

Nº 137
261



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**VALIDACION DE UN METODO ANALITICO POR CLAR
PARA DETERMINAR ETOFAMIDA EN COMPRIMIDOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A

ANA ALICIA ROBLEDO ARANA

MEXICO, D. F.

1992

FALLA DE ORIGEN



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 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.

VALIDACION DE UN METODO ANALITICO POR CLAR PARA
DETERMINAR ETOFAMIDA EN COMPRIMIDOS.

PRINCIPIO ACTIVO

CAPITULO I.
INTRODUCCION

1.1. ANTECEDENTES HISTORICOS DE LA ETOFAMIDA	4
1.2. PROPIEDADES DE LA ETOFAMIDA.....	5
1.2.1. FARMACOLOGIA Y TOXICOLOGIA.....	7
1.2.2. CARACTERISTICAS QUIMICAS Y FISICAS....	8
1.3. OBJETIVO.....	10
1.4. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.....	11
1.5. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION	29

CAPITULO II.

MATERIAL Y METODO

2.1. MATERIAL.....	65
2.2. REACTIVOS.....	66
2.3. EQUIPO.....	66
2.4. METODO.....	66

CAPITULO III.

RESULTADOS

3.1. ESPECIFICIDAD DEL METODO.....	75
3.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA.....	94
3.3. EXACTITUD DEL METODO.....	102
3.4. LINEALIDAD DEL METODO.....	104
3.5. PRECISION DEL METODO.....	108
3.6. REPRODUCIBILIDAD DEL METODO.....	111

CAPITULO IV.

4.0. CONCLUSION Y DISCUSION.....	113
BIBLIOGRAFIA.....	119

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1. ANTECEDENTES HISTORICOS

1.2. PROPIEDADES DE LA ETOFAMIDA

1.2.1. FARMACOLOGIA Y TOXICOLOGIA

1.2.2. CARACTERISTICAS QUIMICAS Y FISICAS

1.3. OBJETIVO

1.4. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

1.5. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

ANTECEDENTES HISTORICOS

Desde hace 15 años dió inicio en los Laboratorios Carlo Erba el estudio con diversas sustancias que presentaban actividad antiprotozoaria. En dichos estudios se examinó, ante todo, la acción antiambiiana de nuevos productos que presentaban en su estructura molecular los radicales difeniléter y la dicloroacetamida.

Entre los compuestos sintetizados se profundizó en el estudio del derivado conocido como Clefamida (Mebinol Erba) y durante las primeras experimentaciones con este preparado se observó que el radical etil-éter (Eticlordinofene o Etofamida) era particularmente activo sobre la Entamoeba histolytica.

Debido a las dificultades que presentó la síntesis química, no fue posible profundizar en el estudio de este último compuesto y sólo recientemente se ha podido experimentar con detenimiento este producto, que se prepara por dicloroacetilación con metil-dicloroacetato, con pentacloroacetona y cloruro de dicloroacetilo de las correspondientes aminas.

FARMACOLOGIA

En estudios *in vitro* se ha demostrado una elevada actividad amebicida de la Etofamida y adicionalmente, se ha observado con éxito su actividad en la amibiasis *in vivo*. Su acción es específica y está limitada a los miembros del género *Entamoeba* y no tiene efecto sobre bacterias, sobre hongos y sobre la mayoría de los protozoarios y de los helmintos.

In vitro la dosis mínima inactivante sobre las cepas patógenas de *E. histolytica* es de 0.04 mcg./ml. Esta actividad antiambiana es 7 veces superior a la de la Clefamida.

Importantes controles han demostrado que el fármaco es inactivado sobre la flora bacteriana de origen intestinal asociado a la amiba, lo cual tiene notable importancia, ya que esto manifiesta que el compuesto no altera la flora bacteriana intestinal normal en los casos de tratamiento prolongado como son los quimioprolácticos.

In vivo el Eticlórdifeno es activo en amibiasis intestinal aguda en ratas infectadas mediante inyección de *E. histolytica*. Con dosis de 4mg./kg. de peso administrada 5 veces en 2.5 días, no se observan lesiones en el 50% de los animales desde el primer día después de la inyección.

El fármaco es inactivado en la amibiasis hepática, lo cual es lógico dado que el producto casi no pasa a la circulación después de su administración oral. Realmente el Eticlórdifeno

administrado al hombre por vía oral prácticamente no se absorbe. Las titulaciones en sangre y orina con métodos colorimétricos, después de la administración de dosis de 100, 200, 400 y 800 mg. de Etilordifene, no han demostrado una cantidad de fármaco dosificable, sin embargo los límites de sensibilidad de esos métodos son de 1mcg./ml. para el suero y de 0.05 mcg. para la orina.

Por otro lado se ha encontrado en las heces concentraciones muy altas de sustancia activa, en personas con tratamiento previo en una dosis única de 200 mg. por vía oral, las heces permanecen activas sobre cultivos de *E. histolytica* a una dilución de por lo menos 1:500 por 3 días después del tratamiento; en promedio, la dilución mínima activa ha sido de 1:18000.

TOXICOLOGIA.

La Dosis letal 50 del Etilclordifene por via oral es mayor de 5000mg./kg. Su minima toxicidad aguda, por consiguiente, nos permite afirmar que el producto está libre prácticamente de efectos toxicos.

Por lo que se refiere a su toxicidad crónica, ésta se ha estudiado en ratas y en perros, administrando el fármaco en dosis hasta de 1 g./kg./día en las primeras y de 650 mg./kg./día en los segundo, por periodos de 13 semanas. Si consideramos que dichas dosis son altas y prolongadas para los animales, el producto no tiene efecto sobre la supervivencia ni sobre el peso de los animales, ni tampoco sobre los parámetros hematológicos y hematoquímicos estudiados.

El estudio teratogénico del Etilclordifene ha demostrado que la droga administrada antes y durante la gestación de ratas y de conejas, a dosis hasta de 1g./kg./día, no ha afectado la fertilidad o la gestación del embrión y por lo tanto puede afirmarse que está libre de efectos sobre el feto.

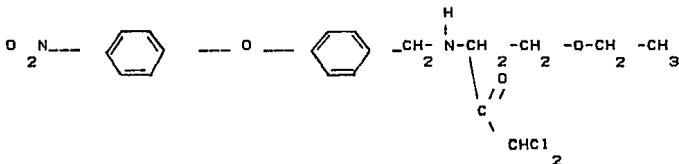
PROPIEDADES FISICO QUIMICAS

DENOMINACION: Etofamida.

SINONIMO: N - (B -ETOXI-ETIL) - N-p-FENOXI (4 NITRO)
BENZIL - DICLORO ACETAMIDA.

FORMULA CONDENSADA: C₁₉ H₂₁ N₂ Cl₂ O₅

FORMULA DESARROLLADA:



ASPECTO: Polvo cristalino de color amarillo.

SOLUBILIDAD: Soluble en acetona, cloroformo, acetato de metilo y metanol.

PUNTO DE FUSION: 103 ° - 106 ° C

CARACTERISTICAS ES-: E_{1%}^{1cm} a 304 nm. = entre 285 y 309.
PECTROFOTOMETRICA

VALORACION: 95 - 105%

ESPECIFICACIONES DEL PRODUCTO

PERDIDA AL SECADO: La perdida no es superior al 1% despues de
secarse a 60 C y vacio durante 3 horas.

PESO TEORICO: 625 mg / Comp.

DESINTEGRACION: No mas de 15 minutos en agua destilada

FRIABILIDAD: No mayor a 2%

DUREZA: 7.0 - 15 Kg.

DIMENSIONES: Diametro 13.0 mm
Espesor 4.2 mm

CONTENIDO DE ETOFAMIDA: 500 mg / comp.
475 - 525 mg / comp.
95 - 105%

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

COMPROBAR Y DOCUMENTAR QUE EL METODO ANALITICO POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS PARA LA DETERMINACION DE ETOFAMIDA EN COMPRIMIDOS ES, UN METODO EXACTO, PRECISO, LINEAL, REPRODUCIBLE Y ESPECIFICO

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

1.1. ANTECEDENTES HISTORICOS.

El objetivo primordial para los fabricantes de medicamentos es sin duda alguna asegurar sus productos, de manera que siempre tengan calidad optima. Para obtener estos resultados es necesario establecer en forma correcta los procedimientos de manufactura y control de medicamentos. Esto es, considerar todos aquellos factores que contribuyen a la calidad en los procesos de fabricación, así como la reproducibilidad del producto lote a lote. La forma de demostrar que estos procedimientos son correctos se conoce como VALIDACION.

Este nuevo concepto y su aplicación en validación de métodos analíticos tiene sus orígenes después de que la FDA (Food and Drug Administration) emitió tres documentos. El primero de ellos, en 1906 exige a los fabricantes de medicamentos evitar la adulteración. El segundo, en 1938 convoca a los mismos a eliminar de las formulaciones aquellas sustancias que pudieran causar algún efecto tóxico para proporcionar seguridad al momento de administrar un medicamento. El último de ellos, publicado en 1962 pide comprobar la eficacia de un producto farmacéutico como resultado de un problema causado por el uso de la talidomina y sus efectos teratogénicos.

En 1984 la administración para la regulación de alimentos y

medicamentos de los Estados Unidos estableció las prácticas adecuadas de manufactura en las cuales especificó los requerimientos para los procesos de validación y control de los productos farmacéuticos. Una sección de las Buenas Practicas de Manufactura regula específicamente los procesos de validación, por lo que apartir de 1985 la FDA estableció que todo proceso que no esté validado, está fuera de control

El concepto de VALIDACION toma el centro de los mayores cambios en las normas de las Buenas Practicas de Manufactura y en los conceptos de Control de Calidad. Estos cambios implican el desaffo de un proceso con el objeto de determinar sus parámetros óptimos de operación y la metodología de control, de tal manera que cuando se apliquen adecuadamente lleven a lograr lo que hasta ahora ha sido objetivo primordial de todo fabricante de medicamentos; asegurar que cada unidad de dosificación elaborada cumpla con las características de calidad diseñada. Estos conceptos nos permiten CONSTRUIR LA CALIDAD en vez de tratar de controlarla.

1.2. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.

Antes de definir el concepto y parámetros de validación, es recomendable entender las normas de las Buenas Practicas de Manufactura y el concepto de Control de Calidad, ya que se incluyen dentro de la metodología racional encaminada a la futura validación.

La primera norma tiene como objetivo establecer un Sistema de Calidad, mediante un conjunto de regulaciones que señalen los

requerimientos basicos para que los procesos de producción y control se realicen en tal forma que la mas alta calidad sea construida a fin de obtener medicamentos que satisfagan sus características de diseño, y por lo tanto, mantengan la identidad, pureza, concentración, potencia e inocuidad requerida para su uso. Para obtener ésto, es necesario normalizar las variables que pudieran afectarla. Resumidas algunas normas establecen lo siguiente:

- 1). **Materiales y Materias:** Cada producto debe regirse con su expediente maestro, es decir con su diseño completo desde su fabricación, empaque, control y almacenamiento. Para ello los materiales y materias empleados deben ajustarse a las especificaciones dadas por el establecimiento farmaceutico, (como nombre, codigo, formula etc.) ademas de cumplir con las especificaciones dadas por un análisis confiable, de variabilidad conocida de una muestra representativa y homogenea de un proveedor confiable. Finalmente estos deben estar basados en los datos de información requeridos para el departamento de Garantia de calidad.
- 2). **Orden de Fabricación y Documentos:** Incluye un registro de fabricación en el cual puede comprobarse que el producto fue fabricado, inspeccionado y analizado en base a los procedimientos e instrucciones del expediente maestro para esto el equipo como máquinas, agitadores, mezcladores, hornos, autoclaves,

secadores, etc) Deben estar en perfecto estado de funcionamiento, limpios, sin superficies reaccionantes, funcionando a la velocidad debida, dando la temperatura adecuada; respaldando ésto por la firma del operador en la fórmula maestra y apoyándose en revisiones, comprobaciones y mantenimiento periódicos, quedando todo debidamente documentado.

- 3). Método: Los métodos de trabajo, el orden de las operaciones, el control ambiental, las precauciones de seguridad y contra la contaminación cruzada no sólo deben estar escritos, sino que se debe saber demostrar su cumplimiento.

Un programa de garantía de calidad bien estructurado satisface el requisito fundamental para las Buenas Practicas de Manufactura, con el ojetivo de monitorizar y asegurar a la dirección que las instalaciones, equipamientos, personal métodos, informes etc. se realizen según se establece en los protocolos y procedimientos normalizados de trabajo.

- 4). Mano de obra: Calificada y entrenada; todos los individuos encargados de efectuar una operación determinada deberán hacerla en forma seleccionada por el juicio y la experiencia.

De todo ello es de vital importancia la documentación, con el propósito de reducir riesgos de error inherente al manejo de la información mediante comunicación verbal, y constituye un

instrumento de ayuda esencial en la investigación de la variabilidad de los procesos. Por tanto, es indispensable mantener actualizados y ordenados todos los documentos existentes en un establecimiento farmacéutico.

El concepto de control de calidad es muy amplio y ya no puede admitirse que sea únicamente responsabilidad de este departamento sino que en realidad de todos .

El verdadero control de calidad ha de incidir en todo el proceso productivo, desde el momento en que se planifica el producto hasta el control de materias primas, proceso de fabricación etc. Por lo tanto es el esfuerzo de calidad de una empresa de todo esto es donde se deriva el concepto de control total de calidad definido como "El esfuerzo conjunto y coordinado de varios departamentos (compras, mercados, costos, producción etc.) de una empresa, para influir sobre todos aquellos aspectos del producto (diseño, promoción, precio, distribución, etc.) que lo hacen conocido, accesible y deseable para un consumidor o que hacen que el producto satisfaga una necesidad real de un mercado".

Estos conceptos aplicados al Laboratorio analítico, nos llevan a la consideración de que el control de calidad, tal como hasta ahora se ha entendido (Tratamiento Estadístico) es una pequeña parte de lo que ha de ser el control de calidad en el laboratorio, y que esta ha de abarcar:

Desde la compra de reactivos --> Forma de hacer la toma de muestra --> diseño del método analítico tratamiento--> estadístico de los resultados --> validación de los mismos --> archivo sin olvidar todo lo relacionado con la infraestructura del laboratorio, equipamiento seguridad y formación del personal.

La validación será iniciada una vez cumplidos y establecidos los prerrequisitos mencionados y consistirá básicamente en generar y documentar información sobre las condiciones en que se realice cada operación del proceso, así como las características en los productos intermedios y finales.

CONCEPTO SOBRE VALIDACION

Hay muchas definiciones propuestas para el término validación, pero ninguna ha sido aceptada universalmente. Frecuentemente se utilizan dos términos en la literatura sobre procesos de validación; calificación y comprobación.

De acuerdo a las buenas prácticas de manufactura, en términos generales, la validación es considerada como: "una revisión sistemática de las instalaciones y etapas esenciales de trabajo en el desarrollo, producción y control de medicamentos, con el objeto de asegurarse de que los productos fabricados puedan ser elaborados con seguridad y además reproducidos con la calidad deseada.

Así, finalmente la validación es definida como " El método científico, que proporciona la evidencia Documentada para demostrar la confiabilidad, reproducibilidad y efectividad de cualquier operación o proceso. (El proceso se encuentra bajo control).

