





## **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.

# INDICE

<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo I. Generalidades</b>	
<b>Minoxidil</b>	<b>2</b>
<b>Espectro de Absorción Infrarrojo</b>	<b>3</b>
<b>Solubilidad</b>	<b>6</b>
<b>Farmacología</b>	<b>6</b>
<b>Farmacocinética</b>	<b>7</b>
<b>Recomendaciones de Seguridad</b>	<b>8</b>
<b>La Piel y los Factores que influyen en la Absorción Percutánea</b>	<b>9</b>
<b>Representación esquemática de la piel y sus anexos</b>	<b>11</b>
<b>Anexos de la Piel</b>	<b>13</b>
<b>Factores fisiológicos que modifican la absorción percutánea</b>	<b>16</b>
<b>Validación</b>	
<b>Definición</b>	<b>21</b>
<b>Especificidad</b>	<b>22</b>
<b>Linealidad del Sistema</b>	<b>22</b>
<b>Precisión del Sistema</b>	<b>22</b>
<b>Linealidad del Método</b>	<b>23</b>
<b>Precisión del Método</b>	<b>23</b>
<b>Exactitud del Método</b>	<b>23</b>
<b>Tolerancia</b>	<b>23</b>
<b>Cromatografía</b>	
<b>Definición</b>	<b>24</b>
<b>Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución</b>	<b>26</b>
<b>Componentes de un Cromatógrafo de Líquidos</b>	
<b>1. Sistema de Bombeo</b>	<b>31</b>
<b>2. Sistemas de Inyección</b>	<b>32</b>
<b>3. Columnas</b>	<b>34</b>
<b>4. Detectores</b>	<b>36</b>
<b>5. Registrador de Señales</b>	<b>39</b>
<b>Propiedades de Fases Estacionarias para Cromatografía en Fase Reversa</b>	<b>41</b>

<b>Adecuabilidad del Sistema</b>	<b>45</b>
<b>Procedimiento de Operación para Registrar el Desgaste de una Columna en función de los Platos Teóricos</b>	<b>47</b>
<b>Programa de Limpieza del Cromatógrafo de Líquidos</b>	<b>48</b>
<b>Capítulo II. Preparación de Placebos</b>	
<b>Marbete</b>	<b>49</b>
<b>Linealidad del Método</b>	<b>51</b>
<b>Exactitud al 100 %</b>	<b>55</b>
<b>Especificidad</b>	<b>57</b>
<b>Capítulo III. Parte Experimental</b>	
<b>Reactivos, material y equipo utilizado en la Validación</b>	<b>58</b>
<b>Técnica Analítica</b>	<b>60</b>
<b>Evaluación del Sistema</b>	
<b>Linealidad del Sistema</b>	<b>65</b>
<b>Precisión del Sistema</b>	<b>68</b>
<b>Evaluación del Método</b>	
<b>Linealidad del Método</b>	<b>69</b>
<b>Exactitud al 100 %</b>	<b>70</b>
<b>Precisión del Método</b>	<b>71</b>
<b>Especificidad</b>	<b>72</b>
<b>Tolerancia</b>	<b>73</b>
<b>Estabilidad de la Muestra</b>	<b>74</b>
<b>Tolerancia de Equipo a Equipo</b>	<b>75</b>
<b>Capítulo IV. Resultados</b>	
<b>Especificidad</b>	<b>77</b>
<b>Linealidad del Sistema</b>	<b>80</b>
<b>Grafica Linealidad del Sistema</b>	<b>87</b>
<b>Precisión del Sistema</b>	<b>89</b>
<b>Linealidad del Método</b>	<b>93</b>
<b>Grafica Linealidad del Método</b>	<b>104</b>
<b>Exactitud al 100 %</b>	<b>108</b>

<b>Precisión del Método</b>	<b>117</b>
<b>Repetibilidad</b>	<b>118</b>
<b>Reproducibilidad</b>	<b>122</b>
<b>Tolerancia</b>	
<b>Estabilidad de la Muestra Analítica</b>	<b>131</b>
<b>Tolerancia Equipo a Equipo</b>	<b>144</b>
<b>Capítulo V. Conclusiones y Bibliografía</b>	
<b>Conclusiones</b>	<b>149</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>151</b>

## INTRODUCCION

En los últimos años, la Validación de los Procesos de Manufactura de los Productos Farmacéuticos así como de las Técnicas Analíticas para la determinación de los Principios Activos de dichos productos, elaborados en la Industria Farmacéutica, se ha convertido en una exigencia de las Autoridades Sanitarias en nuestro País. Por lo que, Validar todas las técnicas utilizadas en el Control Analítico de cualquier preparado farmacéutico forma parte del Aseguramiento de la Calidad Total de un Producto.

El presente trabajo tiene por objeto llevar a cabo la Validación de la Técnica Analítica utilizada en la cuantificación de Minoxidil en una solución tópica, para demostrar que ésta cumple con los Parámetros de Validación establecidos, además de proporcionarnos evidencia documentada que demuestra su confiabilidad, reproducibilidad y exactitud.

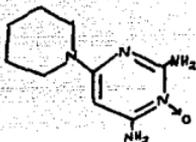
Dicha técnica utiliza a la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) en Fase Inversa, que como es sabido involucra diversos parámetros que hay que controlar para que las determinaciones analíticas sean adecuadas y confiables, cabe mencionar que esta Técnica Analítica ya esta implementada en el Laboratorio de Control de Calidad del lugar donde se realizó este trabajo.

La Validación incluye una evaluación de la Linealidad, Precisión, Exactitud, Reproducibilidad, y Especificidad; proporcionándonos con esto una medida del Comportamiento del Método, el cual se determina en base al Análisis Estadístico de los resultados obtenidos.

## **CAPITULO I. GENERALIDADES**

**MINOXIDIL**

FORMULA QUIMICA



C<sub>9</sub> H<sub>15</sub> N<sub>5</sub> O      PM = 209.25

2,4-Pirimidindiamina,6-(1-piperidinil)-,3-oxido

2,4-Diamino-6-piperidinopirimidina-3-oxido

" El Minoxidil contiene no menos del 97.0 % y no mas del --  
103 % de C<sub>9</sub> H<sub>15</sub> N<sub>5</sub> O, calculada en base seca "

Identificación: El Espectro de Absorción Infrarrojo de una  
dispersion en aceite mineral solo exhibe maximos a la misma  
longitud de onda que una preparaci3n similar de USP Minoxidi-  
l RS.

Perdida por Secado: Secar a 150 C y a una presi3n que no  
exceda los 5 mm de Mercurio por 3 horas: Pierde no mas de  
0.5 % de su peso.

Residuo de Ignici3n: No mayor a 0.5 % .

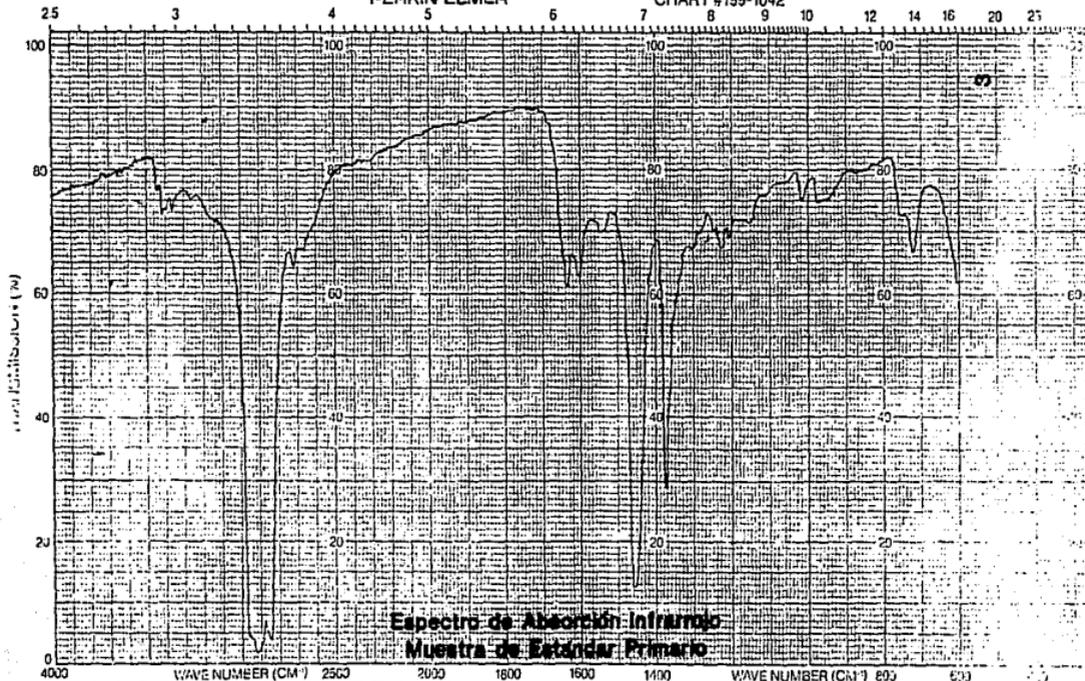
Metales Pesados: No mayor a 0.002 % .

Pureza Cromatogr3fica: El total de alguna impureza detectada  
no debe ser mayor a 1.5 % .

Descripci3n: Polvo cristalino blanco o blanco opaco, inolo-  
ro.

PERKIN-ELMER®

CHART #199-1042

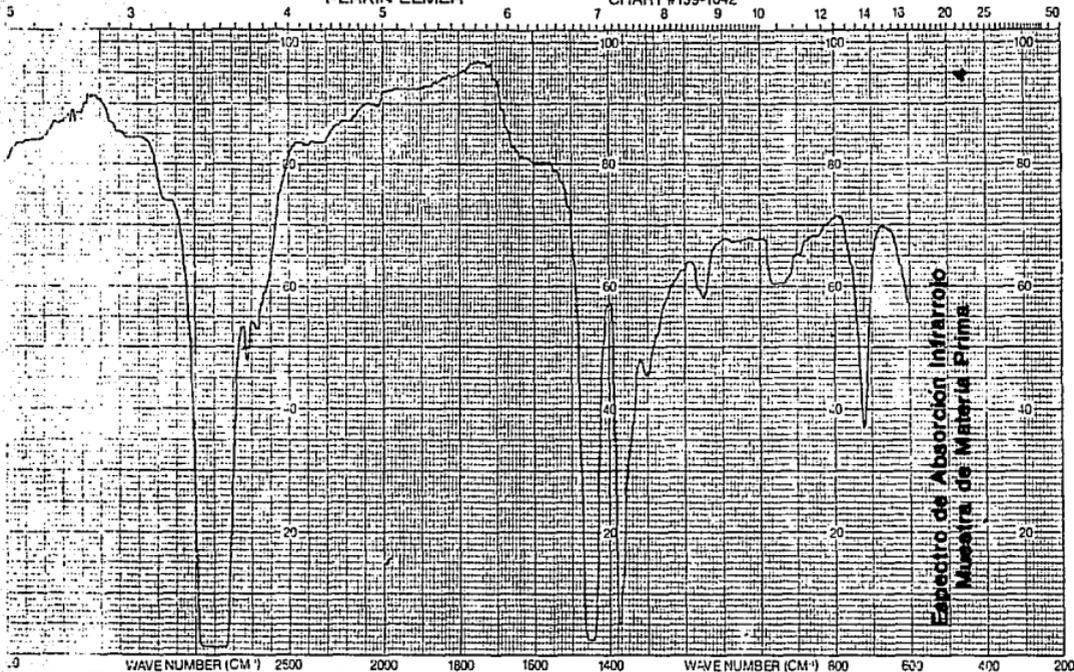


**Espectro de Absorción Infrarrojo**  
**Muestra de Estándar Primario**

ABSCISSA		ORDINATE		SCAN TIME <u>3min</u>	REP. SCAN _____	SINGLE BEAM
EXPANSION _____	EXPANSION <u>0.5</u>	MULTIPLIER _____		TIME DRIVE _____		
SUPPRESSION _____	%T _____	ABS _____		SLIT PROGRAM _____		
SAMPLE <u>Uncr. 1<sup>o</sup></u>	REMARKS _____	SOLVENT <u>Acete</u>			OPERATOR <u>scs/gh</u>	
ORIGIN _____	<u>Positiva</u>	CONCENTRATION _____			DATE <u>June</u>	
				CELL PATH _____		
				REFERENCE _____		
				<u>Gamma 4D</u>		

PERKIN-ELMER

CHART #199-1042



ASCISSA		ORDINATE		SCAN TIME <u>3 min</u>		REP. SCAN _____ SINGLE BEAM _____	
EXPANSION _____		EXPANSION <u>0.5</u>		MULTIPLIER _____		TIME DRIVE _____	
SUPPRESSION _____		%T _____ ABS _____		SLIT PROGRAM _____		OPERATOR <u>SCM/HCH</u> DATE <u>6 Jun 63</u>	
SAMPLE <u>Unoxid USP</u>		REMARKS <u>Positivo</u>		SOLVENT <u>Aceto</u>		CELL PATH _____	
ORIGIN <u>Lot 0439-H</u>				CONCENTRATION _____		REFERENCE <u>Standard 90</u>	

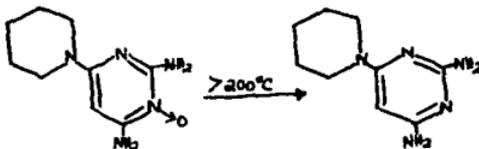
### Solubilidad:

#### Solubilidad de Minoxidil ( T. Ambiente )

Solvente	Solubilidad (mg/ml)
Propilénglicol	75
Metanol	44
Etanol (95 %)	29
2- Propanol	6.7
Dimetilsulfóxido	6.5
Agua	2.2
Cloroformo	0.5
Acetona	0.5
Etilacetato	0.5

Estabilidad y Almacenaje: Es relativamente estable a Temperatura ambiente y no demuestra descomposición significativa.

Sin embargo expuesto a temperaturas extremas, arriba de 200 C muestra descomposición a Desoximinoxidil.



### Farmacología:

El Minoxidil es un potente vasodilatador, actúa directamente sobre las células del músculo liso vascular, y su mecanismo de acción probablemente sea similar al de la Hidralazina.

Es indicado para el tratamiento de la hipertensión severa que no es controlada por otros fármacos o combinación de fármacos.

El Minoxidil ha sido aplicado tópicamente en el tratamiento de Alopecia Androgenética y Alopecia Areata. El modo por el cual se estimula el crecimiento del cabello no es entendido completamente pero quizá actúa por estimulación directa de los folículos epiteliales del cabello.

Los estudios indican que la concentración de Minoxidil en plasma raramente excede los 5 g por litro después de la aplicación tópica de la loción, indicando niveles bajos de absorción percutánea.

La loción al 2 % ha sido considerada como la que muestra la respuesta mas favorable.

Aplicaciones de dos veces diarias por periodos de seis meses quizá sean necesarios antes de obtener resultados; además de que se sugiere que la terapia continua sea necesaria para mantener el crecimiento del cabello.

### Farmacología (Cont.)

El Minoxidil tópicamente probablemente debe evitarse en pacientes con hipertensión o enfermedades cardiovasculares, aunque pocos efectos cardiovasculares adversos han sido vistos en pacientes normotensivos. En general, es bien tolerado pero se han presentado reacciones dermatológicas.

### Farmacocinética

Absorción.— El Minoxidil es rápida y casi completamente absorbida (95 %) después de la administración oral y usualmente aparece en la sangre a los 30 min. Los niveles pico en plasma son alcanzados a la hora de la administración, sin embargo se han reportado cambios considerables en éstos niveles. La absorción cutánea de la aplicación tópica del Minoxidil está limitada a menos del 5 % de la dosis aplicada.

Distribución.— El Volumen de distribución del Minoxidil se debe al volumen total del cuerpo, esto sugiere la concentración en sitios extravasculares. Varios experimentos " in vitro " muestran que el Minoxidil no se une significativamente a las proteínas del plasma. Tampoco se ha reportado que se transfiera a través de la leche materna.

Eliminación.— En todas las especies estudiadas, el Minoxidil y sus metabolitos son excretados primeramente por el riñón. Más del 90 % de la droga administrada aparece en la orina, mientras que sólo del 1 al 3 % se encuentra en las heces

fecales. La droga es excretada por filtración glomerular sin evidencia de secreción o reabsorción de los tubulós renales.

#### Recomendaciones de Seguridad

Usar lentes de seguridad con protección lateral, mascarilla suministradora de aire y guantes.

#### Códigos de Precaución

**B Tóxico ! Precaución !**

Peligroso si se ingiere, se inhala o se absorbe a través de la piel. Evite el contacto con ojos, piel o ropa. Evite respirar el polvo. Mantenga el recipiente cerrado. Uselo con ventilación adecuada. Lávese muy bien después de su manejo.

**P Droga Potente ! Peligro !**

Puede causar efectos adversos serios y de inmediato. Evite el contacto con ojos, piel y ropa. Evite respirar el polvo y vapores. Mantenga el recipiente cerrado. Uselo con ventilación adecuada. Lávese muy bien después de su manejo.

## La Piel y los Factores que Influyen en la Absorción Percutánea

La piel, revestimiento de protección por excelencia, está sometida continuamente a agresiones que tienen su origen en los agentes físicos o químicos del medio exterior. Es una barrera fisiológica importante puesto que se opone tanto a la penetración de los gases, líquidos o sólidos que forman parte del entorno, como a la pérdida de los constituyentes del organismo. La piel es, sin embargo, más o menos permeable a las sustancias químicas y puede, en determinadas ocasiones, franquear el paso a compuestos medicamentosos o nocivos que provocan la aparición de efectos terapéuticos o tóxicos, locales o sistémicos.

Se puede definir la absorción percutánea de una sustancia como la suma de dos fenómenos que son, por una parte, su penetración desde el medio exterior hasta el seno de la piel entera y, por otra, su absorción, a partir de las estructuras cutáneas, por la circulación sanguínea o linfática. El término "percutánea" indica que el paso se realiza a través de toda la epidermis y que la absorción puede tener lugar en los distintos niveles de la dermis.

La determinación de la actividad farmacológica de las preparaciones dermatológicas pone en evidencia la importancia de los excipientes en los procesos de liberación y absorción de los principios activos, mediante su elección, aumentar la acción de los fármacos, tanto desde el punto de vista de la duración como de la intensidad.

En la terapia local, a menudo es necesario el paso de los principios activos a las estructuras cutáneas profundas; por lo que es importante que la concentración en los tejidos situados bajo la zona de aplicación sea elevada para obtener la acción deseada. Pero, la absorción sanguínea debe ser tan pequeña como sea posible con el fin de evitar la aparición de efectos generales. Cuando se requieran acciones generales, las sustancias deben ser absorbidas por la sangre para que sean conducidas hacia los tejidos, en concentraciones capaces de provocar la aparición de las respuestas farmacológicas.

El conocimiento de la anatomía y fisiología cutáneas, así como de los factores fisicoquímicos y fisiopatológicos que condicionan la permeabilidad cutánea, es interesante tanto para el dermatólogo como para el farmacotoxicólogo o el cosmólogo y, con mayor motivo, para el farmacéutico que formula y propone preparaciones activas adaptadas al uso deseado.

## Repaso Anatomofisiológico

La piel, tejido de protección flexible y elástico, recubre toda la superficie del cuerpo y representa aproximadamente el 5% del peso corporal. Cumple con numerosas funciones: regula la temperatura corporal, resguarda al organismo de agentes perjudiciales, elimina productos de desecho y del metabolismo (agua, grasa, toxinas, etc.); es el órgano receptor de las sensaciones táctiles, térmicas y dolorosas. Dado que es mala conductora de la luz, protege al cuerpo, dentro de ciertos límites, de los efectos nocivos del resplandor excesivo. Sus pigmentos contribuyen, en gran medida, a la eficacia de esta protección.

La capa exterior continua de la epidermis forma una barrera ideal contra las invasiones bacterianas. Como es fuerte y flexible a la vez, protege al cuerpo de daños mecánicos menores.

### La Epidermis

La epidermis es un epitelio pavimentoso estratificado, de un espesor medio de 200  $\mu\text{m}$ , cuyas células se diferencian lentamente desde el interior hacia la superficie por el proceso de queratinización. Pueden distinguirse dos partes: los estratos de Malpighi, en contacto con la dermis, y la capa córnea constituida por el conjunto de células muertas queratinizadas.

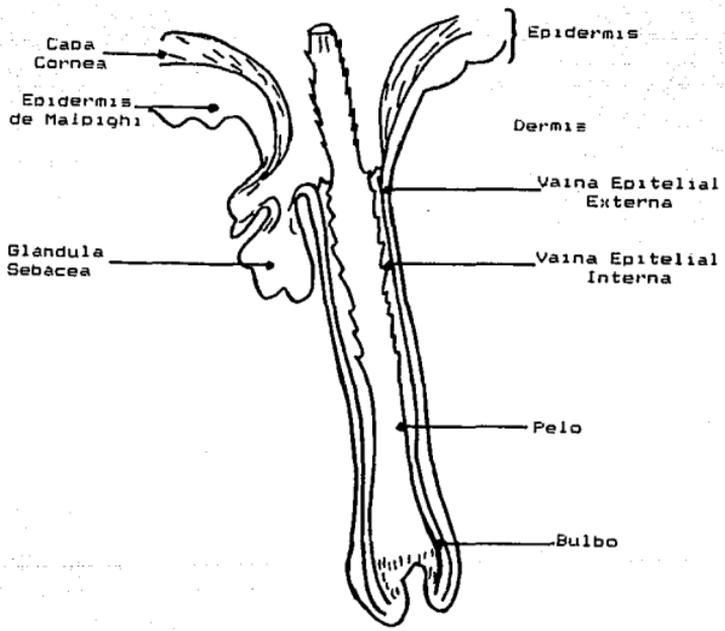
### Los estratos de Malpighi

La capa basal o **estrato germinativo** está formada por una única fila de células cúbicas de 6  $\mu\text{m}$  de lado, apretadas unas contra otras y situada sobre la membrana basal que separa la dermis de la epidermis. Esta capa celular posee una intensa actividad metabólica que conduce a la multiplicación de sus células y permite la formación del resto de las células subyacentes.

Durante su evolución, las células de Malpighi sintetizan elementos específicos de naturaleza protéica: tonofibrillas, gránulos de queratohialina, o lipídica: cuerpos lamelares de Odland.

### El Estrato Córneo

Durante el transcurso de una fase de transición brutal, las células mueren y se transforman en células córneas. Las enzimas de los lisosomas se liberan y destruyen los orgánulos celulares,



Representacion Esquemática de la Piel y sus Anexos

salvo las tonofibrillas y la queratohialina. Una parte de los lípidos de los productos de hidrólisis y de los metabolitos solubles en agua permanecen incluidos en las células. El conjunto constituye una red de proteínas insolubles extremadamente densa y compacta. Simultáneamente, la membrana celular se espesa por depósito, en su cara interna, de un complejo glucolipoprotéico.

Los estudios químicos han mostrado que la membrana, que representa el 5% de la célula córnea, es el elemento de protección más eficaz. Resiste a los agentes reductores queratolíticos, a la mayoría de las proteasas, a los compuestos alcalinos y a los ácidos. Esta resistencia no sólo está asegurada por puentes disulfuro, sino también por otros enlaces covalentes, mal conocidos entre las moléculas. La queratina alfa, fibrosa, constituye el 50% de la capa córnea y presenta una inercia química menor.

Las sustancias hidrosolubles (urea, ácidos orgánicos, aminoácidos) contenidos en el interior de las células corneas tienen propiedades hidrosópicas aunque la célula es capaz de retener el agua procedente de la transpiración.

La hidratación se produce lentamente por ósmosis a través de los lípidos intercelulares. El agua es indispensable para mantener las propiedades mecánicas de la capa córnea. En condiciones normales dicha capa contiene de 10-20%.

Los lípidos que se encuentran en el estrato córneo representan de 7-9% de la masa total de tejido y están constituidos, por ácidos grasos libres o esterificados, por fosfolípidos por escualen y por colesterol que se encuentran emulsionados con el agua.

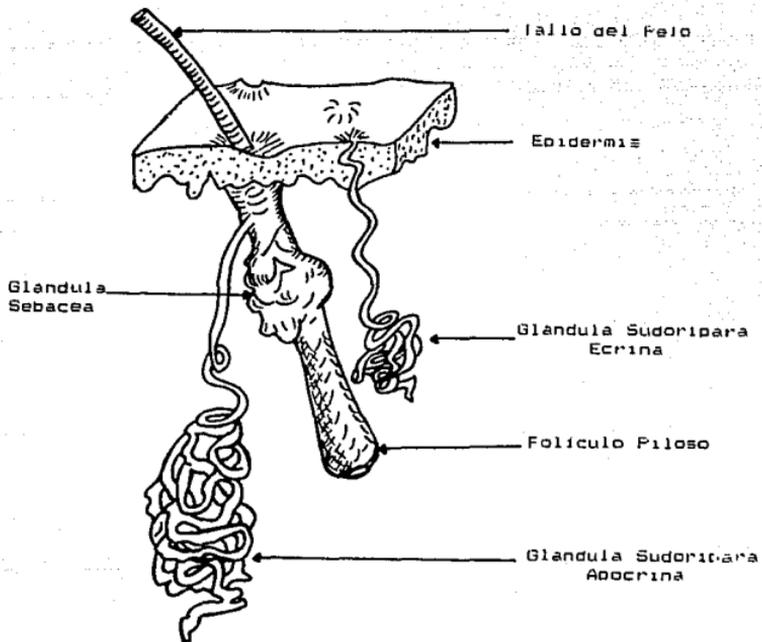
#### La dermis y la Hipodermis

La dermis es un tejido conjuntivo fibroso de un espesor medio de 3-5 mm, cuya función principal es la nutrición de la epidermis.

La hipodermis, tejido conjuntivo flojo, contiene numerosos pániculos adiposos así como los glómerulos de las glándulas sudoríparas.

#### Los Anexos Cutáneos

Los anexos de la piel son las estructuras pilosebáceas y las glándulas sudoríparas. Cada pelo proviene de una invaginación de la epidermis que se hunde en la dermis constituyendo la vaina epitelial externa del pelo. En su extremidad profunda se inserta, mediante su bulbo, sobre una papila muy vascularizada del tejido conjuntivo dérmico. La vaina epitelial interna rodea el pelo



Anexos de la Piel

desde su raíz hasta el nivel de desembocadura de la glándula sebácea.

La piel está constituida por estructuras específicas que pueden oponerse a la migración de las substancias químicas. De esta manera podemos distinguir la película lipídica superficial, la capa córnea y los estratos epidérmicos de Malpighi. Sin embargo, las glándulas sebáceas también pueden constituir una vía de acceso directo hacia el medio interior puesto que sólo presentan, entre el exterior y el líquido extracelular, una barrera " a priori " poco eficaz, constituida por el sebo y una capa de células germinativas.

La función que desempeña la película lipídica superficial, de espesor variable (0.4-4  $\mu$ ) e irregular, es prácticamente despreciable.

La barrera cutánea está constituida principalmente por la capa córnea, puesto que trozos de **estrato córneo** aislados poseen una permeabilidad muy pequeña, muy parecida a la de la piel entera. A pesar de que la capa córnea, en su conjunto, participa en la protección de la piel, la protección más eficaz la proporcionan las capas celulares profundas.

#### Vías de Penetración

La piel, a pesar de su impermeabilidad, es atravesada, al menos en pequeñas cantidades, por numerosas substancias químicas. La penetración de las moléculas del entorno hacia el interior del tegumento puede efectuarse potencialmente bien por difusión a través de la capa córnea o bien por difusión en los conductos de las glándulas sudoríparas o de las estructuras pilosebáceas.

Los anexos de la piel presentan una estructura menos eficaz que la capa córnea.

Las glándulas sudoríparas no intervienen significativamente en el fenómeno de la penetración.

