

64
2er.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

"DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO
ANALITICO PARA CUANTIFICAR, POR
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA
RESOLUCION EN FASE INVERSA, PEFLOXACINO
PRESENTE EN UNA FORMA FARMACEUTICA
INYECTABLE".

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
MARIA EUFEMIA ROBLES LEON

ASESOR DE TESIS: O.F.B. JOSE ANTONIO GARDUÑO ROSAS.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

266376



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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 ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

" Desarrollo y validación de un método analítico para cuantificar, por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en fase inversa, Pefloxacino presente en una forma farmacéutica inyectable".

que presenta la pasante: María Eufemia Robles León
con número de cuenta: 9361331-4 para obtener el TITULO de:
:Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 17 de Junio de 1998

PRESIDENTE	<u>M. en C. Vicente Alonso Pérez</u>	
VOCAL	<u>Q.F.B. Elia Granados Enriquez</u>	
SECRETARIO	<u>Q.F.B. José A. Garduño Rosas</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Ma. Guadalupe Rebollar B.</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M. en C. Julio C. Botello Pozos</u>	

AGRADECIMIENTOS

En este sueño hecho realidad, doy gracias a ese amigo incondicional, quien desde el inicio de mi vida ha estado conmigo, dandome aliento y fuerza creadora.

"Eres único, Padre Celestial"

Por compartir su amplia experiencia y conocimientos para la realización de este trabajo, por su amistad, confianza, apoyo y ayuda brindada.

Gracias profesor: **José Antonio Garduño Rosas.**

A mis Padres que han hecho de mi lo que soy, Gracias por que me han llenado de amor y confianza, he podido alcanzar una más de mis metas el mérito es suyo.

Celestino y Minerva

Por apoyar mis ideas y proyectos, por escucharme y ayudarme y por que siempre hemos estado unidos y por que me haz enseñado que se debe tener valor y determinación para llegar a una meta. Mi hermano:

Jose Robles L.

Por tener siempre una palabra de aliento y motivación, por estar junto a mi siempre y por ser parte fundamental de mi vida.

Seguiremos adelante.

Miguel Angel Reyes Caballero.

A la Dra. **Raquel López Arellano**, que siempre me ha dado muestras de confianza y apoyo.

Gracias por tu amistad que ha continuado a través del tiempo y por todo lo que hemos compartido juntas durante la carrera y el trabajo, eres una gran compañera y amiga:
Angelica García M.

A I.M. Bruluart S.A. y en especial al departamento de Desarrollo y Validación de métodos analíticos por el apoyo y facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

Gracias: **QFB. Martha I. Romero M., Agustín Padilla R., Raúl, Tony, Edgar y Angelica G.**

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y sus profesores, por estar siempre abiertos a la enseñanza y formación y porque han hecho de mi un profesionalista.

DEDICATORIAS

Quiero expresarte mi eterna gratitud por que haz cultivado mi vida y tus consejos han sido determinantes en mis decisiones , quiero que estes orgullosa de mi.

No haz luchado en vano.
Mi madre: **Minerva León V.**

Por que gracias a tu amor, apoyo y comprensión, todo ha sido más fácil, te dedico este trabajo, a ti mi gran amor: **Miguel Angel Reyes Caballero.**

A las familias: **Reyes Caballero y Cárdenas Escobedo**, por su cariño y confianza que me tienen.

A mis amigas: **Meche, Anel y Erika**, las quiero mucho, se que siempre confiaron en mi, gracias por su amistad,

A mis amigos con los que he compartido gratos momentos:

Angélica García, Claudia Ibañez, Arcelia Medina, Ofelia González, Adriana Zamacona, Alberto Jiménez, Alejandra Mena, Inés Cabañas, Sara Isidro, Mireya Mendoza.

ÍNDICE

ÍNDICE

I.	OBJETIVOS GENERALES	1
II.	OBJETIVOS ESPECIFICOS	2
III.	MARCO TEORICO	
1.	INTRODUCCION	3
1.1	DESARROLLO DE MÉTODOS	3
1.2	CROMATOGRAFÍA	9
1.3	EQUIPO CROMATOGRÁFICO	12
1.4	CROMATOGRAFÍA EN FASE REVERSA	17
1.5	CARACTERÍSTICAS DE LOS PICOS CROMATOGRÁFICOS	12
1.6	VALIDACION DE MÉTODOS ANALÍTICOS	23
2.	GENERALIDADES	27
2.1	PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS	27
2.1.1	NOMENCLATURA	27
2.1.2	PESO MOLECULAR	27
2.1.3	ESTRUCTURA	27
2.1.4	ASPECTO	27
2.1.5	TEMPERATURA DE FUSIÓN	28
2.1.6	SOLUBILIDAD	28
2.1.7	CONSTANTE DE DISOCIACIÓN	28
2.1.8	ESPECTRO ULTRAVIOLETA	28

2.2	FARMACOLOGIA	29
2.3	FARMACOCINÉTICA	33
2.4	INDICACIONES TERAPÉUTICAS	35
2.5	CONTRAINDICACIONES	35
2.6	PRECAUCIONES	35
2.7	REACCIONES SECUNDARIAS	36
2.8	INTERACCIONES FARMACOLÓGICAS	36
2.9	POSOLOGÍA	36
2.10	ADMINISTRACIÓN Y DOSIS	37
2.11	PREPARADOS FARMACÉUTICOS	37

IV. DESARROLLO DEL MÉTODO

1.	SELECCIÓN DE LA COLUMNA	41
2.	SELECCIÓN DE LA FASE MOVIL	41
3.	SELECCIÓN DEL DETECTOR	43
4.	PREPARACION DE LA MUESTRA	44
5.	OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES	44
6.	TERMINO DEL MÉTODO	46
7.	DESCRIPCION DE LA METODOLOGIA A VALIDAR	48

V. VALIDACION DEL MÉTODO

➤	PLAN DE VALIDACIÓN	49
1.	EQUIPO	50
2.	MATERIAL	50
3.	REACTIVOS	50
4.	CALIFICACION DEL EQUIPO CROMATOGRAFICO	51
5.	CALIFICACION DE LA COLUMNA CROMATOGRAFICA	52
6.	PARAMETROS A EVALUAR EN LA VALIDACION	52
6.1	LINEALIDAD DEL SISTEMA	52
6.2	PRECISIÓN DEL SISTEMA	52

6.3	PRECISIÓN DEL MÉTODO	53
▪	REPETIBILIDAD	53
▪	REPRODUCIBILIDAD ENTRE DÍAS	53
▪	REPRODUCIBILIDAD ENTRE ANALISTAS	53
6.4	EXACTITUD DEL MÉTODO	53
6.5	ESPECIFICIDAD	53
6.6	ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	54
VI.	RESULTADOS	
▪	LINEALIDAD DEL SISTEMA	55
▪	PRECISIÓN DEL SISTEMA	59
▪	LINEALIDAD DEL MÉTODO	60
▪	PRECISIÓN DEL MÉTODO	65
➤	REPETIBILIDAD	
➤	REPRODUCIBILIDAD ENTRE DÍAS	
➤	REPRODUCIBILIDAD ENTRE ANALISTAS	
▪	EXACTITUD DEL MÉTODO al 80%	67
▪	EXACTITUD DEL MÉTODO al 100%	68
▪	EXACTITUD DEL MÉTODO al 120%	69
▪	ESPECIFICIDAD	70
▪	ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA	71
VII.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	72
VIII.	CRÍTERIOS DE ACEPTACIÓN	76
IX.	CONCLUSIONES	79
X.	BIBLIOGRAFIA	80
•	ANEXO I	84
•	ANEXO II	92
•	ANEXO III	101

INDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Especificaciones de un sistema cromatográfico para el desarrollo de un método.
- Tabla 2. Comparación de la cromatografía moderna y tradicional.
- Tabla 3. Quimioantibióticos. Subgrupos de las quinolonas.
- Tabla 4. Preparados farmacéuticos de Pefloxacino.
- Tabla 5. Condiciones cromatográficas para cuantificar Pefloxacino, de acuerdo a algunas referencias bibliográficas.
- Tabla 6. Ensayo de solubilidad del Mesilato de Pefloxacino en diferentes solventes.
- Tabla 7. Adsorbentes más comunes y sistemas de preparación.
- Tabla 8. Condiciones cromatográficas ensayadas experimentalmente.
- Tabla 9. Comparación de las características de los picos cromatográficos.
- Tabla 10. Ensayo de repetibilidad de la respuesta analítica.
- Tabla 11. Preparación de muestras para la determinación de la linealidad del sistema de Pefloxacino.
- Tabla 12. Respuestas analíticas para la determinación de la linealidad del sistema de Pefloxacino.
- Tabla 13. Análisis de varianza para la evaluación de la linealidad del sistema de Pefloxacino.
- Tabla 14. Modelos matemáticos obtenidos de la linealidad del sistema de Pefloxacino.
- Tabla 15. Análisis de regresión de la linealidad del sistema de Pefloxacino.
- Tabla 16. Respuestas analíticas para la determinación de la precisión del sistema.
- Tabla 17. Preparación de muestras para la determinación de la linealidad del método de Pefloxacino.
- Tabla 18. Resultados analíticos para la determinación de la linealidad del método de Pefloxacino.

- Tabla 19. Análisis de varianza para la evaluación de la linealidad del método de Pefloxacino.
- Tabla 20. Modelos matemáticos obtenidos de la linealidad del método de Pefloxacino.
- Tabla 21. Análisis de regresión de la linealidad del método de Pefloxacino.
- Tabla 22. Análisis estadístico para la evaluación de la reproducibilidad del método.
- Tabla 23. Análisis de varianza para la evaluación de la reproducibilidad del método.
- Tabla 24. Resultados obtenidos de la exactitud del método al 80%.
- Tabla 25. Análisis estadísticos de la exactitud del método al 80%.
- Tabla 26. Resultados obtenidos de la exactitud del método al 100%.
- Tabla 27. Análisis estadísticos de la exactitud del método al 100%.
- Tabla 28. Resultados obtenidos de la exactitud del método al 120%.
- Tabla 29. Análisis estadísticos de la exactitud del método al 120%.
- Tabla 30. Condiciones utilizadas para propiciar la degradación de Pefloxacino.
- Tabla 31. Resultados observados al evaluar la tolerancia del método.
- Tabla 32. Resultados observados al evaluar la estabilidad de la muestra analítica.

INDICE DE GRAFICOS

- Gráfico 1. Linealidad del sistema de Pefloxacino.
- Gráfico 2. Linealidad del método de Pefloxacino Inyectable.

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Equipo Cromatográfico Hewlett Packard Asterix 1100.
- Figura 2. Sistema de detección de arreglo de diodos.
- Figura 3. Mecanismo de separación en una columna cromatográfica.
- Figura 4. Migración diferencial en cromatografía de líquidos.
- Figura 5. Características de los picos cromatográficos.
- Figura 6. Guía para seleccionar columnas cromatográficas.
- Figura 7. Topograma del estándar de Pefloxacino, asociado a los tres ejes: minutos, nanómetros y unidades de absorbancia.
- Figura 8. Cromatograma de una muestra de Pefloxacino inyectable, empleando las condiciones experimentales I.
- Figura 9. Cromatograma de una muestra de Pefloxacino inyectable, empleando las condiciones experimentales II.
- Figura 10. Cromatograma de una muestra de Pefloxacino inyectable, empleando las condiciones experimentales III.
- Figura 11. Cromatograma de una muestra de Pefloxacino inyectable, empleando las condiciones experimentales IV.
- Figura 12. Cromatograma de una muestra de Pefloxacino inyectable, tratada con H_2O_2 , empleando las condiciones experimentales IV.
- Figura 13. Isograma correspondiente a una muestra de Pefloxacino inyectable.
- Figura 14. Análisis de pureza del pico correspondiente a una solución del estándar de Pefloxacino, utilizando todos los espectros, se observa que el factor de pureza es de 990, por lo que esta dentro del límite (1000) permitido.

OBJETIVOS

I. OBJETIVOS GENERALES:

- 1.1 **Desarrollar un método analítico, por cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, para cuantificar pefloxacino en una forma farmacéutica inyectable.**

- 1.2 **Validar el método analítico, de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, desarrollado para determinar Pefloxacino en una forma farmacéutica inyectable.**

II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1 Desarrollar el método analítico para cuantificar pefloxacino en la muestra inyectable.

2.1.1 Establecer una secuencia basada en el método científico para desarrollar un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, para cuantificar Pefloxacino.

