

100
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"VALIDACION DEL METODO ANALITICO PARA
CUANTIFICAR FUROSEMIDA EN SOLUCION
INYECTABLE POR C.L.A.R."

TRABAJO ESCRITO - VIA DE EDUCACION CONTINUA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

INGENIERO QUIMICO

P R E S E N T A

JOSE JULIO TORRES CAMPOS

1990

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

I.-	Introducción:	
1.1.-	Introducción.(02)
1.2.-	Objetivo.(03)
1.3.-	Generalidades:	
1.3.1.-	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	(04)
1.4.-	Validación de Métodos Analíticos.(11)
1.5.-	Estabilidad de la Furosemida.(25)
II.-	Parte Experimental:	
2.1.-	Introducción.(29)
2.2.-	Diseño del Trabajo:	
2.2.1.-	Método Analítico.(30)
2.2.2.-	Equipo utilizado.(32)
2.2.3.-	Reactivos utilizados.(36)
III.-	Resultados:	
3.1.-	Linearidad del sistema.(38)
3.2.-	Precisión del sistema.(41)
3.3.-	Linearidad del método.(42)
3.4.-	Precisión del método.(47)
3.5.-	Exactitud al 100%.(49)
3.6.-	Especificidad del método.(50)
IV.-	Conclusiones.(52)
V.-	Apéndice.(55)
VI.-	Bibliografía.(81)

INTRODUCCION

1.- INTRODUCCION.

1.1.- Introducción:

Actualmente, debido a la diversidad y cantidad de productos que se manejan y para tener la seguridad de que los métodos son apropiados, tanto la Industria Farmacéutica como la Secretaría de Salud están interesados y encaminados en la validación de los métodos analíticos empleados en los laboratorios.

Se tienen razones importantes por las cuales se valida el método para cuantificar el ingrediente activo, una de ellas y muy importante es que la validación del método analítico es una parte integral del Sistema de Control de Calidad. Otra razón es que las Prácticas Adecuadas de Manufactura (P.A.M.) y las nuevas disposiciones oficiales requieren de la validación del contenido. Además, proveen un medio para que los científicos tengan una comunicación efectiva concerniente a las cuestiones técnicas.

Como parte del Sistema de Control de Calidad, la validación del contenido juega un papel clave dentro del ciclo de control universal. Este ciclo incluye los siguientes pasos:

- Ajustar estándares.
- Estimar la conformación de los estándares.
- Tomar acciones apropiadas cuando los estándares no son satisfactorios.
- Planificar para mejorar.

Sin una confianza en las mediciones tomadas de las muestras que llegan, en proceso y también en producto terminado, sería de gran dificultad confirmar que el producto que fué fabricado es uniforme y que cumple con la serie de estándares que aseguran su disposición para el uso.

Ya que el ciclo de control de calidad es un proceso en evolución, la necesidad para la validación del contenido implica que alguna forma de validación o verificación continúe hasta el final del período en el que el procedimiento de ensayo esté en uso, y esto no es algo que se haga inicialmente cuando el ensayo es desarrollado y después olvidado. Otra razón es que la responsabilidad del fabricante es suministrar productos a niveles de calidad consistente con estándares que aseguran su disposición para su uso y por eso requiere de un programa progresivo de validación del ensayo.

Lo importante, es que al tener el método analítico validado se asegura que el método es correcto, lo que dará una pauta para que el departamento de producción sepa en un momento dado si lo que está produciendo está dentro de los parámetros establecidos y, si es así, producirá productos de calidad consistente. Por esto, es importante tener validado el método analítico con base en principios científicos adecuados como son la linealidad, precisión y exactitud.

1.2.- Objetivo.

El objetivo es el validar el método analítico propuesto por la casa matriz para la furosemda en el producto terminado de Lasix solución inyectable, comprobando su precisión, exactitud, linealidad, sensibilidad y su reproducibilidad, obteniendo la evidencia documentada y tener un método confiable.

1.3.- Generalidades.

1.3.1.- Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (C.L.A.R.).

Esta técnica también se le conoce como cromatografía de líquidos de alta presión o cromatografía líquida moderna (High Performance Liquid Chromatography, H.P.L.C.).

Es usada para separar los componentes de una mezcla química. Estos componentes (o soluto), son primero disueltos en un disolvente líquido y después pasados a través de una columna cromatográfica bajo un flujo a una presión determinada. En esta columna, la mezcla es resuelta en sus componentes. La capacidad de resolución es importante y es dependiente de las interacciones entre los componentes del soluto y la fase estacionaria definida como un material de empaque inmóvil en la columna. El movimiento de partículas del sistema es la fase móvil la cual es un líquido. El éxito en la aplicación de CLAR para un compuesto depende de varios factores combinados adecuadamente, es decir, de las condiciones de operación como son: el tipo de columna, la fase móvil, la longitud y diámetro de la columna, la velocidad de flujo de la fase móvil, etc. La migración diferencial en la CLAR es resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la móvil. Los mecanismos de separación involucrados en la retención de las moléculas de una muestra por parte de la fase estacionaria, dan lugar a los diferentes métodos de la cromatografía líquida:

1.3.1.1.- Cromatografía de Exclusión Molecular.

Se basa en el tamaño molecular. El empaque es un material poroso cuyo tamaño está definido, separa muestras cuyo peso molecular puede ser de 500 hasta varios millones; se utiliza para separaciones

de macro-moléculas como: proteínas y ácidos nucleicos, para la purificación de mezclas biológicas consistentes en moléculas grandes y pequeñas (separación de drogas de fluidos fisiológicos como plasma y orina, ingredientes activos en cremas y gelatinas en formulaciones farmacéuticas). Las moléculas que son demasiado grandes para el poro salen rápidamente de la columna mientras que las pequeñas penetran en los poros prolongando su tiempo de elución. Emplea materiales blandos incapaces de resistir presiones mayores de 4 atmósferas (ver figura N° 1).

1.3.1.2.- Cromatografía Líquido - Líquido o de Partición.

Se basa en la distinta solubilidad que presenta una molécula de la muestra en la fase móvil y en la estacionaria. Las moléculas de la muestra se distribuyen entre ambas fases como sucedería en una extracción líquido-líquido. Se usan componentes moderadamente polares de peso molecular inferior a 1500, columnas de 15 a 50 cm de largo y de 3 a 5 mm de diámetro; la caída de presión puede ser hasta de 350 atm. y depende del tamaño de la partícula, longitud y relleno de la columna, flujo de la fase móvil, temperatura y viscosidad de la fase móvil.

1.3.1.3.- Cromatografía de Intercambio Iónico.

Esta basada en la competencia entre la fase móvil y la muestra iónica por los sitios o grupos activos de una resina cambiadora de iones como fase estacionaria. Estas resinas están fabricadas con materiales que tienen exceso de cargas eléctricas positivas o negativas permanentemente unidas a la superficie de la partícula de la resina mediante enlaces químicos.

Las intercambiadoras de cationes contienen un grupo funcional ácido como ácido sulfónico o carboxílico (cambiador de catión fuerte) en tanto que las cambiadoras de aniones contienen un grupo funcional básico (grupo amonio o amonio cuaternario) unido al átomo de sílice a través de grupos intermedios.

1.3.1.4.- Cromatografía Líquido - Sólido o de Adsorción.

La separación depende de la interacción entre la muestra, el empaque de la columna y el disolvente que acarrea la muestra a través de todo el sistema.

De esta manera, la muestra se distribuye entre la fase móvil (disolvente) y la fase estacionaria (sílice, alúmina, etc.).

La sílice se somete a un proceso de desactivación para disminuir el proceso de retención de moléculas muy polares, de esta manera se mantiene la superficie en condiciones uniformes.

La separación ocurre según la afinidad de la muestra hacia la fase sólida o la fase líquida. Si una molécula tiene más de un grupo funcional, el más polar tendrá mayor efecto y será el que determine el tiempo de elución del compuesto.

Por esta razón la cromatografía de adsorción generalmente separa la mezcla en clases de compuestos, agrupándolos según el grupo o grupos funcionales de mayor polaridad.

Se elige una fase móvil de una polaridad aproximadamente igual a la de la muestra o ligeramente inferior, en esta forma el flujo constante con la misma polaridad hace que la muestra rompa su unión con la fase estacionaria y así sea eluida.

Según la polaridad relativa de las dos fases y la preponderancia de los fenómenos de adsorción o reparto, se clasifica en dos formas:

1.3.1.4.a.- Fase Normal.

El lecho estacionario es de naturaleza fuertemente polar (ej. sílice) y la fase móvil es apolar (ej. n-hexano). Las muestras polares quedan retenidas en la columna durante tiempos mayores que las muestras menos polares o apolares. Los empaques para la fase normal son por ejemplo sílice, amino, ciano y diol (figura N°2).

1.3.1.4.b.- Fase Inversa.

Es el proceso inverso en el cual el lecho estacionario es de naturaleza apolar (ej. hidrocarburo), mientras la fase móvil es de un líquido polar. Cuanto más apolar sea la muestra, mayor será su retención (fig. N°3). Los empaques para la fase inversa son por ejemplo ODS (C18), octil, metil y dimetil silano.

Comparación entre fase normal y fase inversa:

	Fase Normal:	Fase Inversa:
Polaridad del empaque:	Alta	Baja
Polaridad del disolvente:	Baja o mediana	Mediana o alta
Orden de elución de la muestra:	Menos polar primero	Más polar primero
Efecto de aumentar polaridad del disolvente:	Reduce tiempo de la elución	Aumenta tiempo de la elución

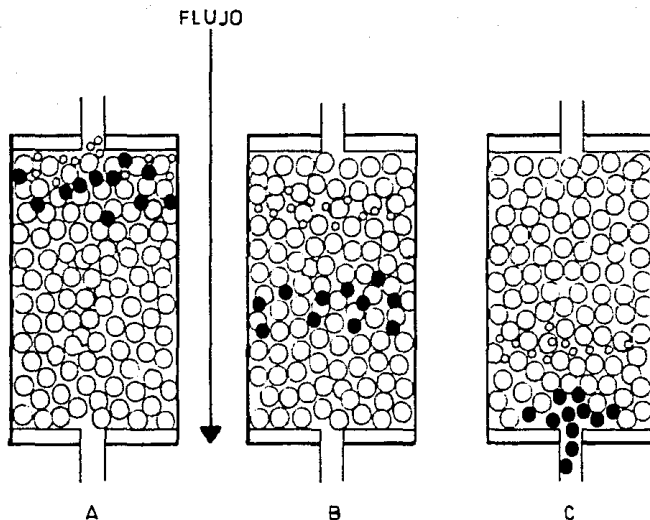


Figura N° 1. Cromatografía de exclusión. Aquí se ve la distribución molecular. Notese que las moléculas grandes salen primero; ya que toman el paso de menor resistencia dentro de la columna.