La penetración de substancias químicas a través de las estructuras pilosebáceas está relacionada con la magnitud de su superficie respecto a la de la epidermis. En el hombre, la piel contiene de 40-70 folículos pilosos por  $\text{cm}^2$ , lo que representa un pequeño porcentaje de la superficie de la epidermis y participan poco en la absorción. Por el contrario, en los animales, la vellosidad es más importante y puede alcanzar los 4000 pelos por  $\text{cm}^2$  en los roedores. En este caso, la absorción a través de los folículos pilosos es preponderante, lo que explica que la piel de los animales sea más permeable que la humana.

REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LAS DISTINTAS ETAPAS DURANTE LA DIFUSION DE UN PRINCIPIO ACTIVO EN LOS ESTRATOS CORNEOS

DISOLUCION DEL PRINCIPIO ACTIVO EN EL VEHICULO

DIFUSION DEL PRINCIPIO ACTIVO DESDE EL VEHICULO HASTA LA SUPERFICIE DE LA PIEL

VIA TRANSEPIDERMICA

VIA TRANSFOLICULAR

COEFICIENTE DE REPARTO VEHICULO / CAPA CORNEA

COEFICIENTE DE REPARTO VEHICULO / SEBO

DIFUSION A TRAVES DE LA MATRIZ PROTEOLIPIDICA DE LA CAPA CORNEA

DIFUSION A TRAVES DE LOS LIPIDOS DE LA GLANDULA SEBACEA

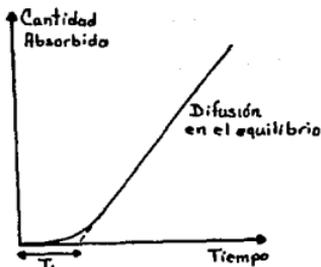
COEFICIENTE DE REPARTO CON LA EPIDERMIS DE MALPIGHI

DIFUSION DE LOS ESTRATOS DE LA EPIDERMIS VIVA

DIFUSION EN LAS ESTRUCTURAS DE LA DERMIS

DIFUSION A TRAVES DE LA PARED DE LOS CAPILARES SANGUINEOS Y DISTRIBUCION SISTEMICA

Ha sido demostrado que la mayoría de las moléculas químicas se absorben a través de la piel por difusión pasiva. La velocidad de absorción a través del tegumento no es constante desde el inicio puesto que siempre se observa un período de latencia  $T_l$ .



Perfil de Absorción de una molécula que difunde a través de la piel humana intacta

El período de latencia representa el tiempo necesario para la penetración de la substancia en el interior de las estructuras córneas y para el establecimiento de un gradiente de difusión.

Para la gran mayoría de los productos, la resistencia a la difusión a través del **estrato córneo** es muy elevada y representa el factor limitante de la absorción percutánea. Por el contrario, la resistencia de la epidermis de Malpighi y de la dermis son despreciables.

#### Factores fisiológicos que modifican la absorción percutánea

##### Estado y Edad de la Piel

La piel intacta es una barrera de difusión cuya eficacia disminuye por alteración o destrucción de las células córneas. La permeabilidad cutánea está aumentada en algunos estados patológicos caracterizados por una modificación de las propiedades del **estrato córneo**: dermatosis con eccema, psoriasis y dermatosis seborreicas.

La difusión cutánea varía así mismo con la edad de los individuos, la piel de los niños es más permeable que la de los adultos.

### Flujo sanguíneo

Las modificaciones del flujo sanguíneo cutáneo pueden variar la velocidad de penetración de una molécula. Para la mayoría de los fármacos, la capa córnea es el factor limitante de la absorción y el flujo sanguíneo siempre es suficiente para arrastrar el principio activo a medida que penetra. Sin embargo, cuando la piel está dañada o si el fármaco se aplica por ionoforesis, las cantidades que penetran son mucho mayores y el papel del flujo sanguíneo es fundamental.

### Lugar de Aplicación

Las cantidades absorbidas de una misma sustancia, son distintas según el lugar anatómico de aplicación: piel de los senos, abdominal, dorsal, del brazo o del antebrazo. Estas variaciones se deben principalmente al espesor de la capa córnea; el **estrato córneo** no tiene el mismo espesor en todas las partes del cuerpo, varía de 9  $\mu\text{m}$  en la piel del escroto a 600  $\mu\text{m}$  en la piel de las zonas palmares y plantares.

### Hidratación y Temperatura

En condiciones normales, el contenido en agua del **estrato córneo** es pequeño, de 5 a 15%, pero puede aumentarse considerablemente hasta el 50% aplicando un excipiente oclusivo a la superficie del tegumento: vaselina, aceites o un vendaje impermeable. El **estrato córneo** hidratado presenta idéntica afinidad por las sustancias solubles en agua o en los lípidos. Esta propiedad se debe a la estructura histológica de las células corneas y, en particular, a los filamentos de queratina que pueden hincharse con el agua y a las matrices amorfas impregnadas de lípidos que rodean estos últimos.

El efecto de la hidratación es hinchar la capa córnea disminuyendo su densidad y resistencia a la difusión.

La temperatura cutánea "in vivo", medida en condiciones normales varía poco y no interviene en los fenómenos de absorción. Por el contrario, "in vitro" la influencia de la temperatura puede ponerse de manifiesto fácilmente.

### Optimización de la Biodisponibilidad

Las condiciones de penetración y absorción percutánea de los fármacos dependen principalmente de sus características

fisicoquímicas. El papel de los excipientes en éstos fenómenos es extremadamente complejo; en la medida que no alteran las funciones fisiológicas de la piel, son incapaces de provocar el paso de las sustancias no absorbibles. Sin embargo, mediante una elección racional de los excipientes, es posible modular la biodisponibilidad de los fármacos.

## Factores Fisicoquímicos

### Constante de Difusión

La constante de difusión de una molécula a través de una membrana corresponde a la resistencia que opone el entorno a sus desplazamientos. Es una magnitud física característica de la sustancia y de la membrana. Las moléculas de masa molecular baja difunden más rápidamente que las de masa molecular elevada, a menos que no se unan con los constituyentes de la membrana.

### Concentración en Principio Activo

Las cantidades absorbidas por unidad de superficie y tiempo son proporcionales a la concentración del fármaco en el vehículo.

Cuando se aplican concentraciones elevadas de principio activo a la superficie de la piel traen como consecuencia una modificación de la estructura de la membrana que provoca la elevada concentración de principio activo o bien, debido a la existencia de una variación del coeficiente de reparto de este último entre el vehículo y la barrera cutánea.

### Coefficiente de Reparto

La importancia del coeficiente de reparto de la sustancia absorbida entre la capa córnea y el vehículo que la contiene ha sido demostrada por Treherne; este autor relaciona la absorción percutánea de diversas sustancias orgánicas en soluciones acuosas con sus coeficientes de reparto éter-agua y demuestra que el grado de absorción es mayor cuanto más elevado sea el coeficiente de reparto.

El coeficiente de reparto **estrato córneo /vehículo** se determina cuando se alcanza el equilibrio de reparto de la molécula, aunque este estado sólo se alcanza, en general, después de un período de contacto prolongado entre el tejido córneo y el excipiente.

Un coeficiente de reparto elevado demuestra la poca afinidad del fármaco estudiado por su vehículo; un coeficiente de reparto cercano a la unidad indica que la molécula se reparte de manera muy parecida entre la capa córnea y el excipiente y, por último,

un coeficiente de reparto pequeño demuestra que el principio activo presenta una gran afinidad por su vehículo y no puede difundir en la capa córnea. La solubilidad de los productos en su excipiente influye mucho sobre el coeficiente de reparto.

### Elección del Excipiente

El desarrollo de una forma destinada a la vía cutánea puede realizarse a través de dos vías generales de investigación; la primera consiste en introducir, en un excipiente, un agente que modifique la estructura de la barrera cutánea y favorezca de esta forma la absorción de las sustancias que se asocien con él; la segunda es la elección de los excipientes a partir de los que el principio activo difundirá fácilmente en las estructuras córneas.

El excipiente puede intervenir en algunas ocasiones modificando, dentro de unos límites fisiológicos y reversibles, la permeabilidad de la piel, generalmente incrementando el estado de hidratación del tegumento o bien aumentando la afinidad de las moléculas por las estructuras cutáneas, es decir, el coeficiente de reparto.

Para que este coeficiente de reparto sea favorable a la capa córnea es necesario que el principio activo sea mucho menos soluble en el vehículo que en la capa córnea, es decir que el excipiente tenga poca afinidad por el fármaco que contiene.

### Determinación de la Biodisponibilidad de los Fármacos destinados a la Vía Percutánea

Las cantidades de sustancias absorbidas por vía percutánea son muy pequeñas y su detección es generalmente difícil y a veces imposible, debido a la sensibilidad, a menudo insuficiente, de los métodos de valoración fisicoquímicos. La utilización de moléculas marcadas ha resuelto este problema, aportando una gran sensibilidad y una especificidad absoluta a las distintas técnicas utilizadas.

El punto de partida para la determinación biofarmacéutica de los fármacos incorporados en una forma destinada a la vía percutánea, después de los estudios farmacéuticos clásicos de viscosidad, compatibilidad y conservación, es el estudio de la liberación "in vitro" del principio activo con el fin de apreciar la facilidad con la que los excipientes lo ceden al medio con que están en contacto. Se han propuesto numerosos métodos entre los que cabe citar:

- La difusión simple en el agua o en un gel.
- La diálisis a través de una membrana de colodión o de celofana.

La absorción percutánea puede ser estudiada bajo dos aspectos principales: la absorción sistémica y la localización de la substancia en las estructuras cutáneas con la ayuda de métodos "in vitro" e "in vivo" que permitan apreciar los modos de penetración, determinar la constante de permeabilidad y comparar la eficacia de diversos excipientes.

La barrera cutánea está constituida fundamentalmente por el **estrato córneo**, estructura muerta que se opone a la penetración de substancias químicas. Sin embargo, esta estructura es más o menos permeable y franquea el paso a compuestos cuya absorción se efectúa por difusión pasiva. Las moléculas mejor absorbidas son las que a la vez son liposolubles y generalmente hidrosolubles.

En la medida que una substancia es absorbible, es posible intervenir sobre el grado de penetración mediante la utilización de vehículos apropiados cuya composición facilite la liberación del principio activo con el fin de que alcance los tejidos donde debe ejercer su acción terapéutica.



La Guía General para Validar un Método Analítico involucra los siguientes parámetros:

- 1.- Especificidad
- 2.- Linealidad del Sistema
- 3.- Precisión del Sistema
- 4.- Linealidad del Método
- 5.- Precisión del Método
- 6.- Exactitud del Método
- 7.- Tolerancia

#### Especificidad

Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida a la sustancia de interés y no a otros componentes que puedan estar presentes en el material a analizar, tales como productos de degradación, excipientes u otros activos.

#### Linealidad del Sistema

Es la habilidad para asegurar que los resultados analíticos, que pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia de interés dentro de un intervalo de concentraciones del principio activo. Dicho intervalo depende del propósito del método; para Control de Calidad y de seguimiento de la Estabilidad de un Fármaco en una forma farmacéutica, deberá estar incluida la concentración seleccionada como 100 % de la cantidad a cuantificar.

#### Precisión del Sistema

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos, esto es, que es la capacidad del método analítico para cuantificar la misma cantidad de la sustancia a analizar con la mínima variación posible cuando se analiza varias veces bajo las condiciones normales de operación. (También llamada Repetibilidad).

### Linealidad del Método

Al igual que la linealidad del sistema es la habilidad para asegurar que los resultados analíticos son proporcionales a la concentración de la sustancia. Pero aquí se determina a partir de placebo cargados cuyas concentraciones deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto, las concentraciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema, incluyendo siempre la que corresponde al 100 %.

### Precisión del Método

Como se mencionó en la precisión del sistema es la capacidad del método analítico para cuantificar la misma cantidad de la sustancia a analizar con la mínima variación posible cuando se analiza varias veces, sólo que en este caso el análisis se efectúa por diferentes analistas y en días diferentes, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc. (También llamada reproducibilidad).

### Exactitud del Método

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

### Tolerancia

La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, sistemas de elución, tipos de empaque (soporte, fase estacionaria, etc.). condiciones ambientales, Estabilidad de la Muestra Analítica.

### Límite de Detección

Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, bajo las condiciones de operación establecidas, pero no necesariamente esta sustancia tiene que ser cuantificable.

### Límite de Cuantificación

Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra que puede ser cuantificable con la precisión y exactitud adecuadas, bajo las mismas condiciones de operación.

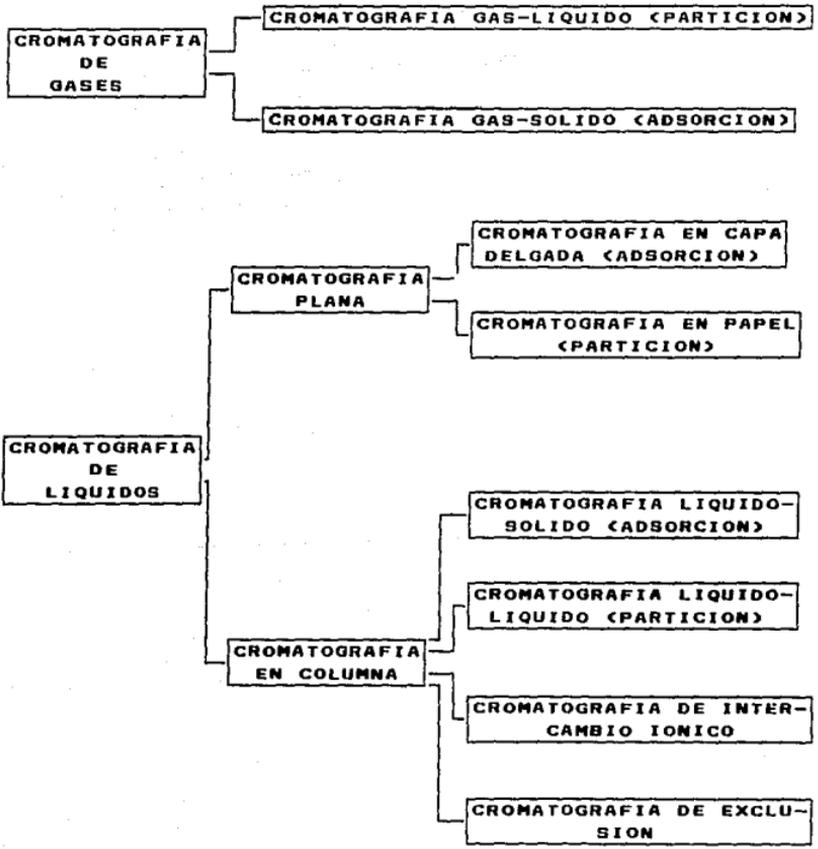
## CROMATOGRAFIA

Con frecuencia, los químicos necesitan separar e identificar los diferentes componentes de una mezcla química. Uno de los instrumentos más importantes para este tipo de análisis es la Técnica o serie de Técnicas conocida como CROMATOGRAFIA.

Este nombre viene de dos palabras griegas que significan "Registro de Color"; pero actualmente en los análisis, los componentes no se diferencian en función del color.

La base de la Cromatografía es la migración diferencial de las moléculas, esto es, que su fluir desde el punto de partida se hace con velocidades distintas para cada componente; la muestra que debe analizarse está en una Fase Móvil, líquida o gaseosa, y se la pasa a través de un medio estacionario que puede ser un sólido o un líquido contenido por un sólido. Puesto que cada uno de los componentes de la muestra pasa por el medio estacionario a velocidad diferente, puede ser separado de los demás en forma efectiva.

DE ACUERDO A LA NATURALEZA DE LAS FASES INVOLUCRADAS  
Y A LOS MECANISMOS DE SEPARACION, LA  
CROMATOGRAFIA SE DIVIDE EN :



## CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION ( CLAR )

En el cuadro anterior mostramos como se divide la Cromatografía en general; por lo que ahora, sólo nos enfocaremos a la Cromatografía que utilizamos para realizar éste trabajo.

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución también es conocida como Cromatografía de Líquidos de Alta Presión ( CLAP ) o Cromatografía Líquida Moderna.

El éxito en la aplicación de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para un compuesto dado consiste en la combinación adecuada de las condiciones de operación, es decir: el tipo de columna, la constitución de la fase móvil, la longitud y diámetro de la columna, la velocidad de flujo de la fase móvil, etc.

La migración diferencial en la CLAR es el resultado del equilibrio de distribución de los diferentes constituyentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil. Dichos componentes se separan en la columna y al salir de esta son conducidos por la fase móvil y en el orden en que emergieron hacia un detector donde se registran sus concentraciones y sus tiempos de retención en la columna. Un registrador de señales, ya sea un graficador o un integrador nos da el cromatograma resultante donde muestra cada compuesto que sale de la columna en forma de picos simétricos con un tiempo de retención característico por lo que éste tiempo puede utilizarse para identificar al compuesto. Este tiempo de retención, tr, se mide desde el momento de la inyección de la muestra hasta el momento en que aparece el máximo del pico en el cromatograma.

Los mecanismos o, procesos de separación que dan como resultado la retención de las moléculas de una muestra por parte de la fase estacionaria dan lugar a los diferentes métodos de Cromatografía Líquida esto es:

- Cromatografía líquido-líquido o de partición, que consta de una fase estacionaria líquida de composición diferente a la de la fase móvil e inmiscible en ella. Las moléculas de la muestra se distribuyen entre ambas fases como sucedería en una extracción líquido-líquido.

- Cromatografía líquido-sólido o de adsorción incluye partículas de gran área superficial donde las moléculas son atraídas, y por lo tanto, retenidas.

- Cromatografía de intercambio iónico en donde la fase estacionaria contiene grupos iónicos fijos como  $SO_3^-$ , junto con iones de carga opuesta. Estos últimos están presentes en la fase móvil en forma de sales. De esta manera las moléculas iónicas son retenidas en la columna por el intercambio iónico, de acuerdo a la siguiente expresión:



- Por último, la Cromatografía de exclusión molecular, en la cual el empaque es un material poroso donde el tamaño del poro está bien definido. De esta manera, las moléculas que son demasiado grandes para el poro salen rápidamente de la columna mientras que las pequeñas penetran en los poros prolongando su tiempo de elución. Este tipo de cromatografía es muy empleado para separar compuestos por su tamaño molecular.

Existen modificaciones a los tipos de cromatografía mencionados como en la Cromatografía de Fases Enlazadas. Esta variante se puede llevar a cabo en Fase Normal o Fase Inversa (Reversa).

- La Fase Normal está constituida por una Fase Estacionaria Polar, generalmente sílica, cuyas propiedades de superficie son: SiO (silanoles libres), que no sea cristalina, que sea porosa, amorfa y que tenga un alto potencial de hidratación (esto facilita que se empape fácilmente con la fase móvil); y una Fase Móvil No Polar.

- La Fase Inversa (Reversa) involucra una Fase Estacionaria No Polar como cadenas de hidrocarburos de 8 a 18 carbonos unidos a los grupos silano del soporte y se utiliza por lo general con Fases Móviles Muy Polares para separar componentes poco polares.

Los parámetros que hay que considerar para que se lleve a cabo una buena separación son:

-Factor de capacidad K' (retención)  $K' = \frac{V_i - V_0}{V_0}$

donde: K' = tr tiempo de retención

$V_0$  = volumen muerto

$V_i$  = tiempo que tarda en salir el compuesto de interés

-Eficiencia o Número de Platos Teóricos que están relacionados directamente con la columna

$$N = 16 \left( \frac{V}{w} \right)^2$$

donde: N = número de platos teóricos

w = ancho de la base del pico

v = tiempo que tarda en salir el compuesto de interés

16 = esta constante depende de a que altura del pico se mida el ancho de la base del mismo. Depende del método que haya utilizado el fabricante para determinar el número de platos teóricos.

Existen varios métodos para determinar los platos teóricos entre los que encontramos:

- Métodos Manuales

- a) Inflexión (o 2 sigma)
- b) Altura a la mitad del pico
- c) Tangentes
- d) Relación altura/area
- e) 4 Sigma
- f) 5 Sigma

- Metodos computarizados

- a) Asimetría
- b) Momentos
- c) Concreto

$$N = \frac{V}{W}^2$$

W	f	Método
W	4	Inflexión
Wh	5.54	Media altura del pico
W3	9	3
W4	16	4
W5	25	5
Wbase	16	Tangentes

Métodos Manuales para determinar  
Platos Teóricos

% Altura del Pico

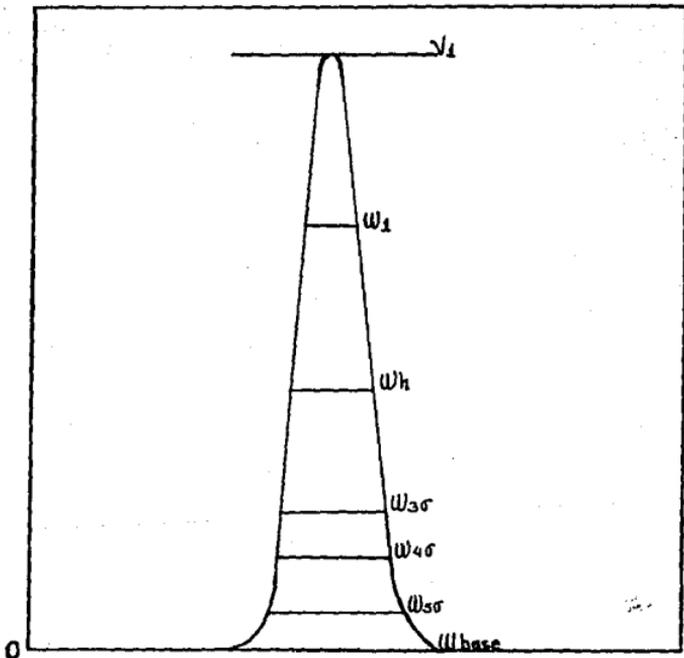


Tabla 5 sigma (5 $\sigma$ )

- Selectividad es la relación de las retenciones

$$a = \frac{K'_2}{K'_1} = \frac{V_0 - V_1}{V_2 - V_0}$$

donde:  $K'$ =tr= tiempo de retención pico muestra 1  
 $K'$ =tr= tiempo de retención pico muestra 2  
 $V_0$ = volumen muerto  
 $V_1$ = tiempo que tarda en eluir la muestra 1  
 $V_2$ = tiempo que tarda en eluir la muestra 2

-Resolución es la capacidad que tiene la columna de separar completamente una muestra de la otra. Se recomienda que el resultado de la resolución esté por arriba de 1.5. Ya que a mayor valor de R la separación será mejor.

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

donde: R = Resolución entre los picos  
 $V_1$  = tiempo que tarda en eluir la muestra 1  
 $V_2$  = tiempo que tarda en eluir la muestra 2  
 $W_1$  = ancho de la base del pico muestra 1  
 $W_2$  = ancho de la base del pico muestra 2

El uso de integradores evita los errores en la medición de las áreas. Estos integradores registran las señales e imprimen el área de los picos en forma numerica.

Es conveniente adiconar un estándar interno para así minimizar errores de inyección, medición o proceso de la muestra. Dicho estándar debe, de preferencia, ser químicamente similar al activo o activos de interés pero con un tiempo de retención diferente además de que en el proceso de separación y detección no presente grandes variaciones. Este estándar debe especificarse en la monografía y su área debe relacionarse al área de los picos de la muestra obteniendo así un área relativa constante que no se vea afectada por variaciones en el proceso de preparación de la muestra o del volumen inyectado de la misma.

## EQUIPO

Esencialmente un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución consta de las siguientes partes:

- 1.- Sistema de bombeo
- 2.- Sistema de Inyección
- 3.- Columna
- 4.- Detector
- 5.- Registrador de señales (graficador o integrador).

### 1.- Sistema de Bombeo

Tiene por objeto impulsar la fase móvil a través de la columna. Las características más importantes en las cuales debe constar un sistema de bombeo para CLAR son:

- a) Reproducibilidad
- b) Velocidad de Flujo
- c) Presión media adecuada
- d) Componentes resistentes a solventes

Existen básicamente dos sistemas de bombeo y cada uno tiene sus ventajas y desventajas. Estos tipos son:

- Bombas de flujo constante que mantienen una velocidad de flujo de la fase móvil constante. Entre estas se cuentan las bombas reciprocantes que funcionan a base de pistones que impulsan el solvente que entra a cámaras con una capacidad de volumen pequeña; en estas bombas se generan pulsaciones de la fase móvil que provocan perturbaciones en la línea base; las pulsaciones se corrigen mediante dispositivos especiales.

Otro tipo de bombas de flujo constante son las bombas de desplazamiento positivo que pueden tener dos formas: como jeringa o como amplificador hidráulico. La primera es parecida a una jeringa cuyo émbolo actúa mediante un espiral que empuja el solvente y la segunda amplifica la presión del solvente mediante un sistema hidráulico. Este tipo de bombas reduce las pulsaciones del solvente.

- Bombas de presión constante que tienen la desventaja de que es necesario mantener la viscosidad del solvente, la temperatura de la columna y la presión constantes. La ventaja es que si

estos parámetros se mantienen, se controlan totalmente las pulsaciones. La forma más sencilla de estas bombas emplea presión de un gas inerte para presurizar el solvente. El problema es que parte del gas se disuelve en el solvente y esto forma burbujas en el sistema. Otro sistema para estas bombas emplea un amplificador neumático que reduce el efecto del gas utilizando un pistón, reduciendo de esta manera el contacto del solvente con el gas comprimido.

Estos normalmente son sistemas isocráticos, es decir, que mantienen constante la proporción de los solventes en la fase móvil, sin embargo, estos sistemas generalmente no son aplicables a separaciones en mezclas de solutos con valores muy variables de  $K$ , en donde es necesario utilizar sistemas de elución con gradiente. Estos sistemas utilizan dos bombas que son programables para modificar, en forma lineal o exponencial, las proporciones iniciales de los solventes. En estos casos los solventes que componen la fase móvil se encuentran separados y alimentando cada uno a su respectiva bomba.

Los solventes se mezclan en la proporción deseada en una cámara que se encuentra antes de la columna. El inconveniente del gradiente es que su uso es muy difícil con ciertos detectores como los refractómetros.

## 2.- Sistema de Inyección

Un factor muy importante para obtener una buena resolución en la separación es la adecuada introducción de la muestra en el sistema. La manera ideal de introducir o inyectar la muestra, es en forma de "paquete" pequeño ya que esto ayuda en la obtención de picos simétricos y angostos.

Existen dos métodos principales para introducir la muestra en una columna de CLAR; estos son por medio de una válvula de inyección o por métodos de detención de flujo. Los métodos de detención de flujo requieren que el flujo de la fase móvil hacia la columna sea detenido o desviado mientras la muestra es introducida en la columna. Luego se reinicia el flujo y el proceso de separación comienza. El método más común para introducir la muestra es usando una válvula de inyección.

El "loop" de la muestra se saca del flujo cambiando la válvula a la posición de carga. En esta posición el flujo de la fase móvil pasa a través de la válvula directamente a la columna. Ahora es cuando se introduce la muestra al "loop" de la válvula, usando una jeringa. El "loop" se puede llenar parcial o totalmente, pero si se requiere precisión se recomienda llenarlo

totalmente. Cuando se cambia la válvula con la muestra a la posición de inyectar, la fase móvil ahora viaja por el "loop" y lleva a la muestra hacia la entrada de la columna. El flujo de la columna solo se interrumpió momentáneamente por el cambio de posición de la válvula.

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; tiempos 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.

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

- 1.- Desplazamiento positivo
- 2.- Succión
- 3.- Con jeringa

Si se utiliza el método de desplazamiento positivo es necesario sellar el vial que contiene la muestra. Cuando se lleva a cabo la carga de la muestra, una aguja doble pasa a través del sello y el aire penetra por uno de los conductos de la aguja. Este aire presuriza el vial y obliga a la muestra a salir por el segundo conducto de la aguja, hacia la válvula. Cuando la introducción de la muestra se hace por succión se utiliza ya sea un sistema de vacío o una jeringa de mayor volumen y los viales que contienen la muestra normalmente no están sellados.

