



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

**VALIDACION DE UN METODO RUTINARIO DE
CONTROL DE CALIDAD POR CLAE PARA LA
DETERMINACION DE UN ANTIHISTAMINICO
NO SEDANTE EN TABLETAS**



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
MARIA ESTHER HERNANDEZ JIMENEZ



MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

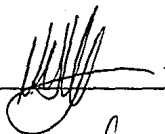
PRESIDENTE: PROF. JOSE LUIS IBARMEA AVILA
VOCAL: PROF. ROSA LORENIA MORA-TOVAR Y CHAVEZ
SECRETARIO: PROF. NORMA TRINIDAD GONZALEZ MONZON
1er. SUPLENTE: PROF. CONSUELO ARELLANO BORJAS
2do. SUPLENTE: PROF. PEDRO ALFREDO GORGONIO HERNANDEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIOS WAYNE, S. A. DE C. V.

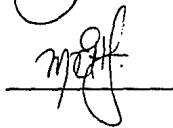
ASESOR DEL TEMA:

Q. F. B. NORMA TRINIDAD GONZALEZ MONZON



SUSTENTANTE:

MARIA ESTHER HERNANDEZ JIMENEZ



"SI EL UNIVERSO CREADO NOS PRESENTA MUNDOS
ABSOLUTAMENTE DESCONOCIDOS, EN NUMERO
INACABABLE, Y LEJANOS, EL MUNDO CELESTE NOS
PREPARARA MARAVILLAS INIMAGINABLES.
HORIZONTES QUE, SOLO CON PENSARLO, DAN
VERTIGO"

Chiara Lubich

Con un profundo agradecimiento a todas
las personas que colaboraron en la
realización de este trabajo.

A Tí, Señor: ¡Gracias por tanto Amor!

INDICE

<u>CAPITULO</u>	<u>PAGINA</u>
1.- Introducción.....	1
2.- Monografía del Principio Activo	
1. Propiedades Fisicoquímicas.....	3
2. Farmacología.....	6
3. Farmacocinética y Metabolismo.....	7
4. Estudios Clínicos.....	9
5. Dosis y Administración.....	12
3.- Validación de Métodos Analíticos	
1. Justificación.....	13
2. Definiciones.....	18
2.1 Linealidad del Sistema.....	18
2.2 Precisión del Sistema.....	19
2.3 Especificidad del Método.....	20
2.4 Intervalo.....	21
2.5 Linealidad del Método.....	21
2.6 Exactitud y Repetibilidad del Método	
Cal 100 %.....	24
2.7 Precisión del Método.....	24
2.8 Límite de Detección.....	26
2.9 Límite de Cuantificación.....	27
2.10 Tolerancia.....	28

3. Cálculos.....	29
4. Documentación.....	29

4. - Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE)

1. Historia.....	30
2. Funcionamiento.....	30
3. Conceptos Básicos.....	33
4. Componentes de un Sistema CLAE.....	35
4.1 Bomba.....	35
4.2 Inyector.....	35
4.3 Columnas.....	36
4.3.1 Procedimiento para determinar la eficiencia de la columna.....	40
4.3.2 Procedimiento para limpieza de columnas.....	42
4.3.3 Procedimiento para mantenimiento de columnas.....	46
4.4 Detectores.....	47
4.5 Fase Móvil.....	49
5. Procedimiento de Análisis.....	52
6. Adecuabilidad del Sistema (System Suitability).	54

5. - Parte Experimental

1. Objetivo.....	57
2. Selección del Método.....	57
3. Actividades a Realizar.....	57

4. Procedimiento	
a. Optimización de la Metodología Analítica....	58
b. Preparación del Placebo.....	61
c. Ensayos de Validación	
i. Linealidad del Sistema.....	61
ii. Precisión del Sistema.....	62
iii. Linealidad del Método.....	62
iv. Exactitud y Repetibilidad del Método (Cal 100 %).....	63
v. Especificidad del Método.....	63
vi. Reproducibilidad del Método.....	64
vii. Tolerancia.....	64
d. Resultados	
i. Linealidad del Sistema.....	64
ii. Precisión del Sistema.....	67
iii. Linealidad del Método.....	67
iv. Exactitud y Repetibilidad del Método (Cal 100 %).....	70
v. Especificidad del Método.....	71
vi. Reproducibilidad del Método.....	71
vii. Tolerancia.....	75
6.- Conclusiones.....	76
Apéndice A: Cálculos Estadísticos.....	79

Apéndice B: Procedimiento de Operación: Validación de Métodos Analíticos.....	95
Apéndice C: Fuentes de Error y Recomendaciones.....	104
Propuesta para la Calibración de Sistemas CLAE.....	117
7.- Bibliografía.....	121

CAPITULO 1

INTRODUCCION

Este trabajo es una etapa del desarrollo farmacéutico de un producto que contiene como principio activo 10 mg de Loratadina en tabletas elaboradas por compresión directa; trata de una parte fundamental del desarrollo: la implementación, optimización y validación de metodología analítica apropiada, en congruencia con las necesidades y posibilidades de la Compañía que está requiriendo el producto, de tal forma que la metodología cuente con las características óptimas como parte del aseguramiento de la calidad del producto. Así mismo, en el presente trabajo se incluyen aspectos prácticos útiles para el analista que trabaja en Cromatografía de Líquidos y en la Validación de Métodos Analíticos. Para ello, basado en la bibliografía y en la experiencia práctica en relación a los problemas más frecuentemente encontrados, se hace un resumen sobre Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) como introducción a ciertas recomendaciones de Buenas Prácticas de Laboratorio para obtener buenos resultados analíticos, sobre todo durante la etapa de desarrollo del producto. Se hace énfasis en las columnas para cromatografía, ya que éstas representan el corazón de un sistema cromatográfico. En el Apéndice C también se extienden las recomendaciones sobre sistemas de cromatografía de alta eficiencia.

Por otra parte, se realizó una revisión a fondo sobre el tema Validación de Métodos Analíticos; Por qué validar? Muchas veces en el afán de obtener resultados muy exactos o, en otro aspecto, por cumplir meramente con requisitos legales, se pierde la objetividad y queda inconclusa o mal hecha esta parte. Se remarca la importancia de la validación, los parametros a evaluar y, como parte importante -ya que mucho se ha hablado del tema- cómo ahorrar tiempo en la validación de un método (que puede ser de cualquier tipo) construyendo dos curvas de calibración de manera simple. Se presenta, en el Apéndice B, una forma sencilla de arreglo de datos para su mejor manejo, y en el Apéndice A, la forma manual de realizar los cálculos estadísticos y la interpretación de resultados, independientemente que se puedan realizar con sistemas automatizados.

Espero que este trabajo pueda ser de utilidad para quien lo consulte y requiera de cosas concretas que puedan ayudarle al mejor desempeño de su labor.

CAPITULO 2

MONOGRAFIA DEL PRINCIPIO ACTIVO

1. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

Nombre(s) químico(s): ^(1,2,3)

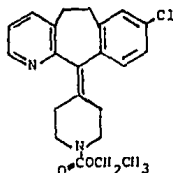
11-(N-Etoxicarbonil)-4-piperilideno]-8-cloro-8,11-dihidro-5H-benzo [5,6] ciclohepta [1,2-b] piridina.

Etil éster del ácido 4-(8-cloro-5,6-dihidro-11H-benzo [5,6] ciclohepta[1,2-b] piridin-11-ilideno)-1-piperidincarboxílico.

Fórmula química condensada: ⁽⁴⁾

C₂₂H₂₉N₂ClO₂

Fórmula química desarrollada: ⁽⁴⁾



Peso molecular: ⁽⁴⁾

382.9

CAS: ^(4,5)

79794-75-5

Aspecto: ⁽⁴⁾

Polvo blanco a grisáceo, inodoro.

Solubilidad: ⁽⁴⁾

Insoluble en agua; libremente soluble en acetona, cloroformo, metanol y tolueno.

Punto de fusión: ^(4,4)

131-137°C

Espectro ultravioleta: ⁽⁴⁾

Longitud de onda a la que presenta máxima absorbancia	Disolvente
246 nm	NaOH 0.1 N/metanol
264 nm	metanol
274 nm	HCl 0.1 N/metanol

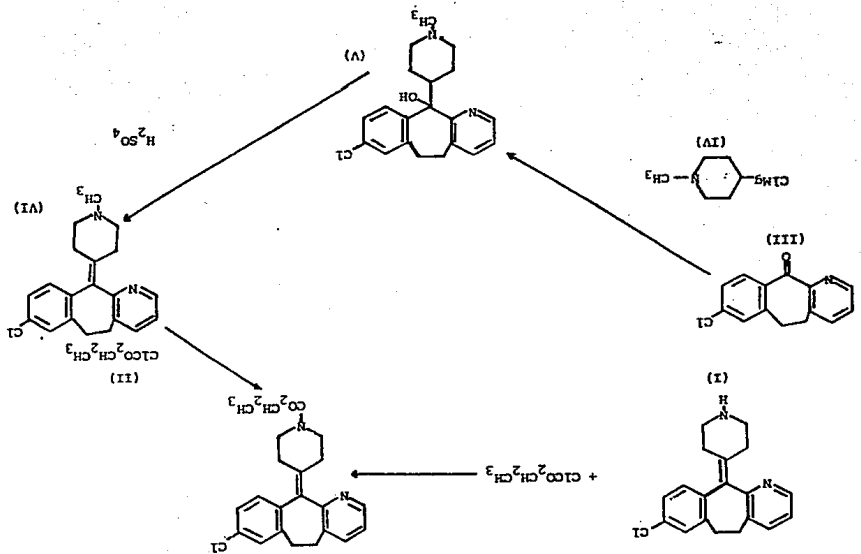
Espectro infrarrojo: ⁽⁴⁾

La dispersión en aceite mineral presenta bandas a 1705, 1590, 1580, 1230, 830, 780 y 765 cm^{-1} .

Síntesis del fármaco: ⁽²⁾

Este compuesto puede obtenerse por 2 diferentes vías (Esquema 1):

1) Por carboxilación de 8-cloro-6, 11-dihidro-11-(4-piperilideno)-5H-benzo [5,6] ciclohepta [1,2-b] piridina (I) con cloroformato de etilo (II) en reflujo con benceno.



ESQUEMA 1: SINTESIS

2) Por reacción de 8-cloro-6,11-dihidro-5H-benzo [5,6] ciclohepta [1,2] piridin-11-ona (III) con el agente de Grignard (IV) para dar el carbinol terciario (V), el cual es deshidratado con H_2SO_4 al 85 % produciendo 8-cloroazatadina (VI). Finalmente el compuesto es tratado con cloroformato de etilo (II) en tolueno.

2. FARMACOLOGIA

La histamina es el mediador químico primario en las reacciones alérgicas. Esta es almacenada en granulos secretorios situados en los mastocitos, basófilos y otros sitios tisulares, especialmente en las mucosas. En los individuos sensibilizados, las reacciones antígeno-anticuerpo estimulan la liberación de la histamina lo que causa contracciones en los músculos lisos y aumento de la permeabilidad vascular⁽²⁾.

Los trastornos alérgicos, como rinitis estacional y perenne, así como la urticaria están relacionados con los signos y síntomas de la liberación de histamina. Las manifestaciones clínicas comúnmente asociadas con estos trastornos incluyen estornudos, rinorrea, congestión nasal, prurito y conjuntivitis en el caso de rinitis alérgica, y con ronchas, eritema y prurito local en el caso de urticaria⁽²⁾.

Los agentes antihistamínicos son sustancias conocidas por su eficacia para inhibir la acción de la histamina sobre los receptores H_1 de la histamina⁽²⁾.

Los antihistamínicos llegaron a usarse ampliamente a mediados de los 40's. Rápidamente se establecieron para el tratamiento de diversos trastornos alérgicos, particularmente rinitis, conjuntivitis y urticaria. El problema de sedación limitó el uso

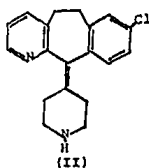
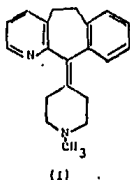
de antihistamínicos clásicos, y la investigación de antagonistas-H₁ sin potencial sedativo ha sido un reto y una meta dentro de la investigación farmacéutica. Recientemente varios antihistamínicos-H₁ no sedantes se han introducido en la clínica y otros están bajo investigación. Hace poco, la conversión del grupo básico amino terciario del potente antihistamínico Azatadina (I) a un grupo funcional carbamato neutro, llevó a la preparación de compuestos con actividad antihistamínica significativa con pequeños o nulos efectos sobre el Sistema Nervioso Central en una variedad de especies animales. Una explicación a esto es su débil afinidad por los receptores de SNC relacionados con la sedación, incluyendo los receptores H₁ de la histamina, los α -adrenorreceptores y los receptores de la acetilcolina. Tiene una penetración pobre en el SNC y selectividad por los receptores periféricos de la histamina. Es el caso de Loratadina ⁽²⁾.

Estudios *in vitro* indicaron que la Loratadina inhibe la liberación de leucotrienes e histamina en fragmentos de pulmón humano, células MCG y células peritoneales de rata. ⁽²⁾

3. FARMACOCINETICA Y METABOLISMO

Estudios experimentales demostraron que la Loratadina es bien absorbida y extensamente metabolizado en animales y humanos. Estudios farmacocinéticos en hombres con el fármaco marcado con ¹⁴C administrado en una dosis simple de 40 mg, mostraron niveles séricos altos para Loratadina y su metabolito activo descarbetoxiloratadina (II), después de 1 a 1.5 h. Los niveles séricos declinaron rápidamente en las primeras 1 a 2 h, con vida media de 15 ± 3 h para Loratadina y 12 ± 3 h para el metabolito.

La vida media de eliminación de radiactividad fue de alrededor de 46 h, cerca del 40 % de radiactividad es eliminado en orina y 40 % en heces. Estudios de dosis simple con dosis de 10, 20 y 40 mg mostraron niveles séricos después de 1.5 h. La vida media de eliminación no se determinó para 10 mg, mientras que para 20 y 40 mg la vida media varió entre 4 y 36 h para el fármaco y de 7 a 38 h para el metabolito. En un estudio de dosis múltiple de 40 mg/día durante 10 días, los niveles séricos fueron 19-27 ng/ml en los días 7 y 10⁽²⁾.



La farmacocinética de Loratadina 40 mg vía oral, se estudió en 6 adultos sanos, 6 pacientes con deterioro renal y 6 pacientes con hemodiálisis. Las vidas medias de eliminación del compuesto sin cambio alguno fueron 8.7, 7.6 y 8.6 h, respectivamente; y las de descarbetoxiloratadina (el metabolito) 18.2, 23.9 y 14.9 h, respectivamente. Los sujetos en hemodiálisis recibieron otros 40 mg una semana después de la primera dosis y la diálisis se realizó 4 h después de la administración; durante 4 h no se observaron diferencias en Loratadina arterial y venosa y en los niveles de metabolito en plasma durante la diálisis; y se encontraron concentraciones pequeñas del metabolito y nulas del fármaco en el dializado.⁽²⁾

4. ESTUDIOS CLINICOS

Se compararon 160 mg de Loratadina, 4 mg de Maleato de Clorfeniramina y placebo para efectos sobre la inducción de histamina mediante su formación post-inyección subcutánea de histamina. La supresión de la respuesta se observó después de 1 h de la administración, fue máxima a las 2 h y la menor fue a las 24 h⁽²⁾.

En un estudio se comparó el efecto de Loratadina 10, 20 y 40 mg administradas 2 veces al día, con el Maleato de Clorfeniramina 12 mg y placebo, administradas durante 28 días. La Loratadina y el Maleato de Clorfeniramina indujeron un decremento estadísticamente significativo en el área de superficie en las siguientes 2 h después de la administración, el efecto fue más marcado en Loratadina 40 mg⁽²⁾.

Se reportaron dos estudios doble ciego en pacientes con rinitis alérgica. Se compararon los efectos de Loratadina 40 mg administrada una vez al día, Mequitazina 5 mg dos veces al día y placebo, durante 14 días en un grupo de 40 pacientes. Se observó un decremento estadísticamente significativo en el registro promedio de síntomas para los componentes activos comparados con el placebo⁽²⁾. En otro estudio se comparó Loratadina 40 mg administrada una vez al día con Terfenadina 80 mg dos veces al día y placebo. No se observó diferencia en eficacia entre los tratamientos con los compuestos activos en el registro promedio de síntomas, y los fármacos fueron significativamente más activos que el placebo⁽²⁾.

Un estudio multicéntrico, doble ciego, randomizado en 437 pacientes con rinitis alérgica evaluó una combinación de

Loratadina 5 mg y Pseudoefedrina 120 mg administrada dos veces al día como componentes individuales y placebo, durante 14 días. La combinación fue significativamente más efectiva que otros tratamientos, con decremento significativamente mayor en el registro total de síntomas al día 4 y al día 14, y la evaluación global de la respuesta fue significativamente mejor. La combinación también fue tolerada con baja incidencia de sedación⁽²⁾.

En otro estudio doble ciego, randomizado, en 45 pacientes con rinitis alérgica perineal, se comparó Loratadina 100 mg administrada una vez al día con Terfenadina 60 mg dos veces al día y placebo. Al final del estudio, el registro total de síntomas se mejoró de forma similar con los componentes activos, y el efecto fue significativamente mejor que con el placebo; la evaluación global mostró que el 60 y el 50 % de los pacientes con Loratadina y Terfenadina, respectivamente, tuvieron una buena respuesta y que cuando se administró la dosis de Loratadina, los pacientes mostraron seguridad y tolerancia, y no se presentó sedación, en tanto que con la Terfenadina sí se presentó un caso de sedación⁽²⁾.

Se comparó la administración de Loratadina 10 mg una vez al día con Astemizol 10 mg una vez al día y placebo en 65 pacientes con rinitis alérgica inducida por el polen en un estudio doble ciego. Al tercer día se observó un mejoramiento significativamente mayor en los síntomas con Loratadina que con Astemizol, el cual no fue significativamente diferente del placebo, mientras que al día 14, ambos compuestos mostraron eficacia similar. Los efectos adversos fueron mínimos y similares en todos los grupos⁽²⁾.

Un estudio multicéntrico, doble ciego, randomizado en 228

pacientes con rinitis alérgica perineal, evaluó Loratadina 10 mg una vez al día, Terfenadina 80 mg una vez al día y placebo durante 4 semanas. Se encontró que la Loratadina y Terfenadina fueron significativamente más efectivos que el placebo desde el inicio del tratamiento, para reducir los síntomas y ambos compuestos fueron efectivos de forma similar. La evaluación global indicó buena o excelente respuesta en 64, 58 y 26 % de los pacientes tratados con Loratadina, Terfenadina y el placebo, respectivamente. Todos los tratamientos fueron bien tolerados, se reportó sedación en 3, 5 y 3 % de pacientes tratados con Loratadina, Terfenadina y placebo, respectivamente⁽²⁾.

Se compararon Loratadina 10 mg una vez al día, Clemastine 1.34 mg una vez al día y placebo durante 2 semanas en 356 pacientes con rinitis alérgica de moderada a severa en un estudio multicéntrico, doble ciego, randomizado. El registro total de síntomas principales y los cambios principales en los registros de síntomas de línea base en los días 7 y 14 se mejoraron notablemente en los tratamientos con los 2 activos, en tanto que con el placebo, no hubo cambios. La incidencia de somnolencia en el tratamiento con Loratadina fue similar a la del placebo, mientras que la diferencia entre Clemastine y el placebo fue significativa⁽²⁾.

