

40  
Zij



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

VALIDACION DEL METODO DE VALORACION DE ACIPIMOX EN CAPSULAS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (CLAR)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA PRESENTA LYDIA FLORES LUGO

MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

**VALIDACION DEL METODO DE VALORACION DE ACIPIMOX EN  
CAPSULAS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION  
(CLAR).**

**TESIS**

**Que para obtener el Título de  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

**Presenta**

**LYDIA FLORES LUGO**

**México, D.F.**

**1996**

## JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA

Presidente: Prof. José Luis Ibarnea Avila  
Vocal: Prof. Isaura Luisa Carrera Garcia  
Secretario Prof. Consuelo Ayala Mondragón  
1er. Suplente Prof. María Cristina Enriquez Mendoza  
2do. Suplente Prof. Manuel Rodríguez Juan

Sitio donde se desarrolló el tema:

Depto. Control de Calidad, Pharmacia & Upjohn.

Nombre completo y firma del asesor del tema:

  
\_\_\_\_\_  
Q.F.B. José Luis Ibarnea Avila

Nombre completo y firma del supervisor técnico:

  
\_\_\_\_\_  
Q.F.B. José Isabel González Pérez.

Nombre completo y firma del sustentante:

  
\_\_\_\_\_  
Lydia Flores Lugo.

**Con todo mi cariño :**

**A mis padres**

**A Zaid**

**A mi hermana**

**A Felicitas y Mode (Q.E.P.D.)**

**Gracias por su esfuerzo y apoyo que en cada momento  
me brindaron.**

**Mi más profundo afecto y gratitud  
al Profesor José Luis Ibarnea Avila  
por su valiosa cooperación.**

**Gracias a los laboratorios Pharmacia & Upjohn  
por las facilidades otorgadas.**

**Gracias a José I. González Pérez y  
Jaime Barrientos Ocaña por su  
asesoría.**

## INDICE

<b>INTRODUCCION</b> .....	<b>4</b>
 <b>CAPITULO I.- GENERALIDADES</b>	
1.1 Antecedentes farmacológicos del Aciplox .....	8
1.2. Propiedades del Aciplox	
1.2.1. Farmacología y toxicología .....	9
1.2.2. Características químicas y físicas .....	11
1.3. Objetivo .....	12
1.4. Validación de métodos analíticos .....	12
1.5. Cromatografía líquida de alta resolución .....	17
 <b>CAPITULO II.- MATERIALES Y METODOS</b>	
2.1. Material .....	23
2.2. Reactivos .....	23
2.3. Equipo .....	23
2.4. Método .....	24
 <b>CAPITULO III.- RESULTADOS</b>	
3.1. Especificidad del método .....	29
3.2. Linealidad del sistema .....	30
3.3. Precisión del sistema .....	32
3.4. Linealidad del método .....	33
3.5. Exactitud al 100 % .....	35
3.6. Precisión del método .....	36
 <b>CONCLUSIONES</b> .....	 <b>37</b>
 <b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	 <b>38</b>

## **INTRODUCCION:**

El objetivo del análisis farmacéutico es obtener la información cuantitativa y cualitativa necesaria acerca de la muestra analizada. El análisis cuantitativo incluye el procedimiento analítico total, desde el tratamiento de la muestra hasta la evaluación de los resultados analíticos, cada paso en el procedimiento puede ser evaluado por separado para determinar el punto más débil que puede influir en los resultados analíticos. Esto significa que la validación de cualquier método de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) puede ser considerado como la suma de los diferentes pasos individuales incluidos dentro del procedimiento analítico. En general, la validación de un método es la realización e interpretación de una serie de experimentos diseñados para descubrir las características más importantes del mismo para su aplicación durante un periodo de tiempo relativamente largo.

Todo método analítico tiene como propósito el determinar al analito en una muestra y es un procedimiento que involucra un proceso de medición de una respuesta analítica. El atributo esencial que debe cumplir la respuesta es la "Confiablez" y los modelos estadísticos nos permiten demostrar si el atributo está ausente o presente.

Toda respuesta analítica está influenciada por una serie de factores intrínsecos del método (variables operativas, eficiencia de técnicas extractivas y separativas, instrumentos, etc.), así como los factores extrínsecos (analistas, reactivos, materiales, etc.) lo que da lugar a que siempre está presente la variación.

Cualquier medición cuantitativa de un analito en una muestra obtenida al aplicar un método analítico, el cual no ha sido sometido a proceso de



validación, además de la presencia de error aleatorio, presupone la presencia de error sistemático.

La respuesta analítica puede ser evaluada estudiando de manera experimental los parámetros que se denominan: linealidad del sistema, exactitud y linealidad del método.

Se deben tener algunos puntos en consideración como son los siguientes, específicamente para un método de CLAR:

1.- Número de componentes en la mezcla. Un análisis de multicomponentes es más difícil para desarrollarlo pues necesita la separación de cada fármaco.

2.- El nivel de concentración de los compuestos que serán separados y determinados. En la determinación de pequeñas cantidades, el ruido e inclinación provocados por el flujo o las fluctuaciones de temperatura pueden disminuir la precisión. Las impurezas provenientes de los disolventes empleados como eluentes y/o para la preparación de las muestras pueden dar resultados falsos.

3.- La disponibilidad de sustancias de referencia puras para la separación y determinación de los compuestos. Sin una sustancia de referencia el analista está trabajando en la oscuridad. El tiempo de retención en cromatografía líquida no es una prueba de identidad, por lo que la disponibilidad de estándares puros es de gran importancia, ya que la respuesta de los solutos puede variar ampliamente, dependiendo de sus estructuras químicas. Un método aceptado generalmente para determinar la identidad de uno o más componentes en una mezcla es la adición de un material de referencia a la muestra. Si aumenta el tamaño del pico esperado, entonces se podrá inferir

que ese pico es debido a la materia en estudio. Este método es denominado adición de estándar. Sin embargo esto no elimina la posibilidad de co-elución de otros componentes con el compuesto en estudio, y que la identificación nos lleve a resultados falsos.

