



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
QUIMICA

VALIDACION DE UN METODO DE ANALISIS POR
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA
RESOLUCION (CLAR) PARA CUANTIFICAR
TRIAZOLAM EN TABLETAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

DORA ALICIA FLORES RIVAS



CIUDAD UNIVERSITARIA, México, D.F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: PROFESORA ETEL VINA MEDRANO BARRA
VOCAL: PROFESOR JOSÉ LUIS IBARMEA AVILA
SECRETARIO: PROFESORA NORMA TRINIDAD GONZÁLEZ MONZÓN
1er SUPLENTE: PROFESORA AIDA NAVA PÉREZ
2do SUPLENTE: PROFESORA GRACIELA SOZA GARCÍA

Sitio donde se desarrollo el tema: Laboratorios Upjohn S. A. de C. V.

Q. F. B. NORMA TRINIDAD GONZÁLEZ MONZÓN

ASESOR DE TEMA

Q. F. B. GLORIA ESTHER SANCHEZ GARCÍA

SUPERVISOR TECNICO

DORA ALICIA FLORES RIVAS

SUSTENTANTE

A la Memoria de Mis Abuelitos
FERNANDO Y ESPERANZA
Su Amor y Ternura Vivirá
Por siempre en mi corazón

A Mis Padres :
RAYMUNDO Y MARÍA DEL CARMEN
Por darme la Vida Con Amor, Cariño, Apoyo
y Comprensión.

A Mis Hermanos :
RAYMUNDO Y MARCO ANTONIO
Por Compartir Conmigo esta Vida

A Mis Sobrinos:
LAURA FERNANDA Y MARIO ALBERTO
Por darme la Chispa de su Alegría

*Al Ing. RAMÓN ARMANDO VÁZQUEZ GUTIÉRREZ
porque su Amor y Comprensión son la luz de mi Vida*

AGRADEZCO

*A Mis Maestros
que compartieron su Sabiduría y Experiencias
para mi formación Profesional*

*Al H. Jurado por sus acertadas Sugerencias
para la elaboración de este trabajo.
A la Q.F.B. Norma Trinidad González Mouzón
Por haber asesorado este trabajo dando su tiempo.*

*A la Q.F.B. Gloria Esther Sánchez Gracla
Por compartir sus conocimientos incondicionalmente
junto con ellos su amistad, que es de sus conocimientos
el mas valioso.*

*A Mis Compañeros
Por todos los momentos felices
que serán recuerdos eternos*

*A Todo el Personal del Laboratorio Upjohn
Por el apoyo Brindad en mi estancia.
Un Agradecimiento Especial a las AMIGUITAS
del Laboratorio de Control de Calidad por darme
la oportunidad de realizar este trabajo, pero además
por amistad...!*

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO 1	
GENERALIDADES	
Triazolam	3
Farmacología	6
Farmacocinética	6
Farmacodinamia	8
Tolerancia	10
Contraindicaciones	11
Efectos Tóxicos	11
Interacciones Medicamentosas	12
Vía De Administración	12
Dosis	12
DEFINICIÓN	
Validación	13
Linealidad	13
Exactitud	13
Especificidad	13
Precisión	14
A) Repetibilidad	14
B) Reproducibilidad	14
Tolerancia	14
Adecuabilidad Del Sistema	15
CAPITULO 2	
TÉCNICA ANALÍTICA	
Condiciones Cromatográficas	18
Reactivos Y Material Utilizado	19
Procedimiento	20
Adecuabilidad Del Sistema	21
Formula	23

CAPITULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

EVALUACIÓN DEL SISTEMA

Linealidad	25
Datos Obtenidos	26
Gráfica 1	32
Gráfica 2	33
Resultados	34
Precisión	35
Resultados	37

EVALUACIÓN DEL MÉTODO

Preparación De Placebos	38
Linealidad	39
Datos Obtenidos	40
Gráfica 3	44
Resultados	45
Exactitud al 100%	47
Resultados	49
Especificidad	50
Repetibilidad	53
Datos Obtenidos	55
Resultados	57
Reproducibilidad	58
Datos Obtenidos	60
Resultados	64
Tolerancia (Equipo Columna)	65
Datos Obtenidos	67
Resultados	69
Tolerancia (Estabilidad De La Muestra Analítica)	71
Datos Obtenidos	71
Resultados	74

CAPITULO 4

ANÁLISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Análisis De Resultados	77
Conclusiones	79

Bibliografía

INTRODUCCIÓN

Debido a los requisitos de la Ley General de Salud de nuestro país es necesario documentar todos los procesos que se vean involucrados en la Producción y la Calidad de los medicamentos, siendo la validación de procesos y métodos analíticos un aspecto relacionado con estos, en el presente trabajo pretendemos documentar y validar el método analítico para cuantificar TRIAZOLAM para la uniformidad de contenido de tabletas por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).

Con la Validación del método analítico se determinará que tan eficaz es la metodología seguida en el Laboratorio de Control de Calidad donde se desarrollo el método tema de la presente tesis.

Evaluando los parámetros estadísticos de Linealidad, Precisión, Exactitud, Reproducibilidad, Especificidad y Tolerancia podremos establecer que el método analítico cumple con los requisitos para Cuantificar TRIAZOLAM y aplicar el método en la Uniformidad de Contenido en tabletas.

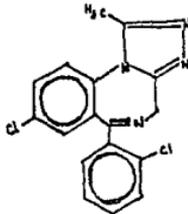
CAPITULO No 1

GENERALIDADES

MONOGRAFÍA

NOMBRE GENÉRICO: TRIAZOLAM

ESTRUCTURA:



C₁₇H₁₂Cl₂N₄

PM=343.21

Triazolam contiene no menos de 97% y no más de 103 % de C₁₇H₁₂Cl₂N₄ Calculado en base seca.

DESCRIPCIÓN Y SOLUBILIDAD:

Polvo cristalino blanco a blanco opaco, prácticamente inodoro soluble en cloroformo; ligeramente soluble en alcohol; prácticamente insoluble en éter y en agua.

PUNTO DE FUSIÓN: 233-235 °C

IDENTIFICACIÓN:

A: El espectro de absorción infra-rojo dispersado en aceite mineral de este exhibe máximos únicamente en la misma longitud de onda que una preparación similar de estándar de referencia de triazolam USP.

B: El espectro de absorción Ultra-violeta de una solución i en 250,000 lts en alcohol exhibe máximos y mínimos a la misma longitud de onda que una solución similar de estándar de referencia de triazolam USP.

Y la respectiva absorbitidad calculada en base seca a la longitud de onda de máxima absorbancia a 220 nm no difiere por mas de 3%.

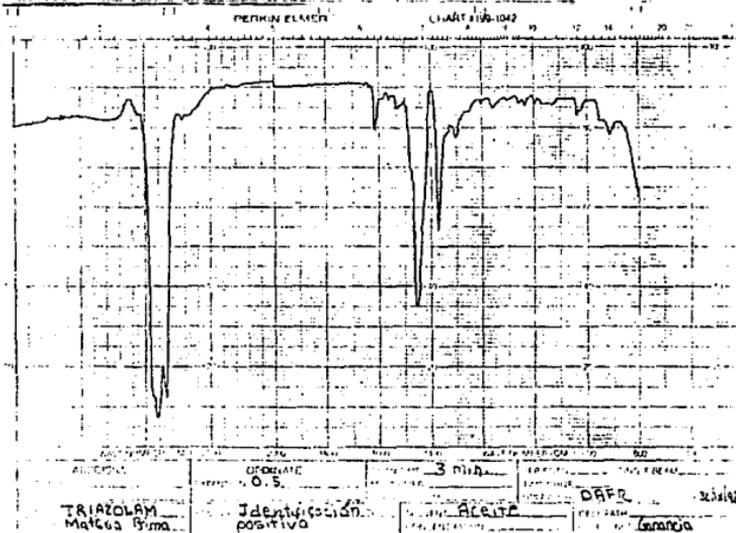
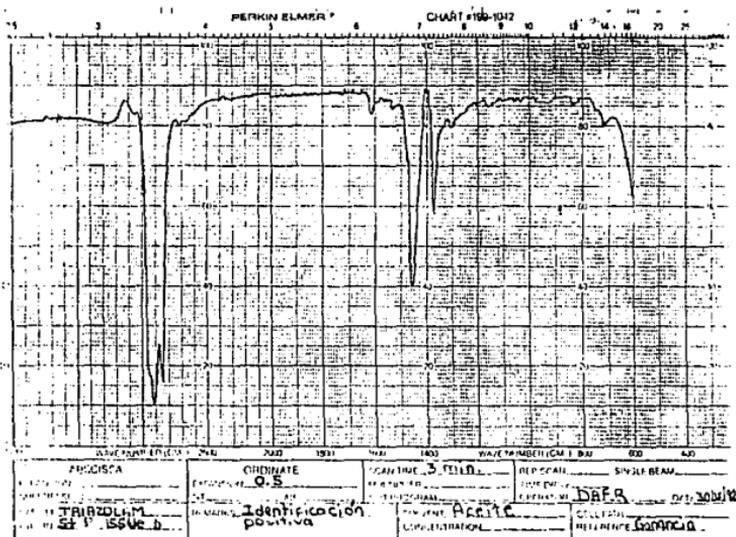
RESIDUOS DE IGNICIÓN:

No mayor a 0.5%

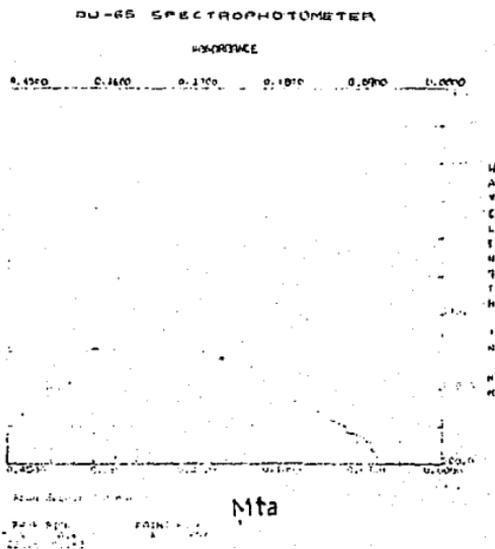
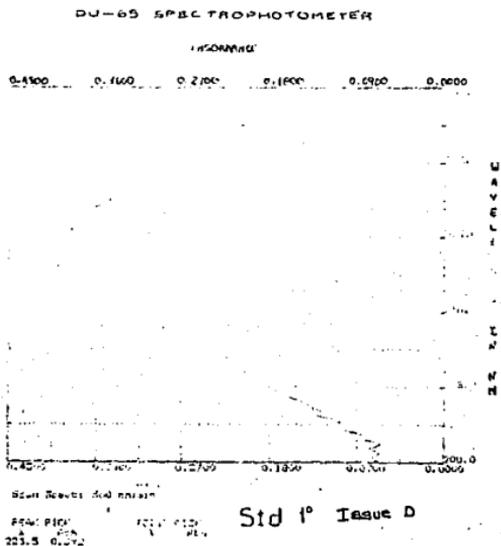
METALES PESADOS:

0.002%

Identificación de espectro infra-rojo del estándar de referencia y de la materia prima realizada en el laboratorio de Control de Calidad.



Identificación del espectro de absorción ultra-violeta del estándar de referencia y de la materia prima realizada en el Laboratorio de Control de Calidad.



FARMACOLOGÍA:

Las Benzodiazepinas son sustancias de origen sintético, tranquilizantes menores, potentes y también anticonvulsivantes, pero algunas son especialmente hipnóticas. Recientemente se ha sintetizado una serie de compuestos, triazolbenzodiazepinas, en que se han añadido al anillo heterocíclico, el triazol núcleo de benzodiazepina, siendo el fármaco principal el triazolam, con un grupo metilo en posición 1, cloro en la posición 8, y un grupo ortoclorofenilo en la posición 6, hipnótico poderoso.

En estudios efectuados en el hombre, el fármaco no ejerce acción evidente sobre la respiración, frecuencia cardiaca y tensión arterial, tampoco afecta a la acción vesical y gastrointestinal, sin embargo a los individuos con insuficiencia respiratoria, está puede ser aumentada por la acción de los hipnóticos.

FARMACOCINETICA:

El triazolam y otros hipnóticos se absorben por todas las vías. Cuando se emplean para tratar a la ansiedad o los trastornos de sueño, los medicamentos de esta clase por lo general se administran por vía bucal. La velocidad de absorción bucal de los sedantes hipnóticos difiere dependiendo de ciertos factores los medicamentos débilmente básicos como las benzodiazepinas son absorbidos con mayor eficiencia en medios con pH más alto como los que se encuentran en el duodeno.

Distribución: el transporte de un sedante hipnótico en la sangre es un proceso dinámico en el cual las moléculas de fármaco entran y abandonan los tejidos a velocidades que depende de la circulación sanguínea gradientes de concentración y permeabilidad. La liposolubilidad interviene de manera importante en la determinación de la velocidad en la cual un sedante hipnótico entra en el sistema nervioso.

El triazolam pasa a la sangre siendo los niveles plasmáticos terapéuticos de alrededor de 7ng/ml y los que se distribuye por el líquido extracelular e intracelular, con considerable captación de las células de los tejidos tóxicos alrededor de 150 ng/ml. En la sangre los fármacos se encuentran combinados con las proteínas especialmente la albúmina en una porción del 90%

El volumen promedio de distribución de este fármaco es de 2.0 l/kg. de peso corporal lo que indica que se distribuye por el líquido extracelular e intracelular, con considerable captación de las células de los tejidos.