Se encontró que la Loratadina 10 mg administrada una vez al día, es significativamente más efectiva que el placebo en estudios clínicos realizados en más de 2000 pacientes pediátricos y adultos con rinitis alérgica tratados durante más de 3 meses. El compuesto es tan efectivo como la Clemastine y no-sedante como la Terfenadina y el Astemizol. La combinación de Loratadina y pseudoefedrina exhibió gran eficacia, especialmente en congestión

nasal. En pacientes con urticaria crónica y otras enfermedades alérgicas de la piel, la Loratadina también fue significativamente más efectiva que el placebo y similar a los antihistamínicos establecidos. Fue altamente efectiva (70 %) en prurito mediado por histamina acompañado de condiciones alérgicas en la piel. Se ha reportado buena tolerancia, con incidencia similar de sedación y efectos colaterales anticolinérgicos al placebo. No se observaron efectos sobre la conducción de autos y máquinas de vapor cuando se co-administró con alcohol o Diazepam. Tampoco se observaron cambios significativos en los valores de las pruebas de laboratorio⁽²⁾.

5. DOSIS Y ADMINISTRACION

Este producto, derivado de la Azatadina, es de larga acción. No tiene poder sedante o actividad muscarínica y se usa para la liberación sintomática de reacciones de hipersensibilidad, incluyendo rinitis y urticaria crónica. Se administra por vía oral. En adultos y niños cuyo peso corporal sea mayor de 30 kg, la dosis es de 10 mg por día. A los niños de 10 a 12 años, de bajo peso corporal, se recomienda administrar 5 mg por día⁽³⁾.

CAPITULO 3

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

1. JUSTIFICACION

Una etapa fundamental en el diseño de medicamentos es el desarrollo de metodología analítica exacta y precisa que garantice la calidad del producto. La validación se define como el proceso para determinar la efectividad de una metodología dada para proporcionar datos analíticos apropiados^(13,14). La USP XXII/NF XVII, indica: "De acuerdo a la Sección 501 del Federal Food, Drug and Cosmetic Act, los análisis y especificaciones de las monografías de la USP y NF constituyen estándares legales. Las regulaciones de las Current Good Manufacturing Practices [21 CFR 211.194 (a)] requieren que los métodos analíticos que se emplean para el aseguramiento de la calidad de productos farmacéuticos con especificaciones establecidas, cumplan los estándares de exactitud y confiabilidad. También, de acuerdo con estas regulaciones [21 CFR 211.194 (a)(2)], los usuarios de métodos analíticos descritos en la USP y NF, no requieren validar la exactitud y confiabilidad de estos métodos, sino solamente verificar su adaptabilidad bajo sus condiciones de operación"⁽¹⁵⁾. Sin embargo, otras fuentes han argumentado que los métodos establecidos en medios oficiales (como la USP, AOAC y otros) deberán validarse igualmente, ya que nuevas condiciones de operación, reactivos, instrumentos y personal, pueden alterar sus características^(13,14). Así mismo, se tiene la

experiencia de que los métodos compendiales descritos en las Farmacopeas, no producen los mismos resultados en productos que tengan el o los mismos principios activos, pero con diferente formulación por lo que es necesaria la validación analítica para cada producto. Esto es que, cuando se trata de formas farmacéuticas se debe tener en cuenta que, debido a la gran variedad de formulaciones existentes en el mercado (sobre todo, esto se verifica principalmente en Empresas Nacionales, las cuales tienen que desarrollar sus propios productos), los resultados pueden no ser satisfactorios y entonces es necesario comprobar la validez del método en el caso particular que se esté analizando⁽¹⁸⁾. De aquí que la validación nos dará una medida no solo de la eficiencia del método en forma individual, sino del sistema analítico total y un tanto del proceso de elaboración de la forma farmacéutica^(18,14).

La validación de métodos analíticos debe hacerse con un objetivo bien definido: fines regulatorios, política empresarial, desarrollo de un nuevo producto, etc. Así, la validación aplica a:

a) Métodos analíticos establecidos: son aquéllos que se emplean de rutina en el análisis de productos en el laboratorio y éstos, a su vez, pueden ser optimizados y/o modificados durante el desarrollo del proceso de validación.

b) Métodos analíticos nuevos: son aquéllos que se desarrollan durante la implementación de un nuevo producto en la Empresa o los que se desarrollan para mejorar la calidad del análisis de productos ya establecidos.

Siempre, antes de comenzar una validación, es necesaria la elaboración de un PROTOCOLO, que es un conjunto de direcciones bien definidas que deben llevarse a cabo, sin excepción, para la realización de las actividades; es decir, es la guía, paso a paso, de cada actividad⁽⁷⁾.

A este respecto, se ha propuesto una estructura de 4 etapas para la validación de métodos⁽⁸⁾:

1.- Identificación de los parámetros apropiados de validación.

2.- Diseño de experimentos para la evaluación de los parámetros (Protocolo).

3.- Determinación de la eficiencia del método para cada parámetro (Realización).

4.- Implementación de los resultados al procedimiento original. (Optimización o mejoramiento de la metodología).

El procedimiento para evaluar cada parámetro de validación no puede definirse universalmente, pues depende de varios factores entre los que se enlistan el propósito del método, el intervalo de concentraciones del analito, el rigor deseado en el análisis, etc.⁽⁸⁾

La forma más comúnmente usada para la validación de métodos analíticos es mediante la evaluación de parámetros establecidos; de acuerdo a la USP XXII/NF XVII, existen 3 categorías de análisis para los cuales se requieren datos de validación diferentes⁽⁵⁾. A continuación se mencionan:

Categoría I: Métodos analíticos para la cuantificación de la mayoría de los componentes de sustancias a granel o ingredientes activos (incluyendo conservadores) en productos farmacéuticos terminados.

Categoría II: Métodos analíticos para la determinación de impurezas o componentes de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos métodos incluyen análisis cuantitativos y pruebas límite.

Categoría III: Métodos analíticos para la determinación de características de ejecución (por ej.: disolución, liberación del fármaco, etc.).

A continuación se presenta la información analítica requerida para cada categoría de análisis:

PARAMETRO ANALITICO	ENSAYO			
	CATEGORIA I	CATEGORIA II		CATEGORIA III
		CUANTITATIVO	PRAS. LIMITE	
Linealidad	Sí	Sí	No	"
Precisión	Sí	Sí	No	Sí
Exactitud	Sí	Sí	"	"
Intervalo	Sí	Sí	"	"
Lín. detección	No	No	Sí	"
Lín. cunatificación	No	Sí	No	"
Especificidad	Sí	Sí	Sí	"
Tolerancia	Sí	Sí	Sí	Sí

" Puede requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

Todo proceso de validación contempla criterios llamados de aceptación los cuales se han desarrollado para determinar y documentar la validez de los métodos. Así, un método es considerado válido cuando su eficiencia con respecto a los criterios establecidos es óptima y el método demuestra, de esta forma, ser aceptable para su uso^(13,14,15).

Un buen plan de validación de métodos analíticos permite evaluar, de manera rápida y práctica, parámetros estadísticos como son: linealidad, exactitud, reproducibilidad, entre otros. La meta de todo laboratorio analítico es "obtener en sus análisis resultados exactos, precisos, lineales y confiables"; exactos por la identidad entre el valor real y el resultante del análisis, reproducibles por la coincidencia entre los resultados analíticos de una misma muestra efectuada por diferentes laboratorios; estas características forman parte de la confiabilidad, pero ésta además debe estar respaldada por un Sistema de Garantía de Calidad que permita reconstruir y documentar la historia del procedimiento analítico seguido". Es decir, un método analítico validado hace parte del Sistema de Aseguramiento de la Calidad de un producto.

Para elaborar un protocolo de validación es necesario entender muy bien cada parámetro que se evaluará y cómo se realizará, para ayudar a ello se han establecido algunas definiciones.

2. DEFINICIONES

2.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Es la variación de la respuesta del sistema de medición con respecto a la concentración del analito, ésta se realiza para asegurar la proporcionalidad directa sobre el intervalo de trabajo pre-establecido⁽⁸⁾.

Se determina construyendo una curva de calibración (respuesta del instrumento-sistema vs cantidad adicionada de sustancia de referencia) de una misma solución de referencia, empleando al menos 5 diluciones para 5 concentraciones que pueden ser: 50, 75, 100, 125 y 150 % de la concentración nominal y que se realizan por triplicado. Los criterios de aceptación se determinan evaluando por el método de mínimos cuadrados los resultados obtenidos (regresión lineal). Estos criterios son:

El valor de la pendiente, m , de la recta debe ser aproximadamente 1.

El valor del intercepto en Y debe ser cercano a 0.

El valor del coeficiente de correlación, r , deberá ser de 0.99 o mayor.

El valor del coeficiente de determinación, r^2 , deberá ser de 0.98 o mayor.

Para ponderizar nuestros resultados se pueden realizar los cálculos con base en las unidades del eje de las ordenadas, esto sera:

$$br = \frac{m}{\bar{y}}$$

$$mr = \frac{b}{\bar{y}} \times \bar{x}$$

donde:

m_r = pendiente relativa

b_r = intercepto relativo

Para métodos cromatográficos: inyectar una serie de concentraciones de sustancia de referencia que cubran el intervalo de trabajo de los análisis y registrar las respuestas. La respuesta debe relacionarse linealmente con la concentración de la sustancia de referencia o de la cantidad inyectada. La ecuación de regresión lineal deberá cubrir los criterios establecidos. Si no es así, se debe documentar que esto no tiene efecto sobre la exactitud del sistema. El coeficiente de variación total, CV_T, debe ser menor de 1.5 %^(19,14).

2.2 PRECISION DEL SISTEMA

La precisión está definida como el grado de concordancia entre los resultados de prueba individuales. Este parámetro considera sólo la contribución al error atribuible al sistema de operación o medición. Generalmente se expresa como la Desviación Estándar Relativa, DER, o Coeficiente de Variación, CV, el cual debe ser menor de 1.5 %; éste es una medida de la repetibilidad del sistema. Por otra parte, el vocabulario de terminología en Metrología de las Normas ISO-9000, prefiere no emplear el término precisión como un parámetro de repetibilidad, e indica que ésta es un concepto cualitativo⁽⁶⁾.

Se puede determinar tomando en consideración el análisis al 100 % realizado en la linealidad del sistema solo que realizado por sextuplicado.

Para métodos cromatográficos: inyectar 6 réplicas de una solución de la sustancia de referencia y medir la respuesta. Si el CV es mayor a 1.5 %, documentar que la reproducibilidad del sistema es adecuada para el método.

2.3.ESPECIFICIDAD DEL METODO

Es la capacidad de un método analítico para medir exacta y específicamente el analito en presencia de componentes que, puede esperarse, estén presentes en la muestra.

Se demuestra estableciendo experimentalmente que el excipiente y sustancias relacionadas al principio activo no interfieran con la medición. Frecuentemente puede expresarse como el grado de la diferencia de los resultados del análisis obtenidos de muestras conteniendo impurezas adicionadas, productos de degradación, compuestos químicos relacionados o ingredientes placebo, comparados con las muestras sin sustancias adicionadas. La especificidad es una medida del grado de interferencia (o ausencia de ella) en el análisis de mezclas de muestras.

Se determina comparando los resultados de los análisis de muestras conteniendo impurezas, productos de degradación o ingredientes placebo con aquéllos obtenidos del análisis de muestras que no los contienen. Cuando las impurezas o productos de degradación no se pueden identificar o no están disponibles, la especificidad puede demostrarse por el análisis, con el método en cuestión, de muestras que contienen impurezas o productos de degradación comparando los resultados con aquéllos obtenidos de análisis adicionales de pureza (por ej. análisis cromatográfico, solubilidad de fase, calorimetría diferencial de barrido). El

grado de concordancia de los resultados es una medida de la especificidad⁽⁵⁾.

Para métodos cromatográficos: deberá tener especificidad adecuada para cumplir los criterios de precisión y exactitud entre el principio activo y todos los otros componentes que podrían interferir. Si existen componentes adicionales, se deberán cuantificar y deberá existir especificidad adecuada⁽⁵⁾.

NOTA: Se puede trabajar con las muestras de Linealidad del Método (ver abajo), con el nivel al 0 % para ver efecto del placebo.

2.4 INTERVALO

Es la región entre los niveles superior e inferior del analito (incluyendo esos niveles) en donde se ha demostrado que el método es apropiado en cuanto a exactitud, precisión y linealidad. El intervalo es validado verificando que el método analítico proporcione precisión, exactitud y linealidad aceptables cuando se aplica a muestras conteniendo analito tanto en los extremos como dentro del intervalo⁽⁵⁾.

2.5 LINEALIDAD DEL METODO

Es la variación de la cantidad de fármaco recuperada en el análisis como una función de la cantidad de fármaco adicionado a la muestra. El objetivo es conocer el intervalo de concentraciones en el cual la respuesta es lineal. Esto se determina para asegurar la proporcionalidad directa sobre el intervalo de trabajo pre-establecido. Se caracteriza por el estudio de recobros de placebos cargados a diferentes niveles de concentración por arriba y por abajo del 100 %, incluyendo éste. La linealidad usualmente

se expresa en términos de la varianza en torno a una recta de regresión lineal calculada de acuerdo a una relación matemática establecida. En esta determinación se considera lo siguiente⁽⁵⁾:

1.- Exactitud: Se analiza de manera semejante a la exactitud al 100 %, pero ahora considerando todo el intervalo estudiado.

2.- Linealidad: Se establece comprobando que la gráfica obtenida de cantidad recuperada tenga un comportamiento de $y=mx + b$, donde la pendiente, "m", y el intercepto, "b", no sean estadísticamente diferentes de 1 y 0, respectivamente.

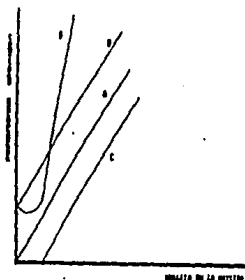
Se determina por el método de recobro de sustancia de referencia o principio activo adicionado a placebo. Se adicionan al placebo, preparado íntegramente, cantidades conocidas del analito, cuando menos a 6 niveles de concentración. Generalmente se emplean los niveles: 0, 60, 80, 90, 100 y 120 % Se recomienda analizarlo por sextuplicado y en días diferentes, al azar, incluyendo en cada día la preparación de reactivos y soluciones de referencia. Cada muestra se analiza siguiendo el método propuesto.

Otro método es el recobro de sustancia de referencia o principio activo adicionado al producto. Se adicionan al producto cantidades conocidas del analito, a los mismos niveles de concentración anteriores y de la misma forma. Este método se emplea cuando no se conoce la formulación del producto o cuando no se tienen los materiales para la elaboración del placebo⁽⁶⁾.

Para métodos cromatográficos: inyectar concentraciones de la sustancia de referencia que cubran el intervalo de trabajo. La

respuesta debe estar linealmente relacionada a la concentración de la sustancia de referencia o de la cantidad inyectada. El intercepto no deberá ser significativamente diferente de cero. Si se obtiene un intercepto significativamente diferente de cero, documentar que esto no afecta la exactitud del método.

Cualquier desviación en la linealidad indica que el método no es adecuado para muestras con esa concentración de principio activo. En tales casos, el investigador deberá modificar y revalidar el método. Una recta de regresión, experimentalmente, puede tener las siguientes características:



donde:

(A) muestra la recta "ideal" a obtenerse en un análisis de linealidad con intercepto en cero y que indica que el método es válido a todos los niveles de concentración establecidos..

(B) es la misma que A, pero cuando se emplea el método de adición de sustancia de referencia en las muestras por falta de placebo, el intercepto en y es positivo y representa la cantidad adicionada de sustancia de referencia

(C) muestra que el método es lineal pero inadecuado a bajas concentraciones de analito, y donde el intercepto en "y" es negativo significativamente.

(D) indica claramente un método no lineal.

2.6 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL METODO (AL 100 %)

Es la medida de concordancia entre los resultados de un método analítico, obtenidos experimentalmente y el el valor real para una muestra. Este parámetro se examina por comparación de la cantidad recuperada con respecto a la adicionada al placebo. Esto demuestra que el método analítico es confiable cuando se efectúa en varias ocasiones por un mismo analista en las mismas condiciones de operación⁽⁴⁶⁾.

Se determina empleando los resultados del nivel al 100 % de la linealidad del método.

Se determinan el promedio de recobro y el C.V., los cuales varían dependiendo del método empleado para el análisis.

Cuando se evalúa la exactitud en todo el intervalo lineal, se determinan los porcentajes recuperados a cada nivel de concentración y se calcula el CVr el cual deberá ser menor del 2.0 %, y el promedio de recobro deberá estar entre el 98% y 102 % del valor teórico. El intervalo de confianza para la media al 95 % deberá encontrarse entre el 96 y 104 %, incluyendo el 100 %⁽⁴⁶⁾.

2.7 PRECISION DEL METODO

Es el grado de concordancia entre medidas individuales en un proceso. Se mide de la siguiente forma⁽⁴⁶⁾:

1.- Repetibilidad: Precisión del método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos aparatos. Con fines prácticos, el estudio está evaluado por el CV de la prueba de Exactitud al 100 %, así como por la linealidad del método. El criterio establecido es que el $CV \leq 2.0 \%$ ⁽¹²⁾

2.- Reproducibilidad: Precisión de un método analítico expresado como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas en diferentes días⁽¹⁴⁾.

El diseño más práctico y rápido es el siguiente:

- Analizar muestras de la formulación (producto terminado) con dos analistas en dos días diferentes.
- Realizar un análisis de varianza.

El método se considera reproducible y, por lo tanto, válido si:

i) No existe modificación estadísticamente significativa entre el porcentaje recuperado cuando el análisis se realiza por personas diferentes.

ii) No existe modificación estadísticamente significativa entre el porcentaje recuperado cuando el análisis se realiza en días diferentes.

2.8 LIMITE DE DETECCION

Es un parámetro de prueba límite. Es la menor concentración de analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones experimentales establecidas. Sólo se verifica que la concentración de analito esté por arriba o por abajo de cierto nivel. Esto significa que esta prueba es aplicable si el analito está en concentración pequeñísima (nivel menor) o si es componente traza⁽⁵⁾.

Para evaluar este parámetro es necesario, en primer lugar, conocer y evaluar la variabilidad de la prueba en blanco. Es necesario repetir un cierto número de análisis (por ej.: 10 veces) sobre una muestra del blanco. Se obtiene así un valor medio y una desviación estándar de la medición o de la señal en las condiciones previstas de análisis del compuesto⁽⁵⁾.

La determinación puede variar dependiendo si se trata de un método instrumental o no instrumental. Para métodos instrumentales, pueden emplearse diferentes técnicas. Algunos investigadores determinan la relación del nivel de ruido comparando los resultados del análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito con muestras blanco y estableciendo el nivel mínimo al cual el analito puede detectarse confiablemente. La regla general, según Fontani, es que el límite de detección de una señal o de una medición está dado por 3 veces la variabilidad del blanco. Este límite es subsecuentemente validado por el análisis de un número adecuado de muestras conocidas preparadas al límite de detección, o cercanas⁽⁹⁾.

Para métodos no instrumentales, el límite de detección generalmente se determina por el análisis de muestras con

concentraciones conocidas de analito y por el establecimiento del nivel mínimo al cual el analito puede detectarse confiablemente⁽⁵⁾.

2.9 LIMITE DE CUANTIFICACION

Es un parámetro cuantitativo para determinar niveles bajos de compuestos en muestras, tales como impurezas, en sustancias farmacéuticas y productos de degradación en formas farmacéuticas. Es la más baja concentración del analito en la muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de prueba establecidas. El límite de cuantificación se expresa como la concentración del analito (por ej.: %, ppb, etc.) en la muestra⁽⁵⁾.

La determinación puede variar también si se trata de un método instrumental o no instrumental. Para métodos instrumentales se realiza de la misma manera que el límite de detección. Cabe subrayar que una señal comprendida entre 3 y 10 veces la variabilidad del nivel de ruido, se considera cualitativamente y sólo si es superior a 10, la señal es utilizable para expresar numéricamente resultados cuantitativos. Este límite es subsecuentemente validado por el análisis de un número adecuado de muestras conocidas preparadas al límite de cuantificación, o cercanas a él⁽⁷⁾.