4.- La exactitud y precisión deseadas en la labor analítica. Por ejemplo la precisión en análisis de trazas de un 10%, puede ser aceptable, pero en una prueba de pureza con una precisión del 5 % puede no ser aceptable.

5.- Preparación de las muestras. La primera consideración que se hace es la selección del disolvente para la disolución de la muestra, idealmente, el disolvente de la muestra debería ser el mismo que el eluente, esto da un menor disturbio en la línea base y evita interferencia en la separación cromatográfica. Sin embargo en varios casos, la muestra no se puede disolver en concentraciones suficientes en el eluente por lo que la selección del disolvente o mezcla de disolventes deben cumplir los siguientes requisitos:

- 1.- Deben ser de alta pureza, de manera que no generen picos extraños.
- 2.- Deben ser miscibles con el eluente.
- 3.- Deben dar poca respuesta en el detector
- 4.- Los compuestos que se analizan deben ser estables en solución.

La inyección de grandes volúmenes en la columna puede dar como resultado una significativa disminución en la eficiencia cromatográfica, mientras que la inyección de volúmenes pequeños pueden provocar un efecto desfavorable en la precisión.

### **GRADIENTE CONTRA ELUCION ISOCRATICA**

Para una mejor precisión, los métodos isocráticos son más empleados, debido a la ausencia de cambios en la línea base, y de picos falsos. Cuando es necesario el análisis de gradiente de elución para la separación, se emplean tres reglas en el laboratorio y estos aspectos se deben tener en consideración para lograr la selectividad, exactitud y precisión deseadas.

- 1.- Calibrar el instrumento para la fase móvil real previo a la cuantificación, así como para los estándares; para el control preciso de las condiciones de gradiente.
- 2.- Inyectar una solución de estándar después de cada inyección de muestra, y calcular cada resultado de la muestra con el estándar respectivo.
- 3.- Emplear medidas de áreas en lugar de alturas de picos para los cálculos.

## **CAPITULO I : GENERALIDADES**

### **1.1. ANTECEDENTES FARMACOLOGICOS DEL ACIPIMOX**

Los triglicéridos constituyen un factor de riesgo independiente del sexo tanto en hombres como en mujeres con niveles bajos de hdl-colesterol (high density level - colesterol). Se considera que 9 de cada 10 pacientes con niveles elevados de triglicéridos se encuentran en riesgo elevado de presentar cardiopatía isquémica en forma prematura, aun cuando casi la mitad de estos pacientes presenten cifras de colesterol total inferiores a 250 mg/dl. (1) (2)

La etiología de las hiperlipidemias puede depender de alguno de los siguientes factores: nutrición, genética, enfermedades metabólicas secundarias y envejecimiento.

Los factores dietéticos en combinación con los genéticos son generalmente las causas más importantes del incremento en los niveles de los lípidos. El consumo de grasas en las personas de los países occidentales es extremadamente alta, y de los 60 a 160 g de grasa que consumen diariamente, la mayoría es en forma de triglicéridos.

Las hiperlipidemias se producen cuando se rompe el equilibrio entre la sobreproducción y el catabolismo de las lipoproteínas. La cantidad de lipoproteína depende tanto de su ingesta como de su depuración; si los mecanismos de ajuste compensatorio resultan insuficientes, se produce la hiperlipidemia.(1)

Las causas de una excesiva producción secundaria de lipoproteínas son:

- Obesidad
- Diabetes Mellitus
- Dieta rica en carbohidratos y excesivo consumo de alcohol

El ácido nicotínico parece ser uno de los medicamentos más efectivos que pueden disminuir substancialmente los niveles de triglicéridos y colesterol. Sin embargo, este fármaco es relativamente difícil de emplear ya que produce un gran número de efectos secundarios. Por otra parte, el Acipimox, un análogo del ácido nicotínico, es igualmente efectivo pero tiene mejor tolerancia.(16)

## **1.2. PROPIEDADES DEL ACIPIMOX**

### **1.2.1. FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA**

El Acipimox es un análogo del ácido nicotínico.

El principal efecto farmacodinámico del Acipimox es el de inhibir la lipasa del tejido adiposo y la lipasa hepática que son sensibles a estímulos hormonales.

- la inhibición de la lipólisis reduce la síntesis de triglicéridos disminuyendo los niveles de lipoproteínas de baja densidad en plasma (LDL).
- la disminución del catabolismo hepático de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) produce por lo tanto mayores niveles de HDL en plasma. Es decir que mientras más elevado se encuentre el nivel de HDL en plasma en relación con las lipoproteínas de baja densidad, más bajo será el riesgo de padecer cardiopatía isquémica.(15)

DIFERENCIAS IMPORTANTES ENTRE ACIPIMOX Y EL ACIDO NICOTINICO  
(16)

ACIPIMOX

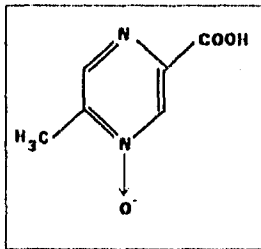
- No se metaboliza
- Vida media de 2 hrs.
- Elevada eficiencia  
( 20 veces mayor que el ácido nicotínico)
- Sin efecto de rebote sobre los ácidos grasos
- Mejora en la tolerancia a la glucosa.
- Esta indicado en pacientes diabéticos.
- No agrava la hiperuricemia
- Produce rubor y comezón en el 8% a 10 % de los pacientes.
- Produce síntomas gastrointestinales en el 4 a 6 % de los casos.