La administración durante el embarazo debe hacerse con el conocimiento de que la barrera placentaria a los medicamentos liposolubles es incompleta y que todos estos agentes son capaces de alcanzar al feto. La velocidad para lograr el equilibrio entre la sangre materna y la fetal es mas lenta que entre la sangre maternal y el sistema nervioso central, parcialmente debido a la lentitud del flujo sanguíneo hacia la placenta. Sin embargo, si el sedante hipnótico se administra en el periodo anterior del nacimiento puede contribuir a la depresión de las funciones vitales del neonato.

Biotransformación: el metabolismo hepático explica la depuración o la eliminación de todas las benzodiazepinas. Las dos vías principales que participan son oxidación microsómica, incluyendo N-desalquilación ó hidroxilación alifática y conjugación subsecuente mediante glucuronilo transferasas para formar glucuronatos que se encuentran en la orina.

Las Triazolobenzodiazepinas alprazolam y triazolam experimentan hidroxilación y los metabolitos resultantes parecen ejercer efectos farmacológicos débiles.

Triazolam: límite de vida media de eliminación de 3 a 5 horas

Metabolitos activos α -hidrotriazolam

Absorción bucal rápida

Excreción: Los metabolitos hidrosolubles de las benzodiazepinas y otros sedantes hipnóticos son excretados principalmente por riñón, casi en todos los casos, los cambios en la función renal no tiene un efecto notable en la eliminación de los medicamentos originales.

Mecanismo de acción: Ha sido lento el desarrollo de una hipótesis unitaria relacionada con los mecanismos de acción de los sedantes hipnóticos. La función del ácido gamma aminobutírico (GABA) como neurotransmisor inhibitor importante del sistema nervioso central se ha vuelto más probable que la modificación de sus funciones sea la base de los efectos farmacológicos de diversas clases de agentes, entre ellos las bezodiazepinas.

corteza cerebelosa y cerebral. Las benzodiazepinas parecen aumentar la eficiencia de la inhibición sináptica GABAérgica que produce disminución de la frecuencia de descarga de neuronas de suma importancia en muchas regiones del cerebro.

Las benzodiazepinas no parecen substituir al GABA, sino que requieren la presencia del neurotransmisor para desencadenar una respuesta. Esto ha conducido al concepto de que las benzodiazepinas fomentan de manera indirecta la neurotransmisión GABAérgica a niveles de los receptores postsinápticos sin activación directa de los receptores GABA o de los conductos de cloruro relacionados. Las benzodiazepinas intensifican el cambio de la conductancia del ion cloruro inducida por la interacción del GABA con sus receptores, lo que da por resultado un aumento en la frecuencia los acontecimientos que abren los conductos.

Los estudios neuroquímicos efectuados durante los últimos años han completado y extendido las pruebas electrofisiológicas de la modulación de la neurotransmisión del GABA por las benzodiazepinas. Se ha demostrado sitios receptores de gran afinidad para las benzodiazepinas en muchas regiones del sistema nervioso central, incluyendo medula espinal, tallo encefálico, hipotálamo, estructuras límbicas y cortezas cerebelosas y central. Estos receptores de benzodiazepinas están localizados en las sinápsis GABAérgicas y acoplados, desde el punto de vista funcional, a los conductos del cloruro sensibles al GABA; pero son macromoléculas del receptor del GABA o del ionóforo del cloruro.

La identificación de los receptores de las benzodiazepinas en el cerebro ha permitido que se caractericen dos tipos principales de ligados de los receptores de este fármaco: (1) Las benzodiazepinas clínicamente útiles que ejercen efectos ansiolíticos, hipnóticos y anticonvulsivantes y que parecen actuar como antagonistas clásicos de los receptores (2) Los *antagonistas* del receptor de benzodiazepinas.

FARMACODINAMIA:

Por definición todos los sedantes hipnóticos inducirán sueño si las dosis son lo bastante altas. Se considera que el sueño normal está formado de etapas distintas. según se infiere de tres mediciones fisiológicas: electroencefalogramas, electromiogramas y electrooculograma (una medición de los movimientos laterales del ojo). Basándose en esto último, pueden distinguirse dos categorías principales: sueño de oculares lentos (MOL, representa aproximadamente 70 a

75% del sueño total y sueños de movimientos oculares rápidos (MOR). Ambas etapas se producen en forma cíclica a intervalos de 90 minutos aproximadamente. La etapa del sueño de movimientos oculares rápidos es aquella en que ocurren los sueños más fáciles de recordar.

El sueño de movimientos oculares lentos progresa a través de cuatro etapas (1 a 4), encontrándose la mayor proporción (50%) de sueño en la etapa dos. Está va seguida del sueño de onda lenta o sueño delta (etapas 3 y 4), en el cual se ha observado que se presentan el sonambulismo y los terrores nocturnos.

Los efectos de los medicamentos en las etapas del sueño han sido estudiados extensamente, aunque a menudo se han utilizado sujetos normales voluntarios mas que enfermos con trastornos del sueño. En el caso de los sedantes hipnóticos, los efectos dependen de varios factores, incluyendo el medicamento específico, la dosis y frecuencia de su administración. Aunque existen algunas excepciones, como sigue: (1) la latencia del comienzo del sueño se reduce (tiempo para quedar dormido); (2) la duración de la etapa dos del sueño de movimientos oculares lentos está aumentada; (3) la duración del sueño MOR es menor, y (4) la duración del sueño de onda lenta también es menor.

El comienzo mas rápido del sueño y la prolongación de la etapa dos son probablemente efectos útiles en la clínica. Sin embargo, no esta claro el significado de los efectos en el sueño MOR y el de onda lenta. La administración de sedantes hipnóticos por mas de una semana conduce a cierta tolerancia de sus efectos en los padrones del sueño.

La supresión después de uso continuo puede producir un "rebote" en la frecuencia de la aparición y duración del sueño MOR. Es importante reconocer que la afirmación que a menudo se hace de la superioridad de un sedante hipnótico sobre otro se basa en las acciones diferenciales sobre una etapa del sueño o sobre otra. Ya que se sabe poco acerca de la función de cualquier etapa del sueño es posible que no tenga validez las declaraciones acerca de la idoneidad de un medicamento en particular basándose en sus efectos en los padrones de sueño. Evidentemente, son mas útiles los criterios clínicos de la eficacia en aliviar un problema particular de sueño. El hipnótico ideal (uno que pudiera favorecer el sueño sin cambio alguno en su patrón natural) todavía no ha sido introducido.

TOLERANCIA; DEPENDENCIA PSICOLÓGICA Y FÍSICA

Las propiedades deseables percibidas del alivio de la ansiedad, euforia pérdida de la inhibición y facilitación del sueño han conducido al abuso compulsivo de casi todos los medicamentos clasificados como sedantes hipnóticos. Las consecuencias del abuso de estos agentes pueden ser definidas en términos psicológicos y fisiológicos. El componente Psicológico puede ir inicialmente paralelo a patrones neuróticos simples de conductas difíciles de diferenciar de los del bebedor inveterado de café o del fumador de cigarrillos.

Cuando el patrón del uso de sedantes hipnóticos se vuelve compulsivo, se desarrollan complicaciones más graves, incluyendo dependencia física y tolerancia.

La dependencia física puede describirse como un estado fisiológico alterado que requiere la administración continua del medicamento para prevenir la aparición de un síndrome de abstinencia o de supresión.

En el caso de los sedantes hipnóticos este síndrome se caracteriza por estado de excitabilidad creciente que puede progresar aun a convulsiones. Todos los sedantes hipnóticos producen dependencia física cuando se emplea en forma crónica. Sin embargo la gravedad de los síntomas de supresión difiere entre los medicamentos y depende también de la magnitud de la dosis administrada antes del cese de su empleo.

Cuando se utilizan dosis altas de estos medicamentos la supresión abrupta puede conducir a signos mas graves, la diferencia de la gravedad de los síntomas de supresión entre los sedantes hipnóticos se relacionan en parte con sus propiedades de bioeliminación. El uso de fármacos con vidas medias muy cortas como hipnóticos pueden ocasionar signos de supresión a un entre una dosis y otra. Por Ejemplo el Triazolam, una benzodiazepina con vida media alrededor de cuatro horas, produce ansiedad durante el día cuando se usa para tratar problemas del sueño.

CONTRAINDICACIONES

Triazolam está contraindicado en pacientes con hipersensibilidad a las benzodiaceinas.

EFFECTOS TÓXICOS

El triazolam tiene varias desventajas que incluyen el desarrollo relativamente rápida de tolerancia. Un gran potencial para producir alteraciones del sueño tanto durante su administración como luego de la suspensión y la inducción de efectos secundarios severos que afectan el comportamiento, en particular en dosis altas.

Dado que el triazolam es eliminado rápidamente, su suspensión usualmente está acompañada por un inmediato e intenso insomnio de rebote. El tiempo total de vigilia puede aumentar dos a tres veces sobre el nivel de la noche anterior a la administración del fármaco. El insomnio temprano por la mañana, la ansiedad durante el día y el insomnio de rebote son factores que se pueden reforzar el hábito del fármaco y contribuir al desarrollo de la dependencia.

En dosis usuales son capaz de producir algunas reacciones adversas, como trastornos nerviosos (cafélea, somnolencia, marcos, discreta astenia y a veces ataxia); en algunas ocasiones se han producido fenómenos paradójicos (de inhibición) en forma de agitación, insomnio y confusión mental, sobre todo en los ancianos. Se observan manifestaciones respiratorias en individuos con insuficiencia respiratoria (anoxia e hipercapnia), hasta narcosis de bióxido de carbono.

Durante la administración de 0,5 mg de triazolam se ha observado deterioro de la memoria e incluso una amnesia anterógrada prolongada. Los graves efectos secundarios (estado de confusión, despersonalización, ansiedad severa o alucinaciones) observados por los holandeses durante la administración de triazolam, han sido más altas que las recomendadas clínicamente. Sin embargo estas dosis eran solo de 1 a 2 mg y es muy posible que la corta vida de triazolam, su potencia elevada y la existencia de amnesia, insomnio de rebote contribuyen al desarrollo de efectos adversos sobre el comportamiento de las personas susceptibles.

INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS

Los anticoagulantes orales pierden potencia cuando se administran concomitantemente. Se puede acentuar la concentración de triazolam cuando se administra con cimetidina o Eritromicina o antibióticos macrólidos.

Interactúa con el alcohol.

VÍA DE ADMINISTRACIÓN: Oral

DOSIS

Las dosis recomendada para la mayoría de los adultos es de 0.25 mg antes de dormir. Hay quienes requieren de 0.125 mg cada noche únicamente.

VALIDACIÓN

La validación es un proceso documentado que proporciona el fundamento necesario, con un alto grado de seguridad, para decidir si un método de análisis reúne las condiciones necesarias para su aplicación, mediante estudios experimentales con la comprobación y la verificación de la efectividad y reproducibilidad de la técnica dentro de un margen establecido.

Los parámetros a valorar son los siguientes:

LINEALIDAD

Es la habilidad de un sistema o método analítico que asegura que los resultados obtenidos directamente o matemáticamente son proporcionales a la concentración de la sustancia de interés dentro de un rango establecido.

Deberá estar incluida la concentración seleccionada como 100% de la cantidad a cualificar.

EXACTITUD

Es la concordancia que existe entre un valor detectado experimentalmente, y su valor real de referencia.

Es cuando el método revela, dentro de un límite aceptable la cantidad del principio activo que está presente en la forma farmacéutica.

Se verifica como el por ciento de recobro de análisis de placebos a los que se les han adicionado cantidades conocidas del principio activo.

ESPECIFICIDAD

Es la capacidad del método analítico para separar el fármaco de interés de los otros componentes que dan un respuesta en la muestra analizada

PRECISIÓN

Es el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando la técnica se aplica repetidamente a diferentes muestras de una solución homogénea.

Se verifica con los resultados obtenidos en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación.

a) REPETIBILIDAD

En la precisión del sistema y método analítico es capaz de detectar con un alto grado de concordancia resultados individuales de diferentes muestras bajo las mismas condiciones de operación.

b) REPRODUCIBILIDAD

Es la precisión del sistema y método analítico donde se verifica la concordancia de los resultados individuales de diferentes muestras bajo condiciones diferentes de operación.

NOTA:

Se recomienda no ser usado el término de PRECISIÓN únicamente REPETIBILIDAD y REPRODUCIBILIDAD, por ser confundido con el concepto EXACTITUD.

“Guide to the expression of uncertainty in measurement. Expression of Uncertainty 1993”.

TOLERANCIA

Determina el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos del método analítico, de una misma muestra, bajo condiciones diferentes de operación, (aparato, columna, pH, temperatura, etc.)

En algunos casos es de utilidad la estabilidad de la muestra analítica como prueba de tolerancia, al conservar la integridad fisicoquímica y la concentración de la (s) sustancia (s) de interés, después de ser preparada para su cuantificación bajo condiciones específicas

ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

En cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es necesario verificar la adecuabilidad y eficiencia del sistema que se está usando.

El sistema debe de ser adecuado a las condiciones de uso, ya que por razones de operación pueden existir modificaciones que alteran la respuesta de los cromatogramas.

La adecuabilidad del sistema puede verificarse mediante las siguientes pruebas:

1. Reproducibilidad de inyecciones repetidas.
2. Factor coleo.
3. Resolución entre los picos.

1. Reproducibilidad de inyecciones repetidas: Se realizan cinco inyecciones con la solución analítica, los resultados se expresan como Desviación Estándar Relativa (RSD).

