

97  
21

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA



EXAMEN DE RESOLUCIÓN  
FAC. DE QUÍMICA

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO  
ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS  
DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR) PARA LA  
CUANTIFICACIÓN DEL COMPUESTO :**

**2,2-Dicloro-N[( $\alpha$ S, $\beta$ R)- $\alpha$ -Fluorometil]- $\beta$ -Hidroxi-p-  
(Metilsulfonyl)Feniletil]Acetamida,**

**EN UNA PREMEZCLA PARA USO VETERINARIO.**

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

**ARMANDO TOVAR CORONA**



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

MÉXICO D.F. 97 1997



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.

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE :** PROF. ETELVINA MEDRANO HARRA

**VOCAL :** PROF. JOSE DE JESUS VILLACAMPA RAMOS

**SECRETARIO :** PROF. GABRIEL RENE GUZMAN MARTINEZ

**1<sup>ER</sup> SUPLENTE :** PROF. ROSA FLORENCIA MORA TOVAR Y CHAVEZ

**2<sup>DA</sup> SUPLENTE :** PROF. CONSUELO ARELLANO BORDAS

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA :**

LABORATORIO SCHERING PLOUGH S.A. de C.V.  
AV. 16 DE SEPTIEMBRE No. 301  
NOCHIMILCO, MEXICO D.F.

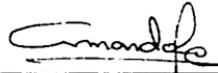
**ASESOR DEL TEMA :**

  
\_\_\_\_\_  
JOSE DE JESUS VILLACAMPA RAMOS

**SUPERVISOR TÉCNICO :**

  
\_\_\_\_\_  
ROSA MARIA ROSETTI ALVAREZ

**SUSTENTANTE :**

  
\_\_\_\_\_  
ARMANDO TOVAR CORONA

SEÑOR, POR PERMITIRME VIVIR ESTE ANHELO... GRACIAS E

•  
TITA, GRACIAS POR MI VIDA, EDUCACION, INTERES Y APOYO  
TE QUIERO MUCHO

•  
GORDITO, GRACIAS POR TUS CUIDADOS, TU EJEMPLO DE  
PERSEVERANCIA, HONESTIDAD Y HUMILDAD  
TE ADMIRO Y RESPETO

•  
SANDRA Y JENNY GRACIAS POR CAMINAR A MI LADO TODOS ESTOS  
AÑOS

•  
NANCY IRENE TE AGRADEZCO TU APOYO INCONDICIONAL Y  
MOTIVACION HACIA MI

•  
FERNANDO HOY Y SIEMPRE TE AGRADEZCO TU APOYO

•  
MII GRACIAS A CADA UNO DE USTEDES POR CREER EN MI.

Q.F.B. ROSA MARIA ROSI TE ALVAREZ

Q.F.B. JOSE DE JESUS VILLACAMPA RAMOS.

ING. JOAQUIN PEREZ RUILAS

Q.F.B. SERGIO A. MORALES ARELLANO

•  
LO QUE VIVE EN TU CORAZON JAMAS MUERE.

TE AGRADEZCO INFINITAMENTE MI PRIMERA OPORTUNIDAD  
PROFESIONAL, TE DESO EXITO SIEMPRE... GRACIAS SCHERING PLOUGH E.

# INDICE :

## INTRODUCCIÓN

### **CAPITULO 1**

PAGINA

#### GENERALIDADES

- Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución ..... 1
- Validación de Métodos Analíticos ..... 15
- Propiedades Físico - Químicas del Principio Activo ..... 19

### **CAPITULO 2**

#### DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

- Desarrollo del Método Analítico ..... 23
- Validación del Método Analítico ..... 27

### **CAPITULO 3**

CONCLUSIONES ..... 63

BIBLIOGRAFIA ..... 65

# **INTRODUCCIÓN**

## **INTRODUCCIÓN**

La Industria Farmaceutica requiere que sus productos sean seguros y exactos en sus especificaciones, por lo tanto, es necesario contar con tecnicas analiticas que aseguren que los procesos de manufactura de los mismos estan bajo control, para obtener productos que satisfagan las perspectivas para los cuales fueron desarrollados.

El proposito del presente trabajo es demostrar la efectividad de un metodo analitico por Cromatografia de Liquidos de Alta Resolucion (CLAR) para la cuantificacion de un nuevo antibiotico en una premezcla para uso veterinario utilizando parametros analiticos adecuados que garanticen que los resultados obtenidos sean confiables.

Estos parametros analiticos estan considerados dentro de la Validacion de Metodos en normas oficiales y comprenden

- PRECISION
- EXACTITUD
- LINEARIDAD
- ESPECIFICIDAD
- TOLERANCIA
- REPETIBILIDAD

Un analisis estadistico de los resultados obtenidos y la aprobacion de estos, bajo criterios de aceptacion previamente definidos, sera la evidencia documental que nos confirme que este metodo analitico es realmente efectivo.

**CAPITULO 1**  
**GENERALIDADES**

# CAPITULO I

## GENERALIDADES

### CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

Las formulaciones o formas farmacéuticas modernas son mezclas complejas que incluyen, además de uno o más componentes medicinalmente activos, una serie de materiales inertes tales como diluyentes, desintegrantes, vehículos, colores, sabores, etc.

Con el fin de asegurar la calidad y la estabilidad del producto final, el farmacéutico analista debe ser capaz de separar estas mezclas en componentes individuales antes del análisis cuantitativo. Entre las técnicas más poderosas de que el analista dispone para la resolución de estas mezclas existe un grupo de métodos altamente eficientes llamados en su conjunto *cromatografía*.

Esta técnica está involucrada íntimamente en todos los aspectos del desarrollo y la investigación farmacéutica como una herramienta analítica altamente confiable.

La cromatografía comprende un grupo de métodos para separar mezclas moleculares en solución tomando en cuenta afinidades diferenciales de los solutos entre dos fases inmiscibles. Una de las fases es un lecho fijo de gran área superficial y la otra puede ser un líquido o un gas que se mueve a través de la fase fija o sobre de ella.

La fase fija se llama fase estacionaria y la otra fase móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido poroso o finamente dividido, o un líquido que ha sido puesto en capa delgada sobre un material sólido que funciona como soporte inerte.

Es necesario que la fase estacionaria posea partículas que sean tan pequeñas como sea posible para que exista una superficie grande de modo que la adsorción y la desorción de los solutos se verifiquen frecuentemente. La fase móvil puede ser un líquido puro o una mezcla de soluciones (por ejemplo, soluciones reguladoras) o puede ser un gas (puro o una mezcla homogénea).

Una clasificación general de algunos de los tipos más comúnmente usados en cromatografía, tomando en cuenta distintos criterios se presenta a continuación. 1 y 2

**1) NATURALEZA DE LA FASE MÓVIL. (F.M.):**

- 1.1) Cromatografía de gases (F.M. = gases)
- 1.2) Cromatografía de líquidos (F.M. = líquido)
  - = Cromatografía de reparto en tubo con placas
  - = Cromatografía de columna abierta
  - = Cromatografía de Alta Resolución
  - = Cromatografía de Fase Normal (F.M. no polar)
  - = Cromatografía de Fase Inversa (F.M. polar)

**2) NATURALEZA DE LA FASE ESTACIONARIA (F.E.):**

- 2.1) Cromatografía sólida (F.E. = sólido y F.M. = líquido)
- 2.2) Cromatografía líquida (F.E. = líquido y F.M. = líquido)
- 2.3) Cromatografía sólida (F.E. = sólido y F.M. = gases)
- 2.4) Cromatografía líquida (F.E. = líquido y F.M. = Gases)

**3) CANTIDAD DE MUESTRA:**

- 3.1) Cromatografía Analítica (µggs. hasta cmg.)
- 3.2) Cromatografía semiquantitativa (mggs. hasta ggs.)
- 3.3) Cromatografía preparativa (ggs. y cantidades mayores)

**4) PROCESO DE SEPARACION:**

- 4.1) Cromatografía de Adsorción (Absorción Superficial)
- 4.2) Cromatografía de Intercambio Iónico (Intercambio de Partículas)
- 4.3) Cromatografía de Interacción Iónica e Interacción no Iónica
- 4.4) Cromatografía por Exclusión (Cromatografía Molecular)

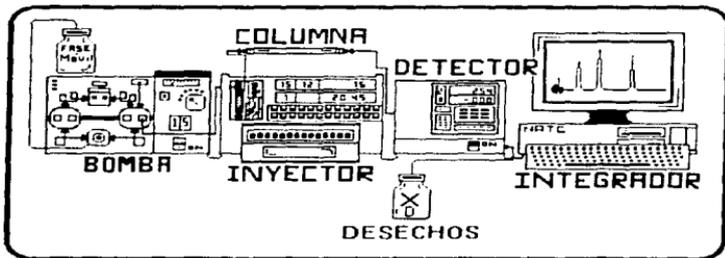
En la anterior descripción se subrayaron cada uno de los criterios de clasificación del tipo de cromatografía que representa la técnica utilizada en el presente trabajo. En adelante trataremos específicamente el campo de la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) por ser esta la técnica de interés en el desarrollo de este trabajo.

## **INSTRUMENTACIÓN CROMATOGRAFICA. 1 y 2**

Basicamente los equipos de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) pueden clasificarse en dos tipos a saber, los **integrados** y **modulares**. En los primeros cada una de sus partes (reservorio de solventes, bomba, inyector, columna, detector e integrador) están reunidas en un gabinete y su intercambio o conexión con otros componentes de la misma o diferente marca es difícil. Permiten en cambio un mejor aprovechamiento del espacio, menos cables, tuberías y conexiones expuestas y quizás menores riesgos de accidente frente a operadores ocasionales o poco experimentados. En los equipos modulares, los módulos son instrumentos individuales que permiten no solo armar el equipo según la necesidad del analista sino aumentar su complejidad según esa necesidad vare.

Esta conformación además de visualizar cada componente del equipo por separado permite no solo el mejor conocimiento y control visual del mismo, sino el mejor aislamiento y resolución de problemas cuando estos se presentan.

A continuación se presenta en la Fig. No. 1 el esquema de un equipo de CLAR tipo modular.



Las características generales de los componentes individuales de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución son las siguientes:

**RESERVORIO DE LA FASE MÓVIL :** El reservorio es el recipiente que contiene la fase móvil. Puede ubicarse dentro de un equipo integrado o externamente en un equipo modular, y en general algunos centímetros sobre el nivel de la bomba para que la fuerza de gravedad dirija el solvente hacia esta, manteniendo llenas las conexiones.

Puede emplearse como reservorio de fase móvil cualquier matraz de laboratorio de buena calidad (de vidrio o polímero resistente e inerte), con una tapa adecuada para prevenir el ingreso de partículas ambientales al sistema.

Al extremo del tubo de salida de solvente se conecta un filtro de acero (buzo) con 2 a 10 micras de porosidad que impide el ingreso de partículas a la bomba.