Al encontrarse incluida dentro de este proceso, la validación de métodos analíticos utilizados en control se puede definir como un proceso por el cual se demuestra que un procedimiento analítico, proporciona resultados dentro de tolerancias aceptables para lo cual fue diseñado. Su objetivo primordial es, certificar y comprobar que los resultados obtenidos permitan avalar los elementos de la calidad de los productos con una confiabilidad adecuada y definida.

Un método analítico se puede validar según las necesidades del laboratorio, aplicación del método, requerimientos oficiales y

criterios de la persona que realiza la validación. Sin embargo se puede iniciar una validación cuando existan las siguientes razones :

- Desarrollo de nuevos productos.
- Métodos analíticos nuevos.
- Instrumentos y reactivos nuevos.
- Puntos de ensayo nuevos.
- Cambios en la formulación.
- Cambios en el proceso de fabricación.
- Cambios en el equipo analítico.

Actualmente existen diferentes formas de abordar la validación de un método analítico. Las dos formas normalmente utilizadas son: la validación Prospectiva que se realiza cuando el método es nuevo y no se dispone de información suficiente, la segunda es una revisión histórica de los datos, (Retrospectiva) En seguida se definen en general tres tipos de validación con mayor aceptación

- I. VALIDACION PROSPECTIVA.- Es la comprobación a través de un proceso predeterminado para la obtención de medicamentos con calidad diseñada basada en un protocolo preparado anticipadamente estableciendo una evidencia documentada en cada paso.
- II. VALIDACION CONCURRENTE.- También se conoce como validación en fase de desarrollo. Es el

establecimiento de la evidencia documentada de que un método analítico realiza aquello para lo que fué diseñado, basándose en información generada durante la ejecución real del proceso, o bien la comprobación documentada, de que los procedimientos de análisis hacen posible la evaluación de las características de calidad de un producto bajo estudio, con suficiente y definida confiabilidad.

III. VALIDACION RETROSPECTIVA.- Es la evidencia documentada de que un método realiza aquello para lo que fué diseñado, basándose en la revisión y el análisis de información histórica.

Es preciso hacer notar que las pruebas farmacopéicas rutinarias no constituyen un proceso de validación analítico, pues no es suficiente con decir que todos los lotes de cierto producto sistemáticamente han reunido las especificaciones, ya sean de farmacopea o internas de la compañía. Cada producto tiene sus propias características, por lo tanto requiere de pruebas especiales que demuestren la confiabilidad, reproducibilidad y efectividad de la técnica a validar. Para ello se cuenta con parámetros estadísticos o criterios de calidad como son: exactitud, precisión, linealidad, reproducibilidad, especificidad, sensibilidad y susceptibilidad, en el cual cada parámetro experimental nos ayuda a valorar cada paso en la técnica sobre los resultados analíticos.

Exactitud Se puede resumir como la concordancia entre un valor encontrado experimentalmente con un valor aceptado de referencia. Este término está íntimamente relacionado con la selectividad y especificidad del método; eliminando con estos parámetros, contaminantes del proceso y productos de degradación. Pero debemos estar conscientes de que un método nunca puede ser 100% exacto, ya que siempre existen un grado de variación. Para evaluar la exactitud debemos determinar la función matemática que relaciona la concentración real del fármaco con la respuesta específica que estamos detectando. Para inferir que el método es exacto el grado de ajuste o correlación entre estas dos variables debe ser muy cercano a 1.0. Además de cumplir con sus criterios establecidos en el cual, el intervalo de confianza (IC) para la media debe incluir el 100%, el coeficiente de variación (CV) debe cumplir con los criterios establecidos que dependerán del tipo de método y de la muestra.

METODO	CV
Cromatográfico	< 2%
Químicos y Espectrofotométricos.	< 3%
Microbiológicos.	< 5%

Exactitud Es el grado de concordancia de las mediciones repetidas de un mismo valor, derivado de la desviación estandar estimada de dichas mediciones y expresada en términos de repetición y/o reproducibilidad. Estos dos términos se expresan de la siguiente forma:

1.- Se considera a la Repetición como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un mismo analista usando la misma técnica y el mismo aparato.

2.- Se considera a la Reproducibilidad como la concordancia obtenida entre determinaciones analíticas realizadas bajo ciertas condiciones: diferente analista, diferente aparato, diferente laboratorio, y diferente tiempo.

El criterio para el c.v. total debe cumplir con los fines para los cuales el método será utilizado. Para el método cromatográfico es $< 2\%$.

Linealidad Es la medición del grado en el que una curva de calibración se aproxima a una línea recta o del grado en el que la susceptibilidad (relación existente entre la pendiente de una curva de calibración y la variabilidad de los puntos experimentales es constante es decir, que se puede captar cualquier error y se puede hacer simplemente con estándares. Para llevar acabo la linealidad en la validación de un método analítico es preciso determinarla mediante dos tipos diferentes:

1.- Linealidad del sistema Para determinarla se evalúa el comportamiento de diferentes niveles de concentración de la sustancia de referencia ante la respuesta del detector. Por lo general, estos niveles de concentración a analizar dependen del propósito del método. Dicha evaluación se realiza a partir del análisis de la gráfica resultante de datos obtenidos

experimentalmente y la respuesta del detector.

Se considera que el sistema es exacto cuando se demuestra que el valor del coeficiente de correlación está muy cercano a 1 y cuando el valor interceptado de la curva es muy cercano a 0.

Precisión del sistema. Aquí se evalúa la dispersión o variación de los datos experimentales. Dicho parámetro se establece a partir de un método determinado de repeticiones del análisis a soluciones de referencia con un 100% del nivel esperado.

Se considera que el sistema es preciso cuando el valor de la media del por ciento de recobro está muy cercano al 100% y el valor del coeficiente de variación esta por debajo del 2%.

- 2.- **Linealidad del método.** Para afirmar que una formulación dada se apega lo suficiente a un valor teórico de referencia en cuanto al contenido de activo, es necesario manejar este parámetro de linealidad. Se establece al graficar los resultados obtenidos de una serie de análisis: muestras placebo adicionados del principio activo relación excipiente -> fármaco y activo solo cantidad de muestra a diferentes concentraciones) contra la cantidad teórica para obtener una línea recta. Es así que la linealidad del método puede verse afectada por dos factores: 1) cantidad de muestra

y 2) relación excipiente-fármaco. Por lo que una vez establecido los efectos de estos dos factores se puede inferir sobre la linealidad del método en base a los siguientes criterios:

1.- El efecto que tiene la cantidad de muestra debe cumplir con valores de coeficiente de correlación cercanos a 1 el intercepto debe ser aproximadamente igual a 0. Se acepta que la variación de la concentración dentro del rango trabajado no altere la exactitud del método analítico.

2.- El efecto excipiente -fármaco. Al obtener valores similares de la media, desviación estándar y coeficiente de variación, se puede inferir que el efecto del placebo sobre la exactitud del método es despreciable.

* Si en el momento de hacer la linealidad del método se trabajan diferentes concentraciones, cuando menos por quintuplicado, la exactitud del método se puede determinar de los valores de linealidad.

Especificidad Un método es específico cuando sus resultados se deben exclusivamente a la sustancia analizada es decir, que las otras sustancias presentes en el producto o bien degradaciones resultantes de un periodo de almacenaje no interfieren, ni en forma inhibitoria ni

aditiva, con la valoración. La valoración deberá establecer que:

- A) Los excipientes del producto no interfieren en la valoración (interferencia).

Criterio Se confirma que el método desarrollado es capaz de separar la sustancia de interés de cualquier interferencia presente. De no ser así, optimizar el método o desarrollar otro.

- B) La valoración de la sustancia en análisis no se ve afectada por otras sustancias presentes (sobre todo en métodos diseñados para estabilidad). Estas sustancias pueden usar metabolitos , productos de degradación, otros principios activos (polifármacos), contaminantes, etc.

Para determinar esta especificidad existen diferentes métodos para degradar la sustancia, y dependerán de las propiedades fisicoquímicas del compuesto.

- 1.- Se coloca la sustancia de interés, placebo y muestras del lote del producto en una estufa a 20°C menos que el punto de fusión de la sustancia de interés durante un apropiado tiempo (2 a 4 semanas).
- 2.- Colocar la sustancia de interés, el placebo y muestras del lote del producto a la luz UV o a la luz fluorescente y/o a humedad controlada.
- 3.- Si se requiere hacer soluciones de la sustancia de interés, ajustar el pH= 1 a 2 y/o 10 a 12 y

colocarlas de 60°C a 80°C durante 2 a 4 semanas.

4.- Si se trata de formas farmacéuticas líquidas o semisólidas, pueden degradarse por oxidación (con peróxido de hidrógeno) y permanecer 2 a 4 semanas a temperatura ambiente; y/o por hidrólisis (pH= 1 a 2 y 10 a 12), colocando las muestras de 60°C - 80°C durante 2 - 4 semanas.

5.- Checar la aparición de sustancias relacionadas (productos de degradación), utilizando por lo menos cualquiera de las técnicas cromatográficas siguientes: Cromatografía de Líquidos de Alta resolución, Cromatografía de gases y/o Cromatografía de Capa Delgada.

Criterio. Se verifica que cada producto de degradación pueda ser separado de la sustancia de interés utilizando el método desarrollado.

Ajustar las condiciones de operación para obtener la máxima resolución.

Sensibilidad (Límite de Detección). Corresponde a la concentración mínima del componente que puede ser detectado por el método analítico. Por regla general cuando una muestra contiene un compuesto en poca cantidad, la señal del instrumento será pequeña. Por lo tanto existe duda de que la señal, se debe al ruido producido por el instrumento sea por el método o por el compuesto a analizar. Esta determinación se realiza disminuyendo la cantidad de principio activo a analizar hasta en un 50% del nivel establecido o a una cantidad específica

establecida y, a partir de ésta se disminuye de 10 en 10% hasta encontrar la cantidad mínima detectada por el método analítico a validar.

Tolerancia Controla un factor alrededor de un rango específico mientras el resto de los factores son sometidos a diferentes condiciones de prueba.

Documentación La documentación, como ya se mencionó anteriormente, es de vital importancia y por lo tanto debe constar como mínimo de:

- Los parámetros de validación.
- La denominación de los lotes y origen de las pruebas y sustancias de comparación.
- La calidad de las sustancias de comparación.
- Los instrumentos utilizados.
- Los espectros, cromatogramas, curvas de registro, etc.
- Los parámetros de ajuste de aparatos.
- Los resultados y cálculos.

Revalidación Se hará para establecer un punto de partida de las operaciones actuales, como una verificación de que el método se encuentra bajo control o cuando se han alterado las condiciones bajo las cuales se ha realizado la validación como:

- Empleo de instrumentos nuevos.
- Modificación de los procesos de fabricación o de reactivos.
- Cambios de proveedor o de calidad de los reactivos,

fases estacionarias y similares.

Esta revalidación puede ser histórica y requerir una mínima cantidad de trabajo adicional, ya que para cada caso debe decidirse hasta que punto debe repetirse una validación.

RECOMENDACIONES FINALES:

Para llevar acabo los diversos análisis de la validación, es necesario cuidar ciertas condiciones como son:

- Descripción clara y concisa del método a validar aún siendo desarrollado en el mismo laboratorio.
- La aplicación que se le dará al método analítico de referencia (para Control de Calidad, pruebas de estabilidad, pruebas de biodisponibilidad etc.)
- Necesidades del laboratorio y capacidad del mismo para establecer el uso continuo o rutinario del método a validar.
- Material a ser analizado, tener cuidado en su muestreo y conservación (protegerlo de la luz, protegerlo de la humedad, de temperaturas elevadas, etc.) si lo requiere.
- Cada equipo que se emplee para el análisis debe de estar debidamente calibrado.
- Para análisis volumétrico emplear soluciones recientemente valoradas.
- Para técnicas de producto terminado emplear placebo y principios activos en vez de producto.
- La sustancia o estandar secundario de referencia

deberá estar bien caracterizado es decir, que se cuenta con un certificado de calidad que establezca su potencia, humedad, los posibles contaminantes y/o productos de degradación (Estandarización del principio activo).

CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION.

INTRODUCCION

La cromatografía es un método que nos permite separar mezclas químicas (principalmente orgánicas) en sus componentes individuales sin embargo, no es útil para identificar a los componentes, en contraste con la espectrofotometría. La cromatografía es una técnica desarrollada a principios del siglo; y su nombre se debe a que las primeras separaciones se llevaron a cabo con pigmentos de plantas. En general, la cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil, gas o líquido y retenido selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido. De acuerdo con la naturaleza de las fases y los mecanismos de separación podemos clasificar a la cromatografía en dos grandes grupos según se muestra en el cuadro No.1.

En un principio se pensó que la cromatografía de fase líquida tendría un desarrollo técnico más rápido, sin embargo, la cromatografía de gases se comercializó primero, debido principalmente a los problemas en diseño que era necesario superar para desarrollar los instrumentos de fase líquida de alta resolución. En seguida se enmarcan los principales hechos históricos en el desarrollo de la cromatografía.

A través de ciertas investigaciones realizadas en la segunda parte del siglo pasado se establecieron los terminos precursores de la cromatografía, esta técnica fue primeramente desarrollada

CUADRO 1

CROMATOGRAFIA
DE GASES

CROMATOGRAFIA Gas-Líquido (partición).

CROMATOGRAFIA Gas-Sólido).(adsorción)

Cromatografía en capa
delgada (adsorción).

CROMATOGRAFIA
PLANA

Cromatografía en papel.
(partición)

CROMATOGRAFIA

DE

LIQUIDOS

CROMATOGRAFIA

EN

COLUMNA

Cromatografía Líquido-
Sólido (adsorción).

Cromatografía Líquido-
Líquido (partición)

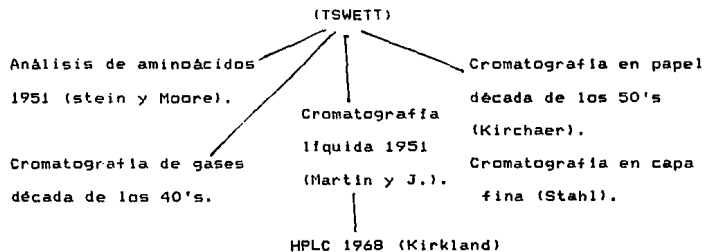
Cromatografía de Inter
cambio Iónico.

Cromatografía de Exclu
sión

por el botánico ruso M.S. TSWETT, para la separación e identificación de los pigmentos de las plantas. La primera descripción del método fue solo mencionada en un artículo presentado en 1903, y posteriormente fue emitido un reporte detallado sobre el método y su aplicación publicado en 1906. TSWETT solo informo el trabajo referido a las separación de las diferentes bandas coloridas atravez de una columna de separación.

Tuviéron que transcurrir 25 años desde el reporte de TSWETT, para que el método cromatografico se retomara nuevamente en Alemania por Kuhn y E. Lederer y en pocos años llegaron a perfeccionarla como una tecnica de uso comun, en los 20 años siguientes al redescubrimiento de la cromatografía fue fuertemente expandida y se desarrollaron algunas variantes de ella. Una particularmente importante fue el desarrollo de la cromatografía de partición gas líquido realizado por Martín y Jamesen 1952. En 1960 se obtuvo un avance que dio origen a la moderna cromatografía de líquidos debido al desarrollo de la alta presión y la detección continua en el sistema (HPLC).