2.1.2 Facilitar el desarrollo de una metodología analítica, obteniendo resultados rápidos y precisos.

2.2 Validar y determinar las siguientes características:

- Linealidad del Sistema.
- Linealidad del Método.
- Precisión del Sistema.
- Precisión del Método:
 - Repetibilidad.
 - Reproducibilidad entre días.
 - Reproducibilidad entre analistas.
- Exactitud del Método.
- Especificidad.
- Estabilidad de la muestra analítica.

III

**MARCO
TEORICO**

1. INTRODUCCION^(24, 26)

1.1 DESARROLLO DE METODOS.

El desarrollo de un método analítico consiste en determinar, de acuerdo a las propiedades físicas y químicas del analito, las condiciones adecuadas para analizar cualitativa y/o cuantitativamente una muestra.

El análisis cualitativo se refiere a la identificación de un compuesto, según la respuesta obtenida mediante la aplicación de un método y puede recurrirse a otro alternativo para corroborar dicha identificación (Espectrometría de masas, Calorimetría, Infrarojo, Resonancia Magnética Nuclear, Análisis elemental, Reacciones de color \Rightarrow grupos funcionales, Ultravioleta, polarografía, Espectrofotometría).

El análisis cuantitativo, que se refiere a la determinación de la cantidad de analito presente en una muestra, es de gran utilidad y de mayor aplicación.

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) es de gran importancia y su uso para análisis cuantitativo ha ido en aumento. En el desarrollo de métodos de este tipo es importante evaluar los siguientes parámetros: resolución, velocidad, presión, simetría de picos, tiempo de separación, gasto de solventes y alcance del método.

El aumento en la resolución de un sistema cromatográfico está en función de la eficiencia de la columna; esto es el número de platos teóricos o la selectividad de la fase.

La mejora en la velocidad se logra empleando tamaño de partículas muy pequeños y columnas cortas a una velocidad de flujo de la fase móvil alta.

El alcance de un método cromatográfico es la capacidad del sistema para separar mezclas de un intervalo de polaridad amplio y la carga esta relacionada con el diámetro de una columna (presión) y marca la diferencia entre una columna preparativa o analítica.

Cuando se presenta un problema analítico en el que se involucra la separación de los componentes de una mezcla o bien al iniciarse el desarrollo de una metodología, surge una pregunta muy frecuente: Por donde empiezo?

Es necesario entonces considerar la secuencia que se sigue para desarrollar un método por CLAR, la cual está dada por etapas:

1. Información sobre la muestra:

Efectuar una revisión bibliográfica acerca de la composición de la muestra y sus propiedades, tales como:

- Número de compuestos presentes.
- Estructuras químicas (grupos funcionales presentes).
- Pesos moleculares de los componentes o del analito.
- Valores de pKa de los compuestos.
- Espectros de UV de los componentes.
- Naturaleza de la matriz de la muestra: excipientes, solventes, lubricantes, grasas, etc.
- Intervalo de concentración de los compuestos de interés en la muestra.
- Solubilidad de la muestra o de los componentes.

2. Definir el objetivo del método.

Establecer claramente para que se necesita el método.

Esto evitará el trabajo improductivo, así como el consumo de recursos y tiempo, para definir los objetivos, son útiles las siguientes cuestiones:

- ¿El objetivo primario es el análisis o el recobro de fracciones de la muestra?
- ¿Es necesario separar todos los componentes?
- ¿Qué precisión se requiere si es un análisis cuantitativo?
- ¿Para que tipo de muestra se va a desarrollar el método?
- ¿El método va a ser utilizado para un número grande de muestras o sólo para unas cuantas?
- ¿Con qué recursos cuenta el laboratorio para desarrollar el método?

3. Naturaleza de la muestra, necesidad de pretratamiento.

Definir la forma de la muestra:

- Solución lista para inyectar.
- Solución que requiere dilución, amortiguamiento u otro "aditivo".
- Sólidos solubles en la fase móvil.
- Soluciones que contienen contaminantes o alguna interferencia, que deban eliminarse.
- Analito en una matriz insoluble.

Determinar el pretratamiento a realizar.

La mayoría de las muestras a tratar por CLAR, requieren de pesarse y diluirse volumétricamente antes de inyectarse, para lo cual debe tenerse el cuidado de aproximar el diluyente final a la fase móvil.

Algunas otras que contienen impurezas o contaminantes deben tratarse previamente, con una extracción, uso de cartuchos, filtración, centrifugación, etc.

4. Selección del detector.

Elegir el detector adecuado para el tipo de muestra que se vaya a analizar. Lo ideal es que el detector sea específico únicamente para la sustancia de interés y que no responda a ningún otro componente, esto es una alta sensibilidad y un mínimo límite de detección. Por lo que de acuerdo a las características de la muestra, propiedades del analito y finalidad del método, puede elegirse cualesquiera de los métodos de detección existentes:

- Ultravioleta/Visible.
- Índice de refracción.
- Fluorescencia.
- Electroquímico.
- Derivatización pre- o post- columna.

5. Selección del método de CLAR.

Evaluar las mejores condiciones de separación.

Para realizar la elección de las condiciones iniciales, deben contemplarse las siguientes características de cada variable:

Columna:	Longitud, Tamaño de partícula, tipo de empaque.
Fase móvil:	Proporción de solventes, buffer-concentración, pH, aditivos (reactivos, par iónico, aminas, etc.), velocidad de flujo, modificadores.
Muestra:	Tamaño, volumen y masa, según la longitud de la columna y tamaño de partícula.
Temperatura.	Si se requiere de ella se hace uso del termostato integrado al equipo.

Establecer las condiciones cromatográficas (corrida preliminar).

Obtener un cromatograma utilizando las condiciones teóricas, que proporcione una idea de la resolución de la muestra en esta primera corrida, para evaluar dicho cromatograma es importante determinar:

- Resolución.
- Tiempo de separación.
- Cuantificación (C.V.).
- Presión.
- Altura de pico.
- Consumo de solvente.

6. Optimización de las condiciones de separación.

Si el cromatograma obtenido de una corrida preliminar no se ajusta a las especificaciones de la tabla 1, realizar los ajustes necesarios.

CARACTERISTICA	ESPECIFICACION
Resolución	El análisis cuantitativo preciso y robusto, requiere $R_s \geq 1.5$
Tiempo de separación	< 5- 10 minutos para métodos empleados de rutina.
Cuantificación	< 2% para ensayos, 5% para trazas.
Presión	< 150 bar es deseable, <200 es adecuado.
Altura de pico	Picos estrechos, para tener una relación señal/ruido adecuada.
Consumo de solvente	Consumo mínimo de fase móvil (vel. flujo baja).

Tabla 1. Especificaciones de un sistema cromatográfico para el desarrollo de un método.

7. Verificación de los problemas.

Evaluar mediante la obtención de otros cromatogramas, si existen problemas en la metodología, o si el cromatograma obtenido presenta picos más anchos con respecto al inicial, o si suscita coileo de picos.

Determinar la robustez del método empleando otra columna con las mismas características.

Evaluar si la fase móvil pudiera afectar la columna, provocando una disminución en la vida media de ésta.

Estudiar las variables (temperatura, composición de la fase móvil, resolución, tiempos de retención, etc.) y su efecto sobre la separación.

Es importante anticiparse a los problemas antes de liberar el método, por lo que debe verificarse la tolerancia de dicho método, para que pueda resistir los cambios inherentes al cambio de columna, de solventes y aún de analistas.

8. Término del método.

Determinar si el procedimiento final satisface los objetivos establecidos al inicio del desarrollo del método.

Mostrar las evidencias del comportamiento del método.

Validar el método desarrollado utilizando muestras que cubran el intervalo de concentración del analito.

Presentar en forma escrita el método desarrollado, para ser utilizado por otros analistas.

1.2 CROMATOGRAFIA.

Según la IUPAC la cromatografía se define como "un método usado primariamente para la separación de los componentes de una muestra en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras que la otra se mueve". La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La fase estacionaria puede estar extendida como una capa o distribuida y la fase móvil puede ser líquida o gaseosa. Pero esta definición es muy general y presenta algunas restricciones, otra definición que es también muy general pero que deja abierta la mente a diversos cambios que sobre esta se vienen dando es la de Guiddings : Un método de migración en zonas.

Otra definición es, que es un método físico de separación y cuantificación, en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de ellas es un lecho estacionario, mientras que la otra se mueve por percolación a través de este lecho, la separación se da como resultado de repetidas adsorciones y desorciones de los componentes a lo largo del lecho estacionario alcanzandose la separación gracias a las diferencias en los coeficientes d distribución de los distintos componentes de la muestra.

La cromatografía se clasifica en diversas modalidades en función de algunos parámetros como son:

Naturaleza de la fase móvil :

Cromatografía líquida
Cromatografía gaseosa

Naturaleza de la fase estacionaria :

Fase estacionaria	Fase móvil	Tipo de Cromatografía
Sólida	Líquida	Sólido-Líquido
Líquida	Líquida	Líquido-Líquido
Sólida	Gas	Sólido-Gas
Líquida	Gas	Líquido-Gas

Fenómeno que ocurre dentro de la columna :

Fase Normal
Fase reversa
Intercambio iónico
Exclusión molecular (Permeación por geles y filtración por geles).

Cantidad de muestra aplicada :

Tipo de Cromatografía	Cantidad de muestra
Analítica	Picogramos - microgramos
Semipreparativa	Microgramos - gramos
Preparativa	Mayores al gramo

Por otra parte la cromatografía líquida se clasifica de la siguiente forma:

- Cromatografía líquido - sólido (Adsorción).
- Cromatografía Líquido – líquido (Partición).
- Cromatografía de Fase ligada
- Cromatografía de Intercambio iónico
- Cromatografía de exclusión por tamaño.

Por cromatografía pueden realizarse separaciones de componentes presentes en muestras complejas que por cualquier otro método sería imposible realizar y se ha hecho indispensable a tal grado que forma parte de los análisis de rutina en la industria y la investigación.

CLAR MODERNA VS. TRADICIONAL.

MODERNA	TRADICIONAL
Columnas pueden utilizarse repetidas veces.	Columna se desecha una vez que ha sido utilizada.
Consume poco tiempo	Consume mucho tiempo
Detección y cuantificación automatizada	Detección y cuantificación manual
Alta reproducibilidad de los resultados	Baja reproducibilidad de resultados

Tabla 2. Comparación de la cromatografía moderna y tradicional.

La cromatografía de líquidos en sus inicios consistía en tubos abiertos, que se rellenaban de diversos materiales y la fase móvil discurría por gravedad a lo largo de la columna, usando el relleno una sola vez y se desechaba. Los componentes separados debían extraerse por fracciones de la columna y analizarse por separado, el resultado finalmente eran separaciones demasiado lentas, poco reproducibles y con mucho error.

Actualmente, está basada en el desarrollo de diversos accesorios como son equipo, columnas y empaques, que permiten que una misma columna pueda ser utilizada un gran número de veces y que sea más rápida; se ha logrado también la automatización de la detección y de la cuantificación, además, la reproducibilidad es alta y la detección es inmediata, excepto en algunos casos en los cuales se requiere algún tratamiento a la sustancia de interés, como puede ser una prederivatización o bien una postderivatización.

La derivatización se refiere a la reacción química que se produce entre la sustancia de interés y un reactivo determinado, ya sea dentro o fuera del equipo cromatográfico.

Si se efectúa antes de inyectar la muestra en el cromatógrafo, la derivatización se denomina pre-columna y los derivados ya formados se separan en la columna, también puede realizarse después de inyectar la muestra en donde se denomina post-columna, que se realiza separando el analito en la columna y luego mezclando el eluyente de la columna con un reactivo en la misma línea del cromatógrafo antes de efectuarse la detección, para elegir que tipo de derivatización utilizar debe considerarse la velocidad de la reacción y compatibilidad de los reactivos con la fase móvil empleada.

1.3 EQUIPO CROMATOGRAFICO

Los equipo de CLAR pueden clasificarse en integrados y modulares. En los equipos modulares cada una de sus partes están reunidas en un solo gabinete, mientras que en los segundos los módulos son instrumentos individuales que permiten visualizar cada uno de los componentes, de esta manera se puede controlar mejor el equipo.