**TUBERÍAS :** La fase móvil empleada en CLAR debe de circular por tuberías que conectan el reservorio de solvente con la bomba, la bomba con el inyector, este con uno o más detectores conectados en serie y eventualmente con un colector de fracciones o válvulas de distribución. Es evidente que estas tuberías deberán ser inertes y de acuerdo a su ubicación en el sistema cromatográfico resistentes a altas presiones. Así se emplean tubos de acero inoxidable o poliméricos (polipropileno o teflón) siendo las tuberías de acero y la de teflón las más comúnmente utilizadas.

Las tuberías de acero se utilizan para conectar los componentes sometidos a alta presión (entre bomba e inyector, inyector y columna, columna y detector) y los materiales poliméricos para conectar los componentes donde la presión es atmosférica o ligeramente superior (reservorio de fase móvil - bomba, detector - colector de desperdicios).

Otro parámetro a considerar es el de la longitud de las tuberías ya que tuberías demasiado largas conducen a problemas de separación no adjudicables a la columna cromatográfica, también llamados ensanchamientos extra columnares. El ensanchamiento de banda extra-columnar se refiere a la pérdida de eficiencia del sistema cromatográfico para resolver o separar los diferentes componentes de la mezcla en estudio. Las conexiones entre bomba e inyector y posteriores al detector no contribuyen al ensanchamiento de banda extra-columnar y su efecto es menos importante.

**UNIONES:** Las uniones permiten conectar las tuberías y con ellas los distintos componentes del sistema cromatográfico. Una unión consiste en dos piezas de acople perfecto, la unión "macho" consistente en una ferula que se afirma a la tubería conectora y un tornillo que se ajusta a la unión "hembra".

**BOMBAS:** Las bombas de CIAR impulsan la fase móvil proveniente del reservorio de solvente hacia el inyector, y desde ahí hacia la columna. Su caudal de trabajo puede ser muy variable, según la escala de trabajo escogido. Existen bombas capaces de entregar caudales muy pequeños, del orden de los  $\mu\text{l}/\text{min}$ , pasando a caudales de unos pocos mililitros por minuto para la cromatografía analítica convencional hasta valores mucho mayores para las separaciones semipreparativas y preparativas.

**INYECTORES:** El inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal del solvente a través de él. El Inyector debe reunir una serie de características importantes:

- 1) Debe ser fácil de operar.
- 2) Debe ser inerte al ataque químico y capaz de soportar altas presiones.
- 3) Debe ser preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida en el sistema.
- 4) No debe provocar diluciones importantes de la solución inyectada.

Ya han sido definitivamente descartados los inyectores de septum similares a los empleados en Cromatografía de gases. Sus inconvenientes eran como puede esperarse, derivados del desprendimiento del material del septum que obstruya la columna y de la contrapresión que debía vencerse al inyectar la muestra, lo que obliga con caudales altos a su interrupción momentánea.

**COLUMNA CROMATOGRAFICA:** La columna cromatográfica es el "corazón" del equipo de CIAR, ya que en ella es donde se lleva a cabo la separación de los componentes individuales que integran a las mezclas complejas en un análisis por esta técnica.

La fuerza de estas uniones y por lo tanto la separación cromatográfica esta dada esencialmente por factores tales como afinidad de grupos activos entre la fase estacionaria y la molécula de interés, naturaleza orgánica/inorgánica, polaridad y pH de la fase móvil, número de platos teóricos presentes en la fase estacionaria, etc.

**DETECTORES :** El detector es la parte del sistema cromatografico que permite "ver" y ubicar en tiempo y espacio la posicion de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatografica. Los detectores deben de reunir ciertas características, entre las que tenemos

- \* Poseer una respuesta lineal. El detector debe de medir alguna propiedad del analito que se incremente linealmente al aumentar su concentracion. Se denomina rango lineal de un detector al rango de concentraciones que produce una respuesta lineal.

- \* No contribuir al ensanchamiento de banda extra-columnar. El ensanchamiento de banda extra-columnar se refiere como se menciono con anterioridad a la perdida de eficiencia del sistema cromatografico para resolver o separar los diferentes componentes de la mezcla en estudio. En esta característica entra en juego tanto las dimensiones de la celda como la longitud y diametro de la tubería de conexión.

- \* Tener la sensibilidad de detección apropiada. Habitualmente esta propiedad se contraponen con la universalidad de detección. Es decir que detectores que responden a todos los analitos en general poseen sensibilidades menores, y en contrapartida, detectores que poseen una alta sensibilidad no responden a todos los analitos.

- \* No afectarse por cambios de temperatura. En lo posible los cambios de temperatura no deben modificar la señal emitida por los detectores. Esta característica no es válida para algunos detectores como el de índice de refracción o el de infrarrojo en los cuales, para trabajos que demande una sensibilidad media o alta debe termoequilibrarse para tener una línea base estable.

- \* No destruir la muestra. Esta propiedad es una característica de casi todos los detectores de CLAR (una excepción es el electroquímico), y resulta muy importante cuando se desea recolectar el analito aislado, por ejemplo en la Cromatografía preparativa.

Los detectores pueden clasificarse en generales y selectivos. Los detectores generales miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene el analito en comparación con la misma fase móvil pura. Ejemplos típicos son el detector de índice de refracción y el de conductividad. Los detectores selectivos son aquellos sensibles a alguna propiedad propia del soluto, por ejemplo el detector de UV, que producirá una señal proporcional a la absorbancia del soluto a una longitud de onda dada.

Otro ejemplo es el detector de fluorescencia, empleado para la detección de solutos con fluorescencia natural o conferida por reacción con un reactivo fluorogénico. Este último proceso se llama derivatización. Otro detector selectivo es el detector electroquímico, empleado para la detección de analitos que pueden oxidarse o reducirse ante la aplicación de una diferencia de potencial.

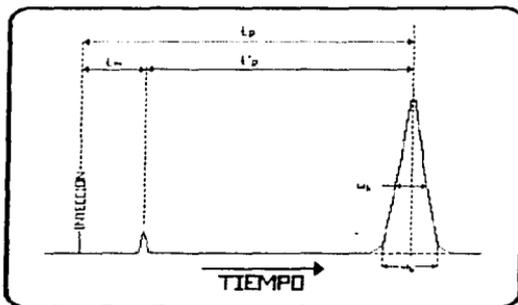
**SISTEMA DE TOMA Y PROCESAMIENTO DE DATOS :** El resultado del ensayo cromatográfico es, por un lado, la obtención de fracciones separadas de los componentes de la muestra, y por otro lado, la obtención de un gráfico o cromatograma, de cuya interpretación pueden extraerse conclusiones cualitativas y cuantitativas. Este registro y la eventual manipulación se obtienen a partir de la señal proveniente del detector por medio de un sistema de toma y procesamiento de datos, entre los que podemos citar:

- Registrador Gráfico, que convierte la señal en un gráfico del tipo X-Y.
- Integrador, que permite no solo obtener un registro gráfico (cromatograma) sino también su tratamiento matemático para el cálculo de la concentración.
- Computadora. Básicamente, el integrador es una computadora de uso muy específico. En este punto nos referimos a una computadora de tipo "personal" que permite con el software o programa apropiado, el registro gráfico del cromatograma, la cuantificación de los componentes de la muestra, la manipulación de datos, el almacenamiento de ensayos, la generación de reportes, e incluso el manejo global de varios cromatogramas.

## CUANTIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA. 1 y 2

**CARACTERÍSTICAS DE UN PICO.** El primer paso en la interpretación cromatográfica es la identificación de las tres principales características de un pico cromatográfico, ancho, altura y área.

La figura numero 2 muestra las principales características de un pico cromatográfico.



donde :

$t_m$  = Tiempo de retención muerto.

$t'_p$  = Tiempo de retención corregido por volumen muerto.

$t_p$  = Tiempo de retención del pico de interés.

$W_b$  = Ancho del pico en la línea base.

$W_{0.5}$  = Ancho del pico medido al 50% de la altura total del mismo.

Los otros dos parámetros relacionados son su área y su altura. El área del pico es proporcional a la cantidad (o concentración, dependiendo del modo de detección) del soluto y es usado para la evaluación cuantitativa. La altura del pico es medida en el punto máximo del mismo donde la concentración del soluto también lo es.

Por definición los tiempos de retención son expresados como los tiempos que tarda cada uno de los componentes de la mezcla en ser identificadas por el detector registrándose una señal que vemos ilustrada como un pico cromatográfico.

**NUMERO DE PLATOS TEÓRICOS.** El Número de platos teóricos es un parámetro que nos indica la capacidad de la columna cromatográfica para retener y separar los componentes de la muestra que se analiza así como la vida útil de la misma.

En la práctica el número de platos teóricos es calculado midiendo el ancho de los picos. Esta medida puede ser tomada directamente en el cromatograma substituyendo los valores apropiados en la siguiente ecuación:

$$n = 16 ( t_r / W_b ) ^ 2 \quad \text{ó} \quad n = 5.545 ( t_r / W_h ) ^ 2$$

donde:

$n$  = Número de platos teóricos

$t_r$  = Tiempo de retención del pico de interés

$W_b$  = Ancho del pico de interés en la base del mismo

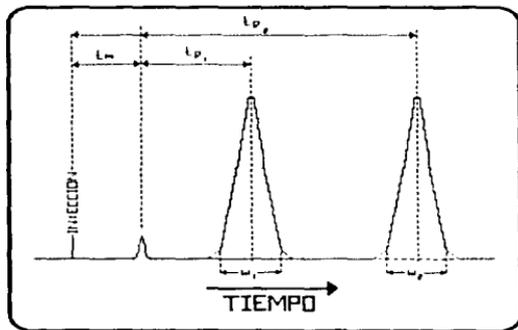
$W_h$  = Ancho del pico medido al 50% de la altura total del mismo

**RESOLUCIÓN.** El objetivo primario de la cromatografía es la separación de los componentes de una mezcla, y el grado de separación se mide por medio del parámetro cromatográfico  $R$  (Resolución)

Este parámetro  $R$  se calcula de la siguiente forma:

$$R = \frac{( t_{R1} - t_{R2} )}{1/2 ( w_1 + w_2 )}$$

Esta fórmula de cálculo se basa en la gráfica del cromatograma No 3 y sólo indica que para mejorar la resolución, los picos deberán de alejarse tanto como sea posible y que sus anchos de base deberán ser pequeños.



donde :

$R$  = Factor Resolución

$t_{R1}$  = Tiempo de retención del pico numero 1.

$t_{R2}$  = Tiempo de retención del pico numero 2

$W_1$  = Ancho de la base del pico numero 1.

$W_2$  = Ancho de la base del pico numero 2.

En la práctica valores del Factor Resolución mayores a 1.5 son indicativos de una buena resolución cromatográfica.

**MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN.** La concentración del Analito en la muestra se puede calcular por diferentes métodos, a saber:

- Normalización interna
- Estandar Externo
- Estandar Interno

La selección del método más adecuado depende del tipo de muestra, del nivel de precisión requerido y de la existencia o no de sustancias de referencia.