CROMATOGRAFIA 1903



TERMINOS GENERALES

Para iniciar la separación de una muestra problema por HPLC, el primer paso a seguir es disolver dicha muestra en un solvente apropiado, el cual en forma ideal debería ser idéntico a la fase móvil. El perfil de requisitos generales de los disolventes en cromatografía deben cumplir las siguientes características:

- elevada pureza y estabilidad.
- serie de polaridad completa y buena miscibilidad.
- baja toxicidad.
- transmisión UV elevada (menos importante para la CCF)
- baja viscosidad.
- poder de elución elevado para el respectivo problema de separación.

Los métodos de separación para la muestra son los siguientes:

- Extracción líquido-líquido (requiere mucho tiempo; gran consumo de disolventes; peligro de formarse emulsiones en el límite entre las fases, de recuperación que a menudo son reducidas).
- Centrifugación (gasto en aparatos).
- Reacciones de precipitación (generalmente vinculadas con centrifugación; peligro de pérdida de sustancia).
- Extracción líquido-líquido / líquido-sólido en columnas de extracción (manejo limpio y sencillo; ahorro de material y tiempo; mayor sensibilidad de

detección; posibilidad de trabajar en serie).

- Inyección directa de la muestra a través de precolumnas / conexión de columnas (método más elegante; pocos ejemplos disponibles hasta ahora; ha de desarrollarse individualmente dentro del marco de la elaboración de métodos).

* Es necesario que la muestra sea estable, que tenga una presión de vapor apreciable a la temperatura de operación y que no reaccione con ninguno de los componentes.

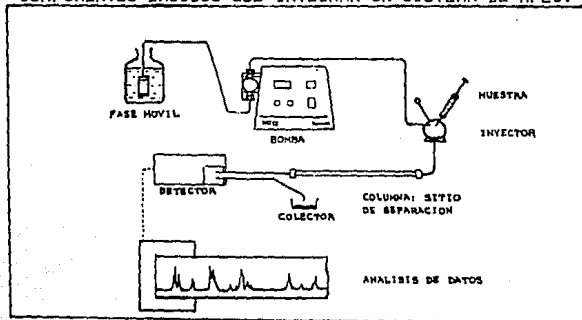
A continuación la muestra se introduce por medio de un mecanismo inyector en la parte superior de la columna. La muestra se mueve dentro de la columna por un flujo continuo de fase móvil que es impulsado por una bomba. Algunos componentes de la muestra viajan por la columna más lentamente que otros; los componentes que tienen más afinidad por la columna, tardan más en salir de la misma. Las normas generales para la elección de la fase móvil en la Cromatografía Líquida de Alta resolución indican lo siguiente:

- Por regla general, las sustancias problema pueden eluirse bien con los mismos disolventes en los que se disuelven bien (es vital que la fase sea compatible con la muestra).
- Por consiguiente, las mezclas problema se disuelven de preferencia en eluyentes (o al menos la mezcla de eluyentes deben contener los componentes) de los que conste que las sustancias problema son bien solubles en ellos.

- En términos generales, se elegirá una fase móvil con un poder de elución que garantice la separación total de todos los componentes introducidos en la columna usada. Esto implica cumplir las siguientes características en la fase móvil: No degradar o disolver la fase estacionaria; que tenga baja viscosidad debido a la influencia que presenta sobre el efecto de la transferencia de masa entre la fase móvil y la estacionaria; ser compatible con el tipo de detector usado, polaridad adecuada para la retención de la muestra en la columna y ser de pureza con grado cromatográfico para realizar el análisis con alta sensibilidad.

Comunmente un detector ultravioleta o de índice de refracción monitorea a los componentes cuando salen de la columna. Por último, el detector transmite señal a un mecanismo de registro que grafica los datos. El cromatograma obtenido puede proporcionarnos información tanto cualitativa como cuantitativa en en relación a la muestra.

COMPONENTES BASICOS QUE INTEGRAN UN SISTEMA DE HPLC.



En realidad, la separación de los componentes ocurre, físicamente en la columna, la cual está empacada con pequeñas partículas sólidas llamadas material de empaque o resinas. Actualmente llaman mucho la atención los materiales de empaque , ya sea para diversificar los tipos moleculares con afinidad, como para aumentar la estabilidad de las partículas en la columna.

VENTAJAS

- Gran espectro de aplicación. El campo de la química es muy extenso, ya que va desde la industria hasta la biomedicina.
- Técnica más suave que la cromatografía de gases ya que la gran mayoría de moléculas pueden disolverse, a diferencia de las que pueden ser volatilizadas y aún retener su estructura molecular original.
- Manejo de gran variedad de moléculas; ionizadas y no ionizadas, de muy alto peso molecular, biológicamente activas (enzimas), entre otras.
- Velocidad de análisis .
- Alta resolución.
- Automatización.

LIMITACIONES

- Equipo costoso.
- Amplia experiencia en su manejo.
- Método no específico para análisis cualitativo.

TIPOS DE CROMATOGRAFIA EN HPLC

TIPO DE SEPARACION: Cromatografía de exclusión cromatografía de Permeación o Cromatografía de Filtración

MECANISMO: Separa moléculas por tamaños. Las más grandes eluyen primero la columna se rellena de un gel, cuyos poros son de tamaño similar a la molécula de la muestra. Las moléculas pequeñas pueden penetrar dichos poros y quedan retenidas, en tanto que las grandes no.

MOLECULAS QUE SEPARAN: desde proteínas y Carbohidratos hasta metacrilatos y neopreno, el intervalo de pesos moleculares en que se puede trabajar varía desde aproximadamente 500 hasta varios millones.

SOLVENTES UTILIZADOS: Tolueno, dioxano, acetona-agua.

COLUMNAS: Las columnas empleadas pueden ser muy largas (varios metros

TIPO DE SEPARACION: Cromatografía líquido-sólido.

FASE NORMAL

MECANISMO: Adsorción.- Separa en base a polaridad.

La menos polar eluye primero, su mecanismo de acción se basa en la competencia que existe entre las moléculas de la muestra y las de la fase móvil o disolvente por ocupar los sitios activos en la superficie de un sólido. Algunos de los sólidos más utilizados son alúmina y gel de sílice.

MOLECULAS QUE SEPARAN: Hidrocarburos y aromáticos isómeros y compuestos no polares, en general se aplica a las moléculas de baja o media polaridad, de peso molecular no mayor de 1000.

SOLVENTES UTILIZADOS: Orgánicos no ionizables (hexano).

COLUMNAS: Las columnas utilizadas varían entre 15 y 25 cm. de longitud y entre 2 y 3 mm de diámetro interno.

TIPO DE SEPARACION: Cromatografía líquido-líquido (Bonder-phase).

FASE NORMAL

MECANISMO: Partición del soluto entre 2 solventes inmiscibles. Fase estacionaria más polar. Fue desarrollada en Inglaterra por Martin y Syrige 1941. Este mecanismo de distribución se basa en la distinta solubilidad que presenta una molécula en la fase móvil y en la fase estacionaria; los más solubles quedaran retenidos selectivamente en la fase estacionaria en tanto, que los menos solubles seran transportados más rapidamente por la fase móvil.

MOLECULAS QUE SEPARAN: Monosacáridos, Catecolaminas y aromáticos. En general se utiliza para compuestos moderadamente polares, cuyo peso molecular es inferior a 1500.

SOLVENTES UTILIZADOS: Polar no polar (Agua-acetonitrilo).

COLUMNA: Las comunmente usadas son de 15 a 50 cm de longitud y de 3 a 4 mm de diámetro interno; la caída de presión depende de variables tales como longitud, viscosidad de la fase móvil, temperatura, tamaño de partícula de relleno, flujo de la fase móvil; etc. pudiendo llegar hasta 35 atm.

TIPO DE SEPARACION: Cromatografía líquido-líquido

FASE REVERSA

**MECANISMO: Partición del soluto entre 2 solventes
inmiscibles. "Fase móvil más polar"**

MOLECULAS QUE SEPARAN: Herbicidas, Acidos grasos.

**SOLVENTES UTILIZADOS: Agua con modificadores orgánicos
(Metanol).**

TIPO DE SEPARACION: Cromatografía por intercambio iónico.

MECANISMO: Iones de la muestra se intercambian con un contra-ión.

Fue usada por primera vez por Taylor y Urey, separando isótopos de Litio y Potasio. Este método separa en base a la competencia entre la fase móvil y la muestra iónica, por los sitios activos de la resina intercambiadora de iones.

Las resinas de intercambio iónico, consisten de una matriz polimérica (estireno divinil benceno), insoluble y permeable, conteniendo grupos polares ácidos o básicos que pueden ser intercambiados por iones de cargas opuestas.

Los intercambiadores, deben ser estructuralmente estables, y las partículas deben estar empacadas de manera que haya buenas propiedades de flujo y con alta capacidad de intercambio.

La elección de las resinas, fuertes o débiles, de tipo aniónico o catiónico, depende en gran parte del pH en el que se realiza el intercambio. El coeficiente de selectividad indica la preferencia con que una resina de intercambio iónico fija dos o más iones de una solución.

En general, la resina fijará de preferencia iones divalentes o multivalentes que iones monovalentes, y ante iones de la misma valencia, fijará preferentemente los más pesados.

La mayoría de las separaciones cromatográficas se llevan a

cabo en soluciones acuosas, debido a las propiedades de ionización en agua.

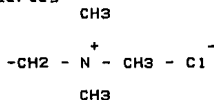
MOLECULAS QUE SEPARAN: Aminoácidos Nucleótidos.

SOLVENTES UTILIZADOS: Diversos Buffers orgánicos.

RESINAS: Existen dos tipos.

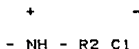
1.- RESINAS DE INTERCAMBIO ANIONICO.

a) Fuertes



Aminas cuaternarias

b) Débiles.



Este tipo de intercambiador adsorbe aniones de soluciones ácidos fuertes y bases moderadamente fuertes. y se utilizan satisfactoriamente en medios ácidos o neutros.

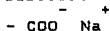
Debido a su carga positiva, puede atraer e intercambiar aniones (intercambio aniónico).

2.- RESINAS DE INTERCAMBIO CATIONICO.

a) Fuertes.



b) Débiles.



Estos intercambiadores adsorben cationes de soluciones de bases fuertes y moderadamente fuertes. Son usados satisfactoriamente en soluciones alcalinas o neutras.

Debido a su carga neta negativa, pueden atraer e intercambiar cationes.

FACTORES QUE AFECTAN LA
RETENCION DE INTERCAMBIO

- Concentración de solución amortiguadora. A concentraciones altas, disminuye la retención.

IONICO:

- Modificaciones en el pH.
- Temperatura. A temperaturas elevadas disminuye la retención.

COMPONENTES BASICOS DE UN SISTEMA DE HPLC

Los principales componentes de un sistema de HPLC se ilustran a continuación:

[BOMBA]-[INYECTOR]-[COLUMNA]-[DETECTOR]-[MANEJO DE DATO]

Los sistemas pueden tener un diseño modular o bien, ser integrados. Los sistemas modulares consisten de componentes individuales cada uno de los cuales puede ser usado como una unidad individual. Esto permite el usuario mucho más flexibilidad en la configuración de su sistema, y gradualmente ir mejorando el mismo. Un ejemplo de esta flexibilidad sería un sistema de gradientes con varias bombas el cual se usa para desarrollar metodologías diversas y que puede ser fácilmente transformado en sistemas de una sola bomba, que son usados para análisis de rutina.

Considerando los diferentes tipos de cromatografía que se aplican en HPLC podemos observar en la siguiente tabla, que sólo aquellos sistemas capaces de desarrollar gradientes, pueden ampliar o diversificar estos métodos de separación.

	TIPO DE CROMATOGRAFIA	GRADIENTE
	Exclusión	no
N O R M A L	Líquido-sólido (adsorción).	si
	Líquido-líquido	si

En general las bombas de presión constante tienen las siguientes características.

1.- Cámara de fase móvil de volumen limitado.

2.- Para una presión constante de la bomba, la velocidad de flujo del sistema varía con cambio en la composición de la fase móvil, en la temperatura, viscosidad, resistencia generada por la columna (filtros obstruidos), entre otros factores.

3.- Generalmente son más sencillas en su construcción por lo tanto son menos caras y es más fácil de darles servicio.

2.- Bombas de flujo constante.

Estas se pueden subdividir en 2 tipos: de cámara reducida (tipo jeringa) y con cámara de volumen infinito. La forma más simple de una bomba de flujo constante, consiste en un pistón accionado por un tornillo; si el tornillo se mueve a una velocidad constante el desplazamiento del pistón será constante y una vez que el sistema ha alcanzado la presión de operación, la velocidad del flujo será también constante.

INYECTORES DE MUESTRA

Esta parte del sistema debe proporcionar una zona de poco volumen completamente barrida por la fase móvil, para evitar la difusión de la muestra y la dilución exponencial.

Existen dos métodos principales para introducir la muestra en una columna de HPLC; estos son por medio de una válvula de inyección o por métodos de detección de flujo. En la actualidad la inyección de la muestra se puede hacer en forma automática. Primordialmente, los inyectores automáticos consisten de una válvula de inyección automática, un sistema de llenado de la válvula y un control electrónico que sirve para controlar funciones tales como; tiempo de inyección, tiempos de corrida, velocidades de llenado, número de inyecciones por muestra, volumen de inyección, identificación de muestra, lavado de válvula y jeringa, inicio de inyección para el registro, así como la operación de programadores de gradientes o controladores de sistema.

Dependiendo de la presión de trabajo y del tipo de bomba usada puede introducirse la muestra por medio de jeringas especiales, válvulas de inyección, inyectores automáticos o por interrupción del flujo.

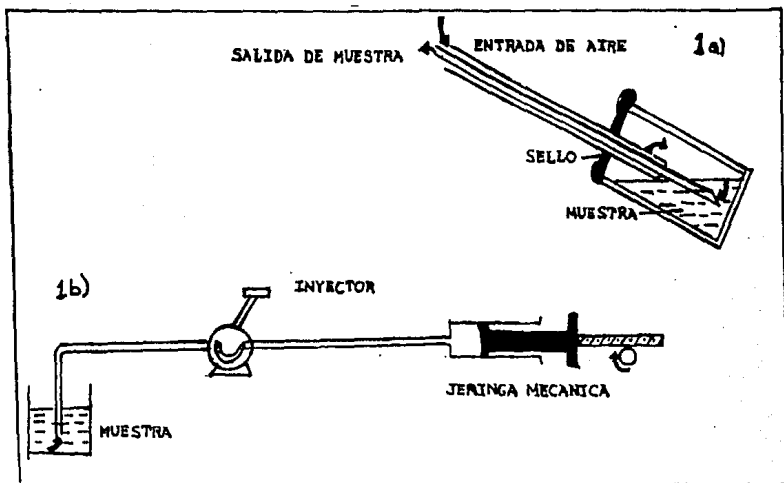
Existen principalmente 3 métodos por medio de los cuales los inyectores automáticos llenan la válvula de inyección:

1.- DESPLAZAMIENTO POSITIVO

Se requiere de un vial sellado que contiene la muestra una aguja doble y aire para pasar a la válvula (figura 1a).

2.- SUCCION.

Se emplea un sistema de succión ya sea por vacío o por una jeringa de mayor volumen y los viales que contiene no están sellados. (figura



1b)

3.- CON JERINGA

La jeringa es automática y generalmente puede ajustarse para dar varios volúmenes los viales empleados pueden estar sellados o abiertos.(figura 1c), la aguja de la jeringa entra en el vial de la muestra y saca el volumen requerido de muestra; finalmente la válvula es accionada y la muestra se introduce en la columna.

Los sistemas de inyección automáticos permiten algunas ventajas como operación sin atención y eliminación de algunos errores que se presentan en el análisis cuantitativo, ocasionado por el manejo manual de las técnicas de inyección.

COLUMNA

La columna es un componente central en el sistema cromatográfico ya que en ella se lleva acabo la separación de los componentes de la muestra en estudio.

Esencialmente esta constituida por un segmento de tubo de algún material inerte (generalmente se emplea acero inoxidable. Para poder elegir la columna adecuada en el desarrollo de un método de separación específico es necesario evaluar los siguiente parámetros de la columna.

a) Longitud de la columna

- Se empieza con columnas de unos 125 mm.
- Se prolonga en múltiplos en caso de requerirse un

número de platos más elevados para la resolución de los componentes (duplicando la longitud de la columna pero afectando la presión, el tiempo de análisis y volumen de elución doble permaneciendo inalterada la velocidad de flujo.)

b) Diámetro interior.

- Se empieza con un diámetro interior de unos 4 mm. considerado como el óptimo para el límite de detección, consumo de disolventes, tiempo de análisis y descenso de la presión; se aumenta para inyecciones de volúmenes de muestras mayores o en problemas con la célula detectora. Se reduce en caso de menores volúmenes o si se requiere una gran sensibilidad de detección.

c) Tamaño de partícula.

- Se empieza con partículas de unos 7 μm de tamaño medio, se aumenta si la presión del aparato no es suficiente para columnas largas y se reduce cuando se requiere una mayor eficacia separadora.

d) Presión

- Importante únicamente para establecer una cuota de flujo definida en el sistema cromatográfico dado.

e) Cuota de flujo

- Debe ajustarse de tal manera que se trabaje cerca del mínimo de la curva óptima (para columnas analíticas, generalmente alrededor de 1ml/min.

f) Temperatura (puede usarse a temperatura ambiente o a temperatura superior pero siempre constante ya que un

cambio pequeño en la temperatura de la columna implicaría variación en la eficiencia) para fines siguientes:

- Control de proceso por separación.
- Disminución de la viscosidad de la fase móvil logrando presiones menores con aumento de transferencia de masa.
- Aumento de la solubilidad de la muestra en la fase enlazada obteniéndose una mayor eficiencia global del equipo.
- Aumento de la velocidad de migración iónica en los sistemas de intercambio iónico.

* Es importante recalcar nuevamente algunos puntos para prolongar la vida de la columna separadora para HPLC como lo son:

- El control en la eficiencia separadora de la columna.
- Disolventes y soluciones tampón filtrados en cada inyección.
- Evitar bases o ácidos fuertes (trabajar dentro del rango de pH=2 a 8).
- Evitar esfuerzos mecánicos como golpes, variaciones de presión cambios en la velocidad de flujo, cambios rápidos de la composición del eluyente etc.
- Evite que la columna se seque por dentro.
- Usar cada columna para una aplicación determinada sobre todo en la cromatografía de pares iónicos.
- y regenerar la columna de cuando en cuando.

DETECTOR

Su objetivo es monitoriar la composición del líquido que eluye de una columna de cromatografía por lo que hace posible el registro de la composición de la muestra respecto al tiempo. Existen varios tipos de detectores, los cuales tienen aplicaciones diferentes, según el tipo de molécula que se separe.

Antes de ampliar la operación de los detectores mencionaremos tres terminos que se usan para describir y comparar los mismos. Estos terminos incluyen el ruido, la derivada y la linealidad. El ruido se refiere a inestabilidad de la línea basal y generalmente se mide en desviación porcentual de una escala establecida y pueden ser causas múltiples como impurezas en la fase móvil, tierras mal establecidas, solventes inmiscibles o fallas electrónicas entre otras.

Por otro lado, la derivada describe el movimiento lento hacia arriba o hacia abajo de la línea basal en un período de tiempo considerable, y son generalmente medidos por hora asociados con la temperatura. Finalmente se dice que un detector es lineal si la respuesta eléctrica producida por el mismo es directamente proporcional a la masa o concentración de los componentes que pasan por el detector.

La siguiente es una lista de algunos de los detectores más utilizados en cromatografía líquida:

- 1.- Detector espectrofotométricos (uv/vis)
- 2.- Detector de Índice de Refracción.
- 3.- Detector de Fluorescencia.

- 4.- Detector Electroquímicos.
- 5.- Detector Infrarojo.
- 6.- Detector de Conductividad.
- 7.- Detector de radioactividad.

1.- Detectores espectrofotométrico (uv/vis).

Son los de mayor uso en HPLC y responden a aquellas sustancias que absorben luz visible o ultravioleta. Una gran variedad de compuestos caen en esta categoría como los son sustancias con electrones sin compartir, compuestos aromáticos y compuestos con enlaces del tipo $C=O$, $C=S$, $-N=O$, $-N=N-$ a la salida de la columna el haz de luz es enfocado a través de la celda de flujo hacia el sistema de foto-detección.

La sensibilidad del detector será directamente proporcional al valor del coeficiente de extinción y al paso de luz de la celda. La mayoría de las celdas tienen un paso de luz entre 1 y 10 mm y varían en volumen de 0.5 μ l a 20 μ l.

Existen diferentes categorías de detectores espectrofotométricos como : longitud de onda fija, longitud de onda seleccionable, selección dual, longitud de onda variable, y detectores de barrido (uv/vis).

2.- Detector de Índice de Refracción.

En base en que los líquidos tienen diferente índice de refracción estos miden la diferencia entre la fase móvil pura y el soluto que eluye de la columna. Sin embargo es poco empleado debido a que tiene menor sensibilidad que otros, es sensible a variaciones de temperatura, tiende a romperse y sensible a la presión y no puede emplearse normalmente para gradientes.

3.- Detectores de fluorescencia.

su ventaja es la selectividad y la sensibilidad. Se trata de una técnica muy poderosa cuando se realizan análisis de sustancias que existen en muy pequeñas cantidades (trazas).

La fluorescencia se lleva a cabo cuando una molécula absorbe energía y ocupa un estado de energía excitado. Esta energía debe disiparse antes de que la molécula regrese a su estado normal o nivel de energía basal. Si la molécula cae instantáneamente a su nivel basal con la emisión de energía en forma de luz se dice que fluoresce.

4.- Detector Electroquímico.

Se emplea en la electroquímica hidrodinámica en capa delgada para la detección de compuestos electroactivos en un eluyente de CLAR, es lo más reciente.

Posee un alta sensibilidad, selectividad y amplio rango de linealidad, puede detectar desde picogramos femtogramos de compuestos electroactivos. El límite de detección determinado por la proporción de la señal al nivel de ruido, depende de la velocidad de las reacciones electroquímicas y de los niveles de corriente residual.

La variación analítica en la detección electroquímica pueden llevarse a cabo por dos técnicas diferentes:

* Voltamétricas . El voltaje aplicado a un electrodo varía constantemente en un periodo de tiempo y se mide la corriente resultante.

* Amperométrica. Se mide a un valor constante de corriente directa el potencial.

MANEJO DE DATOS

La salida de información de un detector de cromatografía líquida es en forma de una señal eléctrica. Esta señal puede ser manejada de diferentes maneras. La forma más simple es disponer de la información en un cromatograma en papel.

Instrumentos alternativos al registrador en papel son desde un simple integrador de sistemas, un integrador de canales múltiples o sistemas de manejo de datos hasta computadoras de alta capacidad con software específico.

METODOS DE CALIBRACION

ESTANDAR EXTERNO.

Se realiza una curva de calibración del compuesto de referencia utilizando una serie de soluciones de diferente concentración, graficando el area o altura del pico contra la concentración; obteniendo de la pendiente el factor de respuesta, utilizado para calcular la concentración del compuesto en la muestra problema.

ESTANDAR INTERNO.

Adición de estandares: a la muestra por analizar se le adiciona el compuesto de referencia a una concentración conocida, lo cual permite que se determinen las posibles variaciones que intervienen durante la separación.

REQUISITOS

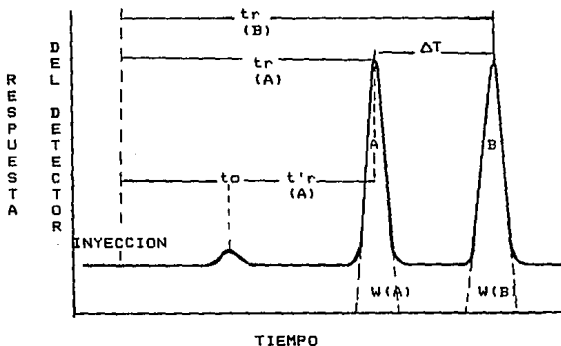
- El tiempo de retención debe ser cercano al pico de interés.
- La concentración debe ser cercana a la del compuesto.
- Debe ser estable y de alta pureza.
- Químicamente similar al compuesto de interés.
- Debe estar ausente en la muestra de interés.

DEFINICIONES BASICAS EMPLEADAS EN CLAR

Es importante discutir en la cromatografía los términos que se usan para describir y comparar los mismos. Estos términos incluyen:

1.- CROMATOGRAMA.

Existe un registro gráfico de los componentes de una muestra, y/o la concentración en que están presentes y/o el área registrada de los picos presentes. Estos salen a un tiempo determinado de la columna, y registrados por el detector, la señal es agrandada por un amplificador y trazada por un registrador.



2.- TIEMPO DE RETENCION

Se manifiesta una vez que la muestra permanece dentro de la columna y es medido desde el momento en que la muestra se introduce en el sistema hasta que se obtiene el punto máximo de la señal o pico. El tiempo de retención esta en función de la muestra, la columna, fase móvil y la temperatura. Usualmente se emplea como medida de tiempo cualitativo y es expresado en minutos.

Existe un factor mediante el cual podemos invertir el tiempo de retención en volumen de retención (v_r), al multiplicar el flujo de la fase móvil por el tiempo de retención.

$$v_r = \text{flujo (ml/min.)} \times t_r.$$

3.- TIEMPO MUERTO (t_0 o t_m).

Tiempo en el cual un compuesto no es retenido.

4.- TIEMPO DE RETENCION AJUSTADO (t'_r).

Se expresa como la diferencia que existe entre el tiempo de retención y el tiempo muerto. Es decir el tiempo en el cual la muestra permanece dentro de la fase estacionaria.

$$t'_r = t_r - t_0$$

5.- ANCHURA EN LA BASE DE LAS SENAL. (W).

Es la relación que existe entre la línea base y la tangente trazada a ambos lados de una señal cromatográfica; considerando que la forma de la señal es gaussiana.

Es importante su uso en el cálculo de la resolución y eficiencia de los sistemas cromatográficos.

6.- LIMITE DE DETECCION.

Minima concentración de la sustancia que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones de operación establecidas.

7.- LIMITE DE CUANTIFICACION.

Minima concentración de una sustancia que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas.

8.- MEDIDA DEL AREA Y ALTURA DEL PICO.

La altura del pico establece la distancia vertical desde el máximo del pico, a la línea base.



W = Anchura del pico

A = h x W / 2

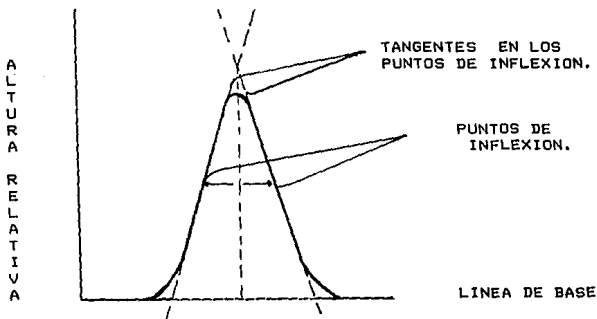
9.- NUMERO DE PLATOS TEORICOS (N).

Es una medida de la eficiencia de la columna y sistemas asociados, por lo tanto, cuanto mayor sea N, más eficiente será la columna .

Se denomina un plato teórico al equilibrio de distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. Hay varios métodos para cuantificar el número de platos teóricos, dependiendo de la altura a la que se tome la anchura del pico.

$$N = 16 (tr / W)$$

Donde tr y W se expresan en las mismas unidades (tiempo, volumen, distancia, etc.), y 16 es obtenido apartir de la anchura del pico tomando 4 desviaciones estándares (método de las tangentes); incluyendo casi el 95% de la superficie o área bajo la curva.



10.- ALTURA EQUIVALENTE A UN PLATO TEORICO (AEPT)

Las moléculas al pasar a lo largo de la columna sufren etapas de partición, que pueden ser calculadas por valores teóricos. Por lo tanto AEPT representa la longitud de la columna necesaria para generar un plato teórico, o bien la longitud de la columna requerida para obtener un equilibrio de la muestra en la fase móvil y la fase estacionaria.

Se representa por:

$$AEPT = L / N$$

L = Longitud de la columna en milímetros.

N = Número de platos teóricos.

11.- VELOCIDAD LINEAL PROMEDIO DE LA FASE MOVIL (U).

Este término es utilizado cuando se representa esquemáticamente AEPT como función de u (gráfica de Van Deemter).

$$U = L / t_0$$

12.- COEFICIENTE DE DISTRIBUCION O DE REPARTO (K).

Esta propiedad característica de cada sustancia es función de la temperatura, del sistema de fase móvil y estacionaria. se expresa en la siguiente medida:

$$K = \frac{\text{Cantidad de muestra / ml de fase estacionaria.}}{\text{Cantidad de muestra / ml de fase móvil.}}$$

13.- RELACION DE FASES (B)

En cada parte de la columna existe una relación en proporción de volumen de fase móvil y fase estacionaria.

$$B = \frac{\text{Mililitros de fase móvil}}{\text{Mililitros de fase estacionaria.}}$$

14.- RELACION DE CAPACIDAD (k').

Es la constante termodinámica que mide la solubilidad de la muestra en la fase estacionaria. Indica el tiempo durante el cual puede retenerse cada componente de la muestra en la columna.

$$k' = \frac{t^*r \text{ Tiempo en la fase estacionaria de la muestra}}{t_o \text{ Tiempo en la fase móvil de la muestra.}}$$

Si se expresa en volumen se tiene:

$$k' = \frac{t_r - t_o}{t_o} = \frac{v_r - v_o}{v_o}$$

Intercambiando las relaciones anteriores

$$K = k' \times B$$

15.- RESOLUCION (R).

Es una medida cuantitativa del grado de separación obtenido entre dos compuestos:

$$R = \frac{V_2 - V_1}{1/2 (W_1 + W_2)} = \frac{2 (t_{r2} - t_{r1})}{W_1 + W_2}$$

W1 y W2 que representan la anchura del pico deben ser expresados en las mismas unidades. Un valor de R = 1.5 significa separación completa.



La resolución es una medida estrechamente ligada a la selectividad, la eficiencia y el factor de capacidad.

$$R = 1/4 (\alpha - 1 / \alpha) (\sqrt{N}) (K' / 1 + K')$$

16.- SELECTIVIDAD (α).

Es una medida de la solubilidad diferencial de dos compuestos en la fase estacionaria. Y puede ser mejorada por el cambio de fase móvil, el cambio de fase estacionaria y un control de la temperatura, un valor elevado significa una mayor separación. Es expresada en la siguiente manera:

$$= t'_{r2} / t'_{r1}$$

CAPITULO II

MATERIAL Y METODO

2.1. MATERIAL

2.2. REACTIVOS

2.3. EQUIPO

2.4. METODO

CAPITULO II

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIAL Y METODOS.

I.-Material. Se utilizó material de vidrio de marca confiable, limpio y en perfecto estado, sobre todo se tuvo especial cuidado en matraces y pipetas aforados, debido a su influencia determinante sobre los resultados a obtener.

- Matraces aforados de 10 ml.
- Matraces aforados de 25 ml.
- Matraces aforados de 50 ml.
- Matraces aforados de 100 ml.
- Pipetas aforadas de 2 ml.
- Pipetas aforadas de 3 ml.
- Pipetas aforadas de 4 ml.
- Pipetas aforadas de 5 ml.
- Pipetas aforadas de 10 ml.
- Pipetas aforadas de 15 ml.
- Mortero con pistilo.
- Embudos de filtración de tallo largo.
- Probeta graduada de 1000ml.
- Equipo de filtración de disolventes MILLIPORE.
- Filtros tipo membrana MILLIPORE No.0.45 c.

II. Reactivos. Los reactivos empleados fueron grado analítico y utilizados sin purificación previa.

- Estandar de referencia primario de Etofamida. Farmitalia Calo Erba Lote: LC34093B 99.3%.
- Metanol HPLC. Mallinckrodt Lot. 3041KEAM
- Acido cítrico. Monterrey Lote: 005204
- Fosfato de sodio dibásico anhidro J.T Baker Lote: 3828 99%.

III. EQUIPO. Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución con las siguientes características:

- Equipo.....
- Modelo.....
- No. serie.....
- Partes del equipo:
 - 1.- Sistema de bombeo, Waters Modelo 590
 - 2.- Sistema de inyección, Waters 712 WISP.
 - 3.- Detector, Waters 490 (programable).
 - 4.- Columna. Waters Nova-Pak C₁₈ Lote: T02501
(60 A , 4µm, 3.9 x 150 mm)
 - 5.- Registrador. Waters 740

IV. METODO. Las muestras fueron disueltas en metanol grado HPLC y se filtraron en papel Watman No. 3. Por diluciones se llevarón a una concentración final de 0.4 mg/ml, que es la equivalente al 100% del activo en el producto. Posteriormente las muestras se filtraron (con filtros de 0.45 µc MILLIPORE), antes de

inyectarse en el cromatógrafo.

V. VALIDACION DEL METODO ANALITICO.

- A). Durante la parte experimental se trabajó con metanol grado HPLC, como mejor solvente del activo. Por otro lado, se trabajó con excipientes de la formulación del producto con y sin activo para verificar interferencias en el registro de las áreas en el cromatograma.
- B). La sensibilidad del método se determinó dentro de las concentraciones comprendidas entre 0.2 mg/ml y 0.6 mg/ml, correspondientes al 50 y 150 % del activo en el producto respectivamente.
- C). La fase móvil (Metanol:Buffer pH=2.85) en relación 68:32 y con un flujo constante de 1.5 ml/min. NOTA: fase que se preparará al inicio de cada día de trabajo.
- D). En cada determinación experimental se utilizó un estandar de referencia primario para verificar la ausencia de variaciones en el funcionamiento del equipo, determinadas por la temperatura de la columna y la presión, parámetros no controlables.

E). Para reducir los posibles errores en la inyección de las muestras, el equipo cuenta con un inyector automatico de 20 μ l por inyección.

F). Se utilizo una columna Nova Pack C-18) , el - detector de luz ultravioleta se ajustó a una longitud de onda de 512 nm, considerada como la máxima absorción del activo.

CAPITULO III

RESULTADOS

- 3.1. ESPECIFICIDAD DEL METODO**
- 3.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA**
- 3.3. EXACTITUD DEL METODO**
- 3.4. LINEALIDAD DEL METODO**
- 3.5. PRECISION DEL METODO**
- 3.6. REPRODUCIBILIDAD DEL METODO**

CAPITULO III.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Se establecieron dos etapas fundamentales para desarrollar la validación del método; la primera nos proporcionó información sobre el comportamiento del método, utilizando los parámetros de especificidad, exactitud y linealidad del método así como la del sistema. Dentro de la segunda etapa se consideraron la precisión y reproducibilidad como sistema de medición para la determinación de posibles errores aleatorios y / o sistematicos.

Dentro del desarrollo se incluyeran los siguientes parametros estadísticos aplicados a la validación de la metodología analítica:

- 1.- Media (\bar{x}).

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{N}$$

- 2.- Desviación estandar (s).

$$DS = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{N-1}}$$

3.- Coeficiente de variación (c.v.).

$$C.V. = \frac{DS}{\bar{X}} \times 100$$

4.- Pendiente de la recta (m).

$$m = \frac{Nt(Sxy) - (Sx)(Sy)}{Nt(Sx)^2 - (Sx)^2}$$

5.- Intercepto al origen (b).

$$b = \frac{Sy - m(Sx)}{Nt}$$

6.- Coeficiente de regresión (r).

7.- Error estandar de regresión (sy/x).

$$Syx = \sqrt{\frac{Sy^2 - m Sxy - b Sy}{N}}$$

9.- Varianza.

$$S^2 = 1/n \sum_{i=1}^n (x - \bar{x})^2$$

Util para determinar la relación existente entre dos poblaciones mediante las tablas de Fisher.

10.- Ecuación de una línea recta.

$$y = b + mx$$

- 11.- Intervalo de confianza al 95% (cualquier parámetro: μ , b y \bar{x}).

$$I.C. = \mu \pm t_{s / (N)}^{1/2}$$

- 12.- Distribución t de student.

Es función del nivel de probabilidad deseado en relación al número de replicas realizadas en la serie.

Este valor es obtenido apartir de las tablas t de student (recomenado para métodos analíticos una probabilidad de (0.05).

- 13.- t experimental

$$t \text{ exp} = \frac{\bar{x} - u}{s \sqrt{N}}$$

- 14.- Prueba de hipótesis

H_0 y H_a .

Para toda prueba de hipótesis es necesario seguir una secuela ordenada, la cual comprende:

- a) enunciar con toda claridad la hipótesis : por comprobar (H_0 hipótesis nula la comparacion de los resultados de dos muestras debe ser nula o casi insignificante, H_a hipótesis alterna para todas las determinaciones.

b) establecer la hipótesis alternativa en caso necesario.

c) fijar el valor conveniente para el NIVEL DE SIGNIFICANCIA para métodos analíticos se estipula un alfa de 0,05.

d) de acuerdo con lo propuesto en el problema o con la distribución que se presente, determinar si este nivel de significancia se debe considerar a un solo extremo de la distribución, o en ambos extremos (en este último caso se debe tomar la mitad del riesgo $/2$ en cada extremo.

e) calcular la estadística correspondiente a la prueba con los datos obtenidos experimentalmente.

f) comparar el valor obtenido con el valor crítico dado por la tablas.

g) aceptar la hipótesis si el valor calculado es inferior al valor crítico, o rechazar en caso contrario.

15.- Error sistemático: error debido a medidas incorrectas con tendencia marcada que se pueden calcular y graficar (esto implica método no confiable).

16.- Error aleatorio: permanece aun cuando se elimino el error sistematico dando lugar a medidas imprecisas; por lo tanto estos errores dan pequeñas medidas imprecisas y tienden a cancelarse, sin embargo no invalidan la confiabilidad del método

ESPECIFICIDAD DEL METODO

(CON TEMPERATURA)

Las muestras de activo, placebo, activo/placebo y producto terminado fueron sometidas a una degradación por calentamiento a 80 C durante 15 días, 1 mes, 2 meses y 3 meses.

Durante este tiempo se analizó por separado cada muestra con el fin de encontrar posibles productos de degradación o interferencias en el título del activo. Encontrándose los siguientes resultados:

MUESTRA	NO. DIAS			
	15	30	60	90
ACTIVO	*	*	*	&
PLACEBO	@	@	@	@
ACTIVO/PLACEBO	*	*	*	^
PROD. TERNINADO	*	*	*	^

* SIN DEGRADACION

& SIN DEGRADACION Y REDUCCION DE 2 % EN POTENCIA

^ SIN DEGRADACION Y REDUCCION DE 3 % EN POTENCIA

@ NO HAY DEGRADACION NI INTERFERENCIA CON EL ACTIVO

Para complementar la especificidad del método y comprobar con ello posibles interferencias que pudieran afectar la integridad del activo en la formulación se llevaron a cabo varias corridas cromatograficas y espectrofotometricas en la siguiente manera:

- 1.- Se registro el cromatograma y barrido del estandar como referencia para todo lo siguiente.
- 2.- Se registró el cromatograma y barrido del producto.
- 3.- Se registró el cromatograma y barrido con la mezcla de excipientes (No se presento respuesta).
- 4.- Se registraron los cromatogramas del activo con cada uno de los excipientes para verificar si alguno de ellos al interactuar con la molécula del activo potenció o redujo la acción del principio activo.

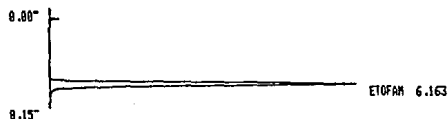
De este ultimo punto la suma, en la diferencia total a una misma concentración del activo frente a cada uno de los excipientes no rebasó al limite del 2% de variación requerido ya que tan sólo se obtuvo un valor del 1.3%

ESTANDAR DE ETOFAMIDA

239

SAMPLE 4

12:14 JAN. 07 1991



CAL. METHOD 04
 SF .100000e+01 PA PB
 .200000e+01 .100000e+01

NO.	NAME	RT	A OR H	MK	CONC
1	ETOFAM	6.163	2653184		47.1234
	TOTAL		2653184		47.1234

DATE SET
 YEAR:1991 MONTH:01 DAY:07 HOUR:02 MINUTE:30

IS THIS A NEW FILE 1:YES 0:NO

0

*** WATERS 740 DATA MODULE ***

FILE NO. 0

FILE SELECT 0-9
 FILE NO:3

240

LIST
 ATTENUATION 256
 CHART FEED 2.00
 END TIME 8.150
 MINIMUM AREA 40000
 MINIMUM HEIGHT 10
 MINIMUM WIDTH 0.100
 DOUBLE PEAK WIDTH 10.000
 CALCULATION METHOD 04

EXTRA DATA

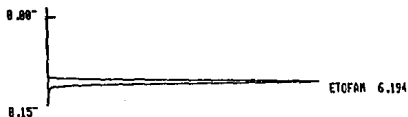
NO.	FUNCTION
1	PARAMETER A .200000e+01
2	PARAMETER B .100000e+01
3	PLAY BACK PEAK DATA 04
13	PLAY BACK SIZE 1
16	RECORD POSITION 0
19	PEAK DETECT MODE 02

ETOFAMIDA MATERIA PRIMA

238

SAMPLE 3

12:04 JAN. 07 1991



CAL. METHOD 04
 SF .100000e+01 PA .200000e+01 PB .100000e+01

NO.	NAME	RT	A OR H	MK	CONC
1	ETOFAM	6.194	2273289		40.3761
----- TOTAL			2273289		40.3761

LIST
ATTENUATION 256
CHART FEED 1.00
END TIME 8.000
MINIMUM AREA 40000
MINIMUM HEIGHT 10
MINIMUM WIDTH 0.100
DOUBLE PEAK WIDTH 10.000
CALCULATION METHOD 04

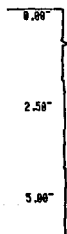
EXTRA DATA

PLACEBO

NO. FUNCTION
1 PARAMETER A .500000E+00
2 PARAMETER B .100000E+02
3 1ST PEAK TIME 5.000
8 PLAY BACK ATTENUATE 512
9 PLAY BACK PEAK DATA 04
13 PLAY BACK SIZE 1
19 PEAK DETECT MODE 02

IDENTIFICATION PEAK

NO.	NAME	RT	COL
1	ETOFAM	6.799	0.03845



139

SAMPLE 1 10:01 JAN. 04 1991



CAL. METHOD 04
SF PA PB
.100000E+01 .500000E+00 .100000E+02

NO.	NAME	RT	A	OR	H	MK	CONC
1	ETOFAM						
	TOTAL	79	0				0.0000

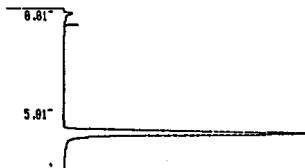
DATE SET
YEAR:1991 MONTH:01 DAY:07 HOUR:14 MINUTE:30

IS THIS A NEW FILE 1:YES 0:NO

DEGRADACION DE ETOFAMIDA CONTEMPERATURA

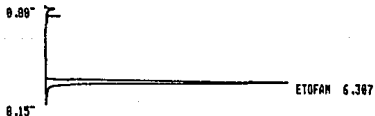
241

FILE SELECT 0-9
FILE NO:3



SAMPLE 1

14:42 JAN. 07 1991



CAL. METHOD 04
SF PA PB
.100000E+01 .200000E+01 .100000E+01

242

NO.	NAME	RT	A OR H	MK	CONC
1	ETOFAM	6.307	1509328		26.8073
----- TOTAL			1509328		26.8073



CAL. METHOD 04
 SF PA PB
 .100000E+01 .200000E+01 .100000E+01

NO. NAME RT A OR H MK CONC

DEGRADACION DE ETOFAMIDA EN
TOTAL PRODUCTO CON 27.6768
TEMPERATURA

243



SAMPLE 3

15:19 JAN. 07 1991



CAL. METHOD 04
 SF PA PB
 .100000E+01 .200000E+01 .100000E+01

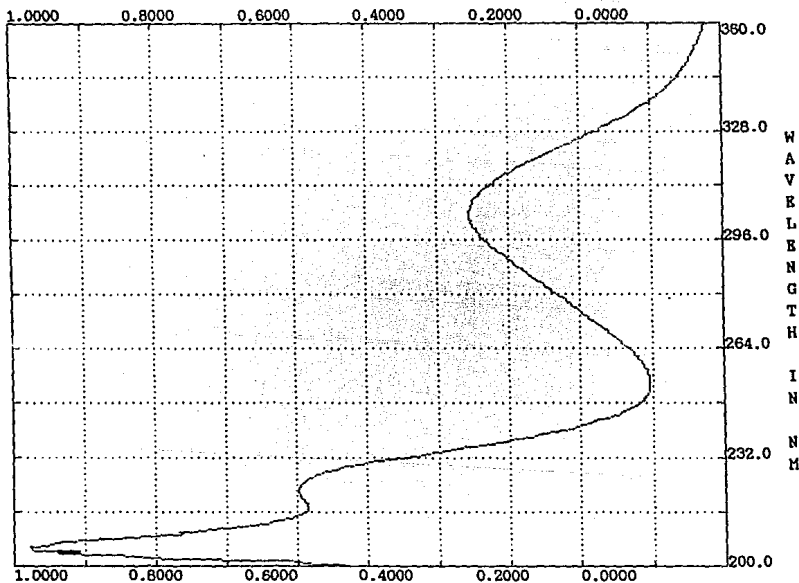
NO.	NAME	RT	A OR H	MK	CONC
1	ETOFAM	6.161	1684126		29.9119
	TOTAL		1684126		29.9119

244

ESTANDAR PRIMARIO DE ETOFAMIDA

BECKMAN
DU-68 SPECTROPHOTOMETER

ABSORBANCE



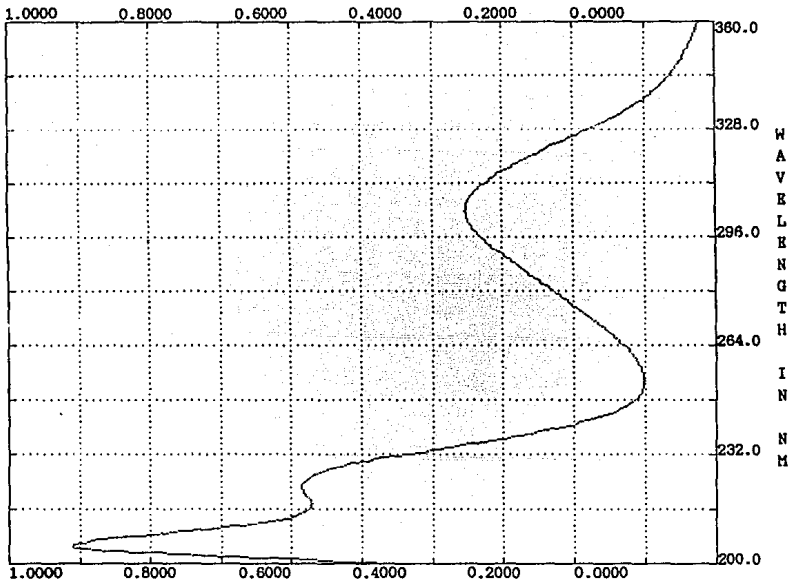
Scan Speed: 500 nm/min

PEAK PICK		POINT PICK	
λ	Abs	λ	Abs
303.5	0.355	340.0	0.083
222.0	0.598	303.0	0.354
205.5	0.978	280.0	0.232
		270.0	0.167
		250.0	0.109

ETOFAMIDA
DEGRADACION CON TEMPERATURA
CONCENTRACION: 95.50%

BECKMAN
DU-68 SPECTROPHOTOMETER

ABSORBANCE



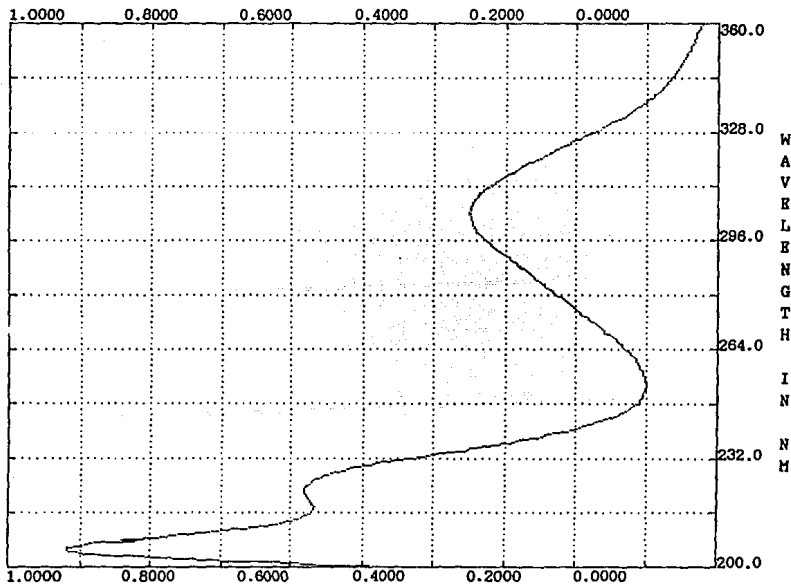
Scan Speed: 500 nm/min

PEAK PICK		POINT PICK	
λ	Abs	λ	Abs
303.5	0.352	340.0	0.083
222.0	0.585	303.0	0.350
205.0	0.911	280.0	0.228
		270.0	0.164
		250.0	0.108

ETOFAMIDA EN PRODUCTO
DEGRADACION CON TEMPERATURA
CONCENTRACION: 95.52%

BECKMAN
DU-68 SPECTROPHOTOMETER

ABSORBANCE



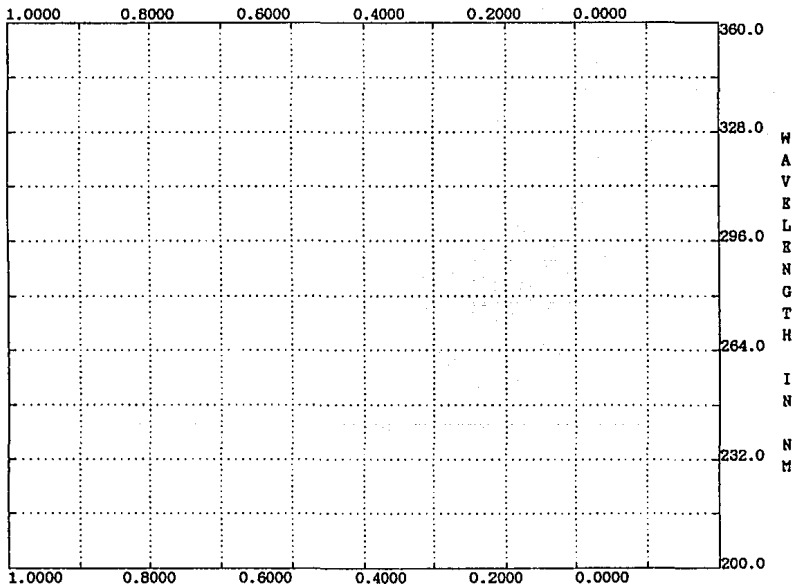
Scan Speed: 500 nm/min

PEAK PICK	POINT PICK
λ	λ
Abs	Abs
303.5 0.350	340.0 0.093
222.0 0.580	303.0 0.348
205.5 0.921	280.0 0.227
	270.0 0.163
	250.0 0.108

PLACEBO
CONCENTRACION: 0%

BECKMAN
DU-68 SPECTROPHOTOMETER

ABSORBANCE



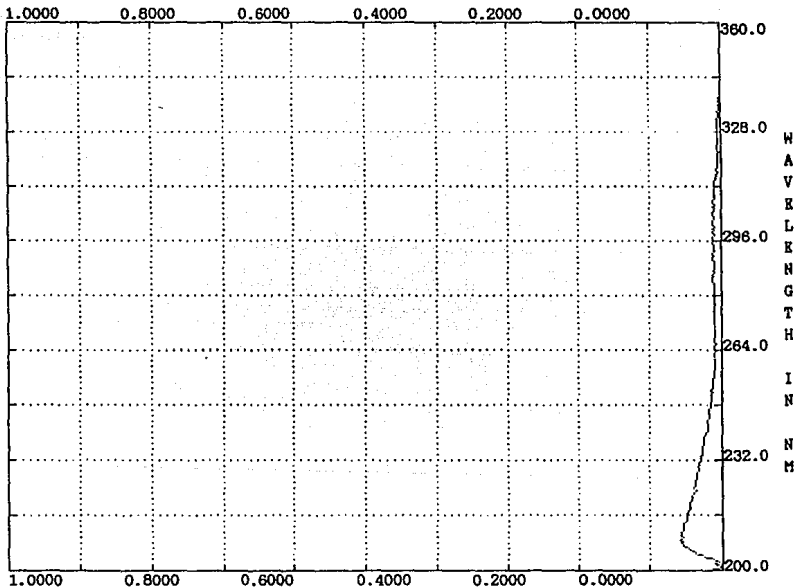
Scan Speed: 500 nm/min

PRAK PICK		POINT PICK	
λ	Abs	λ	Abs
355.0	-0.00	340.0	-0.00
349.5	-0.00	303.0	-0.03
341.0	-0.00	280.0	-0.13
333.5	-0.01	270.0	-0.22
322.5	-0.00	250.0	-0.29

PLACEBO
DEGRADACION CON TEMPERATURA

BECKMAN
DU-68 SPECTROPHOTOMETER

ABSORBANCE



Scan Speed: 500 nm/min

PEAK PICK		POINT PICK	
λ	Abs	λ	Abs
307.0	0.012	340.0	0.001
303.5	0.012	303.0	0.011
301.0	0.012	280.0	0.012
223.5	0.039	270.0	0.010
209.0	0.059	250.0	0.015

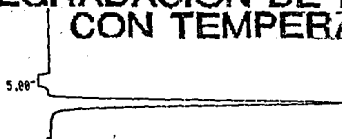
ESPECIFICIDAD DEL METODO

(Por calentamiento y H₂O₂)

Las muestras resultantes por calentamiento fuerdn tratadas con una solución de H₂O₂ al 0.3% al igual que muestras sin calentamiento del activo, placebo y producto durante 15 días expuestas a la luz solar. Despues del analisis se encontro lo siguiente:

MUESTRA	CALENTAMIENTO 80 C H ₂ O AL 30% 15 DIAS 2 2	H ₂ O AL 30% 2 2 15 DIAS T.A.
ACTIVO	REDUCCION EN POTENCIA DEL 25.1%	REDUCCION EN POTENCIA DEL 20.63%
	SIN NINGUNA DEGRADACION	
PLACEBO	SIN DEGRADACION Y SIN INTERFERENCIA CON EL ACTIVO.	
PRODUCTO	REDUCCION EN POTENCIA DEL 28.07%	REDUCCION EN POTENCIA DEL 25.83%
	Y SIN NINGUN OTRA DEGRADACION	

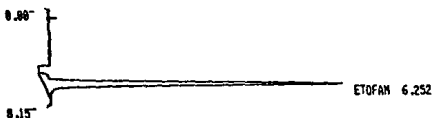
DEGRADACION DE ETOFAMIDA CON CON TEMPERATURA Y H₂O₂



SAMPLE 2

11:52 JAN. 07 1991

236



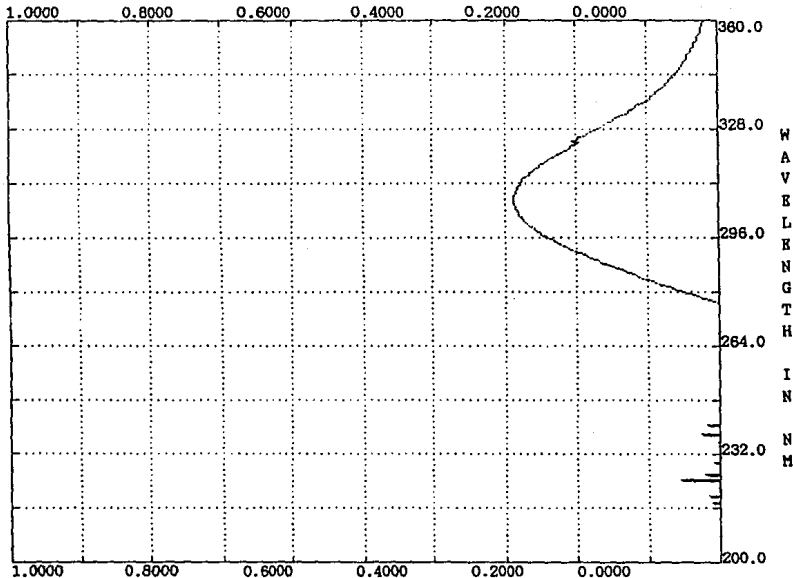
CAL. METHOD 04
 SF PA PB
 .100000E+01 .200000E+01 .100000E+01

NO.	NAME	RT	A OR H	MK	CONC
1	ETOFAM	6.252	2800140		49.7335
	TOTAL		2800140		49.7335

ETOFAMIDA
DEGRADACION CON H₂O₂
CONCENTRACION: 77.05%

BECKMAN
DU-68 SPECTROPHOTOMETER

ABSORBANCE



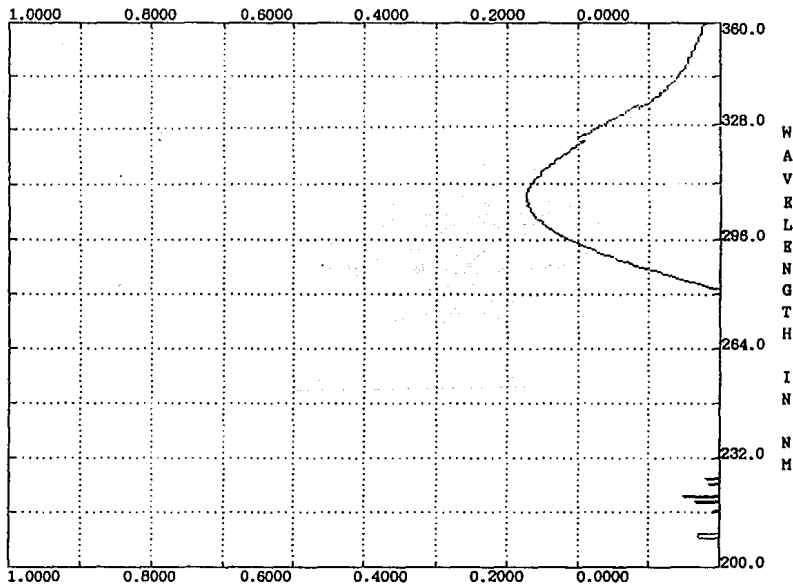
Scan Speed: 500 nm/min

PEAK PICK		POINT PICK	
λ	Abs	λ	Abs
306.5	0.288	340.0	0.081
238.0	0.024	303.0	0.281
229.5	0.008	280.0	0.049
224.5	0.055	270.0	-0.13
217.5	0.011	250.0	-0.30

ETOFAMIDA
DEGRADACION CON TEMPERATURA Y H₂O₂
CONCENTRACION: 72.59%

BECKMAN
DU-68 SPECTROPHOTOMETER

ABSORBANCE



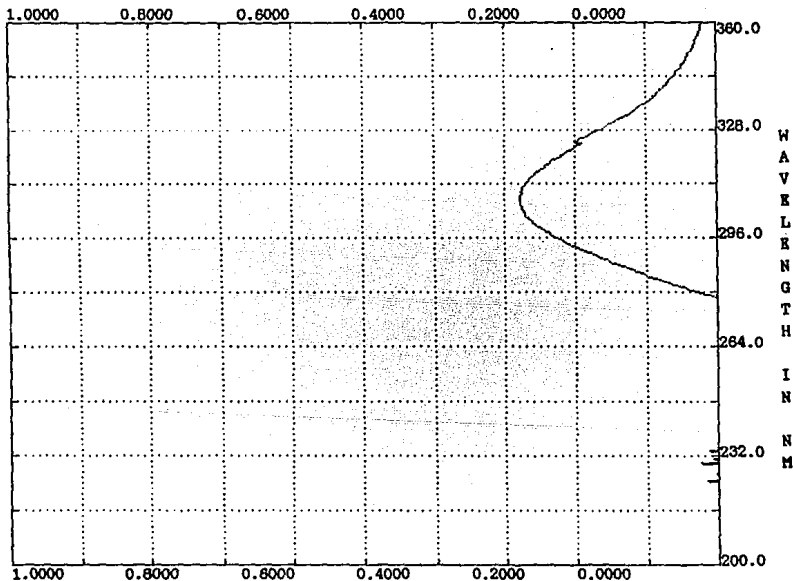
Scan Speed: 500 nm/min

PEAK PICK		POINT PICK	
λ	Abs	λ	Abs
324.5	0.201	340.0	0.080
307.0	0.275	303.0	0.265
221.0	0.052	280.0	-0.03
219.0	0.034	270.0	-0.27
209.5	0.030	250.0	-0.63