Un equipo cromatográfico está constituido por :

- * Reservorios de fase móvil
- * Bomba
- * Termostato para la Columna
- * Integrador ó computadora personal
- * Degasificador (opcional)
- * Automuestreador o Inyector
- * Detector

Aunque no todos los equipos cromatográficos deben tener estos componentes uno de tipo modular si, como lo muestra la Figura 1, a la cual se hace referencia para explicar cada uno de sus módulos:

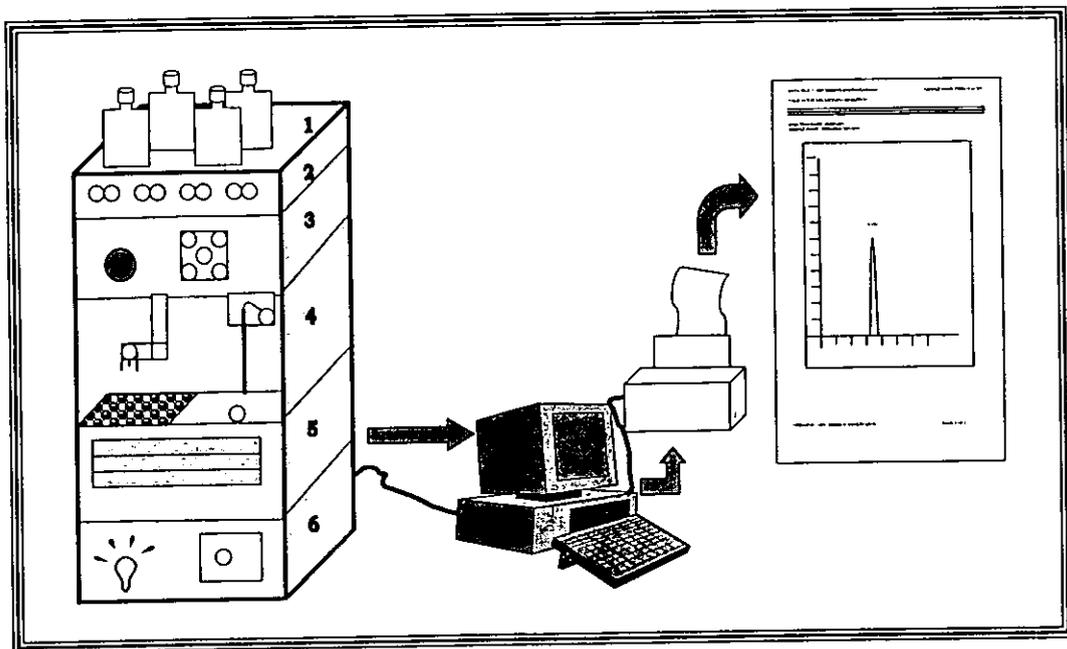


Figura 1. Equipo cromatográfico Hewlett Packard Asterix 1100.

1. Reservorios de la fase móvil :

Es el recipiente que contiene la fase móvil, que se ubica en un sitio externo, algunos centímetros sobre el nivel de la bomba, para que la fuerza de gravedad dirija el solvente hacia ésta, manteniendo así llenas las conexiones. Puede emplearse como reservorio de fase móvil un frasco de vidrio o polímero resistente y que sea inerte, con una tapa adecuada para impedir que las partículas ambientales interfieran en el sistema.

2. Degasificador :

Es el modulo en el cual se detectan y eliminan las posibles burbujas de aire que pudiera haber en las tuberías, para impedir que estas pasen a la bomba y así evitar problemas de estabilización del sistema.

3. Bomba :

Es la encargada de impulsar la fase móvil proveniente del reservorio hasta el inyector y desde allí hasta la columna, el ritmo de trabajo es variable y esta en función del flujo que se haya elegido para trabajar, generalmente las bombas empleadas son de pistón, aunque también las hay de flujo continuo. La bomba puede ser de tipo binaria, ternaria y cuaternaria, además realiza mezclas de solventes, lo cual hace que la fase móvil sea enviada con mayor exactitud.

4. Inyector automático :

Es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el flujo del solvente a través del sistema, su mecanismo esta basado en una válvula que orienta el caudal hacia la columna, esta constituido por un cuerpo fijo, un rotor con sello que gira, la válvula de inyección y un mecanismo que permite el llenado de la válvula y un porta muestras.

5. Porta columna (Con termostato).

Es el modulo en el cual se adapta la columna, esta considerado como un modulo ya que posee un mecanismo que permite controlar la temperatura de trabajo, de esta forma se garantiza que el solvente que este pasando lo haga a una temperatura determinada. Es de gran importancia este modulo cuando se tienen muestras que son retenidas por la fase estacionaria por mucho tiempo, un incremento en la temperatura disminuye este tiempo, haciendo más corto el tiempo de salida de la muestra de la columna.

6. Detector :

Es la parte del equipo cromatográfico que permite "ver" y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente en una muestra a la salida de la columna cromatográfica.

Los detectores pueden ser generales, los cuales miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene el analito en comparación con la misma fase móvil pura, y selectivos , los cuales son sensibles a alguna propiedad del soluto, por ejemplo un detector de UV, que producirá una señal proporcional a la absorbancia del soluto a una longitud de onda determinada.

El detector de UV es el más empleado en CLAR, posee una buena sensibilidad y un rango lineal que permite detectar los analitos hasta en nanogramos, son poco sensibles a los cambios de temperatura y de flujo de trabajo, opera en el rango de 190-350 nm, en algunos equipos puede extenderse hasta 350-700 (visible), existen de dos tipos : de longitud de onda fija y longitud de onda variable.

Entre los últimos adelantos en detectores se encuentra el de ordenamiento de fotodiodos, (Figura 2) en los cuales se emplea un sistema óptico invertido, en el cual la celda se ilumina con luz "blanca" (no monocromada) y la luz emergente de la celda llega a la red de difracción y allí es dispersada hacia el elemento fotosensible, en lugar de una fotocélula se emplea un conjunto de ellas o fotodiodos montados en un chip de silicio, así es posible medir no solo la luz transmitida a una longitud de onda, sino todo el espectro de absorción en tiempo real.

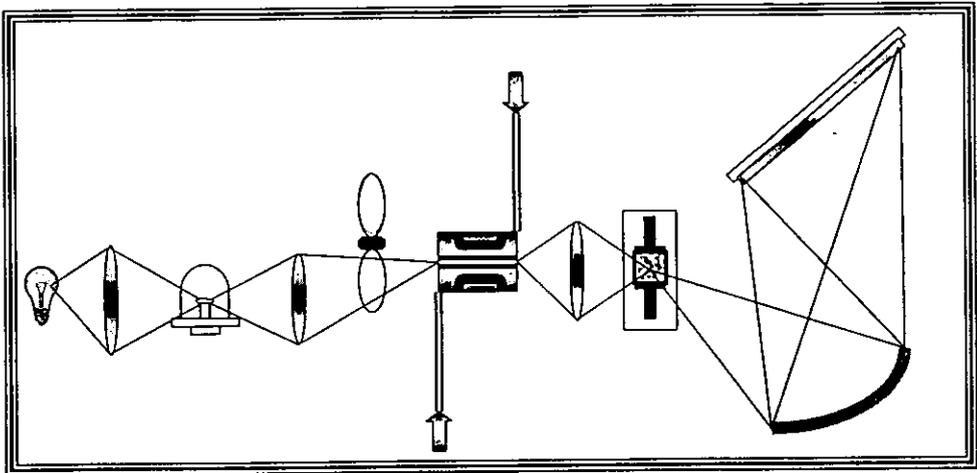


Figura No. 2 : Sistema de detección con arreglo de diodos.

Y por último para poder controlar y procesar toda la información es necesario la presencia de una computadora con un software adecuado.

1.4 CROMATOGRAFIA EN FASE REVERSA⁽²⁶⁾

Un factor de separación clave en la cromatografía líquida es la silicagel, que es un material fuertemente higroscópico, pero dadas sus características acarrea muchos problemas, si se emplea como tal (taponamiento de los poros, control de la polaridad de la fase móvil), por lo que es necesario emplear otro tipo de material en el cual la reactividad de los grupos activos en términos cromatográficos no sea tan intensa y el contenido de agua no sea tan controlable, esto se logró empleando la sílica gel unida a un grupo funcional por unión covalente de tipo siloxano.

Las uniones del grupo funcional a la sílica gel pueden ser de 4 tipos:

1. Tipo éster
2. Tipo amino
3. Tipo Carbono
4. Tipo siloxano

Y con ello se lograron grandes ventajas como son:

- Compuestos iónicos, no iónicos y ionizables, pueden ser separados en la misma columna y con la misma fase móvil.
- La fuerza de atracción superficial no polar-soluto es débil.
- La adsorción es reversible
- La fase móvil predominante es agua.
- El modificador orgánico es metanol (disminuye costos)
- El orden de elución es predecible, de acuerdo a la hidrofobicidad del analito.
- Se requiere poco tiempo para equilibrar el sistema.

La fase móvil arrastra las moléculas a través del lecho de la fase estacionaria. Durante su recorrido las moléculas de la muestra son retenidas por la fase estacionaria en función de la interacción entre los componentes de la muestra y la fase estacionaria y móvil, esta interacción es selectiva.

El mecanismo de separación puede ser descrito de la siguiente forma:

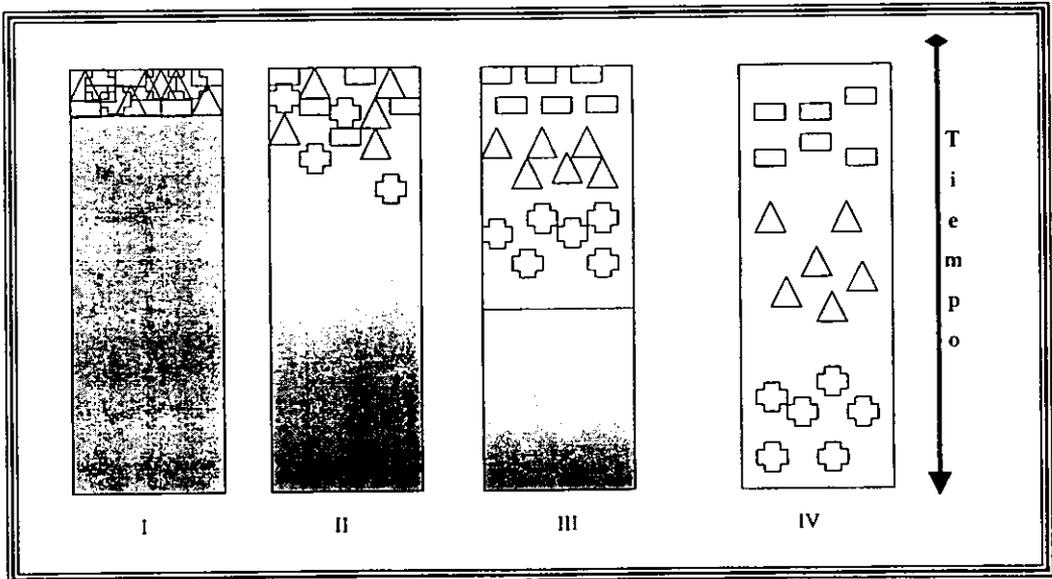
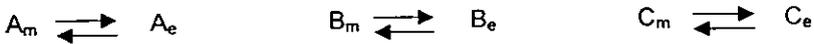


Figura 3. Mecanismo de separación en una columna cromatográfica

- I. Aplicación de la muestra (Previo acondicionamiento de la columna y tratamiento de la muestra).
- II. Paso de la fase móvil (solventes) a través de la columna arrastrando la muestra (se inicia la separación de los componentes).
- III. Migración y separación de los componentes que se incrementa conforme la fase móvil ha recorrido una mayor distancia.
- IV. Los componentes se han separado completamente en forma de bandas a lo largo de la columna. (Figura 3)

Cuando la muestra y la fase móvil son forzados a atravesar la fase estacionaria, se propician diversos tipos de interacción entre cada uno de estos componentes, tales como interacciones hidrofóbicas, dipolares, electrostáticas y puentes de hidrógeno, son las responsables de la mayor o menor afinidad de cada uno de los componentes por la fase móvil o estacionaria. Así el componente más afín a la fase estacionaria se retiene más y tarda más en eluir y el componente más afín a la fase móvil, se retiene menos y tarda menos en eluir, por lo que se establece un equilibrio que involucra la fracción de cada especie disuelta por cada fase en equilibrio. (Ver figura 4), a este fenómeno se le denomina migración diferencial (paso III).

Por ejemplo para A, B y C:



Donde se representa "m" como la fracción disuelta en la fase móvil y con "e" disuelta en la fase estacionaria. Las características químicas de las especies A,B y C pueden ser de acuerdo a las moléculas de solvente y a los grupos funcionales de la fase estacionaria, diferentes como para ser atraídas con distintas fuerzas por esta última.