✓ **NORMALIZACIÓN INTERNA.** El método de normalización interna, consiste en referir el contenido de analito al total de áreas en el cromatograma, para ello se suman las áreas en todos los picos presentes (exceptuando al pico correspondiente al solvente) y el contenido del analito en la muestra se calcula según:

$$P_i = \frac{A_i}{\sum A_i} \times 100$$

Donde

- $P_i$  = Porcentaje del componente  $i$  en la muestra
- $A_i$  = Área del componente  $i$
- $\sum A_i$  = Sumatoria de todas las áreas del cromatograma

✓ **CUANTIFICACIÓN POR ESTÁNDAR EXTERNO.** Este método de cuantificación consiste en la preparación de estándares con una concentración semejante a la del analito en la muestra y analizarlas ambas, bajo las mismas condiciones cromatográficas. La concentración de analito en la muestra se determina comparando el área del pico en cuestión con el área correspondiente al estándar de referencia, es decir:

$$P = \frac{A_m \times C_s \times D}{A_e} \times 100$$

Donde :

- P = Porcentaje de Analito en la muestra.
- Am = Área de la muestra
- Ae = Area del Estándar.
- Cs = Concentracion del Estándar.
- D = Factor de dilucion.

Este metodo requiere, obviamente, la utilizacion de un estandar de referencia y su exactitud dependera ampliamente de la calidad del mismo. La precision de los datos que se obtienen depende tanto de la preparacion de la muestra y el estandar, como de la inyeccion de ambos, ya que utilizando esta modalidad de trabajo, ninguna de las dos operaciones esta exenta de error analitico; de hecho, la precision de esta metodologia es muy sensible a los errores de inyeccion por ello, para mejorarla se suelen realizar varias inyecciones tipicamente tres inyecciones de estandar y dos inyecciones de cada muestra.

Para evitar la falta de precision originada en las variaciones ambientales se pueden correr alternativamente muestra y estandar o intercalar estandares despues de un grupo de unas cinco o seis muestras dependiendo del total de las mismas.

✓ **CUANTIFICACIÓN POR ESTÁNDAR INTERNO** El metodo por estandar interno consiste en agregar cantidades exactamente medidas de una sustancia asi denominada, tanto al estandar de referencia como a la muestra que contiene al analito. Este metodo requiere de estandares de referencia, al igual que en el metodo del estandar externo, por lo cual su exactitud dependera de la pureza de los mismos. Asi mismo requiere del uso de otra sustancia, el estandar interno, cuya pureza no tiene que ser tan controlada como la del patron de referencia, pero debe cumplir con los siguientes requisitos .

- No debe estar presente como un componente propio de la muestra.
- Debe presentar un area similar al analito
- Debe resolverse completamente ( $R > 1.5$ ) del compuesto a cuantificar como de cualquier otra sustancia presente
- Debe poseer características fisico-químicas que permitan su detección de igual manera que el analito en cuestion.

El método del estándar Interno no es sensible a los errores de inyección debido a que estos errores se compensan al utilizar relaciones de áreas y en algunos casos, pueden compensarse los errores generados en la preparación de la muestra como ser dilución, extracción y derivatización.

El estándar de referencia es preparado con la misma concentración que la muestra. Para determinar la concentración de analito en la muestra se calcula primero la relación de áreas entre el estándar de referencia y el estándar interno denominado este último cociente como Factor Respuesta y calculado con la siguiente fórmula :

$$F . R . = \frac{A E r . x W i . x D r .}{A E i . x W r . x D i .}$$

Donde :

F.R. = Factor Respuesta.

AER = Área del Estándar de Referencia.

AEi = Área del Estándar Interno.

Wr = Peso de Estándar de Referencia.

Wi = Peso del Estándar Interno.

Dr = Factor de Dilución del Estándar de Referencia.

Di = Factor de Dilución del Estándar Interno.

Este Factor Respuesta se determina para cada una de las inyecciones que se realicen de los estándares de referencia y el coeficiente de variación de entre todos ellos no deberá de ser mayor al establecido durante el desarrollo y la validación del método analítico.

Así mismo el Factor Respuesta promedio será el que se utilice en la siguiente etapa de la cuantificación por este método.

La cuantificación del analito en la muestra se determina por medio de la siguiente fórmula :

$$P = \frac{A_m \times W_i \times D_m \times 100}{A_{Ei} \times W_m \times D_i \times F.R.}$$

Donde :

**P** = Porcentaje del analito en la muestra

**A<sub>m</sub>** = Area del pico correspondiente a la muestra.

**A<sub>Ei</sub>** = Area del Estandar Interno.

**W<sub>i</sub>** = Peso del Estandar Interno.

**W<sub>m</sub>** = Peso de la muestra

**D<sub>m</sub>** = Factor de Dilucion de la muestra

**D<sub>i</sub>** = Factor de Dilucion del Estandar Interno.

**F.R.** = Factor Respuesta promedio de Estadares.

## **VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS** 3,6 y 9

Antes que nada, es importante no perder de vista que la validación de un método analítico es tan solo una parte de un programa de validación que va desde proveedores, proceso, personal, áreas, sistemas y todo aquello que de alguna manera u otra participa en la elaboración de un medicamento que debe de cumplir con un principal requisito: CALIDAD

La validación de un método analítico la podemos definir como un conjunto de actividades que tienen como fin el obtener la documentación necesaria, a través de estudios de laboratorio, para acreditar a una técnica analítica como confiable en cuanto a los resultados que de ella se obtienen

Dicho de otra manera, es la comprobación documentada, de que los procedimientos de análisis hacen posible la evaluación de las características de calidad de un producto bajo estudio, con suficiente y definida confiabilidad

Los requisitos mínimos que debe de cumplir una técnica analítica en los laboratorios de control según la FDA (Food and Drug Administration), aceptados también por la SSA son

- ✓ Debe ser EXACTO: El método tiene que dar a conocer la cantidad de la sustancia a cuantificar o compuesto de interés en el medicamento dentro de límites establecidos.
- ✓ Debe ser ESPECÍFICO: Esto es, que el método es capaz de detectar la sustancia a cuantificar o compuesto de interés en un mar de excipientes y derivados de su síntesis o productos de degradación sin que interfieran con el pico de interés
- ✓ Debe ser PRECISO: El método debe de repetir resultados con un mínimo de variación cuando se analiza una misma muestra en repetidas ocasiones. Y por último,
- ✓ Debe ser PRÁCTICO, o tan práctico como sea posible.

## **PARÁMETROS EN LA VALIDACIÓN.**

**LINEALIDAD DEL SISTEMA :** La linealidad del sistema, es la habilidad del sistema de detección para dar una respuesta proporcional a la cantidad de sustancia a cuantificar directamente o a través de una transformación matemática, dentro de un rango de concentración perfectamente definido.

Este parametro se determina preparando una serie de soluciones del estandar de referencia de la sustancia a cuantificar, en concentraciones que cubren un rango previamente establecido que generalmente es entre el 50 y 150% de la cantidad teorica que posee la formulacion

Una vez preparadas estas, se procede a analizarlas por duplicado y con los resultados obtenidos se elabora una curva de calibracion, graficando el Factor repuesta contra la concentracion de la sustancia de interes.

Un analisis de regresion lineal y la determinacion de los parametros estadisticos r ( coeficiente de correlacion lineal aprox = 1 ), m ( pendiente de la curva de calibracion ) y b ( ordenada al origen aprox = 0 ) seran los criterios que determinaran que el metodo analitico cumple con este parametro de validacion.

**PRECISION DEL SISTEMA :** La precision como tal es un parametro estadistico que determina el grado de concordancia de una serie de datos o mediciones repetidas de una misma propiedad. La prueba de precision pretende demostrar que el sistema cromatografico elegido es capaz de detectar siempre la misma cantidad de la sustancia de interes en una misma muestra con la misma variacion, cuantas veces sea esta analizada.

La determinacion de este parametro se realiza primero, preparando una solucion estandar de la sustancia de interes la cual es inyectada en seis ocasiones lo cual nos dara el mismo numero de resultados. Se calcula el factor repuesta con estos ultimos y se realiza un analisis de la desviacion estandar y de el coeficiente de variacion con el fin de ver si los resultados que se obtienen son confiables.

**EXACTITUD DEL MÉTODO :** La exactitud es definida como la concordancia de una determinacion, medida o valor calculado respecto a su valor real. El objetivo principal de esta prueba es el tener la seguridad de que aun cuando la concentracion del activo en la muestra varie, la tecnica analitica tiene la capacidad de determinarla confiablemente.

En términos de validación se expresa como el porcentaje de recobro obtenido después de añadir a una serie de muestras placebo cantidades conocidas de estándares cubriendo un rango de concentraciones donde se incluya el 100% de la concentración teórica.

Se elabora una gráfica de Concentración Anadida contra Concentración recobrada. Un análisis de regresión lineal y la determinación de los parámetros estadísticos r (coeficiente de correlación lineal aprox. = 1) m (pendiente de la curva de calibración aprox. = 1) y b (ordenada al origen aprox. = 0) serán los criterios que determinaran que el método analítico cumple con este parámetro de validación.

**LINEALIDAD DEL MÉTODO :** Es el grado de concordancia entre los resultados obtenidos al analizar diferentes tamaños de muestra. Su objetivo es demostrar que la precisión del método analítico no es afectada al variar el tamaño de muestra en un rango determinado alrededor del peso de muestra indicado en el procedimiento normal de análisis.

Este parámetro se determina utilizando un lote de producto terminado pesando diferentes cantidades de muestra en un rango de concentraciones que incluya el 100% y luego se realiza un análisis de la desviación estándar y coeficiente de variación con respecto al recobro obtenido.

**ESPECIFICIDAD :** Es la habilidad que tiene una técnica analítica para detectar el principio activo en presencia de otros componentes del medicamento dependiendo de la forma farmacéutica de que se trate como lo son solventes, excipientes, vehículos, productos derivados de la síntesis y degradación del compuesto. Esto es dependiendo del objetivo que se le va a dar a la técnica analítica, ya sea para control de calidad, estudios de estabilidad, biodisponibilidad, etc.

Este parámetro se determina sometiendo distintos placebos y producto terminado, en condiciones drásticas para favorecer la presencia de sus productos de degradación (por ejemplo, 70 °C / 15 días, cámara humedad relativa 80% - 40 °C / 15 días). También pueden ser utilizados placebos cargados con los productos de degradación o productos relacionados siempre y cuando se les tenga perfectamente identificados y además se cuente con estándares de cada uno de ellos utilizando la técnica propuesta se analiza cada uno de estos placebos o muestras y se determina que si la respuesta que se está cuantificando es debida únicamente al compuesto de interés.

**REPRODUCIBILIDAD :** Es la precision de un metodo analitico expresado como la concordancia obtenida entre los resultados obtenidos por la tecnica analitica aplicada por diferentes quimicos analistas en diferentes dias. Algunas ocasiones se habla de aplicacion de diferentes cromatografos e incluso diferentes laboratorios. El objetivo de este parametro es la comprobacion de que la tecnica analitica propuesta es capaz de detectar siempre la misma cantidad de la sustancia de interes con la minima variacion posible cuando es utilizada varias veces.