ACIDO NICOTINICO

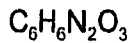
- Amplia metabolización
- Vida media de 30-45 min.
- Baja eficiencia
- Marcado efecto de rebote sobre los ácidos grasos
- Afecta la tolerancia a la glucosa.
- No está indicado en pacientes diabéticos.
- Puede empeorar la Gota.
- Produce rubor y comezón en más del 90 % de los pacientes.
- Produce síntomas gastrointestinales en 30 a 100% de los casos.

### 1.2.2 CARACTERISTICAS QUIMICAS Y FISICAS DEL ACIPIMOX

Fórmula estructural: (16)(19)



Fórmula condensada.



Masa molecular:

154.12

Nombre químico:

Acido- 4-óxido-5-metilpirazinacarboxílico

Descripción:

Polvo cristalino blanco o blanco crema con leve coloración rosada.

Solubilidad:

Soluble en agua y en soluciones alcalinas.

Propiedades físico-químicas: (19)

a) Punto de fusión: 181 ° C.

b) pH= 1.6 - 2.6 (determinado en una solución que contenga 0.5% en agua).

c) Exhibe un máximo a 265 nm en una solución que contenga 0.01 mg/ml en 0.1N de hidróxido de sodio.

#### **1.3. OBJETIVO**

El objetivo del presente trabajo es proporcionar una evidencia documentada de que el método para valoración del Acipimox en cápsulas es confiable y reproducible bajo las condiciones especificadas.

#### **1.4. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS**

La **Validación de un Método Analítico** se define como el proceso por el cual queda establecido por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas (3). El método debe probarse para determinar su efectividad de respuesta, generalmente incluye una evaluación de la precisión, linealidad, exactitud y especificidad.

**Validación Retrospectiva** es la evidencia documentada, basada en los datos acumulados de producción, análisis y control de un producto ya en distribución y que está siendo fabricado con efectividad.

**Validación Prospectiva** es la evidencia documentada realizada antes de que el producto salga al mercado que demuestra que las operaciones se encuentran bajo control por lo que se emplea en productos nuevos, reformulaciones o cambios de equipos de proceso de fabricación.

La validación de un método es la planeación, realización e interpretación de una serie de experimentos diseñados para revelar las características operacionales de un método analítico, el cual se empleará durante un período largo de tiempo con una exactitud aceptable, formulando un criterio de aceptación o rechazo para las aplicaciones analíticas deseadas.



Como se mencionó en la definición anterior, el proceso de validación consiste en tres partes importantes:

- (1) planeación,
- (2) experimentación, y
- (3) documentación.

Los siguientes aspectos se refieren particularmente a un proceso de validación por CLAR.

#### **1. Plan de Validación.**

El plan de validación puede ser empleado como una guía a seguir durante el proceso. El cual está compuesto por cuatro partes, relacionadas:

- (1) separación cromatográfica,
- (2) detectabilidad,
- (3) preparación de las muestras, y
- (4) el método analítico.

#### **2. Experimentación.**

La experimentación de una validación se lleva a cabo mediante la determinación de los siguientes parámetros: precisión, exactitud, linealidad y especificidad.

#### **3. Documentación.**

La documentación de la validación debe contener la siguiente información:

- 1.-Un listado de todas las muestras empleadas en la experimentación, incluyendo número de lote y condiciones de almacenamiento.

2.- Una descripción detallada del proceso analítico incluyendo una lista de los reactivos empleados en la preparación de las muestras y sustancias de referencia, las diluciones requeridas o mezclas, y condiciones de almacenamiento con la indicación de la fecha de caducidad; un listado de los instrumentos requeridos (partes de equipos, columnas); una lista de materiales y reactivos empleados para la preparación de la fase móvil, con sus diluciones y condiciones de mezclas; una lista detallada de los parámetros de operación (flujo, volumen de inyección, longitud de onda, temperatura, etc.); un procedimiento paso por paso (incluyendo cualquier calibración, pesos, volúmenes, tiempos de extracción, disolventes y tiempos de centrifugación); métodos para evaluar y calcular (incluyendo una representación de los cálculos, con tablas y factores numéricos), además de anexar los cromatogramas. El método debe estar presentado con suficiente detalle de tal manera que otro analista que no esté especializado en CLAR pueda reproducir las condiciones necesarias para obtener resultados aceptables.

3.- Precisión del sistema y del método: incluir la metodología empleada, valores obtenidos, datos de desviación estándar y todos los cromatogramas.

4.- Linealidad: describir la metodología, hacer una gráfica de concentración del soluto(s) en la muestra vs respuesta del detector anexando los datos de regresión lineal. Incluir los cromatogramas obtenidos.

5.- Selectividad: Se deben mantener como documentación los cromatogramas de las muestras con y sin adición de sustancias de referencia, así como con la mezcla de las posibles impurezas, productos de degradación o ingredientes del placebo.

6.- Una descripción detallada del método de validación, conteniendo todas las recomendaciones y precauciones que se deben tener en consideración cuando el método por CLAR se emplea rutinariamente.

Se deben dar algunas recomendaciones como cuándo y por qué podría ser necesaria una revalidación.(15)

#### PARAMETROS DE VALIDACION:

##### **LINEALIDAD DEL SISTEMA.**

Es la relación que existe entre la concentración del analito únicamente, sin incluir otros componentes de la muestra y la respuesta del detector que sigue una relación matemática definida y constante, donde se busca que la función sea lineal.

##### **EXACTITUD.**

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

##### **PRECISION DEL METODO.**

Es la capacidad para repetir y reproducir la medición bajo las condiciones normales de operación, el cual es requisito esencial de un método que tenga aplicaciones cuantitativas.