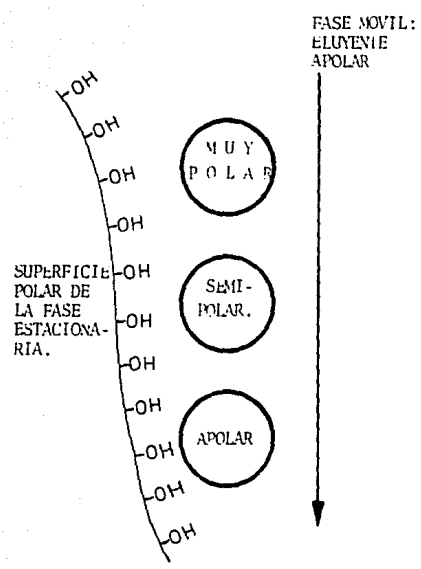


Figura N° 2. Cromatografía líquida en fase normal. Los círculos representan los tipos de compuestos presentes en la muestra y su posición relativa en la dirección del flujo de la fase móvil indica su orden de elución.

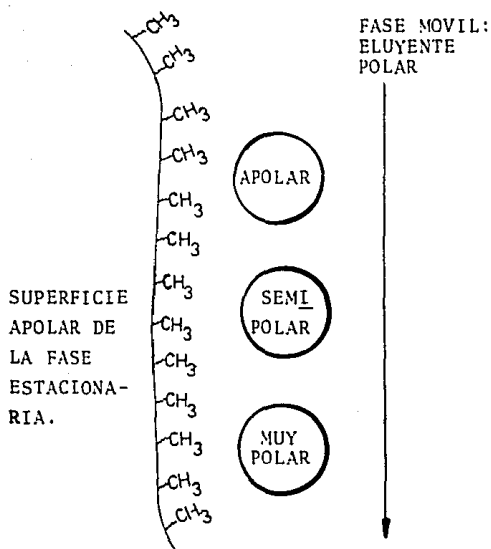


Figura N°3. Cromatografía líquida en fase inversa. Los círculos representan los tipos de compuestos presentes en la muestra y su posición relativa en la dirección del flujo de la fase móvil indica su orden de elución.

1.4.- Validación de Métodos Analíticos.

El objetivo principal en una planta farmacéutica es fabricar productos que cumplan con los requisitos de calidad al costo más bajo posible. Existen varias razones por las cuales la industria farmacéutica está preocupada porque sus procesos y métodos analíticos estén validados:

- Normas legales y reglamentaciones oficiales.
- Garantía de la calidad.
- Reducción de costos.

A la fecha, la industria farmacéutica mexicana no contaba aún con reglamentaciones oficiales específicas concernientes a prácticas adecuadas de manufactura y debido a ello, había optado por emplear las normas que a este respecto han sido publicadas en otros países. De entre ellas, las más extensamente usadas y más frecuentemente citadas son las de los Estados Unidos (Current Good Manufacturing Practices). En ellas uno notará que el tema de validación no se trata de manera directa, pero si se enumeran una serie de requerimientos y normas cuya apreciación contextual y subsecuente puesta en práctica, lleva al control de procesos, operaciones y métodos. La FDA (Food & Drug Administration = Administración de Drogas y Alimentos) publicó en 1984 un borrador de una guía para la presentación de soporte de datos analíticos para validación de procesos en las que se ve la importancia de validar tanto procesos como métodos analíticos y así asegurar la calidad de los productos farmacéuticos. La falta de validación del proceso y del método analítico implica

que el proceso y método no están bien entendidos ni bajo control y por ello no es posible confiar en la calidad de los productos fabricados. Las Prácticas Adecuadas de Manufactura y las validaciones del proceso y del método analítico son conceptos inseparables, son esenciales para obtener una garantía de calidad. Frecuentemente la validación de un método o proceso conduce además de la calidad más consistente, a una mejora de la misma.

La experiencia indica que un método validado es un método más eficiente, que produce menos pérdidas, repeticiones, etc.. Aún cuando existen obvios costos iniciales asociados con la validación del método, también existen ahorros de costo potenciales a plazo más largo.

La principal razón para validar un método es garantizar la calidad a un costo reducido. La validación también ahorra tiempo, lo cual constituye otro ahorro indirecto de costos. Con un método validado no hay "quebraderos de cabeza" cada vez que hay cambios en: personal, disolventes o equipo. Esto es debido a que el método está bien documentado y se basa en principios científicos firmes, los cuales han sido bien pensados a través de la validación original, lo que provee un fundamento sólido sobre el que se puede basar los cambios. El personal tiene a su disposición procedimientos escritos a seguir y que son revisados continuamente y el personal supervisado para evitar perder el tiempo tratando de encontrar la forma de hacer ciertas operaciones o un método impropio. Otra razón para validar sería cuando el análisis de muestras de producto terminado es inadecuado para detectar ciertos tipos de defectos en los productos. El análisis es estadístico en naturaleza, sería imposible e impracticable analizar cada unidad de producto para cumplimiento total con todas las especificaciones.

Aparte del enorme volumen de trabajo, no quedaría nada por vender y aún así, todavía no tendríamos el 100% de garantía debido a la varia bilidad en los métodos de análisis.

Algunos defectos tienen la tendencia a aparecer a través de todo el lote en una forma relativamente uniforme; otros están distribuidos al azar en el lote, frecuentemente en forma aislada. De aquí el rema rcado énfasis puesto en la garantía de calidad, buenas prácticas de manufactura, control de calidad y en proceso, etc. todos los cuales im plican y requieren que los procesos y los métodos analíticos sean validados. Se han propuesto muchas definiciones de validación pero hasta ahora ninguna ha sido aceptada universalmente, por lo que a continuación enuncio algunas: para las guías de la F.D.A. de los Estados Unidos (1987): "Validación es el establecimiento de eviden cia documentada la cual provee un alto grado de garantía de que un proceso específico producirá consistentemente un producto que cumple con sus especificaciones y atributos de calidad predeterminados". Según la Asociación de Fabricantes Farmacéuticos (E.U.A.) especifica mas sobre los métodos analíticos:

"Validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece por estudios de laboratorio que las características de comportamiento del método cumplen con los requerimientos para las aplicaciones analíticas propuestas". Estas características de comportamiento son expresadas en términos de parámetros analíticos; para una apropiada discusión de los resultados obtenidos con el méto do analítico, " y " es designada como una medida cuantitativa observa da de la característica analítica (respuesta analítica) la cual es característica de la substancia a determinar (analito).

Los valores observados son usados para determinar la concentración "x" y la medida cuantitativa "y" está definida como la función analítica ($y = f(x)$). Los valores Y_i (y_1, y_2, \dots, y_n), debido a su origen experimental, muestran variaciones causadas por:

- Errores sistemáticos: que dan lugar a medidas incorrectas y que puede ser: constante o absoluto y proporcional o relativo, cuyas fuentes son errores instrumentales, de método, operativas o personales.
- Errores aleatorios: que permanecen aún cuando se ha eliminado el error sistemático y por lo tanto da lugar a medidas imprecisas.

Estos errores aleatorios reflejan la variabilidad inherente de la respuesta analítica y origina una serie correspondiente de valores X_i (x_1, x_2, \dots, x_n). Los métodos analíticos de farmacopea (USP, DAB, BP, etc.) y provenientes como en este caso de la casa matriz, son métodos validados, en los cuales los errores sistemáticos son controlados de tal manera que la exactitud de los resultados no se afecta. La validación entonces del método analítico consistirá en evaluar parámetros tales como selectividad, precisión, exactitud y linealidad.

1.4.1.- Selectividad o Especificidad.

Es la capacidad para medir exactamente y específicamente el analito en presencia de otros componentes, los cuales pueden estar presentes en la matriz de la muestra. La selectividad puede a menudo ser expresada como el grado de tendencia de resultados de prueba obtenido por el análisis de muestras conteniendo impurezas añadidas, productos de degradación, compuestos químicos relacionados

o placebo (ingredientes) cuando se compara con resultados de prueba de muestras sin sustancias adicionadas. La tendencia (desviación) puede ser expresada como la diferencia en resultados de contenido entre los dos grupos de muestras. La selectividad es una medida del grado de interferencia (o ausencia de la misma) en el análisis de mezclas de muestras complejas. La especificidad o selectividad del método analítico se determina comparando resultados de pruebas de análisis de muestras conteniendo impurezas, productos de degradación o placebos. La tendencia del método si hay alguna, es la diferencia en los resultados de la prueba entre los dos grupos de muestra.

Cuando las impurezas o productos de degradación están sin identificar o no disponibles, la selectividad puede ser demostrada por el análisis, con el método en cuestión de muestras conteniendo impurezas o productos de degradación y comparando los resultados con aquellos de ensayo de pureza adicional (prueba de cromatografía, solubilidad de la fase, etc.). El grado de concordancia de los resultados de prueba es una medida de la selectividad.

Idealmente, significa que el compuesto que va a ser medido está libre de interferencia de todos los materiales conocidos. Sin embargo tal aproximación no es realista ni válida. Por lo tanto, la prueba o ensayo será considerada válida si:

- No hay interferencia de los excipientes con la potencia y pruebas de preservativos (no hay efecto del placebo).
- En adición, la prueba para el ingrediente activo será suficientemente específico para que no haya interferencia de los productos de degradación conocidos.
- Pruebas de medicamentos a granel no tendrán interferencias debidas

a productos de degradación conocidos e impurezas del proceso. (fig. N°4)

1.4.2.- Precisión.