La determinacion de este parametro se lleva a cabo con la aplicacion de la tecnica analitica a la misma muestra de producto por al menos dos quimicos analistas y al menos tambien en dos dias diferentes. Los resultados globales que arroja esta aplicacion son sometidos a un analisis estadistico de desviacion estandar y coeficiente de variacion, ademas de la aplicacion de la prueba estadistica ANOVA (Analysis of Variance) o ANADIVA (Análisis de Varianza) para comprobar que los resultados obtenidos son significativamente confiables, es decir, que los errores de tipo aleatorio que pudiesen existir no afectan la exactitud de los resultados.<sup>10</sup>

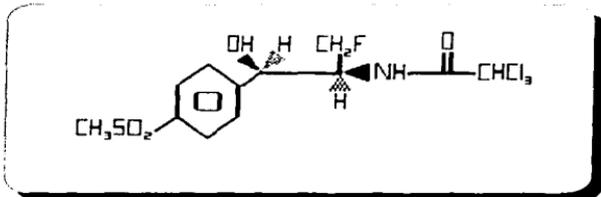
**ESTABILIDAD DE LA MUESTRA :** Es una prueba que nos va a permitir establecer el tiempo que una muestra lista para ser inyectada en el cromatografo puede ser guardada bajo ciertas condiciones para ser utilizada otro dia posteriormente a la preparacion de la misma. Para su realizacion se preparan por lo menos seis muestras las cuales se ponen bajo condiciones normales de almacenamiento a temperatura ambiente, refrigeracion ( $4^{\circ}\text{C}$ ) y protegidas de la luz natural para aquellas que sean fotosensibles.

Estas muestras son analizadas utilizando la tecnica propuesta inicialmente, y posteriormente al 5<sup>o</sup> y 7<sup>o</sup> dia para todas las condiciones a las que se someten. Una vez obtenidos los resultados se observa la variacion con respecto al analisis inicial de referencia y se determina el tiempo y la condicion bajo las cuales la muestra lista por ser inyectada puede ser almacenada.

**TOLERANCIA DEL METODO :** En esta prueba se toman todas aquellas operaciones criticas que influyen dentro del metodo (como lo son ajuste del pH de la fase movil, tiempo de agitacion de la muestra para su extraccion o disolucion, velocidad de flujo de la fase movil y numero de platos teoricos) y se realizan variaciones en cada una de ellas para determinar asi la robustez o tolerancia del metodo. Este parametro se determina debido a que en muchas ocasiones pueden existir variaciones en las operaciones analiticas ya sea voluntaria o involuntariamente.

## PROPIEDADES FÍSICO - QUÍMICAS DEL PRINCIPIO ACTIVO

**ESTRUCTURA :**



**NOMBRE QUÍMICO :**

2,2 - Dicloro - N [ (oS, $\beta$ R)  $\alpha$ - Fluorometil] -p- Hidroxi -p- (Metilsulfoni) Feniletil ] Acetamida

**NOMBRE GENÉRICO :**

FLOFENICOL

**FÓRMULA MOLECULAR :**

C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>FNO<sub>2</sub>S

**PESO MOLECULAR :**

358.21 g/mol

**CATEGORÍA TERAPÉUTICA :**

Antibiótico Veterinario

**APARIENCIA :**

El Principio Activo se presenta como un polvo fino color blanco.

**CONSTANTE DE DISOCIACIÓN :**

El Principio Activo es una molécula neutra que no posee grupos funcionales ácidos o básicos que den una característica determinante de su estructura.

**SOLUBILIDAD :**

La solubilidad del Principio Activo se determinó en varios solventes y soluciones acuosas por diferentes métodos obteniéndose los resultados que a continuación se presentan

<i>MEDIO DISOLUCION</i>	<i>SOLUBILIDAD ( mg/ml )</i>	<i>MÉTODO DETECCION</i>
NaOH 0.1N	1.0	HPLC
HClO 1N	1.3	HPLC
Agua	1.3	HPLC
Propilenglicol	19.6	HPLC
Acetato de Etilo	22.9	HPLC
Etanol	31.8	HPLC
Metanol	86.7	HPLC
Acetonitrilo	> 100	VISUAL
Acetona	> 100	VISUAL

**COEFICIENTE DE PARTICIÓN :**

El Coeficiente de partición del Principio Activo reportado en Octanol y Agua como fases no polar y polar respectivamente con concentraciones entre 0.05 y 0.5 mg/ml a 23°C.

$$K = \frac{[P.A.]_{\text{Octanol}}}{[P.A.]_{\text{Agua}}} = 2.4$$

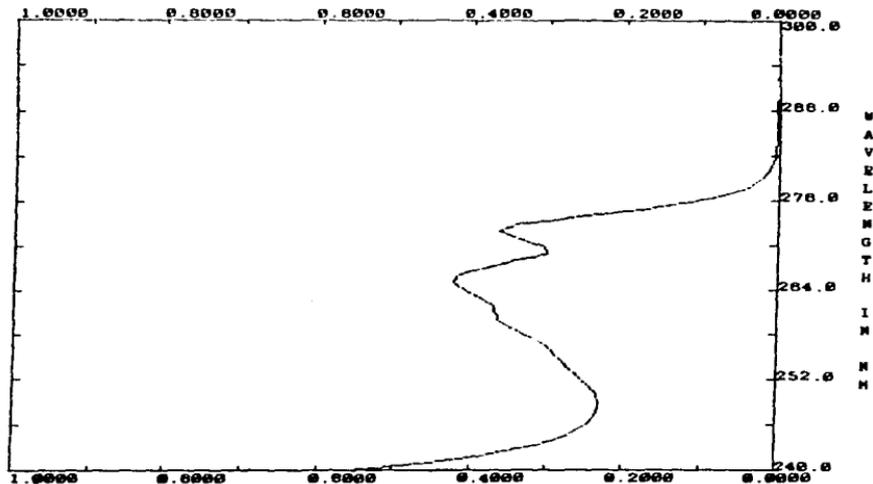
**ESPECTRO DE ABSORCIÓN UV :**

El Espectro de Absorción UV-Visible para el Principio Activo se muestra a continuación.

[ Principio Activo ] = 0.4 mg / ml en Acetonitrilo (CH<sub>3</sub> CN).

**BECKMAN  
DU-88 SPECTROPHOTOMETER**

ABSORBANCE



**FARMACOLOGÍA CLÍNICA :**

El Principio Activo es un antibiotico sintético de amplio espectro el cual actúa en las bacterias inhibiendo la síntesis de proteínas a nivel de ribosomas.

Pruebas de laboratorio han determinado que el Principio Activo tiene efecto contra de una variedad de bacterias aerobicas, anaerobicas, gram positivas y gram negativas aisladas de animales domesticos.

*In vitro* e *in vivo* la actividad de este producto ha sido demostrada contra las más comunes bacterias patógenas encontradas y aisladas en animales del genero bovino.

El Principio Activo esta indicado para el tratamiento de enfermedades respiratorias bovinas asociadas con las bacterias *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Haemophilus somnus*.

## **CAPITULO 2**

# **DESARROLLO DEL** **TRABAJO EXPERIMENTAL**

## CAPITULO 2

### **DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL**

#### **DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO**

El objetivo esencial de este trabajo es el desarrollo y validación de una técnica analítica que nos permita cuantificar el principio activo .

2,2-Dicloro-N[(2S,6R)-6-Fluorometil-6-Hidroxi-pi-Metil sulfonil] Fenil] Acetamida contenido en una premezcla para uso veterinario y que sea aplicable tanto para control de calidad como para estudios de estabilidad del mismo

De antemano se eligió la técnica por cromatografía de líquidos de alta resolución ( CIAR ) debido a que, en primer lugar, se cuenta con el equipo, material y reactivos de la calidad requerida para efectuarse por esta técnica

Esta técnica cuenta ya con una gran diversidad de columnas cromatográficas ( Fases estacionarias ) a las que uno puede recurrir para obtener la que nos de resultados óptimos Por otra parte existe ya un gran número de usuarios por lo que podría ser aplicada en cualquier centro de investigación que cuente con el equipo

Una vez fijada nuestra técnica analítica a utilizar y partiendo de las condiciones cromatográficas reportadas para la determinación de la solubilidad de la molécula de interés, así como las características del resto de los excipientes, se vio la posibilidad de realizar el análisis del producto terminado utilizando una columna C<sub>18</sub> como fase estacionaria y una mezcla de alguna solución reguladora con un solvente con características no polares

De acuerdo a estos experimentos se determinaron las condiciones en las cuales el compuesto de interés presentaba una respuesta cromatográfica adecuada con las características deseadas para un pico

Una vez que se tuvo esta parte del desarrollo analítico se procedió a buscar un estándar interno que cumpliera con las características propias del mismo ya mencionadas en el capítulo anterior y que además no interfiriera con el tiempo de retención del activo

En nuestro caso el Etilparaheno fue la substancia que cumplia con los requisitos previamente establecidos y que en adelante sera considerado como nuestro estandar interno.

**CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.**

**COLUMNA :** Microbondapack C<sub>18</sub> de 30 cm. largo por 4 mm de diametro empacada con particulas de silica de 5 a 10 micras con grupos ligados de octadecilsilano.

**FASE MOVIL :** Mezcla de una solucion de Acetato de Sodio (CH<sub>3</sub>COONa) 0.01 M con Acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) en una proporcion de 2:1 respectivamente y ajustando el pH de esta a un valor de 4.4 con (H<sub>3</sub>COOH) Una vez preparada la Fase Movil se filtra a traves de una membrana de teflon con 0.22 micras de tamaño de poro Millipore o equivalente y se desgasifica colocando el recipiente en el baño de ultrasonido por 10 minutos.

**ELUJO :** 1.0 ml / min

**DETECTOR :** Ultravioleta - Visible.

**λ :** 254 nm

**SENSIBILIDAD :** 0.1 AU.F.

**VOLUMEN INYECCION :** 10 μl.

## REACTIVOS Y SOLUCIONES ESTÁNDAR.

Acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) grado Cromatografico.

Solucion de Estandar Interno

Pesar aproximadamente 20 mgs. de Estandar de Etilparabeno y transferirlos cuantitativamente dentro de un matraz volumetrico de 100 ml. Disolver y diluir al aforo con Acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN).

Solucion Estandar de 2,2 - Dicloro - N [ (αS,βR) - (α - Fluorometil) - β - Hidroxi - p - (Metilsulfonil) Feniletil ] - Acetamida y Solucion de Estandar Combinado.

Pesar aproximadamente 50 mgs. de Estandar de Referencia de 2,2 - Dicloro - N [ (αS,βR) - (α - Fluorometil) - β - Hidroxi - p - (Metilsulfonil) Feniletil ] Acetamida y transferir cuantitativamente dentro de un matraz volumetrico de 50 ml. Añadir 5 ml. de la Solucion de Estandar Interno. Disolver y diluir al aforo con Acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN). Etiquetar esta solucion como Estandar Combinado.

## PROCEDIMIENTO.

Pesar exactamente alrededor de 2.5 grs. de la muestra de premezcla y transferir cuantitativamente dentro de un matraz volumetrico de 50 ml.

Añadir 5.0 ml de Solucion de Estandar Interno y aproximadamente 30 ml de Acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN).

Desgasificar el matraz con la muestra por 10 minutos, dejar enfriar a temperatura ambiente y diluir al aforo con Acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN).