La precisión se establece en términos de 2 componentes independientes:

a) **REPETIBILIDAD:** es el error aleatorio que siempre está presente en cualquier medición analítica. Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos aparatos y técnicas.

b) **REPRODUCIBILIDAD:** es el error aleatorio que puede llegar a estar presente en cualquier medición analítica. Es la medida de la concordancia

relativa, entre determinaciones independientes del analito, bajo distintas condiciones (análisis, analistas, laboratorios, etc.).

#### **LIMITE DE DETECCION.**

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

#### **LIMITE DE CUANTIFICACION.**

Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.

#### **ESPECIFICIDAD.**

Es la medida del grado de interferencia (o ausencia de), en el análisis de mezclas complejas. Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

#### **TOLERANCIA.**

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

#### **ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.**

Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.(3)

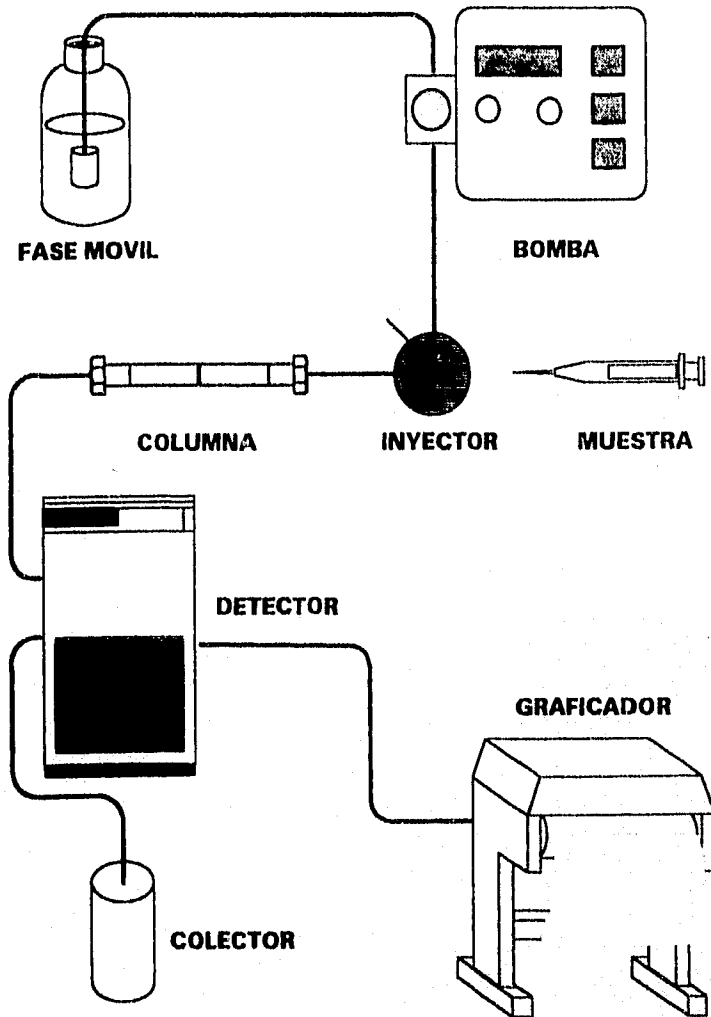
### 1.5. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

Entre los problemas más difíciles relacionados con química y biología están la separación, purificación e identificación de compuestos en una mezcla. Esto es especialmente cierto en farmacología y toxicología ya que los fluidos fisiológicos o extractos de células pueden contener cientos de moléculas complejas con propiedades de solubilidad similares. Algunos problemas en la separación se resolvieron mediante la cromatografía de gases, otros por cromatografía en papel o en capa fina; sin embargo, para varios compuestos biológicos activos éstas técnicas fueron insatisfactorias. El desarrollo de la cromatografía líquida de alta presión (CLAR) ha hecho posible el análisis rápido de compuestos no-volátiles, iónicos y termolábiles que eran previamente difíciles o casi imposibles de separar. Por medio de éste método los componentes moleculares en células se pueden determinar con alta sensibilidad, rapidez, exactitud y resolución. Los tiempos de retención son reproducibles, y el instrumento es versátil y simple de operar. El mayor requerimiento es que los solutos sean solubles en la fase móvil, por lo que un amplio rango de compuestos pueden ser analizados rápida y eficientemente. Esta técnica ha sido especialmente útil en la separación de fármacos y sus metabolitos, y en el análisis de componentes de células tales como esteroides y nucleótidos en pequeñas muestras de células (16)

La siguiente figura nos muestra los componentes esenciales de un cromatógrafo de líquidos.

Figura N°. 1

## PARTES DEL CROMATOGRAFO DE LIQUIDOS



Los métodos cromatográficos empleados incluyen cromatografía de partición (líquido-líquido), cromatografía de adsorción (líquido-sólido), o cromatografía de intercambio iónico.

El tiempo requerido para el análisis por CLAR varía de acuerdo a la separación. Los disolventes pueden ser acuosos o no acuosos dependiendo del tipo de compuesto que se determine, así como de la naturaleza de la separación y en base a esto se determinará el tipo de empaque de la columna que se utilice.

La buena separación de varios compuestos depende de la temperatura, dimensiones de la columna, empaque, concentración y pH de los eluentes, velocidad de flujo, y tipo de elución.

Ejemplos de posibles fuentes de error son:

- 1) técnicas de muestreo.
- 2) preparación de las muestras.
- 3) métodos de almacenaje.
- 4) errores en los cálculos.
- 5) juicio del operador y/o descuido.

Es muy importante emplear procedimientos simples y seguros en la preparación de las muestras. Se debe hacer notar que la velocidad y simplicidad de la preparación y estabilidad de las muestras son esenciales para que el procedimiento sea empleado clínicamente.