Asumiendo que la especificidad ha sido previamente demostrada, la calidad de la respuesta analítica (la serie de valores experimentales Y_i) puede ser indicada por su precisión. La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados de prueba individuales cuando el procedimiento es aplicado repetidamente a múltiples muestras de una muestra homogénea. Es expresada usualmente como la desviación estandar o desviación estandar relativa (coeficiente de variación). Es una medida del grado de reproducibilidad del método analítico bajo circunstancias normales de operación.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad \text{D.E.R. (C.V.\%) = } \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

La precisión de un método analítico se determina ensayando un suficiente número de alícuotas de una muestra homogénea para poder calcular estadísticamente estimaciones válidas de la desviación estandar o la desviación estandar relativa (coeficiente de variación). Análisis en este contexto son análisis independientes de muestras las cuales han sido llevadas a través de un procedimiento analítico completo desde la preparación de la muestra, hasta el resultado de prueba final. Es evidente que decisiones acerca de la precisión requerida deben de ser hechas tomando en cuenta los costos totales. Para pruebas con bajo volumen, un laboratorio puede aceptar una baja precisión (DER > 5%) por que ésta sería más costeable que analizar más muestras para una prueba la cual es hecha ocasionalmente que gastar muchos meses desarrollando un método muy preciso (DER < 2% , 0.05 de nivel de significancia).

También la precisión evalúa la Repetibilidad del método

Esta repetibilidad se refiere a la concordancia entre valores sucesivos determinados bajo condiciones iguales de trabajo y un valor medio. Se puede evaluar mediante el cálculo de la desviación estandar de los resultados obtenidos. La inferencia de la variabilidad de los resultados se hace mediante la prueba de "chi-cuadrada" (o ji-cuadrada) χ^2 definida por:

$$\chi^2 = \frac{(n-1)(s^2)}{\sigma^2} = \frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2}{\sigma^2}$$

donde:

n = número de determinaciones.

s^2 = varianza muestral.

σ^2 = varianza teórica (poblacional). Representa la variabilidad del método. (Este valor se selecciona basándose en la variabilidad que por experiencia generalmente presentan los métodos. En el caso de la cromatografía de líquidos moderna el valor seleccionado es $\sigma^2 = 5$).

Establecemos un contraste de hipótesis con lo cual decidiremos acerca de la repitibilidad del método:

$H_0: s^2 = \sigma^2$ hipótesis nula.

$H_1: s^2 \neq \sigma^2$ hipótesis alternativa.

Para una región de aceptación o de rechazo del 95% con una significancia de $\alpha = 0.05$.

La evaluación del intervalo de confianza para determinar entre qué valores se encuentra el valor verdadero del parámetro se hace por medio de:

$$IC_{95\%} = \sqrt{\frac{(n-1)(s^2)}{\chi^2_{1-\frac{\alpha}{2}}}} < \sigma < \sqrt{\frac{(n-1)(s^2)}{\chi^2_{\frac{\alpha}{2}}}}$$

1.4.3.- Exactitud.

La exactitud de un método analítico es la proximidad de los resultados de prueba obtenidos por el método con respecto al valor verdadero. La exactitud puede a menudo ser expresada como el porcentaje de recobro por el ensayo, sabiendo la cantidad añadida del analito. La exactitud del método analítico puede ser determinada aplicando el método a muestras o mezclas de excipientes a las cuales se les ha añadido cantidades conocidas del analito por arriba y por abajo de los niveles esperados en las muestras. La exactitud de un método está afectado por errores experimentales que son debidos a la tendencia (desviación) en el método. La evaluación de la exactitud es convenientemente expresada por la diferencia entre la media del resultado analítico y el valor verdadero, conocido ó asumido:

$$b = \bar{x} - w$$

La diferencia, llamada tendencia (desviación), puede ser un número negativo o positivo. También la tendencia puede ser expresada en relación con su media (tendencia relativa, $b\%$): $b\% = b/\bar{x} \cdot 100$

Para un procedimiento aceptable, la diferencia entre la cantidad añadida y recobrada debería de ser de 5% o menos de todas las concentraciones para las cuales el ensayo es considerado válido y la diferencia promedio tendrá un valor significativo estadístico de 1% o menos. Este criterio puede ser definido efectuando inferencias estadísticas en base al valor real mediante:

-- Pruebas de hipótesis: verificando que los datos experimentales pertenecan a una distribución especial cuyo parámetro es el valor real. Esta distribución es la "t" de Student para muestras pequeñas y está definida por la expresión:

$$t = \frac{(\bar{x} - \mu_0)}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$$

donde: \bar{x} = media de las determinaciones.

μ_0 = media teórica = 100% (poblacional).

s = desviación estándar de las determinaciones.

n = número de determinaciones.

Estableciendo un contraste de hipótesis:

$H_0: \mu = \mu_0$ hipótesis nula. $H_1: \mu \neq \mu_0$ hipótesis alternativa.

Con lo que se determina si el método es exacto para una región de aceptación o de rechazo del 95% con una significancia del 0.05.

Utilizando el intervalo de confianza nos permite evaluar dentro de qué intervalo se localiza el valor verdadero del parámetro, utilizando

la expresión: $IC = \bar{x} \pm t_{0,95} (s/\sqrt{n})$

1.4.4.- Linealidad.

La linealidad de un método analítico es su habilidad para obtener resultados de prueba los cuales directamente o por una bien definida transformación matemática, son proporcionales a la concentración del analito en las muestras, dentro de un rango dado. La linealidad se expresa usualmente en términos de la varianza alrededor de la pendiente de la regresión lineal calculada de acuerdo a una relación matemática establecida a partir de los resultados de las pruebas obtenidas por el análisis de muestras variando concentraciones del analito. La linealidad del método analítico se determina por tratamiento matemático de los resultados de prueba obtenidos por el análisis de las muestras con las concentraciones del analito a través del intervalo determinado del método. El tratamiento es normalmente un cálculo de una regresión lineal por el método de mínimos cua-

drados de resultados de prueba contra las concentraciones del analito. En algunos casos para obtener proporcionalidad entre ensayos y concentraciones de la muestra los datos de prueba tendrían que ser sujetos a una transformación matemática antes del análisis de regresión. La pendiente de la regresión lineal y su varianza dan una medida matemática de la linealidad; la intersección en el eje de las ordenadas es una medida de la tendencia potencial del ensayo.

Graficando los resultados de prueba como una función de la concentración del analito en un papel adecuado puede ser una alternativa aceptable al cálculo de la regresión lineal.

La ecuación de la recta de regresión es:

$$y = \gamma x + \beta$$

donde: y = cantidad recuperada.

x = cantidad adicionada.

β = ordenada al origen poblacional = 0

γ = pendiente poblacional = 1

El ajuste de los valores experimentales al modelo lineal se puede conocer por medio de:

-- r^2 = coeficiente de determinación y

-- r = coeficiente de correlación.

Mientras más se acerquen estos valores al valor de 1, el modelo lineal propuesto será el más aproximado a una recta. Para saber que tanto se ajusta la recta de ajuste al modelo de regresión lineal, utilizamos pruebas de hipótesis para la pendiente y para la ordenada al origen estableciendo para ellos sus respectivos intervalos de confianza a un nivel de significancia dado.

Ordenada al origen: $H_0: b = \beta$ donde $\beta = 0$, hipótesis nula,

$H_1: b \neq \beta$ donde se tiene una hipótesis alterna.

Pendiente: $H_0: m = \gamma$ donde $\gamma = 1$, hipótesis nula,

$H_1: m \neq \gamma$ hipótesis alterna.

Las expresiones del modelo matemático para estas hipótesis será la "t" de Student:

Ordenada al origen:

$$t = \frac{b - \beta}{s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}}}$$

Pendiente:

$$t_{\text{calc}} = \frac{(m - \gamma) s_x \sqrt{n-1}}{s_{y/x}}$$

donde:

m = valor de la pendiente experimental.

γ = pendiente teórica = 1 (poblacional).

b = valor de la ordenada al origen (poblacional).

β = ordenada al origen teórico = 0 (poblacional).

x_i = cantidad adicionada.

\bar{x} = media de las cantidades adicionadas.

s_x = desviación estandar de las cantidades adicionadas.

$s_{y/x}$ = error estandar de estimación modificado.

n = número de determinaciones.

La evaluación de los intervalos de confianza para la ordenada y la pendiente a un nivel de significancia dado (siendo = 0.05) para determinar entre que valores se encuentra el valor verdadero de la pendiente y la ordenada:

Ordenada al origen:

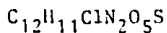
$$IC = b \pm t_{0.95} (\hat{s}_{y/x}) \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

Pendiente:

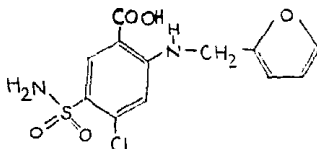
$$IC = m \pm t_{0.95} \frac{\hat{s}_{y/x}}{s_x \sqrt{n-1}}$$

1.5.- ESTABILIDAD DE LA FUROSEMIDA.

Furosemda: Acido 4-cloro-N-furfuril-5-sulfamoilantranílico:

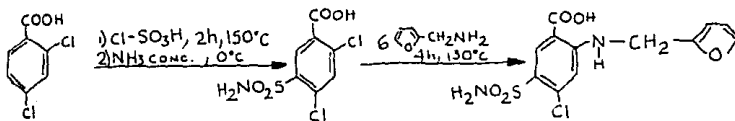


Peso Molecular: 330.7



La furosemda es un polvo cristalino blanco o casi blanco,prácticamente insoluble en agua y cloroformo,soluble en acetona,poco soluble en etanol y difícilmente soluble en eter.La sutancia se solubiliza en soluciones diluídas de hidróxidos alcalinos,por ser un ácido carboxílico al elevarse el pH del solvente su solubilidad se incrementa.Su producción es partiendo del ácido 2,4 diclorobenzoico el cual se clorosulfona en la posición 5 con el ácido clorosulfónico a 0°C y amoniaco concentrado dando una sulfonamida.

Los dos átomos que tiene reaccionan con un exceso de furfurilamina por una sustitución nucleofílica para dar la furosemda:



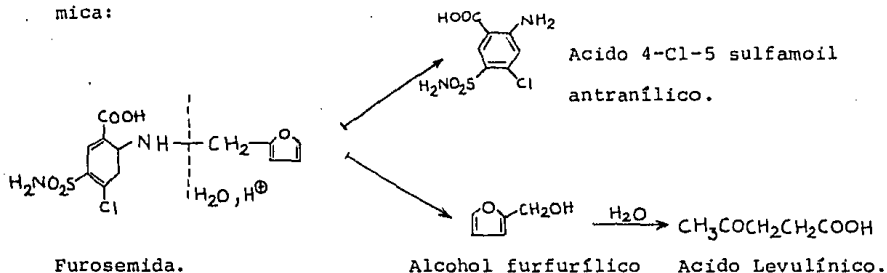
Acido 2,4

Sulfonamida.