Filtrar esta solucion a traves de una membrana de teflon con 0.45 micras de tamaño de poro Millipore o equivalente descartando los primeros 2 a 3 ml. Etiquetar esta solucion como Solucion de la Muestra.

inyectar 10 µl. de las soluciones de Estandar Combinado y Muestra en el Cromatografo de Liquidos de Alta Resolucion bajo las condiciones previamente establecidas.

### TIEMPOS DE RETENCIÓN APROXIMADOS.

2,2 - Dicloro - N [ (αS,βR) -α- Fluorometil] -β- Hidroxi -p- (Metilsulfonil) Feniletil ] Acetamida	8 min.
Etilparabeno	13 min.

### CALCULOS

*Factor Respuesta (F.R.)*

$$F.R. = \frac{\text{Área EA}}{\text{Área EI}} \times \frac{\text{Peso EI}}{100 \text{ ml}} \times \frac{5 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} \times \frac{50 \text{ ml}}{\text{Peso EA}}$$

Donde :

Área EA = Área del Estandar Analítico

Área EI = Área del Estandar Interno.

Peso EA = Peso del Estandar Analítico.

Peso EI = Peso del Estandar Interno

*Calculo de los mg. de Principio Activo / gr. de premezcla.*

$$\text{mg. PA/gr.} = \frac{1}{F.R._m} \times \frac{\text{Área MA}}{\text{Área EI}} \times \frac{\text{Peso EI}}{100 \text{ ml}} \times \frac{5 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} \times \frac{50 \text{ ml}}{\text{Peso MA}}$$

Donde :

F.R.<sub>m</sub> = Factor Respuesta Promedio.

Área MA = Área del Estandar Analítico en la Muestra.

Área EI = Área del Estandar Interno.

Peso EI = Peso del Estandar Interno.

Peso MA = Peso de la Muestra.

## VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

### PARÁMETRO: TIEMPO OPTIMO EN EL BAÑO DE ULTRASONIDO PARA LA PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

**PROCEDIMIENTO:** Preparar dos soluciones de la sustancia de referencia a cuantificar con concentraciones de 1 mg/ml a las cuales, previo a su aforo, se les adiciono 5 ml de solución de Ftíparabeno ( estándar interno ) con una concentración de 0.2 mg/ml ( soluciones estándar 1 y 2 ) Pesar 15 muestras de un lote terminado de premezcla equivalente a 50 mgrs. de principio activo (2.5 grs. de muestra) y transferirlos cuantitativamente a matraces volumetricos de 50 ml, adicionando una alícuota de 5 ml de la solución de estándar interno preparada previamente y agregar aproximadamente 30 ml de Acetonitrilo CH<sub>3</sub>CN. Colocar 3 matraces para cada uno de los siguientes tiempos en el baño de ultrasonido; 10, 15, 20 y 30 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente para diluir y aforar con Acetonitrilo CH<sub>3</sub>CN. Inyectar estas muestras y estándares en el cromatografo de líquidos bajo las condiciones propuestas como óptimas previamente durante la etapa de desarrollo del método.

A continuación se presentan los resultados que arroja esta prueba.

#### 10 MINUTOS DE SONICACIÓN

Peso de muestra grs.	Conc. recuperada mg/gr	% Conc. recuperada
2.5037	20.0004	100.00
2.5056	20.1152	100.58
2.5007	20.1217	100.61

Promedio  
D.E.  
C.V.

100.40
0.34
0.34

#### 15 MINUTOS DE SONICACIÓN

Peso de muestra grs.	Conc. recuperada mg/gr	% Conc. recuperada
2.5096	20.0369	100.18
2.5011	20.0536	100.27
2.5015	19.9005	99.50

Promedio  
D.E.  
C.V.

99.98
0.42
0.42

**20 MINUTOS DE SONICACIÓN**

Peso de muestra grs.	Conc. recuperada mg/gr	% Conc. recuperada
2.5009	19.7390	98.70
2.5020	20.0560	100.28
2.5009	19.9703	99.85

Promedio:	99.61
D.E.:	0.82
C.V.:	0.82

**30 MINUTOS DE SONICACIÓN**

Peso de muestra grs.	Conc. recuperada mg/gr	% Conc. recuperada
2.5050	20.1023	100.51
2.5062	20.0598	100.30
2.5084	20.0276	100.14

Promedio:	100.32
D.E.:	0.19
C.V.:	0.19

**CRITERIO DE ACEPTACIÓN.**

Coefficiente de Variación menor o igual a 2.0 %

lo que significa que los resultados obtenidos son confiables.

**CONCLUSIÓN.**

Durante la preparación de las muestras, el tiempo que deben de permanecer estas en el baño de ultrasonido antes de su aforo es de 15 minutos como mínimo, con un máximo para este mismo objetivo de 30 minutos.

**PARÁMETRO : LINEALIDAD DEL SISTEMA.**

**PROCEDIMIENTO :** La linealidad del sistema se demostro preparando una solución primaria con una concentración de 10 mg/ml de la sustancia de referencia a cuantificar de tal forma que al tomar alícuotas de 3,4,5,6 y 7 ml obtengamos concentraciones del 60,80,100,120 y 140 % con respecto al valor teorico establecido. Por otro lado se preparo una solución con una concentración de 0.2 mg/ml de Etilparabeno ( estandar interno ) de la cual se tomó una alícuota de 5 ml para cada uno de los matraces anteriores antes de llevarlos al aforo de 50 ml con Acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) Estas muestras fueron inyectadas por duplicado en el cromatografo de líquidos bajo las condiciones propuestas como óptimas previamente durante la etapa de desarrollo del metodo.

A continuación se presentan los resultados que arrojó esta prueba, así como la curva de calibración para la linealidad del sistema cromatografico.

Conc. teorica %	Conc. real mg	Factor Resp. Indiv.
60%-M1	0.6004	0.0088
60%-M2	0.6004	0.0088
80%-M1	0.8005	0.0117
80%-M2	0.8005	0.0117
100%-M1	1.0006	0.0147
100%-M2	1.0006	0.0147
120%-M1	1.2007	0.0175
120%-M2	1.2007	0.0176
140%-M1	1.4008	0.0206
140%-M2	1.4008	0.0205



<i>Regresión Lineal :</i>	
Ordenada al origen	a = 0.00002
Error Estandar de a	0.00004
Coef. correlación cuadr.	r = 0.99993
Coef. de correlación	r = 0.99996
No. de Datos	10
Grados de libertad	8
Pendiente	m = 0.01482
Error Estandar de m	0.00005

**RESULTADOS.**

Los resultados de la curva de calibración obtenida al realizar esta prueba fueron los siguientes :

Ordenada al origen ( a ) =	0.00002
Pendiente ( m ) =	0.01462
Coefficiente de correlacion lineal ( r ) =	0.99998

**CRITERIO DE ACEPTACION.**

Los criterios de aceptación para esta prueba así como para el resto de las mismas fueron establecidos tomando en cuenta varios aspectos

- Recomendaciones de la Cámara Interinstitucional de Prácticas Adecuadas de Manufactura ( CIPAM )
- Establecimiento de criterios según la casa matriz de el laboratorio Schering Plough S.A. de C.V.
- Experiencia personal del tipo de muestra y metodología que se aplico para el análisis.

Ordenada al origen ( a ) aprox. = 0

Lo cual significa que no tiene sesgos

Coefficiente de correlacion lineal ( r ) aprox. = 1

Lo que significa que la relacion que se guarda es de tipo lineal y su gráfica tiende a ser una recta.

**CONCLUSIÓN.**

Por lo tanto podemos considerar que este parametro :

**✓ Cumple con los requisitos dentro de la validación de nuestro método analítico.**

**PARÁMETRO: PRECISIÓN DEL SISTEMA.**

**PROCEDIMIENTO:** La Precisión del sistema se demostro preparando una solución primaria con una concentración de 10 mg/ml de la sustancia de referencia a cuantificar de tal forma que al tomar una alícuota de 5 ml obtengamos el 100 % de la concentración con respecto al valor teórico establecido. Por otro lado se preparo una solución con una concentración de 0.2 mg/ml de Etilparabeno ( estándar interno ) de la cual se tomo una alícuota de 5 ml que se anadio al matraz anterior antes de llevarlos al aforo de 50 ml con Acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) Esta muestra fue inyectada por sextuplicado en el cromatografo de líquidos bajo las condiciones propuestas como optimas previamente durante la etapa de desarrollo del metodo.

A continuación se presentan los resultados que arrojó esta prueba

Estándar Número	Conc. Estándar %	Factor Resp.
1	100	0.01475
2	100	0.01472
3	100	0.01471
4	100	0.01475
5	100	0.01463
6	100	0.01471
F.R. promedio =		0.01471
Desviación Estandar =		0.00004
Coeficiente de Variación =		0.30%

**RESULTADOS.**

Los resultados obtenidos fueron los siguientes :

Factor Respuesta Promedio -	0.0147
Desviación Estandar -	0.00004
Coefficiente de Variación -	0.30 %

**CRITERIO DE ACEPTACIÓN.**

Coefficiente de Variación menor o igual a 2.0 %

lo que significa que los resultados obtenidos son confiables

**CONCLUSIÓN.**

Por lo tanto podemos considerar que este parametro :

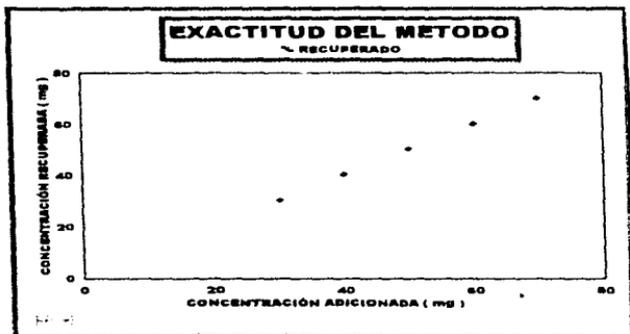
✓ cumple con los requisitos dentro de la validación de nuestro método analítico.

**PARÁMETRO: EXACTITUD DEL MÉTODO.**

**PROCEDIMIENTO** Preparar dos soluciones de la sustancias de referencia a cuantificar a concentraciones de 1 mg/ml a las cuales, previo a su aforo, se les adiciono 5 ml de solución de Etiparabeno ( estándar interno ) con una concentración de 0.2 mg/ml ( soluciones estándar 1 y 2 ) Por otro lado preparar una solución primaria con una concentración de 10 mg/ml de la sustancia de referencia a cuantificar. Pesar por separado 10 diferentes muestras de aproximadamente 2.5 grs. de premezcla placebo y transferirlos en matraces volumetricos de 50 ml. Adicionar por duplicado alícuotas de 3, 4, 5, 6, y 7 ml de la solución primaria equivalente al 60, 80, 100, 120 y 140% de la concentración teórica. A cada uno de los matraces que contienen los placebos ( cargados ) se les añade una alícuota de 5 ml de la solución de estándar interno preparada previamente y se llevan al aforo con Acetonitrilo ( CH<sub>3</sub>CN ). Inyectar estas muestras y estándares en el cromatográfo de líquidos bajo las condiciones propuestas como óptimas previamente durante la etapa de desarrollo del método.