Los resultados de los cinco cromatogramas repetidos, usados para realizar los cálculos, a menos que lo indique la monografía individual, se especifique lo contrario; debe indicar que se encuentra dentro del límite de Desviación Estándar Relativa que es menor de 2%. En caso de que la RSD sobrepase dicho límite; se utilizan los datos de seis cromatogramas y el límite será mayor al 2%.

2. Factor Coleo: Es el límite máximo permisible de asimetría del pico.

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

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

3, Resolución entre los picos: Asegura la separación de los componentes que eluden cerca, estableciendo así la eficiencia general de separación del sistema, o cuando el estándar interno es usado.

FALTA PAGINA

No. *16*

CAPITULO No 2

TÉCNICA ANALÍTICA

TÉCNICA ANALÍTICA

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

EQUIPO

BOMBA: Capaz de operar a 1500 psi

INYECTOR: de volumen muerto bajo

DETECTOR: UV a 254 nm Modelo 441 de Waters

COLUMNA: Acero Inoxidable 4mm DI, 30 cm largo de waters o equivalente

EMPAQUE DE COLUMNA: 10 micras, Silica Gel

PARÁMETROS DE OPERACIÓN

FLUJO: 2.5ml/min.

PRESIÓN: Aproximadamente 1225 psi

TEMPERATURA: Ambiente

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 7µl

ATENUACIÓN: Capaz de obtener respuesta en mas de la mitad de la carta

SENSIBILIDAD: 1.0 AUFS

FASE MÓVIL: Acetonitrilo: Cloroformo: 1-Butanol: Agua Destilada: Ácido Acético Glacial

(850ml : 80ml : 50ml : 20ml : 0.5ml)

TÉCNICA ANALÍTICA

REACTIVOS Y MATERIALES UTILIZADOS

Para la preparación de la fase móvil como de las muestras se utilizo el siguiente material:

FASE MÓVIL

Probetas Graduadas de vidrio (1000 ml, 100 ml, 50 ml).
Equipo de filtración al vacio con membrana 045 micras.
Kitasato (1500 ml).
Equipo Ultrasónico.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Matraz volumétrico (2000 ml, 200 ml, 100 ml, 50 ml, 10 ml).
Míllex poro 0.45 micras.
Pipeta graduada 1 ml.
Pipetas volumétricas (5 ml, 10 ml).
Balanza analítica semi-micro con cinco plazas Mettler.
Balanza analítica con cuatro plazas Mettler.
Agitador Mecánico.
Equipo digital Dosimat Methrom.
Vial de vidrio 30 ml
Tapón de hule gris para vial "The Upjohn Manufacturing Company. F-1888".
Casquillo de aluminio para vial.

SOLVENTES PARA LA REPARACIÓN DE LA FASE MÓVIL

Acetonitrilo:	BAKER ANALYZED GRADO HPLC
Cloroformo:	BAKER ANALYZED GRADO HPLC
1- Butanol:	BAKER ANALYZED GRADO HPLC
Agua destilada	
Ácido acético:	BAKER ANALYZED GRADO HPLC
Glacial.	

ESTÁNDAR INTERNO

Alprazolam: Materia Prima

ESTÁNDAR DE REFERENCIA

Triazolam USP.

TÉCNICA ANALÍTICA

PROCEDIMIENTO SEGUIDO PARA EL DESARROLLO DEL MÉTODO

SOLUCIÓN DEL ESTÁNDAR INTERNO

Con exactitud pesar aproximadamente la cantidad necesaria para preparar una solución 0.025 mg/ml de ALPRAZOLAM en acetonitrilo.

SOLUCIÓN DEL ESTÁNDAR DE REFERENCIA

Con exactitud pesar aproximadamente 2.5 mg de estándar de referencia TRIAZOLAM USP y transferir a un matraz volumétrico de 100 ml adicionar 50 ml de estándar interno disolver con ultrasonido (aproximadamente 3 min.) completar el aforo con estándar interno y mezclar.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Transferir una tableta a cada vial de vidrio.

Adicionar con pipeta graduada 0.4 ml de agua directamente sobre la tableta, mantener en reposo por 2 min. y agitar hasta dispersar la tableta.

A cada vial adicionar estándar interno como se indica en la siguiente tabla:

POR TABLETA (mg)	ESTÁNDAR INTERNO (ml)
0.125	5.0
0.25	10.0
0.50	20.0
1.0	40.0

Agitar la muestra por 30 min. con agitación mecánica filtrar la muestra MILLEX 0.45 micras de poro.

Inyectar los estándares correspondientes y verificar la adecuabilidad del sistema.

TÉCNICA ANALÍTICA ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

Obtener una línea base estable e inyectar no menor de 5 veces la preparación del estándar de referencia

[La Desviación Estándar relativa (RSD) deberá ser menor de 2.0%]

Calculado de la siguiente manera:

$$RSD\% = \frac{100}{X} \cdot \frac{(x_i - X)^2}{n-1}$$

$$\text{ó}$$

$$RSD\% = \frac{DE}{X} \cdot 100$$

Donde:

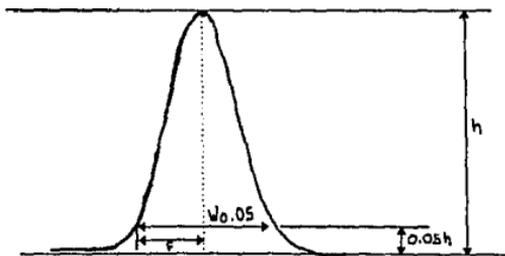
x_i = Cada una de las 5 relaciones (ST / ST INT)

X = Media de los datos obtenidos

n = Número de datos

DE = Desviación Estándar

De los Cromatogramas determinar el Factor de Coleo



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

Así como la resolución entre picos:

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

Donde:

R = Resolución

V1 = Tiempo de retención del primer pico

V2 = Tiempo de retención del segundo pico

W1= Ancho de la base del primer pico

W2 = Ancho de la base del segundo pico

TÉCNICA ANALÍTICA

Si la adecuabilidad del sistema es correcta, inyectar la muestra por duplicado

Para obtener la concentración de TRIAZOLAM en tabletas se aplica la siguiente ecuación:

$$(R_{mta} / R_{ST}) * (W_{ST} / N) * (V_1 / V_2) * P$$

Donde:

R_{Mta} = Relación (ST / STINT)

Teniendo en cuenta que para la muestra el área del ST, es el área del TRIAZOLAM contenido en la tableta

R_{ST} = Es el valor medio, en la adecuabilidad del sistema de la relación (ST / STINT).

W_{ST} = Peso del estándar de referencia en mg

N = Numero de tabletas por vial

V_1 = Volumen del estándar interno usado en la preparación de la muestra

V_2 = Volumen de estándar interno usado en la preparación del estándar de referencia.

P = Pureza del estándar de referencia expresado en decimales

Con la finalidad de facilitar los cálculos en la concentración de las tabletas se obtiene el valor de una constante que se calcula de la siguiente manera para cada análisis :

$$(W_{ST} / R_{ST}) * (V_1 / V_2) * P$$

Como siempre se trabajo con una tableta por vial $N = 1$

El valor de la constante es multiplicado con el valor de la relación R_{Mta} (ST / STINT) de la muestra analizada

CAPITULO No 3
PARTE EXPERIMENTAL

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

EVALUACIÓN DEL SISTEMA

LINEALIDAD

Esta prueba se realizó para verificar que el sistema es capaz de responder de forma lineal.

PREPARACIÓN DE UNA SOLUCIÓN CONCENTRADA DE TRIAZOLAM USP

Potencia = 99.8%

Pesar 25.3 mg en un matraz aforado de 50 ml, adicionar 25 ml de acetonitrilo, disolver con ultrasonido por 3 min., enfriar a temperatura ambiente, aforar con acetonitrilo.

Concentración = 0.503 mg/ml

PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR INTERNO

La preparación del estándar interno fue, pesar 50.5 mg de ALPRAZOLAM llevando la muestra al aforo de 2000 ml con acetonitrilo; con una concentración de 0.025 mg/ml

A partir de la solución concentrada de TRIAZOLAM USP medir alícuotas con el equipo dosificador (Dosimat Metrohm), correspondientes al 120%, 110%, 100%, 90% y 80% del valor de análisis (0.125mg), en matraz de 100 ml y aforar con estándar interno. (Como lo muestra la tabla).

Preparando por duplicado cada una de las muestras

RESULTADOS

La tabla No 1 y 2, y las gráficas 1 y 2 muestran las respuestas obtenidas de la relación entre áreas y el análisis estadístico que demuestra la linealidad del sistema.

NOTA

El intervalo 80% - 120% de las concentraciones de la curva de calibración son con el propósito de tener un rango de análisis que abarque los límites establecidos para el Laboratorio de Control de Calidad.

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO
LINEALIDAD DEL SISTEMA**

% DE ANALISIS	ALICUOTA / AFORO ML / 100 ML	CONCENTRACIÓN MG / ML
120	6.0	0.03036
110	5.5	0.02783
100	5.0	0.02530
90	4.5	0.02277
80	4.0	0.02024

CORRIDA No. 1

TABLA No 1

ÁREA (ST)	ÁREA (ST/INT)	RESPUESTA (ST/STINT)	RELACIÓN (RESP/CONC)
142663	192602	0.74071	24.3975
132275	194647	0.67956	24.4182
122719	197242	0.62217	24.5917
108597	195723	0.55485	24.3675
96655	196764	0.49122	24.2697

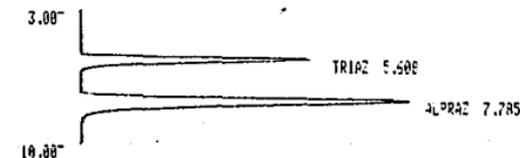
CORRIDA No. 2

TABLA No 2

ÁREA (ST)	ÁREA (ST/INT)	RESPUESTA (ST/STINT)	RELACIÓN (RESP/CONC)
142312	192312	0.74001	24.3745
132021	193054	0.68386	24.5158
123318	198820	0.62025	24.5158
108660	196860	0.55197	24.2411
97217	196558	0.49460	24.4367

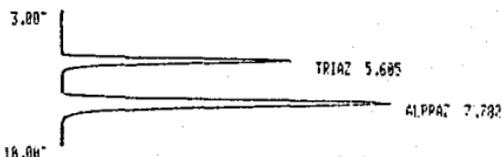
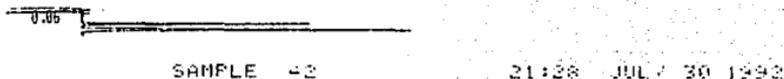
LINEARIDAD DEL SISTEMA

CROMATOGRAMAS AL 80% DE LA CONCENTRACIÓN



CAL. METHOD 00
SF PA FB
.100000e+03 .000000e+00 .100000e+01

NO.	NAME	RT	A OR. H	MK	CONC
1	TRIAZ	5.608	96655	*	63.000000
2	ALPRAZ	7.785	196764	M	63.000000
TOTAL			293419	*	63.000000



CAL. METHOD 00
SF PA FB
.100000e+03 .000000e+00 .100000e+01

NO.	NAME	RT	A OR. H	MK	CONC
1	TRIAZ	5.605	97217	M	63.000000
2	ALPRAZ	7.780	196764	M	63.000000
TOTAL			293976	M	63.000000

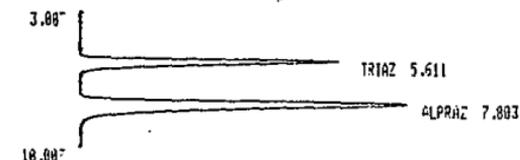
LINEARIDAD DEL SISTEMA

CROMATOGRAMAS AL 90% DE LA CONCENTRACIÓN



SAMPLE 39

20:54 JULY 30 1992



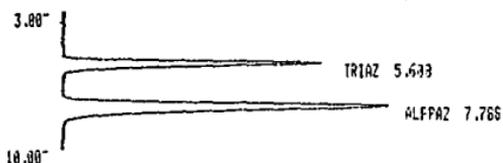
CAL. METHOD 00
 SF .100000E+03 PA .000000E+00 PB .100000E+01

NO.	NAME	RT	A OR H	MK	CONC
1	TRIAZ	5.611	108597	M	* 63.000000
2	ALPRAZ	7.803	195723	M	* 63.000000
TOTAL			304321	*	63.000000



SAMPLE 40

21:05 JULY 30 1992

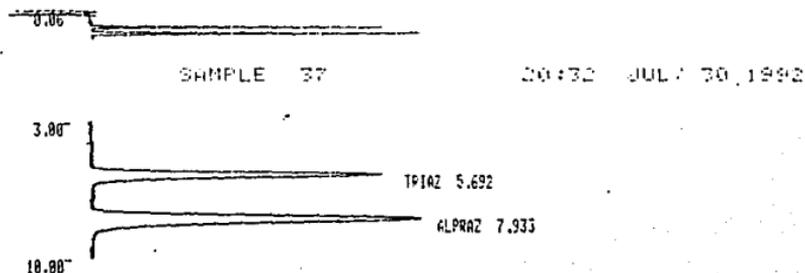


CAL. METHOD 00
 SF .100000E+03 PA .000000E+00 PB .100000E+01

NO.	NAME	RT	A OR H	MK	CONC
1	TRIAZ	5.608	108660	M	* 63.000000
2	ALPRAZ	7.788	196860	M	* 63.000000
TOTAL			305521	*	63.000000