Para métodos no instrumentales, el límite de cuantificación generalmente se determina por el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito y estableciendo el nivel mínimo al cual el analito puede ser cuantificado con precisión y exactitud aceptables⁽⁷⁾.

2.10 TOLERANCIA

Es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos por el análisis de las mismas muestras bajo una variedad de condiciones de prueba, tales como diferentes laboratorios, diferentes tiempos de análisis, diferentes temperaturas de análisis, diferentes días, etc. Se expresa normalmente como la influencia de variables operacionales y ambientales sobre los resultados analíticos⁽⁷⁾.

Se establece por el análisis de alícuotas de lotes homogéneos en diferentes laboratorios, por diferentes analistas, empleando condiciones operacionales y ambientales que pueden diferir pero que siguen estando dentro de los parámetros especificados. La reproducibilidad puede compararse con la precisión del análisis bajo condiciones normales para obtener una medida de la tolerancia del método analítico. Algunas veces se define como la evaluación de las condiciones operacionales para determinar cuales son críticas.

Se puede determinar la estabilidad de la solución de medición; esta determinación nos permite conocer las condiciones y tiempo en que la muestra mantiene sus características originales; es decir, el tiempo que una solución puede permanecer antes del análisis sin comprometer su exactitud. Para la determinación se recomienda usar un mínimo de 4 soluciones en el intervalo de concentraciones de trabajo, y un mínimo de 16 horas para métodos cromatográficos a temperatura ambiente. El tiempo puede ir desde minutos hasta días. O bien, se analizan muestras almacenadas en diferentes condiciones: temperatura ambiente, 5°C, luz, a diferentes tiempos.

Estas muestras corresponden a las soluciones finales de análisis (según el caso, las que se inyectan, a las que se les determina la absorbancia, etc.)

3. CALCULOS

El procedimiento para realizar los cálculos estadísticos necesarios, se presenta en el Apéndice A.

4. DOCUMENTACION

Una vez que se han definido los parámetros a evaluar en la validación, conviene generar una serie de tablas con los datos de validación requeridos. Después de completar la fase de colección de datos del proceso de evaluación de parámetros, deberá realizarse la determinación de la aceptabilidad de la eficiencia del método para cada parámetro.

Algunos ejemplos de formatos se presentan en el Apéndice B.

Se recomienda que toda documentación generada se consigne al Departamento responsable de la validación. Esta documentación constará de un informe detallado del trabajo realizado: protocolo, resultados, evaluación y anexos; cada uno con firmas y fechas correspondientes.

CAPITULO 4

CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA

1. HISTORIA

La cromatografía de líquidos es la más vieja forma de cromatografía. Es una técnica de separación de compuestos y la cuantificación, reproducibilidad y simplicidad están asociadas con la nueva instrumentación, resultante del avance técnico⁽²⁰⁾.

En 1903, el bioquímico ruso M. Tswett desarrolló una nueva técnica de separación basada en el flujo de una mezcla a través de una columna con adsorbente finamente pulverizado y haciendo pasar un disolvente orgánico. Los diferentes componentes de la mezcla salieron por el otro extremo de la columna a diferentes velocidades, formando algunas veces bandas coloridas, de allí el nombre de cromatografía para este método de separación⁽²¹⁾. A partir de entonces se fueron desarrollando y optimizando las técnicas cromatográficas por varios investigadores hasta transformar la cromatografía líquida en columna en un método de separación de alta velocidad y alta eficiencia. Este método algunas veces está referido como HPLC, el cual alternativamente es expresado como Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) o Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)⁽¹⁹⁾.

2. FUNCIONAMIENTO

La tecnología de la columna está basada en el uso de columnas de diámetro pequeño (2-5 mm de DI) y de empaques de tamaño de

partícula pequeño (3-50 μm) que permiten el equilibrio rápido entre la fase móvil y la fase estacionaria. Esta tecnología de columna de tamaño de partícula pequeño, requiere sistemas de bombeo de alta presión capaces de dispensar la fase móvil a alta presión para ejecutar velocidades de flujo de varios ml por min. Ya que es frecuentemente necesario emplear cantidades pequeñas de analito (usualmente menos de 20 μg), son necesarios detectores sensitivos. Con esta tecnología, la cromatografía de líquidos puede dar separaciones a alta velocidad comparables con las obtenidas en cromatografía de gases, con la ventaja de que pueden analizarse materiales no volátiles o térmicamente inestables sin descomposición o la necesidad de formar derivados volátiles⁽¹⁹⁾.

La cromatografía básicamente involucra las separaciones debidas a la diferencia en el equilibrio de distribución de los componentes de la muestra entre dos fases diferentes: la fase móvil y la fase estacionaria. Los componentes de la muestra migran a través del sistema cromatográfico solamente cuando están en la fase móvil. La velocidad de migración de un componente es una función del equilibrio de distribución. Los componentes que tienen distribuciones preferentes por la fase estacionaria migran más lentamente que aquéllos que tienen distribuciones preferentes por la fase móvil. La separación, entonces, resulta de las diferentes velocidades de migración como una consecuencia de la diferencia en el equilibrio de las distribuciones⁽²⁰⁾.

Las tres formas de la cromatografía de líquidos más frecuentemente usadas son: intercambio iónico, partición y adsorción.

La cromatografía de intercambio iónico se usa principalmente para la separación de materiales iónicos o ionizables solubles en agua de pesos moleculares menores de 1500. Las fases estacionarias de la cromatografía de intercambio iónico usualmente son resinas sintéticas orgánicas con diferentes grupos activos presentes. Las resinas de intercambio catiónico contienen sitios activos cargados negativamente y se emplean para separar sustancias básicas tales como aminas, mientras que las resinas de intercambio aniónico tienen sitios activos cargados positivamente, los cuales atraen sustancias tales como grupos fosfato, sulfonato o carboxilato que tienen carga negativa. Los compuestos iónicos o ionizables solubles en agua son atraídos por las resinas y las diferencias en afinidad producen la separación cromatográfica. El pH de la fase móvil, la temperatura, el tipo de ion, la concentración iónica y los modificadores orgánicos afectan la atracción del soluto y esas variables pueden ajustarse para obtener el grado de separación deseado⁽¹⁰⁾.

En la cromatografía de partición, las fases móvil y estacionaria se usan de diferente polaridad. Si la fase móvil es polar y la fase estacionaria no polar, la cromatografía se refiere como de fase inversa, entonces se pueden separar compuestos no polares solubles en hidrocarburos de peso molecular menor de 1000, tales como vitaminas oleosolubles y antraquinonas que pueden separarse por su afinidad con la fase estacionaria. La modificación del disolvente fase móvil polar con un disolvente menos polar causa un decremento en la afinidad y la retención de los compuestos en la columna. Si la fase móvil es no polar y la fase estacionaria es polar, entonces pueden cromatografiarse materiales polares tales

como alcoholes y aminas. La fase móvil no polar puede modificarse con un disolvente más polar para disminuir la retención y cambiar la separación⁽¹⁹⁾. Se puede cromatografiar una amplia variedad de compuestos no iónicos por cromatografía de adsorción mediante la elección de las fases móvil y estacionaria apropiadas⁽¹⁹⁾.

3. CONCEPTOS BASICOS

Consideraremos brevemente algunos términos básicos empleados en CLAE necesarios para comprender el funcionamiento del sistema⁽²²⁾:

Lo que se pretende en cualquier proceso operacional, es la capacidad de obtener resolución, que es una medida del grado de separación de un sistema de dos componentes:

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

Está definida como la distancia entre los centros de los picos de dos picos divididos entre el promedio del ancho de la base de los picos.

La resolución está íntimamente relacionada con la selectividad, la eficiencia y la capacidad de la columna:

$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{1}{\alpha} - 1 \right) (N) \left(\frac{k'}{1+k'} \right)$$

donde:

α = retención relativa

$$\alpha = \frac{V_2 - V_0}{V_1 - V_0}$$

N = número de platos teóricos

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

k' = factor de capacidad

$$k' = \frac{V_1 - V_0}{V_0}$$

α relaciona la separación pico a pico de dos componentes y es una medida de las diferencias termodinámicas en su distribución. Cuando $\alpha=1$, la resolución es cero. Las columnas con valores suficientemente altos, pueden proporcionar excelente separación.

El número de platos teóricos, N, es una medida de la difusión de la banda de un pico a través del sistema cromatográfica. A menor difusión de la banda, es más alto el número de platos teóricos. Es una medida de qué tan bien o mal está empacada la columna. Cuando se trata de una separación difícil, se requiere de columnas de alta eficiencia para obtener resolución satisfactoria.

El factor de capacidad, k', puede interpretarse como la retención de un componente en términos de volúmenes. A mayor valor de k', mayor es la capacidad de la columna y más retenido será el pico. En esencia, esperaríamos valores pequeños de k' para separaciones a alta velocidad, pero valores altos de k' para mejor resolución. k' se puede controlar variando la fuerza del disolvente.

Otra medida de la eficiencia de la columna es la altura equivalente a un plato teórico, (HETP) AEPT, este término se calcula dividiendo la longitud de la columna entre el total del número de platos teóricos. Se considera una buena columna cuando AEPT está entre 0.04 y 0.3 mm. Si una columna tiene buena eficiencia, para N debe corresponder un valor alto y para AEPT un valor bajo⁽²¹⁾.

Otro término empleado comúnmente es el tiempo de retención, t_r , que es el tiempo que una muestra requiere para eluir. Este se mide desde el momento de la inyección hasta el máximo del pico, y es característico para cada muestra según el sistema empleado⁽²²⁾.

4. COMPONENTES DE UN SISTEMA CLAE

El cromatógrafo de líquidos consiste básicamente de un sistema de bombeo, el inyector, la columna cromatográfica, el detector, el integrador y el registrador.

4.1 BOMBA

Los sistemas de bombeo de alta presión liberan el disolvente de la fase móvil del reservorio hacia y a través de la columna.

4.2 INYECTOR

Respecto al inyector, existen dos medios para introducir el analito en la columna, son la inyección en una corriente de flujo y una inyección "deteniendo el flujo". Estas técnicas pueden emplearse tanto con una jeringa o con una válvula de inyección. Para la técnica de inyección con jeringa se usa un septum a la cabeza de la columna donde las presiones son menores de 70 atm (alred. 1000 psi). A altas presiones se puede usar una válvula para introducir la muestra. Algunos sistemas con válvula incorporan un *loop* calibrado que es cargado con una muestra, la cual se transfiere por el sistema de válvula a la corriente del flujo de la fase móvil. Otros sistemas de válvula permiten la introducción del analito a una cavidad usando una jeringa. La

cavidad cargada es entonces cambiada hacia la corriente de alta presión por el sistema de válvula. En la técnica de "deteniendo el flujo", se detiene el flujo de la columna y la inyección se hace a presión ambiental. Después de inyectar el analito se reinicia el bombeo. La alta presión se reestablece rápidamente. Tiene la ventaja de poder usarse a cualquier presión, proporciona mejor reproducibilidad de inyección que con el uso de un septum, y se elimina el problema del deterioro del septum por los disolventes⁽⁴⁹⁾.

4.3 COLUMNAS

Un tipo de soporte o fase estacionaria empleado en estos empaques consiste de micropartículas de 30 a 50 μm de diámetro con un centro sólido y una fina capa porosa. Algunos de esos materiales pelliculares pueden pre-activarse para darles propiedades adsorptivas, mientras que otros se recubren con una fina película de fase estacionaria para las separaciones de partición o intercambio iónico. La fase estacionaria puede ser un líquido o un polímero, estar recubierta o químicamente enlazada a la superficie del soporte en una película fina que reduce la resistencia a la transferencia de masa para obtener un rápido equilibrio entre la fase móvil y la fase estacionaria. Una fase estacionaria líquida puede ser grandemente inmiscible en la fase móvil; usualmente es necesario pre-saturar la fase móvil con la fase estacionaria líquida para prevenir el deterioro de la fase estacionaria de la columna. Las fases estacionarias recubiertas con polímero son más durables. Las fases estacionarias que han sido químicamente enlazadas al soporte proporcionan mayor conveniencia para el uso

con una diversidad de disolventes y a temperaturas elevadas. Otras, con material de empaque con diámetro más pequeño, de 3 a 10 μm , son completamente porosas y dan separaciones mucho más eficientes.

Las columnas normalmente usadas para separaciones analíticas tienen diámetros internos pequeños (2-4 mm); las columnas de diámetros más grandes se usan para etapas preparativas. Las columnas pueden calentarse para dar separaciones más eficientes, pero raramente se emplean a temperaturas mayores de 60°C porque se degrada la fase estacionaria o porque se volatiliza la fase móvil. Normalmente, la columna se mantiene a temperatura ambiente⁽¹⁹⁾.

Dado que la columna es el corazón de un sistema cromatográfico, es importante darle un buen mantenimiento⁽²⁰⁾; para ello se recomiendan las siguientes precauciones:

- Proteger la columna de la vibración o golpes.
- No sobrepasar el límite de presión recomendado:
 - 3500 psi (columnas de acero)
 - 2000 psi (cartuchos)
- No someter la columna a cambios bruscos de presión. No cambiar la velocidad de flujo en incrementos mayores de 0.5 ml/min.
- Proteger la columna de cambios rápidos en composición de disolventes.
- Evitar usar fases móviles con pH muy ácido o muy alcalino: intervalo de pH óptimo: 3.5-6.5 .
- Nunca usar soluciones reguladoras de citrato porque éste disuelve la sílica del empaque de la columna.
- Evitar usar carbonato de amonio, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, pues su pH es demasiado alto.

- Evitar usar fases móviles o muestras, sin filtrar.
- Usar agua grado cromatográfico. El agua deionizada no se recomienda porque contiene contaminantes orgánicos que pueden alterar la eficiencia de la columna.
- Evitar la precipitación. Asegurar que la precipitación no ocurra cuando la muestra se inyecta en la fase móvil.
- Evitar pasar disolventes incompatibles, por ejemplo cloroformo/agua (Ver tabla 1 para la compatibilidad).
- Separar las columnas que se usan con sistemas PIC y no PIC (formadores de par iónico).
- Asignar las columnas a aplicaciones específicas. Cambios constantes de muestras y disolventes pueden causar contaminación y pérdida de resolución más rápida.
- Proteger la columna usando una pre-columna.
- Cuando las columnas dejan de usarse un máximo de 72 horas, no requieren almacenarse.
- No almacenar las columnas con agua sola ya que esto promueve la contaminación microbiana.
- Almacenar las columnas en una solución metanol/agua (50:50).
- No dejar las columnas con soluciones reguladoras. Lavar con agua y después con un disolvente compatible.
- Regresar la columna a su caja con los tornillos finales bien apretados para evitar que se seque.
- Es conveniente determinar la eficiencia de la columna (nueva o en uso). Para ello se recomienda lo siguiente:

CONTROL DE USO DE COLUMNAS

COLUMNA No. _____

USO: _____

INICIO DE USO: _____

PRINCIPIO(S) ACTIVOS(S) ANALIZADO(S): _____

FECHA	TIEMPO DE USO	FASE MOVIL	PRESION	TIEMPO DE RETENCION	ANALISTA	OBSERVACIONES

FORMATO 1

NOTA: El proveedor garantiza la eficiencia, selectividad y resolución de cada columna. Cualquier reclamación deberá efectuarse en un lapso menor a 30 días a partir de la fecha de entrega.

Antes de realizar el primer análisis en la columna nueva, se vuelve a realizar la separación de la muestra de prueba señalada por el proveedor. Determinar el número de platos teóricos cuando la columna se recibe y, periódicamente, ya que es útil para monitorear el estado de la columna. La periodicidad de la prueba dependerá del uso que tenga, o cada mes. Registrar los datos en una bitácora adecuada.

4.3.1 PROCEDIMIENTOS PARA DETERMINAR LA EFICIENCIA DE LA COLUMNA

A) Cálculo del número de platos teóricos

- 1.- Conectar la columna sólo a la bomba.
- 2.- Humectar la columna con el disolvente adecuado durante el tiempo determinado.
- 3.- Anotar la presión obtenida a estas condiciones.
- 4.- Conectar la columna a todo el sistema.
- 5.- Equilibrar la columna con la fase móvil indicada por el proveedor durante 30 min a un flujo de 1 ml/min o hasta que la línea base sea estable.
- 6.- Colocar el aparato en las condiciones de operación que señala el proveedor (velocidad de flujo, longitud de onda, AUFS, atenuación, etc.)
- 7.- Inyectar la solución de prueba por lo menos 6 veces.
- 8.- Calcular el número de platos teóricos con el pico y el método

que el proveedor señale.

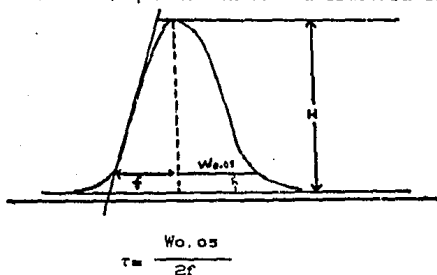
9.- Comparar el resultado obtenido con las especificaciones del proveedor. Si no cumple, dar aviso inmediatamente para efectuar la devolución de la columna.

10.- Determinar el número de platos teóricos regularmente ya que ello da una idea del declive gradual de la resolución de la columna y proporciona información de la vida de la columna por costo de análisis.

11.- Si la columna cumple con los valores de N, aceptarla y darla de alta.

B) Cálculo de la asimetría

Otro dato que refleja la eficiencia de la columna es la asimetría, que nos indica la simetría del pico.



donde:

r = factor de asimetría

$W_{0.05}$ = ancho del pico al 5 % de su altura medida desde la base.

f = ancho del pico medido desde la línea que lo divide pasando por el vértice y la línea tangente.

Para que la forma del pico se considere aceptable, el valor de r no debe exceder de 1.4

C) Determinación del factor de capacidad, k'

Se puede determinar también el factor de capacidad, k' , que para columnas μ Bondapak C18 nuevas debe estar entre 4.5-8.0

Después de probar la eficiencia de la columna, se recomienda:

A) Asignar a cada columna, el número que la identifique.

B) Llevar una hoja de registro de la columna (Ver Formato 1).

C) Anotar los datos que se proponen en el formato, cada vez que se utilice la columna.

4.3.2 PROCEDIMIENTO PARA LIMPIEZA DE COLUMNAS

La fuerte afinidad de los organosilanos por compuestos orgánicos frecuentemente promueve la contaminación de la columna por excipientes que no eluyen bajo las condiciones empleadas para la muestra. El paso continuo de esos materiales da como resultado pérdida de resolución y capacidad. La limpieza cuidadosa de la columna podría restaurarla a su condición original.

Si se está usando un sistema simple metanol/agua, un enjuague con metanol puede ser suficiente. Si se están usando soluciones reguladoras, éstos deben quitarse con agua antes de la adición de metanol o cualquier otro disolvente orgánico. Conviene pasar 100 ml de agua a un flujo de 1 ml/min y después 30 ml de una mezcla metanol/agua (50:50). Dejar la columna lavándose con agua durante toda la noche una vez a la semana. Cuando no se tienen estas precauciones, las soluciones reguladoras pueden precipitar en el instrumento, en las conexiones de la columna, en el inyector y en el detector.