A continuación se presentan los resultados que arrojó esta prueba, así como la curva de calibración para el % de recobro obtenido.

Muestras Etiqueta	Conc adicionada mg	Conc recuperada mg	% Conc recuperada
60%-M1	30.02	30.49	101.59
60%-M2	30.02	30.34	101.10
80%-M1	40.02	40.42	100.75
80%-M2	40.02	40.59	101.42
100%-M1	50.03	50.41	100.77
100%-M2	50.03	50.38	100.72
120%-M1	60.03	60.10	100.12
120%-M2	60.03	60.41	100.64
140%-M1	70.04	69.99	99.94
140%-M2	70.04	70.18	100.20
			<b>100.72%</b>
			<b>0.5413</b>
			<b>0.54%</b>



<i>Regresión lineal</i>	
Ordenada al origen	a = 0.75454
Error Estándar de Y	0.23674
Coef. de correlación cuadr.	0.99992
Coef. de correlación	r = 0.99996
No. de Datos	10
Grados de libertad	6
Pendiente	m = 0.99086
Error Estánd. Pendiente	0.00306

Una de las propiedades mas importantes de un método analítico es que se encuentre libre de errores sistematicos, es decir, el valor dado para la cantidad de analito debería ser el *valor verdadero*. Para decidir si la diferencia entre la cantidad medida y la cantidad conocida se puede justificar por algun error aleatorio, puede aplicarse una prueba estadística que se denomina prueba de significación.

Para ello se determinan, en este caso, los intervalos de confianza de la ordenada al origen ( a ) y de la pendiente ( m )

#### RESULTADOS.

El coeficiente de variación para los resultados arrojados por esta prueba fue de 0.54%.

Los resultados de la curva de calibración obtenida al realizar esta prueba fueron los siguientes :

Ordenada al origen ( a ) =	0.75454
Pendiente ( m ) =	0.99086
Coefficiente de correlación lineal ( r ) =	0.99996

En la prueba de significación, se obtuvieron los siguientes resultados :

Intervalo de Confianza para ( a ) :

$$ICa = a \pm t(n-2,0.95)^{10} \times Sa$$

$$ICa = 0.75454 \pm (2.31)^* \times (0.13674)$$

$$ICa = ( 1.0704 - 0.4386 )$$

donde :

ICa = Intervalo de confianza de la Ordenada.

Sa = Error Estandar de la Ordenada

t(n-2,0.95) = Valor de t para Intervalo de Confianza de 95%.

**Intervalo de Confianza para (m) :**

$$ICm = m \pm t(n-2,0.95)^{10} \times Sm$$

$$ICm = 0.99086 \pm (2.31) \times (0.00306)$$

$$ICm = ( 0.9979 - 0.9838 )$$

donde :

ICm = Intervalo de confianza de la Pendiente.

Sm = Error Estandar de la Pendiente.

t(n-2,0.95) = Valor de t para Intervalo de Confianza de 95%.

#### **CRITERIO DE ACEPTACIÓN.**

Coefficiente de Variación menor o igual a 2.0 %

lo que significa que los resultados obtenidos son confiables.

Ordenada al origen ( a ) aprox. = 0 y

Pendiente ( m ) = 1

Observando los resultados tenemos que el método presenta un sesgo de de caracter sistematico estadisticamente los intervalos de confianza no incluyen al 0 (cero) y 1 (uno) para la ordenada al origen y la pendiente respectivamente pero los resultados del % de recobro cumple con requisito de C.V. menor o igual al 2.0%. por lo que podemos considerar que la magnitud de este sesgo no es de caracter significativo, para los propositos del metodo.

Coefficiente de correlacion lineal ( r ) aprox. = 1

Lo que significa que la grafica tiende a ser una recta.

#### **CONCLUSIÓN.**

Por lo tanto podemos considerar que este parametro

✓ cumple con los requisitos dentro de la validación de nuestro método analítico.

**PARAMETRO : LINEALIDAD DEL MÉTODO.**

**PROCEDIMIENTO:** Preparar dos soluciones de la sustancia de referencia a cuantificar a concentraciones de 1 mg/ml a las cuales, previo a su aforo, se les adiciono 5 ml de solución de Ftílparabeno ( estándar interno ) con una concentración de 0.2 mg/ml ( soluciones estándar 1 y 2 ). Tomando en cuenta que la concentración teórica del principio activo presente es de 20 mgs en cada gramo de premezcla, pesar por duplicado muestras de un lote terminado equivalentes al 60, 80, 100, 120 y 140% de la concentración teórica necesaria para el análisis ( 1 mg/ml ), es decir aproximadamente 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 y 3.5 grs. de muestra respectivamente, transferirlas cuantitativamente a matraces volumétricos de 50 ml para añadir una alícuota de 5 ml de la solución de estándar interno preparada previamente a cada uno de ellos antes de llevar al aforo con Acetonitrilo ( CH<sub>3</sub>CN ) Inyectar estas muestras y estándares en el cromatografo de líquidos bajo las condiciones propuestas como óptimas previamente durante la etapa de desarrollo del método

A continuación se presentan los resultados que arroja esta prueba

Muestras Ftiqueta	Peso de mta. adic. grs	Conc. adicionada mg	Conc. recuperada mg	% Conc. recuperada
60%-M1	1.5001	30.002	29.786	99.29
60%-M2	1.5001	30.002	29.787	99.29
80%-M1	2.0002	40.004	39.599	99.00
80%-M2	2.0003	40.006	39.808	99.52
100%-M1	2.5002	50.004	49.776	99.55
100%-M2	2.5001	50.002	49.789	99.58
120%-M1	3.0001	60.002	59.612	99.35
120%-M2	3.0001	60.002	59.665	99.44
140%-M1	3.5001	70.002	69.461	99.23
140%-M2	3.5001	70.002	69.741	99.63
Concentración recuperada Promedio				99.39
Desviación Estándar				0.1948
Coeficiente de Variación				0.20%

**RESULTADOS.**

Los resultados obtenidos fueron los siguientes :

Concentración Recuperada Promedio =	99.39 %
Desviación Estándar =	0.1948
Coefficiente de Variación =	0.20 %

**CRITERIO DE ACEPTACIÓN.**

Coefficiente de Variación menor o igual a 2.0 %

lo que significa que los resultados obtenidos son confiables.

**CONCLUSIÓN.**

Por lo tanto podemos considerar que este parametro :

✓ cumple con los requisitos dentro de la validación de nuestro método analítico,

**PARÁMETRO PRECISIÓN DEL MÉTODO ( REPRODUCIBILIDAD )**

PROCEDIMIENTO : Esta prueba se realiza con el análisis de dos químicos que preparen individualmente sus muestras en dos días diferentes ambos. Cada uno debe preparar dos soluciones de la sustancia de referencia a cuantificar con concentraciones de 1 mg/ml a las cuales, previo a su aforo, se les adiciono 5 ml de solución de Etilparabeno ( estándar interno ) con una concentración de 0.2 mg/ml ( soluciones estándar 1 y 2 ) Pesar cada uno de los químicos, 3 muestras de un lote terminado de premixela equivalente a 50 mgs de principio activo (2.5 grs. de muestra) y transferirlos cuantitativamente a matraces volumétricos de 50 ml. para añadir una alícuota de 5 ml de la solución de estándar interno preparada previamente a cada uno de ellos antes de llevar al aforo con Acetonitrilo ( CH<sub>3</sub>CN). Inyectar estas muestras y estándares en el cromatografo de líquidos bajo las condiciones propuestas como óptimas previamente durante la etapa de desarrollo del método

A continuación se presentan los resultados que arroja esta prueba para ambos días de análisis

muestra	Conc. recuperada mg/gr	% Conc. recuperada
D1-Q1-M1	19.8692	99.35
D1-Q1-M2	19.7355	98.68
D1-Q1-M3	19.8525	100.20
D1-Q2-M1	19.9016	99.51
D1-Q2-M2	20.0188	100.09
D1-Q2-M3	19.8576	100.09
D2-Q1-M1	19.9145	99.57
D2-Q1-M2	19.9339	100.59
D2-Q1-M3	19.9130	99.67
D2-Q2-M1	19.9487	99.74
D2-Q2-M2	19.8562	99.28
D2-Q2-M3	19.9177	99.59
promedio	19.8933	99.70
desviación estándar	0.0686	0.5013
coeficiente de variación	0.34%	0.50%

**ANÁLISIS DE VARIANZA ( ANOVA / ANADEVA ).**

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Medida de Cuadrados	F <sub>cal</sub>	F <sub>0.05</sub>
Analista (a)	1	0.0048	0.0048	0.0155	F <sub>gl<sub>a</sub>/gl<sub>d</sub></sub>
Día (d)	2	0.6211	0.3105	1.1679	F <sub>gl<sub>d</sub>/gl<sub>e</sub></sub>
Error	8	2.1272	0.2659		

**CRITERIO DE ACEPTACIÓN.**

A) PARA LOS RESULTADOS GLOBALES.

Coefficiente de Variación menor o igual a 2.0 %

lo que significa que los resultados obtenidos son confiables.

B) PARA EL ANÁLISIS DE VARIANZA.

como  $F_a < F_{gl_a, gl_d; 0.05}$

El método analítico es reproducible por los analistas

como  $F_d < F_{gl_d, gl_e; 0.05}$

El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

**CONCLUSIÓN.**

Por lo tanto podemos considerar que este parámetro :

**✓ cumple con los requisitos dentro de la validación de nuestro método analítico.**

**PARÁMETRO : ESTABILIDAD DE LA MUESTRA**

**PROCEDIMIENTO :** Preparar dos soluciones de la sustancias de referencia a cuantificar a concentraciones de 1 mg/ml a las cuales, previo a su aforo, se les adiciono 5 ml de solución de FtIparabeno ( estándar interno ) con una concentración de 0.2 mg/ml ( soluciones estándar 1 y 2 ) Pesar 6 muestras de un lote terminado de premezcla equivalente a 50 mgrs de principio activo ( 2.5 grs. de muestra ) y transferirlos cuantitativamente a matraces volumetricos de 50 ml para añadir una alícuota de 5 ml de la solución de estándar interno preparada previamente a cada uno de ellos antes de llevar al aforo con Acetonitrilo ( CH<sub>3</sub>CN). Inyectar dos de estas muestras y estándares en el cromatógrafo de líquidos bajo las condiciones propuestas como óptimas previamente durante la etapa de desarrollo del método. Repetir el análisis al tercer y quinto día con las muestras restantes las cuales se colocaron una en refrigeración y otra a temperatura ambiente

A continuación se presentan los resultados que arrojo esta prueba.