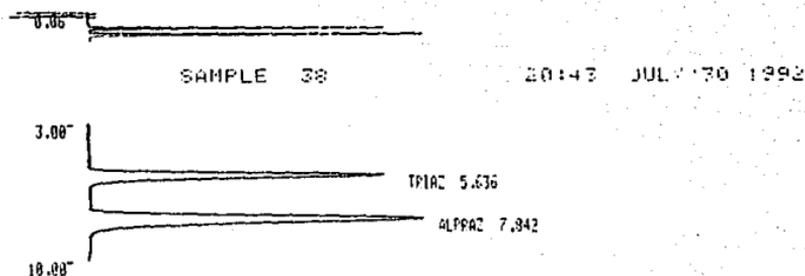
LINEARIDAD DEL SISTEMA

CROMATOGRAMAS AL 100% DE LA CONCENTRACIÓN



SAMPLE 37 20:32 JUL 7 '90 1992

CAL. METHOD		00	SF	PA	PI
		.100000	in+03	.000000	in+00
				.100000	in+01
NO.	NAME	RT	A OR H	MK	CONC
1	TRIAZ	5.692	122719	M	63.000000
2	ALPRAZ	7.933	197242	M	63.000000
TOTAL			319961		63.000000



SAMPLE 38 20:43 JUL 7 '90 1992

CAL. METHOD		00	SF	PA	PI
		.100000	in+03	.000000	in+00
				.100000	in+01
NO.	NAME	RT	A OR H	MK	CONC
1	TRIAZ	5.636	123318	M	63.000000
2	ALPRAZ	7.842	198820	M	63.000000
TOTAL			322139		63.000000

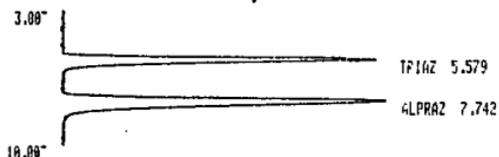
LINEARIDAD DEL SISTEMA

CROMATOGRAMAS AL 110% DE LA CONCENTRACIÓN



SAMPLE 35

20:10 JULY 30 1992



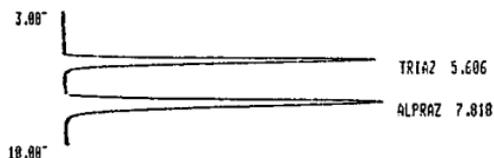
CAL. METHOD 00
 SF PA PB
 .100000₁₀+03 .000000₁₀+00 .100000₁₀+01

NO.	NAME	RT	A OR H	NK	CONC
1	TRIAZ	5.579	132275	*	63.000000
2	ALPRAZ	7.742	194647	*	63.000000
TOTAL			326923	*	63.000000



SAMPLE 35

20:21 JULY 30 1992



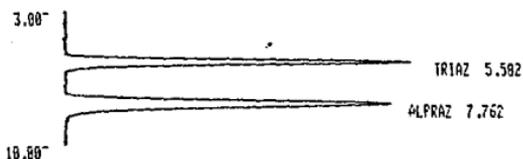
CAL. METHOD 00
 SF PA PB
 .100000₁₀+03 .000000₁₀+00 .100000₁₀+01

NO.	NAME	RT	A OR H	NK	CONC
1	TRIAZ	5.606	132021	N *	63.000000
2	ALPRAZ	7.818	193054	N *	63.000000
TOTAL			325075	*	63.000000

LINEARIDAD DEL SISTEMA

CROMATOGRAMAS AL 120% DE LA CONCENTRACIÓN

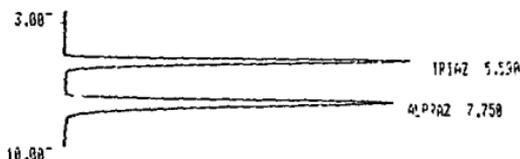
0.00
 SAMPLE 33 19:46 JULY 30 1992



CAL. METHOD 00
 SF PA PE
 .100000₁₀+03 .000000₁₀+00 .100000₁₀+01

NO.	NAME	RT	A OR H	MK	CONC
1	TRIAZ	5.582	142663	M	% 63.000000
2	ALPRAZ	7.762	192602	M	% 63.000000
TOTAL			335266	%	63.000000

0.00
 SAMPLE 34 19:59 JULY 30 1992

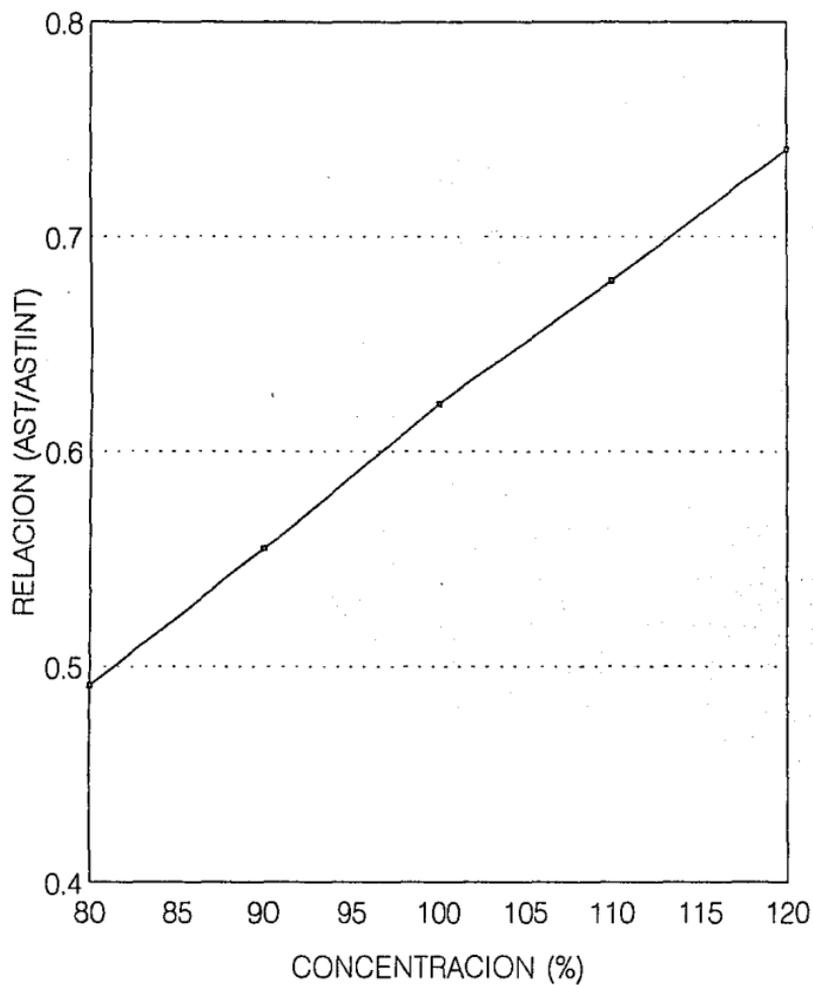


CAL. METHOD 00
 SF PA PE
 .100000₁₀+03 .000000₁₀+00 .100000₁₀+01

NO.	NAME	RT	A OR H	MK	CONC
1	TRIAZ	5.590	142312	M	% 63.000000
2	ALPRAZ	7.750	192312	M	% 63.000000
TOTAL			334625	%	63.000000

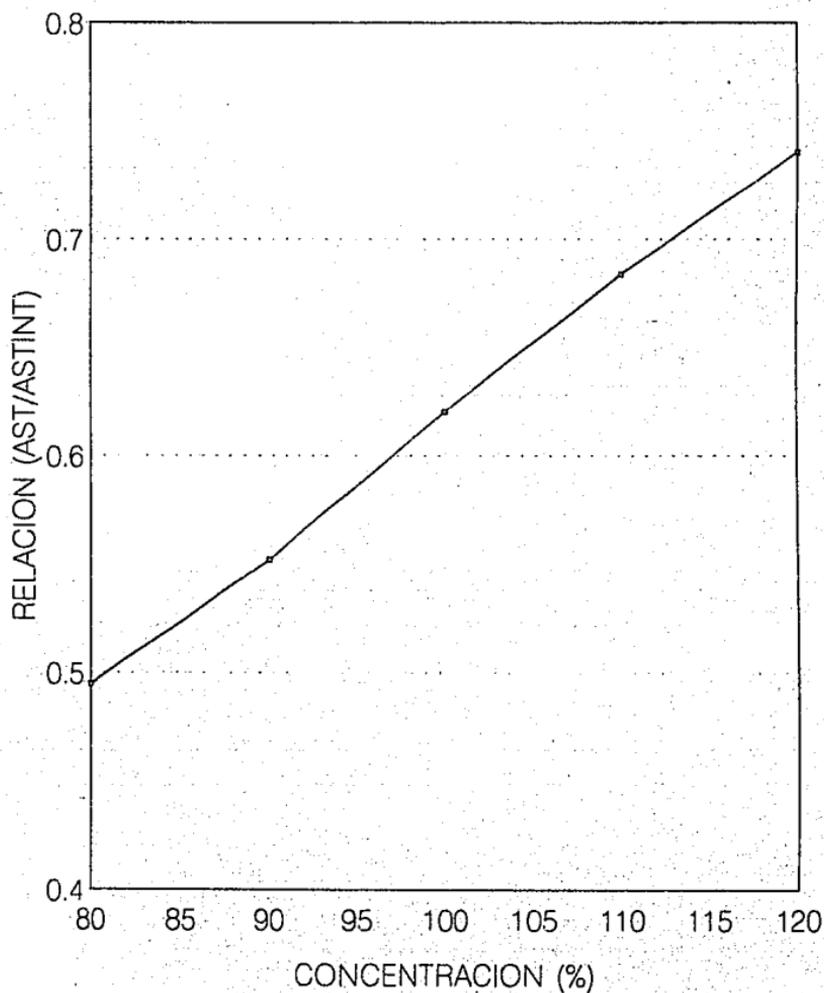
LINEALIDAD DEL SISTEMA

TRIAZOLAM
GRAFICA No 1



LINEALIDAD DEL SISTEMA

TRIAZOLAM
GRAFICA No 2



VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

EVALUACIÓN DEL SISTEMA

RESULTADOS DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA

DE LA CORRIDA 1 SE OBTIENE

Media (X) = 24.40890

Desviación Estándar (DE) = 0.11696

Coefficiente de Variación (CV) = 0.47918%

DE LA CORRIDA 2 SE OBTIENE:

Media (X) = 24.41678

Desviación Estándar (DE) = 0.11476

Coefficiente de Variación (CV) = 0.46990%

DE LA GRÁFICA No 1 SE OBTIENE:

Pendiente (m) = 0.00623

Ordenada al Origen (b) = -0.00599

Coefficiente de Regresión (r) = 0.99960

Coefficiente de Determinación (r²) = 0.99931

Error Estándar de Regresión (Sy / x) = 0.00297

DE LA GRÁFICA 2 SE OBTIENE:

Pendiente (m) = 0.00622

Ordenada al Origen (b) = -0.00457

Coefficiente de Regresión (r) = 0.99940

Coefficiente de Determinación (r²) = 0.99897

Error Estándar de Regresión (Sy / x) = 0.00363

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

EVALUACIÓN DEL SISTEMA

PRECISIÓN

Esta prueba se realizó con el análisis de seis soluciones preparadas a partir de la solución concentrada de TRIAZOLAM USP utilizada para la Linealidad de Sistema. Con la alícuota correspondiente al 100% del valor de análisis (0.125mg), llevando las muestras al aforo de 100ml con la misma solución de Estándar Interno preparada también para la Linealidad del Sistema.

Los datos Obtenidos los encontramos en la siguiente tabla:

TABLA No 3

No.	CONCENTRACIÓN MG ML	ÁREA ST	ÁREA STINT	RELACIÓN ST / STINT
1	0.0253	117242	179152	0.65443
2	0.0253	111345	170616	0.65261
3	0.0253	124704	189191	0.65914
4	0.0253	120188	183212	0.65601
5	0.0253	114701	174682	0.65663
6	0.0253	119933	181930	0.65923

De la Columna RELACIÓN (ST/STIN) se Obtiene:

Media (X) = 0.65634

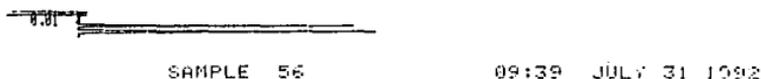
Desviación Estándar (DE) = 0.00260

Varianza (S²) = 0.000006

Coefficiente de Variación (CV) = 0.396699%

PRECISIÓN DEL SISTEMA

CROMATOGRAMAS AL 100% DE LA CONCENTRACIÓN



NO.	NAME	RT	A OR H	NK	CONC
1	TRIAZ	5.569	117245	N	% 63.000000
2	ALPRAZ	7.728	179152		% 63.000000
TOTAL			296397		% 63.000000



NO.	NAME	RT	A OR H	NK	CONC
1	TRIAZ	5.560	111345	N	% 63.000000
2	ALPRAZ	7.710	178616		% 63.000000
TOTAL			289962		% 63.000000

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

EVALUACIÓN DEL SISTEMA

Continuando con la Evaluación de la Precisión del Sistema se Calcula:

De la Tabla Numero 3

Intervalo de Confianza (IC) al 95%

Para un $\alpha = 0.05$ con grados de libertad (g.l. = 5), tenemos T teórica al 95% = 2.015, $n = 6$

Por lo tanto se tiene: $\bar{X} \pm T \text{ teórica al } 95\% (DE / \sqrt{6})$

$$0.65634 \pm 2.015 (0.00260 / \sqrt{6})$$

$$0.65634 \pm 0.00214$$

Por lo consiguiente se tiene el Intervalo de Confianza (IC) al 95% = (0.65848 - 0.65420)

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PREPARACIÓN DE PLACEBOS

FORMULA CUALI-CUANTITATIVA

CADA TABLETA CONTIENE:

TRIAZOLAM	0.125 mg
EXCIPIENTE c.b.p	96.0 mg

- Preparar un kilo de placebo
- Pesar cada una de las materias primas y tamizar como lo indica la técnica de manufactura.
- Para cantidades menores a 10.0 grs. como son el colorante, eritrocina sodica etc. pesarlas en balanza semi-micro.
- Pasar las materias primas a una bolsa de polietileno lo suficientemente grande para mezclar.
- Introducir aire a la bolsa y mezclar con movimientos circulares .