COMPATIBILIDAD COLUMNA/DISOLUENTE

TIPO DE COLUMNA	DISOLVENTES COMPATIBLES	DISOLVENTES DE ALMACENAJE	DISOLVENTES INCOMPATIBLES
FASE NORMAL	HEXANO CLOROFORMO DE METILENO ISOPROPANOL THF*	HEXANO HEPTANO	AGUA METANOL
FASE INVERSA	AGUA METANOL ACETONITRILLO	METANOL	DISOLVENTES CON pH < 2 o pH > 7.5
FASE UNIDA POLAR	DISOLVENTES PARA FASE NORMAL E INVERSA	HEXANO HEPTANO	DISOLVENTES CON pH < 2 o pH > 7.5
INTERCAMBIO IONICO	SOLUCIONES AMORTIGUADORAS	METANOL	DISOLVENTES CON pH < 2 o pH > 7.5

* THF= TETRAHIDROFURANO

TABLA No. 1

VOLUMENES DE PURGA PARA COLUMNAS

DIMENSIONES DE LA COLUMNA (cm X cm)	VOLUMEN RECOMENDADO (ml)
2.8 X 38	8.8
3.9 X 15	15.8
4.8 X 38	38.8
7.8 X 38	128.8

TABLA No. 2

REGENERACION DE COLUMNAS

FASE NORMAL

FASE INVERSA

<C18, CN>

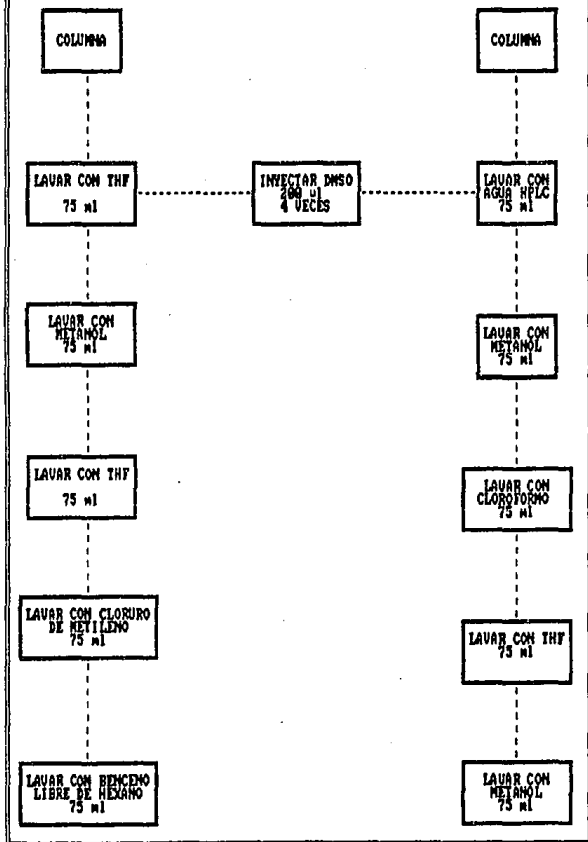
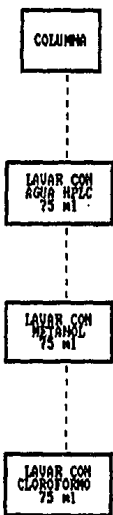


FIGURA 1

REGENERACION DE COLUMNAS

INTERCAMBIO IONICO

AX
ANIONICA



CX
CATIONICA



INYECCION DMSO
100 µl
4 VECES

FIGURA 2

Si la columna no se regenera por un enjuague simple con metanol o acetonitrilo, entonces se puede emplear dimetilformamida (DMF) o dimetilsulfóxido (DMSO). Para limpiar una columna C₁₈ o fenilo de 2 mm ID x 61 cm, generalmente se requerirá lavar con 25 a 50 ml de DMF a un flujo de 1-2 ml/min ⁽²³⁾ (Ver tabla No. 1 y No. 2).

Si se trabaja con grasas, lavar con tetrahidrofurano (THF) a un flujo de 0.5 ml/min a 35°C durante 3 horas.

Si se sospecha de contaminación con proteínas, lavar con agua, después con urea 8 M, y posteriormente enjuagar otra vez con agua. Este procedimiento en general limpia y regenera la columna.

Si se han inyectado muestras en plasma, lavar con agua, metanol, cloroformo, pasando 50 ml de c/u a un flujo de 1.5 ml/min. La frecuencia de este lavado tendrá que determinarse de acuerdo a la experiencia ⁽²³⁾.

4.3.3 PROCEDIMIENTO PARA MANTENIMIENTO DE COLUMNAS

Cuando se notan anomalías en el sistema cromatográfico, como presión alta, picos deformes, picos cortos, pérdida de resolución, etc., la columna se repara por: regeneración, lavado o reemplazo de filtro, reemplazo de material de empaque. La frecuencia depende de la proporción en que disminuya la eficiencia de la columna.

Para cada tipo de columna existe un procedimiento de regeneración. Después de realizarlo, determinar el número de platos teóricos.

NOTA: Antes de iniciar la regeneración de una columna, se debe lavar ésta durante toda la noche con un disolvente fuerte; por ejemplo, para fase inversa usar acetonitrilo o THF a un flujo de 0.5 ml/min o menor, si la presión es demasiado alta (Ver Fig. 1 y

Fig. 2).

Para lavar o reemplazar el filtro: quitar la tuerca de la columna, después se remueve el "frit" sin disturbar el empaque y al final se lava o se reemplaza el "frit". Para lavar el "frit" primero se enjuaga con agua y después se hierve por una hora en una mezcla de ácido nítrico/agua (50:50) o se sonica en agua, ác. nítrico 6N, agua y metanol, por 5 min en cada uno. Se procede a probar la columna.

Otro procedimiento es el reemplazo del material de empaque (ésto puede disminuir la resolución de la columna): remover la tuerca de la columna y quitar, con una espátula pequeña, el empaque contaminado - a simple vista se ve oscurecido-, con cuidado de no tocar la pared interna de la columna. Después se humedece el empaque nuevo con metanol y ya humedecido, se coloca en la columna formando una "montañita". Colocar las tuercas de la columna. Probar la columna.

4.4 DETECTORES

Los detectores comúnmente usados incluyen el fotómetro ultravioleta, el refractómetro diferencial y el fluorómetro. El fotómetro U.V. de baja presión de mercurio es un detector común y estable, pero cuando se cuenta con detectores de longitud de onda fija, su uso está limitado a la detección de materiales que absorben radiación a una longitud de onda de 254 nm. Su límite de sensibilidad a los compuestos que absorben fuertemente luz U.V. puede ser alrededor de 1 ng. Los compuestos que no absorben luz a 254 nm apreciablemente, con frecuencia son convertidos a derivados que absorben a esta longitud de onda; de esta forma se incrementa

el intervalo de aplicabilidad del detector de longitud de onda fija. La introducción de espectrofotómetros equipados con microceldas y detectores capaces de operar a longitudes de onda adicionales ha extendido el margen de la detección U.V.

Los detectores de refractómetro diferencial, determinan la diferencia entre los índices de refracción del disolvente puro y el de la muestra en el disolvente. Entre los más aplicables es el menos sensible con un límite de detección de alrededor de 1 μg y responde a cambios pequeños en la composición del disolvente, velocidad de flujo y temperatura, de tal forma que se requiere de una columna y de flujo de fase móvil de referencia para dar una línea base satisfactoria.

El fluorómetro es un detector sensible para compuestos que son inherentemente fluorescentes o que pueden ser convertidos a derivados fluorescentes, ya sea por transformación química de los compuestos o por acoplamiento con reactivos fluorescentes a grupos funcionales específicos.

Con algunos reactivos, la derivatización se lleva a cabo antes de la separación cromatográfica de los derivados. En otros casos, el reactivo se introduce dentro del reservorio y el eluyente reacciona con el analito *in situ*, y entonces el derivado se expone al detector.

Un detector electroquímico que emplea electrodos de carbón blando, montados en una celda de película fina de volumen muy pequeño, se puede emplear ventajosamente para medir cantidades muy pequeñas (1 ng) de compuestos fácilmente oxidados; particularmente fenoles y catecoles.

En general, la señal del detector se amplifica antes de pasar al registrador, el cual, usualmente corresponde a un registrador potenciométrico con carta, donde se grafica la señal contra el tiempo. La señal puede ir también a un integrador digital electrónico para la medición automática de las áreas del pico del cromatograma⁽⁴⁹⁾.

4.5 FASE MOVIL

La composición de la fase móvil influye de manera significativa en la eficiencia cromatográfica y debe ser controlada cuidadosamente. La composición puede tener un mayor efecto que la temperatura sobre el factor de capacidad. En la cromatografía de adsorción y partición, la fase móvil puede modificarse con otro disolvente, mientras que en la cromatografía de intercambio iónico tanto el pH como la fuerza iónica y la modificación del disolvente, pueden cambiar los factores de capacidad. La técnica de cambio continuo de composición de disolvente durante la corrida cromatográfica es llamada gradiente de elución o programación del disolvente, y algunas veces se emplea para cromatografiar muestras complejas con componentes con factores de capacidad diferentes. Los detectores que son sensibles a cambios en la composición de disolvente, tal como el refractómetro diferencial, son más difíciles de usar con la técnica de gradiente de elución⁽⁴⁹⁾.

En cromatografía de líquidos, la fase móvil es relativamente no compresible. La difusión en la fase móvil es extremadamente baja. Debido a esta baja difusión en la fase móvil, se hace posible la cromatografía de líquidos de alta velocidad. Además, los efectos de temperatura son sólo de importancia secundaria y la resistencia

a la transferencia de masa en un líquido es muy alta⁽²³⁾. Por lo tanto, es de fundamental importancia la calidad de los disolventes empleados en la fase móvil.

Los disolventes usados en CLAE deben ajustarse a algunos otros criterios, además de ser disolventes apropiados para cromatografía. Los requisitos del disolvente para obtener una buena cromatografía son^(22,23):

1.- La filtración del disolvente antes de que entre al sistema cromatográfico es importante, ya que la contaminación de la bomba por partículas daña el funcionamiento de las válvulas, ocasionando fugas de la fase móvil. Esto cambia la velocidad de flujo y reduce la reproducibilidad de los tiempos de retención y de las áreas de los picos. Además, las partículas pueden rayar la superficie del pistón de la bomba; por eso, es recomendable que todos los disolventes se filtren antes de entrar a la bomba. Para este efecto, se coloca un filtro de acero inoxidable o teflón de 0.5 μm en el recipiente que contiene la fase móvil. Este filtro debe limpiarse frecuentemente ya que con el tiempo se acumulan partículas que evitan el paso del disolvente. Como precaución adicional, se puede colocar un filtro antes de entrar a la columna⁽²²⁾.

2.- Los disolventes deben ser de gran pureza para no dañar la columna con las impurezas ni provocar interferencias con el análisis, otras consideraciones importantes son: costo, viscosidad, toxicidad y punto de ebullición.

3.- La muestra debe ser soluble en la fase móvil. Si esto no es, la muestra puede precipitarse y tapan la columna.

4.- La polaridad del disolvente debe controlarse para producir valores de k' entre 1 y 10. Valores de k' menores de 1, indican que la muestra casi no es retenida por la fase estacionaria de la columna y dan como resultado, separaciones muy pobres. Valores de k' mayores de 10 indican que la muestra se retiene excesivamente por la fase estacionaria y dan como resultado un tiempo de análisis muy largo. Por estas razones, es necesario ajustar el valor de k' mezclando disolventes de diferentes polaridades.

5.- Los disolventes que se emplean para separaciones por gradiente de elución, deben estar libres de impurezas que absorben al U.V. Es de primordial importancia correr un blanco del gradiente para asegurar que los picos en el cromatograma no son de los disolventes. El uso de disolventes de alta calidad resuelven muchos de los problemas de impurezas.

6.- El agua destilada es uno de los disolventes más difíciles de obtener en alta pureza para utilizarse como componente de fase móvil. Normalmente requiere purificación para remover materia orgánica. El agua destilada también promueve el crecimiento de bacterias, por lo que no deberá guardarse por largo tiempo sin redestilarla o filtrarla para eliminar bacterias. El agua también absorbe dióxido de carbono del aire, el cual altera el pH. Se debe tener cuidado para evitar este problema.

7.- Las soluciones reguladoras pueden ser un problema debido a las impurezas que se encuentran en las mismas. En algunos casos las impurezas pueden eliminarse con un adsorbente. Otro planteamiento sería considerar que la calidad de la solución reguladora podría mejorarse por la compra de materiales de muy

8.- Los conservadores se usan en muchos disolventes tales como el THF, cloroformo, etc., y ellos pueden alterar las características de los disolventes. La mejor solución al problema es adquirir disolventes libres de conservadores. Otra opción es destilar los disolventes, pero tomando especial cuidado de investigar el peligro que involucra el quitar los conservadores⁽²⁸⁾.

Los sistemas de disolventes más comunes son:

a) Para la cromatografía de adsorción, los disolventes más frecuentemente utilizados son el hexano, cloruro de metileno, cloroformo, metanol y acetonitrilo. Comúnmente se usan mezclas binarias de éstos para obtener un valor de k' favorable.

b) Para los empaques de fase inversa, los sistemas más usados son metanol/agua y acetonitrilo/agua.

c) Para intercambio iónico, el disolvente es agua. Generalmente se usan soluciones amortiguadoras a pH y fuerza iónica controlada. En la cromatografía de intercambio iónico se usa comúnmente la elución por gradiente, la cual se programa para el cambio de pH y fuerza iónica del disolvente durante el análisis.

5.- PROCEDIMIENTO DE ANALISIS

No nos detendremos en los procedimientos a detalle para identificación y cuantificación de compuestos ya que actualmente se emplean integradores electrónicos o computarizados. Para un trabajo cuantitativo exacto, es necesario que el detector tenga un intervalo de trabajo dinámico lineal amplio y que los componentes a medir estén separados de cualquier sustancia de interferencia. El intervalo dinámico lineal está definido como el intervalo del tamaño de muestra mínimo detectable, al máximo tamaño de muestra

sobre el cual el detector tiene una señal de respuesta; por ejemplo, los picos de respuesta en la carta del registrador son linealmente proporcionales a la concentración de la muestra. Para máxima flexibilidad en un análisis cuantitativo, el intervalo debe estar alrededor de tres órdenes de magnitud. Tanto la altura como el área del pico pueden estar relacionados a la concentración de la muestra. Las alturas de los picos son fáciles de medir, pero están influenciadas grandemente por los cambios en los tiempos de retención causados por variaciones en la temperatura y en la composición de los disolventes. Por estas razones, generalmente las áreas están consideradas como un parámetro más exacto para la cuantificación. La respuesta del detector puede calibrarse relacionando áreas o alturas de picos de respuesta a una concentración conocida de sustancia de referencia, empleando un procedimiento tanto de estandarización interna o externa.

Una desventaja del método de calibración externa radica en que al comparar directamente los picos de respuesta obtenidos de la cromatografía de la muestra y una concentración conocida de la sustancia de referencia, es que la exactitud y la precisión dependen de la reproducibilidad de la inyección del analito. Puesto que la reproducibilidad de la inyección a altas presiones puede variar considerablemente, los mejores resultados cuantitativos usualmente se obtienen cuando se usa el método de calibración interna. Un estándar interno de concentración conocida se adiciona tanto a la muestra como a la sustancia de referencia de concentración conocida, y se comparan las relaciones de los picos de respuesta del fármaco con las del estándar interno.

6. ADECUABILIDAD DEL SISTEMA (SYSTEM SUITABILITY)

El objetivo de validar un método analítico es obtener los mejores resultados posibles. Por ello todas las variables deben ser consideradas. El empleo de aparatos más complejos para los análisis, impone tener bajo control su eficiencia. La calidad de los resultados dependerá de cómo se usan los instrumentos. Es por ello que es necesario realizar prueba de "adecuabilidad del sistema"^(12,15,19)

Con respecto a la Cromatografía de Gases y a la CLAE, el problema ya se ha hecho objeto de particular atención por parte de las Farmacopeas. Estas técnicas requieren un sistema constituido de partes fijas (termostatos, bombas, detectores, muestreador, etc.) como ya lo hemos citado arriba, y de partes sustituibles (columnas, gas, etc.)⁽¹²⁾.

La sustitución de estas partes viene realizada por programación y esto ya nos dice que el sistema está sujeto a variaciones con el tiempo. Las respuestas diferentes pueden derivar de columnas de proveniencia diversa. De aquí la necesidad de fijar parámetros que garanticen que el sistema, al momento del análisis, responde a los requisitos fijados cuando se hizo la validación del método. La prueba de adecuabilidad del sistema puede definirse como la medida de la respuesta del sistema en un determinado día, entendiéndose como sistema los componentes del "hardware", los disolventes y la electrónica, considerados todos en conjunto⁽¹⁵⁾.

definido, son:

- a) N, número de platos teóricos, o bien, forma del pico.
- b) R, factor de resolución entre dos picos.
- c) τ , factor de simetría.
- d) C.V., coeficiente de variación o desviación estándar relativa del sistema, que se expresa como la reproducibilidad.

La USP XXII especifica también: el t_r , tiempo de retención, naturaleza de la curva de calibración, respuesta y recobro y aclara que estos parámetros deben ser respetados no sólo al momento de la realización del método, sino que deben ser controlados con el tiempo y garantizados cada vez que se aplica el método⁽¹²⁾.

Un parámetro empleado es la reproducibilidad de las réplicas de las inyecciones de la solución analítica. La reproducibilidad de las réplicas de las inyecciones está mejor expresada como la desviación estándar relativa. Para calcularla, se emplean datos de 5 réplicas de cromatogramas, cuando el límite establecido para la DER es 2 % o menos, y datos de 6 réplicas de cromatogramas, cuando el límite establecido de la DER es más de 2 %⁽¹³⁾.

Según la Ph. Eur., N debe ser superior a 600 y $R \geq 1$.

Para CLAE, la Ph. Eur. hace algunas indicaciones que es útil remarcar:

- Se acepta usar para el análisis la medida de la altura de los picos sólo si $0.8 \leq \tau \leq 1.2$ (τ =factor de simetría)
- Si se usa la técnica de gradiente, se puede utilizar sólo el

- Si se usa la técnica de gradiente, se puede utilizar sólo el valor de las áreas (no las alturas de los picos).

Si el sistema se emplea rutinariamente para el mismo análisis, puede ser suficiente una prueba abreviada seguida a intervalos de tiempo establecidos (por ejemplo, determinando el C.V. y R)⁽¹²⁾.

Si se trata de análisis por CLAE que requieren el empleo de estándar interno y la determinación de dos componentes activos (A y B), los C.V. se calculan sobre 6 réplicas.

Con este tipo de controles y de resultados, el sistema puede considerarse seguramente garantizado y validado en el tiempo.⁽¹²⁾

J. Guerra⁽¹⁴⁾, también afirma que cualquier modificación en el sistema integrador, tal como la adición de una interfase electrónica para la adquisición de datos analíticos, debe validarse para asegurar que los resultados son consistentes.

La documentación relativa a las pruebas de "adecuabilidad" del sistema requiere:

- la definición de los parámetros a controlar;
- los límites para estos parámetros;
- la frecuencia de los controles;
- el registro de los resultados y las conclusiones relativas.

CAPITULO 5

PARTE EXPERIMENTAL

1. OBJETIVO

Validar el método analítico por CLAE para la determinación de Loratadina en tabletas, de forma rápida y sencilla.

Las tabletas presentan la siguiente formulación:

Loratadina..... 10.0 mg

Excipiente c.b.p..... 1 tableta

Peso promedio: 100.0 mg/tab

2. SELECCION DEL METODO

Este método se seleccionó porque, en primera instancia, es el más viable, ya que al efectuar las pruebas para la determinación espectrofotométrica, se encontró que el principio activo absorbe luz U.V. en una longitud de onda en la cual no es posible asegurar reproducibilidad de resultados. Por esta razón, se optó por implementar y validar la metodología por CLAE, que además ofrece la ventaja de ser rápido, lo cual facilita el análisis de muestras que se manejarán durante la fabricación del producto.