E N S A Y O			
TEMPERATURA AMBIENTE			
MUESTRA	INICIAL	3º DÍA	6º DÍA
1	99.57%	98.83%	99.41%
2	100.59%	98.92%	99.74%
3	99.74%	99.54%	99.45%

E N S A Y O			
REFRIGERACION			
MUESTRA	INICIAL	3º DÍA	6º DÍA
1	99.59%	99.52%	99.20%
2	100.29%	100.04%	98.98%
3	9928.00%	99.17%	99.18%

TEMPERATURA AMBIENTE			
	INICIAL	3° DIA	6° DIA
PROMEDIO :	99.96%	99.09%	99.53%
DESVIACIÓN ESTANDAR :	0.5465	0.3866	0.1801
COEFICIENTE DE VARIACION :	0.5467	0.3901	0.1809
IC ( + ) :	101.3233%	100.0564%	99.9804%
IC ( - ) :	98.6100%	98.1370%	99.0862%
CRITERIO DE ACEPTACION :	INDEFIN. AL 100%	INDEFIN. AL 100%	INDEFIN. AL 100%
INTERPRETACION :	ESTABLE	ESTABLE	NO ESTAB.

TEMPERATURA AMBIENTE			
	INICIAL	3° DIA	6° DIA
PROMEDIO :	99.72%	99.57%	99.12%
DESVIACIÓN ESTANDAR :	0.5174	0.4378	0.1217
COEFICIENTE DE VARIACION :	0.5189	0.4396	0.1227
IC ( + ) :	101.0045%	100.6635%	99.4220%
IC ( - ) :	98.4355%	98.4899%	98.8180%
CRITERIO DE ACEPTACION :	INDEFIN. AL 100%	INDEFIN. AL 100%	INDEFIN. AL 100%
INTERPRETACION :	ESTABLE	ESTABLE	NO ESTAB.

Estos resultados nos indican nos muestran que las muestras listas para ser inyectadas en el cromatografo de liquidos, **pueden ser analizadas hasta tres dias despues de su preparaci3n** bajo condiciones de Refrigeraci3n y de Temperatura Ambiente.

**PARÁMETRO: ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO.**

**PROCEDIMIENTO :** Someter muestras de placebos de principio activo y producto terminado a 70 °C y 40 °C/80% de humedad relativa durante 15 días. Preparar una serie de muestras con los placebos y estandares tanto analítico como interno de la siguiente manera

- ✓ Solvente Acetonitrilo ( CH<sub>3</sub>CN )
- ✓ Estandar del principio activo
- ✓ Estandar interno de Ftilparabeno.
- ✓ Estandar Combinado ( principio activo + Ftilparabeno ).
- ✓ Placebo de principio activo a temperatura ambiente sin estandar interno de Ftilparabeno.
- ✓ Placebo de principio activo a 70 °C durante 15 días sin estandar interno de Ftilparabeno.
- ✓ Placebo de principio activo a 40 °C y 80% de humedad relativa durante 15 días sin estandar interno de Ftilparabeno.
- ✓ Producto Terminado a temperatura ambiente sin estandar interno de Ftilparabeno.
- ✓ Producto Terminado a temperatura ambiente con estandar interno de Ftilparabeno.
- ✓ Producto Terminado a 70 °C durante 15 días sin estandar interno de Ftilparabeno
- ✓ Producto Terminado a 40 °C y 80% de humedad relativa durante 15 días sin estandar interno de Ftilparabeno

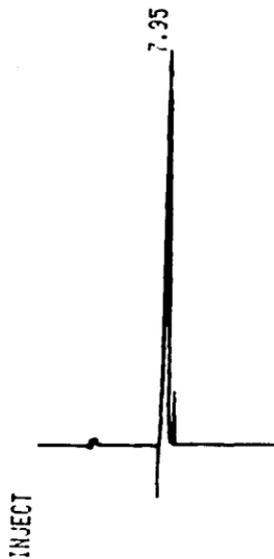
Injectar cada una de estas soluciones en el cromatografo de liquidos bajo las condiciones propuestas como optimas previamente durante la etapa de desarrollo del metodo.

A continuación se presentan los resultados que arroja esta prueba.

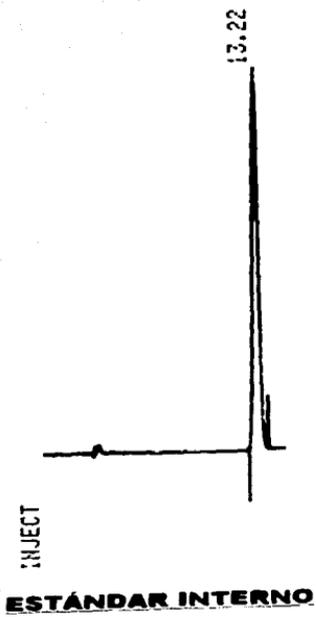
---

INJECT

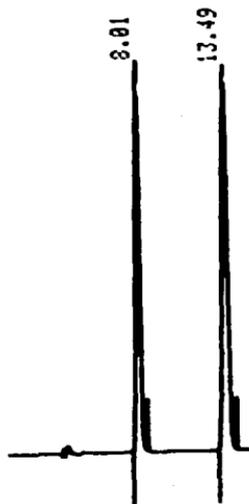
SOLVENTE



**ESTÁNDAR DEL PRINCIPIO ACTIVO**



INJECT

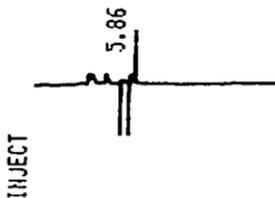


**ESTÁNDAR COMBINADO**

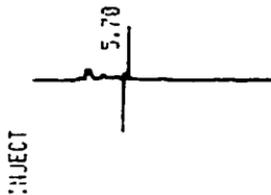
INJECT



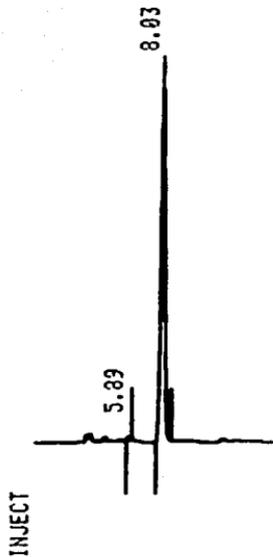
**PLACENO DEL PRINCIPIO ACTIVO A**  
**TEMPERATURA AMBIENTE SIN ESTÁNDAR**  
**INTERNO**



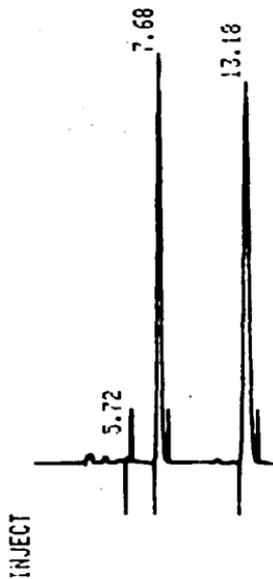
**PLACEBO DE PRINCIPIO ACTIVO A 70°C  
DURANTE 15 DÍAS SIN ESTÁNDAR INTERNO**



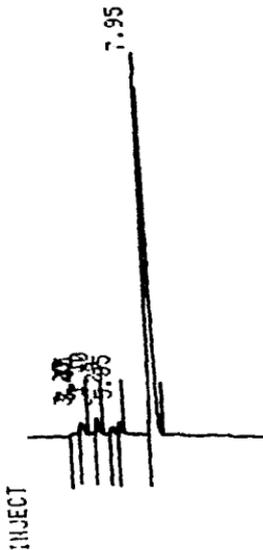
**PLACEBO DE PRINCIPIO ACTIVO A 40°C Y 80%  
DE HUMEDAD RELATIVA DURANTE 15 DÍAS SIN  
ESTÁNDAR INTERNO**



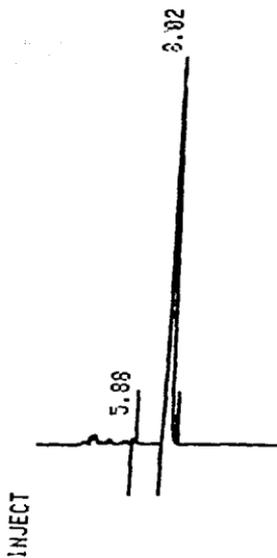
**PRODUCTO TERMINADO A TEMPERATURA  
AMBIENTE SIN ESTÁNDAR INTERNO**



**PRODUCTO TERMINADO A TEMPERATURA**  
**AMBIENTE CON ESTÁNDAR INTERNO**



**PRODUCTO TERMINADO A 70°C DURANTE 15**  
**DÍAS SIN ESTANDAR INTERNO**



**PRODUCTO TERMINADO A 40°C Y 80% DE HUMEDAD RELATIVA DURANTE 15 DÍAS SIN ESTÁNDAR INTERNO**

### **CONCLUSIÓN.**

Los cromatogramas obtenidos al realizar la serie de inyecciones demuestran que los resultados obtenidos durante el ensayo son debidos exclusivamente a la respuesta de las dos sustancias químicas que intervienen en este y que son : 1) El Principio Activo ( 2,2 - Diclora - N 1 (6S,6R) o Fluorometil) p Hidroxip (Metilsulfonil) Fenetil ( Acetamida ) y 2 ) El Estándar Interno ( Clparabeno )

Así mismo los resultados obtenidos de este parametro demuestran que no hay ninguna interferencia por parte de productos relacionados o de degradación generados debido a las condiciones a las cuales fueron sometidas las muestras, lo cual pudo haber ocasionado la obtencion de resultados falsos.

Este método por lo tanto, puede ser utilizado tanto en Control de Calidad como en estudios de Estabilidad.

Por lo tanto podemos considerar que este parametro

✓ cumple con los requisitos dentro de la validación de nuestro método analítico.

**PARÁMETRO: TOLERANCIA DEL MÉTODO.**

**PROCEDIMIENTO:** Preparar una solución de Etilparabeno ( estándar interno ) con una concentración de 0.2 mg/ml.

Pesar una muestra de aproximadamente 2.5 grs. de producto terminado y otra del mismo pero sometido a 70 °C durante 15 días para transferirlas cuantitativamente a matraces volumetricos de 50 ml. Adicionar una alícuota de 5 ml. de la solución de estándar interno preparada previamente a cada uno de ellos antes de llevar al aforo con Acetonitrilo ( CH<sub>3</sub>CN).

Realizar una serie de inyecciones de estas muestras variando las condiciones cromatográficas propuestas como óptimas previamente durante la etapa de desarrollo del método.

Estas variaciones son las siguientes:

- ✓ Proporción de los componentes de la fase móvil. ( +/- 5%)
- ✓ Velocidad de flujo de la fase móvil. ( +/-0.5 ml / min. )
- ✓ pH de la Fase Móvil. ( +/-0.5 )
- ✓ Variación del Número de platos teóricos de la columna.

De los resultados obtenidos, determinar el Factor resolución para los picos involucrados en la determinación cromatográfica.

- a) Entre el frente del solvente (S) y el pico del principio activo (E).
  - b) Entre el pico del principio activo (F) y el pico del estándar interno (I).
- A continuación se presentan los resultados que arroja esta prueba.