Furosemda

dicloro benzoico.

La furosemda es un diurético usado en el tratamiento de edemas cardíacos, hepáticos y venales, de hipertensión arterial, edemas por quemaduras, por insuficiencia venosa y postrombótica; se administra normalmente en solución parenteral conteniendo 20 mg/2 ml (ampolleta). Su estabilidad ha sido estudiada por varios autores y dichos estudios demuestran que su descomposición es por hidrólisis o fotoquímica:



Furosemda.

Alcohol furfurílico Acido Levulínico.

Rowbotham et al. reportan que la solución acuosa de furosemda sufre una degradación por hidrólisis y fotoquímica.

La cuantificación de los productos de degradación de la furosemda por método de la USP XIX utilizando procedimientos de UV para el contenido no fué exitoso. Una prueba de estabilidad del contenido de la furosemda usando CLAR fué desarrollada por Ghanekar et al. y reportaron que una solución acuosa de furosemda conteniendo sorbitol y 10% de alcohol (v/v) tiene estabilidad limitada.

El pH de la solución fué ajustado a 8.5, sin embargo esto dificultó el mantener el valor del pH de la solución, lo que causó fué una

descomposición rápida.

Kirit et al. reportaron en su estudio el efecto del pH, clorobutanol, EDTA, propilenglicol, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y clorhidrato de cistefna en la furosemida a diferentes temperaturas (24 y 50°C) que el pH aparece como el factor crítico para la estabilidad de la furosemida. Teniendo en cuenta esta información para la parte de la especificidad en la validación del método, se podía degradar la furosemida en la solución por hidrólisis o ajustando el pH a 1-2 y permanecer de 2 a 4 semanas a 60-80°C.

O bien, tomando una muestra de retención (contramuestra) que tuviera aproximadamente de 4 a 5 años y ver la aparición de la sustancia relacionada: ácido 4-cloro-5-sulfamólantranílico y verificar que este producto puede ser separado de la furosemida por CLAR y que no interfiere con el tiempo de retención de la misma. Ajustando las condiciones del integrador (atenuación = 2 y el umbral (threshold) = 4) se visualizará mejor la resolución obtenida a partir de las características de las fases utilizadas, la fuerza de la fase móvil y de las características de la columna empleada.

Al manejar o variar los factores de selectividad, eficiencia y capacidad para obtener una mejor resolución y conocer la especificidad del método, se tendrá como resultado final el corroborar que no hay efecto del placebo, ni interferencia del producto de degradación en el cromatograma de la furosemida.

P A R T E E X P E R I M E N T A L

II.- PARTE EXPERIMENTAL.

II.1.- INTRODUCCION.

En esta parte se tendrá la parte experimental, donde se validará el método analítico para cuantificar furosemda en solución inyectable, describiéndose a continuación el método, los reactivos utilizados, el equipo, las condiciones de operación y los resultados obtenidos, así como las conclusiones.

El método analítico se basa en la técnica cromatográfica de separación líquido - sólido o de adsorción en fase inversa, en la que la separación depende de la interacción entre la muestra, el empaque de la columna y el disolvente que acarrea la muestra a través de todo el sistema y en el cual el lecho estacionario es de naturaleza apolar, mientras la fase móvil es de un líquido polar.

II.2.- DISEÑO DEL TRABAJO.

2.2.1.- Método Analítico.

Procedimiento para la muestra:

Se transfieren 5 ml. de la solución inyectable de Lasix (previa mezcla del contenido de varias ampollitas) a un matraz volumétrico de 50 ml.

Se diluye con 20 ml. de Metanol R.A. y se afora con solución de bicarbonato de sodio 0.05 M.

Cinco mililitros de esta solución se transfieren a un matraz volumétrico de 50 ml. y se afora hasta la marca con la fase móvil.

Una parte de esta solución se filtra dos veces por membrana de 0.2 μ m y se degasifica.

Procedimiento para el estándar:

Se pesan exactamente 50 mg. de Furosemida estándar, se transfieren a un matraz volumétrico de 50 ml. y se afora hasta la marca con la fase móvil.

Se toman 5 ml. de esta solución y se transfieren a un matraz volumétrico de 50 ml. y se afora hasta la marca con fase móvil.

Se filtra 2 veces por membrana de 0.2 μ m y se degasifica.

Para llevar a cabo la validación del método, definiremos los parámetros y criterios a seguir para cada una de las pruebas:

1.- Linealidad del Sistema:

Se determinará construyendo una curva de calibración de una misma solución patrón utilizando 5 diluciones y haciendo el análisis por duplicado para cada dilución, en estas diluciones tendrá que estar

incluido el 100% de la dosis. El criterio a seguir será que cumpla con: $b = 0$, $r \geq 0.99$, $r^2 \geq 0.98$.

2.- Precisión del Sistema:

Se determinará por análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad.

El criterio a seguir será que cumpla con un coeficiente de variación (C.V.) = 1.5 %.

3.- Linealidad del método:

Se determinará con placebos adicionados (placebo al que se le adiciona el ingrediente activo), para esto se deberá de conocer la formulación de la solución (protocolo de fabricación) para poder elaborar el placebo. Cada placebo adicionado se analiza de manera independiente a tres diferentes concentraciones (incluyendo el 100%) y se hace por triplicado cada concentración. Esto lo hace un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

El criterio a seguir será que cumpla para la cantidad adicionada vs cantidad recuperada: $m = 1$, $b = 0$, $r^2 \geq 0.98$.

Para el porcentaje recuperado en el intervalo de confianza para la media (\bar{x}) debe localizarse el 100%, C.V. = 2%.

6.- Especificidad:

Se verificará que el producto de degradación pueda ser separado del principio activo y que no haya interferencia del placebo, es decir, que los tiempos de retención en el cromatograma sean diferentes para que no se traslapen y den datos erróneos de concentraciones del principio activo y del producto de descomposición.

II.2.2.- EQUIPO UTILIZADO.

Aparato: Cromatógrafo de líquidos de alta resolución, marca Hewlett-Packard modelo 1090L (sistema de distribución de disolventes, sistema de gradiente binario, inyección de la muestra manual (Rheodyne) , intercambiador de calor y termostato, detector de diodos en circuito integrado, lámpara de Deuterio y control de sistema LUSI).

Tratamiento de los datos:

Integrador HP3392A.

Columna: LiChrospher 100 RP-18 de la compañía Merck.

Tipo: acero inoxidable, longitud: 100 mm

Tamaño de partícula: 5 μ m

Diámetro interno: 4 mm

Grupo funcional: $\text{Si}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$

Geometría de las partículas: esférica.

Condiciones de operación:

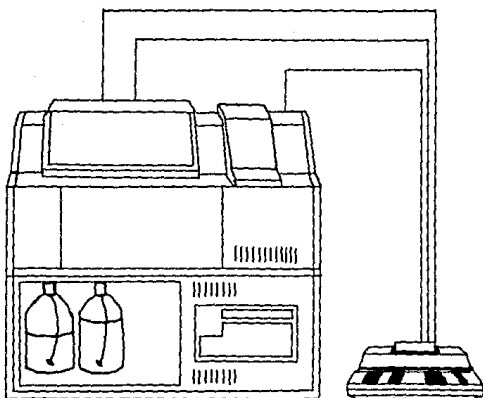
Cromatógrafo:

Flujo: 1 ml/min

Temperatura del intercambiador de calor: 40°C

Detección: UV 254 nm

Fase móvil: Buffer fosfatos (pH = 7)/Metanol (50:50 v/v).



CROMATOGRAFO DE LIQUIDOS

HP 1090

INTEGRADOR

3392A

Figura N° 5. Equipo utilizado en la parte experimental.

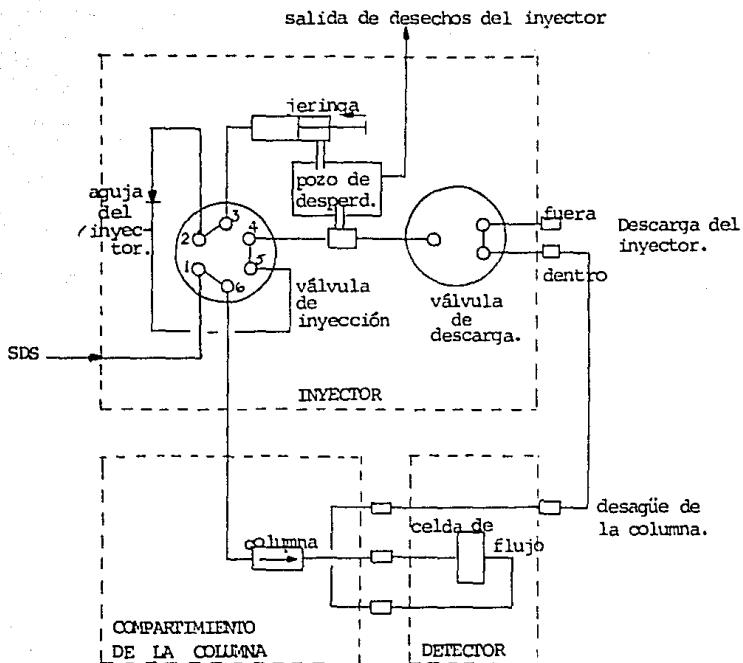


Figura N° 6.

Diagrama de flujo del solvente y de la solución a través del cromatógrafo de líquidos HP 1090L.

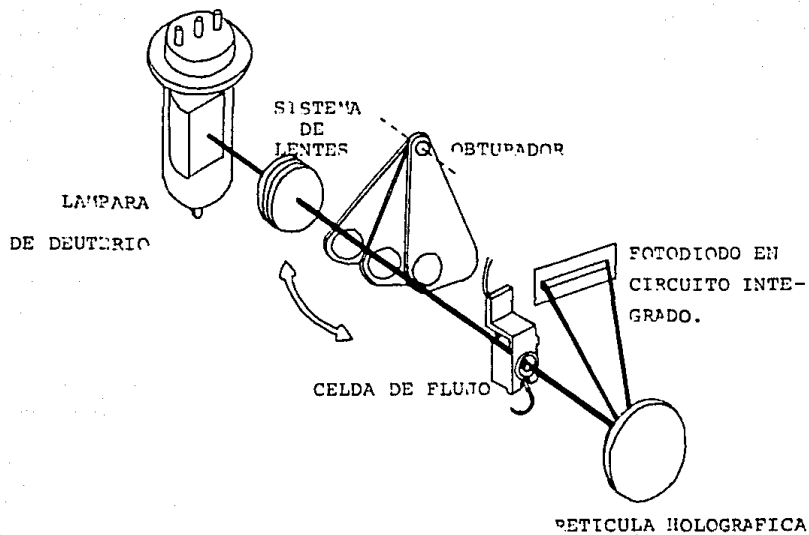


Figura N°7.