Se deben obtener cromatogramas de sustancias de referencia para su uso como punto de comparación antes de aplicar técnicas de CLAR, de tal manera que los picos sean realmente identificados.(5)

## COLUMNAS.

En el transcurso de pocos años se han hecho grandes avances en la cromatografía líquida de alta presión en lo relacionado con columnas y en sus empaques. La eficiencia de las columnas es el resultado de un empaque homogéneo con materiales que tienen tamaño de partícula pequeño o partículas que tienen sólo una capa delgada de superficie activa.

Otra manera de aumentar la eficiencia de las columnas es disminuyendo el tamaño de partícula, esto se debe a que la difusión se minimiza y la transferencia ocurre más rápidamente.

Se ha encontrado que las columnas de divinil-estireno-benceno presentan mayor estabilidad que aquellas que están hechas de una capa o resina homogénea. Estas resinas son muy empleadas en los casos en que se necesita intercambio iónico, pueden ser lavadas con disolventes orgánicos, son estables a sales y a un amplio rango de valores de pH.

Los empaques de micropartículas para intercambio iónico pueden ser de dos categorías:

- 1) micropartículas de resinas totalmente porosas
- 2) micropartículas de resina porosas totalmente enlazadas, donde los grupos de intercambio iónico están permanentemente enlazados a partículas esféricas pequeñas ó partículas de sílica gel triturada.

Los enlaces más usuales son de grupos  $C_{18}$  y otras cadenas alifáticas o aromáticas terminando con grupos  $-CN$  ó  $-NH_2$ .

Los diversos grupos, cuando se unen al soporte, actúan como fases líquidas las cuales permiten la partición entre la fase estacionaria y la fase móvil. Con el grupo  $C_{18}$ , se realiza la cromatografía de fase inversa, y con grupos de



enlaces más polares, como éter, ciano ó amino, se realiza una cromatografía de partición normal.

Las columnas con soporte de sílica se recomienda que se trabajen a valores de pH entre 3.0 y 7.5 porque fuera de esos límites se puede reducir la vida de la columna. A valores de pH bajos se rompen los enlaces silano y a pH altos se puede disolver la sílica.

Los valores de pH entre 7.5 y 8.0 pueden llevar a una lenta disolución del soporte de sílica.

#### DEFINICION DE VOLUMEN MUERTO (5).

El volumen muerto de una columna es el periodo de tiempo,  $t$ , que una molécula de la muestra tarda en pasar en una fase móvil isocrática a un flujo constante.

Las ventajas y desventajas en el uso de la altura o del área de los picos para el análisis cuantitativo son las siguientes:

	<b>VENTAJAS</b>	<b>DESVENTAJAS</b>
<b>ALTURA DEL PICO</b>	No es sensible a la variación de flujo. Menos sensible a interferencias que el área.	Sensible a cambio de composición de disolventes. Sensible a cambios en retención. Sensible a cambios de temperatura. Sensible a la degradación de la columna.
<b>AREA DEL PICO</b>	No es sensible a cambios en la composición del disolvente. No es sensible a cambios en la retención. No es sensible a cambios de temperatura. No es sensible a la degradación de la columna. Preferible para el análisis por gradiente.	Sensible a la variación del flujo. Más sensible a interferencias.

Lo anterior revela que ambas técnicas tienen sus usos propios y la selección depende del tipo de análisis que se realizará. En general, la altura del pico se prefiere y se usa para cuantificación si no es posible controlar el flujo; por otra parte, el área del pico es recomendada si es difícil controlar la composición de la fase móvil.

**CAPITULO 2****MATERIALES Y METODO.****APARATOS REACTIVOS Y ESTANDARES UTILIZADOS.****1. APARATOS.**

Wisp Waters 712

Bomba Waters 590

Detector Waters 490

Columna de separación  $\mu$ Bondapak NH<sub>2</sub> 30 cm

Unidades de filtración MILT.EX HV

Bomba de vacío para filtrar fase móvil

Equipo de filtración MILLIPORE

Potenciómetro BECKMAN 71

**2. REACTIVOS.**

Acetonitrilo H.P.L.C PROLABO

Agua destilada

Acido cítrico MONTERREY

Fosfato de sodio dibásico anhidro MONTERREY

**3. ESTANDARES.**

Acipimox Lote: 1017F202 Potencia: 99.1 %

Acipimox Lote: LC7600A Potencia: 97.1 %

**MATERIA PRIMA UTILIZADA EN LA ELABORACIÓN DEL PLACEBO**

(Cada cápsulas contiene 250 mg de Acipimox. Excipiente c b.p. 310 mg)

- Almidón de maíz
- Sílica gel
- Estearato de magnesio
- Lauril sulfato de sodio

**METODO ANALITICO.**

**Fase móvil:** Solución amortiguadora pH = 2.5 : Acetonitrilo ( 40 : 60 )

**Solución amortiguadora pH = 2.5**

Disolver 9.0 g de ácido cítrico, 1.0 g de fosfato de sodio dibásico en 600 mL de agua destilada. Aforar a 1000 mL con agua destilada.

Si es necesario ajustar el pH a 2.5 con los mismos reactivos.

Mezclar y desgasificar por medio de filtración a vacío con agitación mecánica

**Preparación de la solución de la sustancia de referencia.**

Pesar exactamente 50 mg de Acipimox y disolver en un matríz volumétrico de 50 mL con agitación mecánica durante 10 minutos y aforar a volumen con fase móvil. Tomar 5 mL de ésta solución con pipeta volumétrica y llevar nuevamente a 50 mL con fase móvil.

Filtrar a través de MILEX e inyectar por sextuplicado.