ETOFAMIDA
DEGRADACION: CON H₂O₂
CONCENTRACION: 72.86%

BECKMAN
DU-68 SPECTROPHOTOMETER

ABSORBANCE



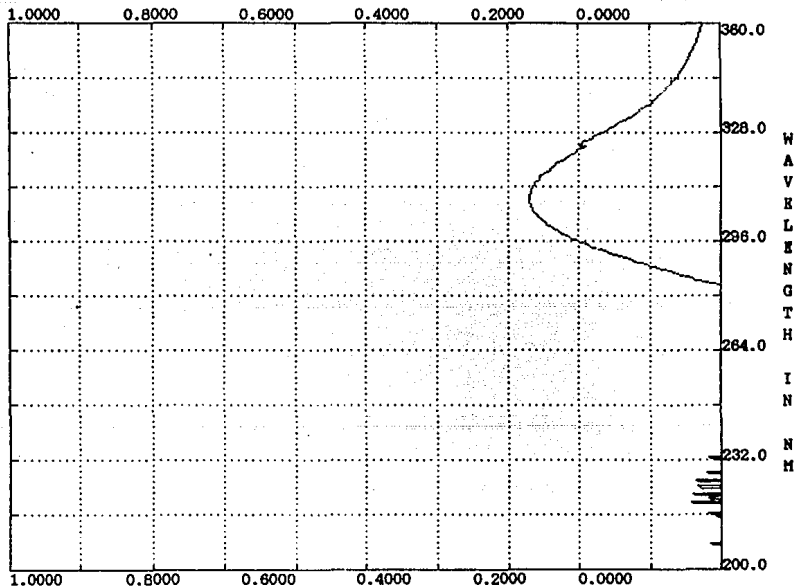
Scan Speed: 500 nm/min

PEAK PICK		POINT PICK	
λ	Abs	λ	Abs
324.5	0.200	340.0	0.079
307.0	0.278	303.0	0.271
233.5	0.013	280.0	0.027
230.0	0.026	270.0	-0.16
226.5	0.002	250.0	-0.37

ETOFAMIDA
DEGRADACION CON TEMPERATURA Y H₂O₂
CONCENTRACION: 70.62%

BECKMAN
DU-68 SPECTROPHOTOMETER

ABSORBANCE



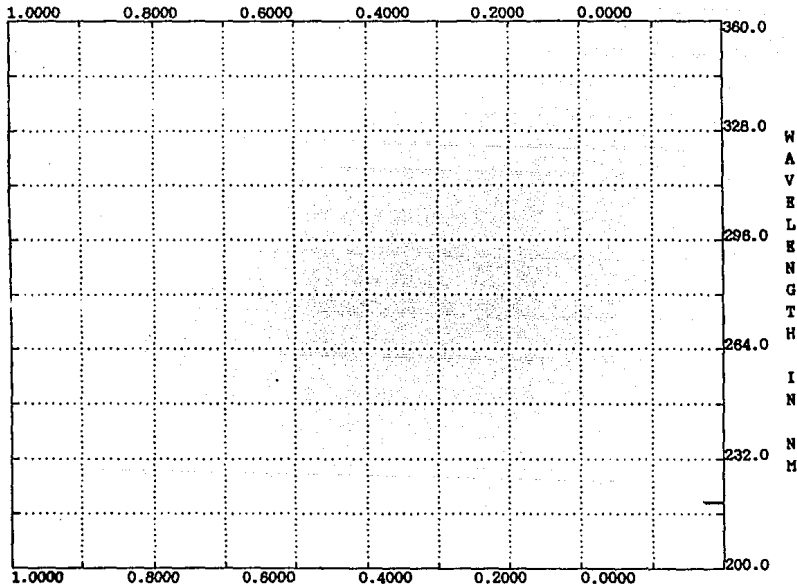
Scan Speed: 500 nm/min

PEAK PICK		POINT PICK	
λ	Abs	λ	Abs
324.5	0.200	340.0	0.083
308.0	0.271	303.0	0.257
228.5	0.019	280.0	-0.06
224.5	0.033	270.0	-0.33
219.5	0.042	250.0	-0.79

PLACEBO
DEGRADACION CON TEMPERATURA Y H₂O₂
CONCENTRACION: 0%

BECKMAN
DU-68 SPECTROPHOTOMETER

ABSORBANCE



Scan Speed: 500 nm/min

PEAK PICK		POINT PICK	
λ	Abs	λ	Abs
358.0	-0.00	340.0	-0.01
354.5	-0.00	303.0	-0.03
352.5	-0.00	280.0	-0.12
349.5	-0.00	270.0	-0.20
221.5	-0.00	250.0	-0.28

LINEALIDAD

1).- DEL SISTEMA

Para efectuar la linealidad del sistema se preparó inicialmente una solución patrón a partir del estándar primario de Etofamida, De ésta solución se realizaron cinco diluciones con concentraciones diferentes que incluyen el 50 y 150% del principio activo en el producto. Cada dilución fue analizada por duplicado registrando para cada una de las concentraciones el área obtenida, posteriormente se graficó una curva de calibración con los parámetros determinados para evaluar el comportamiento del sistema respecto a las concentraciones trabajadas.

1.1 Solución Patrón y diluciones.

SOLUCION*	CONCENTRACION	PORCIENTO
Patrón	[1.0 mg/ml]	-
A	[0.2 mg/ml]	50%
B	[0.3 mg/ml]	75%
C	[0.4 mg/ml]	100%
D	[0.5 mg/ml]	125%
E	[0.6 mg/ml]	150%

* Tanto la solución patrón como las muestras se prepararon por duplicado.

1.2. Resultados:

SOLUCION. (X)	AREA PROMEDIO OBTENIDA.			
	(Y)	MUESTRA 1	MUESTRA 2	PROMEDIO
A		0.1332	0.1332	0.1332
B		0.2034	0.2004	0.2019
C		0.2625	0.2654	0.2639
D		0.3298	0.3297	0.3297
E		0.4239	0.4286	0.4262

* El area registrada es el promedio de dos inyecciones por muestra.

1.3. Calculos.

$$S_x = 2 (0.2 + 0.3 + 0.4 + 0.5 + 0.6) = 4$$

$$S_y = 0.1332 + 0.1332 + 0.2034 + 0.2004 + 0.2625 + 0.2654$$

$$0.3298 + 0.3297 + 0.4239 + 0.4286 = 2.7098$$

$$S_x^2 = 2 (0.2^2 + 0.3^2 + 0.4^2 + 0.5^2 + 0.6^2) = 1.8$$

$$S_y^2 = 0.1332^2 + 0.1332^2 + 0.2034^2 + 0.2004^2 + 0.2625^2 + 0.2654^2 + 0.3298^2 + 0.3297^2 + 0.4239^2 + 0.4286^2 =$$

$$0.837$$

$$S_{xy} = 0.2 (0.1332 + 0.1332) + 0.3 (0.2034 + 0.2004) +$$

$$0.4 (0.2625 + 0.2654) + 0.5 (0.3298 + 0.3297) +$$

$$0.6 (0.4239 + 0.4286) = 1.2267$$

ETOFAMIDA COMPRIMIDOS

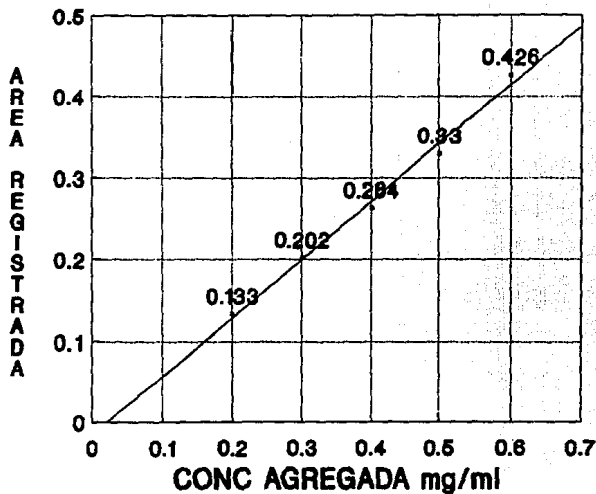
LINEALIDAD DEL SISTEMA

$$m = 0.7139$$

$$b = -0.0146$$

$$r = 0.99$$

Series 1



Cálculo de la pendiente (m):

$$m = \frac{nt \sum (SxY) - \sum Sx \sum (Sy)}{nt \sum (Sx^2) - (\sum Sx)^2}$$

Donde:

t= Número de diluciones.

n= Número de Áreas por dilución.

$$m = \frac{2 \times 5 \sum (1.2262) - 4 \sum (2.7098)}{2 \times 5 \sum (1.8) - (4)^2}$$

$$m = 0.7139$$

Cálculo de la ordenada al origen (b):

$$b = \frac{\sum Sy - m \sum Sx}{nt}$$

$$b = \frac{2.7098 - 0.7139 \sum (4)}{2 \times 5}$$

$$b = -0.0146$$

Cálculo del coeficiente de correlación r^2 :

$$r^2 = \frac{[\frac{nt \sum (SxY) - \sum Sx \sum (Sy)}{2}]^2}{[\frac{nt \sum (Sx^2) - (\sum Sx)^2}{2}] [\frac{nt \sum (Sy^2) - (\sum Sy)^2}{2}]}$$
$$r^2 = \frac{[2 \times 5 \sum (1.2262) - 4 \sum (2.7098)]^2}{[2 \times 5 \sum (1.8) - (4)^2] [2 \times 5 \sum (0.837) - (2.7098)^2]}$$
$$r^2 = 0.9925$$

Ya que $b > 0$ y $r^2 > 0.99$ se cumple con los criterios para linealidad del sistema.

Para determinar los criterios de aceptación de la pendiente y la ordenada para la linealidad se propone lo siguiente:

$$\begin{aligned} H_0. \quad \text{Donde:} \quad m &= 1 \\ b &= 1 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} H_a. \quad \text{Donde:} \quad m &= 1 \\ b &= 0 \end{aligned}$$

Para demostrar la hipótesis nula calculamos lo siguiente:

$$S_y = (0.1332)^2 + (0.2019)^2 + (0.2639)^2 + (0.3297)^2 + (0.4262)^2 = 0.4185$$

$$S_{xy} = (0.1332) 0.2 + (0.2019) 0.3 + (0.2639) 0.4 + (0.3297) 0.5 + (0.4262) 0.6 = 6.1334$$

$$S_x = 0.2^2 + 0.3^2 + 0.4^2 + 0.5^2 + 0.6^2 = 0.9$$

$$S_x = 2$$

$$S_y = 1.3549$$

$$\bar{x} = 0.4$$

Error estándar de regresión:

$$S_{x/y} = \frac{0.4185 - (0.7139) (0.61334) - (-0.0146) (1.3549)}{5}$$

$$S_{x/y} = 0.0089$$

Error estandar para m:

$$SM = S_{xy} \left[\frac{1}{S_x - \frac{(S_x)^2}{N}} \right]^{1/2} =$$

$$SM = 0.0089 \left[\frac{1}{0.9 - \frac{(2)^2}{5}} \right]^{1/2} =$$

$$SM = 0.0281$$

El valor para t student con n-1 y 0.975 se obtiene

$$t = 2.776$$

el Intervalo de confianza para m:

$$\begin{aligned} \text{I.C.} &= 0.7139 \quad + \quad 3.182 (0.0281) \\ \text{I.C.} &= 0.7139 \quad - \quad 0.089 \\ &0.8029 \text{ a } 0.6249 \end{aligned}$$

Criterio de aceptación: como ICM no contiene el valor de 1 entonces el valor de la pendiente calculada no se acepta y H_0 se rechaza.

Para ordenada al origen:

$$SB = Sy/x \quad 1/N + \frac{\frac{-2}{X}}{Sx - (Sx)^2 / N}$$

$$SB = 0.0089 \quad 1/5 + \frac{(0.4)^2}{0.9 - (2)^2 / 5}$$

$$SB = 0.0119$$

El valor de tstudent para n-1 y 0,975 se tiene un valor de 2.776.

$$ICB = - 0.0146 + 2.776 (0.0119)$$

$$ICB = - 0.0146 + 0.0379$$

$$ICB = - 0.052 \text{ a } 0.0233$$

Criterio de aceptación : como ICB contiene el valor de 0 entonces se acepta la ordenada al origen y se acepta Ho.

Precisión del sistema : Con este parámetro se determina la variación que da el detector sobre las áreas registradas de cada inyección .

1. Areas registradas para 0.4 mg/ml (100% de la concentración del activo en el producto).

0.2664, 0.2666, 0.2659, 0.2670, 0.2675, 0.2659.

2. Cálculos.

$$S_y = 1.5993$$

$$S_y^2 = 0.4263$$

$$y = 0.2665$$

$$D.E = 0.000$$

$$C.V. = 0.2359\%$$

Como el coeficiente de variación es menor al 2% se cumple con el criterio para precisión del sistema.

EXACTITUD

Una vez establecida la linealidad del método, se determinó la exactitud del método al 100% del valor en el producto pues se trabajó con placebos cargados con cantidades conocidas de activo, lo que permitió cuantificar el porcentaje real obtenido para cada muestra y por lo tanto determinar los criterios de este parámetro.

Cálculos.

% DE CANTIDAD AGREGADO	% DE CANTIDAD RECUPERADA
100	99.41
100	101.3
100	101.2
100	100.97
100	100.44

$$\bar{X} = 100.66$$

$$D.E. = 0.7759$$

$$CV = 0.7708$$

$$IC = \bar{X} - t_{0.95} \frac{D.E.}{\sqrt{N}}$$

$$IC = 100.66 - 2.132 \frac{0.7759}{\sqrt{5}}$$

$$IC = 100.66 - 0.7398$$

$$101.4 \% \text{ a } 99.92\%$$

Como el ICX contiene el valor al 100% entonces el método es exacto, y se cumple con la hipótesis nula donde:

$$H_0 \quad X = \mu \quad \mu = 100\% \text{ de la cantidad adionada.}$$

$$t \text{ exp.} = \frac{100.66 - 100}{0.7759 / \sqrt{15}} = 1.90$$

t studen para $n-1$ y $\alpha = 0.05$ se tiene un valor de 2.776 por lo tanto el criterio de aceptación es el siguiente.

$$\text{Si } t < 0.025 \text{ o } t > 0.975$$

$$- 2.776 < 1.90 < 2.776$$

Como se cumple con el criterio de aceptación se acepta la hipótesis nula y el método se considera exacto.

LINEALIDAD

2).- DEL METODO.

Se obtuvo al graficar los resultados obtenidos de la adición de estándares correspondiente a 5 concentraciones diferentes del activo en el producto (analizadas por triplicado) contra la cantidad teorica adicionada.

Los resultados a graficar se obtuvieron de una serie de análisis llevados a cabo en la siguiente manera:

- 2.1. A tres muestras de placebo se adiciono una cantidad de activo correspondiente al 80% dandonos a este porcentaje una concentración de 0.32 mg/ml, es decir un 20% menor del limite inferior de la cantidad especificada del principio activo para el producto.
- 2.2. Tres muestras de placebo se llevarón a una concentración de 0.36 mg/ml correspondiente al 90% del limite inferior del contenido de activo para el producto.
- 2.3. A tres muestras de placebo se agregó una cantidad de principio activo correspondiente al 100% es decir 0.4 mg/ml.
- 2.4. A tres muestras de placebo se adiciono una cantidad de activo al 110% (limite superior del contenido de activo para el producto), que corresponde a una concentración de 0.44 mg/ml.