NOTA :

El tiempo de mezclado depende del criterio del químico; cuando la comparación de la mezcla sea igual a las características de un lote.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO

EVALUACIÓN DEL MÉTODO

LINEALIDAD DEL MÉTODO

Se determino con la preparación de placebos, pesando en viales y adicionando alicuotas correspondientes al 80%, 100% y 120% del valor de análisis (0.125mg), tales alicuotas son de la preparación de una solución concentrada de estándar de referencia de TRIAZOLAM USP y adicionadas con el equipo dosificador 665 Dosimat Metrohm, cada concentración fue preparada por triplicado, tal como se indica en la técnica.

ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

Concentración del estándar interno = 50mg / 2000ml de acetonitrilo
Concentración del estándar de referencia = 2.52mg / 100ml de STINT
pureza del estándar = 99.8%

DATOS

ÁREA ST	ÁREA STINT	RESPUESTA ST / STINT
121220	199391	0.60795
120498	196985	0.61171
118585	196676	0.60295
119828	198900	0.60245
120008	199778	0.60071

RESULTADOS

Media (X) = 0.60515

Desviación Estándar (DE) = 0.00454

Desviación Estándar Relativa (RSD) = 0.7% [criterio de aceptación no mas de 2.0%]

A partir de la media y de las diluciones correspondientes obtenemos el valor de la constante

$$2.52 \text{ mg} / 0.60515 * 5\text{ml} / 100\text{ml} * 0.998 = 0.20780$$

Nota:

El valor de la constante en la adecuabilidad del sistema va a ser multiplicado por la relación que se obtenga de (ST/STINT), de cada muestra para obtener de esta manera la concentración en (mg / tab) para cada caso.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

EVALUACIÓN DEL MÉTODO

La preparación de la solución concentrada de estándar de referencia de TRIAZOLAM USP fué de la siguiente manera:

Peso de TRIAZOLAM = 25.34mg

Pureza de TRIAZOLAM = 99.8%

$$25.34 \text{ mg} * 0.998 \text{ mg} = 25.28 \text{ mg de TRIAZOLAM}$$

Tabla No 4

% ANÁLISIS	ALICUOTA ML	CANTIDAD ACONDICIONADA MG / ML	% ADICIONADO
80	4	0.10116	80.93
100	5	0.12645	101.16
120	6	0.15174	121.39

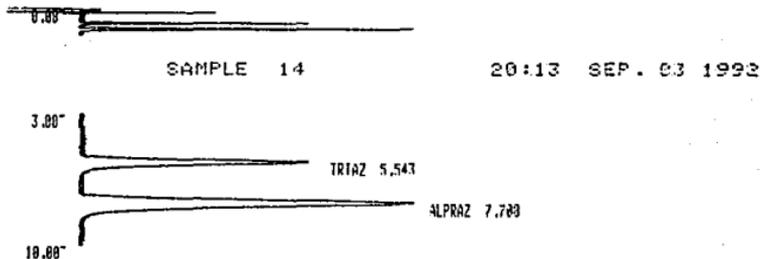
Obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla No 5

ÁREA ST	ÁREA STINT	RELACIÓN (ST / STINT)	CANTIDAD RECUPERADA (MG / TAB)
51531	105405	0.48889	0.10159
51806	106595	0.48601	0.10099
51060	106490	0.47939	0.09962
58768	95263	0.61690	0.12819
57655	94522	0.60996	0.12675
57176	95143	0.60095	0.12488
64811	89781	0.72188	0.15001
63352	88154	0.71865	0.14934
62290	86398	0.72097	0.14982

Usado para la Exactitud al 100 %

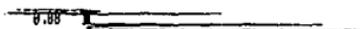
LINERIDAD DEL MÉTODO
CROMATOGRAMAS AL 80% DE LA CONCENTRACIÓN



NO.	NAME	RT	A	OR	H	MK	CONC
1	TRIAZ	5.543	51531			M	* 63.000000
2	ALPRAZ	7.708	105405			M	* 63.000000
	TOTAL		156936				* 63.000000

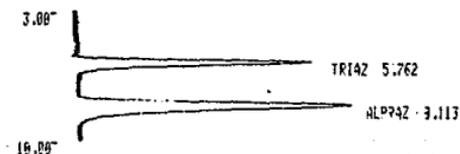
LINERIDAD DEL MÉTODO

CROMATOGRAMAS AL 100% DE LA CONCENTRACIÓN



SAMPLE 21

13:26 SEP. 04 1993

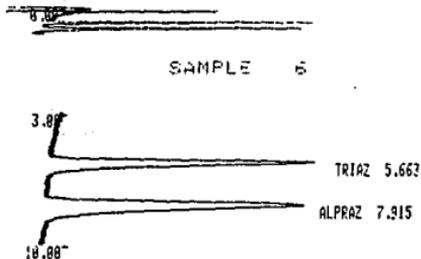


CAL. METHOD	00		
	SF	PA	PB
	.100000e+03	.000000e+00	.100000e+01

NO.	NAME	RT	A OR H	MK	CONC
1	TRIAZ	5.762	98758	M	63.000000
2	ALPRAZ	8.113	95883	M	63.000000
	TOTAL		154641		126.000000

LINERIDAD DEL MÉTODO

CROMATOGRAMAS AL 120% DE LA CONCENTRACIÓN



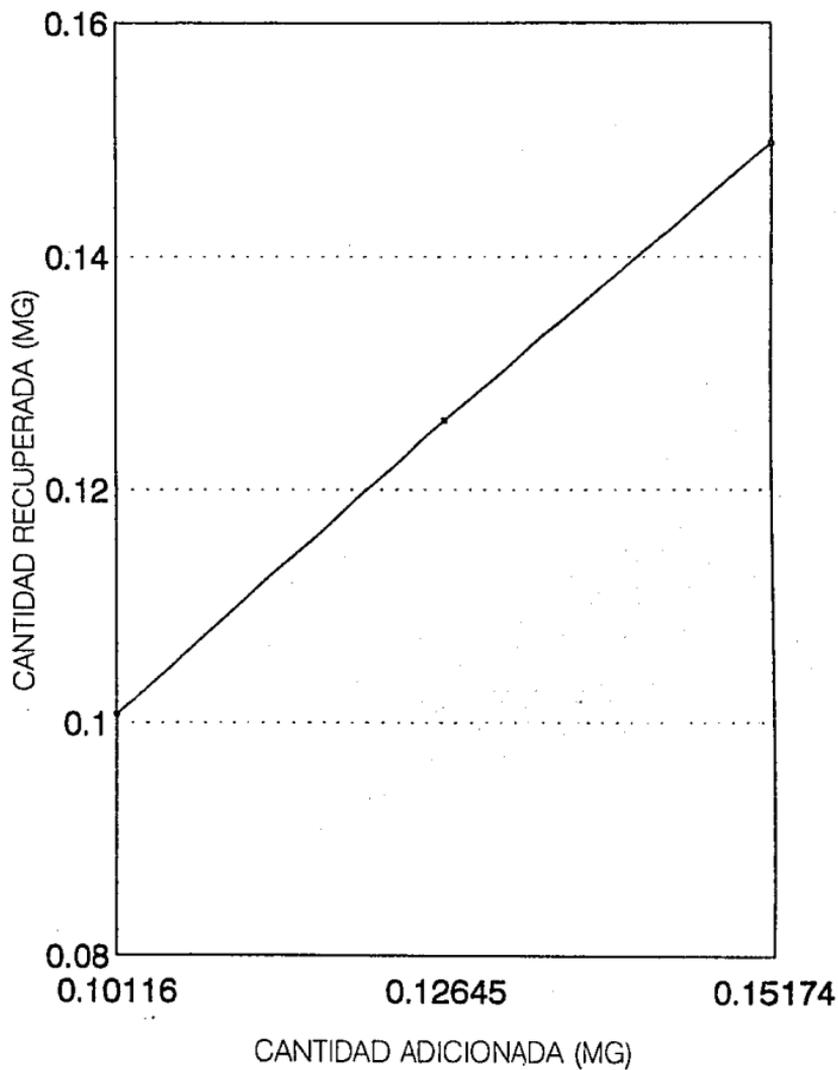
SAMPLE 6

10:04 SEP. 08 '92

NO.	NAME	RT	A	OR H	MF	CONC
1	TRIAZ	5.663	64811			* 63.000000
2	ALPRAZ	7.915	89781			* 63.000000
TOTAL			154593			* 63.000000

LINEALIDAD DEL METODO

TRIAZOLAM
GRAFICA No 3



VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

EVALUACIÓN DEL MÉTODO

Con el análisis de regresión lineal de la gráfica No 3 obtenemos los siguientes resultados:

Ordenada al Origen (b) = 0.00321

Pendiente (m) = 0.96856

Coefficiente de Regresión (r) = 0.99946

Coefficiente de Determinación (r^2) = 0.99893

Error Estándar de Regresión (S_y / X) = 0.03125

Numero de datos (n) = 3

Con el calculo del Intervalo de Confianza (IC) para la media, se localiza el 100% recuperado, se obtiene:

Intervalo de Confianza (IC) al 95% =

$$X \pm T \text{ teórica } (DE / \sqrt{n})$$

Donde para un $\alpha = 0.05$, con grados de libertad (g.l.) = $n-1$; g.l. = $9 - 1 = 8$

se tiene una T teórica al 95% = 1.860 ; donde $n = 9$, $X = 99.62$, $DE = 1.03830$

$$\text{IC al 95\%} = 99.62 \pm 1.860 (1.03830 / \sqrt{9})$$

$$\text{IC al 95\%} = 99.62 \pm 0.64374$$

Por lo tanto el IC al 95% (100.26% - 98.97%)

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

EVALUACIÓN DEL MÉTODO

TABLA No. 6

CANTIDAD RECUPERADA	% RECUPERADO EN BASE AL 100% = 0.125 MG/TAB	% RECUPERACIÓN
0.10159	81.27	100.42
0.10099	80.79	99.83
0.09962	79.70	98.48
0.12819	102.55	101.37
0.12675	101.40	100.24
0.12488	99.90	100.24
0.15001	120.01	98.83
0.14934	119.47	98.42
0.14982	119.85	98.73

De la Columna % Recuperación se obtiene:

Numero de datos (n) = 9

Desviación Estándar (DE) = 1.03830

Varianza (S^2) = 1.07808

Media (X) = 99.62

Coefficiente de Variación (CV) = 1.04224%

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

EVALUACIÓN DEL MÉTODO

EXACTITUD AL 100%

Esta prueba se realizó con la preparación de 6 placebos a los que se adicione la alicuota correspondiente al 100% del valor de análisis (0.125mg) de manera independiente a partir de la solución concentrada de estándar de Referencia de TRIAZOLAM USP utilizada para la linealidad del método, bajo las mismas condiciones de operación y siguiendo la técnica de análisis.

Los resultados obtenidos se describen en la siguiente tabla:

Tabla No 7

AREA ST	ÁREA STINT	RELACION ST / STINT
58381	95795	0.60944
60330	100088	0.60277
60886	101077	0.60237
59548	98298	0.60579
57399	95561	0.60065
60495	101303	0.59717

Con la Adecuabilidad del Sistema para la Linealidad del Método y con los cálculos correspondientes se obtiene:

Tabla No 8

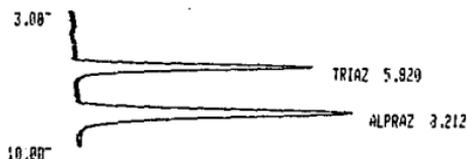
CANTIDAD RECUPERADA MG / TAB	% RECUPERACIÓN EN BASE AL 100% = 0.125 MG / TAB	% RECUPERADO
0.12664	101.31	100.15
0.12526	100.21	99.06
0.12517	100.14	98.99
0.12588	100.70	99.54
0.12482	99.86	98.71
0.12409	99.27	98.13

EXACTITUD AL 100%

CROMATOGRAMAS AL 100% DE LA CONCENTRACIÓN

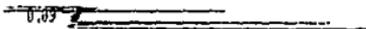
SAMPLE 35

16:02 SEP. 04 1982



CAL. METHOD 00
SF .100000e+03 PA .000000e+00 PB .100000e+01

NO.	NAME	RT	A OR H	MK	CONC
1	TRIAZ	5.820	57399		% 63.000000
2	ALPRAZ	3.212	95561		M % 63.000000
TOTAL			152960		% 63.000000



SAMPLE 13

11:57 SEP. 04 1982

CAL. METHOD 00
SF .100000e+03 PA .000000e+00 PB .100000e+01

NO.	NAME	RT	A OR H	MK	CONC
1	TRIAZ	5.734	60495		% 63.000000
2	ALPRAZ	3.832	101303		M % 63.000000
TOTAL			161798		% 63.000000

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

EVALUACIÓN DEL MÉTODO

De la Tabla No 8 en la Columna % RECUPERADO se calcula :

Media (\bar{X}) = 99.09%

Desviación Estándar (DE) = 0.69321

Varianza (S^2) = 0.48054

Coficiente de Variación (CV) = 0.69953%

Numero de Datos (n) = 6

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

EVALUACIÓN DEL MÉTODO

ESPECIFICIDAD

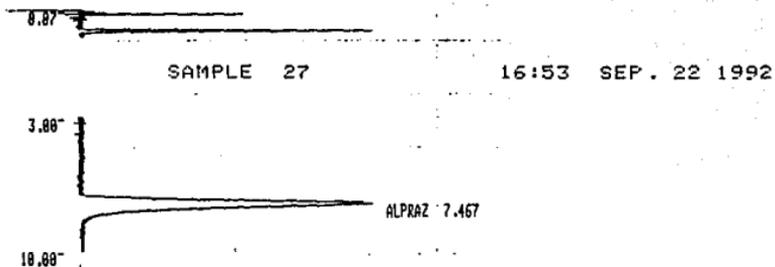
Esta prueba se realizó con el análisis de dos muestras de placebo preparadas de la misma manera, bajo las mismas condiciones de operación, determinando que no existe componentes que den una respuesta que interfiera con la respuesta del fármaco de interés (TRIAZOLAM).