El tercer método de introducción utiliza una jeringa normal de CLAR. La jeringa es automática y generalmente puede ajustarse para dar varios volúmenes, sin cambiar ya sea la jeringa o el "loop" de la válvula. Los viales de la muestra pueden estar sellados o abiertos para este método de introducción. La aguja de la jeringa entra en el vial de la muestra y saca el volumen requerido de muestra. Luego la jeringa carga la muestra en la válvula de inyección, de la misma manera como si se usara la válvula en forma manual; finalmente la válvula es accionada y la muestra se introduce en la columna.

Los sistemas de inyección automáticos obviamente permiten una operación sin atención pero también tienen un beneficio adicional. Estos inyectores eliminan algunos de los errores que se presentan en el análisis cuantitativo, ocasionados por el manejo manual de las técnicas de inyección.

### 3.- Columnas

Se considera a la columna como la parte fundamental de la cromatografía ya que es en esta, donde se lleva a cabo la separación. El material de empaque seleccionado depende básicamente de la separación que se desee hacer.

Las dimensiones de una columna dependerán también del tipo de separación que se desee hacer. Las más comunes son las fabricadas con acero inoxidable aunque también las hay de vidrio. La longitud puede ser de 10 cm a 1 m. Al aumentar la longitud aumenta el número de platos teóricos y por lo tanto, se obtiene una mayor resolución aunque en ocasiones es más importante el tipo de empaque y el tamaño de partícula de este, ya que al elevar el área de superficie del empaque, se aumenta la interacción del soluto con la fase estacionaria.

La eficiencia de las columnas se ha elevado con dispositivos y técnicas de empaque que mejoren el contacto del soluto con la fase estacionaria en su paso en la fase móvil. Uno de estos sistemas consiste en la compresión radial de una columna hecha de un material flexible disminuyendo así los espacios vacíos que quedan entre la pared de la columna y las partículas.

Por otro lado, actualmente se emplean materiales de empaque con partículas muy pequeñas que elevan el área superficial total, pudiendo reducir así las dimensiones de la columna. Otra manera de mejorar la eficiencia y la resolución es el empleo de hornos que mantienen una temperatura constante a lo largo de la columna. Cuando se tienen valores de  $K$  muy semejantes, es conveniente el empleo de temperatura para lograr buenas separaciones.

A continuación se presenta una lista de los empaques empleados en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

- Octadecil-silano enlazado químicamente a sílica porosa o a micropartículas de cerámica de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Octadecil-silano enlazado químicamente a gel de sílice con una superficie de porosidad controlada y que a su vez ha sido unida a un núcleo sólido esférico de 30-50  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Partículas de sílica porosa de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Gel de sílice con una superficie de porosidad controlada unida a un núcleo sólido esférico de 30-50  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Alúmina con una superficie de porosidad controlada unida a un núcleo sólido esférico de 30-50  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Empaque de intercambio catiónico fuerte: polímero de fluorocarbón sulfonado cubriendo un núcleo sólido esférico de 30-50  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Octilsilano enlazado químicamente a partículas de sílica totalmente porosa de 5-10  $\mu\text{m}$  de diámetro.

- Capa monomolecular de aminopropilsilano enlazada químicamente a un soporte de gel de sílice porosa de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Gel de sílice totalmente porosa e irregular de 10  $\mu\text{m}$  con una cubierta enlazada químicamente de un intercambiador catiónico fuertemente ácido.
- Grupos nitrilo químicamente enlazados a partículas de sílice porosa de 5-10  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Grupos fenilo químicamente enlazados a partículas de sílice porosa de 5-10  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Empaque de intercambio-aniónico fuerte formado por una amina cuaternaria enlazada químicamente a un núcleo esférico de sílice de 30-50  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Trimetilsilano enlazado químicamente a partículas de sílice porosa, de 5-10  $\mu\text{m}$  de diámetro.
- Gel de sílice de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro con un intercambiador aniónico de amonio cuaternario fuertemente básico.
- Hexilsilano químicamente enlazado a sílice totalmente porosa de 3-10  $\mu\text{m}$  de diámetro.

#### 4.- Detectores

El fin de un detector de CLAR es el de monitorear la composición del líquido que eluye de una columna de cromatografía y por lo tanto hacer posible un registro de como la composición varía con el tiempo. Existen varios tipos de detectores, los cuales tienen aplicaciones diferentes, según el tipo de moléculas que se separen. Conociendo como trabaja un detector en términos generales, es posible determinar que detector cubre mejor necesidades particulares.

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

1. Detector Espectrofotométrico (UV/VIS)
2. Detector de Índice de Refracción
3. Detector de Fluorescencia
4. Detector Electroquímico
5. Detector Infrarrojo
6. Detector de Conductividad
7. Detector de Radioactividad
8. Detector por Espectrometría de Masas

Antes de discutir la operación de los detectores sera de ayuda explicar algunos terminos que se usan para describir y comparar los mismos. Estos terminos incluyen el ruido, la deriva y la linealidad. El ruido se refiere a la inestabilidad de la línea basal y normalmente se mide en desviaciones porcentuales de una escala establecida. El ruido también se puede medir en unidades

absolutas considerando las oscilaciones del registro de un pico a otro. Causas múltiples como impurezas en la fase móvil, tierras mal establecidas, solventes inmiscibles o fallas electrónicas entre otras, pueden ocasionar el ruido.

Por otro lado, la deriva se puede describir como el movimiento lento hacia arriba o hacia abajo de la línea basal en un periodo de tiempo considerable. Estos cambios de la línea basal normalmente se miden en unidades de cambio por hora y generalmente se asocian con cambios de temperatura o de la fase móvil. 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 linealidad se expresa como una desviación porcentual y se define para un rango establecido de detección. El rango dinámico de linealidad es otro número sin unidades que proporciona información acerca del rango de masa en el cual el detector es lineal.

Los detectores pueden ser clasificados en forma gruesa en dos tipos: los detectores de propiedades generales, los cuales funcionan midiendo alguna propiedad física general del eluyente de la columna, por ejemplo la constante dieléctrica o el índice de refracción. Estos detectores responden a una amplia gama de sustancias casi con la misma sensibilidad, por lo que son conocidos como detectores universales o no específicos.

El segundo tipo de detectores son aquellos que son selectivos en su respuesta. Estos son detectores de propiedades del soluto y funcionan midiendo una propiedad física o química del mismo soluto, como la absorción ultravioleta.

Las características que debe tener un detector ideal se enumeran a continuación:

- a) Tener un diseño tal, que los componentes de la muestra, no se mezclen al pasar por el detector.
- b) Tener una señal de ruido y de deriva baja de tal manera que los componentes que eluyen en pequeña cantidad, puedan ser distinguidos.
- c) Tenga un tiempo de respuesta rápido para no distorsionar los picos que eluyen rápido.
- d) Tenga un rango dinámico lineal amplio para que el análisis cuantitativo se pueda llevar a cabo.
- e) Sea relativamente insensible a cambios en la velocidad de la fase móvil, temperatura o composición.
- f) Responda de la misma manera a todas las sustancias, o bien si es selectivo, se pueda ajustar fácilmente para que la respuesta a cada sustancia sea óptima.
- g) Debe ser fácil de manejar y confiable.

Se han propuesto detectores para CLAR basados en variados principios de operación, sin embargo solo algunos son lo suficientemente versátiles para usarse y producirse comercialmente. A continuación se mencionan solo aquellos que son más usados.

#### Detector de Absorción (UV/VIS)

Estos detectores son los de más uso en CLAR y responden a aquellas sustancias que absorben luz visible o ultravioleta. Una gran cantidad de compuestos caen en esta categoría, incluyendo sustancias que tienen electrones sin compartir como las olefinas, así como todos los aromáticos y compuestos que tienen enlaces del tipo  $>C=O$ ,  $>C=S$ ,  $-M=O$ ,  $-N=N-$ .

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. Cuando los solutos que absorben luz se encuentran en la fase móvil, la intensidad de la luz se encuentran en la fase móvil, la intensidad de luz que llega a la fotocelda se reduce produciendo un cambio en la señal eléctrica, la cual puede ser amplificada e introducida a un registro o sistema de datos. La relación entre la absorción de luz en la celda de flujo y la concentración del soluto está dada por la ley de Beer:

$A=ELC$       donde: A= Absorbancia  
E= Coeficiente de extinción del soluto a una longitud de onda  
L= Paso de luz de la celda de flujo  
C= Concentración del soluto en la celda

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 entre 1 y 10 mm y varían en volumen de 0.5 a 20 ul.

Existen diferentes categorías de detectores espectrofotométricos:

a) Detectores de longitud de onda fija. Utilizan filtros para fijar la longitud a 254 nm.

b) Detectores con longitud de onda seleccionable. En estos se intercambian filtros, lo cual permite seleccionar diferentes longitudes de onda directamente de una lámpara de mercurio.

c) Detectores con selección dual. Similares a los anteriores pero tienen un sistema doble de detección que permite monitorear la celda de flujo a dos longitudes de onda, con lo cual se puede conocer la relación entre ambas longitudes.

Esta relación es útil para identificar picos y confirmar su pureza.

d) Detectores de longitud de onda variable. Permiten una gran flexibilidad para optimizar las longitudes de onda. Utilizan un monocromador para seleccionar la longitud de onda, como en un espectrofotometro.

e) Detectores de barrido (UV/VIS). La característica principal de este detector es que puede barrer rapidamente por varias longitudes de onda durante la elucion de un pico de cromatografia. Esto permite obtener un espectro de absorcion para identificar la longitud de onda optima. Con los detectores de barrido se pueden realizar varias funciones en forma simultanea tales como cromatogramas a dos o mas longitudes de onda, graficas de relacion y barridos rapidos. Tambien es posible programar cambios en la longitud de onda mientras se realiza una corrida, lo cual permite optimizar aun mas la longitud de onda.

#### Detector de Indice de Refraccion

Este detector tambien es conocido como refractometro diferencial. Se basa en el hecho de que la mayoria de los liquidos tienen diferente indice de refraccion. El detector mide la diferencia entre la fase movil pura y el soluto que eluye de la columna. El detector de indice de refraccion es casi un detector universal, pero es poco popular en cromatografia liquida por las siguientes razones:

a) Tiene menos sensibilidad que los detectores por fluorescencia o ultravioleta.

b) Es sensible a variaciones de temperatura. Esto se debe a que el indice de refraccion cambia con la temperatura. Por otro lado los elementos opticos del sistema estan diseñados para detectar cambios pequenos en el angulo de la luz y por lo tanto cambios en la temperatura ocasionan variaciones opticas.

c) Tendencia a romperse y sensible a la presion. Tambien la celda de flujo del detector es muy fragil.

d) No puede usarse normalmente para gradientes. Si la composicion de la fase movil cambia, el indice tambien cambia. La elucion con gradiente solo se puede hacer dividiendo el flujo de la fase movil usando dos columnas, una para la muestra y otra para la referencia.

#### Detector de Fluorescencia

Las ventajas mas grandes de la fluorescencia son la selectividad y la sensibilidad. Se trata de una tecnica muy poderosa cuando se realizan analisis de sustancias que existen en muy pequena cantidad (trazas).

Pero, ¿como se puede definir la fluorescencia?. Cuando una molecula absorbe energia ocupa un estado de energia 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. La luz emitida es generalmente de baja energía (mayor longitud de onda) que la radiación de excitación. Es importante hacer notar que la fluorescencia no se presenta a menos de que haya primero absorción de energía.

La cantidad de fluorescencia o eficiencia (F) se puede definir sencillamente como la relación entre el número de fotones emitidos con el número de fotones absorbidos. De tal manera que la eficiencia F tiene un valor máximo de 1. Las moléculas con un valor F mayor a 0.5 son altamente fluorescentes, mientras que los compuestos que tienen un valor de F menor a 0.1 tienen muy poca fluorescencia.

Ahora bien, ¿qué tipo de compuestos tienen fluorescencia?. Estos compuestos se pueden dividir en dos grandes grupos: nativos y derivados.

1) Fluorescencia nativa.- Son compuestos con estructura clínica, tales como el anillo bencénico. Es difícil predecir la fluorescencia ya que ésta depende del pH, solvente y el tipo de sustitución.

2) Derivados Fluorescentes.- Para aquellos compuestos que no poseen fluorescencia nativa se pueden emplear técnicas de derivación.

a) Cloruro de Dansilo: Este compuesto reacciona con aminas primarias y secundarias así como fenoles. Se utiliza como una derivación precolumna.

b) Fluorescamina: Reacciona con las aminas primarias y se emplea para una derivación postcolumna.

c) Opa (O-ftaldehído): Este compuesto también reacciona con las aminas primarias y lo hace en el rango de picomoles. Se usa, para derivaciones pre y postcolumna.

#### 5.- Registrador de Señales

Al emerger un compuesto ya separado en la columna y pasar por el detector, la señal que provoca en éste debe ser registrada por un graficador o un integrador.

En el caso del graficador es necesario calcular manualmente el área obtenida para cada pico. El método más sencillo de medición es mediante la altura de los picos desde la línea base al máximo del pico aunque es deseable tener una línea base estable para obtener la máxima precisión. Otros métodos de medición involucran el cálculo del área bajo el pico. Dicha área puede

calcularse de muy diversas maneras: si el pico es simétrico puede medirse el área por triangulación prolongando los lados del pico hasta la línea base midiendo el ancho y la altura del pico. Otra forma es utilizando un planímetro o bien, recortando y pesando del área obtenida. Una manera muy común es midiendo la altura de estos y multiplicarlo por el ancho del pico medido a la altura media.

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

## Propiedades de Fases Estacionarias para Cromatografía en Fase Reversa

El empleo en forma rutinaria de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución como una técnica analítica, ha sido extendida ampliamente en diferentes áreas de la industria. En la actualidad los sistemas son fáciles de utilizar, la cuantificación es simple y precisa, la sensibilidad, así como el número de aplicaciones se ha incrementado. El número ilimitado de combinaciones de fase estacionaria y móvil, proporciona amplias posibilidades para la separación de solutos con diferentes características y propiedades.

En la etapa de desarrollo de la separación, la selección de la fase estacionaria define en gran medida el éxito de esta. Existen algunas características para los empaques de fase reversa que en ocasiones son desconocidas o ignoradas y que se relacionan directamente con el comportamiento de los solutos en el sistema. La forma más sencilla de comprender el comportamiento de las fases estacionarias es conociendo sus propiedades físicas. En forma intuitiva sabemos que en empaques de fase reversa (C18) de diferentes proveedores y con características supuestamente equivalentes, los resultados no serán exactamente los mismos; también sabemos que de lote a lote podemos encontrar variaciones en su comportamiento. Esto nos indica que el procedimiento de manufactura define las propiedades de la fase estacionaria y por lo tanto su comportamiento. Dentro de estas propiedades físicas se destacan el tamaño de partícula, diámetro y volumen de los poros, la cantidad de carbón y el proceso de recubrimiento final o "end capping". Cada una de ellas afecta importantemente el desempeño del material de empaque y en forma definitiva a la separación cromatográfica.

### Tamaño y Forma de Partícula

Para fines analíticos se pueden encontrar materiales de empaque con tamaños que van de 4 a 10  $\mu\text{m}$ . El valor es nominal, pues en realidad se presenta una distribución de tamaños de partícula. Esta distribución tiene un papel importante en parámetros como la presión y la eficiencia. En forma teórica, mientras menor sea el tamaño de partícula y más homogénea sea su distribución, mayor será la eficiencia y la presión del sistema. La forma de partícula es importante en cuanto a la resistencia que esta ofrece a fenómenos de fractura.

## Diámetro de Poro

Ya que los empaques o soportes de fases estacionarias son materiales poliméricos (sílica para la mayoría de las fases enlazadas a C18), en el proceso de manufactura se controlan parámetros como temperatura, velocidad de reacción, cantidad de agua residual, etc., con la finalidad de regular el proceso de polimerización y definir de esta forma el tamaño y volumen de los poros del mismo. Por lo tanto, es difícil suponer que el diámetro del poro es un número singular, de nuevo, se trata de una distribución de diámetros de poro que puede tener un efecto sutil en la selectividad de la columna. Generalmente el intervalo de diámetros de poro es grande en especial para empaques de forma irregular, ya que existen materiales de forma esférica con distribuciones de tamaño de poro estrechas. El diámetro del poro es importante cuando se trabaja con muestras que contienen moléculas grandes que puedan experimentar algún efecto de exclusión por tamaño, o peor aún, que puedan quedar adsorbidas disminuyendo su recuperación y la exactitud de la cuantificación.

El área de superficie está íntimamente relacionada con esta propiedad. Al incrementarse el diámetro del poro, su área de superficie disminuye. De tal forma, materiales de empaque de tamaño de partícula grande tienen área de superficie menor.

## Porosidad

El volumen del poro es indicativo de la porosidad de la sílica o material de soporte. Volúmenes de poro grandes indican que el material de empaque tiene baja densidad y bajo ciertas condiciones será más susceptible a la fractura. Los primeros empaques de fase reversa con poros grandes fueron hechos incrementando el tamaño de los poros de los empaques convencionales, al grado de hacer las paredes de estos muy delgadas y las partículas muy frágiles generando columnas inestables. En la actualidad, la tecnología se ha mejorado y los empaques con poros de 300 Å son resistentes y de uso muy común.

## Fase Enlazada

Existen diferentes formas bajo las cuales las fases enlazadas pueden ser sintetizadas. La más común utiliza un reactivo de silanización monofuncional que forma un enlace único entre la fase enlazada (que puede ser C18) y la superficie de sílica (fig.

1). Este tipo de unión proporciona una superficie muy reproducible con densidad de enlace controlada. En algunas ocasiones se emplean reactivos de silanización polifuncionales (generalmente trifuncionales) que pueden formar enlaces múltiples con la superficie de la sílica. El uso de estos reactivos conduce a fases enlazadas poliméricas, en las que más de un agente silanizante se une al otro en la superficie de forma horizontal o vertical (Fig. 2). Esta unión, a la vez que tiene diferente selectividad respecto a las fases enlazadas monofuncionales, es más difícil de controlar y tiene poca reproducibilidad lote a lote. La forma en la que las reacciones progresan o definen las características de la fase enlazada se monitorea con la determinación de la cantidad de carbón.

#### Cantidad de Carbón

Existen diversas técnicas para determinar la cantidad de carbón; una de ellas involucra el calentamiento del material de empaque al punto en el que la cadena hidrocarbonada se elimina; la cantidad de carbón se conoce ya sea por pérdida de peso o por determinación de la cantidad de dióxido de carbono formado. Esta se reporta como porcentaje de carbón, el cual es la fracción en peso de este respecto al material de empaque. En forma teórica se sabe que al incrementarse la cantidad de carbón por un aumento en la longitud de la cadena o por incremento en la densidad del enlace, la retención de las columnas es mayor.

El comportamiento cromatográfico de las fases enlazadas depende de la densidad de la unión y de la sílica empleada como soporte, así como del área de superficie del mismo material. Al ser mayor la densidad del material de empaque, se requiere mayor cantidad de sílica para empacar la columna. Al ser mayor la masa requerida, mayor será la cantidad de carbón en la columna. Si se tienen dos materiales de empaque con densidades muy diferentes, pero la misma cantidad de carbón expresada en porcentaje de su peso, las columnas empacadas con estos materiales tendrán diferencias significativas en las propiedades de retención. Por esta razón es difícil predecir el comportamiento cromatográfico con base en la carga de carbón únicamente.

#### End Capping o Recubrimiento Final

Los reactivos de silanización C18 son moléculas grandes de aproximadamente 20 Å de longitud, que pueden causar impedimento estérico sobre otras moléculas de reactivos que intentan enlazarse a un grupo silanol adyacente, o en aquellas regiones de los

poros que están estéricamente restringidas, lo que conduce a la presencia de grupos silanoles residuales en la superficie. Estos grupos silanoles polares interactúan con solutos básicos bajo ciertas condiciones causando el coqueo de los picos, lo que puede perjudicar la cuantificación en la cromatografía analítica y la carga en las aplicaciones preparativas.

Este problema puede ser resuelto llevando a cabo un recubrimiento final del empaque. El proceso, llamado "End Capping", es una reacción separada y subsecuente que se verifica sobre la fase enlazada para reducir el número de grupos silanoles sobre la superficie. Se utilizan moléculas pequeñas como el trimetilsilano y menos impedidas estéricamente que las moléculas de C18. Algunos proveedores aseguran tener empaques 100 % recubiertos, pero en realidad, la mayoría de las fases estacionarias tienen sólo el 30 % de los sitios de enlace disponibles. El recubrimiento más alto reportado hasta ahora es de aproximadamente 50 % con el empleo de técnicas químicas muy sofisticadas y condiciones de reacción poco comunes.

Uno de los parámetros más difíciles de controlar en la manufactura de las fases enlazadas, es el garantizar que el proceso de "End Capping" sea reproducible.

El conocimiento de la anatomía básica de las columnas de sílica de fase enlazada, ayuda en gran medida a la selección de las fases estacionarias en el proceso de desarrollo de las separaciones cromatográficas y también a la comprensión de las características que estas poseen, así como su posible influencia sobre el comportamiento de los solutos en el sistema.

poros que están estéricamente restringidas, lo que conduce a la presencia de grupos silanoles residuales en la superficie. Estos grupos silanoles polares interactúan con solutos básicos bajo ciertas condiciones causando el coqueo de los picos, lo que puede perjudicar la cuantificación en la cromatografía analítica y la carga en las aplicaciones preparativas.

Este problema puede ser resuelto llevando a cabo un recubrimiento final del empaque. El proceso, llamado "End Capping", es una reacción separada y subsecuente que se verifica sobre la fase enlazada para reducir el número de grupos silanoles sobre la superficie. Se utilizan moléculas pequeñas como el trimetilsilano y menos impedidas estéricamente que las moléculas de C18. Algunos proveedores aseguran tener empaques 100 % recubiertos, pero en realidad, la mayoría de las fases estacionarias tienen solo el 30 % de los sitios de enlace disponibles. El recubrimiento más alto reportado hasta ahora es de aproximadamente 50 % con el empleo de técnicas químicas muy sofisticadas y condiciones de reacción poco comunes.

Uno de los parámetros más difíciles de controlar en la manufactura de las fases enlazadas, es el garantizar que el proceso de "End Capping" sea reproducible.

El conocimiento de la anatomía básica de las columnas de sílica de fase enlazada, ayuda en gran medida a la selección de las fases estacionarias en el proceso de desarrollo de las separaciones cromatográficas y también a la comprensión de las características que estas poseen, así como su posible influencia sobre el comportamiento de los solutos en el sistema.

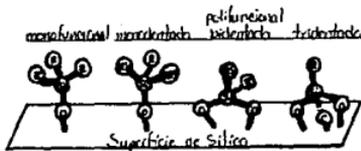


Fig.1. Uniones monofuncionales y polifuncionales en la superficie de sílica

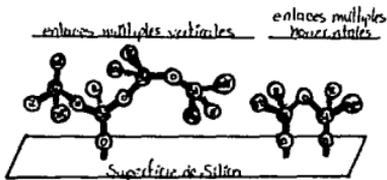


Fig.2. Enlaces horizontales y verticales de los ligandos polifuncionales en la superficie de sílica.

### Adecuabilidad del Sistema

Cuando se emplean metodos cromatograficos, como la Cromatografia de Liquidos de Alta Resolucion o la Cromatografia de Gases, es conveniente verificar la adecuabilidad y eficacia del sistema en uso.

Para comprobar la eficacia del sistema de operacion, este debe someterse a una prueba de adecuabilidad cada vez que se realiza un analisis; esto se debe a que siempre existen modificaciones, ya sea en las condiciones de operacion o en los cromatogramas.

Dicha prueba abarca el concepto de electronica, equipo manejado, preparacion de muestras y operaciones analiticas; constituyendo asi una prueba global en funcion del sistema.

La adecuabilidad del sistema puede corroborarse mediante tres parametros que resultan muy utiles en estos casos:

- a) Reproducibilidad de inyecciones repetidas
- b) Coleo
- c) Resolucion entre los picos

a) Reproducibilidad de inyecciones repetidas.- se realizan 5 inyecciones con la solucion analitica los resultados se expresan como la Desviacion Estandar Relativa (DER).

Los calculos se expresan por la siguiente ecuacion

$$SR (\%) = \frac{100}{\bar{X}} \left[ \frac{\sum (x_i - \bar{X})^2}{N - 1} \right]^{1/2}$$

donde: SR (100 %) = Desviacion Estandar Relativa en 100 %

$\bar{X}$  = Media de N medidas

$x_i$  = Media de la relacion de las respuestas del pico =  $R_s$  ( cuando se usa estandar interno ).

$$X = R_s + \frac{r_s}{r}$$

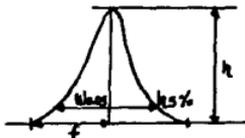
donde:  $r_s$  = respuesta correspondiente al pico del estándar de referencia

$r$  = respuesta correspondiente al pico del estándar interno

Los resultados de los cinco cromatogramas repetidos, usados para realizar los cálculos, a menos que en la monografía individual se especifique lo contrario; deben indicar que se encuentran dentro del límite de la Desviación Estándar Relativa que es de 2% ( $DER < 2\%$ ). En el caso de que la DER sobrepase dicho límite; se utilizan los datos de seis cromatogramas y el límite será mayor al 2% ( $DER > 2\%$ ).

Coleo.- es el límite máximo permisible de asimetría del pico. Para un pico simétrico, el factor de coleo,  $T$ , es la unidad ( $T=1$ ); pero este valor se incrementa cuando el coleo llega a ser más pronunciado ( $T>1$ ).

Este coleo podemos definirlo como la relación que existe entre lo ancho del pico al 5% de la altura del mismo partiendo de la línea base ( $W_{0.05}$ ), y el doble de la distancia,  $f$ , medida en la base del pico.



$$T = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

Resolución R.- asegura la separación de los componentes que eluyen cerca, estableciendo así la eficiencia general de separación del sistema, o cuando un estándar interno es usado.

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

donde:  $R$  = Resolución

$V_1$  = Tiempo de retención del primer pico

$V_2$  = Tiempo de retención del segundo pico

$W_1$  = Ancho de la base del primer pico

$W_2$  = Ancho de la base del segundo pico

## PROCEDIMIENTO DE OPERACION PARA REGISTRAR EL DESGASTE DE UNA COLUMNA EN FUNCION DE LOS PLATOS TEORICOS

**COLUMNA:** NOMBRE Y TIPO DE COLUMNA QUE SE ESTA UTILIZANDO  
**ANALISIS:** ANOTAR NOMBRE(S) DE EL (LOS) ANALISIS Y/O NOMBRE(S) DE EL (LOS) PRINCIPIOS ACTIVOS A ANALIZAR  
**FECHA DE APERTURA:** FECHA DEL DIA EN QUE SE ENPEZO A USAR LA COLUMNA

1) Fecha	2) N (platos teoricos)	3) Analisis	4) Fecha de Lavado
22-03-1993	Determinarlo con el Principio activo del Primer Analisis	No. de Lote que se esta analizando	23-03-1993
9 y 10-03-1993	3281.0	No. de Lote que se esta analizando	10-03-1993
24 y 25-03-1993	6076.3	No. de Lote que se esta analizando	25-03-1993
13-04-1993	2277.1	No. de Lote que se esta analizando	14-04-1993
15-04-1993	4363.0	Linealidad y Precision del Sistema I	16-04-1993
16-04-1993	3002.4	Linealidad y Precision del Sistema II	16 y 19-04-1993
19-04-1993	1398.0	Repatibilidad y Reproducibilidad I	20-04-1993
20-04-1993	1203.0	Repatibilidad y Reproducibilidad II	21-04-1993
21-04-1993	1203.0	Repatibilidad	21-04-1993
22 y 23-04-1993	007.1	Linealidad del Metodo y Exactitud al 100 %	27-04-1993

Si la columna va a ser utilizada por primera vez, es necesario que se le pase un poco de solvente o fase móvil para impregnar toda la fase estacionaria ( el solvente tiene que ser adecuado al tipo de columna). Despues de pasarle el solvente, es necesario pasarle fase móvil para acondicionar la columna.