2.5. Finalmente tres muestras de placebo se llevarón a una concentración de 0.48 mg/ml es decir el 120%.

2.6. Se utilizó un estandar de referencia de Etofamida con una concentración de 0.4 mg/ml y una potencia de 99.3%.

En la siguiente tabla se registran los promedios de las áreas de los tres resultados obtenidos para cada concentración, reportando en el eje de las abcisas los valores teóricos para fines de cálculos.

SOLUCION	CONCENTRACION mg/ml	PORCIENTO	AREAS OBTENIDAS*
STD.	0.40	-	0.2626 0.2621 0.2621
A	0.32	80%	0.2077 0.2097 0.2075
B	0.36	90%	0.2355 0.2385 0.2372
C	0.40	100%	0.2612 0.2625 0.2625
D	0.44	110%	0.2892 0.2891 0.2892
E	0.48	120%	0.3127 0.3164 0.3164

* Cada área es el promedio de dos inyecciones por muestra.

Con estos resultados se relizaron los cálculos para determinar la cantidad recuperada y así mismo, el porcentaje obtenido para cada concentración. Con ello se evaluó estadísticamente el método.

1) Tabla de cantidad adicionada contra cantidad recuperada.

SOLUCION	CANTIDAD mg/ml			% RECUPERACION
	AGREGADA	RECUPERADA		
A	0.32	0.3145	0.3175 0.3142	98.28 99.23 98.19
			Y= 0.3154	Y= 98.57
B	0.36	0.3566	0.3611 0.3592	99.06 100.3 99.77
			Y= 0.3590	Y= 99.71
C	0.40	0.3955	0.3975 0.3975	98.88 99.37 99.37
			Y= 0.3968	Y= 99.21
E	0.44	0.4379	0.4378 0.4379	99.53 99.50 99.53
			Y= 0.4379	Y= 99.52
F	0.48	0.4639	0.4791 0.4791	96.65 99.82 99.82
			Y=0.4740	Y=98.76

1).- r= 0.9995	2).- x= 99.15
b= 0.0005	s= 0.4854
m= 0.9903	c.v= 0.49%

1).- Linealidad del método.

2).- Exactitud al 100%.

En la evaluación estadística del método se encuentran en la tabla anterior los valores relacionados al coeficiente de correlación, ordenada al origen y la pendiente, indicándonos que el método cumple con los criterios para linealidad en la cual $b > 0$, $m < 1$ y $r > 0.98$.

ETOFAMIDA COMPRIMIDOS

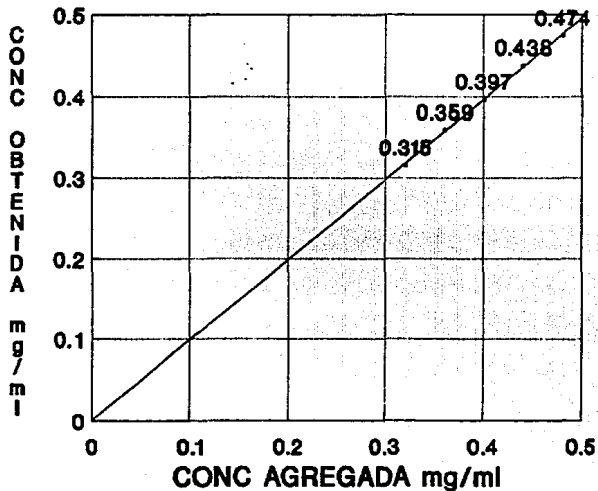
LINEALIDAD DEL METODO

$$m = 0.9903$$

$$b = 0.0005$$

$$r = 0.99$$

Series 1



PRECISION (REPRODUCIBILIDAD).

La determinación de la precisión y reproducibilidad del método analítico se llevo a cabo en dos días consecutivos y por dos analistas. Los resultados individuales obtenidos son los siguientes:

RESULTADOS EXPRESADOS EN PORCIENTO DE LA CONCENTRACION

	ANALISTA #A*	ANALISTA #B*
	AI	BI
D	98.73	99.74
I		
A	98.80	100.21
I	98.85	99.03
	AII	BII
D	99.13	99.09
I		
A	98.94	99.60
I I	98.36	98.63

Cálculos:

La suma total de AI + AII + BI + BII = 1189.11

$$\begin{aligned}
 \text{El cuadrado de } & (98.73)^2 + (98.80)^2 + (98.85)^2 + (98.85)^2 \\
 & + (99.13)^2 + \dots + (98.73)^2 = \\
 & 117834.8631
 \end{aligned}$$

$$S_{d/a}^2 = 0.1149 - 0.0941 = 0.0208$$

La varianza debida al analista:

$$S_{ca} = \frac{706997.3861}{12} - \frac{(1189.11)^2}{12} =$$

$$(2) \quad (3) \quad \quad \quad 12$$

$$117832.8977 - 117831.8827 = 1.0150$$

$$S_{cd} = \frac{353500.0721}{3} - \frac{706997.3861}{6}$$

$$117833.3574 - 117832.8977 = 0.45972$$

Varianza debida al método: Para determinar el error

$$S_{ce} = \frac{117834.8631 - 353500.0721}{3} = 1.5005$$

$$117834.8631 - 353500.0721 + 1.5005$$

REALIZANDO LA SIGUIENTE TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA TOMAMOS
 LOS SIGUIENTES CRITERIOS. (ANADEVA)

ORIGEN DE VARIACION	ANALISTA	DIA	ERROR
GRADOS DE LIBERTAD	$gla = 2-1 = 1$ $a-1$	$gld = (2-1)2 = 2$	$gle =$ $(3-1)(2 \times 2) = 8$ $(r-1)(ad)$
SUMA DE CUADRADOS	1.0150/1	0.45972/2	1.5006/8
MEDIA DE CUADRADOS	MCA= 1.0150	Mcd 0.22986	Mce 0.18757
F CAL	$Fa = Mca/Mcd$ 4.4157	$Fd = Mcd/Mce$ 1.2255	---
F 0.025	$Fgla/gld$ 38.51	$Fgld/gle$ 6.06	

a= Número de analistas
 d= Número de días
 r= Número de analisis.

Como $F_a < F_{g1a, g1d}$ a 0.025 (4.4157 < 38.51) se considera al método analítico como reproducible por los analistas.

Como $F_d < F_{1d, g1e}$ a 0.025 (1.2255 < 6.06) se considera al método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista .

CAPITULO IV

CONCLUSION Y DISCUSION

DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Debido a que anteriormente he tratado ampliamente los fundamentos de la validación de métodos analíticos y sus definiciones básicas, así como de los componentes de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución, únicamente explico la discusión y conclusión de los resultados obtenidos aplicándolos al tema involucrado.

El método analítico, dentro de sus características químicas se comporta perfectamente como un método de separación en fase reversa para HPLC, además de que la composición en fase móvil es la ideal (especialmente el buffer 6.8) para obtener la mejor resolución del pico en la separación del compuesto. Por otro lado, y de acuerdo al estudio para degradación del activo, producto y placebo, por el método térmico y oxidativo, se pudo determinar que este método analítico es ESPECIFICO para separar el activo de la mezcla en la que se encuentra, sin que se presentaran interferencias ó metabolitos de degradación y sin mostrar alteración en la potencia de la Etofamida; desde luego esta última antes de su degradación, ya que después del estudio se obtuvo una reducción del 2% en la potencia del compuesto al haberlo sometido a 80°C por 90 días, tiempo suficiente como para garantizar que el método es específico para el activo.

Con el fin de comprobar lo anterior, se aceleró aún más la degradación del compuesto tratándolo con H_2O_2 al 0.3%, observándose una reducción del 20.63% en la potencia del activo cuando se encontraba sólo y una reducción del 25.83% de la

concentración original cuando se trataba del producto. Estos datos fueron generados apartir de las absorvancias obtenidas de los barridos espectrofotométricos unicamente, ya que, el cromatograma que se obtiene con peróxido de hidrógeno (inclusive a menor concentración del 0.3%) produce calda en la línea base del cromatograma registrado, es posible que esta calda sea debida a la formación de un nuevo compuesto que pudiera modificar las características del activo para llevar acabo la separación en la columna ya que el pico esperado de la etofamida en el cromatograma continua saliendo en el tiempo de retención esperado, y por lo tanto no es posible decir que hay una degradación completa del activo . Los valores de concentración obtenidos con H₂O son dados apartir del cálculo con el método espectrofotométrico ^{2 2} como referencia confiable al valor real en degradación del activo; para ninguno de los casos se detectó algún otro pico a excepción de la calda en la línea base del cromatograma. De lo anterior se puede deducir que, el activo por sí sólo es muy estable para el tiempo en que se requiere, pero cuando se trata del producto únicamente se ve afectada la potencia, ésto sucede cuando se mantiene a un tiempo mayor con respecto al que se encuentra expuesto en el mercado. Por lo tanto, se continuó con la determinación del segundo parámetro de la validación.

Para la evaluación de la LINEALIDAD DEL SISTEMA como medida de calibración en el equipo y como rechazo posible en el funcionamiento, del mismo se desarrolló con un estándar primario certificado. Los resultados generaron tres valores importantes

en la gráfica. El primero de ellos representa la ordenada al origen con un valor de -0.0146 , el segundo a la pendiente de 0.7139 y el tercero al coeficiente de correlación de 0.99 ; de los criterios de aceptación encontramos lo siguiente:

Se trata de un método lineal de acuerdo al coeficiente de correlación, que parte del origen en base a la ordenada es decir, al 0% de la concentración; efectivamente no se obtuvo registro alguno.

La pendiente indica que no existe cierto paralelismo respecto a cada valor.

Sin embargo, al revisar los datos se detectó que la pendiente se comportó (al igual que los demás parámetros) de acuerdo al criterio esperado, es decir, arriba de los valores marcados al 100%. Por ello se deduce que, el equipo trabaja de acuerdo a lo esperado ya que por lo general las especificaciones que se emplean marcan concentraciones entre el 90 y 110% del activo, y por lo tanto cumple en cierta medida con los valores requeridos. Respecto a la precisión del sistema, éste tiene un comportamiento aceptable referente a la reproducibilidad y repetibilidad de las lecturas registradas en cada inyección, ya que el C.V. fue menor al 2% requerido.

Como tercer parámetro, se realizó la LINEALIDAD DEL METODO en la cual, se evaluó si el método utilizado detectaba efectivamente la concentración real.

No se efectuarán los cálculos para el criterio de aceptación, debido a que la gráfica obtenida define la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación con valores

prácticamente similares a valores teóricos y por lo tanto, este método se puede considerar como una técnica adecuada para la separación y cuantificación de la Etofamida.

La EXACTITUD del método cumplió con los criterios marcados para su aceptación, un C.V. $< 2\%$ y un intervalo de confianza que involucre el 100% del activo.

Como último parámetro, la precisión se desarrolló conforme a dos puntos:

- 1.- Repetibilidad. Con un sólo analista en dos días diferentes, obteniéndose valores dentro de los límites marcados (ver tabla de ANADEVA.)
- 2.- Reproducibilidad. Con dos analistas en dos días diferentes, en la que se encontró que el método analítico es reproducible para esta situación (ver tabla de ANADAVE).

Durante todo el estudio, no hubo dificultad para la determinación de cada uno de los valores, y no fue necesario verificar incidencia de errores sistemáticos o aleatorios ya que se obtuvieron en forma constante los valores esperados.

Todo este estudio generó una amplia utilidad, ya que un elemento primordial para cumplir con la validación de cualquier método analítico es la determinación de las variables que pudieran intervenir en un momento dado, directamente sobre la técnica; así como la documentación de dicha técnica y obviamente la revisión y aprobación de los resultados generados. Todo esto desarrolla un sistema de control efectivo para determinar posibles cambios en la técnica. Es recomendable revalidar el método periódicamente para asegurar que todo continua funcionando

de la manera esperada. El objetivo final de una validación de una técnica analítica es asegurar los sistemas de control de cualquier producto para que tanto el público consumidor como nosotros los profesionistas químicos tengamos un alto nivel de confianza en los productos que desarrollamos, además de beneficiar a las empresas tanto en bajos costos como en mantener un prestigio bien fundado.

BIBLIOGRAFIA

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

- 1.- Yost, L.S ettre and RD, Practical Liquid Cromatography
an introduction RW. Perkin elmer New York,
1980 pag 3 a 9; 17 a 30.
- 2.- Kieffer Robert G; Why Validati'Phon. Sterling
International, Sterling Drug, Inc. New York
1983 USA pag. 1 a 16.
- 3.- SINKO R.J. Organizing for Validati6n
Schering- Plough Corporati6n, Kenilworth New Jersey
pag 17 a 26.
- 4.- Berry Ira R; Process validation of raw materials
Pharmaceutical Technology, february 1981 pag. 38 y 39.
- 5.- Trappler, E.H; Validati6n of Lyophilization
Pharmaceutical Technology, january 1989 vol: 13 No. 1
pag 56 a 59.
- 6.- Carleton J.F; Agalloco J.P.; Validati6n of Aseptic
Pharmaceutical Processes. Marcel Dekker, Inc. New York
USA 1983 pag 1 a 26.
- 7.- Bello G; La Cromatografia Liquida de Alta Resoluci6n
fasiculo de HPLC - Bioindustria. emitido por Beckman

- 8.- Deleenheer A>P., Lambert W.E. and De Ruyter M>G>;
Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins
vol. 30 Dekker USA 1990 Marcel pag 49 a 63.
- 9.- Berry I.R; Process Validation for Drugs: Bulk
preparation and storage. Drug cosmetic industry,
Noviembre 1981, by harcourt Brace Jovanovich pag. 1 a 4.
- 10.- Couriel B.D, Jimenez Ricardo; Validación de Procesos
Farmaceuticos. centro mexicano de desarrollo e
investigación farmaceutica Ac. México 1982 pag. 13 a 39
- 11.- Roman F.D; Validación de procesos para productos
farmaceuticos para productos no esteriles. (revisión y
guía general) Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas
pag. 2 a 12.
- 12.- Nash A.R; Process Validation for solid dosage forms.
Pharmaceutical Technology june 1979. New York pag. 105 a
107.
- 13.- Simmons Paul L. Solid Process Validation
Pharmaceutical engineering august october 1981
pag. 38 a 41.

- 14.- Berry I.R; Process Validation: Practical applications-
Pharmaceutical products.
Pharmaceutical Sciences Group may 1987 Toronto, Canada
pag. 377 a 389.
- 15.- CIPAM, Guía de Procedimientos Adecuados de Laboratorio
Analítico Monografía Técnica No. 2 México 1989.
- 16.- CIPAM, Guía de Prácticas de Manufactura Farmacéutica Ed.
No. 3 1989.
- 17.- Adamovics A.J.; Chromatographic Analysis of
Pharmaceuticals. vol. 49 Marcel Dekker Inc. New York
pag. 3 a 84.
- 18.- Comité de Redacción de Guías Generales de Validación
Asociación Farmacéutica Mexicana Arte y diseño México
D.F.
- 19.- Requisitos Mínimos para la Validación de Métodos
Analíticos.
Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biológicos
México. Graciela Aguilar y colaboradores.
- 20.- Cromatografía en la química farmacéutica. Manual
Práctico Merck 1990.

21.- Gonzales Iara Enrique J.

Control estadístico de calidad

**Asociación Nacional Mexicana de Estadística y Control
de Calidad 4a. ed. México 1985**