RESULTADOS

ÁREA ST	ÁREA STINT (ST / STINT)	RESPUESTA (MG / TAB)	CONCENTRACIÓN
0	94358	0	0
0	93647	0	0

En los siguientes cromatogramas se muestra el análisis de dos placebos, donde se observa la respuesta correspondiente al estándar interno ALPRAZOLAM únicamente, no encontrándose la respuesta de alguna otra sustancia.

ESPECIFICIDAD
CROMATOGRAMA DE PLACEBO

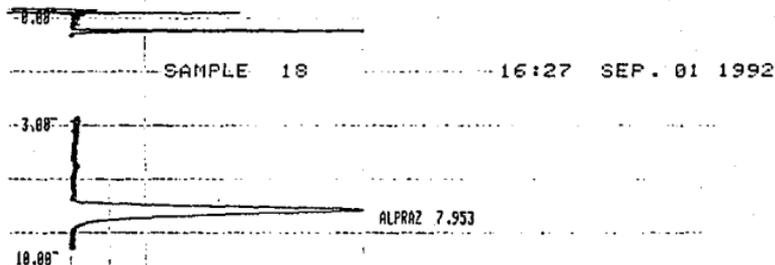


CAL. METHOD . . . 00
 SF PA PB
 .100000e+03 .000000e+00 .100000e+01

NO.	NAME	RT	A	OR	H	MK	CONC
1	TRIAZ						
2	ALPRAZ	7.467	93647			M *	63.000000
	TOTAL		93647			*	63.000000

ESPECIFICIDAD

CROMATOGRAMA DE PLACEBO



DAL . METHOD		00	PA	PB	
		SF			
		.100000e+03	.000000e+00	.100000e+01	
10.	NAME	RT	A. OR. H	MK	CONC
1	TRIAZ				
2	ALPRAZ	7.953	94356	N *	63.000000
	TOTAL		94356	*	63.000000

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

REPETIBILIDAD

Se realizó con el análisis de seis muestras de un mismo lote del producto terminado, teniendo en cuenta que para la preparación de las muestras a diferentes concentraciones es la misma por dilución, y debido a que no hubo producción de tabletas a la concentración de 0.125mg/tab en la fecha que se realiza la prueba, se utilizó para la prueba tabletas de 0.25mg/tab analizando las muestras de manera independiente por un mismo analista, el mismo día y bajo las mismas condiciones de análisis.

Con la finalidad de evaluar este parámetro se utilizó el coeficiente de variación (CV).

Se hace a través de la prueba "t" de Student una comparación de la media de los porcentajes obtenidos prácticamente y la media del valor teórico.

ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

Concentración del Estándar Interno = 0.025 mg/ml

Concentración del Estándar de Referencia = 2.57 mg/100 ml (STINT)

Pureza del Estándar = 99.8%

ÁREA ST	ÁREA STINT	RELACIÓN ST / STINT
119917	196693	0.60967
120587	198287	0.60814
118471	195404	0.60629
120928	199061	0.60749
121274	197991	0.61252

RESULTADOS

Media (X) = 0.60882

Desviación Estándar (DE) = 0.00240

Desviación Estándar Relativa (RSD) = 0.4% [Criterio no más 2.0%]

A partir de la media y las diluciones obtenemos el valor de la constante:

$$2.57 / 0.60882 * 10 / 100 * 0.998 = 0.42128$$

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Obteniéndose los siguientes datos:

Tabla No 9

No.	ÁREA ST	ÁREA STINT	RELACIÓN ST / STINT	CONCENTRACIÓN MG / TAB
1	108734	183859	0.59140	0.249
2	107134	180333	0.59409	0.250
3	106699	179577	0.59417	0.250
4	105521	177657	0.59396	0.250
5	106726	179913	0.59321	0.250
6	107652	182293	0.59054	0.249

Tabla No 10

No.	CANTIDAD DE MARBETE	CANTIDAD RECUPERADA	% RECUPERACIÓN
1	0.250	0.249	99.6
2	0.250	0.250	100.0
3	0.250	0.250	100.0
4	0.250	0.250	100.0
5	0.250	0.250	100.0
6	0.250	0.249	99.6

De la Columna % DE RECUPERACIÓN se calcula lo siguiente:

Media (X) = 99.86%

Desviación Estándar (DE) = 0.2065

Varianza (S²) = 0.0426

Coefficiente de Variación (CV) = 0.2066%

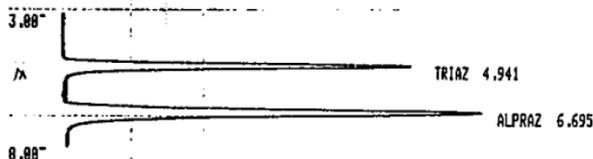
Numero de Datos = 6

REPETIBILIDAD

CROMATOGRAMAS DE TABLETAS DE 0.25 MG

0.00

SAMPLE 23 16:06 OCT. 07 1992



AL METHOD 00

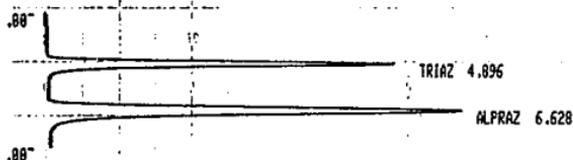
SF PA PB

.100000₁₀+03 .000000₁₀+00 .100000₁₀+01

J.	NAME	RT	A OR H	MK	CONC
1	TRIAZ	4.941	106639	*	63.000000
2	ALPRAZ	6.695	179577	M *	63.000000
TOTAL			286277	*	63.000000

0.00

SAMPLE 22 15:57 OCT. 07 1992



L. METHOD 00

SF PA PB

.100000₁₀+03 .000000₁₀+00 .100000₁₀+01

.	NAME	RT	A OR H	MK	CONC
1	TRIAZ	4.896	105521	*	63.000000
2	ALPRAZ	6.628	177657	M *	63.000000
TOTAL			283179	*	63.000000

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Continuando con la Repetibilidad del Método se Obtiene:

Intervalo de Confianza (IC) al 95%

Para un $\alpha = 0.05$, con grados de libertad (g.l.) = $n-1$, donde $n=6$

tenemos que $g.l = 6 - 1 = 5$ y una T teórica al 95% = 2.015

por lo tanto se tiene :

$$\bar{X} \pm T \text{ teórica al 95\% (DE} / \sqrt{6})$$

$$99.86\% \pm 2.015 (0.2065 / \sqrt{6})$$

$$99.86\% \pm 0.1698$$

Se tiene que el (IC) al 95% = (99.69% - 100.03%)

Interferencia acerca de la media :

Hipótesis Propuestas :

$$\text{Hipótesis nula : } H_0 \quad \bar{X} = \mu$$

$$\text{Hipótesis alterna : } H_a \quad \bar{X} \neq \mu$$

El estadístico de Prueba es :

$$T \text{ practica} = (\bar{X} - \mu) / (\text{DE} / \sqrt{n}) ; \text{ donde } \mu = 100\%$$

$$T \text{ practica} = (99.86\% - 100\%) / (0.2065 / \sqrt{6})$$

$$T \text{ practica} = -1.5823$$

Si la $-T$ teórica < T practica < $+T$ teórica, se acepta la Hipótesis nula

Por lo tanto como $-2.015 < -1.5823 < 2.015$, se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alterna, con lo cual se comprueba la repetibilidad del método.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

REPRODUCIBILIDAD

Esta prueba se realiza con tabletas de TRIAZOLAM 0.25mg/tab, producto terminado, el análisis de tres tabletas de manera independiente de dos días diferentes por dos analistas bajo las mismas condiciones de análisis.

Por la misma razón que en la Repetibilidad se utilizan tabletas de 0.25mg/tab de un mismo lote de tabletas de producto terminado.

La evaluación de la prueba se hace en base al Coeficiente de Variación y de la prueba de "t" de Student.

ADECUABILIDAD DEL SISTEMA PARA EL ANALISTA (A)

Concentración del Estándar Interno = 0.025mg/ml

Concentración del Estándar de Referencia = 2.57mg/100ml (STINT) Pureza del Estándar = 99.8%

ÁREA ST	ÁREA STINT	RELACIÓN ST / STINT
117929	192306	0.61324
118373	194194	0.60956
118874	193194	0.61531
118473	195656	0.60552
119381	195521	0.61058

RESULTADOS:

Media (X) = 0.61084

Desviación Estándar (DE) = 0.00373

Desviación Estándar Relativa (RSD) = 0.6% [Criterio no más de 2.0%]

A partir de la media y de las diluciones obtenemos el valor de la constante

$$2.57 / 0.61084 * 10 / 100 * 0.998 = 0.41989$$

ADECUABILIDAD DEL SISTEMA PARA EL ANALISTA (B)

Concentración del Estándar Interno = 0.025mg/ml

Concentración del Estándar de Referencia = 2.85mg/100ml (STINT)

Pureza del Estándar = 99.8%

ÁREA ST	ÁREA STIN	RELACIÓN (ST / STINT)
132229	196296	0.66682
132178	197763	0.66837
130625	196177	0.66585
126840	187434	0.67138
132046	196498	0.67200

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Continuando con la adecuabilidad del sistema para el Analista (B)

RESULTADOS:

Media (X) = 0.66888

Desviación Estándar (DE) = 0.00272

Desviación Estándar Relativa (RSD) = 0.4% [Criterio no más de 2.0%]

A partir de la media y de las diluciones obtenemos el valor de la constante

$$2.85 / 0.66888 * 10 / 100 * 0.998 = 0.42608$$

Los Resultados Obtenidos de las Muestras son los siguientes:

Tabla No 11

No.	ÁREA ST	ÁREA STINT	RELACIÓN (ST / STINT)	CONCENTRACIÓN MG / TAB
A11	106726	179913	0.59321	0.249
A12	105521	177657	0.59396	0.249
A13	106699	179577	0.59417	0.249
B11	108109	184984	0.58442	0.249
B12	108778	181548	0.59917	0.255
B13	109427	185079	0.59124	0.252
A21	112058	187613	0.59728	0.251
A22	111018	184387	0.60209	0.253
A23	109874	184655	0.59502	0.250
B21	105945	180011	0.58855	0.251
B22	106873	181040	0.59033	0.251
B23	106070	179752	0.59009	0.251

En donde:

A y B son los diferentes Analistas

El 1º número es el día respectivamente

El 2º número es la muestra

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Tabla No 12

No.	CANTIDAD EN MARBETE MG / TAB	CANTIDAD RECUPERADA MG / TAB	% RECUPERACIÓN
A11	0.250	0.249	99.6
A12	0.250	0.249	99.6
A13	0.250	0.249	99.6
B11	0.250	0.249	99.6
B12	0.250	0.255	102.0
B13	0.250	0.252	100.8
A21	0.250	0.251	100.4
A22	0.250	0.253	101.2
A23	0.250	0.250	100.0
B21	0.250	0.251	100.4
B22	0.250	0.251	100.4
B23	0.250	0.251	100.4

De la Columna % de Recuperación se Obtiene:

Media (X) = 100.33%

Desviación Estándar (DE) = 0.74018

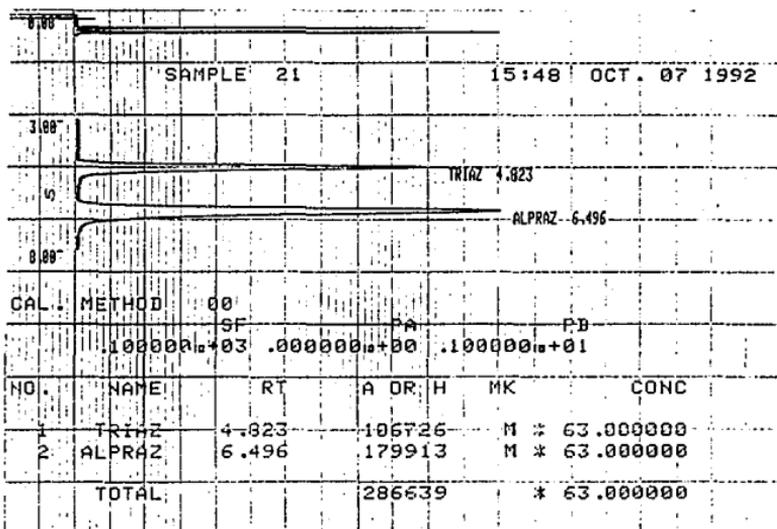
Varianza (S²) = 0.54787

Coefficiente de Variación (CV) = 0.73772%

Número de Datos (n) = 12

REPRODUCIBILIDAD (A)