**Preparación de las muestras.**

Homogenizar el polvo de 20 cápsulas, pesar la cantidad de polvo equivalente a 50 mg de Acipimox y disolver con 20 mL de fase móvil en un matríz volumétrico de 50 mL con agitación mecánica durante 10 minutos, aforar a volumen con fase móvil y filtrar a través de papel filtro. Tomar 5 mL de ésta solución con pipeta volumétrica y llevar nuevamente a 50 mL con fase móvil.

Filtrar a través de MILEX e inyectar.

(Realizar la preparación de las muestras por triplicado).

**Condiciones del equipo.**

Longitud de onda	273 nm
Atenuación	256
Flujo	3.0 mL / min
Volúmen de inyección	20 $\mu$ L
Tiempo de retención	Aproximadamente 5.0 min.

Acondicionar la columna por lo menos durante 30 minutos antes de inyectar la solución de referencia, con un flujo de 0.5 mL/min de la fase móvil a temperatura ambiente.

## CAPITULO 3

FORMULAS ESTADISTICAS EMPLEADAS PARA LOS CÁLCULOS DE  
LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN.(3)

Factor de correlación

$$r = \left[ \frac{[nt \Sigma XY - \Sigma X \Sigma Y]^2}{[nt \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2][nt \Sigma Y^2 - (\Sigma Y)^2]} \right]^{1/2}$$

$$r^2 = \frac{[nt \Sigma XY - \Sigma X \Sigma Y]^2}{[nt \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2][nt \Sigma Y^2 - (\Sigma Y)^2]}$$

- Error estándar de regresión ( $Sy / x$ )

$$Sy / x = \left[ \frac{\Sigma Y^2 - M \Sigma XY - B \Sigma Y}{N} \right]^{1/2}$$

- Para pendiente

$$SM = Sy / x \left[ \frac{1}{\frac{\Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}{N}} \right]^{1/2}$$

- Para ordenada al origen

$$SB = S_y / x \frac{1}{N} \left[ \frac{\frac{2}{X}}{\frac{\Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}{N}} \right]^{1/2}$$

- Pendiente ( M )

$$M = \frac{nt(\Sigma XY) - (\Sigma X)(\Sigma Y)}{nt(\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2}$$

- Ordenada al origen ( B )

$$B = \frac{\Sigma Y - M(\Sigma X)}{n \cdot t}$$

Donde :    n = Número de réplicas

          t = Número de diluciones

          N = Número total de muestras

- Intervalo de confianza para la pendiente

$$I.C.M. = M \pm t \text{ de student } \times SM$$

- Intervalo de confianza para ordenada

$$I.C.B. = B \pm t \text{ de student } \times SB$$

-Desviación estándar

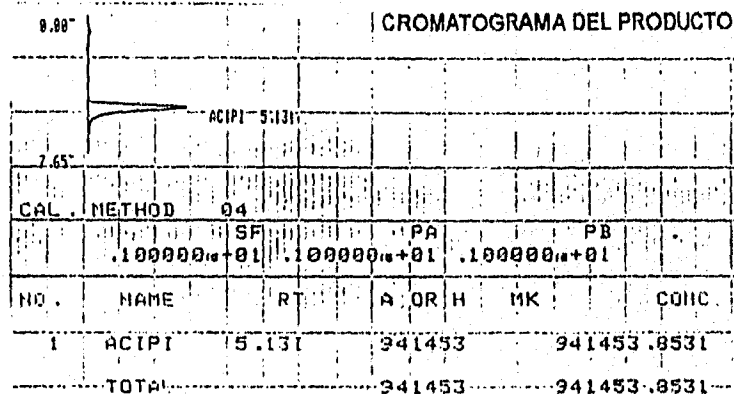
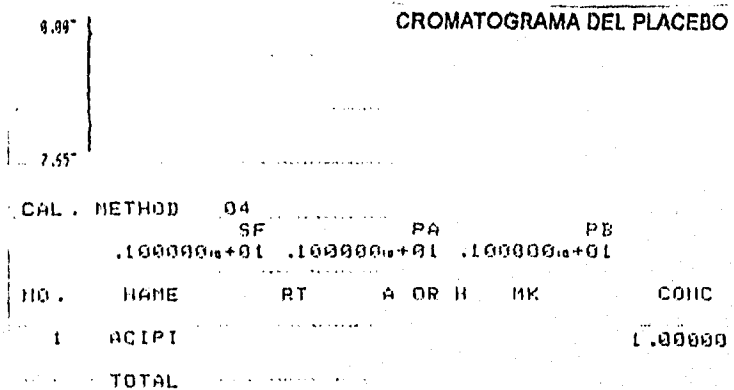
$$\text{D.E.} = \left[ \frac{n (\Sigma Y^2) - (\Sigma Y)^2}{n(n-1)} \right]^{1/2}$$



## RESULTADOS

## 3.1. ESPECIFICIDAD DEL METODO.

La especificidad del método se determinó para comprobar que la respuesta obtenida por el método analítico seleccionado, es debida únicamente al Aciplox y no a los excipientes de la formulación. Para lo cual se inyectó una muestra que únicamente contenía placebo, bajo las mismas condiciones analíticas, y se encontró que no había respuesta alguna observándose únicamente la línea base.



### 3.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA .

Se determinó construyendo una curva de calibración (concentración vs respuesta medida) con cinco muestras que contenían 40, 60, 80, 100 y 120 % de un mismo patrón de referencia cada una por triplicado.

La concentración al 100 % es la solución final a analizar, que proporciona una respuesta adecuada, de acuerdo al método establecido.