Para columnas de FASE INVERSA el solvente mas usado es el METANOL, para el caso de FASE NORMAL se puede utilizar ISOPROPANOL.

1) Fecha .- aqui se anota la fecha del dia en que se realizo el analisis

2) N (Platos Teoricos) .- en esta parte se anotan los platos teoricos que tiene la columna en cada uno de los analisis, y se determinan con cualquiera de las formulas de la pag. 20 ; el calculo depende de la forma en como determinan los platos teoricos en cada uno de los laboratorios y se determina con la misma fase móvil aun si esta fue modificada.

3) Analisis .- aqui se anota el nombre del analisis efectuado o lote del producto que se analizo.

4) Fecha de Lavado .- en esta columna se anota la fecha del dia en que fue lavada la columna, el lavado depende del tipo de columna que sea; se recomienda que en cada hoja donde se lleve este tipo de registros se ponga como es que se lava la columna, con que disolventes, etc.

## PROGRAMA DE LIMPIEZA DEL CROMATOGRÁFO DE LIQUIDOS

### Procedimiento I

- 1) Retirar la columna del equipo.
- 2) Conectar la salida del inyector con la entrada del detector.
- 3) Fijar un límite de presión máximo permisible en la bomba no mayor a 1000 psi.
- 4) Pasarle el sistema agua grado HPLC un volumen de aproximadamente 500 ml y un flujo de 5 ml/min.
- 5) Pasarle al sistema  $\text{HNO}_3$  6N un volumen de aproximadamente 100 ml a un flujo de 5 ml/min.
- 6) Pasar nuevamente agua grado HPLC a un flujo de 5 ml/min, un volumen necesario para eluir completamente el medio ácido, para ello es recomendable medir el pH de salida y que este sea igual al de entrada.

Este procedimiento es recomendable hacerlo por lo menos una vez al mes o dependiendo del uso de sales y la frecuencia, realizarlo más veces.

### Procedimiento II

- 1) Repetir los puntos 1 al 4 del Procedimiento I.
- 2) Pasarle al sistema aproximadamente 100 ml de Metanol grado HPLC.
- 3) Pasarle al sistema aproximadamente 100 ml Acetonitrilo grado HPLC.
- 4) Pasarle al sistema agua grado HPLC un volumen de aproximadamente 500 ml.

Este procedimiento es recomendable hacerlo por lo menos una vez al mes o más veces, dejándolo a criterio del usuario.

Además, es importante no olvidar checar los componentes del sistema por separado y de manera adjunta, para esto se recomienda ejecutar las rutinas que sugiere el fabricante, relacionados con medición de flujos, volumen de inyección y respuesta obtenida, así como prueba de Ramp de manera que la operación del sistema sea confiable, como confiable sean los resultados obtenidos del mismo.

## **CAPITULO II. PREPARACION DE PLACEBOS**

**FORMULA CUALITATIVA**

**MARBETE**

**CADA 100 ML CONTIENEN:**

**MINOXIDIL ..... 2 G**

**VEHICULO c.b.p. .... 100 ML**

**LA FORMULA SE PREPARO CON LOS SIGUIENTES  
MATERIALES:**

**DILUENTE (I)**

**PROPILENGLICOL SIN FIERRO**

**CLAVE: 463411**

**LOTE: 3423 F**

**ALCOHOL USP GRADO REACTIVO**

**CLAVE: 325600**

**LOTE: 2345 F**

**AGUA**

**DESTILADA POR SISTEMA MILLI-Q**

**MINOXIDIL USP (MATERIA PRIMA)**

**LOTE: 246687**

**LOTE:3469 F**

**PUREZA: 98.63 %**

**Note: las claves y lotes son inventados excepto la pureza del Minoxidil.**

**TODOS LOS COMPONENTES EXCEPTO EL MINOXIDIL  
SE AGITARON POR ESPACIO DE UNA HORA**

### **LINEARIDAD DEL METODO**

**SE CARGARON PLACEBOS CON TRES CONCENTRACIONES EN  
DOS DIAS DIFERENTES INCLUYENDO LA QUE CORRESPONDE  
AL 100 %**

<b>%</b>	<b>MG / ML</b>
<b>95</b>	<b>1.9</b>
<b>100</b>	<b>2.0</b>
<b>105</b>	<b>2.1</b>

*LINEARIDAD DEL METODO  
DIA UNO*

<i>%</i>	<i>MG REALES</i>
<i>95</i>	<i>1.9011</i>
<i>100</i>	<i>2.0086</i>
<i>105</i>	<i>2.1041</i>

*LINEARIDAD DEL METODO  
DIA DOS*

<i>%</i>	<i>MG REALES</i>
<i>95</i>	<i>1.9013</i>
<i>100</i>	<i>2.0018</i>
<i>105</i>	<i>2.1078</i>

*LOS MG QUE FUERON PESADOS SE DISOLVIERON CON DILUENTE I Y AGITARON HASTA SU COMPLETA DISOLUCION.*

*YA QUE EL MINOXIDIL ESTABA COMPLETAMENTE DISUELTO SE PROCEDIO A AFORAR CON LA MISMA SOLUCION DILUENTE, ESTE PREPARADO SE COLOCO EN CONTENEDORES PREVIAMENTE LAVADOS COMO NOS INDICA EL W.T. O BIEN LA ORDEN DE PRODUCCION PARA EVITAR EL TENER RESIDUOS DE FIERRO EN LOS MISMOS, Y TAMBIEN PREVIAMENTE ETIQUETADOS.*

## PRIMER DIA

### CONSIDERANDO LA PUREZA

PESO FISICO DE MINOXIDIL EN G	X	PUREZA	MG ADICIONADOS
2.0086		98.63	1.98108
1.9011		98.63	1.87505
2.1041		98.63	2.07527

NOMBRE DE QUIEN VERIFICO LAS PESADAS : J. ROJAS

FIRMA : 

FECHA : ABRIL 22, 1993

### PLACEBOS PARA EL ANALISTA

IDENTIFICACION DEL PLACEBO	% REAL ADICIONADO
P	99.05
A	93.74
Z	103.75

## SEGUNDO DIA

### CONSIDERANDO LA PUREZA

PESO FISICO DE MINOXIDIL EN G	X	PUREZA	MG ADICIONADOS
2.0018		98.63	1.9743
1.9013		98.63	1.8752
2.1078		98.63	2.0789

NOMBRE DE QUIEN VERIFICO LAS PESADAS : GLORIA SANCHEZ

FIRMA :

FECHA : ABRIL 29, 1993

### PLACEBOS PARA EL ANALISTA

IDENTIFICACION DEL PLACEBO	% REAL ADICIONADO
P	98.71
A	93.76
Z	103.94
<b>17</b> PLACEBO SIN CARGAR	

## PRIMER DIA

EXACTITUD AL 100 %

SE CARGARON 6 PLACEBOS DE MANERA INDEPENDIENTE  
LOS CUALES FUERON AFORADOS A 100 ML CON  
DILUENTE (1) AGITANDO UNA HORA.

MUESTRA	PESO MUESTRA EN G	%	ADICIONADO
11	2.0058		98.9
12	2.0042		98.8
13	2.0052		98.9
14	2.0038		98.8
15	2.0029		98.8
16	2.0075		99.0

NOMBRE DE QUIEN VERIFICO LAS PESADAS : J.ROJAS

FIRMA : 

FECHA : ABRIL 22, 1993

## SEGUNDO DIA

EXACTITUD AL 100 %

SE CARGARON 6 PLACEBOS DE MANERA INDEPENDIENTE  
LOS CUALES FUERON AFORADOS A 100 ML CON  
DILUENTE (1) AGITANDO UNA HORA.

MUESTRA	PESO MUESTRA EN G	%	ADICIONADO
1	2.0037		98.8
2	2.0020		98.7
3	2.0044		98.8
4	2.0170		98.9
5	2.0055		98.9
6	2.0260		99.9

NOMBRE DE QUIEN VERIFICO LAS PESADAS : J.ROJAS

FIRMA : 

FECHA : ABRIL 29, 1993

## **ESPECIFICIDAD**

**ESTA PRUEBA SE REALIZO CON EL PLACEBO  
MARCADO CON EL NUMERO 17, EL CUAL NO  
CONTENIA EL PRINCIPIO ACTIVO DE MINOXIDIL  
Y SOLO ES EL DILUENTE I.**

## **CAPITULO III. PARTE EXPERIMENTAL**

## **REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPO UTILIZADO EN LA VALIDACION**

### **REACTIVOS**

**Diocetilsulfosuccinato de Sodio : Aldrich Chemical Company Inc.**

**Metanol (Grado HPLC) : Baker Analyzed**

**Acido Acético Glacial (Grado HPLC) : Merck**

**Agua Destilada : Sistema de Agua Milli-Q**

### **MATERIAL DE VIDRIO**

**Matraces Volumétricos de 10 ml, 60 ml, 500 ml, 1000 ml.**

**Pipetas Volumétricas de 1 ml, 3 ml, 20 ml, 25 ml.**

**Pipetas Graduadas de 5 ml, 10 ml.**

**Matraz Kitasato de 1000 ml.**

**Equipo de Filtración Millipore**

**Probetas Graduadas de 25 ml, 50 ml, 500 ml, 1000 ml.**

**Viales de 4 ml (para las muestras), 10 ml, 30 ml.**

### **MATERIAL AUXILIAR**

**Jeringas de 5 ml con aguja**

**Tapones con roaca para viales de 4 ml**

**Septos**

**Filtros de 0.45 micras (Filtración de Muestras)**

**Etiquetas : para la identificación de reactivos con códigos de precaución.**

**Engargoladora**

**Tapones de plástico para viales**

**Casquillos de Aluminio**

**Tapones de Teflón para los matraces**

**Espátula de Aluminio**

**Líneas de Suministro de :**

**Energía Eléctrica**

**Aire Comprimido**

**Vacío**

## **EQUIPOS E INSTRUMENTOS**

**Balanza Analítica Mettler AE100**

**Balanza Analítica Mettler H54AR**

**Balanza Analítica Mettler Ak160**

**Potenciómetro 691 pH Meter Metrohm**

**Dosimat 665 Metrohm**

**Agitador Magnético Magnestir**

**Cromatógrafo de Líquidos Waters II que consta de :**

- Bomba HPLC Waters 510
- Controlador de Gradiente Automático
- WISP Waters 712
- Detector de Longitud de Onda Variable Waters 490E
- Computadora NEC Powermate SX/16
- Impresora NEC Pinwriter P6200

## Técnica Analítica

La Técnica Analítica para determinar el Minoxidil por HPLC involucra diversos factores que hay que considerar; posteriormente presentaremos - algunas modificaciones que se hicieron para adecuarla a nuestras necesidades.

### Condiciones Cromatográficas:

#### Instrumento

Bomba: Capaz de operar a 2500 psi

Inyector: Adecuado con bajo volumen muerto

Detector: Ultravioleta (254 nm) con un registrador adecuado

Columna: Micro-Bondapak C 18 de 10 micras, 4mm x 30 cm, o equivalente

#### Parámetros de Operación \*

Atenuación: Ajustarla para obtener picos adecuados

Flujo de trabajo: Cerca de 1.0 ml/min

Presión de la Columna: Cerca de 1800 psi

Temperatura de la Columna: T. Ambiente

Volumen de inyección: Cerca de 10 µl

Fase Móvil:        3.0 g de Dioctilfosuccinato de Sodio  
                      10.0 ml de Acido Acético Glacial  
                      700 ml de Metanol  
                      300 ml de Agua Bidestillada  
                      Ajustar el pH a 3 con Acido Perclórico  
                      Filtrar y degaasificar antes de usar

\* Algunos de los parámetros de operación quizá deban ajustarse para obtener un cromatograma satisfactorio. En particular, la resolución entre los picos del Minoxidil y el estándar interno puede incrementarse disminuyendo la concentración de Metanol en la Fase Móvil.

Los tiempos de retención de los picos de la Medroxiprogesterona Aceta- y el Minoxidil son aproximadamente de 8 y 10 min, respectivamente.

### Preparación de los Estándares y la Muestra

#### Preparación de la Solución de Estándar Interno :

Preparar una solución que contenga 0.2 mg/ml de Medroxiprogesterona Acetato (Std Int) en Fase Móvil. Quizá sea necesario ponerlo en el ultra-sonido; sólo para disolver el Std. Interno.

#### Preparación del Estándar de Referencia :

Pesar aproximadamente 5 mg del Estándar de Referencia de Minoxidil y transferirlo a un vial adecuado. Adicionarle 20.0 ml de la Solución de Std. Interno y agitar vigorosamente hasta disolver el fármaco.

#### Preparación de la Muestra :

##### Solución al 2 %

Medir una alícuota de 1.0 ml de la solución tópica y pasarla a un matraz volumétrico de 10.0 ml. Diluir a volumen con Fase Móvil y mezclar. De esta solución tomar una alícuota de 3.0 ml y transferirlo a un vial adecuado. Adicionarle 25.0 ml de la Solución de Std Interno y mezclar.

Filtrar las muestras a través de un poro de 0.45 micras de diámetro.

**Adecuabilidad:**

inyectar 4 alícuotas de la preparación del Estándar de Referencia y medir la respuesta del pico del Minoxidil (RStd) y del pico del Estándar Interno (RStInt). Calcular el Factor del Estándar (SF) de cada inyección del Estándar de Referencia.

$$SF = Wstd/Rstd \times P$$

Donde:

Wstd = Peso del Std de Referencia de Minoxidil en mg

Rstd = Relación de la respuesta del pico de Minoxidil y la respuesta del pico del Std Interno (Medroxiprogesterona Acetato)

P = Pureza del Estándar de Referencia de Minoxidil, expresado en decimales

La Desviación Estandar Relativa de los valores de SF no deben exceder el 2 %. El Factor de Resolución (Rf) entre el pico del Minoxidil y el pico del Std Interno es NLT 2.0.

El Rf quizá se calcule con cualquiera de las siguientes fórmulas:

$$Rf = [ 2 (Tr - Tr') ] / [ 1.699 (Wr/2 + Wr'/2) ]$$

o

$$Rf = [ 2 (Tr - Tr') ] / (W + W')$$

Donde:

Tr = Tiempo de Retención del Minoxidil

Tr' = Tiempo de Retención de la Medroxiprogesterona Acetato

Wr/2 = Ancho del pico de Minoxidil, a la mitad de la altura del mismo, en unidades de tiempo

Wr'/2 = Ancho del pico de la Medroxiprogesterona Acetato, a la mitad de la altura del mismo, en unidades de tiempo.

W = Ancho de la base del pico de Minoxidil, obtenida por extrapolación.

W' = Ancho de la base del pico de la Medroxiprogesterona Acetato, obtenida por extrapolación.

### **Cálculos:**

Calcular el contenido de Minoxidil en la formulación apropiada usando la siguiente fórmula :

$$\text{Solución Tópica (mg/ml)} = (\text{Ream/Rstd}) \times (\text{Wstd/Vapl}) \times (\text{F1/F3}) \times (\text{F2/F4}) \times \text{P}$$

Donde:

**Ream** = Relación de las Respuestas de Minoxidil y el Estándar Interno en la preparación de las muestras

**Rstd** = Relación de las Respuestas de Minoxidil y el Estándar Interno en la preparación del Estándar

**Wstd** = Peso del Estándar de Referencia de Minoxidil, en mg

**Vapl** = Volumen de muestra tomada, en ml

**F1** = Volumen de solución de Std Interno usado en la preparación de la Muestra, en ml

**F3** = Volumen de solución de Std Interno usado en la preparación del Estándar, en ml

**F2** = Factor de Dilución por muestra

Solución al 1 %	= 1.0
Solución al 2 %	= 10
Solución al 3 %	= 10
Solución al 5 %	= 10

**F4** = Factor de Dilución por Muestra

Solución al 1 %	1
Solución al 2 %	3
Solución al 3 %	2
Solución al 5 %	1

**P** = Pureza del Estándar de Referencia de Minoxidil, expresada en decimales

# TECNICA ANALITICA

## ALGUNAS MODIFICACIONES A LA TECNICA ANALITICA

### CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

#### INSTRUMENTO

- a) BOMBA: CAPAZ DE OPERAR A 2500 PSI
- b) INYECTOR: CON BAJO VOLUMEN MUERTO DE INYECCION
- c) DETECTOR: ULTRAVIOLETA (254 nm). CON REGISTRADOR ADECUADO
- d) COLUMNA: MICRO-BONDAPAK G 18 DE 10 MICRAS,  
4 mm DE DIAMETRO X 30 cm DE LARGO.

#### PARAMETROS DE OPERACION

- a) FLUJO DE LA COLUMNA: 1.3 ML/MIN .
- b) PRESION DE LA COLUMNA: PROMEDIO 2200 PSI .
- c) TEMPERATURA DE LA COLUMNA: AMBIENTE
- d) VOLUMEN DE INYECCION: 10  $\mu$ l
- e) SENSIBILIDAD: 1.0 AUFS
- f) ATENUACION: ADECUARLA SEGUN NECESIDADES
- g) FASE MOVIL:

- 3.0 G DE DIOCTILSULFOSUCCINATO DE SODIO
- 675 ML DE METANOL (GRADO HPLC)
- 325 ML DE AGUA DESTILADA
- 10 ML DE ACIDO ACETICO GLACIAL (GRADO HPLC)
- AJUSTAR EL Ph A 3 CON ACIDO PERCLORICO
- FILTRAR Y DEGASIFICAR ANTES DE USAR

• MODIFICACIONES HECHAS A LA TECNICA

## **EVALUACION DEL SISTEMA**

## **LINEARIDAD DEL SISTEMA**

LA LINEARIDAD DEL SISTEMA SE DETERMINO CONSTRUYENDO UNA CURVA DE CALIBRACION QUE COMPRENDIA LAS CONCENTRACIONES DE 95 %, 97 %, 100 %, 103 % Y 105 %; UTILIZANDO PARA SU PREPARACION LA MISMA SOLUCION PATRON. CADA PUNTO DE LA CURVA FUE ANALIZADO POR DUPLICADO, ADEMAS DE QUE LA LINEARIDAD DEL SISTEMA TAMBIEN FUE ANALIZADA POR DUPLICADO ( O SEA QUE SE HICIERON DOS PESADAS ).

### **CRITERIO DE ACEPTACION**

#### **DE LA GRAFICA RESPUESTA VS CONCENTRACION**

$$m \approx 1$$

$$b \approx 0$$

$$r \leq 0.99$$

$$r^2 \leq 0.98$$

$$CV \leq 1.5 \%$$

NOTA: LOS CROMATOGRAMAS QUE SE PRESENTAN A LO LARGO DE ESTA PARTE EXPERIMENTAL SOLO SON UNA PARTE DE ELLOS, DEBIDO A QUE SERIA IMPOSIBLE ILUSTRARLOS EN SU TOTALIDAD.

## LINEARIDAD DEL SISTEMA

### MINOXIDIL

#### SOLUCION PATRON

ESTANDAR PRIMARIO: MINOXIDIL (UPJOHN)

PUREZA: 100 % ISSUE: B CONTENIDO: 200 MG

FECHA DE APERTURA: 08/MARZO/1993 (FRASCO 1)  
16/ABRIL/1993 (FRASCO 2)

FECHA DE CADUCIDAD: 08/MARZO/1994 (FRASCO 1)  
16/ABRIL/1994 (FRASCO 2)

FECHA DE TERMINACION: 16/ABRIL/1993 (FRASCO 1)

PESO ST REF (MG)	AFORO (ML)	CONCENTRACION (MG/ML)
100.19	50	2.0038
100.06	50	2.0012

FECHA DE REALIZACION: 15 Y 16 DE ABRIL DE 1993

ESTANDAR INTERNO: MEDROXIPROGESTERONA ACETATO

MATERIA PRIMA LOTE: 0324C FECHA: 26/MARZO/1990

PESO ST INT (MG)	AFORO (ML)	CONCENTRACION (MG/ML)
100.11	500	0.2002
100.10	500	0.2002

FECHA DE REALIZACION: 15 Y 16 DE ABRIL DE 1993

FIRMA DE QUIEN VERIFICO LAS PESADAS



## LINEARIDAD DEL SISTEMA

<b>% DE ANALISIS</b>	<b>ALICUOTA * (ML)</b>	<b>CONCENTRACION (MG/ML)</b>
95	2.85	0.2280
95	2.85	0.2280
97	2.91	0.2328
97	2.91	0.2328
100	3.00	0.2400
100	3.00	0.2400
103	3.09	0.2472
103	3.09	0.2472
105	3.15	0.2520
105	3.15	0.2520

\* A LA ALICUOTA SE LE ADICIONARON 25 ML DE ST INT.

## ***PRECISION DEL SISTEMA***

***ESTA PRUEBA SE EFECTUO ANALIZANDO POR --  
SEXTUPLICADO UNA MISMA SOLUCION ESTANDAR -  
CORRESPONDIENTE A EL 100 % EMPLEADO EN LA  
LINEARIDAD DEL SISTEMA.***

***CRITERIO DE ACEPTACION***

***COEFICIENTE DE VARIACION CV  $\leq$  1.5 %***

## **EVALUACION DEL METODO**

# LINEARIDAD DEL METODO

SE DETERMINO ANALIZANDO TRES PLACEBOS A LOS CUALES SE LES ADICIONO DE MANERA INDEPENDIENTE CANTIDADES NECESARIAS DE MINOXIDIL (MATERIA PRIMA PREVIAMENTE VALORADA) PARA OBTENER LAS CONCENTRACIONES DE 95 %, 100 % Y 105 %. CADA CONCENTRACION FUE ANALIZADA POR TRIPLICADO BAJO LAS MISMAS CONDICIONES DE OPERACION Y POR EL MISMO ANALISTA.

CRITERIO DE ACEPTACION

DE LA GRAFICA

CANT. ADICIONADA VS CANT. RECUPERADA

$$m \approx 1$$

$$b \approx 0$$

$$r \leq 0.99$$

$$r \leq 0.98$$

PROMEDIO DE RECOBRO 98-102 %

COEFICIENTE DE VARIACION  $CV' \leq 2$  %

## **EXACTITUD AL 100 %**

**SE DETERMINO POR EL ANALISIS DE SEIS PLACEBOS CARGADOS DE MANERA INDEPENDIENTE CON LA CANTIDAD NECESARIA DE LA SUSTANCIA DE INTERES (MATERIA PRIMA MINOXIDIL) PARA OBTENER LA CONCENTRACION DE 100 %.  
LOS PLACEBOS SE ANALIZARON CADA UNO POR TRIPLICADO, BAJO LAS MISMAS CONDICIONES DE OPERACION Y POR EL MISMO ANALISTA.**

### **CRITERIO DE ACEPTACION**

**PROMEDIO DE RECOBRO 98-102 %**

**COEFICIENTE DE VARIACION CV  $\leq$  2 %**

# PRECISION DEL METODO

## REPETIBILIDAD

SE EFECTUO ANALIZANDO POR SEXTUPLICADO UN PRODUCTO TERMINADO, EL CUAL CONTIENE EN TEORIA EL 100 % DE LA CONCENTRACION.

### CRITERIO DE ACEPTACION

PROMEDIO DE RECOBRO 98-102 %

COEFICIENTE DE VARIACION  $CV \leq 2 \%$

## REPRODUCIBILIDAD

SE REALIZO CON UN PRODUCTO TERMINADO, EL CUAL FUE ANALIZADO POR TRIPLICADO, POR DOS ANALISTAS, DOS DIAS DIFERENTES Y CON EL MISMO EQUIPO.

### CRITERIO DE ACEPTACION

EL CV TOTAL DEBE CUMPLIR CON EL SIGUIENTE CRITERIO  $CV \leq 2 \%$

NOTA: ESTAS PRUEBAS SE REALIZARON CON EL LOTE MI10347 DE REGAINE SOL. 2 % APROBADA EL DIA 13-04-93.

## ESPECIFICIDAD

LA PRUEBA SE REALIZO CON PLACEBOS NO CARGADOS QUE FUERON ANALIZADOS BAJO LAS MISMAS CONDICIONES DE OPERACION (VER MODIF. A LA TECNICA PAG. 64).

EL CRITERIO DE ACEPTACION CONSISTE EN QUE EL SISTEMA CROMATOGRAFICO SEA CAPAZ DE SEPARAR EL PICO DE INTERES DE OTRAS SUSTANCIAS QUE PUEDAN PRODUCIR UNA SEÑAL EN EL DETECTOR.

### RESULTADOS

AREA MTRA	AREA ST INT	RELACION AREAS MTRA/ST INT	CONC. (MG/ML)
0	2785412	0	0
0	2786195	0	0
0	2792591	0	0

FECHA DE REALIZACION : 28 DE ABRIL DE 1993

# **TOLERANCIA**

**ES EL GRADO DE REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS ANALITICOS OBTENIDOS POR EL ANALISIS DE LA MISMA MUESTRA BAJO MODIFICACIONES DE LAS CONDICIONES NORMALES DE OPERACION, TALES COMO DIFERENTES TEMPERATURAS, LOTES DE REACTIVOS, COLUMNAS, SISTEMAS DE ELUCION, TIPOS DE EMPAQUE (SOPORTE, FASE ESTACIONARIA, ETC.), CONDICIONES AMBIENTALES, ETC.**

**LAS MODIFICACIONES HECHAS A LAS CONDICIONES NORMALES DE OPERACION FUERON:**

- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA**
- TOLERANCIA DE EQUIPO A EQUIPO**

## ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

SE DETERMINO LA ESTABILIDAD DE LA MUESTRA REANALIZANDO LAS MUESTRAS YA PREPARADAS (COMO INDICA LA TECNICA ANALITICA) DEL LOTE DE REGAINE SOL. TOPICA AL 2 % MII0390 (APROBADO EL DIA 09-06-1993). Y LAS CONDICIONES FUERON:

- LOS REANALISIS FUERON EFECTUADOS POR EL MISMO ANALISTA.
- LAS CONDICIONES DE OPERACION Y CROMATOGRAFICAS FUERON LAS MISMAS (VER PAG. 64).
- LA VARIABLE QUE SE CONSIDERO PARA ESTE ANALISIS FUE EL TIEMPO, POR LO QUE LAS MUESTRAS YA PREPARADAS SE ALMACENARON A TEMPERATURA AMBIENTE POR 24 Y 48 HORAS, PARA POSTERIORMENTE SER REANALIZADAS.

### CRITERIO DE ACEPTACION

LA MUESTRA ES ESTABLE SI EL IC (INTERVALO DE CONFIANZA) PARA LA DIFERENCIA DE LA MEDIA DEL ANALISIS FINAL DE LA MUESTRA CON RESPECTO A LA MEDIA DEL ANALISIS INICIAL INCLUYE EL VALOR DE CERO Y/O LA MAGNITUD DEL EFECTO NO EXCEDA EL SIGUIENTE PORCENTAJE :

CROMATOGRAFICO  $\pm 2 \%$

ADEMAS DE QUE LA MEDIA DEL FACTOR I (VER PAG. 142) PARA CADA CONDICION (T.A.)/TIEMPO (24 Y 48 HRS) DEBERA CUMPLIR CON EL SIGUIENTE CRITERIO:

CROMATOGRAFICO VALOR DE  $\bar{T}$  98-102 %

## **TOLERANCIA DE EQUIPO A EQUIPO**

**EN ESTA PRUEBA LA MODIFICACION A LAS CONDI-  
CIONES NORMALES DE OPERACION FUE LA DE A--  
NALIZAR LAS MUESTRAS EN DOS EQUIPOS DIFEREN-  
TES.**

**LOS EQUIPOS UTILIZADOS PARA ESTA PRUEBA FUE-  
RON EL WATERS II (FREDDY, EL CUAL SE UTILIZO  
PARA TODA LA VALIDACION) Y EL WATERS III (TOM).**

## **CAPITULO IV. RESULTADOS**

COLUMNA:  $\mu$ -BONDAPAK C18

ANALISIS: DETERMINACION DE MINOXIDIL EN LA SOLUCION TOPICA AL 2 X

FECHA DE APERTURA: 22 DE MARZO DE 1993

Fecha	N (Platos Teoricos)	Analisis	Fecha de Lavado
22-03-1993	-----	Lote H2888	23-03-1993
9 y 10-03-1993	3201.0	Lote H2881	18-03-1993
24 y 25-03-1993	6876.3	Lote H2882	25-03-1993
13-04-1993	2277.1	Lote H2883	14-04-1993
15-04-1993	4363.0	Linealidad y Precision del Sistema I	16-04-1993
16-04-1993	3882.4	Linealidad y Precision del Sistema II	16 y 19-04-1993
19-04-1993	1398.0	Repetibilidad y Reproducibilidad I	20-04-1993
20-04-1993	1283.0	Repetibilidad y Reproducibilidad II	21-04-1993
21-04-1993	1283.0	Repetibilidad	21-04-1993
22 y 23-04-1993	887.1	Linealidad del Metodo y Exactitud al 100 X	27-04-1993
27-04-1993	782.5	Linealidad del Metodo I	27 y 28-04-1993
28-04-1993	1098.7	Exactitud al 100 X I	29-04-1993
29-04-1993	1282.9	Linealidad del Metodo II	30-04-1993
30-04-1993	1177.5	Exactitud al 100 X II	03-05-1993
10-05-1993	1328.0 y 1376.3	Estabilidad de la Muestra	19-05-1993
19-05-1993	1328.0 y 1376.3	Estabilidad de la Muestra	20-05-1993
20-05-1993	1592.0	Tolerancia Equipo TOM	20-05-1993
21-05-1993	1468.5	Estandares para Tolerancia	21-05-1993

NOTA: LA COLUMNA SE LAVARA CON AGUA CALIENTE (CON TEMPERATURA MENOR A 50 °C) DURANTE UNA HORA Y POSTERIORMENTE SE LE PASARA METANOL (PREVIAMENTE DEGASIFICADO) POR ESPACIO DE UNA HORA. EL TIEMPO DE LAVADO PUEDE MODIFICARSE, Y DEPENDE DEL USO QUE SE LE HAYA DADO A LA MISMA.

## ***Especificidad***

### ***RESULTADOS***

<i><b>AREA MTRA</b></i>	<i><b>AREA ST INT</b></i>	<i><b>RELACION AREAS MTRA/ ST INT</b></i>	<i><b>CONC. (MG/ML)</b></i>
<i><b>0</b></i>	<i><b>2785412</b></i>	<i><b>0</b></i>	<i><b>0</b></i>
<i><b>0</b></i>	<i><b>2786195</b></i>	<i><b>0</b></i>	<i><b>0</b></i>
<i><b>0</b></i>	<i><b>2792591</b></i>	<i><b>0</b></i>	<i><b>0</b></i>

***FECHA DE REALIZACION : 28 DE ABRIL DE 1993***

***EL PLACEBO PREPARADO PARA ESTA PRUEBA SE IDENTIFICO CON EL NUMERO 17***

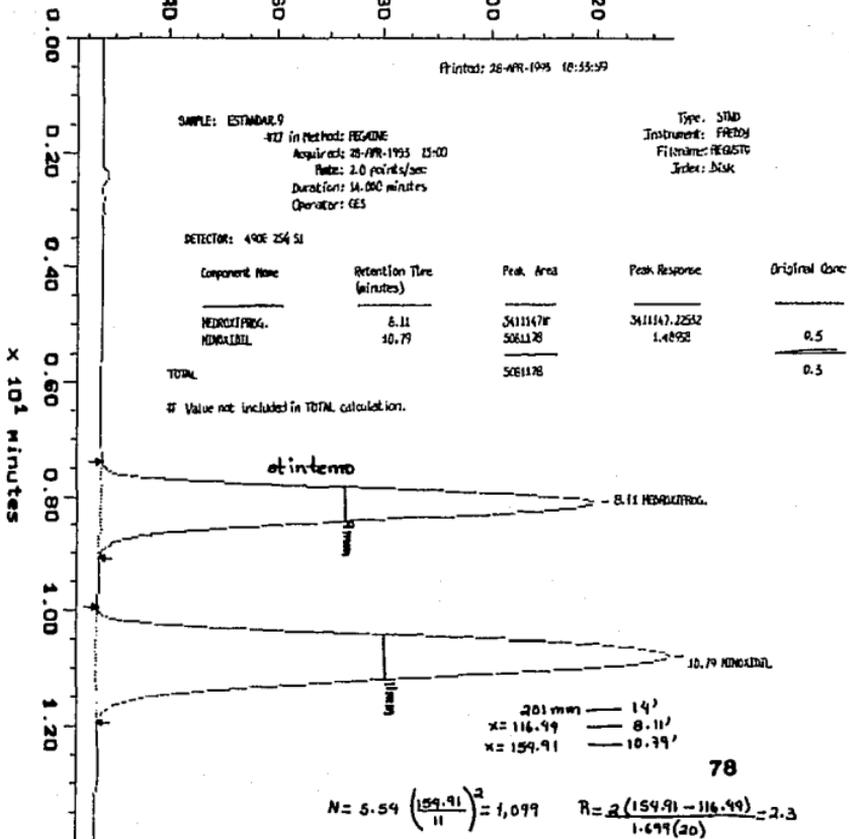
Sample: ESTANDAR.9 Channel: 490E 254 SI  
 Acquired: 28-APR-93 13:00 Method: E:\VIVA\LOGS\RESV

Filename: RESVTP  
 Operator: CES

$\times 10^{-1}$  volts

Especificidad

Estándar



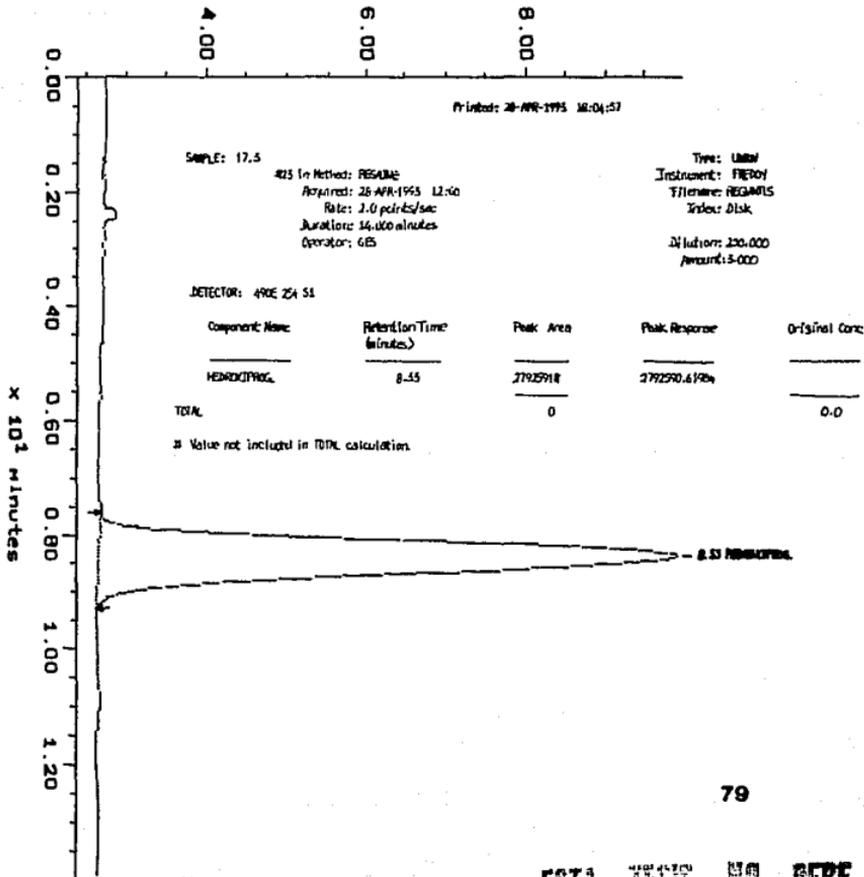
Sample: 17.3  
Acquired: 28-APR-93 12:00  
Dilution: 1 : 250.000

Channel: 490E 254 S1  
Method: C:\MSDCHEM\MSDCHEM  
Amount: 3.000

Filename: REGMNT15  
Operator: GES

**Especificidad  
Muestra**

$\times 10^{-2}$  volts



79

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

# LINEARIDAD DEL SISTEMA

## ADECUABILIDAD DIA UNO

AREA ST REF	AREA ST INT	RELACION AREAS ST REF/ST INT
4922270	3025341	1.62701
4919405	3025291	1.62609
4935607	3029765	1.62904
4920911	3033101	1.62240
4987767	3080112	1.61935
5052267	3118075	1.62032

PESO ST REF : 5.31 MG

X= 1.62404

ADICIONADOS : 20 ML ST INT

CV= 0.2 %

DE= 0.00391

# LINEARIDAD DEL SISTEMA

## ADECUABILIDAD DIA DOS

AREA ST REF	AREA ST INT	RELACION AREAS ST REF/ST INT
4671398	3032706	1.54034
4679079	3026930	1.54582
4707527	3040549	1.54825
4706278	3037050	1.54962
4699630	3037663	1.54712
4726332	3045080	1.55212
4725708	3044307	1.55231
4779270	3103249	1.54009
4741877	3065829	1.54669

PESO ST REF : 5.13 MG

X= 1.54693

ADICIONADOS : 20 ML ST INT

CV= 0.3 %

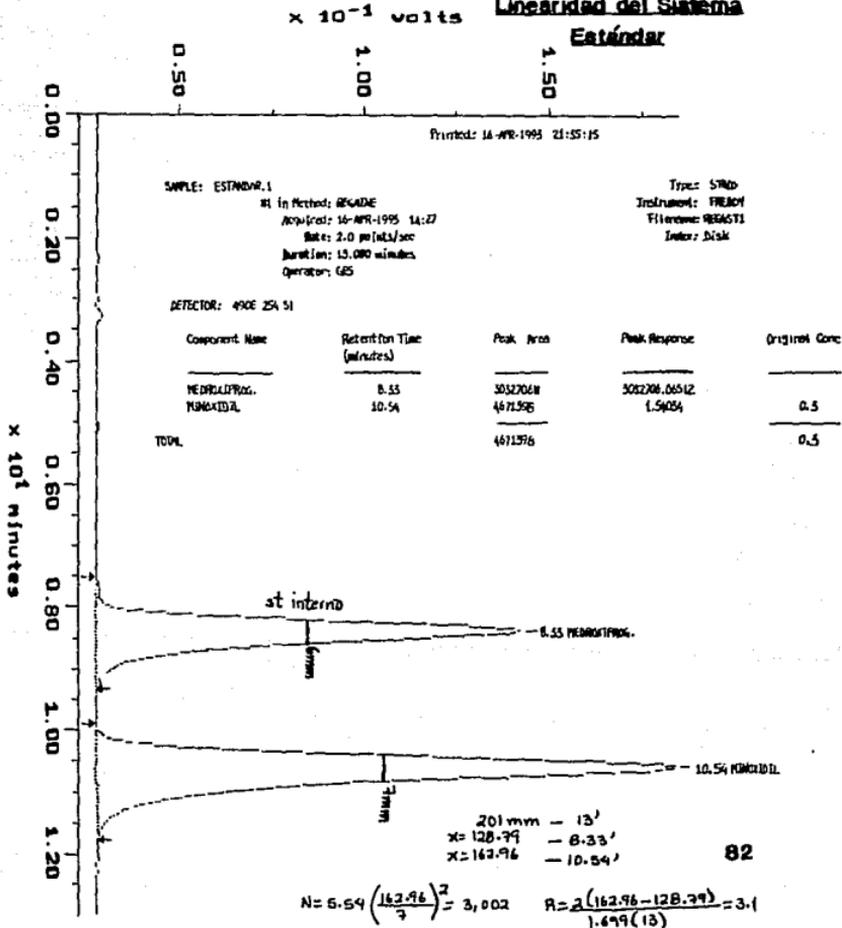
DE= 0.00442

Result = 5.13 mg/20 ml s<sup>-1</sup> . . .

Sample: ESTANDAR.1 Channel: 490E 25A 51  
 Acquired: 16-APR-95 14:27 Method: C:\MSDCHEM\REFCAL

Filename: RES6611 Operator: GES

**Linealidad del Sistema Estándar**



# LINEARIDAD DEL SISTEMA

## RESULTADOS DIA UNO

AREA MTRA	AREA ST INT	RELACION AREAS MTRA/ST INT
3700513	2728084	1.35645
3746379	2750196	1.36222
3792343	2717761	1.39539
3826406	2761293	1.38573
3912196	2750638	1.42229
3927485	2738731	1.43405
3998443	2724278	1.46771
4059067	2759348	1.47102
4099664	2743477	1.49433
4106735	2746792	1.49510

FECHA DE REALIZACION: 15 ABRIL 1993

# LINEARIDAD DEL SISTEMA

## RESULTADOS DIA DOS

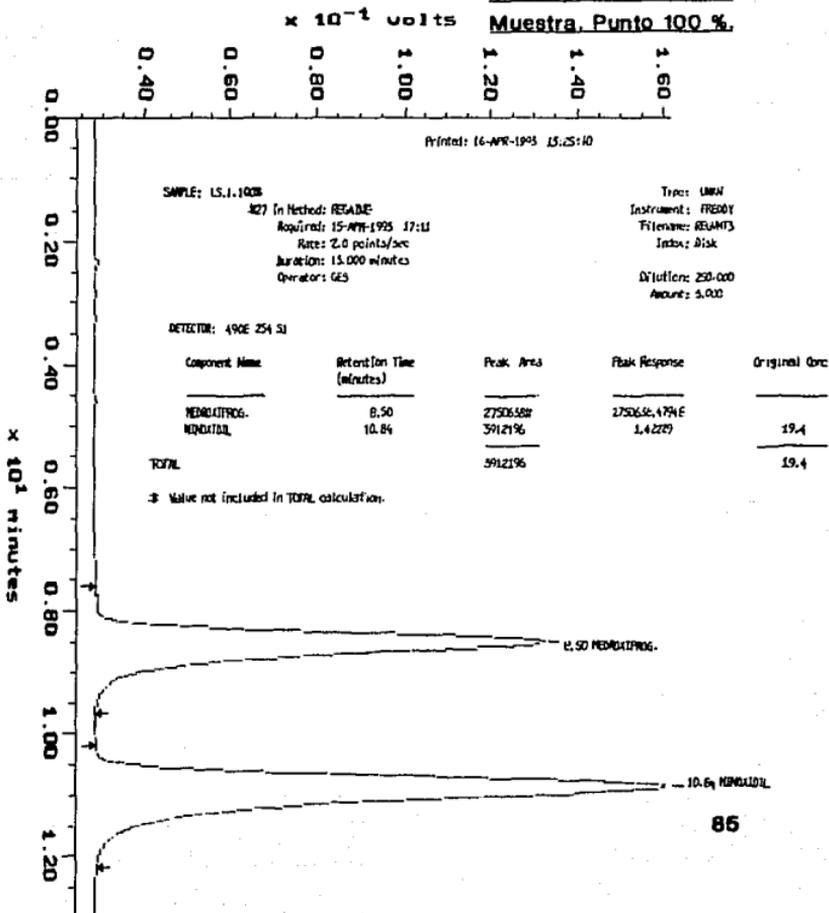
AREA MTRA	AREA ST INT	RELACION AREAS MTRA/ST INT
3635570	2732145	1.33067
3643105	2749660	1.32493
3711233	2734672	1.35710
3752913	2764327	1.35762
3843409	2734295	1.40563
3898295	2776574	1.40399
3917983	2727971	1.43623
3952245	2756973	1.43355
3994461	2718458	1.46939
4032405	2759680	1.46119

FECHA DE REALIZACION: 16 ABRIL 1993

Sample: LS.J.1008 Channel: 490E 254 SI  
 Acquired: 15-APR-93 17:11 Method: C:\MSA\DATA\VIEW  
 Dilution: 1 : 250.000 Assort: 3.000

Filename: REGA073  
 Operator: GES

Linealidad del Sistema  
Muestra, Punto 100 %



## **LINEARIDAD DEL SISTEMA**

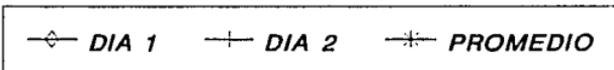
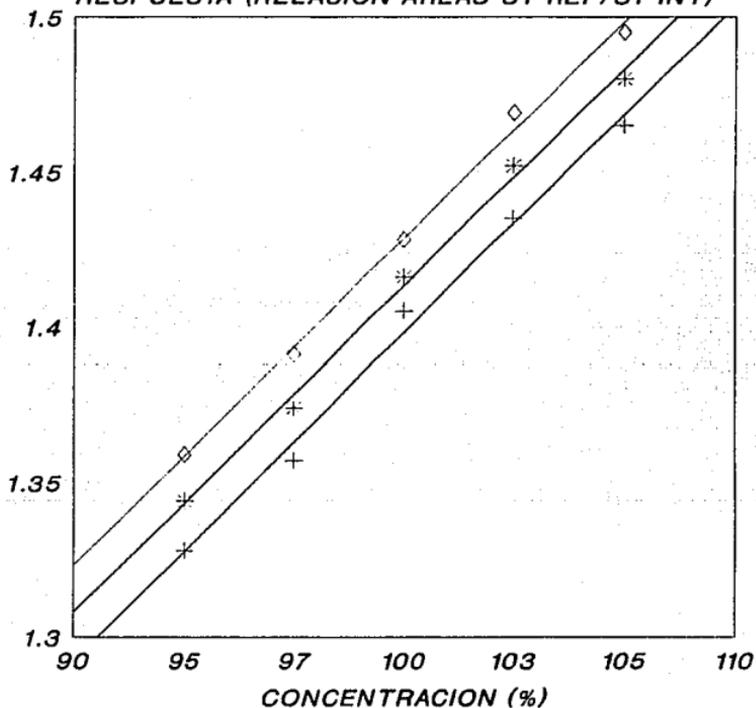
<b>LINEARIDAD I</b> <i>(DIA UNO)</i>		<b>LINEARIDAD II</b> <i>(DIA DOS)</i>	
<b>% ANALISIS</b>	<b>RESPUESTA</b>	<b>% ANALISIS</b>	<b>RESPUESTA</b>
95	1.35933	95	1.32780
97	1.39056	97	1.35736
100	1.42817	100	1.40481
103	1.46936	103	1.43489
105	1.49471	105	1.46529

<b>LINEARIDAD DEL SISTEMA</b> <i>(PROMEDIO DE LOS DOS DIAS)</i>	
<b>% ANALISIS</b>	<b>RESPUESTA</b>
95	1.34356
97	1.37396
100	1.41649
103	1.45212
105	1.48000

# LINEARIDAD DEL SISTEMA

## MINOXIDIL

RESPUESTA (RELACION AREAS ST REF/ST INT)



# LINEARIDAD DEL SISTEMA

## DATOS DE LA GRAFICA

- 1.-ORDENADA AL ORIGEN = 0.06517
- 2.-PENDIENTE = 0.01348
- 3.-COEFICIENTE DE CORRELACION = 0.99919
- 4.-COEFICIENTE DE DETERMINACION = 0.99839
- 5.-ERROR ESTANDAR DE REGRESION = 0.14359
- 6.-NUMERO DE DATOS = 5

## COEFICIENTE DE VARIACION

- 1.- 1.35933/ 95 = 0.01431
- 2.- 1.39056/ 97 = 0.01434
- 3.- 1.42817/100 = 0.01428
- 4.- 1.46936/103 = 0.01427
- 5.- 1.49471/105 = 0.01424
- 6.- 1.32780/ 95 = 0.01398
- 7.- 1.35736/ 97 = 0.01399
- 8.- 1.40481/100 = 0.01405
- 9.- 1.43489/103 = 0.01393
- 10.- 1.46529/105 = 0.01396

X = 0.01414  
DE = 0.00017  
CV = 1.2 %  
N = 10

# PRECISION DEL SISTEMA

## ADECUABILIDAD DIA UNO

AREA ST REF	AREA ST INT	RELACION AREAS ST REF/ST INT
4922270	3025341	1.62701
4919405	3025290	1.62609
4935607	3029769	1.62904
4920911	3033101	1.62240
4987767	3080112	1.61935
5052267	3118075	1.62032

PESO ST REF = 5.31 MG

X= 1.62404

ADICIONADOS = 20 ML ST INT

DE= 0.00391

CV= 0.2 %

# PRECISION DEL SISTEMA

## ADECUABILIDAD DIA DOS

AREA ST REF	AREA ST INT	RELACION AREAS ST REF/ST INT
4671398	3032706	1.54034
4679079	3026930	1.54582
4707527	3040549	1.54825
4706278	3037050	1.54962
4699630	3037663	1.54712
4726332	3045080	1.55212
4725708	3044307	1.55231
4779270	3103249	1.54009
4741877	3065829	1.54669

PESO ST REF = 5.13 MG

X = 1.54693

ADICIONADOS = 20 ML ST INT

DE = 0.00442

CV = 0.3 %

## PRECISION DEL SISTEMA

N°	ANALISIS (%)	CONC. (ML)	AREA MTRA	AREA ST INT	RELACION AREAS ST REF/ST INT
1	100	0.2400	3894561	2749900	1.41626
2	100	0.2400	3925430	2763465	1.42047
3	100	0.2400	3853071	2734848	1.40888
4	100	0.2400	3872256	2753552	1.40628
5	100	0.2400	3894037	2769426	1.40608
6	100	0.2400	3903105	2789538	1.39919

• NOTA: PREPARADAS CON LAS SOLUCIONES PATRON DE LA LINEARIDAD DEL SISTEMA CORRESPONDIENTES AL PUNTO DE EL 100 %.

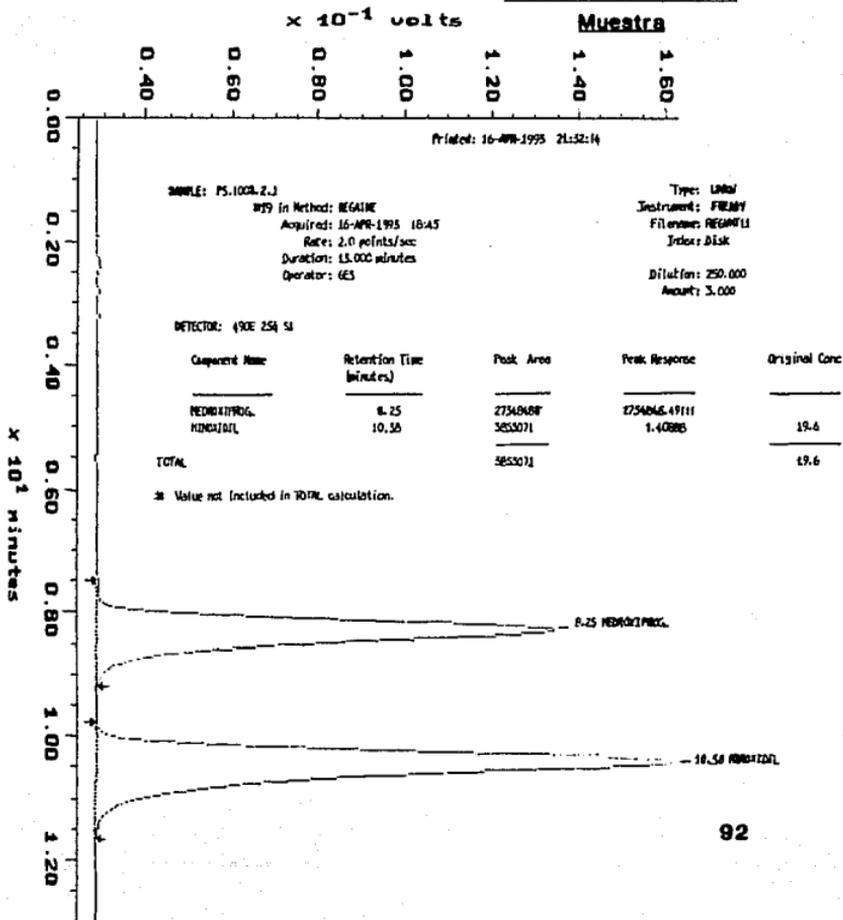
FECHA DE REALIZACION: 15 Y 16 DE ABRIL DE 1993

Sample: PS.100L2.J  
Acquired: 16-APR-95 16:15  
Dilution: 1 : 250.000

Channel: 490E 254 SI  
Method: C:\MSDCHEM\VEG\W  
Amount: 5.000

Filename: REGUM11  
Operator: 665

### Precisión del Sistema



# LINEARIDAD DEL METODO

## ADECUABILIDAD DIA UNO

AREA ST REF	AREA ST INT	RELACION AREAS ST REF/ST INT
4697810	3149211	1.49174
4698518	3158549	1.48756
4752314	3146149	1.51052
4732816	3182611	1.48709
4723164	3138181	1.50506
4776704	3176196	1.50391

PESO ST REF = 5.19 MG

X= 1.49765

ADICIONADOS = 20 ML ST INT

DE= 0.01008

CV= 0.7 %

# LINEARIDAD DEL METODO

## ADECUABILIDAD DIA DOS

AREA ST REF	AREA ST INT	RELACION AREAS ST REF/ST INT
4669876	3215450	1.45232
4680916	3212115	1.45727
4699402	3215908	1.46130
4688099	3215585	1.45793
4700878	3210621	1.46416
4720977	3238992	1.45755
4752430	3260739	1.45747
4787611	3281346	1.45904

PESO ST REF = 5.12 MG

X= 1.45838

ADICIONADOS = 20 ML ST INT

DE= 0.00342

CV= 0.2 %

Sample: ESTANBRLJ Channel: 490E 254 S1  
 Acquired: 20-APR-93 10:54 Method: C:\MSL\DATA\REGM

Filename: REGS7I  
 Operator: GES

Linealidad del Método

$\times 10^{-1}$  volts

Estándar

0.40 0.60 0.80 1.00 1.20



Printed: 20-APR-1993 9:56:22

SAMPLE: ESTANBRLJ

#1 In Method: REGADNE  
 Acquired: 20-APR-1993 10:54  
 Rate: 2.0 points/sec  
 Duration: 14.000 minutes  
 Operator: GES

Tree: STD  
 Instrument: FRENZY  
 Filename: REGS7I  
 Index: Disk

DETECTOR: 490E 254 S1

Component Name	Retention Time (minutes)	Peak Area	Peak Response	Original Conc
PERDUALTRBG	8.55	52154328	5215450.1262	
PERDUALTRJL	11.29	4669676	1.45232	0.5
TOTAL		4669676		0.5

#1 Value not included in TOTAL calculation.

st. interval

8.55 PERDUALTRBG

11.29 PERDUALTRJL

201 mm — 14'  
 $x = 119.88$  — 8.35'  
 $x = 162.09$  — 11.29'

95

$$N = 5.54 \left( \frac{162.09}{11} \right)^2 = 1,203$$

$$\bar{r} = \frac{2(162.09 - 119.88)}{1.699(20)} = 2.5$$

$\times 10^1$  minutes

**LINEARIDAD DEL METODO**  
**RESULTADOS DIA UNO**

<b>ANALISIS (%)</b>	<b>AREA MTRA</b>	<b>AREA ST INT</b>	<b>RELACION AREAS MTRA/ST INT</b>
95	3748974	2785788	1.34575
95	3743574	2820333	1.32735
95	3684652	2805583	1.31333
100	3888406	2766405	1.40558
100	3887724	2764528	1.40629
100	3884169	2788694	1.39283
105	4126100	2817765	1.46432
105	4108256	2818439	1.45764
105	4105716	2797824	1.46747