3. ACTIVIDADES A REALIZAR

- a. - Optimización de la metodología analítica.
- b. - Preparación del placebo
- c. - Ensayos de validación (Evaluación de parámetros)
 - i. Linealidad del Sistema
 - ii. Precisión del Sistema

- iii. Linealidad del Método
 - iv. Exactitud al 100 % del Método
 - v. Especificidad del Método
 - vi. Reproducibilidad del Método
 - vii. Tolerancia
- d. - Resultados
- i. Linealidad del Sistema
 - ii. Precisión del Sistema
 - iii. Linealidad del Método
 - iv. Exactitud al 100 % del Método
 - v. Especificidad del Método
 - vi. Reproducibilidad del Método
 - vii. Tolerancia
- e. - Evaluación de los resultados
- f. - Conclusiones de la validación

4.- PROCEDIMIENTO

- a. - Optimización de la Metodología Analítica.

Sistema Cromatográfico:

Equipo:	Cromatógrafo de Líquidos Perkin-Elmer
Columna:	μ Bondapak Cis , 4 mm X 30 cm
Detector:	U.V. a 254 nm
Vol. inyección:	20 μ l
Vel. flujo:	2 ml/min
Temperatura:	Temperatura ambiente
Fase móvil:	Metanol/Fosfato de potasio 0.01 M (80:30), pH 7.8 \pm 0.2

Sensibilidad: Seleccionarla de manera que la altura del componente mayor ocupe el 60 % de la escala.

Material, reactivos y equipo empleados:

MATERIAL:

Pipetas volumétricas de 2, 3, 4, 5 y 6 ml
Matraces volumétricos de 25, 100 y 1000 ml
Mortero con pistilo
Papel glassine
Espátula de acero inoxidable
Probeta graduada de 500 ml

REACTIVOS:

Sustancia de referencia de Loratadina
Materia prima de Loratadina
Tabletas de Loratadina
Materias primas para elaboración del placebo:
 Almidón de maíz Lactosa DC
 Estearato de magnesio.
Metanol grado HPLC
Fosfato de potasio R. A.
Agua grado HPLC

EQUIPO:

Balanza analítica
Baño de ultrasonido Cole Parmer 9850
Cromatógrafo de Líquidos Perkin Elmer

Unidad CPU IBM adaptada al cromatógrafo de líquidos, para registro, integración y graficación de los datos analíticos.

Método optimizado:

* Preparación de la muestra analítica:

Pesar y moler 20 tabletas hasta polvo fino y mezclar. Pesar una cantidad de polvo equivalente a 25 mg del principio activo (250 mg de polvo) y transferirlos a un matraz volumétrico de 25 ml. Adicionar 20 ml de metanol y disolver con ayuda de ultrasonido durante 5 min. Enfriar. Aforar con metanol y mezclar. Filtrar por papel Whatman No. 1, desechando los primeros ml. Medir una alícuota de 1 ml y transferirla a un matraz volumétrico de 25 ml. Aforar con metanol. Filtrar por membrana de 0.22 μ m.

* Preparación de la sustancia de referencia:

Transferir 25 mg de la sustancia de referencia de Loratadina y llevarlos a un matraz volumétrico de 25 ml. Adicionar 20 ml de metanol y disolver con ayuda de ultrasonido durante 5 min. Enfriar. Aforar con metanol y mezclar. Medir una alícuota de 1 ml y transferir a un matraz volumétrico de 25 ml. Aforar con metanol. Filtrar por membrana de 0.22 μ m.

Para el análisis, inyectar 20 μ l de cada solución al cromatógrafo de líquidos.

Este procedimiento involucra las mínimas cantidades de material y de reactivos redundando en una significativa reducción de costos de análisis.

b.- Preparación del placebo:

Las tabletas se diseñaron para fabricarlas por el método de compresión directa, por lo que el placebo se preparó con la formulación al 100 %, mediante el tamizado y la mezcla simple de las materias primas: Almidón de maíz, Lactosa DC y Estearato de magnesio (18:71.3:0.7).

c.- Ensayos de validación (Evaluación de parámetros)

i.- Linealidad del Sistema.

Construir una curva de calibración de la respuesta del equipo contra la cantidad adicionada de principio activo, a los niveles 50, 75, 100, 125 y 150 %, partiendo de una solución Patrón, de la siguiente forma:

Pesar 25 mg de la sustancia de referencia de Loratadina y transferir a un matraz volumétrico de 100 ml. Disolver y aforar con metanol (Sol. Patrón con 250 µg/ml). Tomar el volumen de alícuota de acuerdo con la siguiente tabla y llevar a 25 ml con metanol:

Nivel %	Vol. alícuota ml	Conc. µg/ml	No. de réplicas
50	2	20	3
75	3	30	3
100	4	40	6
125	5	50	3
150	6	60	3

Injectar 20 µl de cada solución en el cromatógrafo.

Registrar los resultados de la respuesta obtenida en áreas de los picos, y calcular los valores de m, b, mr, br, r y r^2 .

ii.- Precisión del Sistema:

Tomar los resultados obtenidos con el nivel al 100 % y calcular los valores de \bar{x} , σ y el C.V.

iii.- Linealidad del Método:

Construir una curva de calibración de cantidad recuperada contra cantidad adicionada de principio activo, a los niveles : 0, 60, 80, 90, 100 y 120 %, mediante el método de adición de sustancia de referencia a placebo, de la siguiente manera:

Pesar 225 mg de placebo y transferir a un matraz volumétrico de 25 ml, para cada vez, adicionar la cantidad especificada de Loratadina de acuerdo con la tabla siguiente, proceder como indica el método de análisis (dilución 1:25).

Nivel	mg	conc.
%	adicionados	$\mu\text{g/ml}$
0	0	0
60	15	24
80	20	32
90	22.5	36
100	25	40
120	30	48

Realizar cada pesada y análisis por sextuplicado y, de ser posible, al azar. Calcular los mg recuperados, m, mr, b, br, r y r^2 .

iv. - Exactitud y Repetibilidad del Método Cal 100 %

Emplear los resultados del nivel al 100 % obtenidos en la linealidad del método y determinar el C.V.

Para todo el intervalo de concentraciones, excluyendo el 0 %, calcular el % recuperado y determinar el C.V.T.

v. - Especificidad del Método.

I. - Preparar las siguientes muestras en frascos viales de vidrio:

a) Disolver 20 mg de Loratadina en 5 ml de metanol y adicionar 2 ml de solución de HCl 1 N. Colocar a 60°C durante 2 semanas.

b) Disolver 20 mg de Loratadina en 5 ml de metanol y adicionar 2 ml de solución de NaOH 2 N. Colocar a 60°C durante 2 semanas.

II. - Evaluar periódicamente la posible degradación del principio activo mediante Cromatografía en Capa Delgada (CCD).

La fase eluente para las pruebas de CCD correspondieron a los siguientes disolventes en varias proporciones:

Tolueno:Metanol:Ac. acético glacial

Cloroformo:Metanol:Dimetilformamida

III. - En caso de encontrar degradación, someter las muestras a análisis por CLAE, con el método propuesto, para evaluar interferencias.

IV. - Determinar el % de respuesta del placebo contra la sustancia de referencia al 100 %, inyectando al cromatógrafo de líquidos y obteniendo las respuestas de la fase móvil, de la sustancia de referencia y del placebo, para identificar posibles interferencias.

vi.- Reproducibilidad del Método.

Realizar el análisis como se indica en la parte (a) de este capítulo, con 2 analistas, en 2 días diferentes, por triplicado. Calcular los mg recuperados.

Calcular el C.V. y realizar el análisis de varianza.

vii.- Tolerancia

(Estabilidad de la muestra analítica)

Para evaluar la tolerancia, emplear los datos de reproducibilidad del Método. Para la estabilidad de la muestra analítica, tomar las 3 muestras de cualquiera de los analistas, dividirías en 2 partes para obtener 6 soluciones, mantener 3 de ellas en refrigeración y las otras 3 en a la luz y temperatura ordinaria. Inyectar a las 24 horas comparando contra una sustancia de referencia recién preparada.

d.- Resultados

i.- Linealidad del Sistema.

Los resultados de las respuestas obtenidas se muestran en la tabla No. 3, referidas como áreas de los picos y se representan en la Gráfica No. 1.

Los resultados de la curva de calibración son:

$$b = -19947.4$$

$$b_r = - 0.0228$$

$$m = 8954.976$$

$$m_r = 1.0228$$

$$r = 0.9999$$

$$r^2 = 0.9998$$

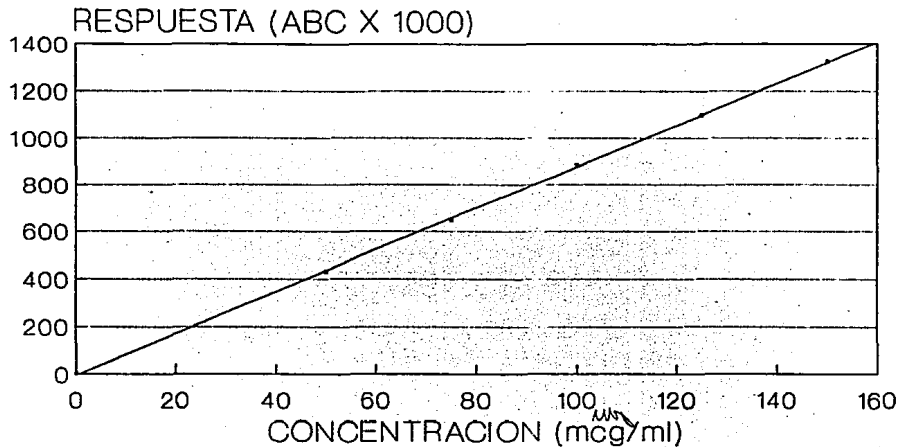
LINEALIDAD DEL SISTEMA

NIVEL x	CONC. mcg/ml	REPLICA No.	RESPUESTA ABC	y	σ	C.V. %
50	20	1	431821	429613	3670	0.854
		2	431643			
		3	425376			
75	30	1	642786	644966	6251	0.969
		2	640096			
		3	652816			
100	40	1	863064	882844	8400	0.952
		2	869652			
		3	881078			
		4	895582			
		5	886303			
		6	861385			
125	50	1	1094130	1097720	3917	0.357
		2	1097134			
		3	1101898			
150	60	1	1314473	1322600	9770	0.739
		2	1333446			
		3	1319907			

TABLA No. 3

LORATADINA

LINEALIDAD DEL SISTEMA



GRAFICA No. 1

Por los datos obtenidos se concluye que existe una relación altamente significativa entre la concentración del analito ($\mu\text{g/ml}$) y la respuesta obtenida (ABC, área bajo la curva), por lo que se infiere que el sistema es lineal en el intervalo de concentraciones especificado.

ii. - Precisión del Sistema.

Tomando el nivel al 100 % de la curva de linealidad del sistema, se tienen los siguientes resultados:

Conc. $\mu\text{g/ml}$	Réplica No.	y ABC	\bar{y}	σ	C.V. %
40	1	883064	882844	8408	0.952
	2	889852			
	3	881078			
	4	895582			
	5	886303			
	6	881385			

El C.V. es menor al 2.0 % establecido, por lo que se concluye que el sistema es preciso en la concentración trabajada (100 %).

iii. - Linealidad del Método.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla No. 4 y se representan en la Gráfica No. 2.

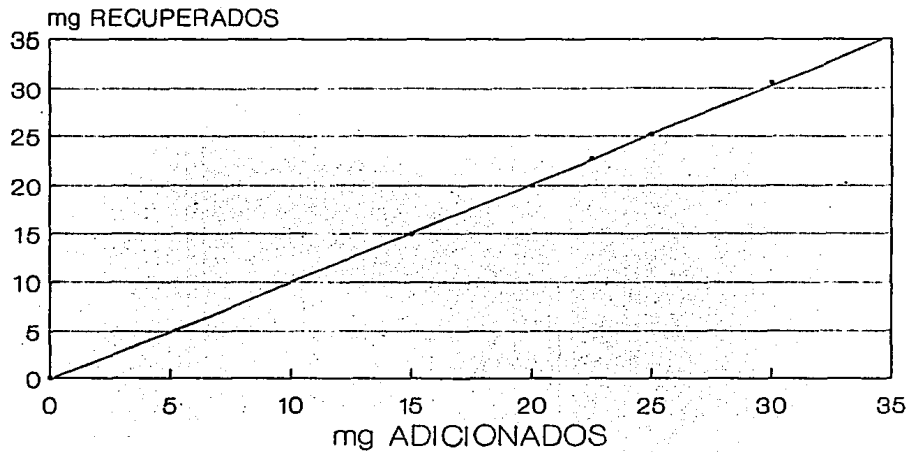
LINEALIDAD DEL METODO

NIVEL %	mg Adicionados	REPLICA No.	mg Recuperados	y	σ	C.V. %	% Recuperado
0	0	1	0	0	0	0	0
		2	0				
		3	0				
		4	0				
		5	0				
		6	0				
60	15	1	14.58	14.90	0.2806	1.8840	97.20
		2	14.56				97.07
		3	15.07				100.47
		4	14.89				99.27
		5	15.00				100.00
		6	15.27				101.60
80	20	1	19.94	19.93	0.2667	1.3301	99.70
		2	19.98				99.90
		3	19.62				98.10
		4	20.12				100.60
		5	20.30				101.50
		6	19.64				98.20
90	22.5	1	23.04	22.76	0.3998	1.7570	102.40
		2	22.75				101.11
		3	22.52				100.09
		4	23.11				102.71
		5	23.04				102.40
		6	22.08				98.13
100	25	1	25.33	25.00	0.2896	1.1540	101.32
		2	25.05				100.20
		3	25.52				102.08
		4	24.98				99.92
		5	24.78				99.12
		6	24.83				99.32
120	30	1	30.75	30.55	0.2462	0.8061	102.50
		2	30.57				101.90
		3	30.78				102.60
		4	30.10				100.33
		5	30.40				101.60
		6	30.60				102.00

TABLA No. 4

LORATADINA

LINEALIDAD DEL METODO



GRAFICA No. 2

Los resultados de la curva de calibración para la linealidad del método son:

$$b = -0.1528$$

$$b_r = -0.0081$$

$$m = 1.0145$$

$$m_r = 1.0081$$

$$r = 0.9998$$

$$r^2 = 0.9997$$

De lo anterior se infiere que existe una relación altamente significativa entre los mg adicionados y los mg de principio activo recuperados, por lo que se concluye que el método es lineal en el intervalo de concentraciones establecido.

iv. - Exactitud y Repetibilidad del Método (al 100 %)

Tomando el nivel al 100 % de la curva de Linealidad del Método, se tienen los siguientes resultados:

mg adicionados	Réplica No.	mg recuperados	\bar{y}	σ	C. V. %
25	1	25.33			
	2	25.05			
	3	25.52	25.08	0.2898	1.1548
	4	24.98			
	5	24.78			
	6	24.83			

El C. V. es menor al 2.0 % establecido, por lo que se concluye que el método es repetible en el intervalo de concentraciones especificado.

Para todo el intervalo de concentraciones:

$$\bar{x} = 100.45 \%$$

$$\sigma = 1.6412$$

$$C. V. \tau = 1.6338 \%$$

Indicativo de la exactitud del método en el intervalo propuesto.

v.-Especificidad del método.

No existe degradación significativa del fármaco, investigada por CCD, por cualquiera de los sistemas eluentes, a pesar de ser ésta una molécula con aparente susceptibilidad de hidrólisis ácida o alcalina, puesto que se trata de un éster, por lo demás estable.

Por otra parte, como se observa en los cromatogramas (Figs. 1, 2, 3 y 4), no existe interferencia del placebo, por lo que se concluye que el método es específico para los fines que se requieren.

vi.- Reproducibilidad del método.

Para evaluar este parámetro, se fabricaron lotes piloto de las tabletas con el principio activo y se analizaron por dos analistas diferentes y en dos días diferentes, por triplicado. Los resultados se muestran en la tabla No. 5. El Análisis de Varianza para determinar el efecto de los analistas y de los días sobre el análisis se representa en la tabla No. 6

$$\bar{x} = 109.10 \% \quad \sigma = 1.0907 \quad C.V. = 0.9997 \%$$

Como observamos, de acuerdo a los cálculos:

Como $F_{cal} < F_{tab}$ para la fuente de variación Analista, el analista no presenta efecto sobre la valoración.

Como $F_{cal} < F_{tab}$ para la fuente de variación Día/Analista, no existe efecto de los días para un analista en la valoración.

Por lo anterior, concluimos que el método es reproducible para los fines que se requieren.

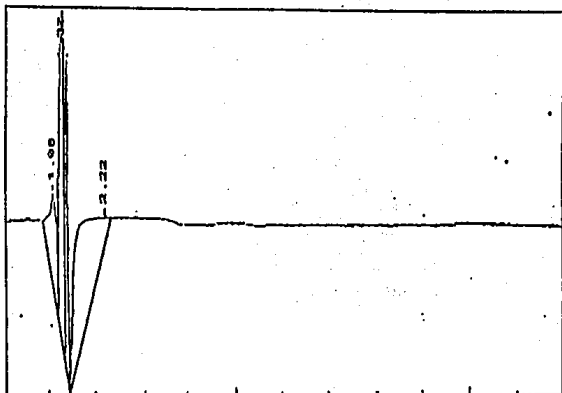


Figura 1: Cromatograma de la Fase Móvil

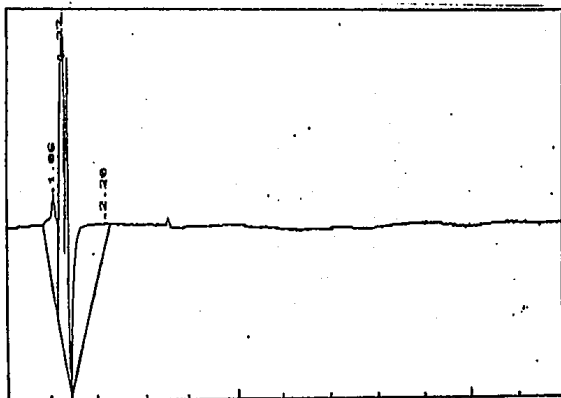


Figura 2: Cromatograma del Placebo

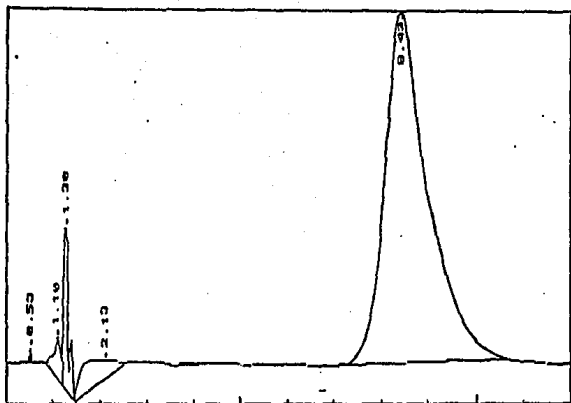


Figura 3: Cromatograma de la Sustancia de Referencia de Loratadina

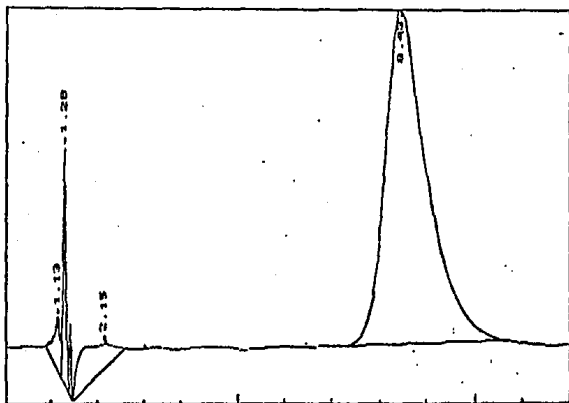


Figura 4: Cromatograma de la muestra de tabletas de Loratadina

REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

RESULTADOS EXPRESADOS EN % DE PRINCIPIO ACTIVO OBTENIDO EN LA VALORACION

		DÍA	
		1	2
ANALISTA	1	118.87	109.64
		107.54	110.24
		118.21	118.79
	2	108.94	107.75
		108.00	108.85
		108.15	109.01

TABLA No. 5

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	Fcal	Ftab
ANALISTA	1	5.8938	5.8938	8.1126	7.4891
DÍA/ANALISTA	2	1.375	0.6875	0.5257	0.8277
ERROR	8	6.6445	0.8306	-	-

TABLA No. 6

vii.- Tolerancia

(Estabilidad de la muestra analítica)

Resultados expresados en % de Principio Activo obtenido en la valoración a las 24 horas, manteniendo las muestras en las condiciones que se indica:

CONDICION		
	REFRIGERACION	TEMP. AMBIENTE
	109.96	114.52
	108.73	113.06
	108.88	111.87
\bar{X}	109.19 %	113.15 %
σ	0.6710	1.3273
C.V.	0.6146 %	1.1730 %

No existe variación significativa en las muestras guardadas en refrigeración, por lo que se recomienda que, una vez preparada la muestra, y si no se emplea inmediatamente, se conserve en refrigeración, ya que es estable en esas condiciones, durante el tiempo establecido en este estudio.