Criterios: (3)

- Coeficiente de variación (C.V.)  $\leq 1.5 \%$
- $r \geq 0.99$ ,  $r^2 \geq 0.98$

**TABLA No. 1**  
**LINEALIDAD DEL SISTEMA**

mg ADICIONADOS	AREA	mg RECUPERADOS	% RECUPERADO
25.05	943907.5	25.19	100.55
37.57	1408063.8	37.25	99.14
50.10	1859970.5	49.99	99.78
62.62	2358538.5	62.59	99.95
75.15	2830738.0	74.74	99.45

Regresión lineal:  $r = 0.99987$   $r^2 = 0.99974$

$$A = -9.34 \times 10^3$$

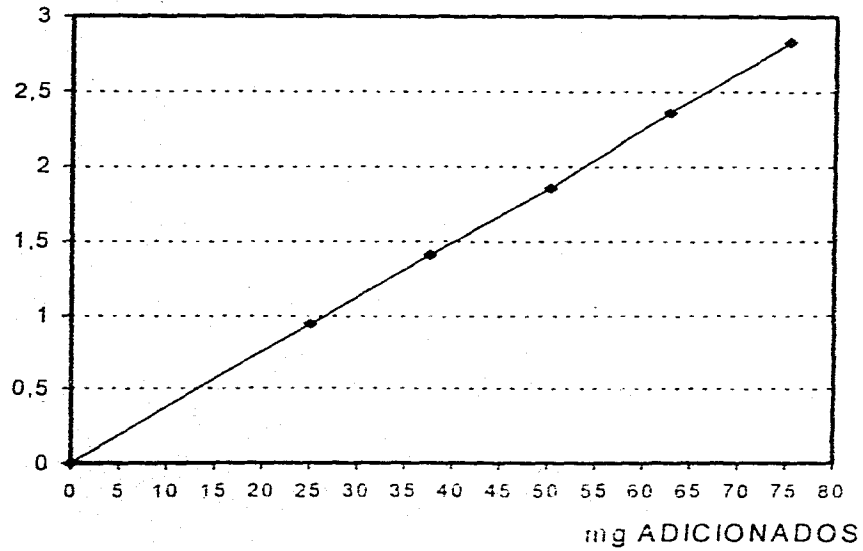
$$B = 0.0377$$

Coeficiente de variación:

$$\bar{X} = 99.79 \quad D.E. = 0.540 \quad C.V. = 0.541$$

# LINEALIDAD DEL SISTEMA

AREA



GRAFICA N° 1

### 3.3. PRECISION DEL SISTEMA

Se efectuaron seis determinaciones de soluciones que contenían solución estándar correspondiente al 100 % establecido en la linealidad del sistema.

Criterio: (3)

$$C.V. \leq 1.5 \%$$

**TABLA No. 2**  
**PRECISION DEL SISTEMA**

mg RECUPERADOS	% RECUPERADO
25.5	100.39
25.7	101.18
26.0	102.36
26.2	103.14
25.8	101.57
25.7	101.18

mg adicionados de Aciplox = 25.4 mg que equivale al 100 %

$$\bar{X} = 101.63 \%$$

$$D.E. = 0.9755$$

$$C.V. = 0.9598 \%$$

### 3.4. LINEALIDAD DEL METODO

Se determinó a partir de placebos cargados adicionados de 5 cantidades diferentes de Acipimox, cada uno de manera independiente por triplicado, siendo las concentraciones finales de 60, 80, 100, 120 y 140 %.

Criterio: (3)  $r \geq 0.99$   
 $r^2 \geq 0.98$   
 $b = 0$

Coefficiente de variación  $\leq 2.0 \%$

**TABLA No. 3**  
**LINEALIDAD DEL METODO**

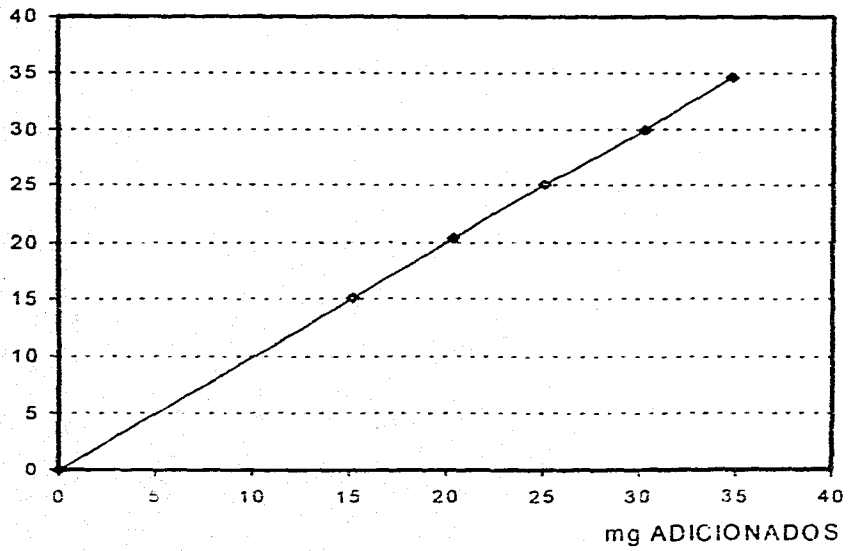
mg ADICIONADOS	% ADICIONADO	mg RECUPERADOS	% RECUPERADO
15.2	60.8	15.08	99.21
20.4	81.6	20.38	99.90
25.1	100.4	25.01	99.64
30.3	121.2	29.92	98.74
34.8	139.2	34.66	99.59

Regresión lineal:  $r = 0.99987$   $r^2 = 0.99975$   
 $m = 0.9916$   
 $b = 0.0593$

Coefficiente de variación:  $\bar{x} = 99.40 \%$  D.E. = 0.4293  
C.V. = 0.4319

mg  
RECUPERADOS

### LINEALIDAD DEL METODO



GRAFICA N° 2

### 3.5. EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100 %

Se determinó por el análisis de seis muestras de placebo que contenían al principio activo en una concentración del 100 %