Detector de diodos en circuito integrado.

Sistema óptico del Cromatógrafo de Líquidos.

II.2.3.- REACTIVOS UTILIZADOS.

Para la preparación de las muestras (estandar y placebos adicionados):

- 1.- Agua destilada, calidad farmacéutica (agua para inyectables).
- 2.- Metanol grado R.A.
- 3.- Buffer fosfatos: 0.4% fosfato dibásico de Sodio heptahidratado grado R.A.
0.4% fosfato monobásico de Potasio R.A.
en 1000 ml de agua destilada, ajustando el pH a 7.
- 4.- Bicarbonato de Sodio 0.05 M : 4.2005 g de Bicarbonato de Sodio R.A. en 1000 ml de agua destilada.
- 5.- Fase móvil: Metanol R.A. 50 volúmenes.
Buffer fosfatos 50 volúmenes.

Para el cromatógrafo:

- 6.- Metanol grado HPLC filtrado 2 veces por membrana de 0.42 μm y degasificado.
- 7.- Buffer fosfatos filtrado 2 veces por membrana de 0.42 μm y degasificado.

RESULTADOS

III.- RESULTADOS.

III.1.- LINEALIDAD DEL SISTEMA.

a) Curva de calibración de Furosemina por absorción al ultravioleta a 254 nm en fase móvil.

Concentración a

partir de la

Concentración reportada (ng/ml)

solución patrón:

(mg/ml)

$$X_1 = 11.125$$

$$Y_{11} = 11.118$$

$$Y_{12} = 11.119$$

$$X_2 = 10.550$$

$$Y_{21} = 10.588$$

$$Y_{22} = 10.594$$

$$X_3 = 10.025$$

$$Y_{31} = 10.136$$

$$Y_{32} = 9.981$$

$$X_4 = 9.550$$

$$Y_{41} = 9.533$$

$$Y_{42} = 9.585$$

$$X_5 = 9.050$$

$$Y_{51} = 9.057$$

$$Y_{52} = 9.026$$

El 100% de la dosis corresponde a X_3

$$T = 5 \quad n = 2$$

b) Cálculos preliminares.

$$\Sigma x = 100.6$$

$$\Sigma y = 100.737$$

$$\Sigma x^2 = 1017.3475$$

$$\Sigma y^2 = 1020.1878$$

$$\Sigma xy = 1018.7577$$

$$\text{Pendiente: } m = 1.0060 \approx 1.00$$

c) Cálculos finales.

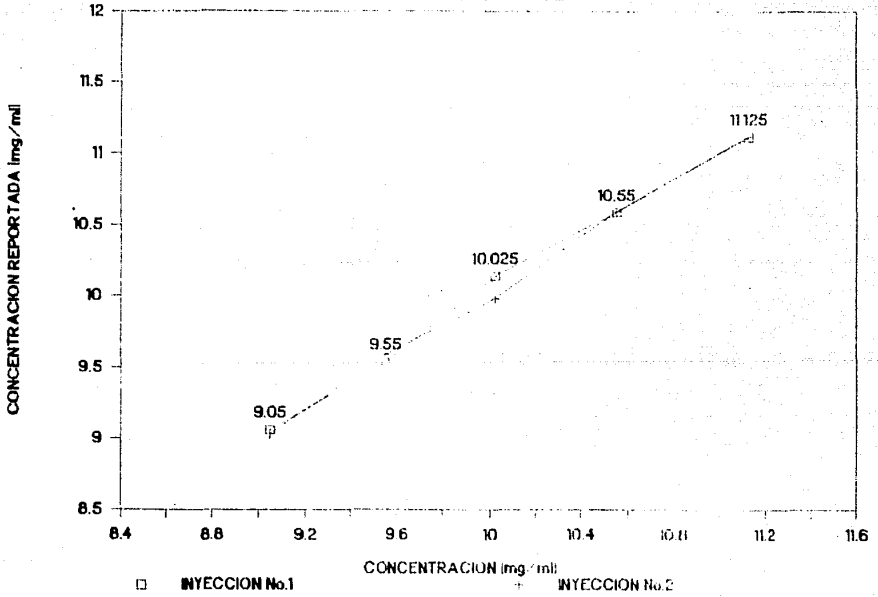
$$b = -0.04687 \approx 0.0$$

$$r^2 = 0.9967$$

Ya que $r^2 > 0.98$ y $b = 0$, se cumplen con los criterios para linea lidad del sistema.

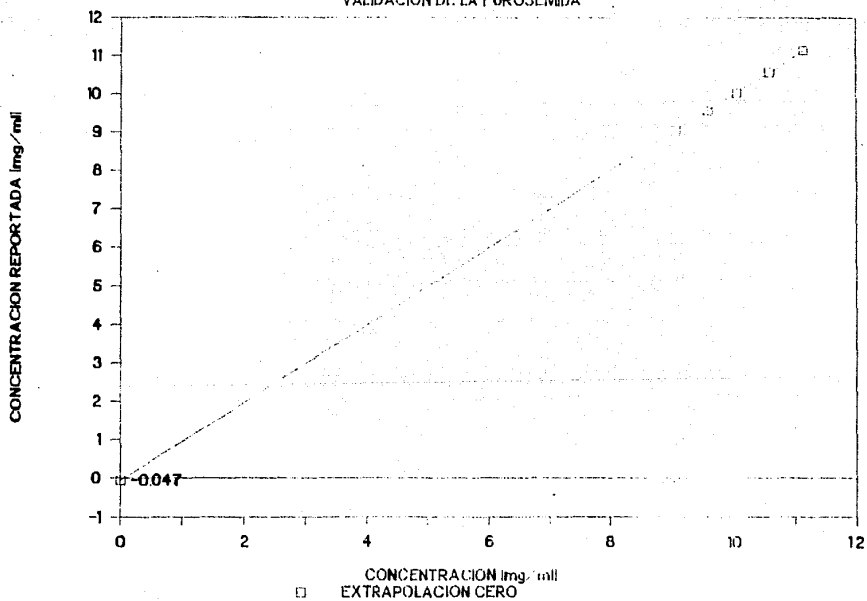
LINEARIDAD DEL SISTEMA

VALIDACION DE LA FUROSEMIDA



LINEARIDAD DEL SISTEMA

VALIDACION DE LA FUROSEMIDA



III.2.- PRECISION DEL SISTEMA.

Al analizar una solución estandar por sextuplicado se obtuvieron los siguientes resultados:

a) Tabla de concentraciones reportadas (mg/ml):

$$\begin{array}{lll}
 y_1 = 10.136 & y_3 = 10.148 & y_5 = 10.199 \\
 y_2 = 9.981 & y_4 = 10.127 & y_6 = 10.125 \\
 n = 6
 \end{array}$$

b) Cálculos preliminares.

$$\Sigma y = 60.716 \quad \Sigma y^2 = 614.432 \quad \bar{y} = 10.119$$

$$DE = \frac{6(614.432) - (60.716)^2}{6(5)} = 0.0730$$

c) Cálculos finales.

$$\text{Coeficiente de variación, CV} = \frac{0.0730}{10.119} * 100 = 0.72\%$$

Se cumple con el criterio para la precisión del sistema (CV < 1.5%).

III.3.- LINEALIDAD DEL METODO.

a) Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada:

Tabla de cantidad adicionada contra cantidad recuperada.

Cantidad

adicionada (x)

Cantidad recuperada (y)

$X_1 = 8.20$

$Y_{11} = 8.250 \quad Y_{12} = 8.165 \quad Y_{13} = 8.200$

$X_2 = 10.084$

$Y_{21} = 10.103 \quad Y_{22} = 10.049 \quad Y_{23} = 10.067$

$X_3 = 11.927$

$Y_{31} = 11.986 \quad Y_{32} = 11.908 \quad Y_{33} = 11.918$

$T = 3 \quad n = 3$

b) Cálculos preliminares:

$x = 90.633$

$x^2 = 933.54$

$\bar{x} = 10.070$

$y = 90.646$

$y^2 = 933.87$

$\bar{y} = 10.072$

$xy = 933.701$

c) Cálculos finales:

$$m = \frac{(3)(3)(933.701) - (90.633)(90.646)}{(3)(3)(933.54) - (90.633)^2} = 1.0014$$

$$b = \frac{90.646 - (1.0014)(90.633)}{(3)(3)} = -0.0126 \approx 0.00$$

$$r^2 = \frac{(3)(3)(933.701) - (90.633)(90.646)^2}{(3)(3)(933.54) - (90.633)^2} \cdot \frac{(3)(3)(933.87) - (90.646)^2}{(3)(3)(933.87) - (90.646)^2} = 0.99955$$

d) Pruebas de hipótesis para la ordenada al origen:

$H_0: b = \beta \quad \text{donde } \beta = 0 \quad \text{hipótesis nula.}$

$H_1: b \neq \beta \quad \text{hipótesis alternativa.}$

prueba estadística para la ordenada:

$$t_{\text{calc}} = \frac{b - \beta}{\hat{S}_y \sqrt{\frac{\sum x^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}}}$$

f) Porcentaje recuperado:

$$r_1 = \frac{-8.250}{8.20} * 100 = 100.61$$

$$r_6 = \frac{-10.067}{10.084} * 100 = 99.83$$

$$r_2 = \frac{-8.165}{8.20} * 100 = 99.57$$

$$r_7 = \frac{-11.986}{11.927} * 100 = 100.49$$

$$r_3 = \frac{-8.20}{8.20} * 100 = 100.00$$

$$r_8 = \frac{-11.908}{11.927} * 100 = 99.84$$

$$r_4 = \frac{-10.103}{10.084} * 100 = 100.19$$

$$r_9 = \frac{-11.918}{11.927} * 100 = 99.92$$

$$r_5 = \frac{-10.049}{10.084} * 100 = 99.65$$

calculos del porcentaje recuperado
para cada cantidad recuperada.

Tabulando los resultados:

100.61 99,57 100.00 100.19 99.65 99.83 100.49 99.84 99.92

n = 9

Cálculos preliminares:

$$\bar{r} = 900.1 \quad \sum r^2 = 90021.017 \quad \bar{r} = 100.011$$

$$DE = \frac{9(90021.017) - (900.1)^2}{9(9-1)} = 0.3563$$

Cálculos finales:

Intervalo de confianza para la media:

De la distribución "t" de Student con 8 grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975, se tiene: t = 2.306

$$IC = 100.0111 \pm 2.306 \frac{0.3563}{9} = 100.0111 \pm 0.27387$$

IC = 99.737 a 100.285

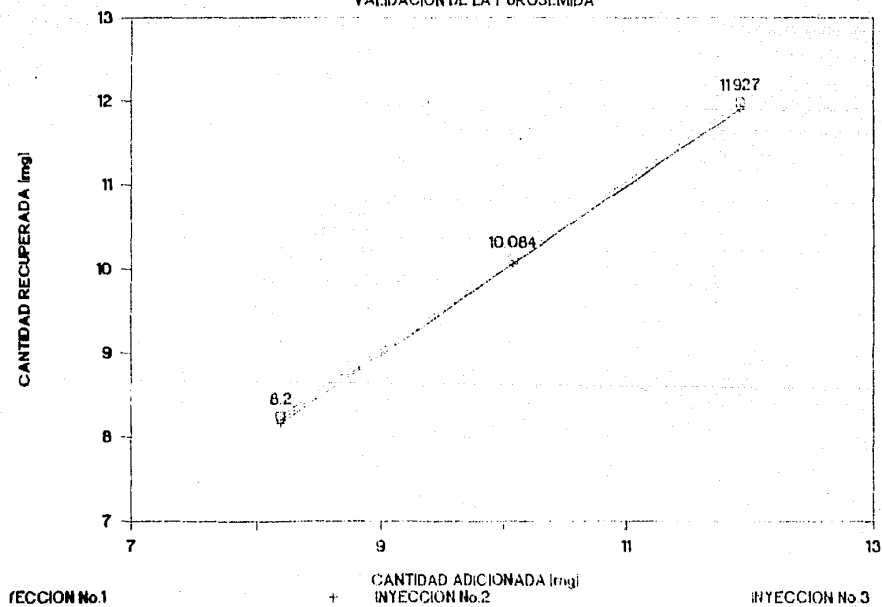
Coefficiente de variación:

$$CV = \frac{0.3563}{100.011} * 100 = 0.3562\%$$

Ya que en el intervalo de confianza para la media se localiza el 100% y el coeficiente de variación es menor del 2%, se cumplen los criterios.

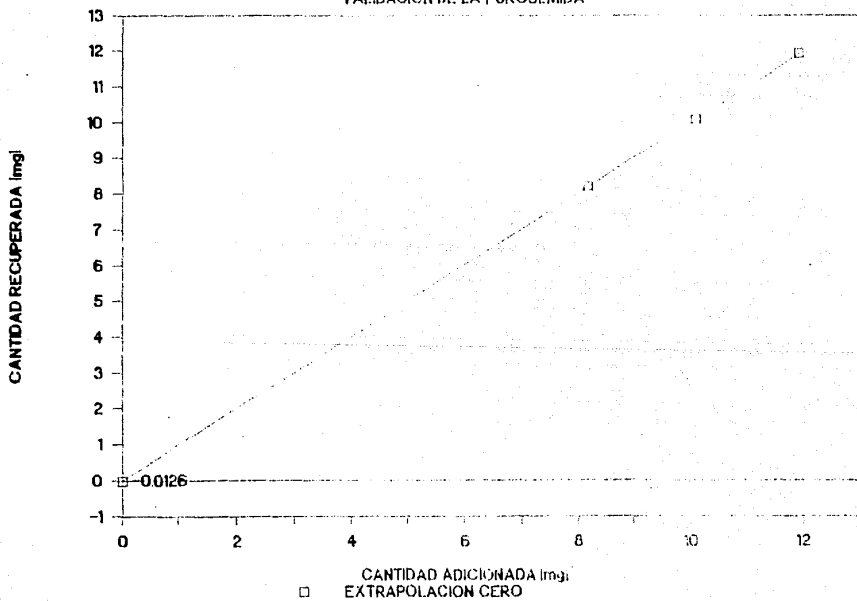
LINEARIDAD DEL METODO

VALIDACION DE LA FUROSEMIDA



LINEARIDAD DEL METODO

VALIDACION DE LA FUROSEMIDA



III.4.- PRECISION (REPRODUCIBILIDAD) DEL METODO.

a) Tabla de resultados:

		A N A L I S T A	
		1	2
		100.19%	99.32%
1		99.65%	99.72%
		99.83%	99.93%
DIA			
		99.63%	99.61%
2		99.68%	100.51%
		100.79%	100.59%

b) Cálculos preliminares:

$$\bar{\Sigma}x = 1199.45 \quad \Sigma x^2 = 119892.36 \quad \bar{x} = 99.954\% \quad DE = 0.4604$$

c) Cálculo final:

$$CV = \frac{0.4604}{99.954} * 100 = 0.4606\% \quad \text{Se cumple con el criterio.}$$

Cálculos de repetibilidad, reproducibilidad interdía/analista y reproducibilidad interanalista.

a) Cálculos preliminares.

$$X_{11} = 100.19 + 99.65 + 99.83 = 299.67$$

$$X_{12} = 99.63 + 99.68 + 100.79 = 300.10$$

$$X_{21} = 99.32 + 99.72 + 99.93 = 298.97$$

$$X_{22} = 99.61 + 100.51 + 100.59 = 300.71$$

$$\Sigma x_{D/A}^2 = 359671.68$$

$$X_1 = 299.67 + 300.10 = 599.77$$

$$X_2 = 298.97 + 300.71 = 599.68$$

$$\Sigma x_A^2 = 719340.16$$

Varianza debida al método:

$$S_M^2 = \frac{119892.36}{8} - \frac{(359671.68/3)}{8} = 0.225$$

Varianza debida al día/ analista:

$$S_{D/\bar{A}}^2 = \frac{\frac{359671.68}{3} - \frac{719340.16}{6}}{6} - \frac{119892.36}{24} - \frac{359671.68}{3}$$

$$= 0.0139$$

Varianza debida al analista:

$$S_A^2 = \frac{\frac{719340.16}{6} - \frac{(1199.45)^2}{12}}{6} - \frac{359671.68}{3} - \frac{719340.16}{12}$$

$$= -0.0442$$

Ya que S_A^2 es menor que cero, entonces $S_A^2 = S_{D/A}^2$

b) Cálculos finales:

Repetibilidad: $\pm 1.96 (0.225) = \pm 0.9297\%$

Repetibilidad interdía/analista: $\pm 1.96 (0.0139) = \pm 0.0272\%$

Repetibilidad interanalista: $\pm 1.96 (0.0139) = \pm 0.0272\%$

III.5.- EXACTITUD AL 100%.

a) Tabular los resultados obtenidos:

% Recuperado:

101.23 99.92 101.16 100.49 100.82 99.68 100.08

n = 7

b) Cálculos preliminares:

$$\begin{aligned} \Sigma X &= 703.38 & \Sigma X^2 &= 70679.886 & \bar{X} &= 100.483\% \\ DE &= \sqrt{\frac{7(70679.886) - (703.38)^2}{7(6)}} = \sqrt{0.37579} = 0.6130 \end{aligned}$$

c) Cálculos finales:

Intervalo de confianza para la media y valor de la "t" de Student con n - 1 grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975

$$t_6 = 2.4469$$

$$100.483 \pm 2.4469 \frac{0.6130}{7} = 100.483 \pm 0.56695$$

$$IC = 99.916 \text{ a } 101.0498\%$$

$$\text{Coeficiente de variación } CV = \frac{0.6130}{100.483} * 100 = 0.61\%$$

Ya que el intervalo de confianza para la media se localiza el 100% y el coeficiente de variación es menor al 2% se cumplen con los criterios.

III.6.- ESPECIFICIDAD DEL METODO.

- a) Se degradó el ingrediente activo, Furosemida por hidrólisis cambiando el pH de la solución entre 1 y 2 y manteniéndose a temperatura de 60°C durante 3 semanas.
- b) Se ajustaron las condiciones de operación para obtener la máxima resolución y obtener una separación completa del pico del producto de descomposición: ácido 4-Cl-5-sulfamoil antranílico y la Furosemida.
- c) El producto de degradación producida por hidrólisis o durante la vida media del producto muestra un tiempo de retención diferente al de la Furosemida.
- d) La mezcla de excipientes (placebo) preparada en el laboratorio no muestra interferencias en el análisis de la Furosemida.

C O N C L U S I O N E S

IV.- CONCLUSIONES.

De los resultados obtenidos durante la validación del método, de acuerdo a la guía general en la que se describen los principios generales que la DIGECIS SSA que considera elementos aceptables para la validación de los procesos involucrados en la fabricación de medicamentos, productos biológicos y equipos médicos, se pueden sacar las siguientes conclusiones:

1.- Para la linealidad y precisión del sistema, se puede apreciar por las gráficas y resultados obtenidos, que la respuesta del detector es prácticamente lineal en este intervalo de concentraciones, cumpliendo con la ecuación de una línea recta, el factor de correlación es próximo a la unidad y la ordenada al origen se encuentra muy cercana a cero, el sistema es preciso ya que se obtuvo un CV menor al 1.5%.

2.- El método demostró ser exacto, preciso y lineal, ya que cumplió con los criterios establecidos de antemano.

3.- El método demostró ser específico para el producto de degradación, ya que se tiene una buena separación entre él y el ingrediente activo.

4.- El método es confiable para el análisis rutinario del producto tanto para semiterminado como terminado, para el análisis de materia prima así como para las pruebas de estabilidad, ya que los cromatogramas obtenidos lo detectan.

Al tener un método validado, junto con la calibración de los aparatos y equipos, los procedimientos estandares de operación completos se ha avanzado para realizar la validación del proceso y lo que es

más importante: el obtener un producto cuya calidad está controlada para beneficio del consumidor y de la empresa.

A P E N D I C E

V.- A p é n d i c e .

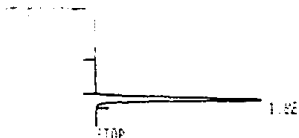
En esta sección se tienen los cromatogramas generados de los resultados obtenidos en la parte experimental:

- Linealidad del sistema
- Precisión del sistema
- Precisión (reproducibilidad) del método
- Exactitud al 100%
- Especificidad del método.

Prueba de Linealidad del sistema.

Se analizaron cinco concentraciones diferentes a partir de la solución patrón
y se inyectaron cada una dos veces.

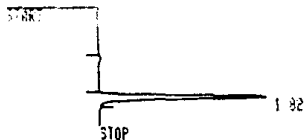
Con $x_1 = 11.125$ mg/ml:



RUN # 7 AUG/29/89 20:19:03
WORKFILE ID: B
WORKFILE NAME:
ID: 1.1

ESTD	RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
	1.82	589060	PB	1R	11.118

TOTAL AREA= 589060
MUL FACTOR= 1.0000E+00



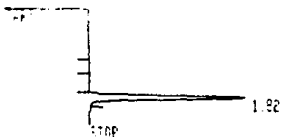
RUN # 8 AUG/29/89 20:22:11
WORKFILE ID: B
WORKFILE NAME:
ID: 1.2

ESTD	RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
	1.82	589120	PB	1R	11.119

TOTAL AREA= 589120
MUL FACTOR= 1.0000E+00

Prueba de Linealidad del sistema.

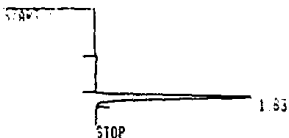
Concentración $x_2 = 10.550 \text{ mg/ml}$:



RUN # 10 AUG/29/89 20:39:29
 WORKFILE ID: B
 WORKFILE NAME:
 ID: 2.1

RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
1.02	560990	PB	1R	10.588

TOTAL AREA= 560990
 MUL FACTOR= 1.0000E+00



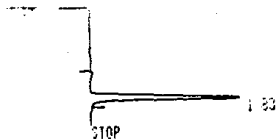
RUN # 12 AUG/29/89 20:46:50
 WORKFILE ID: B
 WORKFILE NAME:
 ID: 2.3

RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
1.63	561310	PB	1R	10.594

TOTAL AREA= 561310
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

Prueba de Linealidad del sistema.

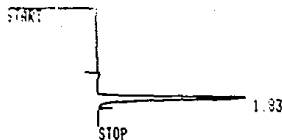
Concentración $x_3 = 10.025 \text{ mg/ml}$:



RUN # 13 AUG/29/89 20:53:10
 WORKFILE ID: B
 WORKFILE NAME:
 ID: 3.1

ESTD	RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
	1.83	537858	PB	1R	10.136

TOTAL AREA= 537858
 MUL FACTOR= 1.0000E+00



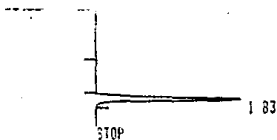
RUN # 14 AUG/29/89 20:57:10
 WORKFILE ID: B
 WORKFILE NAME:
 ID: 3.1

ESTD	RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
	1.83	528800	PB	1R	9.981

TOTAL AREA= 528800
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

Prueba de linealidad del sistema.

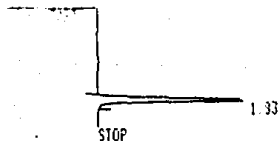
Concentración de $x_4 = 9.550$ mg/ml:



RUN # 19 AUG/29/89 21:17:26
 WORKFILE ID: B
 WORKFILE NAME:
 ID: 1.1

ESTD	RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
	1.83	505100	BB	1R	9.533

TOTAL AREA= 505100
 MUL FACTOR= 1.0000E+00



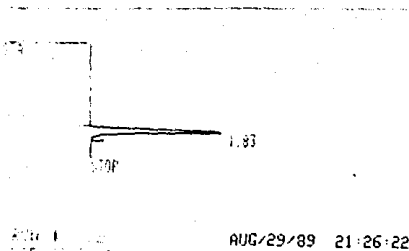
RUN # 20 AUG/29/89 21:30:23
 WORKFILE ID: B
 WORKFILE NAME:
 ID: 4.2

ESTD	RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
	1.33	507840	PB	1R	9.565

TOTAL AREA= 507840
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

Prueba de Linealidad del Sistema.

Concentración de $x_3 = 9.050$ mg/ml:



RUN # 24
 WORKFILE ID: A
 WORKFILE NAME:
 ID: 5.1

AUG/29/89 21:26:22

ESTD	AREA	AREA TYPE	CAL #	AMOUNT
1.83	479850	PB	IR	9.057

TOTAL AREA= 479850
 MUL FACTOR= 1.0000E+00



RUN # 25
 WORKFILE ID: B
 WORKFILE NAME:
 ID: 5.2

AUG/29/89 21:36:32

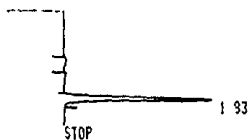
ESTD	AREA	AREA TYPE	CAL #	AMOUNT
1.83	470200	PB	IR	9.026

TOTAL AREA= 470200
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

Prueba de Precisión del sistema.

Se determinó analizando una solución estandar por sextuplicado.

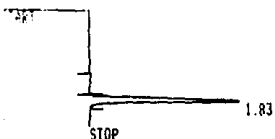
Los dos primeros valores (cromatogramas) de concentración están en la parte de linealidad del sistema (10.136 y 9.981 mg/ml).



RUN # 15 AUG/29/89 21:01:35
 WORKFILE ID: B
 WORKFILE NAME:
 ID: 3.3

ESTD	RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
	1.83	537670	PB	1R	10.148

TOTAL AREA= 537670
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

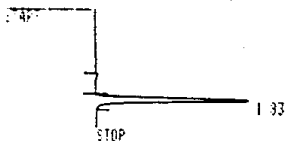


RUN # 16 AUG/29/89 21:05:59
 WORKFILE ID: B
 WORKFILE NAME:
 ID: 3.4

ESTD	RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
	1.83	536580	PB	1R	10.127

TOTAL AREA= 536580
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

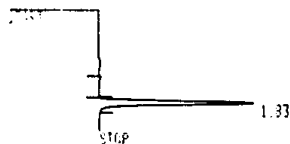
Prueba de precisión del sistema.



RUN # 17 AUG/29/89 21:10:45
 WORKFILE ID: B
 WORKFILE NAME:
 ID: 7.5

ESTD	RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
	1.33	540360	PB	1R	10.199

TOTAL AREA= 540360
 MUL FACTOR= 1.0000E+00



RUN # 18 AUG/29/89 21:14:12
 WORKFILE ID: B
 WORKFILE NAME:
 ID: 3.6

ESTD	RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
	1.83	536480	PB	1R	10.125

TOTAL AREA= 536480
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

Prueba de Linealidad del método.

Se analizaron placebos cargados del principio activo a tres diferentes concentraciones (80, 100, 120%).

80%

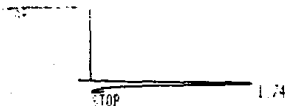


RUN # 3 SEP/04/89 19:07:30
 WORKFILE ID: B
 WORKFILE NAME:
 ID: 80-1-S 20

RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
1.74	1073500	BB	1R	8.250

TOTAL AREA= 1073500
 %L FACTOR= 1.0000E+00

80%



RUN # 4 SEP/04/89 19:10:32
 WORKFILE ID: B
 WORKFILE NAME:
 ID: 80-2-

RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
1.74	1062400	BB	1R	8.165

TOTAL AREA= 1062400
 %L FACTOR= 1.0000E+00

Prueba de Linealidad del método.

80%



RUN # 5 SEP/04/89 19:13:01
 WORKFILE ID: B
 WORKFILE NAME:
 ID: 100-3

ESTD	RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
	1.74	1067000	PB	1R	8.200

TOTAL AREA= 1067000
 CAL FACTOR= 1.0000E+00

100%



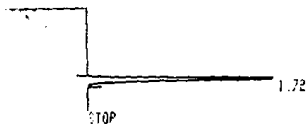
RUN # 6 SEP/04/89 18:22:59
 WORKFILE ID: B
 WORKFILE NAME:
 ID: 100-1-10.004

ESTD	RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
	1.73	1298900	PB	1R	3.102

TOTAL AREA= 1298900
 CAL FACTOR= 1.0000E+00

Prueba de Linealidad del método.

100%

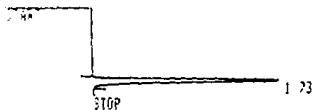


RUN # 7 SEP/04/89 18:25:55
 WORKFILE ID: B
 WORKFILE NAME:
 ID: 100-2

ESID	RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
	1.72	1291900	BB	1R	10.049

TOTAL AREA= 1291900
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

100%



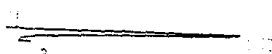
RUN # 8 SEP/04/89 18:29:14
 WORKFILE ID: B
 WORKFILE NAME:
 ID: 100-3

ESID	RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
	1.73	1294300	PB	1R	10.067

TOTAL AREA= 1294300
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

Prueba de Linealidad del método.

1203

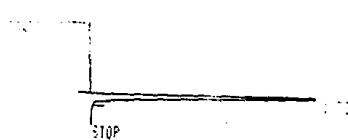


SEP/04/89 18:32:58
 WORKFILE ID: B
 WORKFILE NAME:
 ID: 120-2

AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
1541000	PB	1R	11.9%

LEVEL AREA= 1541000
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

1203



RUN # 10 SEP/04/89 18:35:56
 WORKFILE ID: B
 WORKFILE NAME:
 ID: 120-2-

ESTD	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
1	1531000	PB	1R	11.9%

LEVEL AREA= 1531000
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

Prueba de precisión del método.

Día uno, analista dos:

NOV 1 8 SEP 84 09 13 26 44

NOVFILE 10: B

NOVFILE NAME

10 100-2-10 084

NO	QTY	UNIT	PRICE	AMOUNT
1	1	ED	10.00	10.00

NOV 1 8 SEP 84 09 13 26 44

NOV 1 8 SEP 84 09 13 26 44

NOVFILE 10: B

NOVFILE NAME

10 100-2-10 084

NO

NO	QTY	UNIT	PRICE	AMOUNT
1	1	ED	10.00	10.00

NOV 1 8 SEP 84 09 13 26 44

Prueba de precisión del método.

Día dos, analista uno:

14 1 SEP/85/89 17:01:43

WORKFILE ID 5

NAME

100-2-10.000

AREA	TYPE	AMOUNT
1006800	BB	10.047

14 2 SEP/85/89 17:04:30

WORKFILE ID 5

WORKFILE NAME

100-2-10.000

DATA

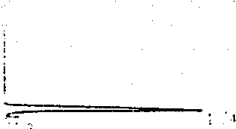
AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
1074	1307400 BB	1R	10.048

TOTAL AREA= 1307400

100-2-10.000

Prueba de precisión del método.