Con respecto a las muestras mantenidas a temperatura ambiente, se nota casi un 4% de incremento en la concentración del principio activo con respecto a la inicial, pero esto puede deberse a la evaporación del disolvente.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

- 1.- Hasta el momento no existe sustancia de referencia USP ni Nacional de Loratadina, por lo que, para realizar este trabajo, se procedió a estandarizar materia prima contra una sustancia de referencia proporcionada por el proveedor de la misma.
- 2.- En relación a la controversia que existe en utilizar, en la Validación de Métodos Analíticos, lotes piloto, lotes preparados manualmente o lotes de la producción real, para la preparación del placebo; en este caso, no existe diferencia entre el placebo preparado manualmente y las tabletas ya que se trata de un proceso por compresión directa. Prueba de ello es el resultado de la evaluación de la exactitud del método. Si se tratara de granulación y secado, tal vez se presentaría alguna modificación en las propiedades de las tabletas tales como la liberación y/o disolución del fármaco.
- 3.- Se consideraron las concentraciones 0, 60, 80, 90, 100 y 120% para la construcción de la curva de calibración para la Linealidad del Método, porque inicialmente se consideró la posibilidad de desarrollar el método analítico indicador de estabilidad; sin embargo, se decidió no emplearlo para dicho fin específico, debido a que la Loratadina es una molécula muy estable. Por otra parte, con las concentraciones propuestas, se

trabaja en un intervalo más amplio de concentraciones, lo cual es conveniente ya que muchas veces no se cumple con la Ley de Lambert-Beer en el intervalo señalado.

4.- Se realiza el cálculo de la pendiente relativa (m_r) y del intercepto relativo (b_r), en las curvas de calibración para la Linealidad, para la ponderización de unidades, ya que en la curva de Linealidad del Sistema las unidades son diferentes. En la curva de Linealidad del Método no es tan necesario este cálculo, puesto que las unidades de ambas variables son las mismas.

5.- Respecto al 0% en la Linealidad del Método; se introdujo esta "concentración" para evaluar la especificidad del método en relación al efecto del placebo. Se realizó por sextuplicado con el fin de tener un criterio aplicable estadísticamente válido sobre la respuesta.

6.- En la Linealidad del Método se propone realizar las pruebas al azar para determinar la variabilidad día-día del analista, efectuando -al mismo tiempo-, ensayos sobre la tolerancia del sistema y del método de análisis.

7.- Las pruebas de degradación del fármaco y su interacción con los excipientes se realizaron durante la fase de desarrollo de la formulación, sin encontrar inestabilidad o incompatibilidad. En estas pruebas se basó la especificidad del método, ya que no se encontraron referencias sobre la degradación del fármaco.

8. - La Reproducibilidad del Método se realizó con un lote piloto de tabletas elaboradas con un 10 % de exceso teórico del principio activo en el polvo comprimido; así también, al evaluar la recuperación de la cantidad adicionada, se certifica que el método funciona como se esperaba, dando una idea también de la eficiencia del proceso de fabricación. Se puede decir que éste es otro ensayo sobre la tolerancia del método analítico propuesto.
9. - El Método de Análisis Rutinario de Control de Calidad para cuantificar Loratadina en tabletas es Lineal, Exacto, Preciso, Específico, por lo que se le considera apropiado para lo que fue diseñado.
10. - Con respecto a la tolerancia del método y estabilidad de la muestra analítica, es recomendable almacenar la muestra preparada a bajas temperaturas (preferentemente en refrigeración) con el fin de evitar pérdida de disolvente por evaporación. Si se desea inyectar la muestra después de 24 horas, es necesario preparar una sustancia de referencia en el momento de la determinación.
11. - Aún no existe ninguna Norma Oficial o Norma Voluntaria Mexicana (NOM- o NMX-) que legisle la calibración de sistemas CLAE, así que nos guiamos por criterios de quienes poseen mayor experiencia en este campo.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

APENDICE A:

CALCULOS ESTADISTICOS

CALCULOS ESTADISTICOS

Las pruebas estadísticas se refieren de acuerdo al concepto establecido:

Linealidad del Sistema

La relación entre cantidades adicionadas de principio activo y la respuesta obtenida por el sistema: cromatográfico (CLAE, CO), volumétrico, gravimétrico, absorciométrico, etc., debe ser una función lineal del tipo:

$$y = b + mx + \epsilon$$

donde:

y = respuesta obtenida

b = ordenada al origen

m = pendiente (coeficiente de extinción, título, etc.)

x = cantidades adicionadas de principio activo (pesadas independientes, diluciones)

ϵ = error del sistema ($\sigma_{y/x}$)

Estimación de b y m por el método de mínimos cuadrados.

Fórmulas empleadas:

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

$$b = \frac{(\sum y) - (\sum x)(\sum xy) / \sum x}{n} = \frac{\sum y - m \sum x}{n}$$

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

$$\hat{y} = b + mx$$

donde:

m = estimado de la pendiente

b = estimado de la ordenada al origen

$S_{y/x}$ = estimado de $\sigma_{y/x}$ (desviación estándar de la regresión)

\hat{y} = estimado de la respuesta a partir del modelo de regresión dado x

DEFINICION DE m:

Es la relación de cambio de la respuesta dada con respecto al cambio de la cantidad de principio activo.

Inferencia:

* Límites del intervalo de confianza:

$$m \pm t_{0.975, n-2} \cdot S_{Y/X} \sqrt{\frac{1}{\sum X^2 - (\sum X)^2 / n}}$$

donde:

$t_{0.975, n-2}$ = valor de t de Student con área bajo la curva de 0.975 y n-2 grados de libertad.

* Prueba de hipótesis:

$$H_0: m = m_0$$

$$H_1: m \neq m_0$$

Realizamos la prueba para $m_0 \neq 0$ ya que en un sistema de medición adecuado, al variar la cantidad adicionada debe variar la respuesta obtenida.

* Distribución muestral: distribución t de Student con n-2 grados de libertad.

$$t = \frac{m - m_0}{S_{Y/X} \sqrt{\frac{1}{\sum X^2 - (\sum X)^2 / n}}}$$

* Estadígrafo de contraste:

$$t_{\text{CAL}} = \frac{m}{S_{Y/X} \sqrt{\frac{1}{\sum X^2 - (\sum X)^2 / n}}}$$

DEFINICION DE b_1

Inferencia:

* Límites del intervalo de confianza:

$$b \pm t_{0.975, n-2} \cdot S_{y/x} \sqrt{\frac{\bar{x}^2}{\sum x^2 - (\sum x)^2} + \frac{1}{n}}$$

donde:

$t_{0.975, n-2}$ = valor de t de Student con área bajo la curva de 0.975 y $n-2$ grados de libertad.

* Prueba de hipótesis:

$$H_0: b=b_0$$

$$H_1: b \neq b_0$$

Realizamos la prueba para $b_0=0$ ya que en teoría muchos sistemas dan respuesta cero a concentración cero. En esta prueba se busca que H_0 se cumpla, por lo que si el sistema de interés no cumple con la suposición anterior, esta prueba no debe de interpretarse.

* Distribución muestral: distribución t de Student con $n-2$ grados de libertad.

$$t = \frac{b - b_0}{S_{y/x} \sqrt{\frac{\bar{x}^2}{\sum x^2 - (\sum x)^2} + \frac{1}{n}}}$$

* Estadígrafo de contraste:

$$t_{CAL} = \frac{b}{S_{y/x} \sqrt{\frac{\bar{x}^2}{\sum x^2 - (\sum x)^2} + \frac{1}{n}}}$$

BASE DE LA INTERPRETACION:

Si $|t_{CAL}| < t_{0,975,n-2}$, la interpretación de resultados es que la ordenada pasa por el origen.

Si $|t_{CAL}| > t_{0,975,n-2}$, la interpretación de resultados es que la ordenada no pasa por el origen.

Inferencia sobre linealidad.

Asociación entre cantidad adicionada y propiedad medida.

* Prueba de hipótesis:

$$H_0: \mu = \mu_0$$

$$H_1: \mu \neq \mu_0$$

Realizamos la prueba también para $\mu_0 \neq 0$ ya que en teoría un sistema de medición es adecuado cuando al variar la cantidad adicionada también varía la respuesta obtenida. Se busca efecto altamente significativo; es decir, que H_1 se cumpla.

* Distribución muestral: Distribución F con un grado de libertad en el numerador y n-2 grados de libertad en el denominador.

$$F = \frac{\sigma^2}{\sigma_{ER}^2}$$

* Estadígrafo de contraste:

$$F = \frac{MC_R}{MC_{ER}}$$

donde:

R= regresión

ER= error de regresión

MC= medida de cuadrados

Determinación de la linealidad entre cantidad y propiedad medida.

* Prueba de hipótesis:

$$H_0: y = b + \mu x$$

$$H_1: y \neq b + \mu x$$

Mediante este planteamiento determinamos si la asociación entre cantidad y propiedad medida se describe mediante un modelo lineal.

* Distribución muestral: distribución F con (n-2)-E(r₁-1) grados de libertad en el numerador y E(r₁-1) grados de libertad en el denominador.

$$F = \frac{\sigma^2_{FA}}{\sigma^2_{EP}}$$

* Estadígrafo de contraste:

$$F = \frac{MC_{FA}}{MC_{EP}}$$

donde:

FA= falta de ajuste

EP= error puro

TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA
REGRESION	1	$m\sum xy + b\sum y - [(\sum y)^2/n]$	SC_R / GL_R	MC_R / MC_{ER}
ERROR DE REGRESION	$n-2$	$\sum y^2 - m\sum xy - b\sum y$	SC_{ER} / GL_{ER}	
FALTA DE AJUSTE	$\frac{(n-2) - \sum(r_i-1)}{r_i-1}$	$SC_{ER} - SC_{EP}$	SC_{FA} / GL_{FA}	MC_{FA} / MC_{EP}
ERROR PURO	$\sum(r_i-1)$	$\sum y^2 - \sum y^2 / r_i$	SC_{EP} / GL_{EP}	

donde:

SC= suma de cuadrados

GL= grados de libertad

m= pendiente de la recta

b= ordenada al origen

n= número total de pares de cantidad adicionada-respuesta

r_i = número de replicaciones de iésimo nivel de cantidades adicionadas

x= cantidad adicionada

y= propiedad medida

y_i = total de la propiedad medida del iésimo nivel de cantidades adicionadas.

BASE DE LA INTERPRETACION:

Si F_{CAL} de la fuente de variación-regresión es mayor a 0.05, la interpretación de resultados es que no existe relación entre la cantidad adicionada y la respuesta obtenida.

Si F_{CAL} de la fuente de variación-regresión es menor a 0.05 y mayor a 0.01, la interpretación de resultados es que existe una relación significativa entre la cantidad adicionada y la respuesta obtenida.

Si F_{CAL} de la fuente de variación-regresión es menor de 0.01, la interpretación de resultados es que existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la respuesta obtenida.

Si F_{CAL} de la fuente de variación-falta de ajuste es mayor a 0.05, la interpretación de resultados es que el modelo lineal representa de manera correcta la relación entre cantidad y la respuesta obtenida.

Si F_{CAL} de la fuente de variación-falta de ajuste es menor a 0.05, la interpretación de resultados es que el modelo lineal no representa de manera correcta la relación entre cantidad y la respuesta obtenida.

* Correlación

Se evalúa calculando la raíz cuadrada del coeficiente de determinación (r^2).

$$r^2 = \frac{[n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[n(\sum x^2) - (\sum x)^2][n(\sum y^2) - (\sum y)^2]}$$

Exactitud

Es la concordancia existente entre un valor determinado y su valor real.

DEFINICIÓN DE μ :

Es la media poblacional de los recobros experimentales expresada en porcentaje.

Inferencia:

* Prueba de hipótesis:

$$H_0: \mu = \mu_0$$

$$H_1: \mu \neq \mu_0$$

Realizamos la prueba para $\mu_0 = 100$, ya que en teoría si el método carece de error sistemático constante, el recobro experimental expresado en porcentaje debe ser 100.

Distribución muestral: distribución t de Student con n-1 grados de libertad.

$$t = \frac{y - \mu_0}{s/\sqrt{n}}$$

donde:

y = valor promedio de los datos (estimador de μ): $y = \frac{\sum y}{n}$

μ_0 = valor real del parámetro

s/\sqrt{n} = error estándar

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$$

donde:

s= desviación estándar

n= número de recobros

* Estadígrafo de contraste:

$$t_{\text{CAL}} = \frac{\bar{y} - \mu_0}{s/\sqrt{n}}$$

* Límites del intervalo de confianza:

$$\bar{y} \pm t_{0.975, n-1} (s/\sqrt{n})$$

* Repetibilidad:

Es la concordancia entre los recobros independientes generados bajo las mismas condiciones de análisis (mismo día, mismo analista, misma corrida, mismos reactivos, - mismo equipo, etc.)

Fórmula:

$$(1.96)s$$

BASE DE LA INTERPRETACION:

Si $t_{\text{CAL}} < t_{0.975, n-1}$, la interpretación de resultados es que el método carece de error sistemático constante; por lo tanto, el método es exacto al 100 %

Si $t_{\text{CAL}} \geq t_{0.975, n-1}$, la interpretación de resultados es que el método presenta error sistemático constante; por lo tanto, el método no es exacto al 100 %

Linealidad del método

La relación entre las cantidades adicionadas y cantidades recuperadas de principio activo empleando el método analítico debe ser una función lineal del tipo:

$$y = b + mx + \epsilon$$

donde:

y= cantidad recuperada de principio activo

b= ordenada al origen

m= pendiente

x= cantidades adicionadas de principio activo

ϵ = error del método ($\sigma_{y/x}$)

Para la estimación de m y b por el método de mínimos cuadrados se emplean las mismas fórmulas que en la linealidad del sistema. Entonces,

$$\hat{y} = b + mx_1$$

donde:

m = estimado de la pendiente

b = estimado de la ordenada al origen

y = y estimado de la cantidad recuperada del principio activo a partir del modelo de regresión dado x_1 .

DEFINICION DE m :

Es la relación de cambio de la cantidad recuperada con respecto al cambio de la cantidad adicionada del principio activo.

Inferencia:

* Límites del intervalo de confianza:

$$m \pm t_{0.975, n-2} S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

donde:

$t_{0.975, n-2}$ = valor de t de Student con área bajo la curva de 0.975 y $n-2$ grados de libertad.

* Prueba de hipótesis:

$$H_0: m = m_0$$

$$H_1: m \neq m_0$$

Realizamos la prueba para $m_0 = 1$, ya que si el método carece de error sistemático proporcional consistente, la pendiente es uno.

* Distribución muestral: distribución t de Student con $n-2$ grados de libertad.

$$t = \frac{m - m_0}{S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}}$$

* Estadígrafo de contraste:

$$t_{CAL} = \frac{m - 1}{S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}}$$

DEFINICION DE b:

Es la respuesta del método a la cantidad adicionada de cero.

Inferencia:

* Límites del intervalo de confianza:

$$b \pm t_{0.975, n-2} S_{X/Y} \sqrt{\frac{\bar{x}^2}{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}} + \frac{1}{n}}$$

donde:

$t_{0.975, n-2}$ = valor de t Student con área bajo la curva de 0.975 y n-2 grados de libertad.

* Prueba de hipótesis:

$$H_0: b = b_0$$

$$H_1: b \neq b_0$$

Realizamos la prueba para $b_0 = 0$ ya que en teoría el método a cantidad adicionada de cero debe recuperar cero; es decir, el método carece de error sistemático proporcional constante.

Un método se considera que carece de error sistemático proporcional cuando no presenta ni error sistemático proporcional consistente ni error sistemático proporcional constante.

* Distribución muestral: distribución t de Student con n-2 grados de libertad.

$$t = \frac{b - b_0}{S_{X/Y} \sqrt{\frac{\bar{x}^2}{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}} + \frac{1}{n}}}$$

* Estadígrafo de contraste:

$$t_{CAL} = \frac{b}{S_{X/Y} \sqrt{\frac{\bar{x}^2}{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}} + \frac{1}{n}}}$$

BASE DE LA INTERPRETACION:

i) Error sistemático proporcional consistente:

Si $|t_{CAL}| < (t_{0.975, n-2})$, la interpretación de resultados es que el método carece de error sistemático proporcional consistente.

Si $|t_{CAL}| > (t_{0.975, n-2})$, la interpretación de resultados es que el método presenta error sistemático proporcional consistente.

ii) Error sistemático proporcional constante:

Si $|t_{CAL}| < (t_{0.975, n-2})$, la interpretación de resultados es que el método carece de error sistemático proporcional constante.

Si $|t_{CAL}| > (t_{0.975, n-2})$, la interpretación de resultados es que el método presenta error sistemático proporcional constante.

Inferencia sobre linealidad:

Asociación entre cantidad adicionada y cantidad recuperada.

* Prueba de hipótesis:

$$H_0: \mu = \mu_0$$

$$H_1: \mu \neq \mu_0$$

Realizamos la prueba para $\mu \neq \mu_0$, ya que en un método de medición adecuado, al variar la cantidad adicionada, debe variar la cantidad recuperada.

* Distribución muestral: distribución F con un grado de libertad en el numerador y $n-2$ grados de libertad en el denominador.

$$F = \frac{\frac{\sigma_x^2}{r}}{\frac{\sigma_{EX}^2}{n-2}}$$

* Estadígrafo de contraste:

$$F_{CAL} = \frac{MC_R}{MC_{EX}}$$

donde:

MC= media de cuadrados

r= regresión

EX= error de regresión

Determinación de la linealidad entre cantidad adicionada y cantidad recuperada.

* Prueba de hipótesis:

$$H_0: y = b + mx$$

$$H_1: y \neq b + mx$$

Mediante este planteamiento, determinamos si la asociación entre cantidad adicionada y cantidad recuperada se describe mediante un modelo lineal.