**FECHA DE REALIZACION: 27 ABRIL 1993**

**LINEARIDAD DEL METODO**  
**RESULTADOS DIA DOS**

<b>ANALISIS (%)</b>	<b>AREA MTRA</b>	<b>AREA ST INT</b>	<b>RELACION AREAS MTRA/ST INT</b>
95	3699889	2864564	1.29161
95	3718895	2878297	1.29205
95	3727997	2861560	1.30279
100	3946712	2919407	1.35189
100	3969505	2927315	1.35602
100	3895182	2852182	1.36568
105	4074529	2854992	1.42716
105	4080548	2806422	1.45400
105	4183121	2891590	1.44665

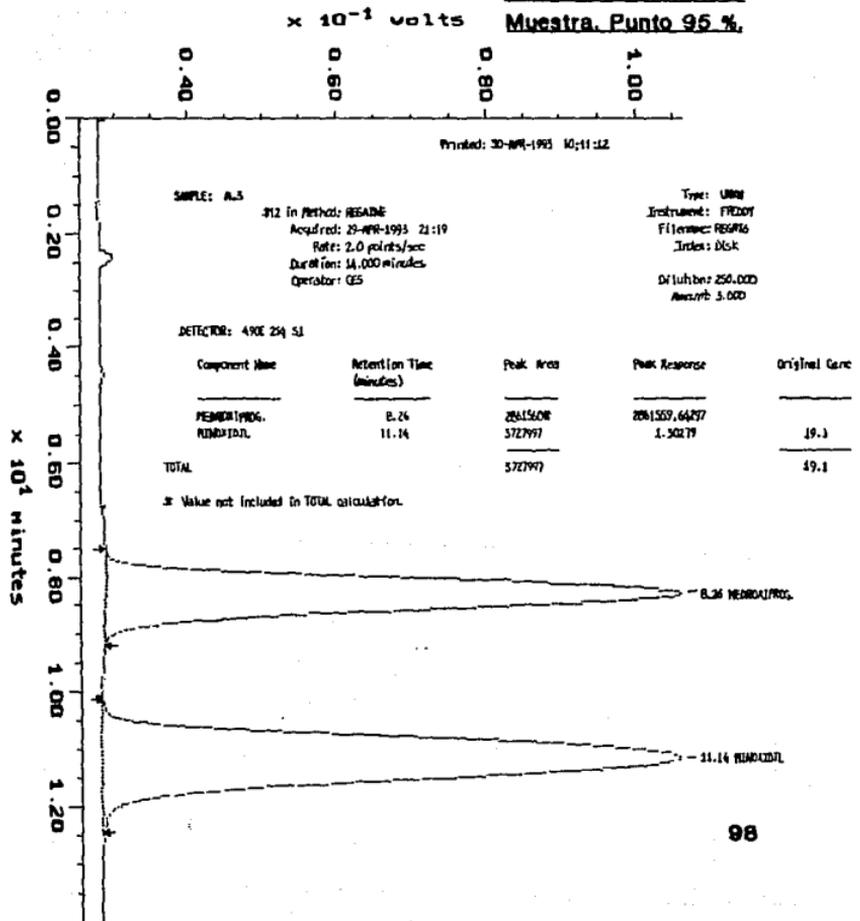
FECHA DE REALIZACION: 29 ABRIL 1993

Sample: A.5  
 Acquired: 29-APR-95 21:19  
 Dilution: 1 : 250.000

Channel: 490E 254 S1  
 Method: C:\MSDCHEM\RESAM  
 Amount: 5.000

Filename: RESAM6  
 Operator: CES

**Linealidad del Método**  
**Muestra. Punto 95 %.**



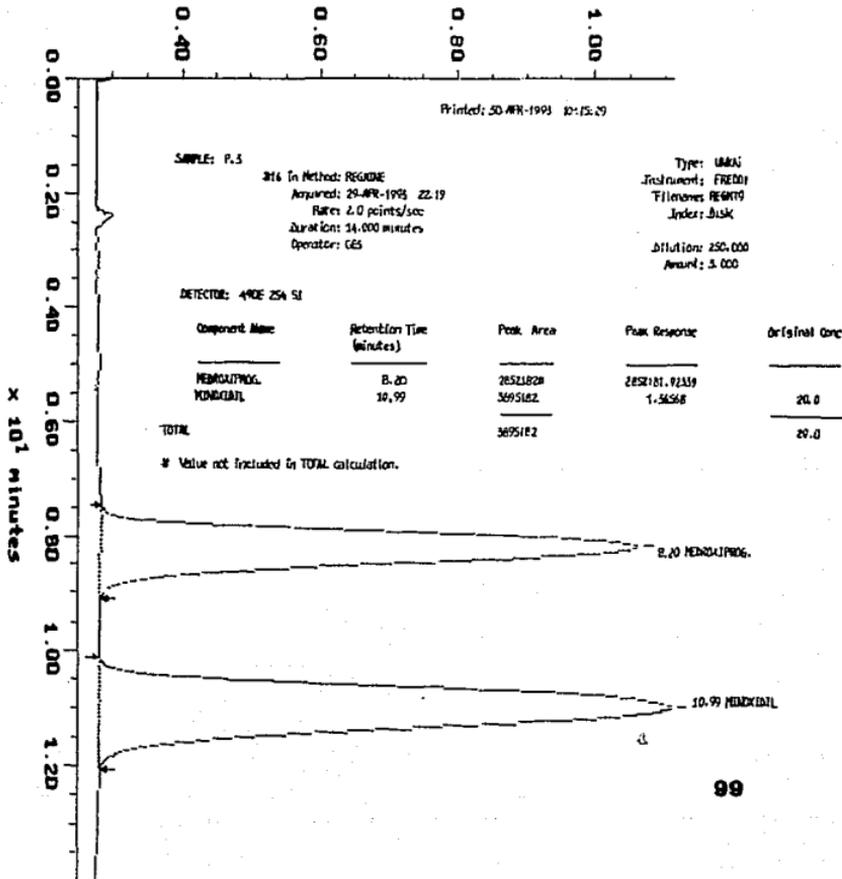
Sample: P.3  
Acquired: 29-APR-93 22:17  
Dilution: 1 : 250,000

Channel: 490E 254 SI  
Method: C:\VPL\DATA\MS61  
Amount: 3.000

Filename: REG019  
Operator: CES

Linealidad del Método  
Muestra. Punto 100 %.

$\times 10^{-1}$  volts

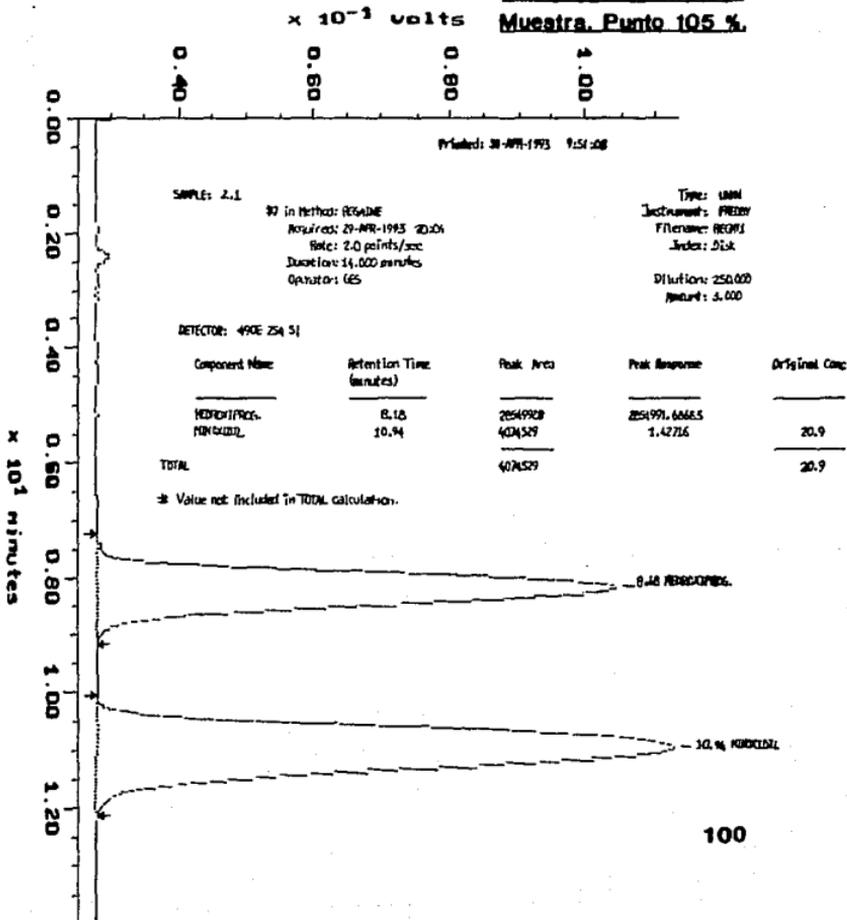


Sample: 2.1  
Acquired: 29-APR-83 20:04  
Dilution: 1 : 250.000

Channel: 490E ZSA S1  
Method: C:\MSL\DATA\REGU  
Amount: 3.000

Filename: REGU1  
Operator: GES

**Linealidad del Método**  
**Muestra. Punto 105 %.**



## LINEARIDAD DEL METODO

### RESULTADOS DIA UNO

ADICIONADO (%)	ADICIONADO (MG/ML)	RECUPERADO (%)	RECUPERADO (MG/ML)	RECOBRO (%)
93.7	18.74	96.5	19.3	103.0
93.7	18.74	95.5	19.1	101.9
93.7	18.74	94.5	18.9	100.8
99.0	19.80	101.5	20.3	102.5
99.0	19.80	101.0	20.2	102.0
99.0	19.80	100.0	20.0	101.0
103.7	20.74	105.0	21.0	101.2
103.7	20.74	104.5	20.9	100.8
103.7	20.74	106.0	21.2	102.2

DE LA COLUMNA DE RECOBRO:  $\bar{X} = 101.7 \%$

$DE = 0.79600$

$CV = 0.8 \%$

$S^2 = 0.63361$

**LINEARIDAD DEL METODO**  
**RESULTADOS DIA DOS**

<b>ADICIONADO (%)</b>	<b>ADICIONADO (MG/ML)</b>	<b>RECUPERADO (%)</b>	<b>RECUPERADO (MG/ML)</b>	<b>RECOBRO (%)</b>
93.76	18.75	94.5	18.9	100.8
93.76	18.75	94.5	18.9	100.8
93.76	18.75	95.5	19.1	101.8
98.71	19.74	99.0	19.8	100.3
98.71	19.74	99.0	19.8	100.3
98.71	19.74	100.0	20.0	101.3
103.94	20.79	104.5	20.9	100.5
103.94	20.79	106.5	21.3	102.5
103.94	20.79	106.0	21.2	102.0

DE LA COLUMNA DE RECOBRO:  $X = 101.1 \%$

$DE = 0.79861$

$CV = 0.8 \%$

$S^2 = 0.63778$

## **LINEARIDAD DEL METODO**

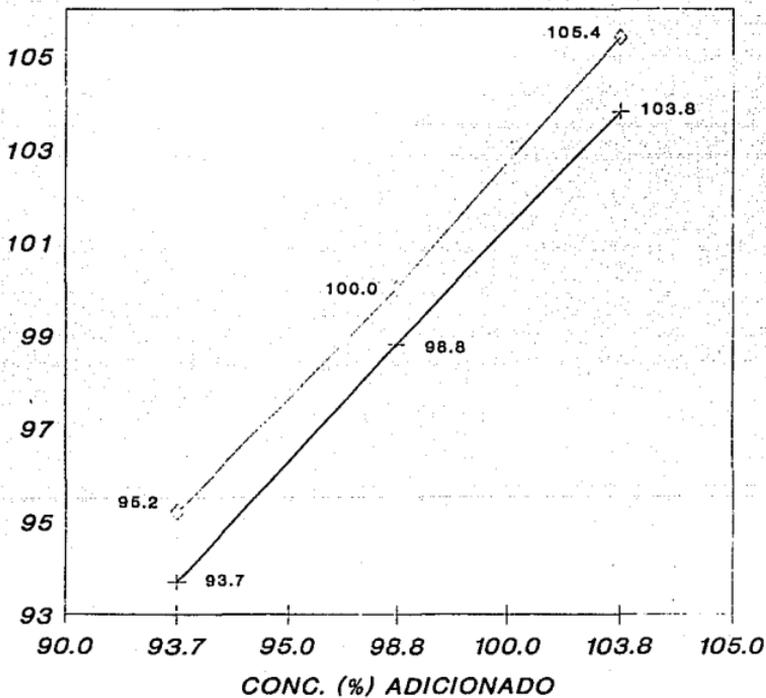
<b>LINEARIDAD I</b> <i>(DIA UNO)</i>		<b>LINEARIDAD II</b> <i>(DIA DOS)</i>	
<b>% ANALISIS</b>	<b>RESPUESTA</b>	<b>% ANALISIS</b>	<b>RESPUESTA</b>
93.70	95.5	93.76	94.8
99.00	100.8	98.71	99.3
103.70	105.2	103.94	105.7

<b>LINEARIDAD DEL SISTEMA</b> <i>(PROMEDIO DE LOS DOS DIAS)</i>	
<b>% ANALISIS</b>	<b>RESPUESTA</b>
93.7	95.2
98.8	100.0
103.8	105.4

# LINEARIDAD DEL METODO

MINOXIDIL

CONC. (%) RECUPERADO

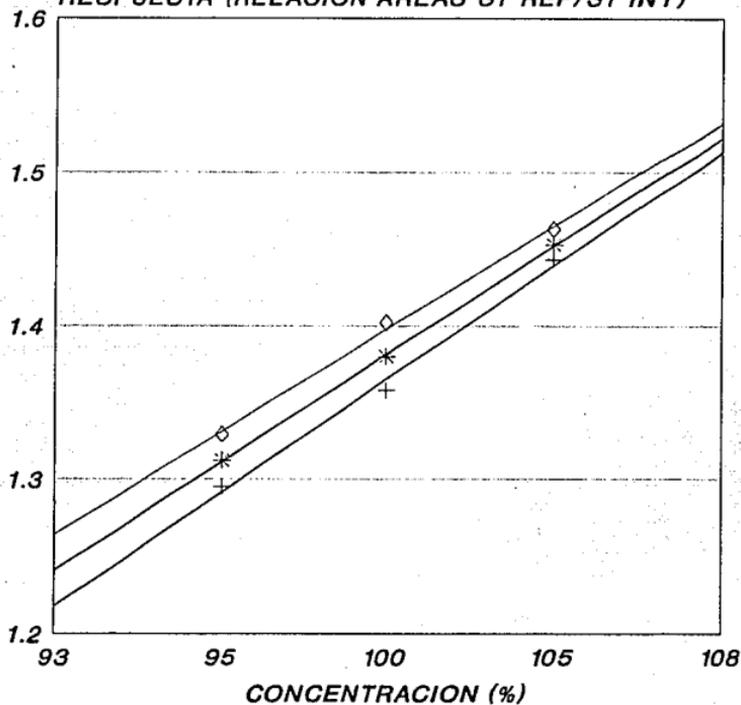


— EXPERIMENTAL    + TEORICO

# LINEARIDAD DEL METODO

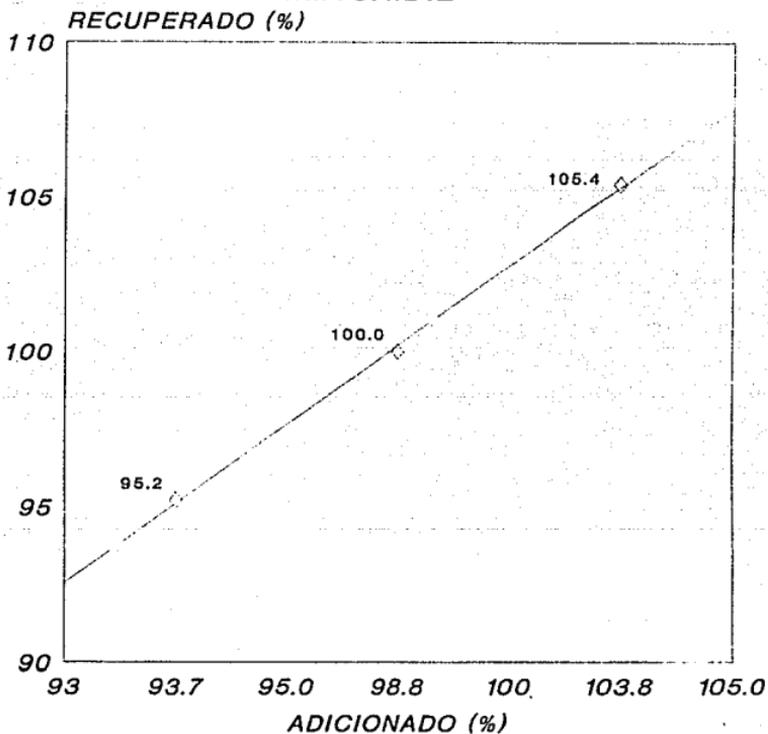
## MINOXIDIL

RESPUESTA (RELACION AREAS ST REF/ST INT)



# LINEARIDAD DEL METODO

## MINOXIDIL



—◇— PROMEDIO EXP.

# LINEARIDAD DEL METODO

## DATOS DE LA GRAFICA

- 1.-ORDENADA AL ORIGEN = 0.47807
- 2.-PENDIENTE = 1.00967
- 3.-COEFICIENTE DE CORRELACION = 0.99921
- 4.-COEFICIENTE DE DETERMINACION = 0.99840
- 5.-NUMERO DE DATOS = 3

## COEFICIENTE DE VARIACION

### PROMEDIO DE LOS DOS DIAS

- 1.- 101.9
- 2.- 101.3
- 3.- 101.3
- 4.- 101.4
- 5.- 101.1
- 6.- 101.1
- 7.- 100.8
- 8.- 101.6
- 9.- 102.1

X = 101.4 %  
DE = 0.40927  
CV = 0.4 %  
N = 9

# EXACTITUD AL 100%

## ADECUABILIDAD DIA UNO

AREA ST REF	AREA ST INT	RELACION AREAS ST REF/ST INT
4697810	3149211	1.49174
4698518	3158549	1.48756
4752314	3146149	1.51052
4732816	3182611	1.48709
4723164	3138181	1.50506
4776704	3176196	1.50391

PESO ST REF = 5.19 MG

X = 1.49765

ADICIONADOS = 20 ML ST INT

CV = 0.7 %

DE = 0.01008

# EXACTITUD AL 100 %

## ADECUABILIDAD DIA DOS

AREA ST REF	AREA ST INT	RELACION AREAS ST REF/ST INT
4669876	3215450	1.45232
4680916	3212115	1.45727
4699402	3215908	1.46130
4688099	3215585	1.45793
4700878	3210621	1.46416
4720977	3238992	1.45755
4752430	3260739	1.45747
4787611	3281346	1.45904

PESO ST REF = 5.12 MG

X= 1.45838

ADICIONADOS = 20 ML ST INT

DE= 0.00342

CV= 0.2 %

Sample: ESTADARLLI Channel: 4XDE Z54 SI  
 Acquired: 50-APR-93 17:52 Method: C:\PRO\DATA\REGM

Filename: REGSTL1  
 Operator: GES

**Exactitud al 100 %**

**Estándar**

$\times 10^{-1}$  units

0.40 0.60 0.80 1.00 1.20

0.00

0.20

0.40

0.60

0.80

1.00

1.20

Printed: 50-APR-1993 19:01:27

SAMPLE: ESTADARLLI  
 RM In Method: REGLINE  
 Acquired: 50-APR-1993 17:52  
 Rate: 2.0 points/sec  
 Duration: 14.000 minutes  
 Operator: GES

Type: STD  
 Instrument: FRENZY  
 Filename: REGSTL1  
 Index: 015K

DETECTOR: 4XDE Z54 SI

Component Name	Retention Time (minutes)	Peak Area	Peak Response	Original Conc
MEDROL/PROG.	8.25	54395498	343566.80501	
MANKIDIL	11.17	5259185	1.42057	0.5
TOTAL		5259185		0.5

\* Value not included in TOTAL calculation.

$\times 10^4$  minutes

st interval

8.25 MEDROL/PROG.

11.17 MANKIDIL

201 mm — 14'  
 $\pi = 118.88$  — 8.25'  
 $x = 160.37$  — 11.13'

110

$$N = 5.59 \left( \frac{160.37}{11} \right)^2 = 4,177$$

$$R = \frac{2(160.37 - 118.88)}{1.679(19.5)} = 0.5$$

**EXACTITUD AL 100 %****RESULTADOS DIA I**

<b>ANALISIS (%)</b>	<b>AREA MTRA</b>	<b>AREA ST INT</b>	<b>RELACION AREAS MTRA/ST INT</b>
100	3789564	2834363	1.33701
100	3835485	2838830	1.35108
100	3841272	2852979	1.34641
100	3926974	2859277	1.37341
100	3865460	2824826	1.36839
100	3858522	2826193	1.36527
100	3899229	2820144	1.38263
100	3896037	2827364	1.37797
100	3772807	2825881	1.33509
100	3831979	2828166	1.35493
100	3902137	2811860	1.38774
100	3895612	2823120	1.37990
100	3748817	2827045	1.32605
100	3872754	2811524	1.37746
100	3827100	2827646	1.35346
100	3952242	2809639	1.40667
100	3765673	2806469	1.34178
100	3969761	2828682	1.40340

**EXACTITUD AL 100 %  
RESULTADOS DIA DOS**

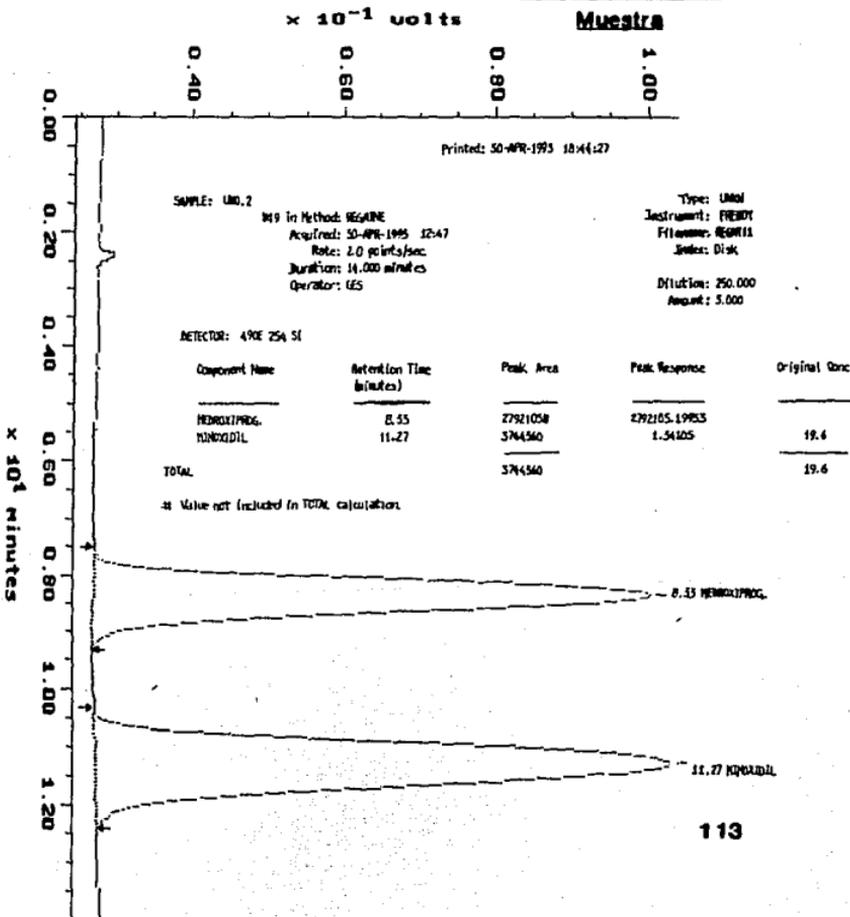
<b>ANALISIS (%)</b>	<b>AREA MTRA</b>	<b>AREA ST INT</b>	<b>RELACION AREAS MTRA/ST INT</b>
100	3707633	2792660	1.32763
100	3744360	2792105	1.34105
100	3737241	2807404	1.33121
100	3682297	2789110	1.32024
100	3703031	2827381	1.30970
100	3807296	2807496	1.35612
100	3868284	2836390	1.36381
100	3712164	2822257	1.31532
100	3873228	2830337	1.36847
100	3876612	2847466	1.36143
100	3802671	2841972	1.33804
100	3809662	2856854	1.33352
100	3844802	2857500	1.34551
100	3732891	2853293	1.30827
100	3827460	2841527	1.34697
• 100	3680843	2837309	1.29730
100	3905568	2862808	1.36424
100	3878736	2883158	1.34531

• ESTE DATO NO SE TOMO EN CUENTA PARA LOS CALCULOS

Sample: UMO.2 Channel: 490E 254 SI  
Acquired: 50-APR-95 12:47 Method: C:\MS\DATA\REGV  
Dilution: 1 : 250.000 Amount: 3.000

Filename: RESA011  
Operator: GES

**Exactitud al 100 %**



**EXACTITUD AL 100 %****RESULTADOS DIA I**

<b>ADICIONADO (%)</b>	<b>ADICIONADO (MG/ML)</b>	<b>RECUPERADO (%)</b>	<b>RECUPERADO (MG/ML)</b>	<b>RECOBRO (%)</b>
98.9	19.78	96.5	19.3	97.6
98.9	19.78	97.5	19.5	98.6
98.9	19.78	97.5	19.5	98.6
98.8	19.76	99.5	19.9	100.7
98.8	19.76	99.0	19.8	100.2
98.8	19.76	98.5	19.7	99.7
98.9	19.78	100.0	20.0	101.1
98.9	19.78	99.5	19.9	100.6
98.9	19.78	96.5	19.3	97.6
98.8	19.76	98.0	19.6	99.2
98.8	19.76	100.5	20.1	101.7
98.8	19.76	100.0	20.0	101.2
98.8	19.76	96.0	19.2	97.2
98.8	19.76	99.5	19.9	100.7
98.8	19.76	98.0	19.6	99.2
99.0	19.80	101.5	20.3	102.5
99.0	19.80	97.0	19.4	98.0
99.0	19.80	101.5	20.3	102.5

**EXACTITUD AL 100 %  
RESULTADOS DIA DOS**

<b>ADICIONADO (%)</b>	<b>ADICIONADO (MG/ML)</b>	<b>RECUPERADO (%)</b>	<b>RECUPERADO (MG/ML)</b>	<b>RECOBRO (%)</b>
98.8	19.76	97.0	19.4	98.2
98.8	19.76	98.0	19.6	99.2
98.8	19.76	97.0	19.4	98.2
98.7	19.74	96.5	19.3	97.8
98.7	19.74	95.5	19.1	96.7
98.7	19.74	98.5	19.7	99.8
98.8	19.76	99.5	19.9	100.7
98.8	19.76	96.0	19.2	97.2
98.8	19.76	100.0	20.0	101.2
98.9	19.78	99.5	19.9	100.6
98.9	19.78	97.5	19.5	98.6
98.9	19.78	97.5	19.5	98.6
98.9	19.78	98.5	19.7	99.6
98.9	19.78	95.5	19.1	96.6
98.9	19.78	98.0	19.6	99.1
99.9	19.98	94.0	18.8	.
99.9	19.98	99.5	19.9	99.6
99.9	19.98	98.5	19.7	98.6