CROMATOGRAMAS DE TABLETAS 0.25 MG



VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Siguiendo con la evaluación estadística del método tenemos que la comparación de las medias de los resultados de los Analistas en ambos días por la "t" de Student es la siguiente:

Cuando el estadístico de prueba es $n = n\mu$ es:

$$t = \frac{X\mu - X}{\sqrt{S^2/n + S^2\mu/n\mu}} \cdot \frac{1}{2}; \text{ para :}$$

$$\text{g.l.} = n + n\mu - 2$$

$$\alpha = 0.05$$

Donde para el :

ANALISTA (A)

Media (X) = 100.066%
Varianza (S²) = 0.41066
Número de Datos = 6

ANALISTA (B)

Media (X) = 100.600%
Varianza (S²) = 0.62400
Número de Datos = 6

Pruebas de Hipótesis:

Hipótesis nula : $H_0 = X = X\mu$
Hipótesis alterna : $H_a = X \neq X\mu$

$$\text{g.l.} = 6 + 6 - 2 = 10$$

$$T_{\text{practica}} = 100.600 - 100.066 / (0.41066 / 6 + 0.62400 / 6)^{1/2}$$

$$T_{\text{practica}} = 1.28593$$

Tratándose de un ensayo bilateral o "en dos sentidos" con $n + n\mu - 2$ grados de libertad, la Hipótesis nula se rechaza cuando:

$T_{\text{practica}} < -T_{\text{teórica}} \text{ con } \alpha / 2$ ó $T_{\text{practica}} > +T_{\text{teórica}} \text{ con } \alpha / 2$

Esto es si $-T_{\text{teórica}} \alpha / 2 < T_{\text{practica}} < +T_{\text{teórica}} \alpha / 2$, se acepta la Hipótesis nula y se rechaza la Hipótesis alterna.

Como la T teórica $\alpha / 2 = 2.228$, entonces:

$-2.228 < 1.28593 < +2.228$, se acepta la Hipótesis nula y se rechaza la Hipótesis alterna.

Por lo que la media de los valores obtenidos por los dos analistas en los dos días, estadísticamente es la misma con lo que se comprueba que el método es Reproducible.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

TOLERANCIA

Para determinar el grado de reproducibilidad de datos en el análisis de las mismas muestra modificando las condiciones normales de operación, se procedió a obtener los resultados en dos diferentes equipos de cromatografía de líquidos los cuales además teniendo su propia columna. Las muestras fueron preparadas siguiendo la técnica, así como el estándar de referencia, analizándose en un equipo y posteriormente en el otro.

ADECUABILIDAD DEL SISTEMA PARA EL EQUIPO (WATERS 1)

Concentración del Estándar Interno = 0.025 mg / ml

Concentración del Estándar de Referencia = 2.58 mg / 100 ml (STINT)

Pureza del Estándar de Referencia = 99.8%

ÁREA ST	ÁREA STINT	RELACIÓN ST / STINT
118726	191978	0.61843
117362	192017	0.61120
118319	190975	0.61955
117126	192582	0.60618
119440	193631	0.61664

Resultados :

Media (X) = 0.61484

Desviación Estándar (DE) = 0.00491

Desviación Estándar Relativa (RSD) = 0.8% (criterio no mas del 2%)

a partir de la medida y las diluciones obtenemos el valor de la constante:

$$2.58/0.61484*10/100*0.998 = 0.41878$$

ADECUABILIDAD DEL SISTEMA PARA EL EQUIPO (TOM)

ÁREA ST	ÁREA STINT	RELACIÓN ST / STINT
93381	154509	0.60437
93197	154726	0.60233
93433	155516	0.60079
94925	166753	0.60557
94561	158412	0.60469

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

RESULTADOS:

Media (X) = 0.60355

Desviación estándar (DE) = 0.00194

Desviación Relativa (RSD) = 0.3% (Criterio no mas de 2%)

A partir de la medida y las diluciones obtenemos el valor de la constante:

$$2.58 / 0.60355 * 10 / 100 * 0.998 = 0.42661$$

TABLA No. 13 (WATTERS 1)

ÁREA ST	ÁREA STINT	RELACIÓN ST / STINT	CONCENTRACIÓN MG / TAB
114317	193218	0.59164	0.247
115682	192458	0.60108	0.251
116436	194172	0.59985	0.251
118197	196714	0.60085	0.251
114968	192275	0.59793	0.250
115728	193865	0.59695	0.249

de la columna CONCENTRACIÓN (MGS. / TAB.) obtenemos los siguientes resultados :

Media (\bar{X}) = 0.2498

Desviación estándar (DE) = 0.00160

Coefficiente de variación (CV) = 0.64126%

Número de datos (n) = 6

Varianza (S^2) = 0.04

TABLA No. 14 (TOM)

ÁREA ST	ÁREA STINT	RELACIÓN ST / STINT	CONCENTRACIÓN MG / TAB
88677	152994	0.57961	0.247
91126	154606	0.68976	0.251
91703	156783	0.58490	0.249
91185	156303	0.58338	0.248
91884	156632	0.58662	0.250
91450	155106	0.58959	0.251

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

De la tabla número 14 (TOM) en la columna CONCENTRACIÓN (MG. / TAB.) obtenemos los siguientes resultados :

Media (\bar{X}) = 0.2493

Desviación estándar (DE) = 0.00163

Coefficiente de variación (CV) = 0.65494

Número de datos = 6

Varianza (S^2) = 0.04

Siguiendo con los cálculos estadísticos tenemos que la comparación estadística de las medias entre el equipo WATERS 1 y el equipo TOM con diferente columna es ;

Estadístico de prueba cuando $n = n\mu$

$$t = \frac{\bar{X}_\mu - X}{(S^2/n + S^2_\mu/n\mu)^{1/2}}$$

$$\text{para g.l.} = n + n\mu - 2$$

$$\alpha = 0.05$$

Sustituyendo los datos anteriores tenemos que para:

Hipótesis nula: $H_0 \quad X = X_\mu$

Hipótesis alterna: $H_a \quad X \neq X_\mu$

$$\text{g.l.} = 6 + 6 - 2 = 10$$

$$T \text{ practica} = 0.2498 - 0.2493 / (0.04 / 6 + 0.040 / 6)^{1/2}$$

$$T \text{ practica} = 0.00432$$

Como se trata de un ensayo bilateral o " en dos sentidos " , con $n + n\mu - 2$ grados de libertad, la hipótesis nula se rechaza cuando:

$T \text{ practica} < -T \text{ teórica}$ con $\alpha / 2$ o $T \text{ practica} > +T \text{ teórica}$ con $\alpha / 2$ se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alterna cuando $-T \text{ teórica}$ con $\alpha / 2 < T \text{ practica} < T \text{ teórica}$ con $\alpha / 2$

Como:

$$T \text{ teórica con } \alpha / 2 = 2.228$$

Entonces:

$-2.228 < 0.00432 < +2.228$, se rechaza la hipótesis alterna y se acepta la hipótesis nula considerando que es la hipótesis de la igualdad.

Sample: MTA.1
Acquired: 20-SEP-82 20:18
Dilution: 1 : 10.000

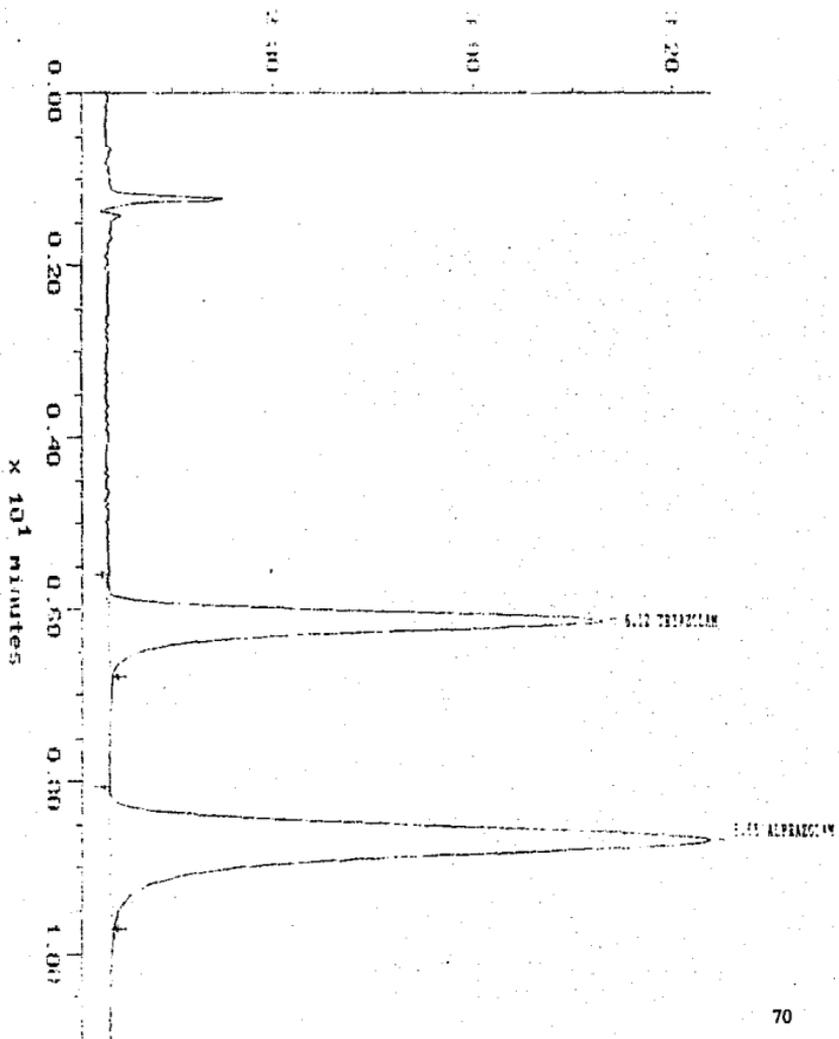
Channel: 455 35cm 5.1
Method: ...
Amount: 1.000

Filename: MTA1
Operator: SP

EQUIPO TOM

CROMATOGRAMA DE TABLETA 0.25MG

$\times 10^{-2}$ volts



VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA

Esta prueba se realizó con la preparación de tres muestras de tabletas de un mismo lote de TRIAZOLAM 0.25mg/tab., analizándolas independientemente de la misma manera el mismo día, analizándolas después los cinco días siguientes a su preparación. Las muestras permanecieron a Temperatura Ambiente en los viales de preparación engargolados.

La preparación del Estándar de Referencia se realizó cada día, con la finalidad de detectar si existe algún cambio en la concentración de las tabletas por el paso del tiempo.

Es importante mencionar que la preparación del Estándar interno se realizó en cantidad suficiente para las muestras así como para cada preparación de Estándar de Referencia.

La adecuabilidad del sistema para cada día cumplió con las especificaciones marcadas de RSD para el Método [Criterio no más de 2.0%].

Los Resultados Obtenidos son los siguientes:

MTA	ÁREA ST	ÁREA STINT	RELACIÓN (ST / STINT)	CONCENTRACION MG / TAB	% RECUPERACIÓN
DÍA					
INC					
1	108468	186563	0.58140	0.241	96.4
2	110375	186533	0.59172	0.245	98.0
3	109990	189248	0.58120	0.241	96.4
24 Hrs					
1	117490	201500	0.58308	0.242	96.8
2	115202	196738	0.58566	0.243	97.2
3	119181	204096	0.58395	0.242	96.8
48 Hrs					
1	119543	208604	0.57306	0.237	94.8
2	119555	201990	0.59189	0.245	98.0
3	122602	210985	0.58109	0.241	96.4
72 Hrs					
1	107608	183013	0.68743	0.243	97.2
2	105752	184728	0.57247	0.237	94.8
3	106724	183516	0.58155	0.241	96.4
96 Hrs					
1	136426	233435	0.58443	0.242	96.8
2	132139	227207	0.58158	0.241	96.4
3	116318	200334	0.58062	0.241	96.4

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

De la columna de % recuperado se obtiene la siguiente tabla:

Tabla No. 15

HORAS	MEDIA (X)	DESVIACION ESTÁNDAR (DE)	VARIANZA (S)
INC	96.93	0.92376	0.85333
24	96.93	0.23094	0.05333
48	96.40	1.60000	2.56000
72	96.13	1.22002	1.49333
96	96.53	0.23094	0.53333

El análisis por la "t" de Dunnett es:

VARIANZAS PONDERADAS

$$S^2_{pl} = \frac{2S^2_{inc} + 2S^2_{24hrs}}{2(c+1)} = \frac{2(0.85333 + 0.05333)}{2(2+1)} = 0.3022$$

$$S^2_{pl} = \frac{2S^2_{inc} + 2S^2_{48hrs}}{2(c+1)} = \frac{2(0.85333 + 2.56)}{2(2+1)} = 1.1377$$

$$S^2_{pl} = \frac{2S^2_{inc} + 2S^2_{72hrs}}{2(c+1)} = \frac{2(0.85333 + 1.49333)}{2(2+1)} = 0.78222$$

$$S^2_{pl} = \frac{2S^2_{inc} + 2S^2_{96hrs}}{2(c+1)} = \frac{2(0.85333 + 0.05333)}{2(2+1)} = 0.3022$$