* Distribución muestral: distribución F con $[(n-2)-\Sigma(r_i-1)]$ grados de libertad en el numerador y $\Sigma(r_i-1)$ grados de libertad en el denominador.

$$F = \frac{\sigma_{FA}^2}{\sigma_{EP}^2}$$

* Estadígrafo de contraste:

$$F = \frac{MC_{FA}}{MC_{EP}}$$

donde:

FA= falta de ajuste

EP= error puro

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA
REGRESION	1	$n\bar{e}x\bar{y} + b\bar{e}y - [(\Sigma y)^2/n]$	SC_R / GL_R	MC_R / MC_{ER}
ERROR DE REGRESION	$n-2$	$\Sigma y^2 - n\bar{e}x\bar{y} - b\bar{e}y$	SC_{ER} / GL_{ER}	
FALTA DE AJUSTE	$(n-2) - \Sigma(r_i-1)$	$SC_{ER} - SC_{EP}$	SC_{FA} / GL_{FA}	MC_{FA} / MC_{EP}
ERROR PURO	$\Sigma(r_i-1)$	$\Sigma y_i^2 - \bar{e}y_i^2 / r_i$	SC_{EP} / GL_{EP}	

donde:

SC= suma de cuadrados

GL= grados de libertad

n= pendiente de la recta

b= ordenada al origen

n= número total de pares de cantidad adicionada-cantidad recuperada

r_i = número de replicaciones de i ésimo nivel de cantidades adicionadas

\bar{x} = cantidad adicionada

\bar{y} = cantidad recuperada

\bar{y}_i = total de la cantidad recuperada del i ésimo nivel de cantidades adicionadas

BASE DE LA INTERPRETACION:

Si F_{CAL} de la fuente de variación-regresión es mayor de 0.05, la interpretación de resultados es que no existe relación entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

Si F_{CAL} de la fuente de variación-regresión es menor a 0.05 y mayor a 0.01, la interpretación de resultados es que existe una relación significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

Si F_{CAL} de la fuente de variación-regresión es menor de 0.01, la interpretación de resultados es que existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

Si F_{CAL} de la fuente de variación-falta de ajuste es mayor a 0.05, la interpretación de resultados es que el modelo lineal representa de manera correcta la relación entre cantidad adicionada y cantidad recuperada.

Si F_{CAL} de la fuente de variación-falta de ajuste es menor a 0.05, la interpretación de resultados es que el modelo lineal no representa de manera correcta la relación entre cantidad adicionada y cantidad recuperada.

* Correlación

Es el grado de asociación entre 2 variables dado el modelo de regresión.

Se evalúa calculando la raíz cuadrada del coeficiente de determinación (r^2).

$$r^2 = \frac{[n(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)]^2}{[n(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2][n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]}$$

Exactitud al 100%

Es la concordancia existente entre un valor determinado y su valor real, expresado en %

DEFINICION DE μ_1

Es la media poblacional de los recobros experimentales expresada en porcentaje.

Inferencia:

* Límites del intervalo de confianza:

$$\bar{y} \pm t_{0.975, n-1} (s/\sqrt{n})$$

* Prueba de hipótesis:

$$H_0: \mu = \mu_0$$

$$H_1: \mu \neq \mu_0$$

Realizamos la prueba para $\mu_0=100$, ya que en teoría si el método carece de error sistemático constante, el recobro experimental expresado en porcentaje debe ser 100.

* Distribución muestral: distribución t de Student con n-1 grados de libertad.

$$t = \frac{\bar{y} - \mu_0}{s/\sqrt{n}}$$

donde:

\bar{y} = valor promedio de los datos (estimador de μ), $\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$

μ_0 = valor real del parámetro

s/\sqrt{n} = error estándar

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$$

donde:

s = desviación estándar

n = número de recobros

* Estadígrafo de contraste:

$$t_{CAL} = \frac{\bar{y} - \mu_0}{s/\sqrt{n}}$$

BASE DE LA INTERPRETACION:

Si $t_{CAL} < t_{0.975, n-1}$, la interpretación de resultados es que el método carece de error sistemático proporcional consistente; por lo tanto, el método es exacto al 100 %

Si $t_{CAL} > t_{0.975, n-1}$, la interpretación de resultados es que el método presenta error sistemático constante; por lo tanto, el método no es exacto al 100 %

Precisión (Reproducibilidad)

Es la concordancia de un conjunto de valores experimentales respecto al valor central. Se clasifica en reproducibilidad y repetibilidad.

Evaluación: Inferencia estadística sobre la variabilidad de los resultados obtenidos al utilizar el método en estudio.

La inferencia estadística que manejaremos se basa en un estudio de reproducibilidad interanalista e interdía-analista, por lo que el modelo hipotético que representa este caso es:

$$y_{ijk} = \mu + A_i + D_j(1)$$

donde:

y_{ijk} = el ensayo del principio activo de la k -ésima muestra analizada por el i -ésimo analista en el j -ésimo día

M = media poblacional del ensayo del principio activo en la muestra

A_i = efecto del analista en el ensayo, (donde $i=1...a$)

D_j = efecto del día anidado en el analista, (donde $j=1...d$)

$E_{k(i,j)}$ = error del método analítico (repetibilidad, donde $k=1...r$)

a = número de analistas

b = número de días

r = número de ensayos

* Prueba de hipótesis:

$$H_0: A = A_0$$

$$H_1: A \neq A_0$$

Realizamos la prueba para $A_0 = 0$, ya que si un método es reproducible por los analistas, no debe haber efecto por los analistas.

* Distribución muestral: distribución F con $a-1$ grados de libertad en el numerador y $a(d-1)$ grados de libertad en el denominador.

$$F = \frac{\frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^d \sum_{k=1}^r y_{ijk}^2}{a} - r a b d \bar{y}^2}{\frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^d \sum_{k=1}^r y_{ijk}^2}{a r + r a d}}$$

* Estadígrafo de contraste:

$$F_{CAL} = \frac{MC_A}{MC_D}$$

* Prueba de hipótesis:

$$H_0: D = D_0$$

$$H_1: D \neq D_0$$

Realizamos la prueba para $D_0 = 0$, ya que si un método es reproducible en distintos días para un mismo analista, no debe haber efecto del analista.

* Distribución muestral: distribución F con $a(d-1)$ grados de libertad en el numerador y $a(r-1)$ grados de libertad en el denominador.

$$F = \frac{\frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^d \sum_{k=1}^r y_{ijk}^2}{a r + r a d}}{\frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^d \sum_{k=1}^r y_{ijk}^2}{a r}}$$

* Estadígrafo de contraste:

$$F_{CAL} = \frac{MC_D}{MC_A}$$

TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA
A_i	$a-1$	$\sum y_i^2 / dr - y^2 / adr$ 1...	SC_A / GL_A	MC_A / MC_D
$D_{j(1)}$	$a(d-1)$	$\sum \sum y_{ij}^2 / dr - y^2 / adr$ 1j 1...	SC_D / GL_D	MC_A / MC_D
$D_{j(1)}$	$a(d-1)$	$\sum \sum y_{ij}^2 / dr$ 1j 1...	SC_D / GL_D	MC_D / MC_T
$E_{k(1j)}$	$ad(r-1)$	$\sum \sum \sum y_{ijk}^2 - \sum \sum y_{ij}^2 / r$ 1jk 1j 1j	SC_T / GL_T	

donde:

SC= suma de cuadrados

GL= grados de libertad

MC= media de cuadrados

y_i = total de ensayo del i-ésimo analista

y_{ij} = total de ensayo de la combinación del i-ésimo analista, j-ésimo día.

y = gran total del ensayo

BASE DE LA INTERPRETACION:

Si F_{CAL} de la fuente de variación- A_i es mayor de 0.05, la interpretación de resultados es que el analista no presenta efecto sobre la valoración.

Si F_{CAL} de la fuente de variación- A_i es menor de 0.05, la interpretación de resultados es que el analista presenta efecto sobre la valoración.

Si F_{CAL} de la fuente de variación- $D_{j(1)}$ es mayor de 0.05, la interpretación de resultados es que el día anidado en el analista no presenta efecto sobre la valoración.

Si F_{CAL} de la fuente de variación- $D_{j(1)}$ es menor de 0.05, la interpretación de resultados es que el día anidado en el analista presenta efecto sobre la valoración.

Precisión

Se calcula la repetibilidad (S_r), la reproducibilidad interdía anidado en el analista (S_D) y la reproducibilidad interanalista (S_A) con las siguientes fórmulas:

$$S_r = (1.96)(MC_T)^{1/2}$$

$$S_D = (1.96)[(MC_D - MC_T)/r]^{1/2}$$

$$S_A = (1.96)[(MC_A - MC_D)/rd]^{1/2}$$

APENDICE B:

**PROCEDIMIENTO DE OPERACION:
VALIDACION DE METODOS ANALITICOS**

(ANEXO 1-CARATULA)

Laboratorio: _____

PROCEDIMIENTO DE OPERACION
VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

Método: _____

Proyecto No.: _____

Nombre del Producto: _____

Fórmula Maestra No.: _____

Nombre Genérico: _____

Validación

Forma Farmacéutica: _____

Revalidación

Departamento: _____

Fecha inicio: _____

Fecha término: _____

METODO RUTINARIO DE CONTROL DE CALIDAD

METODO INDICADOR DE ESTABILIDAD

PARAMETROS A EVALUAR

LINEARIDAD: SISTEMA ____ METODO ____

PRECISION ____

EXACTITUD ____

REPRODUCIBILIDAD ____

LIMITE DE DETECCION ____

LIMITE DE CUANTIFICACION ____

ESPECIFICIDAD ____

TOLERANCIA ____

OTROS: _____

ESTE ESTUDIO DE VALIDACION CERTIFICA QUE EL METODO CUMPLE CON LOS
REQUISITOS MINIMOS ESTABLECIDOS POR LO QUE SE CONSIDERA ACEPTADO
PARA EL ANALISIS DEL PRODUCTO SIEMPRE Y CUANDO NO SE MODIFIQUE
ALGUNO DE LOS PARAMETROS CONSIDERADOS EN EL MISMO.

REALIZADO POR:	REVISADO POR:	APROBADO POR:
FECHA:	FECHA:	FECHA:

Laboratorio: _____

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

Método: _____ Proyecto No.: _____
Nombre del Producto: _____ Fórmula Maestra No.: _____
Nombre Genérico: _____
Forma Farmacéutica: _____
Departamento: _____

PROTOCOLO DE VALIDACION

1.- OBJETIVO DE LA VALIDACION:

Establecer la(s) razón(es) de la realización del estudio de validación de la metodología analítica, ya sea rutinaria de Control de Calidad o para fines de estudio de Estabilidad, ya que de acuerdo al objetivo, serán los parámetros a evaluar.

2.- FUNDAMENTO DE LA METODOLOGIA ANALITICA:

Fundamentar científicamente la metodología analítica empleada.

3.- REACTIVOS:

Indicar todos los reactivos y disolventes a emplear, así como cantidades de éstos.

4.- EQUIPO Y MATERIAL:

Listar todo el equipo involucrado en el estudio de validación, así como el material.

5.- PROCEDIMIENTO:

Describir detalladamente la metodología analítica a validar.

Describir detalladamente la evaluación de los parámetros de acuerdo al tipo de metodología especificada en el objetivo.

6.- RESULTADOS Y ANALISIS:

Una vez realizados los análisis correspondientes, ordenar y tabular los resultados para su mejor manejo en el análisis estadístico.

7.- CONCLUSIONES:

Del análisis estadístico de los resultados, concluir si el método cumple o no con los requisitos mínimos necesarios, y si es apto o no para emplearlo para los fines establecidos.

NOTA: Anexar al estudio, todos los gráficos y cromatogramas de los análisis, así como los cálculos y todo lo relacionado a este estudio.

(ANEXO 3)

Laboratorio: _____

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

Método: _____

Proyecto No.: _____

Nombre del Producto: _____

Fórmula Maestra No.: _____

Nombre Genérico: _____

Forma Farmacéutica: _____

Departamento: _____

REPORTE DE LINEARIDAD DEL SISTEMA

Sustancia de Referencia: _____ Niveles de Concentración: _____

No. de Lote de la Sust. Ref.: _____ Unidad de Respuesta: _____

Fecha Inicio: _____ Fecha Término: _____

NIVEL %	CONCENTRACION	REPLICA No.	RESPUESTA (U DE RESP)	\bar{x}	DESU STD σ	C.V. %
(1)		1				
(2)		2				
(3) 100		3				
(4)		4				
(5)		5				

$n=$

$b=$

$r=$

$n_x=$

$b_x=$

$r^2=$

Cumple con los criterios de aceptación: Sí No

Conclusión: _____

REALIZADO POR:	REVISADO POR:	APROBADO POR:
FECHA:	FECHA:	FECHA:

(ANEXO 4)

Laboratorio: _____

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

Método: _____

Proyecto No.: _____

Nombre del Producto: _____

Fórmula Maestra No.: _____

Nombre Genérico: _____

Forma Farmacéutica: _____

Departamento: _____

REPORTE DE PRECISION DEL SISTEMA

Sustancia de Referencia: _____ Niveles de Concentración: _____

No. de Lote de la Sust. Ref.: _____ Unidad de Respuesta: _____

Fecha Inicio: _____ Fecha Término: _____

REPLICA No.	RESPUESTA (U DE RESP)
1	
2	
3	
4	
5	
6	

-
X=

σ=

C.V.=

Cumple con los criterios de aceptación:

Sí

No

Conclusión: _____

REALIZADO POR:	REVISADO POR:	APROBADO POR:
FECHA:	FECHA:	FECHA:

Laboratorio: _____

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

Método: _____

Proyecto No.: _____

Nombre del Producto: _____

Fórmula Maestra No.: _____

Nombre Genérico: _____

Forma Farmacéutica: _____

Departamento: _____

REPORTE DE LINEARIDAD DEL METODO

Sustancia de Referencia: _____ Niveles de Concentración: _____

No. de Lote de la Sust. Ref.: _____ Concentración de Placebo: _____

Fecha Inicio: _____ Fecha Término: _____

NIVEL X	REPLICA No.	CANTIDAD ADICIONADA	CANTIDAD RECUPERADA	Y RECUPERADO	\bar{X}	σ	C.U. %
(1)	-----						
(2)	-----						
(3)	-----						
(4)	-----						
(5)	-----						

 $n =$

$$s_x = (n/y)$$

 $b =$

$$b_x = (b/y) \cdot x$$

 $r =$

$$r^2 =$$

Cumple con los criterios de aceptación:

Si No

Conclusión: _____

REALIZADO POR:	REVISADO POR:	APROBADO POR:
FECHA:	FECHA:	FECHA:

Laboratorio: _____

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

Método: _____

Proyecto No.: _____

Nombre del Producto: _____

Fórmula Maestra No.: _____

Nombre Genérico: _____

Forma Farmacéutica: _____

Departamento: _____

**REPORTE DE EXACTITUD Y REPETIBILIDAD
DEL METODO (AL 100 %)**

Sustancia de Referencia: _____ Niveles de Concentración: _____

No. de Lote de la Sust. Ref.: _____ Unidad de Respuesta: _____

Fecha Inicio: _____ Fecha Término: _____

Tomar los resultados de % RECUPERADO del reporte de Linealidad del Método y hacer las siguientes determinaciones:

x=

 σ =

C.V.=

Valor t de Student con n-1 grados de libertad y probabilidad de 0.975

t=

Intervalo de confianza para la media:

Ic=

(Ic debe incluir el 100 %)

Cumple con los criterios de aceptación:

Sí No

Conclusión: _____

REALIZADO POR:	REVISADO POR:	APROBADO POR:
FECHA:	FECHA:	FECHA:

Laboratorio: _____

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

Método: _____

Proyecto No.: _____

Nombre del Producto: _____

Fórmula Maestra No.: _____

Nombre Genérico: _____

Forma Farmacéutica: _____

Departamento: _____

REPORTE DE ESPECIFICIDAD DEL METODO

Sustancia de Referencia: _____

No. de Lote de la Sust. Ref.: _____

Unidad de Respuesta: _____

Fecha Inicio: _____

Fecha Término: _____

Para un método rutinario de Control de Calidad, tomar los resultados de la respuesta al 0 % de 6 réplicas involucrando solo el 100 % de placebo y evaluar su interferencia.

Para un método indicativo de Estabilidad, evaluar la interferencia de los productos de degradación sobre la respuesta normal del principio activo.

REPLICA No.	RESPUESTA (U DE RESP)
1	
2	
3	
4	
5	
6	

X=

σ=

C.V.=

Cumple con los criterios de aceptación:

Sí No

Conclusión: _____

REALIZADO POR:	REVISADO POR:	APROBADO POR:
FECHA:	FECHA:	FECHA:

(ANEXO 8)

Laboratorio: _____

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

Método: _____

Proyecto No.: _____

Nombre del Producto: _____

Fórmula Maestra No.: _____

Nombre Genérico: _____

Forma Farmacéutica: _____

Departamento: _____

REPORTE DE LA PRECISION (REPRODUCIBILIDAD) DEL METODO

Sustancia de Referencia: _____ No. de Lote del Producto: _____

No. de Lote de la Sust. Ref.: _____ No. de Réplicas: _____

Fecha Inicio: _____ Fecha Termino: _____

Analista 1: _____

Analista 2: _____

ANALISTA			
	1	2	
D	1	REP. 1	REP. 1
		REP. 2	REP. 2
		REP. 3	REP. 3
A	2	REP. 1	REP. 1
		REP. 2	REP. 2
		REP. 3	REP. 3

X=

σ=

C.V.=

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA:

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALC	F TAB
ANALISTA	1				
DIA/ANALISTA	2				
ERROR	8				

Cumple con los criterios de aceptación: Si No

Conclusión: _____

REALIZADO POR:	REVISADO POR:	APROBADO POR:
FECHA:	FECHA:	FECHA:

APENDICE C:

FUENTES DE ERROR Y RECOMENDACIONES

PROPUESTA PARA LA VERIFICACION DEL FUNCIONAMIENTO

DE SISTEMAS CLAE

FUENTES DE ERROR Y RECOMENDACIONES

Como se revisó en el Capítulo 4 -Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia-, en ocasiones se presentan algunos problemas durante el análisis, debido a alguno de los componentes del sistema cromatográfico y esto se refleja básicamente en los cromatogramas obtenidos. A continuación se menciona una serie de problemas un poco más específicos, su posible causa y recomendaciones para su solución.

PROBLEMA 1: Cuando después de inyectar la muestra no aparecen picos o éstos son muy pequeños.

Posibles causas y recomendaciones:

- a) Revisar que la lámpara del detector correctamente conectada y encendida ya que el problema podría deberse a que la lámpara del detector se encuentre apagada.
- b) Revisar que haya corriente eléctrica entre el detector y el registrador-integrador.
- c) Verificar el flujo correcto de la fase móvil.
- d) Revisar los viales con la muestra, si se trata de un inyector automático, y/o evaluar la eficiencia del sistema con una sustancia de referencia recién preparada, para confirmar si la muestra es la fuente del problema.
- e) También es recomendable verificar la atenuación del detector y/o registrador.

PROBLEMA 2: Cuando no hay flujo.

Posibles causas y recomendaciones:

- a) Revisar que la bomba se encuentre encendida.
- b) Verificar que el flujo no esté interrumpido, para lo cual, revisar el reservorio de la fase móvil, el sistema de flujo, el loop y el filtro de la fase móvil. También asegurarse que los componentes de la fase móvil sean miscibles entre sí y que ésta está bien degasificada.
- c) Verificar que no haya fugas que ocasionen este problema, para lo cual, es recomendable revisar las conexiones del sistema, especialmente en la bomba, para asegurarse de que no haya acumulación de sales ; si es necesario, cambiar los empaques.

PROBLEMA 3: Cuando hay problemas con la presión.

Posibles causas y recomendaciones:

- a) Cuando se presentan fluctuaciones de presión, puede deberse a aire atrapado en la bomba. Para verificarlo, es necesario desconectar la tubería y revisar el flujo. Es recomendable purgar la bomba a alta velocidad de flujo (10 ml/min). Si el problema continúa, pasar metanol. Si aún así persiste, llamar a un técnico especializado, de preferencia, el mismo proveedor del equipo.
- b) Cuando la presión es baja (con respecto a la normal, por ej. de 1000 a 700 psi), puede deberse a fugas. Ver Problema 2, c). O bien, es posible que el flujo esté interrumpido. Ver Problema 2, b).