**EXACTITUD AL 100 %  
RESULTADOS % DE RECOBRO**

**DIA UNO**

**VALOR MEDIO  $X = 99.8 \%$**

**DESVIACION ESTANDAR = 1.67220**

**COEFICIENTE DE VARIACION = 1.7 %**

**VARIANZA = 2.79625**

**NUMERO DE DATOS = 18**

**DIA DOS**

**VALOR MEDIO = 98.8 %**

**DESVIACION ESTANDAR = 1.34074**

**COEFICIENTE DE VARIACION = 1.3 %**

**VARIANZA = 1.79757**

**NUMERO DE DATOS = 17**

# PRECISION DEL METODO

## ADECUABILIDAD PARA REPETIBILIDAD

AREA ST REF	AREA ST INT	RELACION AREAS ST REF/ST INT
4727720	3042685	1.55380
4762507	3065634	1.55351
4761340	3043018	1.56468
4755108	3038939	1.55607
4747621	3051036	1.55607

ADECUABILIDAD PARA LOS DIAS UNO Y DOS

PESO ST REF = 5.22 MG

X= 1.55856

ADICIONADOS = 20 ML ST INT

DE= 0.00570

CV= 0.4 %

## REPETIBILIDAD

<i>ANALISIS Nº</i>	<i>AREA MTRA</i>	<i>AREA ST INT</i>	<i>RELACION AREAS MTRA/ST INT</i>
<i>1</i>	<i>3851554</i>	<i>2705778</i>	<i>1.42345</i>
<i>2</i>	<i>3935893</i>	<i>2742559</i>	<i>1.43512</i>
<i>3</i>	<i>3937024</i>	<i>2730716</i>	<i>1.44175</i>
<i>4</i>	<i>3857847</i>	<i>2699224</i>	<i>1.42924</i>
<i>5</i>	<i>3900006</i>	<i>2704001</i>	<i>1.44231</i>
<i>6</i>	<i>3850280</i>	<i>2705039</i>	<i>1.42337</i>

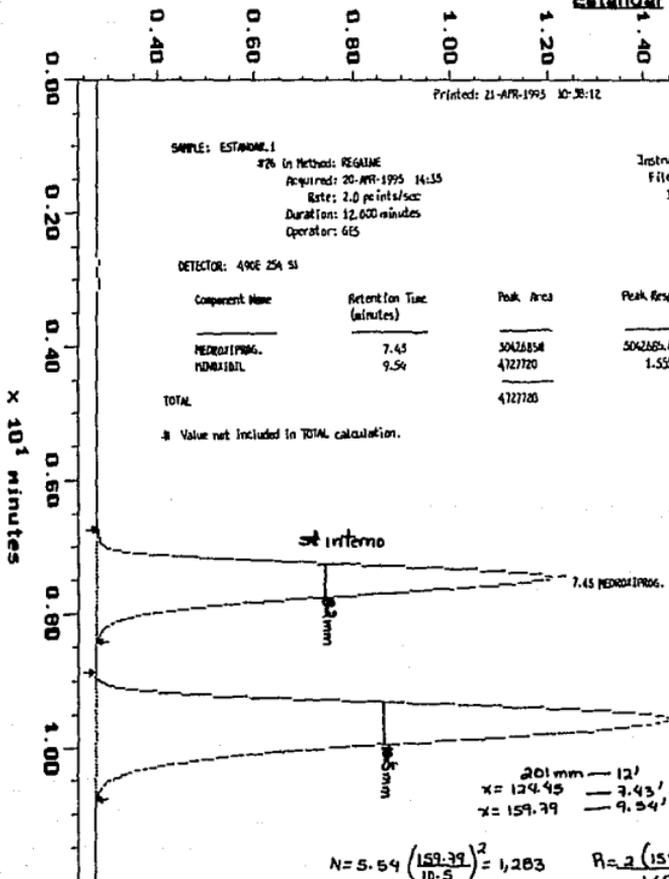
*FECHA DE REALIZACION 19 Y 21 ABRIL 1993*

Sample: ESTANDAR.1 Channel: 490E 25A SI  
 Acquired: 20-APR-95 14:55 Method: C:\VMS\UNID2\REG

Filename: REGSST1  
 Operator: GES

**Repetibilidad  
 Estándar**

$\times 10^{-1}$  volts



## REPETIBILIDAD

<b>ANALISIS Nº</b>	<b>RECUPERADO (MG/ML)</b>	<b>RECUPERADO (%)</b>
1	19.9	99.5
2	20.0	100.0
3	20.1	100.5
4	19.9	99.5
5	20.1	100.5
6	19.9	99.5

**RESULTADOS DE LA COLUMNA % RECUPERADO:**

**VALOR MEDIO= 99.9 %**

**COEFICIENTE DE VARIACION= 0.5 %**

**DESVIACION ESTANDAR= 0.49160**

**VARIANZA= 0.24167**

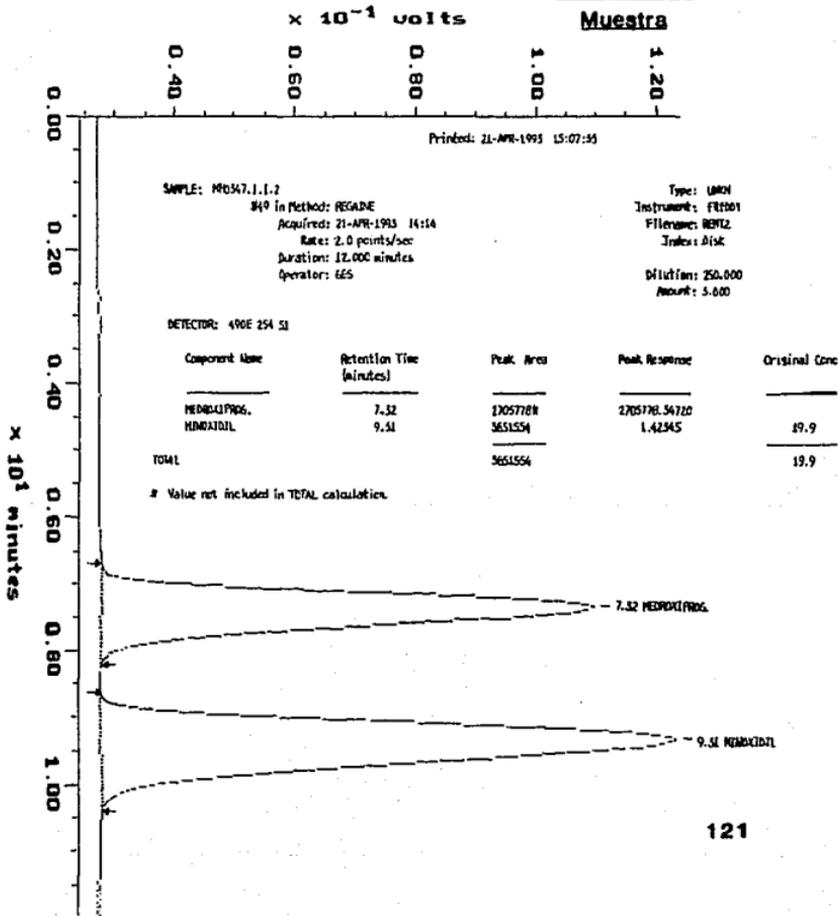
**NUMERO DE DATOS= 6**

Sample: M0547.1.1.2  
Acquired: 21-APR-95 14:14  
Dilution: 1 : 250.000

Channel: 490E 254 S1  
Method: C:\MSDCHEM\REGM  
Amount: 3.600

Filename: REPTZ  
Operator: GES

**Repetibilidad**  
**Muestra**



**PRECISION DEL METODO**  
**ADECUADIBILIDAD PARA REPRODUCIBILIDAD**

ANALISTA A DIAS UNO Y DOS

AREA ST REF	AREA ST INT	RELACION AREAS ST REF/ST INT
4727720	3042685	1.55380
4762507	3065634	1.55351
4761340	3043018	1.56468
4755108	3038939	1.55607
4747621	3051036	1.55607

PESO ST REF = 5.22 MG

X = 1.55856

ADICIONADOS = 20 ML ST INT

DE = 0.00570

CV = 0.4 %

# PRECISION DEL METODO

## ADECUABILIDAD PARA REPRODUCIBILIDAD

ANALISTA B DIA 1

AREA ST REF	AREA ST INT	RELACION AREAS ST REF/ST INT
4973910	3283598	1.51477
4948315	3256697	1.51943
5002302	3297175	1.51715
4964998	3281329	1.51311
4978692	3288310	1.51406
4951195	3288556	1.50558

PESO ST REF =  
5.11 MG  
ADICIONADOS =  
20 ML ST INT

X = 1.51402  
DE = 0.00473  
CV = 0.3 %

ANALISTA B DIA 2

AREA ST REF	AREA ST INT	RELACION AREAS ST REF/ST INT
4702195	3042389	1.54550
4737254	3079579	1.53828
4726004	3075141	1.53684
4762066	3070735	1.55079
4741045	3074064	1.54227

PESO ST REF =  
5.20 MG  
ADICIONADOS =  
20 ML ST INT

X = 1.54275  
DE = 0.00565  
CV = 0.4 %

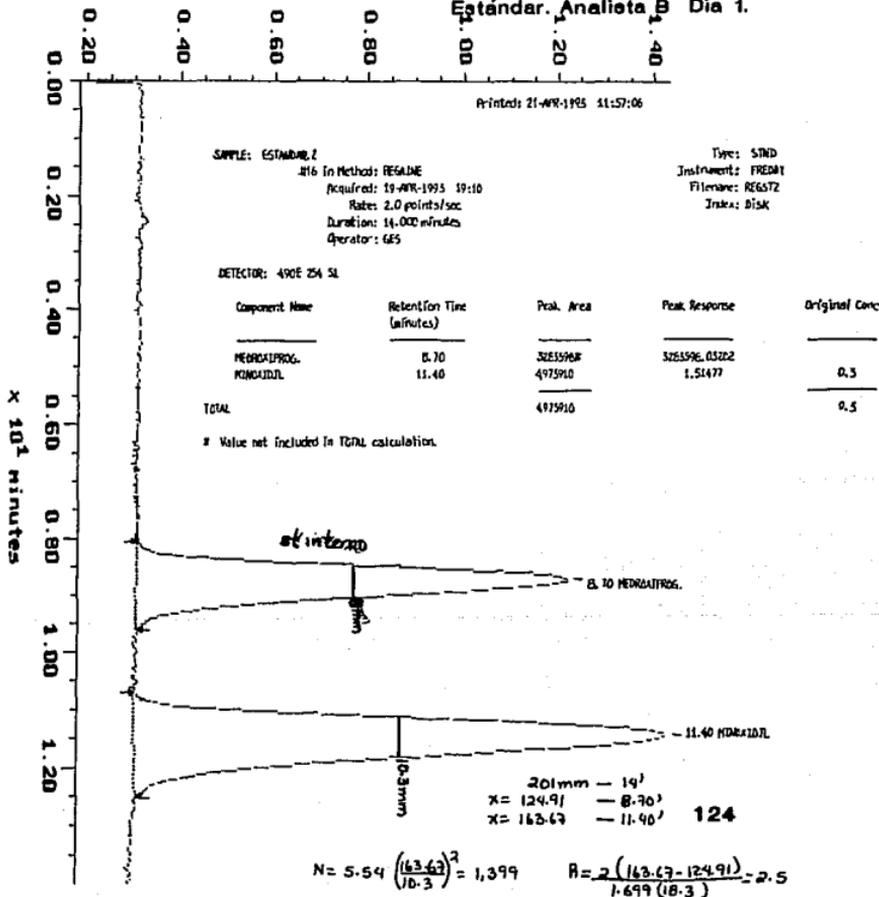
Sample: ESTANDARZ  
 Channel: 490E 254 SI  
 Acquired: 19-APR-95 19:10  
 Method: C:\VMS\DATA\REGV

Filename: REGS72  
 Operator: CES

$\times 10^{-1}$  volts

Reproducibilidad

Estándar. Analista B Dia 1.



**PRECISION DEL METODO  
REPRODUCIBILIDAD**

**RESULTADOS ANALISTA A DIA 1**

<b>AREA MTRA</b>	<b>AREA ST INT</b>	<b>RELACION AREAS MTRA/ST INT</b>	<b>RECUPERADO (MG/ML)</b>	<b>RECUPERADO (%)</b>
3851554	2705778	1.42345	19.9	99.5
3935893	2742559	1.43512	20.0	100.0
3937024	2730716	1.44175	20.1	100.5

**FECHA DE REALIZACION: 19 ABRIL 1993**

**RESULTADOS ANALISTA A DIA 2**

<b>AREA MTRA</b>	<b>AREA ST INT</b>	<b>RELACION AREAS MTRA/ST INT</b>	<b>RECUPERADO (MG/ML)</b>	<b>RECUPERADO (%)</b>
3857847	2699224	1.42924	19.9	99.5
3900006	2704001	1.44231	20.1	100.5
3850280	2705039	1.42337	19.9	99.5

**FECHA DE REALIZACION: 20 ABRIL 1993**

**PRECISION DEL METODO  
REPRODUCIBILIDAD**

**RESULTADOS ANALISTA B DIA 1**

<b>AREA MTRA</b>	<b>AREA ST INT</b>	<b>RELACION AREAS MTRA/ST INT</b>	<b>RECUPERADO (MG/ML)</b>	<b>RECUPERADO (%)</b>
3876596	2716110	1.42726	20.0	100.0
4169635	2899275	1.43816	20.2	101.0
4191273	2908200	1.44119	20.3	101.5

**FECHA DE REALIZACION: 19 ABRIL 1993**

**RESULTADOS ANALISTA B DIA 2**

<b>AREA MTRA</b>	<b>AREA ST INT</b>	<b>RELACION AREAS MTRA/ST INT</b>	<b>RECUPERADO (MG/ML)</b>	<b>RECUPERADO (%)</b>
3919063	2724539	1.43843	20.2	101.0
3908659	2732019	1.43069	20.1	100.5
3893114	2752284	1.41450	19.9	99.5

**FECHA DE REALIZACION: 20 ABRIL 1993**

Sample: M05A7.2.J  
Acquired: 20-APR-95 14:05  
Dilution: 1 : 250.000

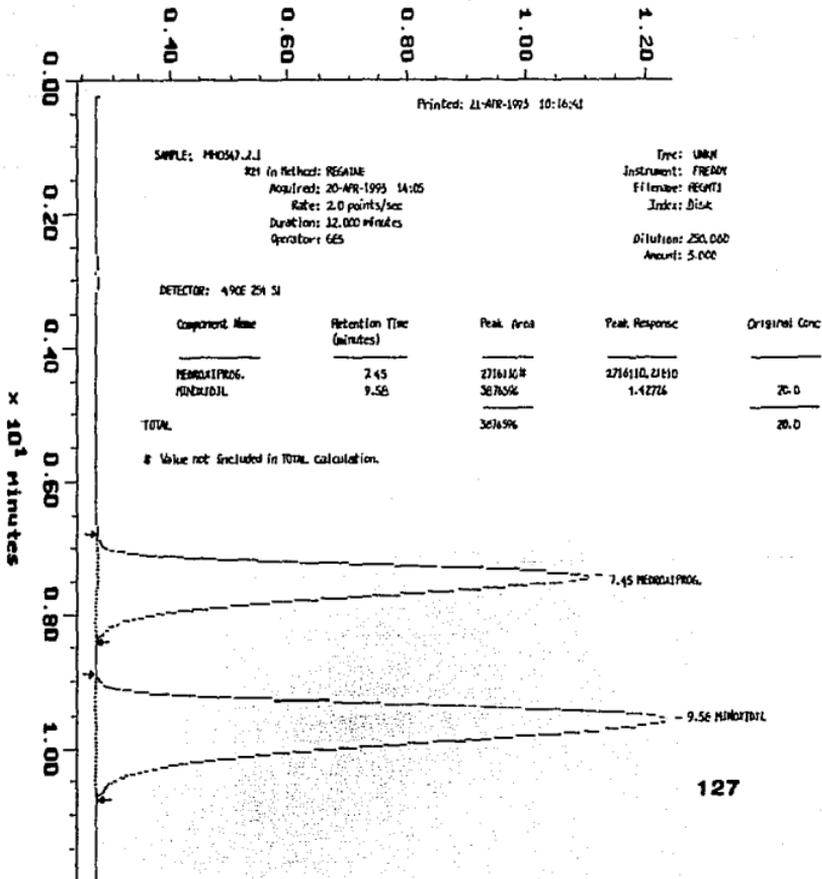
Channel: 490E 254 SI  
Method: C:\PROG1\DATA2\RES6V  
Amount: 5.000

Filename: REG001  
Operator: GES

### Reproducibilidad

Muestra. Analista B Dia 1.

$\times 10^{-1}$  volts



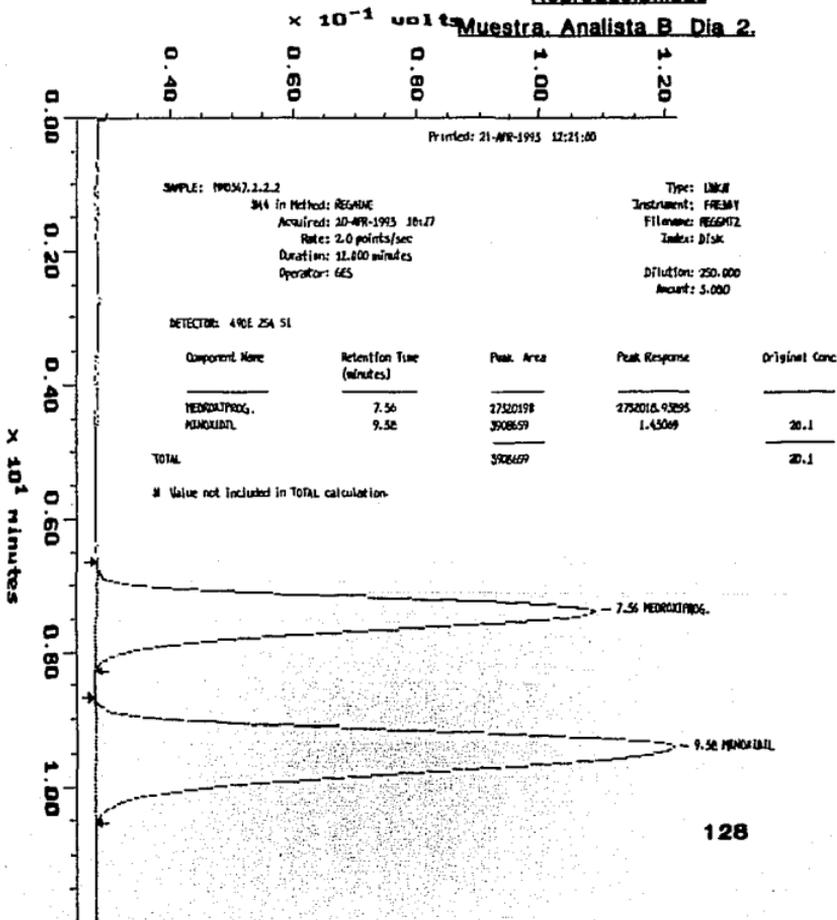
Sample: HPO317.2.2.2  
Acquired: 20-APR-93 18:27  
Dilution: 1 : 250.000

Channel: 490E ZSA S1  
Method: C:\PMW\DATA\ZRE6W  
Amount: 5.000

Filename: REG6972  
Operator: GES

### Reproducibilidad

Muestra: Analista B Dia 2.



# PRECISION DEL METODO

## REPRODUCIBILIDAD

		ANALISTA	
		A	B
D	1	99.5	100.0
		100.0	101.0
		100.5	101.5
I	2	99.5	101.0
		100.5	100.5
		99.5	99.5
A			

## ***PRECISION DEL METODO***

### ***REPRODUCIBILIDAD***

#### ***RESULTADOS:***

***VALOR MEDIO = 100.2 %***

***COEFICIENTE DE VARIACION = 0.7 %***

***DESVIACION ESTANDAR = 0.69085***

***VARIANZA = 0.47727***

***NUMERO DE DATOS = 12***

## ***Tolerancia***

### ***Estabilidad de la Muestra Analítica***

***Se refiere a la Estabilidad de la Muestra Analítica que se encuentra en solución lista para ser inyectada al Sistema de Inyección del Cromatógrafo.***

# TOLERANCIA

## ADECUABILIDAD

### ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

AREA ST REF	AREA ST INT	RELACION AREAS ST REF/ST INT
4827968	3169109	1.52345
4817745	3158798	1.52518
4817292	3158038	1.52541
4833075	3165052	1.52701
4813541	3159170	1.52367

PESO ST REF = 5.18 MG

X= 1.52494

ADICIONADOS = 20 ML ST INT

DE= 0.00145

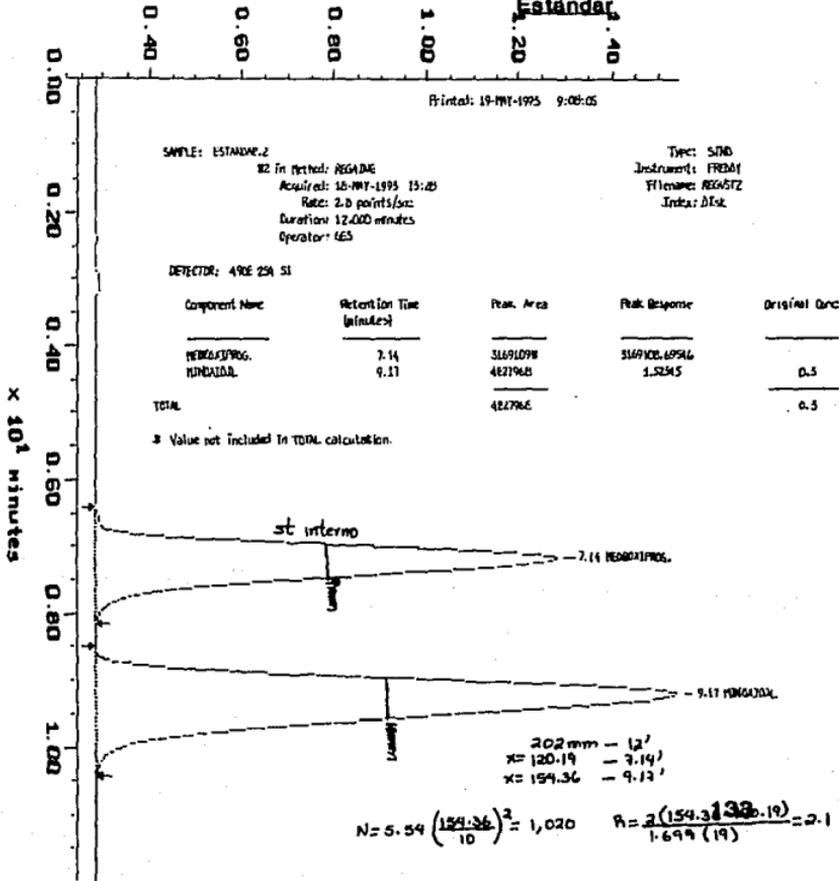
CV= 0.09 %

Sample: ESTANDAR.2 Channel: 490E 254 SI  
 Acquired: 16-MAY-1995 15:28 Method: C:\PM1\DATA2\REGM

Filename: REG512  
 Operator: GCS

$\times 10^{-1}$  Estabilidad de la Muestra Analítica

Estándar



# Tolerancia

## ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

TIEMPO ( 0 HRS )

MUESTRA Nº	AREA MTRA	AREA ST INT	RELACION AREAS MTRA/ST INT
1	3924797	2814471	1.39451
2	3965764	2816933	1.40783

TIEMPO ( 24 HRS )

MUESTRA Nº	AREA MTRA	AREA ST INT	RELACION AREAS MTRA/ST INT
1	3923948	2834645	1.38427
2	3970820	2840951	1.39771

TIEMPO ( 48 HRS )

MUESTRA Nº	AREA MTRA	AREA ST INT	RELACION AREAS MTRA/ST INT
1	3909579	2832501	1.38026
2	3966038	2849345	1.39191

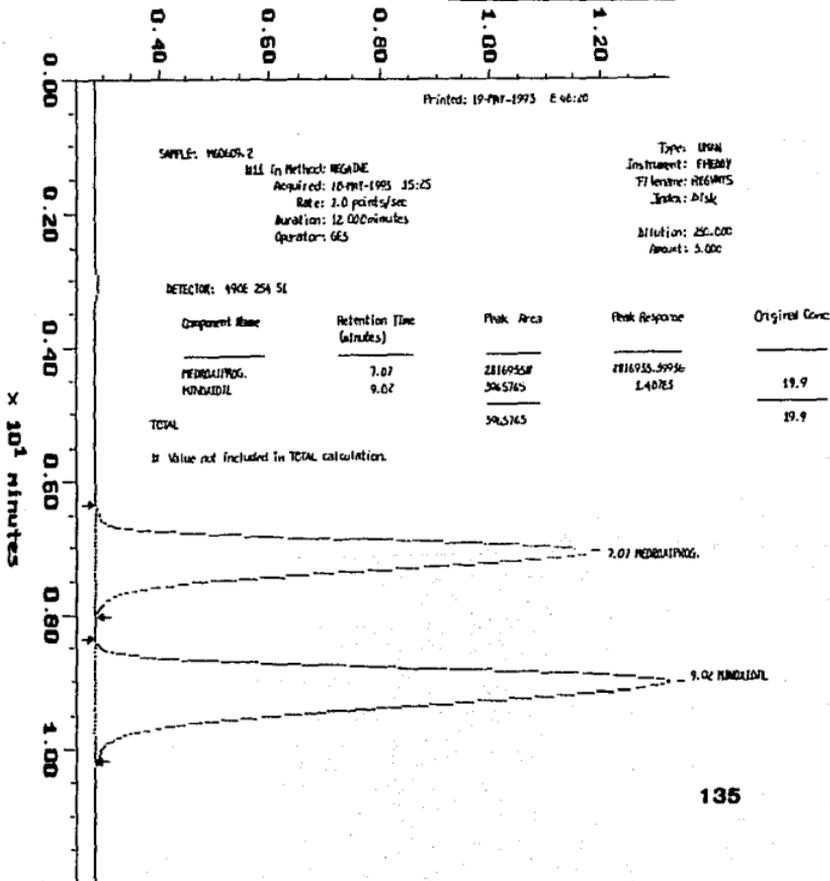
Sample: M6609.2 Channel: 4906 254 SI  
Acq/Inst: 18-PMY-45 15:25 Method: C:\PMU\DATA\REGAL  
Dilution: 1 : 250.000 Amount: 5.000

Filename: REGAL25  
Operator: GES

### Estabilidad de la Muestra Analítica

Muestra: T.A. / 0 hrs.