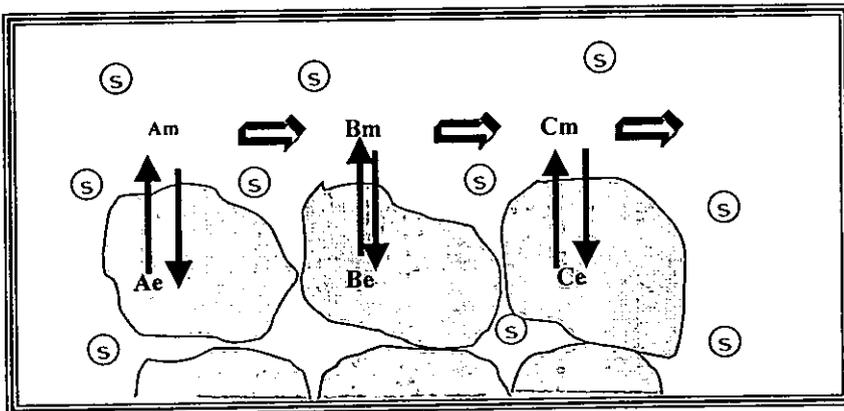


Figura 4. Migración diferencial en cromatografía líquido-sólido.

De acuerdo a la figura 4, las moléculas de C viajan a mayor velocidad que las de B y esta a mayor velocidad de las de A.

Para que A eluya de la columna es necesario que un determinado volumen de fase móvil (eluyente) llamado volumen de elución, atraviese la columna. Por lo que el volumen de elución es diferente y creciente para C, B y A, pero si se trabaja a un volumen constante el volumen de elución de cada especie será proporcional a un tiempo conocido como tiempo de retención.

1.5 CARACTERISTICAS DE LOS PICOS CROMATOGRAFICOS

El pico cromatográfico tiene la forma de una curva de distribución normal, la cual se caracteriza por su desviación estándar (σ), por lo que la anchura del pico puede expresarse como un múltiplo de la desviación estándar.

Si se trazan una tangentes a cada lado del pico y se extienden hasta tocar la línea base es posible obtener la anchura del pico, esta anchura puede medirse también al 50% de la altura total (Ver figura 5).

Algunas otras características que pueden evaluarse en un pico cromatográfico y que son indicadoras a su vez de las características de la columna y del método an lítico son:

Factor de capacidad (K)

Es el cociente entre el número de moles de soluto en la fase estacionaria y el número de moles del soluto en la fase móvil y está relacionado con el coeficiente de distribución entre ambas fases.

$$K = \frac{\text{No. de moles del soluto en la fase estacionaria}}{\text{No. de moles del soluto en la fase móvil}}$$

Puede demostrarse que K es proporcional al tiempo de retención del soluto y se calcula para el pico enésimo como:

$$K = \frac{(T_n - T_o)}{T_o}$$

Donde: T_n = Tiempo de retención del enésimo pico.
 T_o = Tiempo de la primera respuesta evidente del cromatograma.

Factor de separación (α),

Es el cociente entre los factores de capacidad de un par de picos, si no existe separación, es igual a la unidad y su valor aumenta cuando aumenta la separación se calcula como:

$$\alpha = (K'2/K'1)$$

Resolución (Rs).

Es la expresión cuantitativa de la calidad de la separación, esta expresión se calcula para un par de picos adyacentes como:

$$R = \frac{(T_2 - T_1)}{1/2 (W_2 + W_1)}$$

Donde :

T_1 y T_2 son los tiempos de retención de los picos 1 y 2

W_1 y W_2 son los anchos de los picos medidos desde su base.

Platos teoricos (N)

El concepto de plato teórico fue desarrollado en 1941 por Martin y Syngle, para la cromatografía de partición líquido - líquido, para explicar el fenómeno separativo, compararon el método con un proceso de distribución en contracorriente, donde la extracción de las fases se repite varias veces en forma encadenada. Sin embargo la diferencia fundamental reside en que en la cromatografía el proceso es continuo, pero la columna podía dividirse en cortes o rodajas imaginarias donde se conseguía un equilibrio transitorio, antes que la fase móvil avance hacia el siguiente, cada corte se llama plato y su espesor es la altura equivalente del plato teórico.

La eficiencia de una columna cromatográfica y por tanto su poder separativo se mide en función de su número de platos teóricos y puede calcularse en función del ancho del pico, de la siguiente manera:

$$N = 16 \left(\frac{T_n}{W_{TAN}} \right)^2$$

Donde: T_n = Tiempo de retención del pico enésimo
 W_{TAN} = Ancho del pico medido sobre la línea base.

Asimetría de picos (As).

La Asimetría (Tailing) es una de las formas más comunes de alejamiento de la curva Gaussiana y su medición es importante puesto que puede llevar, de acuerdo a su magnitud, a errores considerables de cuantificación e incluso ocultar picos adyacentes. Si bien no existe un criterio único para el cálculo de asimetría, las fórmulas empleadas con mayor frecuencia son:

$$As (10\%) = b'/a'$$

$$As (5\%) = b/a$$

Donde a , b , son las medidas entre la línea que une al máximo del pico con la línea base y los extremos anterior y posterior del pico, tomados al 5% de su altura.

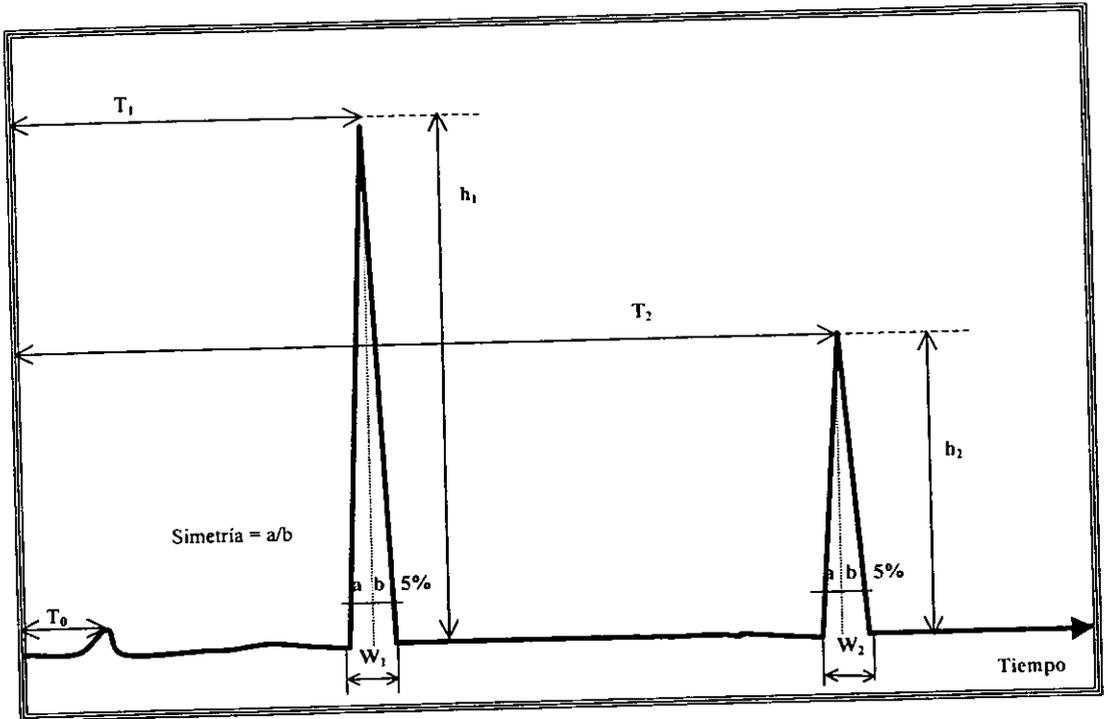


Figura 5. Características de los picos cromatográficos.

1.6 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir el método debe probarse para determinar su efectividad.

La validación de un método analítico se define, como un conjunto de evidencias que establecen la capacidad del método analítico y la medida en que éste satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas que se deseen.

El proceso de validación de un método en particular está basado en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos prácticos de medición. Para una evaluación de las características analíticas de un método, prevalece ante todo la experiencia y el criterio de la persona que lleva a cabo la validación.

La capacidad de un método analítico queda expresada en términos de parámetros analíticos, tales como:

Linealidad: La linealidad de un sistema o método analítico, se define como el aseguramiento de que los resultados analíticos (que pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática) son proporcionales a la concentración del activo dentro de un intervalo determinado.

Exactitud: Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia (estándar). Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas del activo.

Precisión del sistema: Es el grado de concordancia entre respuestas analíticas individuales, expresándose en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación.

Precisión del método: Es el grado de reproducibilidad o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

a) **Repetibilidad:** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre las determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.)

b)Reproducibilidad: Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes días, diferentes analistas).

Especificidad: 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: 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: diferente temperatura, lotes de reactivos, columna, condiciones ambientales, equipo analítico, etc.).

Estabilidad de la muestra analítica: 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.

Son varias las razones por las cuales en la industria Farmacéutica debe validarse un método analítico:

- Es una parte integral del sistema control de calidad.
- Desarrollo de nuevos productos
- Métodos analíticos nuevos
- Instrumentos y reactivos analíticos nuevos
- Cambios en la formulación
- Cambios en el proceso
- Cambios en equipos analíticos.

La validación de métodos analíticos puede abordarse de diferentes maneras:

Prospectiva: Establecer la evidencia documentada de que un método analítico realiza aquello para lo que fue diseñado, basándose en un protocolo previamente preparado.

Introspectiva: Conocida como validación en fase de desarrollo, es el establecimiento de la evidencia documentada de que un método analítico realiza aquello para lo que fue diseñado basándose en información generada durante la ejecución real del proceso.

Retrospectiva: Es el establecimiento de la evidencia documentada de que un método realiza aquello para lo que fue diseñado basándose en la revisión y el análisis de información histórica.

2. GENERALIDADES

2.1 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS^(29,23).

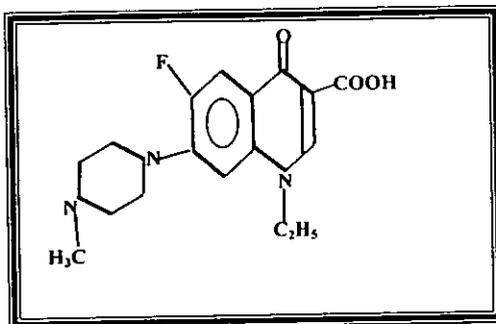
NOMENCLATURA

Nombre común	: Mesilato de pefloxacino dihidratado
Fórmula molecular	: $C_{18}H_{24}FN_3O_6S \cdot 2H_2O$
Nombre Químico	: Ácido 1-etil-6-fluoro-1,4 - dihidro -7-(4-metil-1-piperazinil)- 4-oxo-3-quinolina carboxílico.

PESO MOLECULAR

Mesilato pefloxacino dihidratado:	465.49 g/mol
Mesilato de Pefloxacino :	429.46 g/mol
Pefloxacino :	333.36 g/mol

ESTRUCTURA



ASPECTO

Polvo cristalino de color blanco o ligeramente crema, inodoro.

TEMPERATURA DE FUSIÓN

Los cristales de pefloxacino funden entre 227 y 285°C.

SOLUBILIDAD

Muy soluble en agua y en medios ácidos, soluble en solución de hidróxido de sodio, medianamente soluble en metanol, etanol e isopropanol, poco soluble en cloroformo.

CONSTANTE DE DISOCIACIÓN⁽¹³⁾

En un sistema acuoso mediante titulación potenciométrica, los valores de pKa determinados son de 7.1 y 7.7, para pefloxacino a 25°C.

ESPECTRO DE ULTRAVIOLETA⁽²⁾

El pefloxacino se caracteriza por un máximo característico a 278 nm.

2.2 FARMACOLOGÍA^(14, 17, 22, 25, 30)

ANTECEDENTES.

Pefloxacino es una quinolona de síntesis, fluorada y heterocíclica.

Las quinolonas constituyen un importante grupo de quimioantibióticos en plena expansión en cuanto a investigación se refiere y en el área comercial, cuyas características farmacológicas y terapéuticas son de gran interés infectológico.

El origen de este grupo se remonta al año 1962 cuando Lescher sintetiza el ácido nalidixico durante ensayos efectuados con clorquina, para el hallazgo de nuevos agentes antimaláricos.

Ese primer fármaco se empleó como antibacteriano de las vías urinarias, pero su interés médico decayó progresivamente cuando se comprobó la resistencia adquirida por los microorganismos en el tratamiento de las infecciones urinarias.

Los derivados obtenidos sintéticamente -ácido oxolinico (1967), cinoxacin y ácido piromidico (1970), rosoxacin (1973)- siguieron la misma curva descendente del interés terapéutico hasta que se obtuvo el ácido pipemidico (1974) cuya destacada actividad contra *Pseudomonas* marcó una nueva etapa en la investigación del grupo.

En los inicios de los años 70's pudo agregarse un átomo de flúor a estos compuestos lo cual les otorgó gran eficacia terapéutica con capacidad de acción sistémica, ejemplo de ello son: Norfloxacina (1978) y la enoxacina (1979).

En la década de 1980 se produjo un notable avance mediante la obtención de nuevos fármacos: ofloxacina (1981), ciprofloxacina, **pefloxacino** y fleroxacina (1983) y lomefloxacina (1985) todos actualmente disponibles comercialmente para el tratamiento de diferentes procesos infecciosos.

Esa década (80's) también fue idónea para la obtención de otros fármacos en plena investigación experimental y clínica, los cuales tienen un mayor espectro de actividad bactericida rápida y notable, susceptibles a la resistencia mediada por plásmidos.

El estudio de este grupo de antibacterianos es mejor comprendido si se divide en tres subgrupos:

ANTIGUAS	NUEVAS	EN DESARROLLO
<p>ÁCIDO NALIDÍXICO ÁCIDO OXOLÍNICO CINOXACINA ÁCIDO PIPEMÍDICO</p>	<p>NORFLOXACINA ENOXACINA CIPROFLOXACINA OFLOXACINA PEFLOXACINA FLEROXACINA LOMEFLOXACINA TEMAFLOXACINA SPARFLOXACINA</p>	<p>ROSOXACINA AMIFLOXACINA FLUMEQUINA DIFLOXACINA IRLOXACINA PIROXACINA TOSUFLOXACINA</p>

Tabla 3. Quimioantibióticos. Subgrupos de las quinolonas.

FARMACOLOGÍA CLÍNICA.

Pefloxacino es uno de las más recientes quinolonas fluoradas que son muy activas sobre bacilos aeróbicos G(-) y cocos; su gran actividad antibacteriana intrínseca es debida a la actividad inhibitoria en la síntesis del DNA.

Pefloxacino es administrado como un mesilato para el tratamiento de infecciones sistémicas o del tracto urinario.

A diferencia de la resistencia de algunas bacterias a los antibióticos, que es transmitida por plásmidos, la resistencia a las fluorquinolonas es debida a mutación cromosomal.

El inyectable de Pefloxacino es utilizado y puede ser administrado por perfusión con grandes ventajas, tales como una acción terapéutica y una absorción en diferentes tejidos y/u órganos rápida.

Las quinolonas inhiben la actividad de una enzima bacteriana esencial para la replicación del DNA, por lo tanto interfieren en su síntesis. Esta enzima topoisomerasa es útil para superenrollar las cadenas de DNA, paso necesario para acomodar el núcleo dentro de la célula bacteriana mediante la reducción de su tamaño. La inhibición de esta enzima provoca la muerte de la bacteria, por lo que el mecanismo de acción de las quinolonas es de tipo bactericida.

El espectro bacteriano es inicialmente confinado a las enterobacterias, posteriormente se fue ampliando a las Pseudomonas, cocos Gram positivos, Micoplasmas y Clamidias. Los anaerobios son poco o nada sensibles.

La actividad antibacteriana de las quinolonas es muy amplia y abarca numerosos microorganismos. Como característica importante no son susceptibles a la resistencia mediada por plásmidos.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

Pefloxacino presenta actividad sobre:

Plasmodium falciparum

Plasmodium yoelii

Haemophilus influenzae

Neisseria gonorrhoeae

Pseudomona aeruginosa

Klebsiella pneumoniae

Staphilococcus s.p.

Shigella s.p.

Salmonella s.p.

De los cuales *P. aeruginosa* puede desarrollar resistencia a pefloxacino siguiendo el mecanismo de reducir la permeabilidad de la membrana externa, alterando la DNA girasa o una combinación de ambos procesos. Sin embargo los mecanismos de resistencia, a nivel molecular no han sido completamente elucidados ya que la membrana externa presenta cambios muy complejos.

MODO DE ACCIÓN Y ESPECTRO ANTIBACTERIANO

Es inhibidor de la enzima DNA-girasa y actúa de modo bactericida contra una amplia franja de microorganismos.

Las enterobacterias presentan una sensibilidad desde 0.02 a 2 mcg/ml .
Haemophilus influenza presenta una CMI (Concentración mínima inhibitoria) muy bajo, de 0.008 a 0.06 mcg/ml, Neisseria gonorrhoeae, un CMI de 0.016 a 0.12 mcg/ml

La actividad contra *Pseudomonas* es solo discreta con un CMI de 1 a 8 mcg/ml. Tiene poca actividad contra estreptococos, incluso neumococos y enterococo, cuyo CMI varía desde 4 a 32 mcg/ml. El estafilococo, en sus dos variantes, está en la franja de las bacterias sensibles, como también *Shigella* y *Salmonella*.

Pefloxacino es activo contra *Legionella*, pero micoplasma y clamidia son inconstantemente sensibles a éste.

2.3 FARMACOCINÉTICA^(3, 15, 16, 20, 27)

ABSORCIÓN, DIFUSIÓN Y EXCRECIÓN

La dosis de 400 mg por vía oral es absorbida en 20 minutos aproximadamente, con un porcentaje del 90%, alcanzando un nivel en el suero sanguíneo suficiente para destruir la mayoría de enterobacterias, ya que la concentración sanguínea se estima de 3.8 a 5.6 mcg/ml.

La unión con las proteínas es del 20 al 30% con una vida media de 7.5 a 10 horas, lo cual la distingue de otras quinolonas.

Si se repiten las dosis aumenta la concentración. Tiene capacidad de difusión en LCR (Líquido Cefaloraquídeo) con nivel terapéutico útil contra bacilos gramnegativos y estafilococos durante 12 horas, si se emplea por vía intravenosa.

Las experiencias efectuadas en cirugía ósea demuestran que una dosis de 400 mg IV cada 12 horas provee un nivel de pefloxacino adecuado para eliminar la mayoría de las bacterias causantes de osteomielitis.

La penetración en los tejidos orgánicos ha sido demostrada en trabajos especializados. Se han comprobado niveles altos en tejido prostático, amígdalas, bronquios y válvulas cardíacas. Presenta una excelente penetración hacia varios tejidos y fluidos lo cual permite su uso en un amplio orden de infecciones.

Pefloxacino es biotransformado extensivamente para formar el producto activo N-demetilpefloxacin (Norfloxacin) y el producto inactivo N-óxido.

La eliminación o tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de pefloxacino seguida de una administración de dosis única, se alcanza a las 8 o 13 horas, aumentando de 14 a 15 horas después de una dosis múltiple.

Una administración de 800 mg de pefloxacino una vez en un día en vez de 400 mg puede ser clínicamente efectiva y es adecuada para un tratamiento.

La eliminación se realiza principalmente por vía renal como fármaco inmodificado o de sus productos de biotransformación, comprobado hasta 80 horas después de su administración.

La insuficiencia renal no modifica sustancialmente la concentración sérica, pero si lo hace la insuficiencia hepática, según lo ha demostrado en cirróticos y alcohólicos, porque aumenta la vida media de eliminación. El pefloxacino es poco dializable.

2.4 INDICACIONES TERAPEUTICAS^(6, 22, 25)

Considerando su actividad antibacteriana y en sus características farmacocinéticas, está indicado su uso en el adulto, en infecciones severas producidas por bacilos gramnegativos y estafilococos, fundamentalmente en las siguientes manifestaciones:

Septicemia y endocarditis, infecciones meningéas o del S.N.C., infecciones de las vías respiratorias, otorrinolaringológicas, infecciones renales y urinarias, infecciones del tracto ginecológico, infecciones abdominales y hepatobiliares, infecciones osteoarticulares, infecciones cutáneas y heridas quirúrgicas.

2.5 CONTRAINDICACIONES^(6, 27)

Contraindicado en:

- ❖ Alergias a los medicamentos del grupo de las quinolonas.
- ❖ Embarazo y lactancia.
- ❖ Menores de 18 años.
- ❖ Deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

2.6 PRECAUCIONES^(6,20)

Puede originarse teniditis, que puede provocar la ruptura del tendón, entonces podría requerirse la interrupción del tratamiento inmediatamente y dar el auxilio apropiado al paciente.

En el caso de presentarse dolor del tendón de Aquiles (a nivel del tobillo), debe suspenderse el tratamiento.

2.7 REACCIONES SECUNDARIAS^(6, 20)

- ❖ Trastornos digestivos: Gastralgias, náusea, vómito.
- ❖ Manifestaciones alérgicas cutáneas y de fotosensibilidad.
- ❖ Dolores musculares y/o articulares.
- ❖ Trombocitopenias, que aparecen con la prescripción de posologías fuertes (1660mg/día).
- ❖ Alteración de las transaminasas.
- ❖ Trastornos neurológicos: Cefaleas, trastornos de la vigilancia.

2.8 INTERACCIONES FARMACOLÓGICAS^(17, 27)

En la administración simultánea de pefloxacino y teofilina se ha observado una prolongación de la vida media de la teofilina en el suero, ocasionando niveles elevados de este fármaco en plasma lo cual incrementa el riesgo de reacciones adversas.

2.9 POSOLOGÍA^(20, 25)

Adulto con función hepática normal 800 mg/día (2 ampolletas de 400 mg)
Adulto con insuficiencia hepática severa o de disminución del flujo sanguíneo hepático, la posología diaria debe ser adaptada por disminución del ritmo de las administraciones.

Para la forma inyectable Intravenosa (Peflacina), se recomienda perfundir 8 mg/kg en una hora:

Dos veces al día si no existe ictericia.

Cada 36 horas en caso de ascitis.

Cada dos días si existe ictericia y ascitis.

En caso de insuficiencia renal, no se requiere reducir la posología.

2.10 ADMINISTRACIÓN Y DOSIS⁽²⁵⁾

La dosis oral de 400 mg dos veces por día es suficiente para el tratamiento de la mayor parte de las infecciones por microorganismos sensibles a estos fármacos.

La aplicación intravenosa de 400 mg se realiza en infecciones graves como tratamiento inicial, se aplica diluido en 250 ml de solución glucosada durante 1 hora, resguardándola de la luz. La insuficiencia hepática exige una restricción de la dosis o alargamiento de los intervalos.

No emplear solución clorada ya que el pefloxacino se precipita en presencia de iones cloro.

2.11 PREPARADOS FARMACÉUTICOS⁽⁶⁾

PRESENTACIÓN	FORMULACIÓN
Caja con 8 comprimidos de 400 mg (Peflacina)	Mesilato de pefloxacino dihidratado equivalente a 400 mg de pefloxacino. Excipiente c.b.p..... 1 tableta
Caja con una ampolleta de 5 ml. con 400 mg (Peflacina).	Mesilato de pefloxacino dihidratado equivalente a 400 mg de pefloxacino. Vehículo c.b.p..... 5 ml

Tabla 4. Preparados farmacéuticos de Pefloxacino.

El fármaco presenta fotosensibilidad, por lo que no debe exponerse a la luz solar. No es conveniente su aplicación en pediatría, durante el embarazo o la lactancia.

IV

**DESARROLLO
DEL
METODO**

Se realizó una revisión bibliográfica acerca de Pefloxacino encontrando algunas propiedades y características que se enuncian en el apartado de Generalidades (Pág. 27) y algunas condiciones cromatográficas para su cuantificación que se resumen en la siguiente tabla:

Condición	USP-23 (27)	Proveedor (Química Alkano) (2)	Journal Chromatography (15)	Antimicrobial agents and Chemotherapy (16)
Columna	C-18, 4 mm x 25 cm, 3-10 μ m	Fase Normal	C-18, 4.6 mm x 10 cm, 5 μ m	C-18, 4.6 mm x 10 cm, 2 μ m
Fase móvil	Acido fosfórico 0.025M Ajustar a pH = 3.0 \pm 0.1 con Trietilamina (TEA) 87 % Acetonitrilo 13%	CCl ₃ : 40 ml Metanol:40 ml Tolueno:20 ml Dietilamina : 14 ml Agua : 8 ml	Solución 0.1% de Trietilamina, Ajustar a un pH=3.3 con ácido fosfórico (50%) Acetonitrilo (50%)	150 ml Acetonitrilo, 2 g de Acetato de sodio trihidratado, 2 g de ácido cítrico monohidratado 1 ml de Trietilamina, 850 ml de agua. Ajustar pH = 4.8 \pm 0.2
Long. Onda	278 nm	278 nm	277-435 nm	330-440
Temperatura	40°C \pm 1°C	T. Ambiente	T. Ambiente	T. Ambiente
Vel. Flujo	1.5 ml/min	1 ml/min	2 ml/min	2 ml/min
Tiempo de ret.	6.4 – 10.8 min	4.5 min	1.59 min	4.8 min
Vol. inyección	10 μ l	20 μ l	25 μ l	25 μ l

Tabla 5. Condiciones cromatográficas para cuantificar Pefloxacino, de acuerdo a la revisión bibliográfica.

También es importante conocer la muestra que se va a analizar, en este caso se trata de una forma farmacéutica inyectable, cuya fórmula es:

Cada ampolleta contiene:

Mesilato de pefloxacino dihidratado, equivalente a:.....400 mg
de pefloxacino.

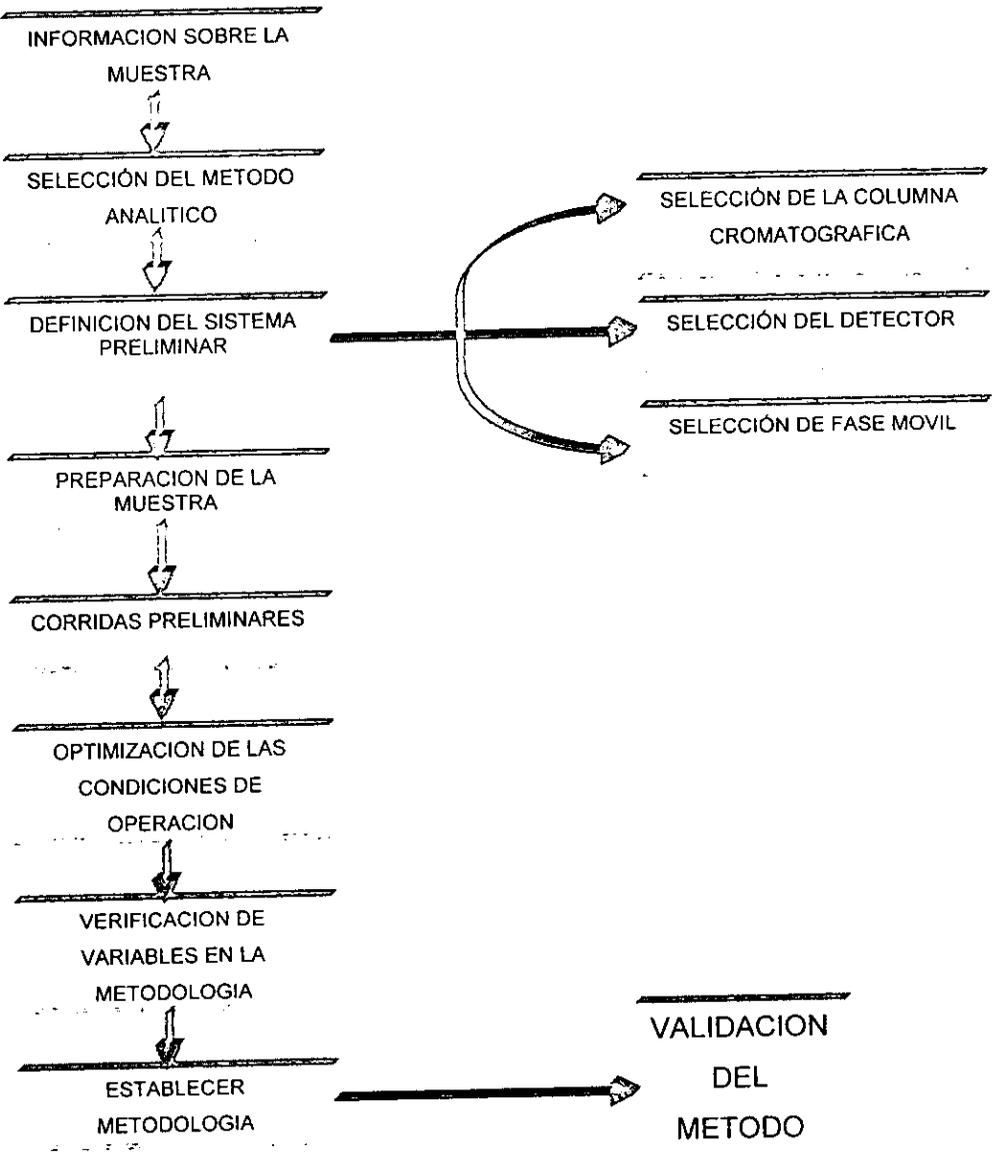
Vehículo c.b.p..... 5 ml

Se realizaron algunos ensayos de solubilidad de Pefloxacino, ya que conociendo esta propiedad puede modificarse el disolvente a utilizar, para mejorar la respuesta en la metodología a desarrollar, de donde se obtuvieron los siguientes resultados:

DISOLVENTE	CANTIDAD (ml)	CANTIDAD (mg)	OBSERVACION
AGUA	15	500	SE DISUELVE
METANOL	15	500	NO SE DISUELVE
ACIDO CLORHIDRICO 0.1N	15	500	SE DISUELVE
HIDROXIDO DE SODIO 0.1N	15	500	NO SE DISUELVE
CLOROFORMO	15	500	NO SE DISUELVE
ISOPROPANOL	15	500	SE DISUELVE LIGERAMENTE
ETANOL	15	500	SE DISUELVE LIGERAMENTE
HEXANO	15	500	SE DISUELVE LIGERAMENTE

Tabla 6. Ensayo de solubilidad del mesilato de Pefloxacino en diferentes solventes.

DESARROLLO DEL METODO



1. Selección de la columna cromatográfica:

Para determinar que tipo de columna sería utilizada, se consideraron algunas características del Pefloxacino, tales como: Peso molecular, solubilidad, pKa, ya que de esto depende que se obtenga un pico simétrico y bien definido. Posteriormente se tomó como referencia la guía para selección de columna que se muestra en la figura 6 y también se consideraron las sugerencias que se tienen de la bibliografía según la tabla 5.

Cabe mencionar que Pefloxacino Inyectable no es un producto que tenga metodología farmacopeica, sin embargo, de acuerdo al grupo al que pertenece (Quinolonas), puede compararse con el Ciprofloxacino, el cual tiene una metodología farmacopeica y se consideró como una opción.

Se realizaron las corridas preliminares en una columna nueva con las siguientes características:

Symmetry Waters, tipo C-18, fase reversa de 5 μm , con dimensiones de 15 cm x 3.9 mm D.I.

La cual posee características de empaque adecuadas, tales como partículas esféricas, que disminuyen la resistencia mecánica, lo cual evita la saturación de las columnas, mejora la resolución y simetría de picos.

2. Selección de la fase móvil:

La selección de la fase móvil está en función de:

- Tipo de columna que se utilice.
- Las características de la muestra.
- Propiedades químicas de la sustancia a cuantificar.

Para lo cual se considera el siguiente cuadro que muestra los diferentes solventes que pueden ser utilizados de acuerdo al tipo de material de relleno que contenga la columna:

Material de relleno	Tipo de analitos	Naturaleza de la matriz	Activación de la columna	Solvente de elución
C ₈ / C ₁₈	Sustancias no polares, sustancias ionizables en su forma no ionizada.	Acuosa	Metanol Agua	Metanol/Acetonitrilo, o mezclas de estos con agua o buffer a un pH adecuado.
Sílice Diol -CN	Sustancias polares	Solución en solventes no polares. Aceites	Cloroformo Hexano	Solventes polares. Metanol
Aniónico	Aniones Carboxilatos Sulfonatos	Soluciones acuosas de baja fuerza iónica	Metanol Buffer	Buffer de alta fuerza iónica y pH adecuado, sólo o en mezclas con Metanol/Acetonitrilo.
Catiónico	Cationes Aminas	Soluciones acuosas de baja fuerza iónica	Metanol Buffer	Buffer de alta fuerza iónica y pH adecuado, sólo o en mezclas con Metanol/Acetonitrilo.

Tabla 7. Adsorbentes más comunes y sistemas de preparación.

3. Selección del detector (Equipo cromatográfico):

En términos generales el detector a elegir depende de las propiedades de respuesta del analito, en este caso y de acuerdo a la bibliografía se observa que Pefloxacino presenta un máximo en el espectro de Ultravioleta a 278 nm, por lo que el detector empleado, es el propio del cromatografo previamente electo para esta metodología. La razón por la que se eligió este equipo es por que cuenta con sistema de detección ultravioleta / visible con arreglo de diodos, el cual es ideal para el desarrollo de un método, ya que se pueden obtener barridos espectrales de la (s) sustancia (s) que eluye (n) de la columna, además tiene la ventaja de medir la señal no sólo en una longitud de onda discreta, sino en el espectro de absorción completo en tiempo real, de tal forma que a las dimensiones habituales de tiempo y absorbancia, se agrega una tercera la longitud de onda, permitiendo apreciar detalles que escapan a los detectores convencionales.

Con el detector de arreglo de diodos y el software propio del equipo es posible obtener información adicional para el desarrollo de un método, así como para el estudio de pureza de los picos de interés, como:

- Isogramas.

Es un gráfico que representa líneas de isoabsorción en un diagrama bidimensional (Longitud de onda y tiempo). (Ver Anexo I, figura 13).

- Topogramas.

Es un gráfico típico de un detector con arreglo de diodos, en el que se muestra en forma tridimensional los parámetros de tiempo, longitud de onda y absorbancia, (Figura 7) proporciona una imagen visual muy elegante y sólo mediante el software adecuado se puede tener información adicional, ya que éste permite girar el gráfico, y ubicarse dentro del gráfico interceptando las tres variables.

- Análisis de pureza de los picos de absorción.

El software tiene la capacidad de determinar el umbral de pureza (Ver anexo I, figura 14) considerando el ruido del equipo, solvente, error fotométrico y concentración de la muestra que contribuyen a las diferencias espectrales (línea punteada), así como el conjunto de espectros observados en un rango de longitud de onda y la homogeneidad espectral que no debe exceder los límites establecidos por la línea punteada, determinando así un factor de pureza, que no debe exceder el límite de 1000, para que sea considerado como un pico puro.

4. Preparación de la muestra:

Inicialmente se considera la concentración en la que se encuentra el Pefloxacino en la muestra inyectable es de 80 mg/ml, dicha concentración es muy alta para una determinación cromatográfica donde pueden determinarse mcg de muestra inyectada, razón por la que se hace necesaria una dilución de la muestra.

Es importante que la muestra se encuentre preferentemente disuelta en un solvente que se asemeje lo más posible a la fase móvil, por lo que el medio de dilución que finalmente se emplea es la fase móvil como tal. Obteniendo una solución clara y libre de "partículas" visibles.

5. Ensayos preliminares y optimización de las condiciones de separación :

La finalidad del método por CLAR es cuantificar al activo (Pefloxacino) presente en el inyectable, por lo que se considera como referencia la tabla de condiciones cromatográficas (Tabla 5).

El método a desarrollar tiene la funcionalidad de cuantificar el principio activo presente en una muestra inyectable, el método debe ser cromatográfico para tener mayor precisión en los resultados.

Conociendo los componentes que hay en dicha muestra se sabe que pefloxacino es activo único, por lo que no se requiere de una separación de componentes sabiendo además sus características fisicoquímicas y teniendo los recursos materiales suficientes es posible iniciar con algunos ensayos (Tabla 8).

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS EXPERIMENTALES

CONDICION	I	II	III	IV
COLUMNA	SYMMETRY WATERS C-18 3.9 x 150 mm DIAM. 5 mcm			
FASE MOVIL	BUFFER FOSFATOS (pH=3.085) : ACN (87:13)	BUFFER FOSFATOS (pH=3.040) : ACN (85:15)	BUFFER FOSFATOS (pH=3.085) : ACN (80:20)	BUFFER CITRATOS/ ACETATOS (pH=4.805): ACN (85:15)
VOL. INY.	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
CONC.	20 µg/ml	20 µg /ml	20 µg /ml	20 µg /ml
LONG.ONDA	278 nm	278 nm	278 nm	278 nm
MEDIO DE DILUCION	FASE MOVIL	FASE MOVIL	FASE MOVIL	FASE MOVIL
FLUJO	1.2 ml/min	1.5 ml/min	1.5 ml/min	1.5 ml/min
TEMP. (°C)	25°C	25°C	25°C	25°C

Tabla 8. Condiciones cromatográficas, ensayadas experimentalmente.

De acuerdo a sus características ácido-base y el valor de pKa que posee se considera adecuado tener la muestra a un pH determinado, para ello se utiliza un buffer, realizando algunos ensayos se empleó inicialmente buffer de fosfatos pH=4.5, sin embargo se considera que se obtiene una mejor respuesta con un buffer de acetatos/citratos pH=4.8, ver cromatogramas en Anexo I.

Las condiciones cromatográficas se fueron determinando al realizar diferentes corridas y evaluando algunos parámetros mediante el cromatograma obtenido como son: tiempo de retención, anchura del pico, simetría, Número de platos teóricos.

CONDICION	Tr	N	Simetría
I	4.356	9,145.3215	0.88
II	3.816	10,137.6740	0.90
III	1.390	2,959.7007	0.82
IV	3.522	11,356.2720	0.98

Tabla 9. Comparación de características del pico cromatográfico.

El detector utilizado fue el propio del cromatógrafo que es Ultravioleta / Visible, y al obtener uno de los cromatogramas del estándar de Pefloxacino se determinó la longitud de onda que es 278 nm (Ver espectro de absorción en Anexo I).

6. Término del método:

Las condiciones cromatográficas que muestran mejores características en cuanto al pico obtenido son las que se marcan en la tabla No.8 marcadas como IV, por lo que se efectuaron una serie de inyecciones en las cuales se observa una repetibilidad de la respuesta analítica con un coeficiente de variación mínimo:

No. INYECCION	RESPUESTA (AREA)
1	627.14343
2	628.57874
3	628.14661
4	629.86829
5	627.35895
6	630.02893
C.V.	0.194609 %

Tabla 10. Repetibilidad de la respuesta analítica.

Dada la concentración de la muestra que se inyecta y el volumen de inyección que es de 20 μ l la columna no presenta problemas de saturación al término de un análisis que involucra hasta 25 inyecciones, obteniendo al final tiempos de retención muy semejantes, así como picos con las mismas características de simetría. Dentro de las condiciones cromatográficas se considera el control de la temperatura con la finalidad de evadir las variaciones ambientales que pudieran presentarse en el lugar de trabajo y con ello disminuir las variaciones en tiempo de retención.

Efectuadas 3 valoraciones de algunos lotes de Pefloxacino inyectable se observa una recuperación del activo que se encuentra dentro de especificación (90.0 –110.0 %), por lo que se considera que el método desarrollado satisface los fines para los cuales ha sido desarrollado, pero debe demostrarse que este método es confiable y capaz de identificar alguna interferencia o producto de degradación que pudiera tenerse en el inyectable, por lo que se procede a realizar la validación del método.

7. DESCRIPCION DE LA METODOLOGIA A VALIDAR

Preparación del estándar de referencia:

Pesar, con precisión una cantidad de estándar de referencia equivalente a 50 mg de Pefloxacino (69.8 mg de mesilato de pefloxacino dihidratado) y transferir a un matraz volumétrico de 50 ml; disolver con 25 ml de la fase móvil y agitar mecánicamente durante 5 minutos aproximadamente, llevar al aforo con la misma fase móvil. Transferir una alícuota de 1 ml de la solución anterior y recibir en un matraz volumétrico de 50 ml, agitar y llevar al aforo con la misma fase móvil. La concentración final es aprox. 20 mcg/ml.

Preparación de la muestra:

Vaciar el contenido de no menos de 20 ampollitas en un recipiente y homogenizar. Transferir de la solución anterior una alícuota de 1ml a un matraz volumétrico de 200 ml, adicionar 100 ml de fase móvil y agitar mecánicamente por espacio de 5 minutos aproximadamente, al término de este tiempo llevar al aforo con la fase móvil, tomar una alícuota de 5 ml y transferirla a un matraz volumétrico de 100 ml, agitar y llevar al aforo con la fase móvil. Esta solución tiene una concentración de 20 mcg/ml.

Preparación de la fase móvil.

Pesar 2 g de ácido cítrico, 2 g de acetato de sodio anhidro y colocar en un matraz volumétrico de 1000 ml disolver y llevar al aforo con agua desionizada y mezclar; ajustar el pH con trietilamina hasta 4.8, filtrar a través de una membrana de 0.45 micras de porosidad y desgasificar a vacío.

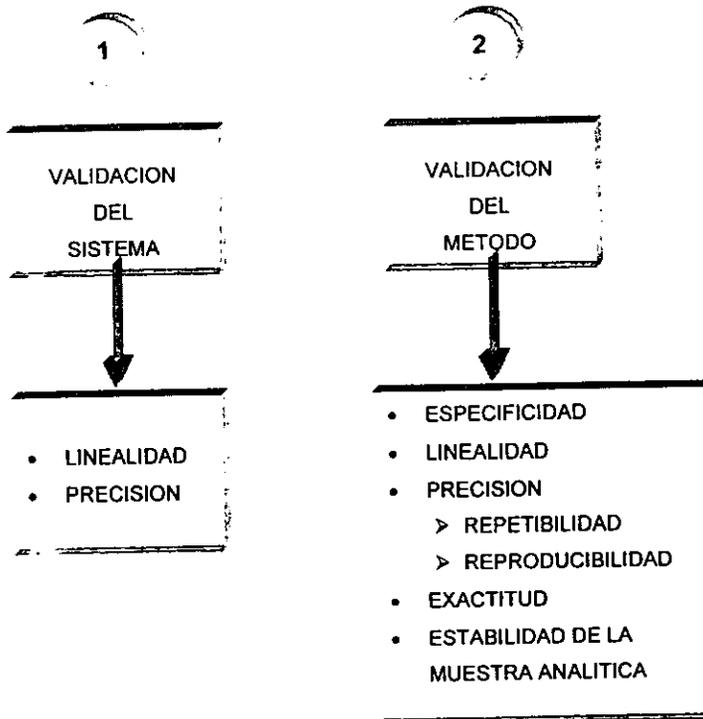
Procedimiento:

Una vez establecidos los parámetros de operación en el equipo, inyectar al cromatógrafo por separado volúmenes iguales de la preparación de referencia y de la preparación de la muestra. El coeficiente de variación para las áreas del estándar de referencia no debe ser mayor de 1.0%.

V

**VALIDACION
DEL
MÉTODO**

PLAN DE VALIDACION



1. EQUIPOS.

- 1.1 Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (Hewlett Packard)
HPLC 1100 HP ASTERIX
Bomba cuaternaria G13311A US53606781
Automuestreador G1313A DE54901581
Detector con Arreglo de Diodos G1315A DEG1801174
Termostato para Columna G1316A US54000803
Ordenador PC HP Pentium.
- 1.2 Balanza Analítica Mettler Toledo AG204.
- 1.3 Parrillas de agitación y calentamiento Pyro-Multi-Magnestir No. 1268
Lab-Line.

2. MATERIAL.

- 2.1 Material de vidrio comúnmente utilizado en el Laboratorio.
- 2.2 Membranas para filtración Millipore 0.45 μm .
- 2.3 Barras magnéticas.

3. REACTIVOS.

- 3.1 Estándar primario de Mesilato de pefloxacino dihidratado
Proveedor: Madex Pharmaceutical
Lote : ML100472
Pureza : 100.2 %
- 3.2 Materia Prima de Mesilato de pefloxacino dihidratado.
Proveedor : Química Alkano
Lote : PF-011-01-96
Ensayo : 99.6 %

- 3.3 Acetato de sodio anhidro.
Proveedor : Baker Analyzed
Ensayo : 99.5 %
- 3.4 Acido citrico
Proveedor : Baker Analyzed
Ensayo :99.7 %
- 3.5 Trietilamina.
Proveedor : Merck
Ensayo : 99.0 %
- 3.6 Acetonitrilo grado HPLC.
Proveedor : OmniSolv
Ensayo : 99.99 %
- 3.7 Agua desionizada grado HPLC
Proveedor : OmniSolv

4. CALIFICACION DEL CROMATOGRAFO DE LIQUIDOS.

Se realizó la calificación del equipo cromatográfico ya que es indispensable conocer bajo que condiciones se llevará a cabo la validación del método, y si en un momento dado pudiera presentarse algún problema en el sistema. Además al evaluar los resultados que de la calificación se obtuvieron se puede concluir que los resultados son confiables ya que cada uno de los módulos : Bomba, Inyector y detector cumplen con los requerimientos y especificaciones que para este equipo se consideran. La forma en que se calificó el equipo y los resultados se muestran en el Anexo II.

5. CALIFICACION DE LA COLUMNA CROMATOGRAFICA.

Se calificó la columna cromatográfica, previamente seleccionada, puesto que es necesario conocer en que condiciones se encuentra, ya que en ella se llevará a cabo el análisis y de las condiciones en que se encuentra depende la confiabilidad de los resultados que se obtengan.

Los forma en que se calificó la columna y los resultados de dicha calificación se muestran en el Anexo III.

Los resultados muestran que la columna se encuentra en condiciones óptimas y que de ella pueden obtenerse picos con una buena resolución y simétricos, además una alta eficiencia.

6. PARAMETROS A EVALUAR EN LA VALIDACIÓN.

VALIDACION DEL SISTEMA.

6.1. Linealidad del Sistema

Se determina construyendo una curva de calibración (Concentración - área) a partir de una solución Stock de Pefloxacino estándar, utilizando cuando menos 5 diluciones por triplicado, incluyendo la concentración del 100% (20 mcg/ml de pefloxacino).

6.2 Precisión del sistema.

Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar de concentración igual al 100 % (20.0 mcg/ml).

Nota: 69.8149 mg de Mesilato de pefloxacino dihidratado, equivale a 50 mg de Pefloxacino.

VALIDACION DEL MÉTODO.

6.3 Linealidad del método.

Preparar de manera independiente placebos cargados de principio activo cuando menos a cinco diferentes concentraciones, incluyendo la concentración del 100 % y considerando los mg de activo por ml que presenta en la formulación, haciendo los análisis por triplicado de cada concentración y recuperar el activo adicionado, tomando como referencia una solución estándar de pefloxacino a la concentración del 100 % (20 mcg/ml). Preparar un placebo empleando el proceso de manufactura.

6.4 Precisión del método (Reproducibilidad al 100 %)

Se determina de una muestra homogénea del producto, Inyectable de Pefloxacino cercana al 100 % (20.0 mcg/ml), analizada por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado.

6.5 Exactitud y repetibilidad al 100%

Se realiza con seis placebos cargados de Pefloxacino a una concentración cercana al 100 % (20.0 mcg/ml) de manera independiente, por el mismo analista y en las mismas condiciones de operación.

6.6 Especificidad del método.

Se prepara un placebo y se analiza con el método propuesto y se somete tanto placebo como muestra a condiciones tales que pueda degradarse el activo, analizar y determinar la separación del analito y algún producto de degradación con el método.

6.7 Estabilidad de la muestra analítica.

Se determina de una muestra homogénea del producto, Inyectable de Pefloxacino, con una concentración cercana al 100 % (20.0 mcg/ml), analizada por un solo analista, por triplicado, sometiendo alguna variable dentro del ensayo, en cuanto a temperatura, tiempo, o suspensión del ensayo en un momento dado del análisis.

VI

RESULTADOS

LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Se determinó construyendo una curva de calibración (Concentración - Área) a partir de una solución Stock de Pefloxacino Inyectable estándar de referencia, utilizando 5 diluciones, incluyendo el 100% (20.0 mcg/ml de Pefloxacino). Haciendo el análisis por triplicado para cada dilución.

Solución Stock: 50 mg/ 200 ml = 250 mcg/ml.

ALICUOTA (ml)	VOLUMEN DE AFORO	CONCENTRACION (mcg/ml)	PORCENTAJE (%)
2	50	10	50
3	50	15	75
4	50	20	100
5	50	25	125
6	50	30	150

Tabla 11. Preparación de muestras para la determinación de la linealidad del sistema de pefloxacino.

Los resultados que se obtuvieron son los siguientes:

COMPARACIÓN ENTRE LOS DATOS OBSERVADOS Y CALCULADOS A
PARTIR DE LA LÍNEA DE MEJOR AJUSTE.