- c) La presión baja también puede ser ocasionada por fugas en la columna. En este caso, se recomienda bombear disolvente a 1-2 ml/min. Si la presión continúa baja, revisar las conexiones de la columna.
- d) La presión baja también puede deberse a que existe aire atrapado en alguna otra parte del sistema; es necesario entonces, desconectar la columna analítica y purgar el sistema. Si el problema persiste, pasar metanol por un tiempo prolongado.
- e) Si los empaques de la bomba están muy deteriorados, pueden originar fugas y por lo tanto, disminución en la presión; en este caso, es necesario reemplazarlos.
- f) Cuando la presión aumenta demasiado con respecto a lo que normalmente se trabaja (por ej. de 1000 a 3500 psi), el problema puede provenir de la bomba, del inyector o de la tubería. Conviene desconectar la columna, bombear a 2-5 ml/min. Si esto no resuelve el problema, se recomienda identificar la causa por eliminación sistemática de los componentes, comenzando por el detector hasta llegar a la bomba.
- g) Otra de las causas de que la presión aumente, es que la columna o precolumna (en caso de utilizarse), esté tapada. Se recomienda que en el caso de estar empleando una precolumna, conviene quitarla y verificar la presión; si el problema no desaparece, reemplazarla. Si es la columna la que está obstruida, invertirla y pasar flujo de fase móvil. Si el problema persiste, significa que la columna tiene contaminantes fuertemente retenidos, entonces es necesario

proceder a regenerarla. Si a pesar de las acciones tomadas aún es muy alta la presión, verificar los "frits", especialmente el inicial, y como último recurso, si el problema no se resuelve, proceder a reemplazar la columna.

PROBLEMA 4: Cuando varían los tiempos de retención.

Posibles causas y recomendaciones:

- a) Puede deberse a la presencia de fugas. Ver Problema 2, c).
- b) El problema puede presentarse también debido a cambios realizados en la composición de la fase móvil, es conveniente recordar que pequeños cambios en su composición, pueden provocar cambios grandes en los tiempos de retención. Conviene verificar la preparación de la fase móvil y suplirla, si es necesario.
- c) Otra causa del aumento en los tiempos de retención, puede ser la presencia de aire atrapado en la bomba. En este caso es necesario purgarla y revisar las válvulas. También se recomienda revisar los empaques y asegurarse de la degasificación de la fase móvil.
- d) Otro de los factores que pueden causar este problema es la fluctuación en la temperatura de la columna, por lo que es necesario tener un buen control de ésta.
- e) Cuando la columna se sobrecarga, es decir, se excede su capacidad, los tiempos de retención tienden a disminuir. Es necesario, entonces, inyectar volúmenes pequeños de muestra o diluir 1:10 ó 1:100.
- f) Puede deberse también a que el disolvente en el que se preparó

la muestra sea incompatible con la fase móvil. Se recomienda que en todas las veces que sea posible, se empleen los disolventes de la fase móvil para preparar las muestras.

- g) Es posible que la causa del problema esté en la columna, ya que con su uso, los tiempos de retención tienden a disminuir gradualmente. Se recomienda sustituir la columna para confirmar que sea la causa del problema. Descartar la columna usada si no son aplicables los procedimientos de regeneración.

PROBLEMA 5: Cuando se pierde resolución.

Posibles causas y recomendaciones:

- a) El problema puede deberse a la contaminación o a la descomposición de la fase móvil. Para verificarlo es necesario revisar su preparación o sustituirla.
- b) Otra causa podría ser la obstrucción de la columna. Ver Problema 3, h).

PROBLEMA 6: Cuando los picos se parten.

Posibles causas y recomendaciones:

- a) Este problema puede deberse a que la columna esté obstruida. Ver problema 3, h).
- b) Otra causa puede ser la incompatibilidad entre el disolvente de las muestras y la fase móvil. Ver Problema 4, f).

PROBLEMA 7: Cuando los picos no son simétricos.

Posibles causas y recomendaciones:

- a) Puede deberse a posibles factores que interfieren en la muestra. Se recomienda verificar la eficiencia de la columna con sustancias de referencia.
- b) El coleo de los picos en ocasiones se debe a que el tipo de columna no es el adecuado para el análisis que se esté realizando. Se recomienda intentar con otro tipo de columna.
- c) Es necesario verificar el pH de la fase móvil ya que éste puede ser la causa del problema de coleo.
- d) Hay ocasiones en que la muestra reacciona con sitios activos de la columna y los picos salen "colegados"; en este caso es recomendable adicionar un reactivo formador de par iónico.
- e) Si sucede que los picos salen con "frente", una de las causas puede ser el aumento gradual de la línea base antes de que salga otro componente de la muestra. Se recomienda incrementar la eficiencia o cambiar la selectividad del sistema de elución para mejorar. Si es necesario, intentar con otro tipo de columna.
- f) El problema puede deberse a la sobrecarga de la columna. Ver Problema 4, e).
- g) El problema se puede presentar por alguna interacción muestra-columna, por lo que se recomienda realizar un análisis previo de la estructura del soluto para ayudar a evitar este tipo de problemas.
- h) Es necesario verificar siempre los ajustes realizados al detector y/o registrador ya que valores muy altos pueden ocasionar el problema de picos con "frente".

- i) Si los picos salen "redondeados", puede ser porque el detector no esté operando dentro del intervalo dinámico lineal. En este caso es recomendable reducir el volumen y/o la concentración de la muestra.

PROBLEMA B: Cuando hay problemas en la línea base (No se refiere a Ruido).

Posibles causas y recomendaciones:

- a) En algunos casos, pequeños cambios en la temperatura de la columna causan elevaciones cíclicas de la línea base. Este problema frecuentemente afecta a los detectores de índice de refracción, a los de conductividad y a los detectores UV de alta sensibilidad. Es necesario controlar la temperatura tanto de la fase móvil como de la columna.
- b) Ese problema también puede ser ocasionado por la falta de homogeneidad de la fase móvil. Siempre es recomendable emplear disolventes grado HPLC, sales y aditivos de alta pureza; es necesario degasificar la fase móvil antes de usarla o bombear con helio durante su uso.
- c) Otras causas pueden ser que la fase móvil no esté bien mezclada o que se cambió la velocidad de flujo. Para evitar el problema, es necesario monitorear rutinariamente la composición y la velocidad de flujo.
- d) También es frecuente que se presente este problema porque cuando se cambia la fase móvil, el equilibrio de la columna es muy lento, por lo cual, en estos casos, es necesario pasar por la columna un disolvente de fuerza intermedia y después pasar

la fase móvil.

- e) Es posible que la fase móvil se haya preparado con materiales de baja calidad o que se contamine o se descomponga. Verificar sus preparación y reemplazarla, si es necesario.
- f) Los materiales que se retienen fuertemente en la columna (k' alto), pueden eluir como picos muy anchos y aparecer como línea base en ascendencia. Los análisis por gradiente pueden agravar el problema. En estos casos es necesario emplear una precolumna. Cuando se requiera, pasar un disolvente fuerte entre las inyecciones o periódicamente durante el análisis.
- g) El problema puede deberse a que en la celda del detector haya aire o algún contaminante. Es conveniente limpiar la celda dejando fluir metanol u otro disolvente fuerte. Si es necesario, limpiarla con HNO_3 (nunca con HCl).
- h) En algunas ocasiones se recicla la fase móvil pero no se hacen los ajustes necesarios en el detector. Cuando el intervalo del detector no se puede ya ajustar, es conveniente emplear nuevos materiales y dejar de recircular la fase móvil.
- i) El problema también se puede presentar cuando la longitud de onda del detector no es la adecuada, entonces es necesario buscarla.

PROBLEMA 9: Cuando hay ruido en la línea base.

Posibles causas y recomendaciones:

- a) Puede deberse a aire en la fase móvil, en la celda del detector o en la bomba. Es necesario degasificar la fase móvil y pasarla por el sistema para quitar el aire de la celda del

detector o la bomba.

- b) Puede presentarse por fugas. Ver Problema 2, c).
- c) Es posible que el problema se deba a que no se haya mezclado bien la fase móvil o tal vez es necesario emplear un disolvente menos viscoso.
- d) Otra de las causas puede ser un diferencial de temperaturas entre la columna y el detector. Es necesario reducir este diferencial.
- e) El problema también se puede presentar debido a la interferencia de otro equipo electrónico sobre la misma línea de corriente. Para detectar si ésta es la causa, se recomienda aislar parte por parte del sistema.
- f) Las pulsaciones de la bomba también ocasionan ruido en la línea base. Si es necesario, incorporar al sistema un amortiguador de la pulsación.
- g) Puede deberse también a problemas de contaminación de la fase móvil.
- h) Se recomienda verificar la lámpara del detector y reemplazarla, si es necesario, porque puede ser la causa del problema.

PROBLEMA 10: Cuando los picos son anchos:

Posibles causas y recomendaciones:

- a) Verificar la composición de la fase móvil y preparar una nueva, si es necesario.
- b) Revisar si la velocidad de flujo no es demasiado baja y ajustarla.

- c) Puede deberse a fugas, principalmente entre la columna y el detector. Revisar este sistema.
- d) Asegurarse de los ajustes realizados en el detector.
- e) Es posible que el problema se deba a que el tiempo de respuesta del detector sea demasiado alto o el volumen de la celda demasiado grande. Verificar estos factores.
- f) Puede suceder que la causa sea que la tubería entre la columna y el detector sea demasiado larga o que el diámetro interno sea demasiado grande. En este caso se recomienda emplear piezas cortas y de diámetro interno pequeño (0.007-0.10").
- g) También se puede presentar el problema cuando la concentración de la solución amortiguadora es muy baja. Verificar su preparación.
- h) Si se está empleando una precolumna, puede suceder que esté contaminada; es necesario verificarlo reemplazándola.
- i) En caso de que la columna esté contaminada, es conveniente reemplazarla para regenerar la anterior.
- j) Este problema también se puede presentar cuando la temperatura de la columna es muy baja. Es necesario incrementarla para mejorar la eficiencia, cuidando de no exceder la temperatura recomendada por el fabricante.

PROBLEMA 11: Cuando cambian las alturas de los picos.

Posibles causas y recomendaciones:

- a) Puede deberse a que uno o más componentes de la muestra hayan descompuesto o a que la eficiencia de la columna haya disminuido. Es recomendable emplear muestras recién preparadas

para confirmar la fuente del problema. Si éste continúa, reemplazar la columna y tratar de regenerarla.

- b) Es posible que el problema se debe a que existan fugas, principalmente entre el puerto de inyección y la entrada a la columna. Ver el Problema 2, c).
- c) Otro de los factores que puede causar este problema, es que los volúmenes de las muestras sean inconsistentes. Es conveniente verificar que los viales en el inyector automático contienen la cantidad de muestra suficiente o que el loop funciona adecuadamente. Verificar también si no hay aire involucrado o precipitación de sales.
- d) Verificar el ajuste del detector, así como la lámpara y la contaminación probable de la celda, pues éstos podrían ser la causa del problema.

PROBLEMA 12: Cuando cambia la selectividad de la columna. (Cambios en los tiempos de retención).

Posibles causas y recomendaciones:

- a) Puede ser ocasionado por incremento o decremento de la fuerza iónica del disolvente, el pH o la concentración de aditivos. Es conveniente verificar la preparación de la fase móvil.
- b) Si se cambió columna, es posible que la nueva tenga diferente selectividad con respecto a la que se usó anteriormente. Es conveniente ajustar las condiciones.
- c) Verificar que la muestra no se haya inyectado en un disolvente incorrecto.
- d) Verificar la temperatura de la columna, pues pequeñas

diferencias, pueden dar lugar a cambios grandes en otros parámetros.

e) Verificar el tiempo de vida de la columna.

PROBLEMA 13: Cuando se presentan picos negativos.

Posibles causas y recomendaciones:

- a) Revisar la polaridad de las líneas de conexión eléctrica del registrador.
- b) El problema puede deberse a que el índice de refracción del soluto sea menor que el de la fase móvil (principalmente en detectores de índice de refracción). En este caso, es posible invertir la polaridad de las líneas de conexión.
- c) Puede presentarse cuando el disolvente de la muestra y la fase móvil, difieren grandemente en composición. Se recomienda homogeneizar los disolventes.
- d) Otra causa puede ser que la fase móvil absorba más radiación electromagnética, que los compuestos de la muestra en longitudes de onda UV, ésto puede deberse también a la contaminación por reciclaje de la fase móvil. Es conveniente cambiar la longitud de onda o emplear fase móvil con disolventes nuevos y evitar la recirculación prolongada.

PROBLEMA 14: Cuando aparecen picos fantasma (Picos no esperados ni deseados)

Posibles causas y recomendaciones.

- a) Principalmente los picos fantasma se deben al arrastre de muestra por contaminación del inyector o la columna. En este caso, se considera una buena práctica de rutina pasar fase móvil por el inyector, entre los análisis. Si es necesario, se recomienda pasar un disolvente fuerte a través de la columna para lograr remover todos los contaminantes. Es conveniente incluir una etapa de enjuague final en los análisis por gradiente para eliminar los compuestos retenidos fuertemente.

PROPUESTA PARA LA VERIFICACION DEL FUNCIONAMIENTO DE SISTEMAS CLAE

Se recomienda verificar el funcionamiento del sistema cada 6 meses o después de haber realizado servicio de mantenimiento correctivo.

No es posible realizar la verificación del sistema total, sino que se hace por componentes, y se puede efectuar siguiendo el esquema general:

1. - Registro de instalación:

- * Funcionamiento de la fuente de poder.
- * El equipo debe estar aislado de vibraciones.
- * Llevar un registro de la temperatura y humedad del área de instalación del equipo.

2.- Realizar pruebas de rutina:

- * De bombas
- * De columna
- * De inyector

3.- Evaluación indirecta de cada medición.

4.- Evaluación global del sistema.

5.- Pruebas rutinarias de confiabilidad.

EVALUACION:

1.- Calificación de la bomba.

1.1 Determinar la precisión de la velocidad de flujo.

Cómo? Determinar el volumen liberado por unidad de tiempo pero alternando los niveles de prueba.

Se recomienda hacer 4 niveles y 6 réplicas alternadas.

La especificación sugerida es C.V. \leq 1.0 %

1.2 Determinar la exactitud de la velocidad de flujo.

Cómo? Determinar el volumen liberado por unidad de tiempo.

Se recomiendan 4 niveles y 6 réplicas.

La especificación sugerida es C.V. \leq 5.0 % en todo el intervalo de trabajo.

2.- Calificación del inyector.

2.1 Determinar la precisión del volumen de inyección.

Cómo? Determinar las respuestas de sustancias de concentración conocida.

Se recomienda hacer 30 inyecciones con un blanco cada 3 muestras.

La especificación sugerida es C.V. $\leq 1.0 \%$ de cada nivel evaluado.

2.2 Determinar la linealidad del volumen de inyección.

Cómo? Determinar la respuesta de volúmenes representativos del intervalo de trabajo.

Realizar un intervalo lineal de respuesta contra volumen.

Se recomienda realizar 6 niveles por triplicado cada uno.

Las especificaciones sugeridas son:

$b_r = -0.02$ a 0.02

$m_r = 0.98$ a 1.02

Error estándar de regresión ≤ 0.03

$r^2 \geq 0.98$

2.3 Determinar el acarreo de muestra.

Cómo? Determinar la respuesta de muestras blanco a lo largo de muestras de análisis.

Se recomienda inyectar 2 muestras y un blanco cada vez.

La especificación sugerida es C.V. $\leq 1.0 \%$ para cada volumen evaluado.

3.- Verificación del detector.

3.1 Determinar el ruido y la desviación.

Cómo? Determinar las fluctuaciones provenientes de la unidad electrónica y de otras fuentes.

* Ruido: Se sugiere conectar la bomba al detector y determinar el ruido proveniente de la señal eléctrica del detector; es decir, sin flujo. Esto se realiza para

conocer el límite de detección en trazas. Se sugiere determinarlo cada medio minuto.

* Desviación: Si se van obteniendo desviaciones significantes, se recomienda evaluar la Absorbancia a lo largo de 60 minutos.

3.2 Determinar la exactitud y repetibilidad de la escala de absorbancia.

Cómo? Determinar la respuesta comparativa de dicromato de potasio a longitudes de onda representativas del intervalo de trabajo en condiciones estáticas.

Se recomienda conectar la bomba al detector.

La especificación sugerida es C.V. \leq 5.0 %

3.3 Determinar la detección mínima y el intervalo lineal.

Cómo? Determinar la respuesta de una sustancia de concentración conocida en un intervalo más amplio que el lineal.

Se recomienda trabajar con 5 niveles y 6 réplicas de cada nivel.

Calcular el factor (F): Respuesta/Concentración.

Graficar F vs log Concentración.

La especificación sugerida para el intervalo es \pm 5.0 %

4.- Calificación del integrador.

4.1 Determinar la velocidad de la carta.

Cómo? Hacer mediciones de la distancia recorrida por unidad de tiempo.

CAPITULO 7

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Budavari Susan. Editor. "The Merck Index". 11th Ed. Merck & Co., Inc. Rahway, N.J., USA, (S455): 877, 1989.
- 2.- "Drugs of the Future". 12 (6): 544-549, 1987.
- 3.- Reynolds James E.F. Editor. "Martindale. The Extra Pharmacopoeia". 30th Ed. The Pharmaceutical Press. London, U.K.: 941, 1993.
- 4.- Wayne, S.A. de C.V. "Especificaciones Internas del Laboratorio". 1992.
- 5.- United States Pharmacopeia XXII/National Formulary XVII. Part <1225>: "Validation of Compendial Methods": 1710-1712, 1990.
- 6.- International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology. 1992.
- 7.- Fontani F., Prelini R., Ronchi M.C. y Zanotti Gerosa A. "Criteri de Convalida dei Metodi d'Analisi". Boll. Chim. Farm. 126 (2): 66-74, 1987.
- 8.- Taylor John K. "Validation of Analytical Methods" Anal. Chem. 55 (6): 600A-608A, 1983.

- 9.- Inman Eugene L., Frischmann Joseph K. "General Method Validation Guidelines for Pharmaceutical Samples". *J. of Chromatograph. Sci.* 25: 252-256, 1987.
- 10.- Jiménez Vargas Enrique. "Un Acercamiento a la Validación de Métodos Analíticos". Parte 1. *Pharma News.* 1 (5): 16-17, 1990.
- 11.- Jiménez Vargas Enrique. "Un Acercamiento a la Validación de Métodos Analíticos". Parte 2. *Pharma News.* 1 (6): 15-20, 1990.
- 12.- White Thomas X. "Current Concepts for the Validation of Compendial Assays". Stimuli to the Revision Process. *Pharmacopeial Forum.* Mar-Apr: 1241-1245, 1986.
- 13.- Finkelson Martin J. "Validation of Analytical Methods by FDA Laboratories". *Pharm. Techn.* March: 75-79, 1986.
- 14.- Guerra Johny. "Validation of Analytical Methods by FDA Laboratories". *Pharm. Techn.* March: 74-76, 1986.
- 15.- "Report of the PMA Quality Control Section Committee on Pressurized Liquid Chromatography Guidelines for the Analytical Validation of HPLC Methods". Stimuli to the Revision Process. *Pharmacopeial Forum.* Mar-Apr: 2789, 1983.

- 16.- VanderWielen Adrianus J y Hardwidge Edward A. "Guidelines for Assay Validation". *Pharm. Techn.* March, 1982.
- 17.- Vanderhaeghe H. "Validation des Procèdes Analytiques"
- 18.- Comisión Interinstitucional de Prácticas Adecuadas de Manufactura. Monografía Técnica No. 2. "Guía de Prácticas Adecuadas de Laboratorio Analítico". 3a. Ed. México, 1988.
- 19.- United States Pharmacopeia XXII/National Formulary XVII. Part <621>: "Chromatography": 1562-1568, 1990.
- 20.- Abdel M., Henkel. "Essentials of Drug Product Quality" Capítulos 18 y 19.
- 21.- Willard H., Merritt L. Jr. and Dean J. "Instrumental Methods of Analysis". Wadsworth Publishing Co. Belmont, Ca. U.S.A. 1988.
- 22.- Instituto de Análisis Instrumental. "Cromatografía de Líquidos". Manual. 1990.
- 23.- Waters. "Liquid Chromatography". Folleto. 1985.