$\times 10^{-3}$  volts



Sample: M6069-2  
 Acquired: 19-MAR-95 12:55  
 Dilution: 1 : 250.000

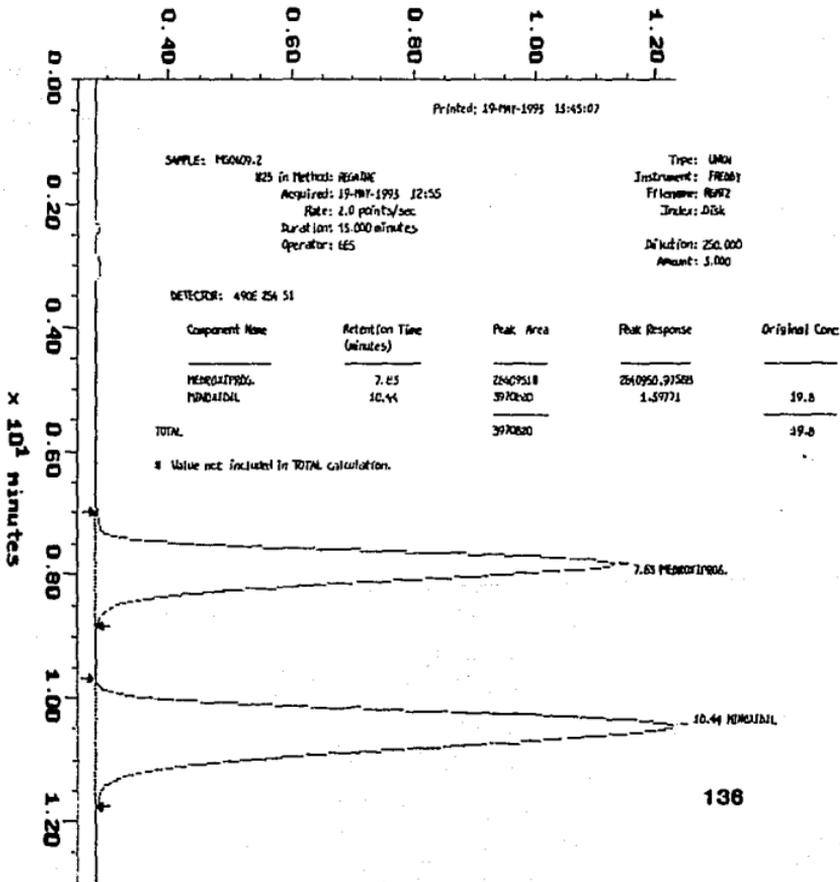
Channel: 49E 254 S1  
 Method: C:\MSDCHEM\MSDCHEM.M  
 Amount: 5.000

Filename: R6172  
 Operator: GES

**Estabilidad de la Muestra Analítica**

Muestra: T.A. / 24 hrs.

$\times 10^{-1}$  vol



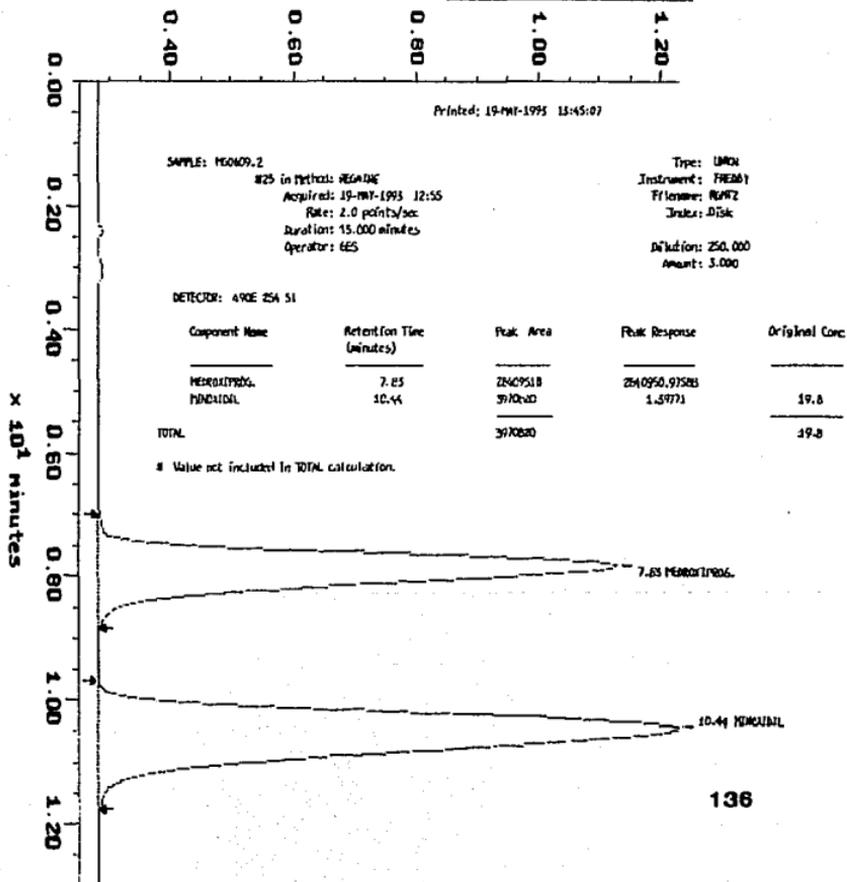
Sample: M6069.2  
Acquired: 19-MAY-93 12:55  
Dilution: 1 : 250.000

Channel: 4ROE 254 S1  
Method: C:\MSDCHEM\2\REGV  
Amount: 5.000

Filename: R6M72  
Operator: GES

### Estabilidad de la Muestra Analítica

Muestra: T.A./ 24 hrs.



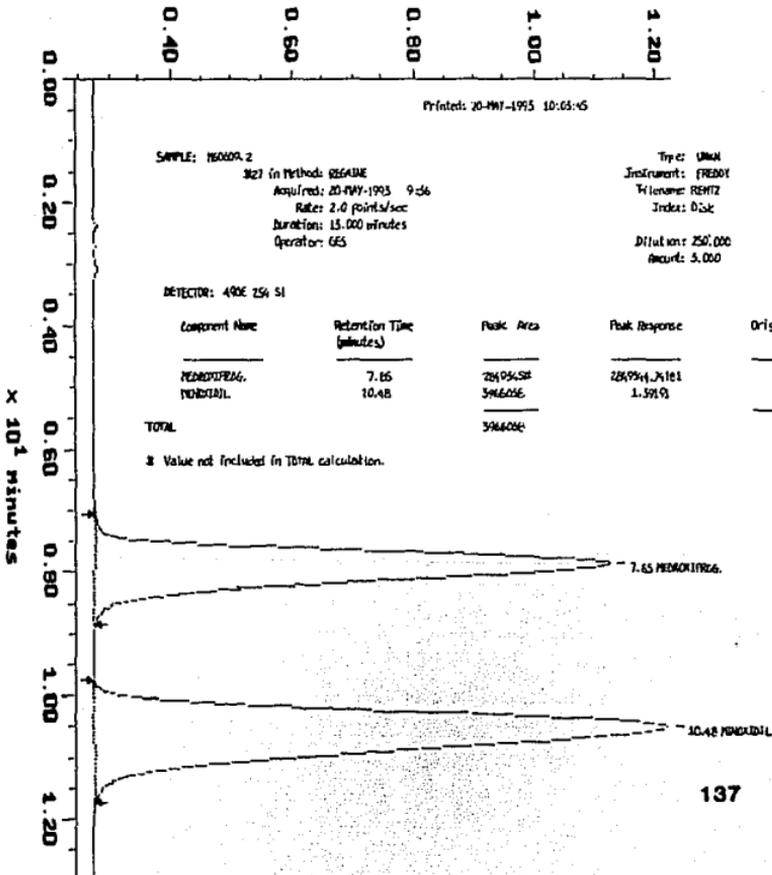
Sample: PE6049.2  
Acquired: 20-MAY-93 9:36  
Dilution: 1 : 250.000

Channel: 490E 254 S1  
Method: C:\VMS\INSTR\REGW  
Amount: 5.000

Filename: REN12  
Operator: GFS

### Estabilidad de la Muestra Analítica

$\times 10^{-1}$  vol Muestra, T.A./ 48 hrs.



# Tolerancia

## ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

### RESULTADOS % RECUPERADO

TIEMPO ( 0 HRS )

MUESTRA Nº	RELACION AREAS MTRA/ST INT	CONC. (MG/ML)	RECUPERADO (%)
1	1.39451	19.7	98.5
2	1.40783	19.9	99.5

TIEMPO ( 24 HRS )

MUESTRA Nº	RELACION AREAS MTRA/ST INT	CONC. (MG/ML)	RECUPERADO (%)
1	1.38428	19.6	98.0
2	1.39771	19.8	99.0

TIEMPO ( 48 HRS )

MUESTRA Nº	RELACION AREAS MTRA/ST INT	CONC. (MG/ML)	RECUPERADO (%)
1	1.38026	19.5	97.5
2	1.39191	19.7	98.5

# Tolerancia

## ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

TIEMPO	0 HRS	24 HRS	48 HRS
MUESTRA N°	RECUPERADO (%)	RECUPERADO (%)	RECUPERADO (%)
1	98.5	98.0	97.5
2	99.5	99.0	98.5

COMO PODEMOS OBSERVAR EL % RECUPERADO EN EL TIEMPO ( 0 ) VA DISMINUYENDO CONFORME TRANSCURREN LAS HORAS, ESTO NOS INDICA QUE LA MUESTRA A TEMPERATURA AMBIENTE ( TOMANDO EN CUENTA QUE DICHA MUESTRA SE ENCUENTRA EN FASE MOVIL CUYO pH ES DE 3.0) NO ES MUY ESTABLE PERO REALIZANDO LOS CALCULOS DE LA  $t$  DE DUNET VEREMOS SI ESTO AFECTA EL ANALISIS (AUN TRANSCURRIDAS ESAS HORAS DESPUES DE PREPARADA LA MUESTRA).

# Tolerancia

## ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

	INICIAL	1	2
	98.5	98.0	97.5
	99.5	98.0	98.5
MEDIA	99.0	98.5	98.0
VARIANZA	0.50	0.50	0.50

VARIANZAS PONDERADAS:

$$Sp1 = \frac{2(0.50) + 2(0.50)}{2(2+1)} = 0.33$$

$$Sp2 = \frac{2(0.50) + 2(0.50)}{2(2+1)} = 0.33$$

PARA T A / 24 HRS.

$$IC = (98.5 - 99.0) \pm 2.86 \sqrt{0.33 \frac{2}{3}}$$

$$IC = -1.84146 \text{ a } 0.84146$$

POR LO TANTO LA MUESTRA ES ESTABLE YA QUE EL IC INCLUYE EL VALOR DE CERO

# **Tolerancia**

## **ESTABILIDAD DE LA MUESTRA**

**PARA T.A / 48 HRS**

$$IC = (98.0-99.0) \pm 2.86 \sqrt{0.33 \frac{2}{3}}$$

$$IC = -2.14346 \text{ a } 0.34146$$

**POR LO TANTO LA MUESTRA ES ESTABLE YA QUE  
EN EL IC SE INCLUYE EL VALOR DE CERO.**

# Tolerancia

## ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

### CALCULOS PARA EL FACTOR I

$$I = \frac{98.0}{99.0} \times 100 = 99.5$$

$$I = \frac{99.0}{99.5} \times 100 = 99.5$$

$$\bar{I} = \frac{99.5 + 99.5}{2} = 99.5$$

LA MUESTRA ES ESTABLE A CONDICIONES AMBIENTALES POR 24 HRS YA QUE EL VALOR DE LA MEDIA PARA EL FACTOR I SE ENCUENTRA ENTRE 98-102 %.

# Tolerancia

## ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

### CALCULOS PARA EL FACTOR I

$$I = \frac{97.5}{98.5} \times 100 = 99.0$$

$$I = \frac{98.5}{99.5} \times 100 = 99.0$$

$$\bar{I} = \frac{99.0 + 99.0}{2} = 99.0$$

LA MUESTRA ES ESTABLE A CONDICIONES AMBIENTALES POR 48 HRS YA QUE EL VALOR DE LA MEDIA PARA EL FACTOR I SE ENCUENTRA ENTRE 98-102 %.

TOMANDO EN CUENTA TODOS LOS CALCULOS TENEMOS QUE:

$$CV = 0.3 \%$$

$$X = 99.2 \%$$

# TOLERANCIA

## ADECUABILIDAD DE TOLERANCIA

AREA ST REF	AREA ST INT	RELACION AREAS ST REF/ST INT
4827968	3169109	1.52345
4817745	3158798	1.52518
4817292	3158038	1.52541
4833075	3165052	1.52701
4813541	3159170	1.52367

PESO ST REF = 5.18 MG

X= 1.52494

ADICIONADOS = 20 ML ST INT

DE= 0.00145

EQUIPO : WATERS II (FREDDY)

CV= 0.09 %

AREA ST REF	AREA ST INT	RELACION AREAS ST REF/ST INT
5272480	3183743	1.65606
5260541	3172150	1.65835
5272274	3179538	1.65819
5267973	3175121	1.65914
5288712	3180005	1.66311

PESO ST REF = 5.28 MG

X= 1.65897

ADICIONADOS = 20 ML ST INT

DE= 0.00258

EQUIPO : WATERS III (TOM)

CV= 0.1 %

## TOLERANCIA

### RESULTADOS EQUIPO FREDDY

AREA MTRA	AREA ST INT	RELACION AREAS MTRA/ST INT	CONC. (MG/ML)	RECUPERADO (%)
3924797	2814471	1.39451	19.7	98.5
3965765	2816933	1.40783	19.9	99.5

### RESULTADOS EQUIPO TOM

AREA MTRA	AREA ST INT	RELACION AREAS MTRA/ST INT	CONC. (MG/ML)	RECUPERADO (%)
4203537	2799705	1.50142	19.9	99.5
4237002	2790978	1.51811	20.1	100.5

### PROMEDIOS

EQUIPO FREDDY

X = 99.0 %

EQUIPO TOM

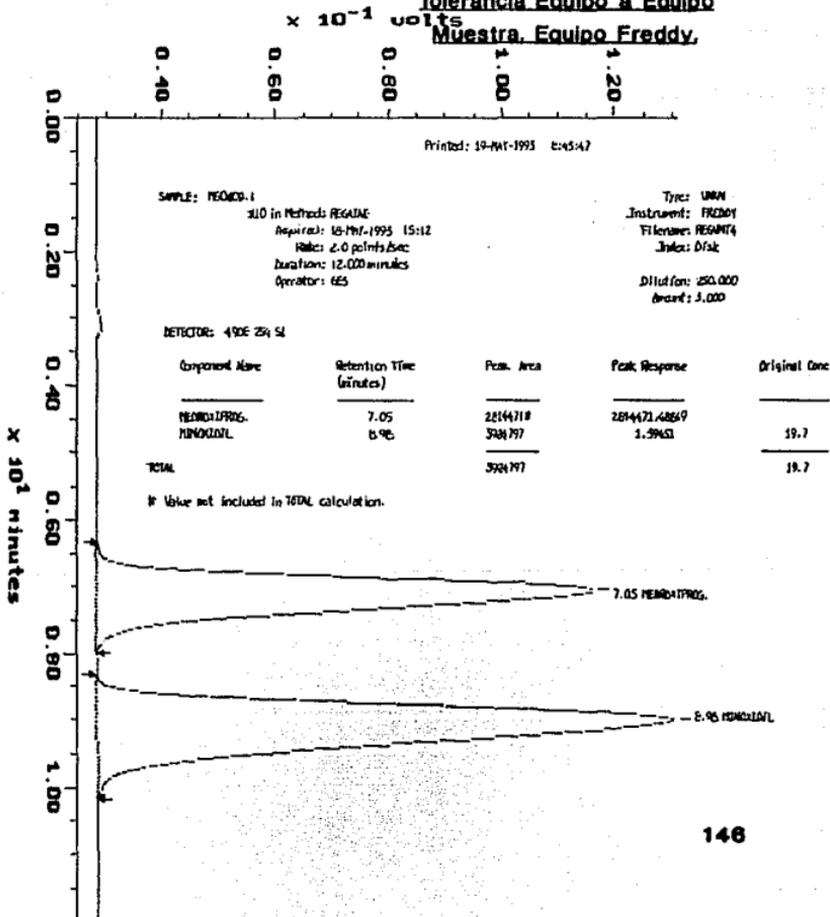
X = 100.0 %

Sample: ME6609.1  
Required: 18-MAY-93 15:12  
Dilution: 1 : 250,000

Channel: 490E 254 S1  
Method: C:\MSDCHEM\AD2050\  
Amount: 5.000

Tiername: REGM74  
Operator: GES

Tolerancia Equipo a Equipo  
Muestra: Equipo Freddy.



Sample: ESPANAME.8  
 Acquired: 21-May-93 11:35

Channel: 486 254 SS  
 Method: C:\PROTON\11182

Filename: REG578  
 Operator: JRP

$\times 10^{-1}$  Tolerancia Equipo a Equipo

Estándar

0.40 0.60 0.80 1.00 1.20 1.40

Printed: 21-May-1993 15:56:42

SAMPLE: ESPANAME.8  
 IR2 In Method: REG578  
 Acquired: 21-May-1993 11:35  
 Rate: 2.0 points/sec  
 Duration: 15.000 minutes  
 Operator: JRP

Type: STD  
 Instrument: TOM  
 Filename: REG578  
 Index: 0184

DETECTOR: 420 254ms L

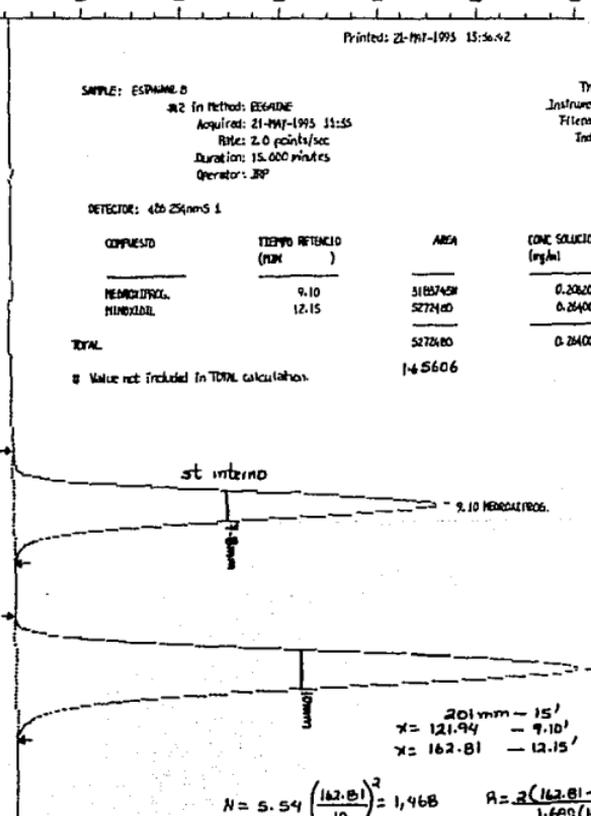
COMPUESTO	TIEMPO RETENCION (MIN)	AREA	(CONC. SOLUCION (ng/ml))	(CONC. ORIGINAL (ng/ml))
MERCAPTOFENOL	9.10	5183745H	0.28200	0.5
MINDOXIL	12.15	527240D	0.28400	0.5
TOTAL		527240D	0.28400	0.5

# Value not included in TOTAL calculations.

145606

$\times 10^4$  Minutes

0.00  
0.20  
0.40  
0.60  
0.80  
1.00  
1.20  
1.40



$$x = \frac{201mm - 15'}{121.94 - 9.10}$$

$$x = \frac{162.81 - 12.15}{1.699(17.8)} = 2.7$$

$$N = 5.54 \left( \frac{162.81}{10} \right)^2 = 1,468$$

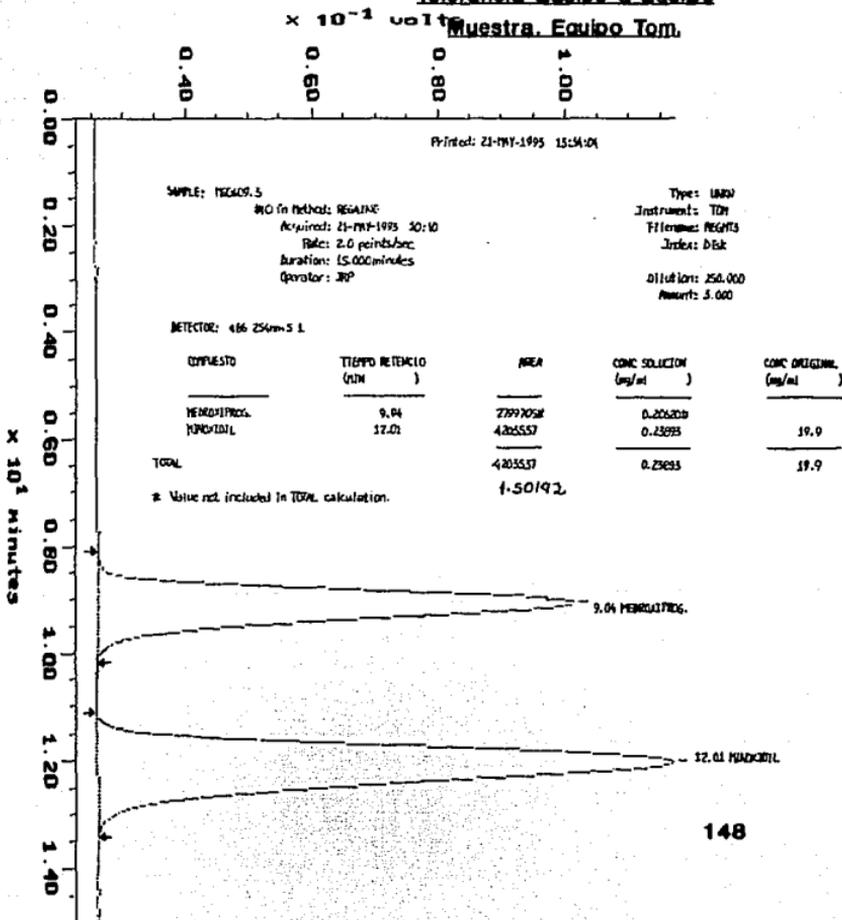
$$R = \frac{2(162.81 - 121.94)}{1.699(17.8)} = 2.7$$

Sample: NEG609.5  
Acquired: 21-NOV-95 10:10  
Dilution: 1 s 250.000

Channel: 444 254 3.1  
Method: C:\VPRO\DATA\1\NEG  
Amount: 5.000

Filename: NEG609.5  
Operator: JRP

Tolerancia Equipo a Equipo  
Muestra: Equipo Tom.



## **CAPITULO V. CONCLUSIONES Y BIBLIOGRAFIA**

## CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en cada uno de los parámetros desarrollados en la Validación y comparándolos con la bibliografía puede concluirse que la Técnica Analítica para cuantificar Minoxidil en la solución tópica por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) es :

- Lineal. Ya que observando los resultados obtenidos podemos constatar que cumplen con los requisitos de ordenada al origen (b) aproximadamente 0, pendiente (m) aproximadamente 1, coeficiente de correlación (r) mayor o igual a 0.99, coeficiente de determinación ( $r^2$ ) mayor o igual que 0.98; tanto en las gráficas de Linearidad del Sistema como la de Linearidad del Método.

En cuanto al Coeficiente de Variación de la Linearidad del Sistema y al Coeficiente de Variación de la Linearidad del Método, los resultados obtenidos fueron menores a las especificaciones adoptadas para este trabajo (1.5 % y 2.0 % respectivamente) y el Promedio de Recobro se encontró entre el 98-102 % (que es el límite de la especificación adoptada).

- Preciso, puesto que se obtuvieron Coeficientes de Variación (CV) para la Precisión del Sistema menor al 1.5 % y para la Precisión del Método menor al 2 % con un recobro dentro de los límites establecidos del 98-102 %.

- Exacto, debido a que se obtuvo un Coeficiente de Variación (CV) menor al 2 % y el Porcentaje de Recobro se encontró dentro de los límites de 98-102 % establecidos en las especificaciones de este trabajo.

- Específica, porque se comprobó que el método es específico para cuantificar Minoxidil, ya que al correr una muestra del placebo preparado

para esta prueba, se observa en el cromatograma que no existe ningún otro pico que se detecte al mismo tiempo de retención del Minoxidil, por lo que el Método puede utilizarse para el análisis del producto en proceso y terminado.

En lo que se refiere a la Tolerancia del Método, los resultados indican que la muestra analítica almacenada a Temperatura Ambiente por 24 y 48 horas van disminuyendo conforme pasó el tiempo; por lo que las muestras deben ser analizadas el mismo día de su preparación. Con esto evitamos posibles rechazos por este motivo.

En cuanto a la Tolerancia variando el equipo podemos observar que existe (pag.146) diferencia en los resultados promedio (99.0 y 100.0 %), - éstos son atribuibles a diversos factores como lo son las tuberías del equipo, la presión que varía a consecuencia de éste, el detector, etc. Pero a pesar de todo esto los resultados son bastante confiables.

Finalmente podemos concluir que la Técnica Analítica para Cuantificar Minoxidil en la solución tópica al 2 % por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), es confiable ya que cumple con todos los requerimientos establecidos para esta Validación.

Por lo anterior se propone incluir esta metodología en la Farmacopea Nacional, para el análisis de este producto.

## BIBLIOGRAFIA

- **Analytical Profiles of Drug Substances**  
Edited by Klaus Florey  
Academic Press Inc.  
Volume 17  
1988. San Diego, California.
- **Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica**  
Goodman Gilman, Alfred  
Goodman, Louis S.  
Editorial Médica Panamericana  
7a. Edición  
1986. Buenos Aires, Argentina.
- **Biofarmacia**  
J.M. Alache, J.Ph. Devissaguet, A.M. Guyot-Herman  
Asociación Farmacéutica de Enseñantes de Farmacia Galénica  
Editorial el Manual Moderno, S.A. de C.V.  
Traducido de la Segunda Edición Francesa
- **Detection and Determination of Error in Analytical Methodology**  
Part. I. In the Method Verification Program  
Cardone, Mario J.  
J. Assoc. Off. Anal. Chem. (Vol. 66, No. 6, 1983)  
Pag. 1267-1282.
- **Detection and Determination of Error in Analytical Methodology**  
Part. II. Correction for Corrigible Systematic Error in the Course of Real Sample  
Analysis  
Cardone, Mario J.  
J. Assoc. Off. Anal. Chem. (Vol. 66, No. 5, 1983)  
Pag. 1283-1294
- **Detection and Determination of Error in Analytical Methodology**  
Part. II B. Direct Computational Technique for Making Corrigible Systematic Error  
Corrections  
Cardone, Mario J. and Lehman Jay G.  
J. Assoc. Off. Anal. Chem. (Vol. 68, No. 2, 1985) Pag. 198-202

## BIBLIOGRAFIA

(Cont.)

- **The Extra Pharmacopoeia**  
**Martindale**  
**The Pharmaceutical Press**  
**Twenty-ninth Edition**  
**1989. London, Great Britain.**
  
- **Farmacología. Acciones y Reacciones Medicamentosas**  
**Levine, Ruth R.**  
**Salvat Editores S.A.**  
**Traducción de la Segunda Edición en Inglés**  
**1982. Barcelona, España.**
  
- **Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos**  
**Quinta Edición**  
**1988. México.**
  
- **Farmacotecnia Teórica y Práctica**  
**Helman, Dr. José**  
**Compañía Editorial Continental, S.A.**  
**Primera Edición**  
**Tomo VII, Capítulo 60.**  
**Julio, 1981.**
  
- **Fundamentos de Farmacología**  
**Introducción a los Principios de Acción de los Fármacos**  
**Bevan, John A., Et al.**  
**Harla S.A. de C.V.**  
**Segunda Edición**  
**1982. México D.F.**
  
- **Guía Profesional de Medicamentos**  
**Manual de Consulta para Médicos, Odontólogos y Farmacéuticos**  
**Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V.**  
**Tercera Edición**  
**1989. México D.F.**

## BIBLIOGRAFIA

(Cont.)

- **Guideline on General Principles of  
F.D.A. Rockville, Md.  
Mayo, 1987.**
- **Maintaining and Troubleshooting HPLC Systems  
A User's Guide  
Runser, Dennis J.  
Wiley-Interscience Publication  
1981, U.S.A.  
Pag. 6-134**
- **Métodos Analíticos de Validación  
Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de  
Control de Insumos para la Salud, S.A.A.**
- **The Pharmaceutical Codex  
The Pharmaceutical Press  
Eleventh Edition  
1979. London, Great Britain.**
- **The Theory and Practice of Industrial Pharmacy  
Lachman, Leon  
Lieberman, Herbert A.  
Joseph L.  
Third Edition  
Lea & Febiger  
1986. Philadelphia.**
- **The United States Pharmacopeia  
XXII Edition  
P. 1710 (1221)  
P. 1221 (621)  
USP Reference Standards (1)**
- **Report of the PMA Quality Control Section Committee on Pressurized Liquid  
Chromatography  
Farmacopeial Forum, 1982**