Donde:

S^2_n = Varianzas

c = Comparaciones

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

La determinación del Intervalo de Confianza se realizó mediante los siguientes cálculos:

$$"t" = \text{Valor de la "t"} \text{ de Dunnett} = 2.86$$

$$c = \text{Comparaciones} = 2$$

$$g.l. = 2(c + 1) = 2(2 + 1) = 6$$

Probabilidad Acumulada de 0.975

$$IC = [X_2 - X_{inc}] \pm t^* \sqrt{S^2 \pi (2+3)}$$

Sustituyendo los Valores tenemos que para las 24hrs:

$$IC = (96.93 - 96.93) \pm 2.86 \sqrt{0.3022 (2+3)}$$

$$IC \text{ 24hrs} = \{-1.28371 \text{ a } 1.28371\}$$

para las 48hrs

$$IC = (96.40 - 96.93) \pm 2.86 \sqrt{1.1377 (2+3)}$$

$$IC \text{ 48hrs} = \{-3.02077 \text{ a } 1.96077\}$$

para las 72hrs

$$IC = (96.13 - 96.93) \pm 2.86 \sqrt{0.78222 (2+3)}$$

$$IC \text{ 72hrs} = \{-2.86530 \text{ a } 1.26530\}$$

para las 96hrs

$$IC = (96.53 - 96.93) \pm 2.86 \sqrt{0.3022 (2+3)}$$

$$IC \text{ 96hrs} = \{-1.68371 \text{ a } 0.88371\}$$

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Calculo para el Factor I

(análisis de la muestra / tiempo) i

$$I_i = \frac{\text{análisis de la muestra } i}{\text{análisis inicial } i} * 100$$

$$FI = \frac{\sum I_i}{n}$$

A las 24hrs

$$mta 1 = 96.8 / 96.4 * 100 = 100.41\%$$

$$mta 2 = 97.2 / 98.0 * 100 = 99.18\%$$

$$mta 3 = 96.8 / 96.4 * 100 = 100.41\%$$

$$FI = \frac{100.41 + 99.18 + 100.41}{3} = 100\%$$

A las 48hrs

$$mta 1 = 94.8 / 96.4 * 100 = 98.34\%$$

$$mta 2 = 98.0 / 98.8 * 100 = 100\%$$

$$mta 3 = 96.4 / 96.4 * 100 = 100\%$$

$$FI = \frac{98.34 + 100.0 + 100.0}{3} = 99.44\%$$

A las 72hrs

$$mta 1 = 97.2 / 96.4 * 100 = 100.82\%$$

$$mta 2 = 94.8 / 98.0 * 100 = 96.73\%$$

$$mta 3 = 96.4 / 96.4 * 100 = 100\%$$

$$FI = \frac{100.82 + 96.73 + 100.0}{3} = 99.18\%$$

A las 96hrs

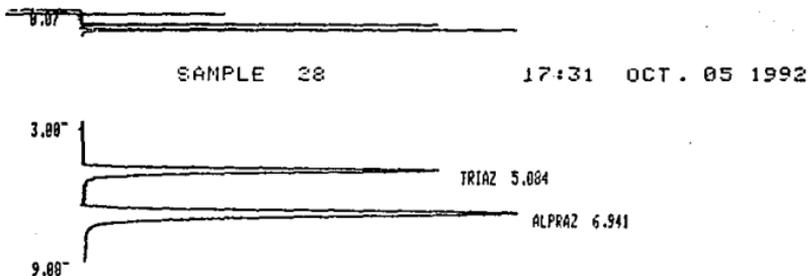
$$mta 1 = 96.8 / 96.4 * 100 = 100.41\%$$

$$mta 2 = 96.4 / 98.0 * 100 = 98.36\%$$

$$mta 3 = 96.4 / 96.4 * 100 = 100\%$$

$$FI = \frac{100.41 + 98.38 + 100.0}{3} = 99.59\%$$

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA
CROMATOGRAMAS AL 100% DE LA CONCENTRACIÓN



SAMPLE 38

17:31 OCT. 05 1992

CAL. METHOD 00
 SF PA PD
 .100000₁₀+03 .000000₁₀+00 .100000₁₀+01

NO.	NAME	RT	A OR H	MK	CONC
1	TRIAZ	5.084	108468	M *	63.000000
2	ALPRAZ	6.941	186563	M *	63.000000
	TOTAL		295032	*	63.000000

CAPITULO No 4
ANALISIS DE RESULTADOS
Y CONCLUSIONES

RESULTADOS ANÁLISIS DE RESULTADOS
--

RESULTADOS OBTENIDOS
CRITERIO DE ACEPTACION
LINEALIDAD DEL SISTEMA

CV1 = 0.47918 %

CV2 = 0.46990 %

 $CV \leq 1.5 \%$
GRAFICA # 1
GRAFICA # 2

m = 0.00622

b = -0.00599

r = 0.99960

 $r^2 = 0.99931$

m = 0.00622

b = -0.00467

r = 0.99940

 $r^2 = 0.99897$
 $r \geq 0.99$
 $r^2 \geq 0.98$
PRECISION DEL SISTEMA

CV = 0.39699 %

 $CV \leq 1.5 \%$
LINEALIDAD DEL METODO

CV = 1.04225 %

 $CV \leq 2.0 \%$
PROMEDIO DE RECOBRO

(98.42% - 101.37%)

PROMEDIO DE RECOBRO

(98 % - 102 %)

IC = (100.28% - 98.97%)

INCLUYE EL 100 %

m = 0.96858

b = 0.00321

r = 0.99946

 $r^2 = 0.99893$
 $m \approx 1$
 $b \approx 0$
 $r^2 \geq 0.98$
EXACTITUD AL 100 %

CV = 0.69953 %

 $CV \leq 2 \%$
PROMEDIO DE RECOBRO

(98.13 % - 100.15 %)

PROMEDIO DE RECOBRO

(98 % - 102 %)

RESULTADOS ANÁLISIS DE RESULTADOS
--

RESULTADOS OBTENIDOS
CRITERIO DE ACEPTACIÓN
REPETIBILIDAD

CV = 0.2066 %

CV ≤ 2%

PROMEDIO DE RECOBRO

(99.6 % - 100.0 %)

PROMEDIO DE RECOBRO

(98 % - 102%)

IC = (99.69% - 100.03%)

INCLUYE EL VALOR DE 100%

REPRODUCIBILIDAD

CV = 0.73772 %

CV ≤ 2%

ESPECIFICIDAD

No se encontró sustancia que proporcionará interferencia en el tiempo de retención de TRIAZOLAM al analizar el placebo del producto.

TOLERANCIA
ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA

IC 24 Hrs (-1.28371 a 1.28371)

IC 48 Hrs (-3.02077 a 1.96077)

IC 72 Hrs (-2.86530 a 1.26530)

IC 96 Hrs (-1.68371 a 0.88371)

INCLUYE EL VALOR DE CERO

FI = (99.18% - 100.0%)

FI = (98% - 102%)

La muestra puede permanecer después de su preparación hasta 96 hrs sin cambios.

El método tolera cambios de equipo y de columna ya que existe una igualdad con respecto a las medias de los valores de resultado.

CONCLUSIONES

En la prueba de linealidad y exactitud del método con respecto al empleo de lotes pilotos como placebos no se preparo el lote al tamaño deseado 5 kg. debido a que no se contaba con equipo para lotes piloto.

Se preparo 1.0 kg. de lote placebo en el Laboratorio de Control de Calidad.

La preparación de placebos se realizo con la mezcla de materias primas siguiendo el procedimiento de manufactura sin llegar a tabletear, por lo que las muestras fueron preparadas con el peso equivalente a una tableta de placebo y acondicionando en triazolam en alicuota correspondiente a la concentración deseada a partir de una solución concentrada de estándar de referencia.

Basándonos en el análisis de resultados obtenidos de los diferentes parámetros de validación desarrollados, se establece que el método para cualificar TRIAZOLAM por cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) en tabletas es:

Lineal. - Ya que se comprobó que cumple con los requisitos de coeficientes de variación (CV) menor a 1.5 % para la linealidad del Sistemay menor de 2% para la linealidad del Método, con respecto a la pendiente (m) es aproximadamente 1.0, la ordenada al origen es aproximadamente 0, el coeficiente de correlación mayor a 0.99 y el coeficiente de determinación mayor a 0.98, como se muestra en las gráficas 1,2 y 3.

El promedio de recobro para la linealidad del Método cumple con el limite de especificación adoptada ya que se encuentra entre el rango de (98% - 102%).

Exacto. - debido a que el coeficiente de variación CV es menor al 2 % con un promedio de recobro entre (98 % - 102 %) cumpliendo con la especificación de este método.

Preciso. - porque se obtuvieron coeficientes de variación CV menores a 1.5 % para el sistema y menor al 2.0 % para el método. Con el promedio de recobro dentro de los limites (98 % - 102 %).

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA** 79

Específico.- se comprobó que el método es específico para cualificar TRIAZOLAM en tabletas con el análisis de un placebo preparado para la prueba encontrándose en el cromatograma solo el pico de respuesta del TRIAZOLAM. El método puede ser entonces utilizado en el análisis de producto intermedio y producto terminado, cromatogramas de las paginas 51 y 52.

La prueba de tolerancia: 96 horas después de preparada la muestra no existe cambio en la precisión de los resultados, por lo que la muestra puede ser preparada y almacenarse a temperatura ambiente y ser analizada durante las 96 horas posteriores a su preparación.

Dentro de las condiciones normales de trabajo en el laboratorio de Control de Calidad, se comprobó estadísticamente que la medida de los valores obtenidos en dos diferentes equipos Cromatograficos con dos diferentes columnas es igual.

Es importante mencionar que en las condiciones adecuadas de trabajo se observo que hay una rápida estabilización del sistema siendo una fase normal el tiempo de retención se mantiene constante en el análisis de las muestras sin mostrar deformación en los picos (Coleo), aún en tiempos prolongados de análisis.

Por lo anterior podemos concluir que el método analítico para cualificar TRIAZOLAM en tabletas por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), reúne las condiciones necesarias para su aplicación con el grado de seguridad que demuestran las pruebas estadísticas, comprobando y verificando su exactitud y Reproducibilidad y especificidad en los rangos establecidos, para ser usados como método de Control de Calidad.

BIBLIOGRAFÍA

Las Bases de la Farmacología Terapéutica

Alfred Goodman Gilman, Theodore W Rall Alan S, Nies Palmer Taylor.

Octava Edición 1991 Editorial Medica Panamericana

paginas 367 a 369.

Compendio de Farmacología

Litter M.

4ª Edición. Editorial el Ateneo 1988.

pagina 111.

Detection and Determination of Error in Analytical Metodology

Part I in The Method Verification Program

Cardone, Mario J.

J Assoc of Anal. Chem. Vol 66 # 6, 1983.

paginas 1257 a 1282.

Detection and Determination of Error in Analytical Metodology

Part II Correction for Corregible Systematic Error in the Course of Real Sample Analysis

Cardone, Mario J.

J Assoc of Anal. Chem. Vol.66 # 6, 1983.

paginas 1283 a 1294.

Detection and Determination of Error in Analytical Metodology

Part IIB Direc. Calculational Technique for Making Corregible Systematic error Corrections

Cardone, Mario J and Lehrman Jay G.

J Assoc of Ana l. Chem. Vol 68 # 2, 1985.

paginas 199 a 202.

Farmacología

Cedric MSmith, M.D. Alan, Reynard Ph.D.

Editorial Medica Panamericana S.A. 1993

paginas 270 a 289.

Farmacología Acciones y Reacciones Medicamentosas

Levine, Ruth R.

Traducción de la segunda edición en ingles Editores Slavat S.A.

1982 Barcelona España.

Farmacología Clínica GOTH

Wesley G Clark, D Craig Brater, Alice R. Johnson

12ª Edición . Editorial Medica Panamericana 1990.

pagina 234.

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
Quinta Edición
1988 México.

ISO 9000
Guide the expression of uncertainty in measurement.
Expression of uncertainty 1993

Introducción a la Estadística Matemática
Erwin Kreyszing
Editorial Limusa 1987
paginas 314, 354.

Maintaining and Troubleshooting HPLC System a User's Guide
Runser , Dennis J.
Willey Intercience Publication
1981 U.S.A.
paginas 5 , 134.

Métodos Analíticos de Validación
Comite de elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control
de Insumos para la Salud S.S.A.
Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México.
A.C. México 1990.

The Merck Index.
11ª Edición Merck y Co. Inc.
paginas 1512

The pharmacological Basic of Therapeutics
Alfred Goodman Gilman, Louis S Goodman, Alfred Gilman.
Sixth Edition. MC Millan Publishing Co. Inc 1980.
paginas 340 a 350.

Practical Liquid Chromatography An Introduction
R.W. Yost L.S. Ettre R.D. Conlon
Perkin Helmer

Principles and Practice of Chromatography
B.Ravindranath
Editorial Ellis Horwood Limited.

Probabilidad y Estadística para Ingenieros
Miller, Irwin., Fred, John.
1ª Edición. Editorial Reverte México 1967.
paginas 150 a 159, 167, 168, 215 a 220.

Remington's Pharmaceutical Sciences
18th Edition 1990
paginas 1062

The United State Pharmacopea
XXII Edition
paginas 1402 ,1566.