Criterio: C.V.  $\leq$  a 1.5 %

Intervalo de confianza: G.L. = 5  $t = 2.5706$

**TABLA 4**  
**EXACTITUD AL 100 %**

mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS	% RECUPERADO
25.1	25.18	100.31
25.1	25.13	100.11
25.1	24.65	98.20
25.1	24.62	98.08
25.1	24.90	99.20
25.0	24.78	99.12

Coefficiente de variación:  $\bar{x} = 99.17$  %      D.E. = 0.9290

C.V. = 0.9368 %

Intervalo de confianza: I.C. =  $\bar{x} \pm t (D.E. / \sqrt{n})$

I.C. =  $99.17 \pm 2.5706 (0.9290 / \sqrt{6})$

I.C. = 100.14% a 98.19%

### 3.6. PRECISION DEL METODO

Se realizó por dos analistas en dos días diferentes, partiendo de una muestra homogénea al 100 % de la concentración del principio activo en el producto.

Criterio: C.V.  $\leq$  2.0 %

**TABLA 4**  
**PRECISION DEL METODO**

DIA	ANALISTA1 % DE RECOBRO	ANALISTA 2 % DE RECOBRO
1	100.61	100.43
	100.20	100.93
	100.05	103.04
	99.41	99.11
	100.10	100.44
	101.21	100.81
2	98.23	98.30
	100.00	98.32
	100.48	98.41
	101.63	98.02
	98.95	98.53
	100.48	98.35

Coefficiente de variación:  $\bar{x} = 99.83 \%$       D.E. = 1.283

C.V. = 1.286%



## CONCLUSIONES

El método para valorar Acipimox en cápsulas por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, resultó ser específico, lineal, preciso y exacto para las condiciones preestablecidas; quedando la evidencia documentada mediante la presente validación.

El método es específico para determinar la sustancia en estudio ya que no se observó interferencia debida a los ingredientes de la formulación, ni por los reactivos empleados para la cuantificación.

El análisis estadístico nos demuestra que tanto la linealidad del sistema como del método, son confiables debido a que la desviación estándar y el coeficiente de variación obtenidos, son menores a los límites establecidos.

De la misma manera los resultados obtenidos de la regresión lineal de los datos corrobora la confiabilidad del estudio. Por otra parte, el método resultó ser exacto y preciso tanto por los valores obtenidos de cantidad recuperada, como por los datos de desviación estándar y coeficiente de variación.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Eu Heart J. *The recognition and management of hyperlipidemia in adults: A policy statement of the European Atherosclerosis Society* p 9, 571--600, 1988.
- 2.- Am Heart J. *The triglyceride issue: A view from Framingham*. 112:432, 1986.
- 3.- Guía de validación de métodos analíticos Comisión interinstitucional de Prácticas Adecuadas de Manufactura (CIPAM).
- 4.- Gazdag, M. and Szepesi, G.3. *Liquid Chromatography Problem Solving and Troubleshooting*. Journal of Chromatographic Science, Vol. 31, pag. 347 y 564. 1993.
- 5.- Snyder, L. R. and Kirkland, J. J., *Introduction to modern liquid chromatography*, 2nd ed., Wiley Interscience, New York, 1979.
- 6.- Done, J; Knoll, J; Loheac, J. *Applications of high speed liquid chromatography*. Willey and Sons. U.K. 1974.
- 7.- Mc Nair, Harold. *Cromatografía de líquidos* Ed. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Washington, D.C., U.S.A. 1981. pág. 1 -- 67.
- 8.- Yost, R. W., Ettore, L. S ; Conton, R. D. *Introducción a la Cromatografía líquida práctica*. Ed. Perkin Elmer, México, 1985.
- 9.- Connors, K. A. *Curso de análisis farmacéutico*. 2a ed. Ed. Reverté S.A. España. 1981.
- 10.- Jenkins, G. L.; Knevel, A. M. *Cuantitative Pharmaceutical Chemistry* 6a.ed Ed. Mc. Graw Hill Back, 1967.
- 11.- Stevenson, R. and Johnson. *Basic liquid chromatography*. Ed. B. L. Varian Associates. U.S.A. 1978.
- 12.- Lachman, L.; Lieberman, H. A.; Kaning, J. L. *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*. 3 th ed. U.S.A. 1986.

- 13.- Bernard T. Lottus and Robert A. Nasch. *Drugs and Pharmaceutical Science. Pharmaceutical Process Validation*. Vol. 23, U.S.A., 1994.
- 14.- Calvin Giddings, Roy A. Keller, Jack Cazes, Eli Grushka. *Advances in Chromatography*. Vol. 12, pág. 1 a 29, 1975. Vol. 17, pág. 53 a 99, 1979. Vol. 21, pág. 41 a 83, 1983. Vol 26, pág. 277 a 310, 1987, New York.
- 15.- Taskin M. R., Nikkita E. A. *Effects of acipimox on serum lipids, lipoproteins and lipolytic enzymes in hypertnglyceridemia. Atherosclerosis*. p. 69, 249. 1988.
- 16.- Muggeo M., Lavezzan M. Montoro C., Sacchetti G. *Long-term mullicentre trial with acipimox in diabetic patients with hyperlipoproteinemia*. Proceedings of 6th International Meeting Atherosclerosis and Cardiovascular Disease. Bologna. p. 27--29, 1986.
- 17.- Capitolato de materia prima. Farmitalia Carlo Erba. Milán Italia.
- 18.- Erni, F., Steuer, W., and Bosshardt. *Automation and validation of HPLC systems*, Chromatography, p. 24 ,201. 1987.
- 19.- Dictionary of Anaitical Reagents. Chapman & Hall Chemical database. A. Townshend, D.T. Burns, R. Kosinski, E.J. Newman. Great Britain, 1993, p. 815 (P.00285)

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA