$Y = \gamma X + \beta$$

La prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen es:

Ho: $b = \beta$, donde $\beta = 0$ (Hipótesis nula)

Hi: $b \neq 0$ (Hipótesis alternativa)

El estadístico de prueba empleado es la "t de Student" para $n-2$ grados de libertad ya que los coeficientes de regresión β (ordenada al origen) y γ (pendiente) fueron reemplazados por las estimaciones de mínimos cuadrados:

$$t = \frac{b - \beta}{S_e} \sqrt{\frac{n S_{xx}}{S_{xx} + n(\bar{x})^2}}$$

Donde:

b = Ordenada al origen experimental

β = Ordenada al origen poblacional ($\beta=0$)

S_e = Error típico de estimación

S_{xx} = Suma de cuadrados de la variable independiente

n = Número de determinaciones

\bar{x} = Media experimental

El error típico de estimación se calcula, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$S_e = \sqrt{\frac{S_{xx} S_{yy} - (S_{xy})^2}{(n-2)n S_{xx}}}$$

Donde:

$$S_{xx} = n \sum_{i=1}^n X_i^2 - \left[\sum_{i=1}^n X_i \right]^2$$

$$S_{yy} = n \sum_{i=1}^n Y_i^2 - \left[\sum_{i=1}^n Y_i \right]^2$$

$$S_{xy} = n \sum_{i=1}^n X_i Y_i - \left[\sum_{i=1}^n X_i \right] \left[\sum_{i=1}^n Y_i \right]$$

Para rechazar la hipótesis nula: $t < -t_{\alpha/2}$ ó $t > t_{\alpha/2}$, pues se trata de un ensayo bilateral ó de dos colas. Donde α es el nivel de significancia, que en el presente trabajo se considerará del 5% ($\alpha=0.05$), que corresponde a un valor usual en el riesgo de cometer un error tipo I.

Es recomendable calcular el intervalo de confianza para el mismo nivel de significancia para conocer entre que valores se encuentra el valor verdadero de la ordenada al origen.

$$I.C: b \pm t_{\alpha/2} S_e \sqrt{\frac{S_{xx} + (n \bar{x})^2}{n S_{xx}}}$$

La prueba de hipótesis para la pendiente es:

H₀: $m = \gamma$, donde $\gamma = 1$ (en caso de la linealidad del método)

H₁: $m \neq \gamma$

Nuevamente el estadístico de prueba utilizado es la t de student para $n-2$ grados de libertad.

$$t = \frac{(m-\gamma)}{S_e} \sqrt{\frac{S_{xx}}{n}}$$

Donde:

m = Pendiente experimental

γ = Pendiente poblacional

S_e = Error típico de estimación

S_{xx} = Suma de cuadrados de la variable independiente.

n = Número de determinaciones

Para rechazar la hipótesis nula : $t < -t_{\alpha/2}$ ó $t > t_{\alpha/2}$. Se utilizó un nivel de significancia del 5%.

El intervalo de confianza se calcula de acuerdo a la

siguiente ecuación: (19)

$$I.C.: m \pm t_{\alpha/2} S_e \sqrt{\frac{n}{S_{xx}}}$$

B) Exactitud

Se define como el grado de concordancia entre un valor experimental y un valor de referencia que se considera como el valor real.

Para probar la exactitud del método de manera experimental se ensayaron por sextuplicado placebos adicionados de cuatro diferentes concentraciones (al 50, 80, 100 y 120%) del principio activo estándar de referencia. (18)

La hipótesis nula propuesta es:

$$H_0: \bar{x} = \mu$$

Es decir, la media poblacional, cuyo valor es aceptado como el real debe ser igual a la media experimental encontrada.

La hipótesis alternativa es:

$$H_1: \bar{x} \neq \mu$$

Como se hacen menos de 30 determinaciones el estadístico de prueba es la "t de Student", para n-1 grados de libertad.

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{s/\sqrt{n}}$$

Donde:

\bar{x} = es la media experimental

μ = es el valor considerado como real ($\mu=100\%$)

s = es la desviación estándar

n = es el No. de determinaciones.

Se trata de una región bilateral ó "en dos sentidos", por ello para rechazar la hipótesis nula $t < -t_{\alpha/2}$ ó $t > t_{\alpha/2}$.

El intervalo de confianza puede evaluarse para conocer el intervalo donde se encuentra la media experimental (18)

$$I.C.: \bar{x} \pm t_{\alpha/2} s/\sqrt{n}$$

C) Precisión

La precisión es el grado en que concuerdan las diferentes mediciones de una misma propiedad. La precisión puede calcularse tanto para el sistema como para el método. Para conocer la precisión del sistema se ensayaron por duplicado 8 soluciones estándar al 100%. Los resultados de este ensayo no deben diferir en más del 2% de la desviación estándar relativa por tratarse de un método cromatográfico.

La precisión del método puede expresarse como la reproducibilidad y la repetibilidad.

La repetibilidad es la concordancia entre determinaciones independientes de soluciones con una concentración del principio activo cercana al 100%, provenientes de una muestra homogénea del producto. Los ensayos son realizados por un mismo analista y en las mismas condiciones de operación. La diferencia con la reproducibilidad es que los análisis los pueden realizar diferentes analistas en diferentes equipos y/o en diferentes laboratorios.

Para evaluar la repetibilidad se prepararon 8 soluciones de una muestra homogénea del contenido de 20 cápsulas de clorhidrato de Lincomicina de 300 mg. Se determinó previamente el peso promedio de las cápsulas para conocer el equivalente del contenido de las cápsulas que debió pesarse para tener una concentración cercana al 100% (1.1 mg/ml) del principio activo. Este experimento corresponde al del analista 1 día 1, y junto con el experimento del analista 2 día 2, que consistió en preparar otras 8 soluciones independientes de la misma muestra homogénea de las cápsulas por otro analista en otro día, sirven para evaluar la reproducibilidad del método. (8)

En los casos de precisión del sistema y repetibilidad del método, la hipótesis nula que se contrasta es $H_0: s = \sigma$ frente a la hipótesis alternativa $H_1: s > \sigma$. Esto es equivalente a contrastar la hipótesis nula $s^2 = \sigma^2$ contra la alternativa $s^2 > \sigma^2$. Como los resultados de estos experimentos no deben variar en más del 2%, la hipótesis nula para el caso de la precisión del sistema es:

Ho: $s^2 = \sigma^2$, donde $\sigma^2 = 0.04$ (pues el Fr ≈ 1 , y el 2% de 1 es $\sigma = 0.02$)
 y la hipótesis alternativa:

Hi: $s^2 > \sigma^2$, $s^2 > 0.0004$

Para la repetibilidad del método:

Ho: $s^2 = \sigma^2$, donde $\sigma^2 = 4$ (pues el porcentaje recuperado $\approx 100\%$, y el 2% de 100 es $\sigma = 2$)

Hi: $s^2 > \sigma^2$, $s^2 > 4$

Por tratarse de muestras aleatorias que provienen de una población normal de varianza σ_0^2 se utiliza la prueba de χ^2 con n-1 grados de libertad:

$$\chi^2 = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2}$$

Donde:

n = Número de determinaciones.

s = desviación estándar muestral

σ_0 = desviación estándar máxima aceptable

El intervalo de confianza al nivel de $1-\alpha$, para σ^2 es:

$$\frac{(n-1)s^2}{\chi_2^2} < \sigma^2 < \frac{(n-1)s^2}{\chi_1^2}$$

Tomando la raíz cuadrada de cada miembro de la desigualdad obtenemos el intervalo de confianza para σ con el mismo nivel $1-\alpha$.

$$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_2^2}} < \sigma < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_1^2}}$$

Se consideran dos "colas iguales", a pesar de que la distribución χ^2 no es simétrica para evitar cálculos complicados.

La reproducibilidad del método se determina de la comparación de las varianzas y de las medias de los resultados obtenidos por los dos analistas en los dos días.

La prueba de hipótesis sobre las varianzas quedaría:

Ho: $\sigma_1^2 = \sigma_2^2$

Hi: $\sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$

Como se trata de determinar si las dos muestras provienen de

poblaciones con variancias iguales, se utiliza el estadístico F de Snedecor, que se calcula:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

Donde:

s_1^2 = Es la variancia muestral mayor con $n_m - 1$ grados de libertad

s_2^2 = Es la variancia muestral menor con $n_m - 1$ grados de libertad

Se rechaza la hipótesis nula H_0 , si $F > F_{\alpha/2}(n_m - 1, n_m - 1)$.

La prueba de hipótesis sobre las medias se establece como:

$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$, o sea, $\mu_1 = \mu_2$

$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$

Si con la prueba anterior se demostró que las variancias son iguales y se trata de muestras pequeñas e independientes, el estadístico de prueba es:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}} \cdot \frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}$$

Cuando $n_1 = n_2$, es decir, el mismo número de determinaciones para ambos experimentos, la ecuación anterior se reduce a:

$$t = \frac{\bar{x}_2 - \bar{x}_1}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n} + \frac{s_2^2}{n}}}$$

Como se trata de un ensayo bilateral o "en dos sentidos", con $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad, la hipótesis nula se rechaza cuando el $t_{\text{calc}} < -t_{\alpha/2}$ ó $t_{\text{calc}} > t_{\alpha/2}$.

D) Estabilidad de la Muestra

En este ensayo, se trata de observar el efecto del disolvente sobre el principio activo. Para ello se dejan las muestras ya preparadas a temperatura ambiente, bajo la luz solar y/o en refrigeración. El objetivo es establecer las condiciones de almacenamiento de la muestra. Se recomienda un mínimo de 16 horas

a temperatura ambiente en viales herméticamente cerrados, para métodos cromatográficos. Es posible utilizar las mismas soluciones empleadas en el experimento de reproducibilidad del analista 1 día 1, después de guardarlas el tiempo y las condiciones elegidas. En el presente trabajo se escogió almacenar las muestras 24 horas a temperatura ambiente. Las pruebas de hipótesis establecidas son las mismas que para reproducibilidad del método: (10)

$$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$$

$$H_1: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$$

y,

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$$

Es decir, no deberá haber ninguna diferencia estadística entre los ensayos hechos antes y después del almacenamiento de la muestra.

Otros parámetros que pueden evaluarse son:

E) Especificidad

Este parámetro asegura que la respuesta medida es debida al principio activo y no a otros componentes de la muestra que pueden ser productos de degradación, excipientes o impurezas.

Si se trata de un método de control de calidad, como el método que se propone en la presente tesis, se debe asegurar que el método es capaz de separar el principio activo de cualquier interferencia presente. Para ello, se debe:

- 1) Analizar con el método propuesto placebos del producto.
- 2) Identificar las señales del principio activo, su co-producto, el estándar interno, excipientes y otras sustancias presentes.
- 3) En caso de contar con los estándares del principio activo, de co-productos o productos de degradación, se añaden a placebos y se analizan con el método propuesto.

Para métodos indicadores de estabilidad, se debe degradar la sustancia de interés por algún método fisicoquímico como es calentamiento de 70°C a 120°C, luz UV o luz fluorescente y/o humedad, o someterla a pH's extremos y confirmar que el método es capaz de separar las señales de los productos de degradación de la señal del principio activo.

Se aconseja usar otra técnica de análisis para comprobar la selectividad del método, como puede ser un cambio en la polaridad de la columna en el caso de Cromatografía de Gases.

F) Tolerancia del Método

Es la influencia del cambio de alguna de las condiciones experimentales en el análisis.

En Cromatografía de Gases las modificaciones pueden realizarse al variar cualquiera de las temperaturas (del inyector, del horno, o del detector), variando el porcentaje de fase líquida, el flujo del gas acarreador, etc.

G) Efecto de la Matriz

Es básicamente el mismo experimento que el de exactitud, solo que en este caso, se observa como afecta la matriz al recobro del analito.

Cuando se certifica un método para una concentración mayor del 10% del analito como es el caso particular del Clorhidrato de Lincomicina materia prima, es recomendable, evaluar los siguientes parámetros: linealidad, precisión, especificidad y estabilidad, y evaluar linealidad, precisión, recuperación, especificidad, estabilidad y efecto de la matriz cuando se trata de alguna forma farmacéutica como son: cápsulas, tabletas, suspensiones, soluciones, etc. (18)

CAPITULO IV. PARTE EXPERIMENTAL

IV.1 Equipo, Material y Reactivos

A) Técnica Desarrollada

a. 1) Equipo:

- 1) Cromatógrafo de Gases Hewlett Packard Modelo 5890 con detector de ionización de llama, para columnas capilares.
- 2) Cromatógrafo de Gases Hewlett Packard Modelo 5880A con detector de ionización de llama, para columnas capilares.
- 3) Integrador Hewlett Packard Modelo 3396A.
- 4) Integrador Hewlett Packard Modelo 3390A.
- 5) Integrador Hewlett Packard Modelo 5880A.

a. 2) Material:

- 1) Columna capilar entrecruzada de metilsilicón
 - 1.1) Espesor de la película: 0.33 μm
 - 1.2) Diámetro interno: 0.20 mm
 - 1.3) Longitud: 12 m.
- 2) Columna capilar entrecruzada de Carbowax 20M
 - 2.1) Espesor de la película: 0.2 μm
 - 2.2) Diámetro interno: 0.25 mm
 - 2.3) Longitud: 30 m.
- 3) Columna Capilar de metilfenilsilicón
 - 3.1) Espesor de la película: 0.2 μm
 - 3.2) Diámetro interno: 0.25 mm
 - 3.3) Longitud: 30 m.
- 4) Columna Megabore de metilfenilsilicón
 - 4.1) Espesor de la película: 1.2 μm
 - 4.2) Diámetro interno: 0.53 mm
 - 4.3) Longitud: 30 m.
- 5) Columna Capilar entrecruzada de metilsilicón
 - 5.1) Espesor de la película: 0.33 μm
 - 5.2) Diámetro interno: 0.20 mm
 - 5.3) Longitud: 6.5 m.
- 6) Jeringa de vidrio graduada de 10 μl

a. 3) Reactivos

- 1) Cloroformo
- 2) Imidazol

- 3) Clorhidrato de Lincomicina. Estándar de Referencia. Potencia 858 µg/mg
- 4) Dotriacontano
- 5) N.O-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA)
- 6) trimetilclorosilano (TMCS)

IV.2 Preparación de la Muestra

A) Preparación de las Soluciones

a. 1) Solución del Estándar Interno

Se pesan aproximadamente 850 mg de dotriacontano en un matraz volumétrico de 100 ml y se lleva al aforo con cloroformo. La concentración aproximada de la solución es de 8.5 mg/ml.

a. 2) Solución de Imidazol-Cloroformo

Se prepara una solución con una concentración aproximada de 20 mg/ml de imidazol en cloroformo.

a. 3) Solución de Clorhidrato de Lincomicina Estándar de Referencia

Se pesan aproximadamente 110 mg de Clorhidrato de Lincomicina estándar en un matraz volumétrico de 100 ml. se adicionan 10 ml de la solución de estándar interno y se lleva al aforo con la solución de imidazol-cloroformo.

a. 4) Solución a valorar:

a. 4.1) Cápsulas

De acuerdo a la USP XXI se remueve el contenido de no menos de 20 capsulas de clorhidrato de Lincomicina. Se transfiere el equivalente a 110 mg de Lincomicina en un matraz cónico de 250 ml. se añaden 10 ml del estándar interno y 90 ml de la solución de cloroformo-imidazol, se agita mecánicamente por 15 minutos, se filtra. Sin embargo, como menos del 2.5% del contenido de las cápsulas analizadas corresponde a los excipientes, se puede ahorrar el paso de la filtración, pues los excipientes se dispersan en la solución. Por lo tanto, en este caso, es preferible preparar la muestra directamente en un matraz volumétrico de 100 ml.

B) Optimización de las Condiciones de la Reacción de Silanización

La USP XXI recomienda la utilización de tubos de centrifuga de 15 ml con tapón de vidrio para llevar a cabo la reacción de

silanización). Sin embargo, en el momento de calentar la mezcla de reacción en baño María se introduce el vapor de agua dentro de los tubos de centrifuga, favoreciéndose la descomposición del reactivo silanizante. Como la reacción debe llevarse a cabo en medio anhidro se propone el empleo de frascos viales con tapón de hule y engargolados. Además si se coloca un tubo capilar en el tapón de hule se genera un reflujó que favorece la reacción y permite el desprendimiento de gases que de no ser eliminados dificultan la toma de la muestra al término de la reacción, por la diferencia de presiones existentes dentro del frasco vial y la atmósfera.

Por otra parte, la farmacopea recomienda la adición de 1 ml de la mezcla silanizante de trimetilclorosilano en bis(trimetilsilil)acetamida (1:100) a 4.0 ml de la solución estándar y de la solución por valorar. No obstante, por razones de costo, es preferible añadir 0.5 ml del reactivo silanizante a 2 ml de las soluciones.

La reacción se realiza en frascos viales secos de 5 ml como se mencionó anteriormente y se calienta a 65°C por 30 minutos. Después de transcurrido ese tiempo se inyecta 1 μ l de cada solución en el cromatógrafo.

C) Ensayos para la Certificación del Método

c.1) Linealidad del Sistema

Se prepararon por duplicado diferentes soluciones correspondientes al 50, 80, 100 y 120% del valor establecido en la farmacopea para cuantificar el clorhidrato de Lincomicina estándar (\approx 110 mg/100 ml). El volumen de la solución del estándar interno (10 ml de conc. \approx 8.5 mg/ml) se mantuvo constante en todas las soluciones. Se llevó al aforo (100 ml) con la solución de imidazol-cloroformo (conc. \approx 20 mg/ml). Se silanizaron las muestras y cada una se inyectó por duplicado.

c.2) Precisión del Sistema

Se pesaron aproximadamente 110 mg del clorhidrato de Lincomicina estándar en 8 matraces volumétricos de 100 ml y se adicionaron 10 ml de la solución del estándar interno (\approx 8.5 mg/ml). Se llevó al aforo con la solución de imidazol-cloroformo.

Se silanizaron las muestras y cada una se inyectó por duplicado.

c. 3) Linealidad y Exactitud del Método

En este ensayo se usaron matraces volumétricos de 50 ml porque no se tenían a la mano suficientes matraces volumétricos de 100 ml. Se mantuvo la cantidad de placebo constante en cada matraz (28 mg) y se pesó por sextuplicado el equivalente a cada porcentaje 50, 80, 100 y 120% del valor establecido (55 mg/ 50 ml) del clorhidrato de Lincomicina estándar. A cada matraz se le adicionaron 5 ml de la solución del estándar interno (conc. \approx 8.5 mg/ml). Se llevó al aforo con la solución imidazol-cloroformo. Se silanizaron las muestras y cada una se inyectó una vez.

c. 4) Precisión del Método

c. 4. 1) Repetibilidad

Se pesaron en 8 matraces volumétricos de 100 ml el equivalente a 110 mg de clorhidrato de Lincomicina de una muestra homogénea del contenido de 20 cápsulas, se adicionaron 10 ml de la solución del estándar interno (conc. \approx 8.5 mg/ml). Se llevó al aforo con la solución imidazol-cloroformo (conc. \approx 20mg/ml). Se silanizaron las muestras y cada una se inyectó por duplicado.

c. 4. 2) Reproducibilidad

c. 4. 2. 1) Analista 1 día 1

El experimento anterior corresponde también al del Analista 1 Día 1 del ensayo de reproducibilidad.

c. 4. 2. 2) Analista 2 día 2

Un segundo analista pesó el equivalente a 110 mg de clorhidrato de Lincomicina de la misma muestra homogénea del contenido de las cápsulas en 8 matraces volumétricos de 100 ml. adicionó 10 ml de la solución del estándar interno, llevó al aforo con la solución imidazol-cloroformo, silanizó las muestras y las inyectó una vez.

c. 5) Estabilidad de la Muestra

Las soluciones preparadas por el analista 1 día 1 fueron almacenadas 24 horas a temperatura ambiente. Cada muestra se inyectó por duplicado.

c. s.) Especificidad del Método

c. s. 1) Placebo solo

Se pesó aproximadamente 2.8 mg de placebo en un matraz volumétrico de 100 ml y se llevó al aforo con la solución imidazol-cloroformo (conc. \approx 20 mg/ml). Se silanizó la muestra y se inyectó.

El placebo que corresponde al 2.14% del contenido de las cápsulas está constituido por dos excipientes: 72.9% del excipiente A y 27.1% del excipiente B.

c. s. 2) Placebo con Clorhidrato de Lincomicina estándar

Se pesaron aproximadamente 110 mg de clorhidrato de Lincomicina estándar y aproximadamente 2.8 mg de placebo, en un matraz volumétrico de 100 ml, y se llevó al aforo con la solución de imidazol-cloroformo (conc. \approx 20 mg/ml). Se silanizó la muestra y se inyectó.

c. s. 3) Clorhidrato de Lincomicina sólo

Se pesaron aproximadamente 110 mg de clorhidrato de Lincomicina estándar en un matraz volumétrico de 100 ml. Se llevó al aforo con la solución de imidazol-cloroformo (conc. \approx 20 mg/ml). Se silanizó la muestra y se inyectó.

c. s. 4) Estándar Interno sólo

Se adicionaron 10 ml de la solución del estándar interno (conc. \approx 8.5 mg/ml) en un matraz volumétrico de 100 ml, se llevó al aforo con la solución imidazol-cloroformo. Se silanizó la muestra y se inyectó.

c. s. 5) Clorhidrato de Lincomicina estándar con Estándar Interno

Esta solución se preparó igual que la solución del clorhidrato de Lincomicina estándar de referencia. Se silanizó la muestra y se inyectó.

IV.3 Selección de la Columna

Para poder seleccionar la columna en forma adecuada fue necesario probar columnas de diferente polaridad, tamaño y cantidad de fase.

La primera columna que se probó fue una columna polar de Carbowax 20M (Superox) entrecruzada, de longitud: 30 m., diámetro: 0.25 mm y temperatura máxima de operación: 220°C, 0.2 μ m

de espesor de película.

Las condiciones de trabajo fueron:

Flujos

Split: 36.6 ml/min
Purga: 7.14 ml/min
H₂ columna: 0.99 ml/min
H₂ detector: 26.2 ml/min
N₂ detector: 27.0 ml/min
Aire: 333.0 ml/min

Relación de split: 37:1

Temperaturas

Temp. inyector: 210°C
Temp. detector: 210°C
Temp. horno: 210°C

Equipo

Cromatógrafo de Gases: HP 5880 A
Integrador: HP 5880 A

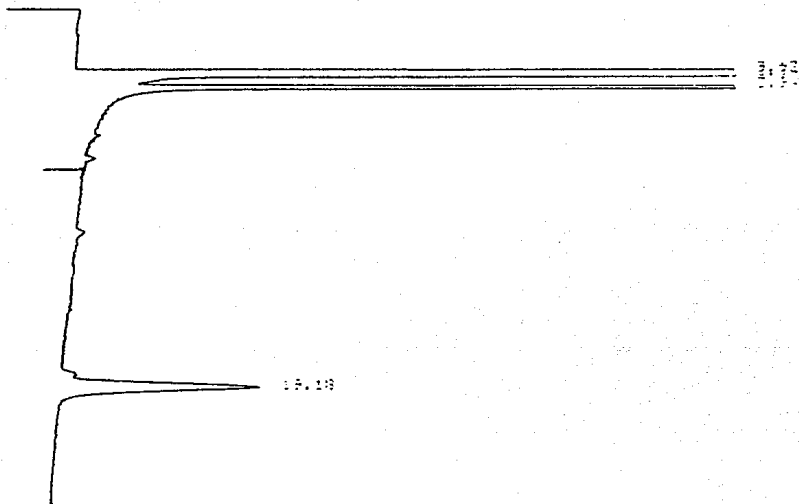
El cromatograma obtenido al inyectar 1 µl de la solución de Clorhidrato de Lincomicina estándar silanizado y estándar interno, se muestra en la figura 4.1.

Esta columna no es adecuada ya que el tiempo de análisis es muy largo, además de que la Lincomicina A se retiene mucho y sale hasta los 19.18 min, muy alejada del estándar interno que sale a los 3.94 min. La resolución entre la Lincomicina A y el estándar interno es de 33.85. Esto es debido a que el dotriacontano que es usado como estándar interno es completamente no polar y prácticamente no se retiene en la columna, en cambio, la Lincomicina posee varios grupos polares como son los grupos hidroxilo, y por tanto se retiene mucho.

El hombro que se observa en el pico de la Lincomicina A corresponde posiblemente a la Lincomicina B.

El número de platos teóricos efectivos de esta columna es de 7,500, es decir, 250 platos por m., lo cual indica que la columna no es eficiente, pues el intervalo de platos teóricos en una columna capilar va de 3,000 a 4,000 platos por metro.

Fig. 4.1



REPORT ANNOTATION - On

[[P]] 5869A MANUAL INJECTION @ 18:22 SEP 21, 1989
AREA %

RT	AREA	TYPE	WIDTH	HEIGHT	BASELINE	AREA %
3.17	17291.75	2V	0.069	4435.71	17.65	35.733
3.34	2167.41	V8	0.07	508.76	18.39	10.324
3.94	645.83	88	0.092	110.01	18.65	3.225
19.18	119.82	88	0.436	4.29	16.95	0.598

Después se probó una columna capilar de polaridad intermedia de RSL-300 (50% metil, 50% fenilpolisiloxano) de 30 m de longitud, de 0.25 mm de diámetro y 330°C de temperatura máxima de operación y 0.2 µm de espesor de película.

Las condiciones de operación fueron:

Flujos

Split: 36.0 ml/min
Purga: 3.7 ml/min
H₂ columna: 1.0 ml/min
H₂ detector: 25.0 ml/min
N₂ detector: 30.0 ml/min
Aire detector: 333.3 ml/min
Relación de split: 38:1

Temperaturas

Temp. inyector: 270°C
Temp. detector: 270°C
Temp. horno: 250°C

Equipo

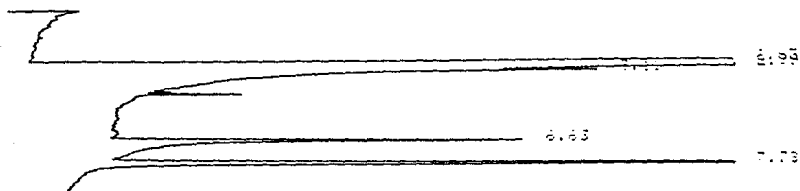
Cromatógrafo de Gases: HP 5880 A
Integrador: HP 5880 A

Nuevamente se inyectó 1 µl de la muestra de Clorhidrato de Lincomicina estándar silanizado, el cromatograma obtenido se muestra en la figura 4.2.

En este cromatograma se observa que el tiempo de análisis en la columna de RSL 300 es menor que en la columna de Carbowax. Sin embargo, el pico de la Lincomicina A no es simétrico y en estas condiciones no se detecta la Lincomicina B. La resolución entre la Lincomicina A ($t_r=6.63$) y el Dotriacontano ($t_r=7.78$) es de 1.67 apenas mayor de 1.5 que es el valor límite indicativo de una buena resolución (Separación del 99%).

La eficiencia de la columna expresada como el número de platos teóricos efectivos es de 5,500, o sea, 200 platos por metro.

Fig. 4.2



DATA SYSTEM MANUAL INJECTION # 15135 AUG 20, 1982
AREA 1

RT	AREA	TYPE	AREA 1
2.63	36902.98	EV	99.621
2.89	154.80	UV	0.792
7.11	153.98	UV	0.390
6.63	50.34	SB	0.155
7.78	174.24	SB	0.442

La tercera columna que se probó tenía la misma fase que la columna anterior (RSL-300), con la diferencia que la columna es Megabore, es decir, tiene un diámetro interno mayor (0.53 mm), mayor capacidad de muestra y mayor espesor de película (1.2 μ m). Debido a las características anteriormente mencionadas, se requiere un flujo más alto del gas acarreador.

Las condiciones del análisis fueron:

Flujos

Split: 40.00 ml/min.
 Purga: 4.23 ml/min
 H₂ columna: 5.00 ml/min
 H₂ detector: 30.00 ml/min
 N₂ detector: 30.00 ml/min
 Aire detector: 333.00 ml/min
 Relación de split: 8:1

Temperaturas

Temp. inyector: 290°C

Temp. detector: 290°C

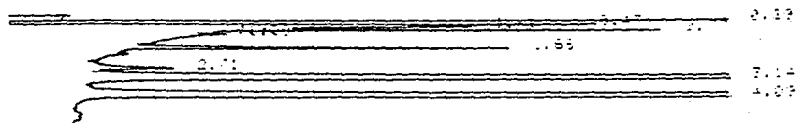
Temp. horno: 280°C

Equipo

Cromatógrafo de Gases: HP 5880 A

Integrador: HP 5880 A

Fig 4.3



1-1 5880A MANUAL INJECTION 2 18:17 SEP 5, 1982
AREA %

RT	AREA	TYPE	AREA %
0.29	33483.70	EB	37.698
0.47	1562.95	9V	1.760
0.61	1865.14	VV	2.100
0.77	3267.94	VV	2.557
0.91	80.12	VV	0.090
1.03	109.37	VB	0.122
1.68	1756.54	PB	1.927
2.71	333.10	EP	3.381
3.14	24727.19	FB	27.839
4.09	23231.79	SB	25.930

El tiempo de análisis se acorta con esta columna de 8 minutos a 5 minutos. Los picos de la Lincomicina A ($T_r=3.14$) y el del estándar interno ($T_r=4.09$) son simétricos pero anchos, y se logra detectar el pico de la Lincomicina B ($T_r=2.71$). La detección de la Lincomicina B se logra por el aumento en el espesor de la fase estacionaria. Esto último se demuestra al comparar las razones de fase (β), ya que la β para la columna capilar es de 312.5, y la β para la columna megabore es igual a 110.42, es decir, hay mayor volumen de fase estacionaria en la columna megabore. Al aumentar el espesor de película de la fase líquida se bloquean los sitios

activos residuales en la pared del tubo capilar, eliminándose así la adsorción de los solutos polares, que provoca la aparición de picos asimétricos.

Se observa que la resolución de la Lincomicina B con respecto a la A no es muy buena ($R_s=0.88$), pero ésta se puede mejorar, si se disminuye la temperatura del horno.

Por último, se probó una columna no polar de RSL-150 (metilpolisiloxano), de 12 m de longitud, 0.2 mm de diámetro interno, 0.33 μm de espesor de la película.

Las condiciones de trabajo, fueron:

Flujos

Split: 46.50 ml/min
Purga: 5.81 ml/min
 H_2 columna: 2.93 ml/min
 H_2 detector: 27.27 ml/min
 N_2 detector: 27.27 ml/min
Aire detector: 375.00 ml/min
Relación de split: 16:1

Temperaturas

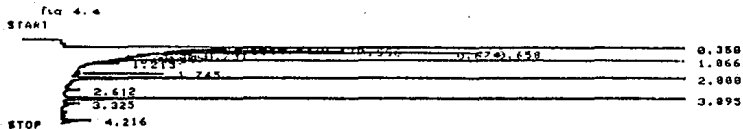
Temp. inyector: 300°C
Temp. detector: 300°C
Temp. horno: 290°C

Equipo

Cromatógrafo de Gases: HP 5890
Integrador: HP 3395A

Esta columna es la adecuada para el método desarrollado, por las siguientes cualidades: el tiempo de análisis es corto (4 min), los picos de interés son simétricos y la señal de la Lincomicina B ($T_r=1.745$) se resuelve bien ($R_s=5.88$) de la Lincomicina A ($T_r=2.000$)

Además esta columna es más eficiente que todas las anteriores con 25,000 platos efectivos, es decir, 2,000 platos por m.



RUN# 5 JAN 1, 1981 01113:55

AREAS

RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREA%
.353	20205048	SBB	.017	76.95843
.368	3694957	TBB	.008	21.69050
.435	232	TBV	.007	.00000
.446	116	TPV	.007	.00044
.504	231	TPV	.011	.00000
.556	1360	PV	.010	.00521
.658	2039	VV	.011	.01001
.674	2379	VV	.011	.00906
.731	446	VV	.013	.00170
.814	306	PV	.029	.00147
.855	215	VP	.016	.00082
.919	194	VV	.013	.00074
.983	211	VP	.020	.00080
1.866	8382	VB	.015	.03192
1.213	491	PP	.021	.00187
1.745	1736	PB	.025	.00461
2.000	177686	PB	.028	.67645
2.612	421	VV	.037	.00160
3.095	155886	PB	.041	.59296
3.325	651	VV	.052	.00248
4.216	1171	PV	.049	.00446

Es posible disminuir aún más el tiempo de análisis, empleando una columna con las mismas características que la anterior, pero con una longitud menor (8.5m), como se observa en el siguiente cromatograma, cuyas condiciones fueron:

Flujos

Split 40.00 ml/min
 Purga 4.75 ml/min
 H₂ columna. 0.90 ml/min
 H₂ detector: 25.30 ml/min
 H₂ detector: 25.00 ml/min
 Aire detector. 364.00 ml/min

Relación de split: 40:1

Temperaturas

Temp. inyector: 290°C

Temp. detector: 290°C

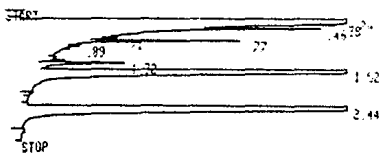
Temp. horno: 280°C

Equipo

Cromatógrafo de Gases: HP 5890

Integrador: HP 3390A

Fig 4.5



RUN # 11
WORKFILE ID: C
WORKFILE NAME:

AREA%	RT	AREA TYPE	AR/HT	AREA%
	0.24	1.4946E+07 TSPB	0.030	36.756
	0.38	1586 DTBP	0.012	0.010
	0.46	5831 DTBP	0.027	0.033
	0.71	586 DTVP	0.024	0.003
	0.77	6386 TYP	0.028	0.041
	0.89	381 DTBP	0.026	0.002
	1.32	4597 PP	0.041	0.030
	1.52	263130 PB	0.049	1.704
	2.44	213340 PB	0.072	1.382

La resolución entre la Lincomicina A ($T_r=1.52$) y la Lincomicina B ($T_r=1.32$) es de 2.79 con 8,000 platos teóricos efectivos (900 platos/m) de la columna.

IV.4 Condiciones de Operación

Una vez elegida la columna se procede a optimizar las condiciones de operación, para ello se debe considerar:

1o. Que el pico de la Lincomicina B se resuelva bien y que la señal producida por éste sea reproducible de inyección a inyección.

2o. Que el tiempo de análisis no sea muy largo.

Como la columna seleccionada es de diámetro pequeño y película delgada es posible aumentar el flujo de hidrógeno de 1 ml/min a 3 ml/min para acortar el tiempo de análisis, sin sacrificar la eficiencia de la columna.

Para hallar las condiciones óptimas de análisis se hicieron una serie de ensayos, en los cuales se mantuvieron todas las condiciones de operación constantes, excepto la temperatura del horno, la cual se modificó de 10°C en 10°C. Los cromatogramas obtenidos se muestran a continuación:

Condiciones

Columna

Fase estacionaria: Metil Silicón entrecruzado

Espesor de la Película: 0.33 µm

Diámetro interno: 0.20 mm

Longitud: 12.00 m

Flujos

Split: 46.50 ml/min

Purga: 5.61 ml/min

H₂ columna: 2.93 ml/min

H₂ detector: 27.27 ml/min

N₂ detector: 27.27 ml/min

Aire detector: 375.00 ml/min

Relación de Split: 16:1

Presiones

12 PSI

10 PSI

30 PSI

27 PSI

Temperaturas

Temp. inyector: 300°C

Temp. detector: 300°C

Equipo

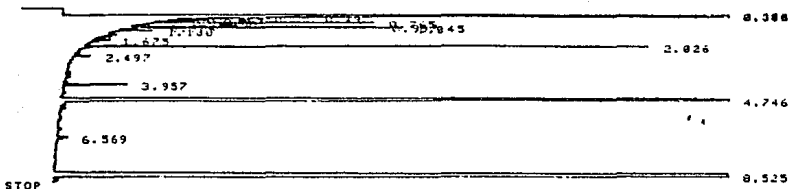
Cromatógrafo de Gases: HP 5890

Integrador: HP 3396 A

Temp. horno: 260°C

fig 4. d

* RUN # 2 JAN 1, 1981 08:48:02
START



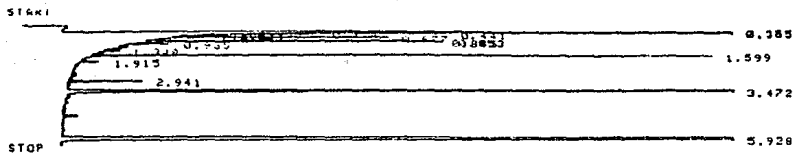
RUN# 2 JAN 1, 1981 08:48:02

AREA%

RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREA%
.356	22125200	SPB	.017	66.13645
.368	9453670	TBP	.010	28.25880
.388	1438498	TPB	.010	4.29995
.497	385	TBP	.009	.00115
.558	338	TPP	.012	.00099
.574	152	TPV	.011	.00045
.597	285	TVP	.011	.00085
.646	571	TPV	.017	.00171
.670	528	TVV	.021	.00158
.744	294	TPV	.016	.00088
.765	2022	TVB	.012	.00684
.974	103	PV	.011	.00055
.997	4014	VV	.023	.01200
1.045	3018	VB	.015	.00902
1.180	351	BP	.015	.00105
1.675	371	PP	.030	.00111
2.026	10491	VB	.026	.03136
2.497	419	VP	.033	.00125
3.957	2196	PP	.047	.00656
4.746	225839	PB	.061	.67500
6.569	726	PP	.091	.00217
8.525	104358	PP	.112	.35108

Temp. horno: 270°C

Fig 4.7



RUN# 3 JAN 1, 1981 00:59:17

AREA#

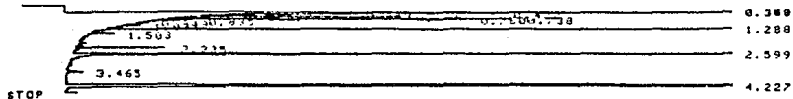
RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREA%
.355	22005000	SMB	.017	70.53334
.365	7999069	TBP	.009	25.64598
.385	709239	TPB	.008	2.53072
.441	749	TBP	.008	.00240
.474	428	TPV	.008	.00137
.490	135	TVP	.008	.00043
.515	235	TPP	.011	.00075
.534	135	TPV	.009	.00043
.550	204	TVP	.009	.00065
.589	454	TVV	.013	.00146
.606	190	TVV	.010	.00063
.677	1777	TVB	.011	.00570
.053	3975	PV	.010	.01274
.005	2930	VB	.014	.00939
.985	420	BP	.016	.00137
1.340	340	PP	.020	.00109
1.599	9045	PB	.022	.03156
1.915	530	VP	.036	.00172
2.941	1933	BB	.036	.00620
3.472	20113	PB	.044	.04479
5.928	170656	PB	.076	.54714

Temp. horno: 280°C

fig 4.8

* RUN 4 JAN 1, 1981 01186120

START: not ready



RUN 4 JAN 1, 1981 01186120

AREAX

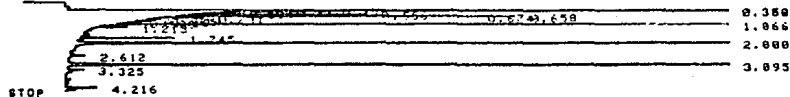
RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREAX
.349	7694186	PV	.086	25.91442
.358	21341392	VB	.014	72.72960
.422	333	BP	.005	.00113
.449	331	PV	.008	.00113
.495	185	PV	.008	.00036
.507	164	VP	.009	.00056
.537	490	PV	.013	.00170
.552	564	VV	.021	.00193
.605	2165	VV	.014	.00738
.738	3727	PV	.015	.01270
.760	2963	VB	.013	.01810
.835	451	BP	.014	.00154
.949	335	PV	.032	.00114
1.094	236	PV	.016	.00080
1.288	9814	PB	.018	.03345
1.503	447	BP	.027	.00152
2.235	1956	PV	.029	.00667
2.599	198169	PB	.033	.67534
3.465	500	VV	.045	.00170
4.227	175156	PB	.053	.59692

Temp. horno: 290°C

Fig 4. p

* RUN # 5 JAN 1, 1981 01113155

START



RUN# 5 JAN 1, 1981 01113155

AREA%

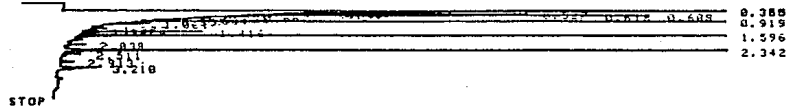
RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREA%
.353	28285848	SBB	.017	76.95843
.368	5694957	TBB	.008	21.69858
.435	232	TBV	.007	.00088
.446	116	TVP	.007	.00044
.504	231	TPV	.011	.00088
.556	1368	PV	.018	.00521
.658	2839	VV	.011	.01081
.674	2379	VV	.011	.00906
.731	446	VV	.013	.00170
.814	386	PV	.029	.00147
.855	215	VP	.016	.00082
.919	194	VV	.013	.00074
.983	211	VP	.028	.00080
1.066	8382	VB	.015	.03192
1.213	491	PP	.021	.00187
1.745	1736	PB	.025	.00661
2.000	177686	PB	.028	.67645
2.612	421	VV	.037	.00168
3.095	155686	PB	.041	.59296
3.325	651	VV	.052	.00248
4.216	1171	PV	.049	.00446

Temp. horno: 300°C

Fig 4.10

RUN# 1 JAN 1, 1981 08:37:47

START



RUN# 1 JAN 1, 1981 08:37:47

AREA#

RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREA#
.358	5728925	PV	.005	28.83683
.365	21439768	VB	.014	77.97613
.467	213	BP	.009	.00077
.487	393	PV	.011	.00143
.527	2007	VB	.011	.00738
.608	3670	BV	.012	.01335
.618	2755	VV	.011	.01002
.662	438	VP	.015	.00156
.728	425	PV	.023	.00155
.884	441	VP	.026	.00168
.857	217	PP	.017	.00079
.919	9813	VB	.015	.03278
1.021	515	PP	.018	.00187
1.272	419	PV	.027	.00152
1.342	262	VP	.026	.00095
1.416	2196	PV	.024	.00799
1.596	186511	PB	.023	.67834
2.838	368	BP	.028	.00131
2.342	114558	PB	.032	.41665
2.511	446	PP	.032	.00162
2.913	568	PV	.053	.00284
3.218	1237	PV	.044	.00458

De los cromatogramas anteriores se puede deducir que las condiciones óptimas de operación se obtienen con una temperatura del horno de 200°C. pues el pico de la Lincomicina B ($T_r=1.745$) sale justo después de la cola del disolvente, se resuelve perfectamente del pico de la Lincomicina A ($R_s=5.66$) y el tiempo de análisis es corto (4min). Se observa que a 300°C, el tiempo de análisis se acorta aun más (2.5min). sin embargo, el pico de la Lincomicina B ($T_r=1.416$) sale en la cola del disolvente y puede ocasionar una falta de reproducibilidad de la señal de inyección a inyección.

CAPITULO V. RESULTADOS

V.1 Linealidad del Sistema

Conc D : 8.503 mg/ml

No de muestra	No. de inyección	Conc LA (mg/ml)	ALA	Ad	$\frac{\text{Conc LA}}{\text{Conc D}} (\times)$	$\frac{\text{ALA}}{\text{Ad}} (y)$
0		0.0000	0	0	0.0000	0.0000
1	1o.	0.4745	186498	351144	0.5580	0.5311
2	1o.	0.4745	89273	159081	0.5580	0.5612
2	2o.	0.4745	87792	150636	0.5580	0.5827
3	1o.	0.7568	189287	215158	0.8900	0.8798
3	2o.	0.7568	184163	211430	0.8900	0.8710
4	1o.	0.7568	155666	172631	0.8900	0.9017
4	2o.	0.7568	138358	150771	0.8900	0.9177
5	1o.	0.9438	184989	164303	1.1100	1.1259
5	2o.	0.9438	195846	170086	1.1100	1.1515
6	1o.	0.9429	266571	243845	1.1089	1.0932
6	2o.	0.9429	258443	235045	1.1089	1.0995
7	1o.	1.1317	381415	297265	1.3309	1.2831
7	2o.	1.1317	323116	244737	1.3309	1.3203
8	1o.	1.1317	225866	174408	1.3309	1.2950
8	2o.	1.1317	220059	163182	1.3309	1.3485

V.2. Precisión del Sistema

$W_{\text{est int}} = 850.1 \text{ mg}$

No de muestra	No. de inyección	Peso de muestra (mg)	Area de LA	Area de est int	Factor de respuesta
1	1o.	110.3	145785	1473	0.9939
1	2o.	110.3	146325	1489	1.0010
2	1o.	110.1	127397	1301	0.9929
2	2o.	110.1	125962	1290	0.9931
3	1o.	110.0	99260	1014	1.0013
3	2o.	110.0	97873	992	1.0069
4	1o.	110.3	119136	1205	1.0091
4	2o.	110.3	123108	1257	1.0175
5	1o.	110.3	157048	1629	1.0199
5	2o.	110.3	151166	1551	1.0207
6	1o.	110.3	168731	1668	0.9936
6	2o.	110.3	165028	1762	1.0036
7	1o.	110.4	128086	1378	1.0043
7	2o.	110.4	128521	1441	1.0042
8	1o.	110.3	203786	2035	0.9995
8	2o.	110.3	199351	2004	0.9978

$\overline{Fr} = 1.0037$

$s = 0.0092$

$\%C. V. = 0.92 \%$

V 3 Precisión del Método

A) Repetibilidad

B) Reproducibilidad

b. 1) Analista 1 Día 1

Marbete: 500mg/cápsula

No. de muestra	No. de inyección	mg de LA peso promedio	Porcentaje respecto al marbete	mg de LA peso promedio
1	1o.	502.36	100.47	9.81
1	2o.	510.20	102.04	9.71
2	1o.	488.01	97.60	9.43
2	2o.	506.10	101.22	9.72
3	1o.	502.27	100.45	9.76
3	2o.	498.78	99.76	9.50
4	1o.	495.04	99.21	9.60
4	2o.	495.02	99.20	9.66
5	1o.	485.84	97.17	9.60
5	2o.	492.42	98.48	9.35
6	1o.	467.19	93.44	8.33
6	2o.	476.34	95.27	9.04
7	1o.	493.77	98.75	9.63
7	2o.	497.28	99.46	9.53
8	1o.	509.24	101.85	9.82
8	2o.	<u>500.70</u>	<u>100.14</u>	<u>9.69</u>
		$\bar{x} = 495.41$	$\bar{x} = 99.28$	$\bar{x} = 9.57$
		%C.V. = 1.83	%C.V. = 1.83	%C.V. = 2.16
		s = 9.08	s = 1.82	s = 0.21

Nota: Se usó el factor de respuesta de la Lincomicina A para hacer los cálculos de la Lincomicina B. pues no se cuenta con el estándar de referencia de esta última.

b. 2) Analista 2 Dia 2

No. de muestra	<u>mg de La</u> <u>peso promedio</u>	Porcentaje respecto al marbete.	<u>mg de La</u> <u>peso promedio</u>
1	501.66	100.33	9.68
2	497.49	99.50	9.51
3	500.19	100.04	9.70
4	520.51	104.10	10.16
5	510.08	102.02	10.22
6	491.51	98.38	9.50
7	507.08	101.42	10.33
8	496.90	99.38	9.58
	$\bar{x} = 503.18$	$\bar{x} = 100.65$	$\bar{x} = 9.84$
	$s = 9.12$	$s = 1.81$	$s = 0.34$
	%C. V. = 1.81	%C. V. = 1.80	%C. V. = 3.49

V.4 Estabilidad de la Muestra. (Temperatura Ambiente. 24 horas)

No. de muestra	No. de inyección	mg de LA peso promedio	Porcentaje respecto al marbete	mg de Ln peso promedio
1	1o.	500.57	100.11	9.58
1	2o.	495.92	99.18	9.41
2	1o.	503.13	100.63	9.70
2	2o.	494.23	98.85	9.61
3	1o.	512.98	102.60	10.00
3	2o.	507.32	101.46	9.58
4	1o.	503.29	100.66	9.62
4	2o.	502.80	100.56	9.50
5	1o.	522.67	104.53	10.18
5	2o.	513.18	102.64	10.19
6	1o.	519.24	103.85	10.01
6	2o.	<u>514.01</u>	<u>102.80</u>	<u>9.82</u>
		$\bar{x} = 507.45$	$\bar{x} = 101.49$	$\bar{x} = 9.77$
		$s = 8.99$	$s = 1.80$	$s = 0.27$
		%CV = 1.77	%CV = 1.77	%CV = 2.74

V.5 Linealidad y Exactitud del Método :

No. de muestra	Cantidad adicionada (mg) x	Cantidad recuperada (mg) y	Porcentaje de recuperación. (%)
1	0.00	0.00	0.00
2	27.46	27.28	99.34
3	27.54	28.39	103.09
4	27.63	27.17	98.34
5	27.63	28.24	102.21
6	27.63	28.52	103.22
7	27.63	29.16	105.54
8	43.93	42.03	95.67
9	44.02	43.59	99.02
10	44.02	45.34	103.00
11	44.02	45.93	104.34
12	44.10	42.55	96.49
13	44.10	43.37	98.34
14	54.91	56.65	103.17
15	55.00	56.90	103.45
16	55.17	55.92	101.36
17	66.15	66.95	101.21
18	66.15	67.45	101.97

V. 6 Especificidad

A) Cromatograma del Placebo solo :
fig. 5.4

* TIME 0 INTC # -9 9
* RUN # 3 APR 27, 1989 12:50:25
START



RUN# 3 APR 27, 1989 12:50:25

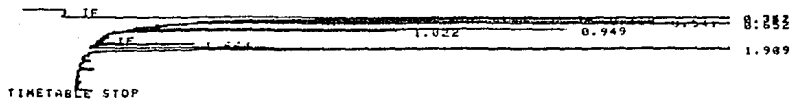
AREA#

RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREA#
.339	6363274	PV	.009	48.81978
.349	7990816	VV	.013	58.25558
.367	1521934	VB	.008	9.57178
.498	2443	PV	.013	.81338
.498	338	VP	.011	.88288
.538	3714	PP	.014	.92336
.648	8174	P8	.017	.85141
.945	4189	P8	.018	.82584
1.818	4916	B8	.019	.83892
2.976	642	I 8H	.041	.88484

B) Cromatograma del Placebo con Clorhidrato de Lincomicina estándar :
 fig 5.2

* RUN # 4 APR 27. 1989 12:55:39

START



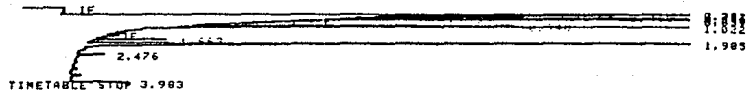
RUN# 4 APR 27. 1989 12:55:39

AREAX

RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREAX
.341	6662728	PV	.009	38.58322
.352	10358376	VB	.017	59.98443
.468	3861	PV	.014	.01773
.494	393	VP	.011	.00228
.541	4325	PP	.014	.02585
.652	10769	PP	.017	.06236
.949	5939	PV	.019	.03439
1.022	4122	VB	.021	.02307
1.664	2290	VB	.032	.01326
1.989	216459	PB	.033	1.25349

C) Cromatograma del Clorhidrato de Lincomicina estándar solo :
 (Fig 3.3)

* RUN 0 3 APR 27, 1989 13:02:47
 START



TINETABLE STOP 3.903

RUN 0 5 APR 27, 1989 13:00:49

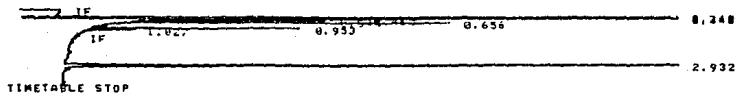
AREAX

RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREAX
.341	6578637	PV	.009	39.93315
.352	9635795	VB	.016	58.63794
.460	2732	VV	.015	.01673
.493	548	VP	.011	.00323
.540	5255	BV	.014	.03198
.639	5892	VV	.012	.03099
.631	11634	VV	.016	.07000
.703	302	PV	.026	.00354
.940	5015	PV	.020	.03052
1.022	10276	VB	.021	.11122
1.663	1032	PB	.033	.01113
1.905	172579	PD	.033	1.05022
2.476	809	PD	.042	.00541
3.903	1010	IBH	.040	.01101

D) Cromatograma del Estándar interno solo :
fig 5.4

RUN 18 APR 27, 1989 13:24:54

START



RUN# 18 APR 27, 1989 13:24:54

AREA#

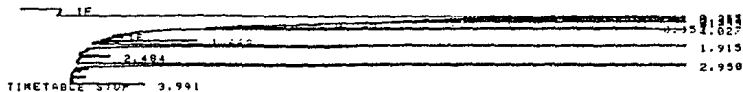
RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREA*
.343	499864	BB	.002	74.21347
.449	18338	PV	.012	1.87844
.465	13258	VV	.033	2.39916
.545	12837	VV	.037	2.32438
.656	15668	VV	.048	2.83553
.953	3431	PV	.021	.62125
1.027	933	VB	.024	.16894
2.932	85972	PD	.845	15.56682

E) Cromatograma del Clorhidrato de Lincomicina estándar con estándar interno :

Fig 5.5

RUN # 6 APR 27. 1989 13186118

START



RUN# 6 APR 27. 1989 13186118

AREA#

RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREA%
.342	6916893	PV	.018	37.62938
.755	18945672	VB	.018	59.85562
.164	3667	BV	.016	.01935
.496	687	VV	.014	.00338
.344	6519	VV	.017	.03546
.787	1185	VV	.032	.00681
.655	19714	VV	.026	.10725
.798	762	PV	.027	.00415
.952	7191	PV	.022	.03912
1.027	23645	VB	.023	.12863
1.668	2686	PB	.034	.01418
1.915	247997	PB	.035	1.34916
2.484	946	BB	.041	.00515
2.950	182258	PD	.048	.99152
3.991	2871	IBH	.035	.01127

CAPITULO VI. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

VI.1 Linealidad del Sistema

Con este experimento se pretende demostrar que la respuesta medida es directamente proporcional a la concentración del estándar dentro de un intervalo dado. Para ello se construyó una curva de calibración con 4 puntos (50%, 80%, 100% y 120% preparados por duplicado).

Para evaluar la relación existente de la razón de Área Lincomicina/Área estándar interno en función de la razón de Concentración Lincomicina/Concentración estándar interno se hizo la regresión lineal de todos los datos y se encontró:

- 1) Ordenada al origen, $b=0.0095$
- 2) Pendiente = Factor de Respuesta, $Fr=0.9876$
- 3) Coeficiente de regresión, $r=0.9970$
- 4) Coeficiente de determinación, $r^2=0.9957$

Con estos resultados se puede construir la siguiente ecuación

$$\frac{A_{la}}{A_{stint}} = Fr \frac{C_{la}}{C_{stint}} + b$$

$$\frac{A_{la}}{A_{stint}} = 0.9876 \frac{C_{la}}{C_{stint}} + 0.0095$$

5) La prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen es :

H₀: $b=\beta$, $\beta=0$

H₁: $b \neq 0$

6) El estadístico empleado para b, es :

$$t_{calc} = \frac{(b-\beta)}{S_e} \sqrt{\frac{nS_{xx}}{S_{xx} + (n\bar{X})^2}}$$

Donde :

$$\bar{X} = 0.9372$$

$$S_{xx} = n \sum_{i=1}^n X_i^2 - \left[\sum_{i=1}^n X_i \right]^2 = 32.930$$

$$S_{yy} = n \sum_{i=1}^n Y_i^2 - \left[\sum_{i=1}^n Y_i \right]^2 = 32.246$$

$$S_{xy} = n \sum_{i=1}^n X_i Y_i - \left[\sum_{i=1}^n X_i \right] \left[\sum_{i=1}^n Y_i \right] = 32.5094$$

$$S_e^2 = \frac{S_{xx} S_{yy} - (S_{xy})^2}{n(n-2) S_{xx}} = 0.0007$$

$$t_{\text{cate}} = 0.5204$$

7) Se trata de una región bilateral o de " dos colas " con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, y g.l. = $n-2 = 15-2 = 14$.

Para rechazar H_0 :

$$t < -t_{\alpha/2} \quad \text{ó} \quad t > t_{\alpha/2}$$

$$t < -t_{0.025} \quad \text{ó} \quad t > t_{0.025}$$

Donde :

$$-t_{0.025} = -2.145$$

$$t_{0.025} = +2.145$$

8) Conclusión : Como $-2.145 < 0.5204 < 2.145$, se acepta la hipótesis nula, es decir, la ordenada al origen es igual a 0.

9) Cálculo del intervalo de confianza del 95% para la ordenada al origen :

$$b \pm t_{\alpha/2} S_e \sqrt{\frac{S_{xx} + (n\bar{X})^2}{nS_{xx}}}$$

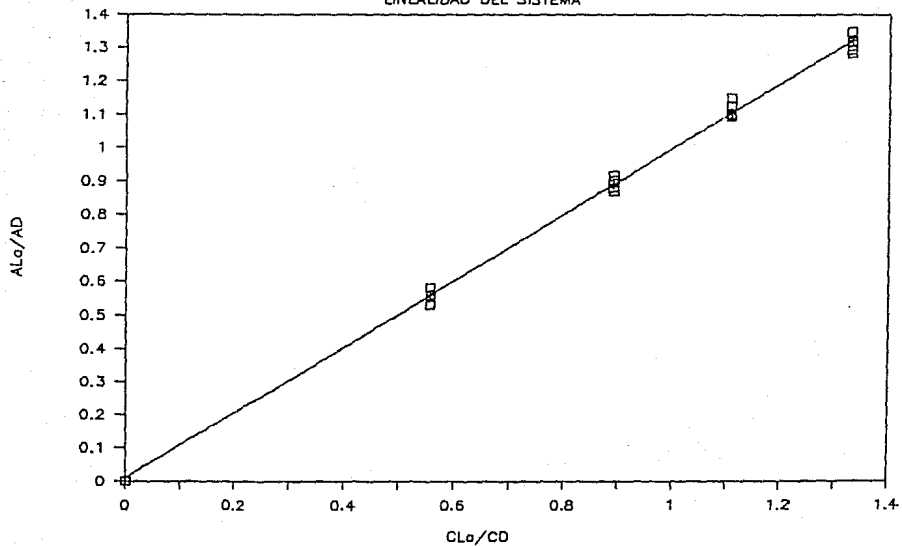
$$0.0095 \pm 0.0362$$

$$-0.0267 < \beta < 0.0467$$

10) Nota: Se puede hacer una prueba de hipótesis sobre el coeficiente de correlación, pero la potencia de esta prueba es tan baja que generalmente se acepta la correlación. Además en la figura 6.1 se observa que es una línea recta.

FIGURA 6.1

LINEALIDAD DEL SISTEMA



VI.2 Precisión del Sistema

Se analizaron 8 soluciones estándar del Clorhidrato de Lincomicina al 100% para conocer el grado de concordancia de los resultados de las diferentes determinaciones. Para ello, se calculó el factor de respuesta para cada inyección, y se encontró:

1) Media, $\overline{Fr} = 1.0037$

2) Varianza, $s^2 = 8.484 \times 10^{-5}$

3) Desviación estándar, $s = 0.0092$

4) Coeficiente de variación, %CV = 0.92%

5) La prueba de hipótesis propuesta es:

H₀: $s^2 = \sigma^2$ donde $\sigma^2 = 0.0004$

H₁: $s^2 > \sigma^2$

6) El estadístico de prueba utilizado es:

$$\chi^2 = \frac{(n-1)s^2}{\sigma^2} = 3.174$$

7) Con una región unilateral, un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$, g.l. = 16-1 = 15

Para rechazar H₀:

$$\chi^2_{\text{calc}} > \chi^2_{\alpha}$$

$$\chi^2_{\text{calc}} > \chi^2_{0.05}$$

$$\chi^2_{0.05} = 24.996$$

8) Conclusión: Como $\chi^2_{\text{calc}} < \chi^2_{\alpha}$; $3.174 < 24.996$. La hipótesis nula se acepta, el sistema es preciso, con un error del 2% como máximo.

9) Cálculo del intervalo de confianza del 95% para s :

$$IC = \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_2}} < \sigma < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_1}}$$

Donde:

$$\chi^2_1 = \chi^2_{0.025} = 6.252$$

$$\chi^2_2 = \chi^2_{0.975} = 27.488$$

$$IC = 0.0068 < \sigma < 0.0142$$

$$IC = 0.0068 < 0.0092 < 0.0142$$

VI.3 Linealidad del Método

La linealidad del Método se determina al ensayar por sextuplicado placebos adicionados del clorhidrato de Lincomicina estándar al 50%, 80%, 100% y 120% del valor esperado .

Algunos valores se rechazaron debido a que la prueba de hipótesis sobre los mismos demostró que se encontraban fuera del cinturón de confianza de la regresión.

Por lo tanto quedan únicamente 18 datos que son :

Cantidad adicionada	Cantidad recuperada	% de Recuperación
0.00	0.00	0.00
27.46	27.28	99.34
27.54	28.39	103.08
27.63	27.17	98.34
27.63	28.24	102.21
27.63	28.52	103.22
27.63	29.16	105.54
43.93	42.03	95.67
44.02	43.59	99.02
44.02	45.34	103.00
44.02	45.93	104.34
44.1	42.55	96.49
44.1	43.37	98.34
54.91	56.65	103.17
55.00	56.90	103.45
55.17	55.92	101.36
66.15	66.95	101.21
66.15	67.45	101.97

Haciendo la regresión lineal de los 18 datos, se obtiene :

- 1) Pendiente, $m = 1.0154$
- 2) Ordenada al origen, $b = -0.1576$
- 3) Media, $\bar{X} = 40.3930$
- 4) Coeficiente de regresión : 0.9978
- 5) Coeficiente de determinación : 0.9956
- 6) Número de determinaciones : 18
- 7) Número de grados de libertad : 16
- 8) Error típico de estimación : $S_e = 1.1496$
- 9) Suma de cuadrados de la variable independiente, $S_{xx} = 89959.31$
- 10) Para comprobar que el método es lineal se hacen las pruebas de hipótesis para la ordenada al origen y para la pendiente. La prueba de hipótesis para la ordenada al origen es :
 $H_0: b = \beta$, donde $\beta = 0$
 $H_1: b \neq 0$.
- 11) El estadístico de prueba para b, es :

$$t_{\text{calc}} = \frac{(b - \beta)}{S_e} \sqrt{\frac{n S_{xx}}{S_{xx} + (n \bar{X})^2}}$$

Donde :

$$\bar{X} = 40.39$$

$$S_{xy} = 85251.05$$

$$S_e^2 = \frac{S_{xx} S_{yy} - (S_{xy})^2}{n(n-2) S_{xx}} = 1.3216$$

$$S_e = 1.1496$$

Por lo tanto :

$$t_{\text{calc}} = -0.2153$$

- 12) Se trata de una región bilateral, con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$, y con $n-2 = 18-2 = 16$ grados de libertad. Para rechazar H_0 :

$$t < -t_{\alpha/2} \text{ ó } t > t_{\alpha/2}$$
$$t < -t_{0.025} \text{ ó } t > t_{0.025}$$

$$-t_{0.025} = -2.120$$

$$t_{0.025} = 2.120$$

13) Conclusión: Como $-2.120 < -0.2153 < 2.120$, se acepta la hipótesis nula, es decir, la ordenada al origen es igual a 0.

14) La prueba de hipótesis para la pendiente es:

$H_0: m = \gamma$, donde $\gamma = 1$

$H_1: m \neq \gamma$

15) El estadístico de prueba es:

$$t_{\text{calc}} = \frac{(m - \gamma)}{S_e} \sqrt{\frac{S_{xx}}{n}}$$

$$t_{\text{calc}} = 0.9149$$

16) Como es una región bilateral con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$, con $n-2 = 18$ grados de libertad.

Para rechazar H_0 :

$$t < -t_{\alpha/2} \text{ ó } t > t_{\alpha/2}$$

$$t < -t_{0.025} \text{ ó } t > t_{0.025}$$

$$-t_{0.025} = -2.120$$

$$+t_{0.025} = 2.120$$

17) Conclusión: Como $-2.120 < 0.9149 < 2.120$ se acepta H_0 , por lo tanto, la pendiente es igual a 1. Se concluye que el método es lineal, pues ambas hipótesis fueron aceptadas.