Día dos, analista uno.



1.0000E+00
 1.0000E+00
 1.0000E+00

1.0000E+00
 1.0000E+00

1.0000E+00
 1.0000E+00

Prueba de precisión del método.

Ufa dos, analista dos:

SEP-05-89 17

AREA	AREA TYPE	CAL #	AMOUNT
100.2	SP	15	10.000

STOP

RUN # 5 SEP-05-89 17-13-58

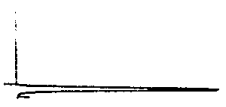
DATAFILE ID: B
 WORKFILE NAME:
 ID 100.2-10.00

AREA	AREA TYPE	CAL #	AMOUNT
100.2	SP	15	10.131

TOTAL AREA= 101310
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

Prueba de precisión del método.

Día dos, analista dos:



FILE 1015
 FILE NAME
 FILE 1015

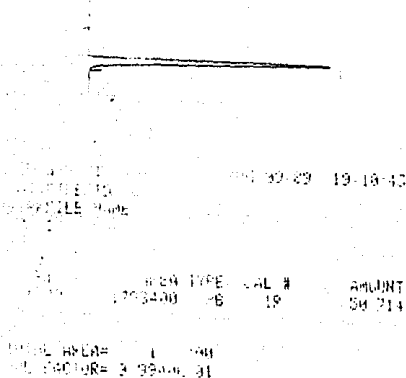
1015 1015 1015
 1015 1015 1015

1015
 1015

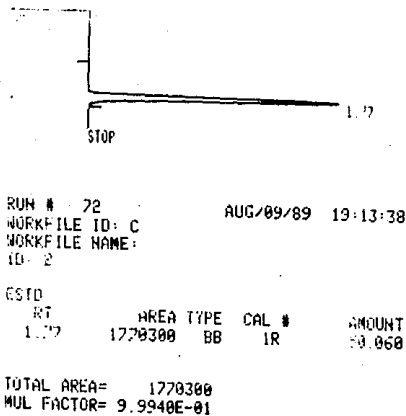
Prueba de exactitud al 100%.

Se analizaron 7 placebos cargados con aproximadamente el 100% del principio activo.

1.-

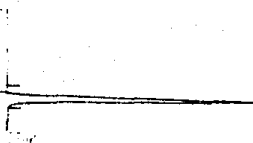


2.-



Prueba de exactitud al 100%

3.-



RUN # 73 AUG/09/89 19:16:31

WORKFILE ID: C

WORKFILE NAME:

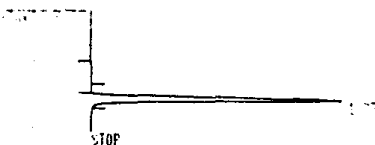
ID: 3

ESTD

RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
1.72	1780300	PB	1R	50.69

TOTAL AREA= 1780300
MUL FACTOR= 9.9940E-01

4.-



RUN # 74 AUG/09/89 19:19:43

WORKFILE ID: C

WORKFILE NAME:

ID: 4

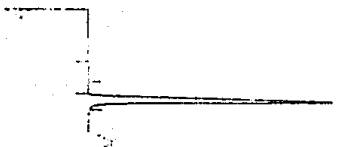
ESTD

RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
1.77	1780300	PB	1R	50.343

TOTAL AREA= 1780300
MUL FACTOR= 9.9940E-01

Prueba de exactitud al 100%.

5.-



RUN # 75 AUG/89/89 19:23:48

WORKFILE ID: C

WORKFILE NAME:

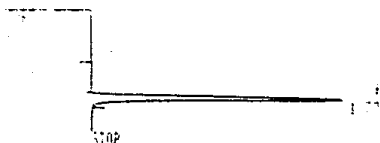
ID: 5

RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
1.77	1766300	PB	1R	50.517

TOTAL AREA= 1766300

CAL FACTOR= 9.9940E-01

6.-



RUN # 76 AUG/89/89 19:27:01

WORKFILE ID: C

WORKFILE NAME:

ID: 6

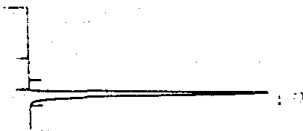
RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
1.77	1766000	PB	1R	49.940

TOTAL AREA= 1766000

CAL FACTOR= 9.9940E-01

Prueba de exactitud al 100%

7.-



10-09-89 13:22

INSTRUMENT: 10
SAMPLE NAME:

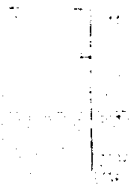
AREA	AREA	TIME	CAL #	AMOUNT
1.0	1223800	FB	IR	50.130

TOTAL AREA= 1223800
MUL FACTOR= 9.9948E-81

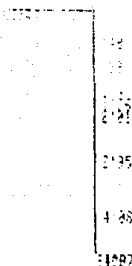
Prueba de especificidad del método.

La determinación se hizo probando que el producto de descomposición y el placebo no interfirieran con el pico del ingrediente activo en el cromatograma, es decir que tuvieran tiempos de retención diferentes.

Cromatogramas del placebo (sin cargar):



RUN 1 3
 SAMPLE ID 6
 SAMPLE NAME
 NO. MIN PEAKS STORED



RUN 1 3
 SAMPLE ID 6
 SAMPLE NAME
 NO. MIN PEAKS STORED

Prueba de especificidad del método.

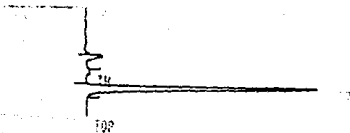
Placebo cargado con el ingrediente activo (tiempo de retención de 1.77,1.79) y producto de descomposición (tiempo de retención de 1.09).

41 08/09/89 10:43:44

AREA	TYPE	CR	AMOUNT
10543	IR	18	2.119
10544	IR	2	27.810

1.09 1.77 1.79

AREA	TYPE	CR	AMOUNT
10543	IR	18	2.119
10544	IR	2	27.810



41 08 08/09/89 10:52:26
 SAMPLE ID: C
 SAMPLE NAME:
 10

AREA	TYPE	CR	AMOUNT
10543	IR	18	40.283

TOTAL AREA= 1054300
 40. FACTOR= 2.0046E-01

BIBLIOGRAFIA

V.- B I B L I O G R A F I A.

- 1.- LEON, R. "El Libro Básico para la Cromatografía de Líquidos" Primera Edición. Roy Milton Co. (1982).
- 2.- ASOCIACION FARMACEUTICA POLITECNICA, E.N.C.B. "Memorias del Curso sobre Métodos Cromatográficos de Mayor Aplicación en la Industria Químico-Farmacéutica. Jul - Ago (1984).
- 3.- PERKIN ELMER DE MEXICO, S.A. Memorias del Curso Introducción a la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. 23-25 Nov (1988).
- 4.- MERCK "Cromatografía en la Química Farmacéutica, Manual Práctico" E. Merck.
- 5.- FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS. 5a. Edición. pp. 116- 20, 1233- 4, 690- 1 (1988).
- 6.- COMITE DE ELABORACION DE GUIAS OFICIALES DE VALIDACION. "Requisitos Mínimos para la Validación de Métodos Analíticos" Colegio Nacional de QFB, México, A.C. (1989).
- 7.- WANDERVIELEN, A.J.; HARDWIDGE, E.A. "Guidelines for Assay Validation" Pharm. Tech. pp 66-76 Mar (1982).
- 8.- ASOCIACION FARMACEUTICA MEXICANA. Memorias del Curso de Validación: Parte "Estadística Aplicada a la Validación de Métodos Analíticos" 10-14 de Abril (1989).
- 9.- FOOD & DRUG ADMINISTRATION. Department of Health and Human

Services. Issue: "Draft Guideline for Submission of Supportive Analytical Data for Methods Validation in New Drug Applications" Apr (1984).

10.- COMPENDIAL ASSAY VALIDATION COMMITTEE. "Current Concepts for the Validation of Compendial Assays". Pharm. Forum. Stimuli to the Revision Process. pp 1241-45. Mar-Apr (1986).

11.- TAYLOR, J.K., "Validation of Analytical Methods" Anal. Chem. 55, 6, 600-608A (1983).

12.- HORWITZ, W.; ALBERT, R. "Standardization of Analytical Methods" Anal. Proc. 24, pp 49-55 (1987).

13.- CAVENAGHI, L.; GALLO, G.; LEALI, G.M.; VIANELLO, S. "Statistical Evaluation of the Results Obtained with the Analytical Methods Used for the Quality Control of Medicines" Drug. Dev. Ind. Pharm. 13. 14., Part I 2571-95, Part II 2596-615 (1987)

14.- HARTKE, F.; MUTSCHLER, E. (Hrsg): Deutsches Arzneibuch 9 Ausgabe 1986 Band 1 296-97, Band 2 1728-34. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart. Gove-verlag GmbH, Frankfurt.

15.- HIRIT, A.S.; DAS GUPTA, V.; STEWART, K.R. "Effect of pH, Chlorobutanol, Cysteine Hydrochloride, Ethylenediaminetetracetic acid, Propylene Glycol, Sodium Metabisulfite and Sodium Sulfite on Furosemide Stability in Aqueous Solutions" J. Pharm. Sci. 69 5, 594-596 (1980).

16.- GHANEKAR, A.G.; DAS GUPTA, V.; GIBBS Jr., Ch. W. "Stability

of Furosemide in Aqueous Systems" J. Pharm. Sci. 67, 6, 808-11 (1978).

17.- ROWBOTHAM, P.C.; STANFORD, J.B.; SUGDEN, J.K. "Some Aspects of the Photochemical Degradation of Furosemide" Pharm. Acta Helv. 51, 10, 304-307 (1976).

18.- MOLLIKA, J.A.; AHUJA, S.; COHEN, J. "Stability of Pharmaceuticals" J. Pharm. Sci. 67, 4, 443-65 (1978).

19.- KREYZIG, E. "Introducción a la Estadística Matemática, Principios y Métodos" 7a. Reimpresión, Ed. Limusa México 1983

20.- THE STAFF OF THE TEXAS INSTRUMENTS LEARNING CENTER "Making Tracks into Programming" (1977)

21.- HEWLETT PACKARD "HP1090 Liquid Chromatographs Reference Manual.