VARIABLE **Proporción de los componentes de la Fase Móvil**  
 CONDICIÓN **Temperatura Ambiente (T.A.)**

Proporción Cadena de Picos	Tiempo de Rotación (min)			FACTORES DE RENDIMIENTO (%)	
	S	E	I	S/E	F/I
1.9 : 1.1	5.03	6.15	9.72	1.60	7.14
2.0 : 1.0	5.48	7.62	13.55	3.06	8.47
2.1 : 0.9	7.14	10.32	21.46	4.54	11.14

VARIABLE **Proporción de los componentes de la Fase Móvil**  
 CONDICIÓN **70 Grados Centígrados**

Proporción Cadena de Picos	Tiempo de Rotación (min)			FACTORES DE RENDIMIENTO (%)	
	S	E	I	S/E	E/I
1.9 : 1.1	4.96	6.35	10.04	2.32	6.15
2.0 : 1.0	5.51	7.71	13.58	3.67	8.39
2.1 : 0.9	6.91	10.85	21.94	5.63	12.32

DONDE: S = PICO DE ALGUN EXCIPIENTE Y/O DEGRADACION.  
 E = PICO DEL ESTANDAR A CUANTIFICAR  
 I = PICO DEL ESTANDAR INTERNO

VARIABLE: **Numero de Platos Teóricos ( NPT )**  
 CONDICIÓN: **Temperatura Ambiente ( T.A. )**

NPT Cadena	Tiempo de Rotación ( min )			FACTORES DE CORRECCIÓN (FC)	
	S	E	I	S/E	E/I
4590 poco uso	5.48	7.62	13.55	3.06	8.47
3465 medio uso	4.88	6.88	11.27	3.33	7.32
2491 mucho uso	5.30	6.70	11.23	1.75	5.66

VARIABLE: **Numero de Platos Teóricos ( NPT )**  
 CONDICIÓN: **70 Grados Centígrados**

NPT Cadena	Tiempo de Rotación ( min )			FACTORES DE CORRECCIÓN (FC)	
	S	E	I	S/E	E/I
4590 poco uso	5.51	7.71	13.58	3.67	8.39
3465 medio uso	4.94	6.85	11.24	2.73	6.27
2491 mucho uso	5.15	6.80	11.15	2.36	6.21

DONDE: S = PICO DE ALGUN EXCIPIENTE Y/O DE GRADACION.  
 E = PICO DEL ESTANDAR A CUANTIFICAR  
 I = PICO DEL ESTANDAR INTERNO

VARIABLE **pH de la Fase Movil**  
 CONDICIÓN **Temperatura Ambiente ( T.A. )**

pH Fase Movil	Tiempos de Retención ( min )			VALORES DE RETENCIÓN (R)	
	S	E	I	S/E	E/I
3.9	5.38	7.33	12.14	2.79	6.87
4.4	5.48	7.62	13.55	3.06	8.47
4.9	5.51	7.60	13.26	2.99	9.43

VARIABLE **pH de la Fase Movil**  
 CONDICIÓN **70 Grados Centígrados**

pH Fase Movil	Tiempos de Retención ( min )			VALORES DE RETENCIÓN (R)	
	S	E	I	S/E	E/I
3.9	5.37	7.35	13.04	2.83	8.13
4.4	5.51	7.71	13.58	3.14	8.39
4.9	5.62	7.87	13.85	3.75	8.54

DONDE S = PICO DE ALGUN EXCIPIENTE Y/O DEGRADACION  
 E = PICO DEL ESTANDAR A CUANTIFICAR  
 I = PICO DEL ESTANDAR INTERNO

VARIABLE : **Flujo de la Fase Móvil**  
 CONDICIÓN : **Temperatura Ambiente ( T.A. )**

Flujo ( ml / min )	Tiempos de Retención ( min )			FACTORES DE RETENCIÓN (R)	
	S	E	I	S/E	E/I
0.5	8.42	15.92	28.61	4.17	7.46
1.0	5.48	7.62	13.55	3.06	8.47
1.5	3.55	4.80	8.27	2.08	4.96

VARIABLE : **Flujo de la Fase Móvil**  
 CONDICIÓN : **70 Grados Centígrados**

Flujo ( ml / min )	Tiempos de Retención ( min )			FACTORES DE RETENCIÓN (R)	
	S	E	I	S/E	E/I
0.5	11.50	16.25	28.37	4.75	9.32
1.0	5.51	7.71	13.58	3.67	8.39
1.5	3.60	4.92	8.53	3.30	7.22

DONDE : S = PICO DE ALGUN EXCIPIENTE Y/O DEGRADACION.  
 E = PICO DEL ESTANDAR A CUANTIFICAR  
 I = PICO DEL ESTANDAR INTERNO

**CRITERIO DE ACEPTACIÓN.**

Factor Resolución ( R ) mayor o igual a 1.5

lo que significa que la separación de los picos de interes en los cromatogramas es adecuada

**CONCLUSIÓN.**

Con los resultados obtenidos podemos concluir que nuestro método tiene una robustez o aceptación de posibles variaciones de:

5% para la proporción de los componentes de la Fase Móvil.

11.36 % en el valor de pH de la Fase Móvil.

50 % en el Flujo de la Fase Móvil.

2500 Platos Teóricos como mínimo en la Columna Cromatográfica.

## **CAPITULO 3**

### **CONCLUSIONES**

## **CAPITULO 3**

### **CONCLUSIONES**

De acuerdo a los resultados experimentales anteriormente obtenidos podemos concluir que el objetivo principal del presente trabajo se cumplió ya que se desarrollo y valido un metodo analitico para la cuantificación del principio activo 2,2 - Dicloro - N [ (α,βR) -α- Fluorometil] -β- Hidroxi -p- (Metilsulfonil) Feniletil ] Acetamida bajo criterios de aceptacion previamente establecidos.

Este método se desarrollo con los objetivos principales de ser utilizado tanto en estudios de estabilidad como para analisis cotidianos de control de calidad motivo por el cual se efectuo la prueba de especificidad que arrojó resultados que dejan ver que el metodo es especifico tanto para el Principio Activo en estudio como para la sustancia utilizada como Estándar Interno ya que ninguno de los cromatogramas de cada uno de ellos es afectado por la respuesta obtenida debido a la presencia del Solvente, Excipientes y de Productos de Degradación.

El Método presenta una Tolerancia en cuanto a los parametros cromatográficos que se requieren para que se lleve a cabo; pH en la Fase Movil (3.9 a 4.9), Proporción de los componentes de la Fase Móvil, Acetonitrilo CH<sub>3</sub>CN · Solución de Acetato de Sodio 0.01 M (28.33 a 38.33% y 61.67 a 71.67%) respectivamente y Flujo de la Fase Movil ( 0.5 a 1.5 ml/min ), lo cual minimiza de manera notable los posibles errores involuntarios del químico analista durante la preparación, así como las posibles variaciones del equipo al efectuar la mezcla de los componentes de la Fase Movil y en el caudal o Flujo que este proporciona durante el análisis, arrojando siempre resultados confiables.

Se pueden utilizar columnas con un minimo de 2500 platos teoricos evaluados con Etilparabeno y los resultados son tan confiables como con columnas nuevas de hasta 4500 platos teoricos. Esto repercute directamente en la compra de columnas ya que tenemos una mayor numero de analisis confiables por cada compra.

Los resultados que se obtienen son exactos y precisos lo cual representa para el método un alto grado de confiabilidad que es uno de los objetivos del Desarrollo de un Método Analítico.

Los resultados obtenidos al efectuar el ensayo diferentes días e incluso por diferentes analistas no mostraron diferencias estadísticas significativas como se observó en la prueba de reproducibilidad lo cual significa que cualquier analista puede llevar a cabo el ensayo variando también el día que se efectúa.

La metodología de preparación de las muestras, no presenta una problemática elevada en cuanto a complejidad y tiempo, lo cual es un aspecto importante ya que aunado a tiempos de corrida cromatográfica cortos nos dan por resultado una metodología con tiempos rápidos de análisis, lo cual sabemos es una de las principales prioridades cuando este método sea utilizado rutinariamente.

Las muestras que se encuentran listas para ser inyectadas en el equipo, preparadas a temperatura ambiente y refrigeración ( 0 a 5 °C ), demostraron ser estables por un periodo de hasta 3 días, lo cual es importante en el caso de imprevistos mecánicos, disponibilidad del cromatógrafo, fallas eléctricas, etc. ya que no se requiere volver a preparar las muestras para obtener resultados confiables.

El cromatógrafo de líquidos de alta resolución que se utilizó para llevar a cabo el presente trabajo, también demostró estar trabajando confiablemente en cuanto a las operaciones mismas que lleva a cabo ya que los parámetros de linealidad y precisión del sistema resultaron contundentes.

# **BIBLIOGRAFÍA**

- 1.-) Oscar A. Quattrocchi, Sara A. de Andrizzi y Raúl F. Laba. **Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica.** Ed. Artes Graficas Farro S.A. Buenos Aires, Argentina ( 1992 ).
- 2.-) R.W. Yost, L.S. Fttre and R.D. Conlon. **Practical Liquid Chromatography. An Introduction.** Ed. Perkin - Elmer ( 1980 ).
- 3.-) Johnny Guerra. **Validation of Analytical Methods by FDA Laboratories.** Pharmaceutical Technology. March ( 1986 ).
- 4.-) Mario J. Cardone. **Detection and Determination of Errors in Analytical Methodology.** J. Assoc. off Anal. Chem. Vol. 66 No. 5 ( 1983 ). pp. 1260-1263.
- 5.-) G. Szepesi, N. Gazdag and K. Mihalyfi. **Selection of High Performance Liquid Chromatographic Methods in Pharmaceutical Analysis.** Journal of Chromatography. 464 ( 1989 ). pp. 265-269.
- 6.-) Eugene I. Inman, Joseph K. Frischman and Pedro J. Jimenez. **General Method Validation Guidelines for Pharmaceutical Samples.** Journal of Chromatography Science. Vol. 25 ( Jun. 1987 ). pp. 252-256.
- 7.-) **Información Interna proporcionada por el Departamento de Desarrollo Analítico y Estabilidades del Laboratorio Schering Plough S.A. de C.V. (México Agosto 1994).**
- 8.-) **Waters - Millipore Associates Operator's Manual.** USA ( 1982 ).
- 9.-) Tesis. **María Concepción Reyes Alvarez. Desarrollo y Validación de un Método Analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para cuantificar Cloruro de Bencetonio en un Cosmético.** Facultad de Química. U.N.A.M. ( México 1991 ).
- 10.-) J.C. Miller and J.N. Miller. **Estadística para Química Analítica.** Ed. Addison - Wesley Iberoamericana. E.I.L.A. 1993.
- 11.-) **Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.** Secretaria de Salud. 6° Edición. México 1994.

- 12.-) **Guía de Procedimientos adecuados de Laboratorio Analítico. Monografía técnica No. 2 Comisión Interinstitucional de Practicas Adecuadas de Manufactura ( CIPAM ). México 1989.**
- 13.-) **Guía de Validación de Métodos Analíticos. Monografía Técnica. Comisión Interinstitucional de Practicas Adecuadas de Manufactura (CIPAM ). México 1989.**
- 14.-) **British Pharmacopoeia Vol. II. London 1993 : HMSO.**
- 15.-) **The United States Pharmacopoeia XXIII th and the National Formulary XVIII th. The United States Convention. USA 1995.**
- 16.-) **Leon Lachman, Herbert A. Lieberman and Joseph L. Kanig. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy. 3ª Edición. Ed. Lea and Febiger. USA 1986.**