18) Cálculo del intervalo de confianza del 95% para la ordenada al origen:

$$b \pm t_{\alpha/2} \cdot S_e \sqrt{\frac{S_{xx} + (n - 1)\bar{x}^2}{nS_{xx}}}$$

$$-0.1576 \pm 1.55$$

$$-1.7076 < b < 1.3924$$

19) Cálculo del intervalo de confianza del 95% para la pendiente:

$$m \pm t_{\alpha/2} \cdot S_e \sqrt{\frac{n}{S_{xx}}}$$

$$1.0154 \pm 0.0357$$

$$0.9797 < m < 1.0511$$

VI.4 Exactitud del Método

Con los resultados de los porcentajes recuperados de los placebos adicionados del estándar al 50%, 80%, 100% y 120% puede evaluarse la exactitud del método. Para ello deben considerarse los siguientes datos :

- 1) Media del porcentaje recuperado , $\bar{x} = 101.18$
- 2) Desviación estándar, $s = 2.82$
- 3) Coeficiente de variación , %CV = 2.79%
- 4) Error estándar, $s/\sqrt{n} = 0.68$
- 5) Número de determinaciones, $n = 17$
- 6) Grados de libertad, $n-1 = 16$
- 7) La prueba de hipótesis propuesta es :
Ho : $\bar{x} = \mu$, donde $\mu = 100\%$
Hi : $\bar{x} \neq \mu$
- 8) El estadístico utilizado es :

$$t_{\text{calc}} = \frac{\bar{x} - \mu}{s/\sqrt{n}} = 1.7059$$

- 9) Se trata de una región bilateral o " de dos colas " con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$
Para que Ho se rechace :

$$t < -t_{\alpha/2} \text{ ó } t > t_{\alpha/2}$$
$$t < -t_{0.025} \text{ ó } t > t_{0.025}$$

Donde :

$$-t_{0.025} = -2.120$$

$$+t_{0.025} = 2.120$$

- 10) Conclusión : Como $-2.120 < 1.7059 < 2.120$ se acepta la hipótesis nula y por tanto, se concluye que el método es exacto.
11) Cálculo del intervalo de Confianza del 95% para la media :

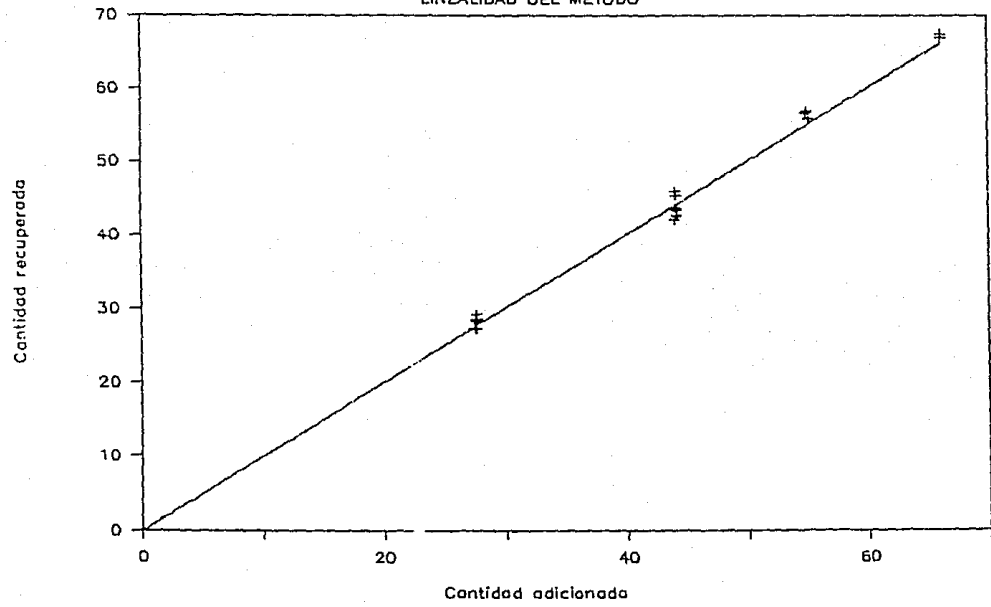
$$I.C. : \bar{x} \pm t_{\alpha/2} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$I.C. : 101.18 \pm 1.44$$

$$I.C. : 99.72 < \bar{x} < 102.60$$

FIGURA 6.2

LINEALIDAD DEL METODO



VI.5 Precisión del Método

A) Repetibilidad

Para evaluar la repetibilidad del método se analizaron por duplicado 8 soluciones preparadas a partir de una muestra homogénea del producto (cápsulas). Estos mismos datos corresponden a los del analista 1, día 1 del experimento de reproducibilidad.

1) La media del porcentaje encontrado es : $\bar{x} = 99.28\%$

2) Desviación estándar, $s = 1.82\%$

3) Coeficiente de variación, % C.V. : 1.83%

4) Error estándar : $s/\sqrt{n} = 0.48$

5) Número de determinaciones : $n = 16$

6) Número de grados de libertad, $n-1 = 15$

7) Varianza, $s^2 = 3.31$

8) La prueba de hipótesis establecida es :

H₀: $s^2 = \sigma^2$, donde $\sigma^2 = 4$

H₁: $s^2 > \sigma^2$

9) El estadístico de prueba es :

$$\chi^2_{\text{calc}} = \frac{(n-1)(s^2)}{\sigma^2} = 12.41$$

10) Con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ y 15 grados de libertad.

Para rechazar H₀:

$$\begin{aligned}\chi^2_{\text{calc}} &> \chi^2_{\alpha} \\ \chi^2_{\text{calc}} &> \chi^2_{0.05}\end{aligned}$$

Donde $\chi^2_{0.05} = 24.996$

11) Conclusión : Como $\chi^2_{\text{calc}} < \chi^2_{0.05}$: $12.41 < 24.996$. La hipótesis nula se acepta, con un error del 2% como máximo, por lo tanto, el método es preciso (repetible).

12) Cálculo del intervalo de confianza del 95% para s :

$$I.C. = \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_2}} < \sigma < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_1}}$$

Donde :

$$\chi^2_1 : \chi^2_{0.975} = 6.262$$

$$\chi^2_2 : \chi^2_{0.025} = 27.488$$

I.C. = 1.34% < 0 < 2.62%
 I.C. = 1.34% < 1.82% < 2.82%

B) Reproducibilidad

Para demostrar que el método es reproducible, se prepararon 8 soluciones, a partir de una muestra homogénea del producto (cápsulas) por el analista 1 en el día 1, y se prepararon otras 8 soluciones de la misma muestra, pero de manera independiente por el analista 2 día 2.

Para evaluar la reproducibilidad de dos analistas en dos diferentes días (día 1 y día 2), es posible, comparar las varianzas y las medias de los dos días y de los dos analistas, con los siguientes datos :

- 1) Media del día 1 analista 1 : $\bar{x}_1 = 99.28\%$
- 2) Desviación estándar del día 1 analista 1 : $s_1 = 1.62\%$
- 3) Varianza del día 1 analista 1 : $s_1^2 = 3.31$
- 4) Coeficiente de variación del día 1 analista 1 : % C.V. = 1.63%
- 5) Media del día 2 analista 2 : $\bar{x}_2 = 100.85\%$
- 6) Desviación estándar del día 2 analista 2 : $s_2 = 1.81\%$
- 7) Varianza del día 2 analista 2 : $s_2^2 = 3.28$
- 8) Coeficiente de variación del día 2 analista 2 : % C.V. = 1.80%
- 9) Prueba de hipótesis sobre las varianzas :

$$H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2$$

$$H_1 : \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$$

- 10) El estadístico de prueba es :

$$F = \frac{s_M^2}{s_m^2} = \frac{s_1^2}{s_2^2} = 1.01$$

- 11) Grados de libertad para la varianza mayor, $n_M - 1 : 16 - 1 = 15$
- 12) Grados de libertad para la varianza menor, $n_m - 1 : 8 - 1 = 7$
- 13) Se trata de una región bilateral o " de dos colas ", con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

Para rechazar H_0 :

$$F > F_{\alpha/2}$$

$$F > F_{0.025}$$

Donde $F_{0.025} = 4.57$

14) Conclusión : Como $F_{calc} < F_{0.025}$: $1.01 < 4.57$. La hipótesis nula se acepta, es decir, las varianzas de las dos muestras independientes analizadas por diferentes analistas en días distintos son iguales.

15) Prueba de hipótesis sobre las medias :

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 : \mu_1 \neq \mu_2$$

16) El estadístico de prueba es :

$$\text{Para } \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma^2 \text{ y } n_1 \neq n_2$$

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}} \quad \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

$$t = -1.74$$

17) Los grados de libertad para la distribución t son : $n_1 + n_2 - 2 = 22$.

18) Se trata de un ensayo bilateral o " en dos sentidos " con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

Para rechazar H_0 :

$$t < t_{-\alpha/2} \text{ ó } t > t_{\alpha/2}$$

$$t < t_{-0.025} \text{ ó } t > t_{0.025}$$

Donde :

$$-t_{0.025} = -2.074$$

$$+t_{0.025} = 2.074$$

19) Conclusión : Como $t_{-0.025} < t_{calc} < t_{0.025}$: $-2.074 < -1.74 < 2.074$, la hipótesis nula se acepta, es decir, la media para ambos analistas en los dos días es la misma. Se concluye que el método es preciso (reproducible), pues la varianza y la media son iguales para los dos analistas en los dos días distintos.

VI.6 Estabilidad de la Muestra

Para comprobar que la muestra es estable, se almacenaron las muestras preparadas por el analista 1 día 1 del experimento de reproducibilidad a temperatura ambiente por 24 horas, se analizaron y los datos obtenidos se contrastaron con los del día anterior, según :

- 1) Media del día 1 : $\bar{x}_1 = 99.28\%$
- 2) Desviación estándar del día 1 : $s_1 = 1.82\%$
- 3) Varianza del día 1 : $s_1^2 = 3.31$
- 4) Coeficiente de variación del día 1 : % C.V. = 1.82%
- 5) Media del día 2 : $\bar{x}_2 = 101.49\%$
- 6) Desviación estándar del día 2 : $s_2 = 1.80\%$
- 7) Varianza del día 2 : $s_2^2 = 3.24$
- 8) Coeficiente de variación del día 2 : % C.V. = 1.77%

9) Pruebas de hipótesis sobre varianzas :

$$H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2$$

$$H_1 : \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$$

10) El estadístico de prueba es :

$$F = \frac{s_M^2}{s_m^2} = \frac{s_1^2}{s_2^2} = 1.02$$

- 11) Grados de libertad para la varianza mayor : $n_M - 1 : 16 - 1 = 15$
- 12) Grados de libertad para la varianza menor : $n_m - 1 : 12 - 1 = 11$
- 13) Se trata de una región bilateral o " de dos colas ", con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$

Para aceptar H_0 : $F < F_{\alpha/2}$

$$F < F_{0.025}$$

Donde :

$$F_{0.025} = 3.33$$

14) Conclusión : Como $F_{calc} < F_{0.025} : 1.02 < 3.33$. La hipótesis nula se acepta, es decir, que la varianza de las muestras almacenadas 24 horas a temperatura ambiente y sin almacenar es la misma.

15) Prueba de hipótesis sobre las medias .

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 : \mu_1 \neq \mu_2$$

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

16) El estadístico de prueba es :

Para $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma^2$ y $n_1 \neq n_2$:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}} \sqrt{\frac{(n_1 + n_2 - 2) n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$$

$$t = -1.22$$

17) Los grados de libertad para la distribución t son : $n_1 + n_2 - 2 = 26$.

18) Se trata de una región bilateral, con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$

Para rechazar H_0 :

$$t < -t_{\alpha/2} \text{ o } t > t_{\alpha/2}$$
$$t < -t_{0.025} \text{ o } t > t_{0.025}$$

Donde :

$$-t_{0.025} = -2.056$$

$$+t_{0.025} = +2.056$$

19) Conclusión : Como $-t_{0.025} < t_{calc} < t_{0.025}$: $-2.056 < -1.22 < +2.056$, la hipótesis nula se acepta, es decir, la media para las muestras almacenadas y sin almacenar es la misma. Por lo tanto, las muestras son estables por 24 horas a temperatura ambiente.

VI.7 Precisión del Método (Lincomicina B)

Para el caso de la Lincomicina B como no se cuenta con un estándar de referencia, únicamente puede evaluarse la precisión del método, considerando el mismo factor de respuesta que para la Lincomicina A.

A) Repetibilidad

Del mismo análisis que se utilizó para evaluar la repetibilidad del método para la Lincomicina A, se puede determinar la repetibilidad del método para la Lincomicina B.

1) La media de la cantidad de Lincomicina B por peso promedio : 9.57 mg/p.p.

2) La desviación estándar : $s = 0.21$ mg/p.p.

3) Coeficiente de variación : % C.V. = 2.16 %

4) Número de determinaciones : $n = 16$

5) Error estándar : $s/\sqrt{n} = 0.053$

6) Grados de libertad : $n-1 = 15$

7) Varianza : $s^2 = 0.041$

8) La prueba de hipótesis propuesta es :

$H_0 : s^2 = \sigma^2$, donde $\sigma^2 = 0.04$

$H_1 : s^2 > \sigma^2$

9) El estadístico de prueba es :

$$\chi^2_{\text{calc}} = \frac{(n-1)(s^2)}{\sigma^2} = 18.54$$

10) Con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ y 15 grados de libertad :

Para rechazar H_0 :

$$\begin{aligned}\chi^2_{\text{calc}} &> \chi^2_{\alpha} \\ \chi^2_{\text{calc}} &> \chi^2_{0.05}\end{aligned}$$

Donde :

$$\chi^2_{0.05} = 24.996$$

11) Conclusión : Como $\chi^2_{\text{calc}} < \chi^2_{0.05}$: $18.54 < 24.996$. La hipótesis nula se acepta. Por tanto, el método es preciso (repetible) para cuantificar a la Lincomicina B.

12) Cálculo del intervalo de confianza del 95% para s :

$$I.C. = \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_2}} < \sigma < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_1}}$$

Donde :

$$\chi^2_1 : \chi^2_{0.025} = 6.262$$

$$\chi^2_2 : \chi^2_{0.025} = 27.488$$

$$I.C. = 0.16 \text{ mg/p.p.} < \sigma < 0.33 \text{ mg/p.p.}$$

$$I.C. = 0.16 \text{ mg/p.p.} < 0.21 \text{ mg/p.p.} < 0.33 \text{ mg/p.p.}$$

VI.8 Especificidad del Metodo

Para demostrar que el método es específico se prepararon diferentes muestras silanizadas del Clorhidrato de Lincomicina solo, del placebo solo, del estándar interno solo y combinaciones como son placebo adicionado de Lincomicina estándar y Lincomicina adicionada del estándar interno, con el objeto de identificar las señales de cada uno de los componentes de la muestra y asegurar que no hay sobreposición de los picos.

Del cromatograma del placebo solo, se observa que con el sistema cromatográfico establecido no se detectan señales debidas a los excipientes. Los primeros picos que se observan son debidos al disolvente y a compuestos asociados al medio de reaccion, pues se repiten en los otros cromatogramas.

Los cromatogramas de Clorhidrato de Lincomicina estándar solo y con placebo son iguales, ya que como se menciona anteriormente los excipientes no dan señal. El tiempo de retención de 1.905 corresponde a la Lincomicina A y el de 1.653 corresponde a la Lincomicina B.

En el cromatograma del estándar interno solo, el pico de tiempo de retención de 2.932 se asocia al dotriacontano, pues esta señal no aparece en los cromatogramas anteriores.

VI.9 Conclusiones Generales

La fase estacionaria óptima para cuantificar el Clorhidrato de Lincomicina en columnas capilares es metilsilicón. El espesor de la película mínimo para este análisis es de 0.33 μm .

Debido a la alta selectividad y eficiencia de las columnas capilares con fase metilsilicón, es posible, reducir aún más el tiempo de análisis optimizando la separación con una columna más corta, o bien usando una columna de 12 m. pero aumentando el flujo del gas acarreador de 1 a 3 ml/min.

El polietilenglicol no sirve como fase estacionaria, ya que carece de selectividad y se debe trabajar a la temperatura máxima con tiempos de análisis muy largos.

La separación de la Lincomicina A y B se puede lograr utilizando como fase estacionaria metilsilicón, siempre y cuando se emplee una columna con una razón de fase menor de 312.5.

Con los resultados obtenidos se concluye que el método propuesto es confiable, pues cumple los requisitos de precisión, exactitud, linealidad y especificidad para poder ser utilizado como un método de control de calidad para la determinación del clorhidrato de Lincomicina en cápsulas.

El método propuesto presenta como ventajas ser un método más rápido (4 min) que el farmacopeico (7 min), permite cuantificar la Lincomicina B, los picos obtenidos son simétricos, el gas acarreador utilizado (Hidrógeno) es más barato que el gas acarreador recomendado por la USP XXI (Helio).

La principal desventaja es el costo de las columnas capilares que es mucho mayor que el de las empacadas. Sin embargo, debido a la alta eficiencia de estas columnas se requiere un menor número de ellas para cuantificar compuestos con diferentes propiedades. Otra desventaja es el peligro que representa trabajar con hidrógeno como gas acarreador. No obstante, si se siguen todas las recomendaciones de seguridad como son revisión de fugas tanto en el cilindro del gas como en el equipo y eliminación por combustión del hidrógeno que no entra a la columna y que de otro modo sería enviado a la atmósfera, se descarta casi por completo la posibilidad de una explosión.

Por otra parte, al realizar la reacción de silanización, se evapora parte del disolvente (cloroformo) y puede llegar a precipitar el estándar interno. Este problema se elimina adicionando disolvente después de efectuada la reacción a las muestras que lo requieran.

Si se desea emplear este método para cuantificar el clorhidrato de Lincomicina en otras formas farmacéuticas, es necesario, validar nuevamente el método para cada forma farmacéutica, pues se requiere demostrar que los excipientes utilizados en cada formulación no interfieren en el análisis (efecto de matriz).

CAPITULO VII. BIBLIOGRAFIA

- 1) Glasby, John S. "Encyclopaedia of Antibiotics". 2nd Edition. Ed John Wiley & Sons. London, Great Britain. 1979. p.p. 281, 282
- 2) Eble, T.E. " Lincomycin ". Antibiotics Biosynthesis .Vol 2. 1st Edition. Gottlieb and Shaw (Editors). Ed. Springer-Verlag. New York, U.S.A. 1967. p.p. 353 - 358.
- 3) Connors, Kenneth et al. " Chemical Stability of Pharmaceuticals. " Handbook for Pharmacists. 1st Edition. Editorial John Wiley & Sons. U.S.A. 1979. p.p. 250-254.
- 4) Windholz, Martha (Editor). " The Merck Index ". 9th Edition. Editorial Merck & Co. Inc. N. Jersey, U.S.A. 1976. p.p. 719
- 5) Argoudelis, A.D., J.A. Fox and T.E. Eble. " U-21,599 : A new Lincomycin-related antibiotic ". Biochemistry 4, 698-703. (1965).
- 6) Argoudelis, A.D., J.A. Fox, D.J. Mason and T.E. Eble " New Lincomycin-related antibiotics ". J. Am Chem. Soc. 86, 5044-5045 (1964)
- 7) Bowman, W.C. y Rand, M. J. " Farmacología. Bases Bioquímicas y Patológicas. Aplicaciones Clínicas ". 2^{da} Edición. Ed. Interamericana, México, D.F. 1984. 34.38, 34.39.
- 8) Weinstein, Louis. " Antimicrobial Agents ". The Pharmacological Basis of Therapeutics. 5th Edition Goodman y Gilman (Editors). Ed. Mac Millan Publishing Co. New York, U.S.A. 1975, p.p. 1227-1228.
- 9) Mandell, Gerald y Sande, Merie A. " Agentes Antimicrobianos " Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 7^{ma} Edición. Goodman y Gilman (Editores). Editorial Médica Panamericana. México, D.F., 1985. p.p. 1132-1134.
- 10) Alcántara, Merino. (Editor) " Farmacopaea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos ." 4^{ta} Edición. México, D.F. 1974. p.p. 938-941.
- 11) " The United States Pharmacopeia ". Twenty-first Revision. 16th Edition. Ed. Mack Printing Co. U.S.A. 1985. p.p. 595-598.
- 12) Mc. Nair, Harold. " Cromatografía de Gases ". Primera Edición. Ed. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Washington, D.C., U.S.A. 1981. p.p. 1-90.
- 13) Poole, Colin F. and Schuette, Sheila A. " Contemporary Practice of Chromatography ". 1st Edition. Ed. Elsevier Science

Publishers. Amsterdam, The Netherlands. 1984. p.p. 1-109, 145-205, 485-511.

14) Mc. Nair, Harold y Capella Santiago. " Curso sobre Cromatografía de Gases. Columnas Capilares. Facultad de Química. U.N.A.M. México, D.F. 1987. p.p. 1-38.

15) Dandaneau, Raymond et al. " Flexible Fused Silica Columns : An Advance in High Resolution Gas Chromatography ". Reprinted from American Laboratory. U.S.A. 1979. p.p.45-49.

16) Knapp, Daniel R. " Handbook of Analytical Derivatization Reactions . 1st Edition. Ed. John Wiley & Sons. U.S.A. 1979 p.p. 1-24, 33-39, 633.

17) Frei, R.W. and Lawrence, J.F. " Chemical Derivatization in Analytical Chemistry ". 1st Edition. Ed. Plenum Press. 1981 p.p. 127,128,134,135.

18) Inman, Eugene L. et al. " General Method Validation Guidelines for Pharmaceuticals Samples ". Journal of Chromatographic Science Vol. 25, 252-256. (1987).

19) Miller, Irwin y Freund, John. " Probabilidad y Estadística para Ingenieros ". 1^{era} Edición. Ed. Reverté. México, D.F. 1967. p.p. 150-159, 167-168, 215-220.