CANTIDAD ADICIONADA (mcg/ml)	ÁREA OBSERVADA	ÁREA ESTIMADA	DIFERENCIA
10.02	311.11	311.65	-0.42
10.02	311.01	311.65	-0.42
10.02	311.23	311.65	-0.42
15.03	476.81	471.24	+3.48
15.03	476.52	471.24	+3.48
15.03	474.72	471.24	+3.48
20.04	622.70	630.83	-11.48
20.04	623.92	630.83	-11.48
20.04	619.35	630.83	-11.48
25.05	796.45	790.41	+4.47
25.05	796.42	790.41	+4.47
25.05	794.89	790.41	+4.47
30.06	949.87	950.00	-0.20
30.06	947.62	950.00	-0.20
30.06	949.80	950.00	-0.20

Tabla 12. Respuestas analíticas para la determinación de la linealidad del sistema de pefloxacino.

ANALISIS DE VARIANCIA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA
REGRESION	1	764602.13	764602.13	24867.16
ERROR DE REGRESION	13	399.72	30.75	
FALTA DE AJUSTE	3	19.03	6.34	0.17
ERROR PURO	10	380.69	38.07	

Tabla 13. Análisis de varianza para la evaluación de la linealidad del sistema de pefloxacino.

Suma de Cuadrados total

$$F_{95 \text{ CRITICA}}(1, 13) = 4.67$$

$$F_{99 \text{ CRITICA}}(1, 13) = 9.07$$

$$F_{95 \text{ CRITICA}}(3, 10) = 3.71$$

$$F_{99 \text{ CRITICA}}(3, 10) = 6.55$$

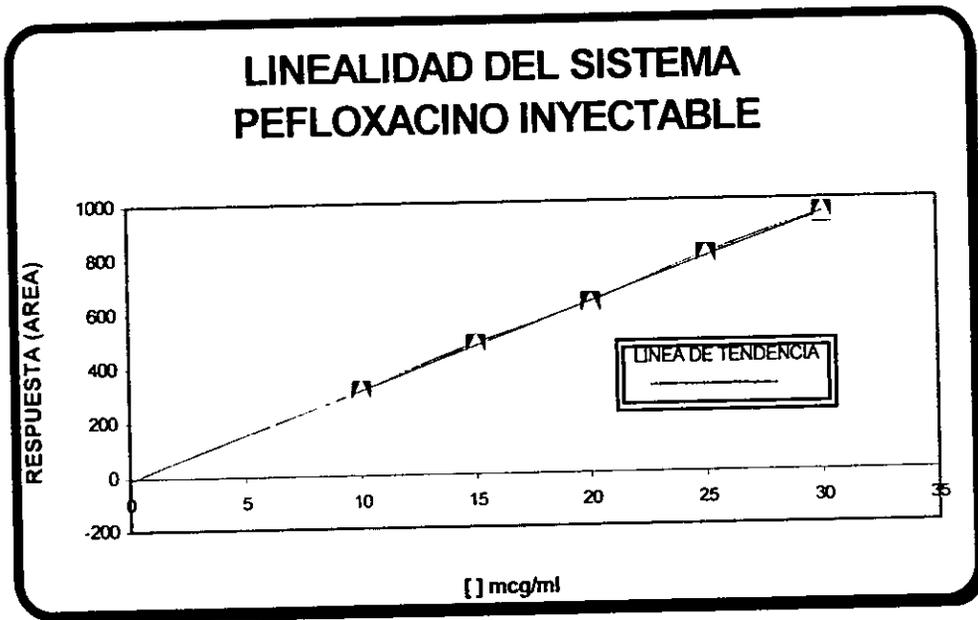


Gráfico 1. Linealidad del sistema para Pefloxacino.

CURVA	r	r ²	MODELO DETERMINADO (y=mx + b)
1	0.999741	0.999482	Cantidad recuperada = 31.8794 (Cantidad adicionada) - 7.4760
2	0.999799	0.999599	Cantidad recuperada = 31.8347 (Cantidad adicionada) - 7.2300
3	0.999686	0.999372	Cantidad recuperada = 31.8824 (Cantidad adicionada) - 8.926
Global	0.99973	0.99946	Cantidad recuperada = 31.8654 (Cantidad adicionada) - 7.5174

Tabla 14. Modelos matemáticos obtenidos de la linealidad del sistema de Pefloxacino.

ANÁLISIS DE REGRESIÓN

PARÁMETRO	RESULTADO
Pendiente (m)	31.865402
Intercepto (b)	-7.51735
Coef. Correlación (r)	0.99973
Coef. Determinación (r ²)	0.99946
Desv. Std. De la pendiente	0.20595
Desv. Std. Del intercepto	4.37766
t (gl = 13, 95 %)	2.16
Intervalo de confianza 95% (b)	-16.97310 < -7.51735 < 1.93840
Intervalo de confianza 95% (m)	31.40863 < 31.85349 < 32.29835
Desv. Std estimado de y dado x	5.44596
Desv. Std estimado de x dado y	0.17092

Tabla 15. Análisis de regresión de la linealidad del sistema de pefloxacino.

PRECISIÓN DEL SISTEMA.

Se determinó mediante el análisis sextuplicado de una misma solución estándar de pefloxacino a la concentración del 100% (20.0 mcg/ml).

Obteniendo los siguientes resultados:

No. REPETICION	AREA
1	623.82623
2	631.01746
3	631.68579
4	627.35895
5	630.02893
6	631.11511
PROMEDIO	629.17208
DESV.STD.	3.03642
C.V. %	0.482606

Tabla 16. Respuestas analíticas para la determinación de la precisión del sistema.

LINEALIDAD DEL METODO

Se preparó de manera independiente placebos cargados de principio activo (Pefloxacino) a cinco diferentes concentraciones, incluyendo el 100%, considerando los mg de activo por ml que presenta la formulación. Haciendo el análisis por sextuplicado para cada concentración y recuperando el activo adicionado, tomando como referencia una solución estándar de Pefloxacino a la concentración del 100% (20 mcg/ml).

Se prepararon los siguientes sistemas:

ACTIVO ADICIONADO (mg)	PORCENTAJE (%)	PLACEBO (ml)	[] (mcg/ml)	RESPUESTA (área)
34.4	43	1.0	8.6	266.02 267.14 264.61 265.96 267.02 263.58
45.8	57	1.0	11.5	361.41 358.48 358.75 358.50 357.30 358.57
80.0	100	1.0	20	627.34 626.33 628.98 629.87 628.14 630.69
96.0	120	1.0	24	760.07 754.98 759.71 752.03 719.42 760.81

Tabla 17. Preparación de muestras para la determinación de la linealidad del método de pefloxacino inyectable.

Los resultados que se obtuvieron son los siguientes:

COMPARACIÓN ENTRE LOS DATOS OBSERVADOS Y CALCULADOS A
PARTIR DE LA LÍNEA DE MEJOR AJUSTE.

CANTIDAD ADICIONADA mcg/ml)	CANTIDAD DETERMINADA	CANTIDAD ESTIMADA	DIFERENCIA
8.59	8.60	8.62	-0.113
8.59	8.62	8.62	-0.113
8.59	8.54	8.62	-0.113
8.59	8.59	8.62	-0.113
8.59	8.62	8.62	-0.113
8.59	8.51	8.62	-0.113
11.46	11.54	11.46	+0.033
11.46	11.49	11.46	+0.033
11.46	11.50	11.46	+0.033
11.46	11.49	11.46	+0.033
11.46	11.45	11.46	+0.033
11.46	11.49	11.46	+0.033
20.00	19.93	19.91	+0.126
20.00	19.90	19.91	+0.126
20.00	19.98	19.91	+0.126
20.00	20.01	19.91	+0.126
20.00	19.96	19.91	+0.126
20.00	20.04	19.91	+0.126
24.00	24.10	23.87	+0.253
24.00	23.94	23.87	+0.253
24.00	24.09	23.87	+0.253
24.00	23.85	23.87	+0.253
24.00	22.82	23.87	+0.253
24.00	24.12	23.87	+0.253

Tabla 18. Resultados analíticos para la determinación de la linealidad del método de pefloxacino inyectable.

ANÁLISIS DE VARIANCIA

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA
REGRESIÓN	1	913.26	913.26	15110.77
ERROR DE REGRESIÓN	22	1.33	0.06	
FALTA DE AJUSTE	2	0.05	0.03	0.41
ERROR PURO	20	1.28	0.06	

Tabla 19. Análisis de varianza para la evaluación de la linealidad del método de pefloxacino inyectable.

Suma de Cuadrados total

$$F_{95 \text{ CRÍTICA}} (1, 13) = 4.67$$

$$F_{99 \text{ CRÍTICA}} (1, 13) = 9.07$$

$$F_{95 \text{ CRÍTICA}} (3, 10) = 3.71$$

$$F_{99 \text{ CRÍTICA}} (3, 10) = 6.55$$

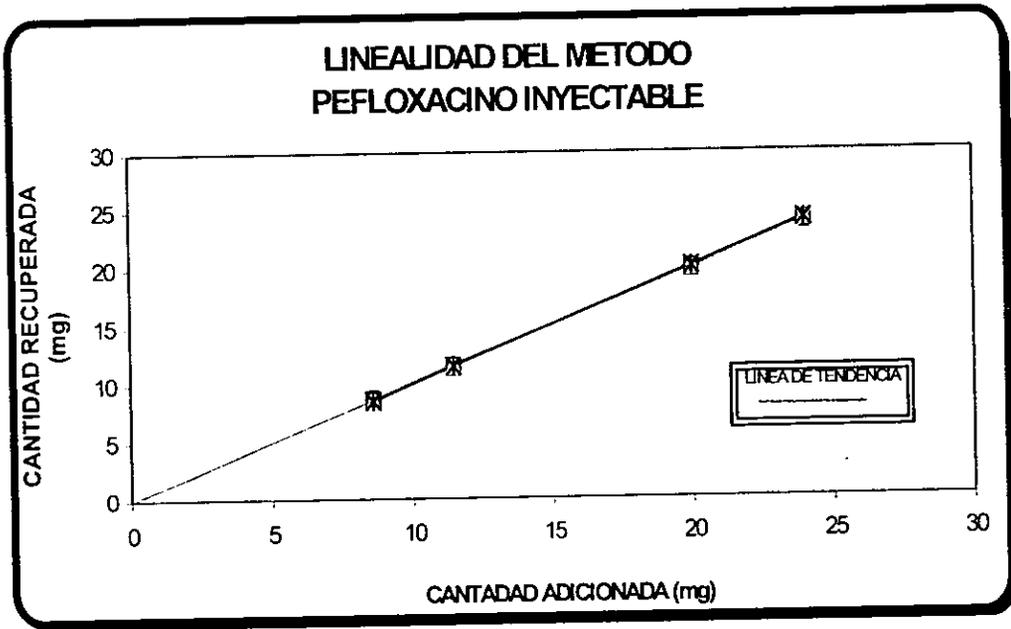


Gráfico 2. Linealidad del método de Pefloxacino Inyectable.

CURVA	r	r ²	MODELO DETERMINADO (y=mx + b)
1	0.999943	0.999886	Cantidad recuperada = 1.0007 (Cantidad adicionada) + 0.0176
2	0.999989	0.999979	Cantidad recuperada = 0.9922 (Cantidad adicionada) + 0.0984
3	0.999976	0.999952	Cantidad recuperada = 1.0055 (Cantidad adicionada) - 0.0743
4	0.999967	0.999935	Cantidad recuperada = 0.9919 (Cantidad adicionada) + 0.1018
5	0.998454	0.996911	Cantidad recuperada = 0.9374 (Cantidad adicionada) + 0.7014
6	0.999986	0.999971	Cantidad recuperada = 1.0103 (Cantidad adicionada) - 0.1388
Global	0.99927	0.99854	Cantidad recuperada = 0.9895 (Cantidad adicionada) + 0.1200

Tabla 20. Modelos matemáticos obtenidos de la linealidad del método de Pefloxacino Inyectable.

ANÁLISIS DE REGRESIÓN

PARÁMETRO	RESULTADO
Pendiente (m)	0.98949
Intercepto (b)	0.12003
Coef. Correlación (r)	0.99927
Coef. Determinación (r ²)	0.99854
Desv. Std. De la pendiente	0.00805
Desv. Std. Del intercepto	0.13833
t (gl = 22, 95 %)	0.40692
Intervalo de confianza 95% (b)	-0.16686<0.12003<0.40692
Intervalo de confianza 95% (m)	0.97280<0.98949<1.00619
Desv. Std estimado de y dado x	0.24044
Desv. Std estimado de x dado y	0.24282

Tabla 21. Análisis de regresión de la linealidad del método de pefloxacino inyectable.

PRECISIÓN DEL MÉTODO (Reproducibilidad)

Se determinó de una muestra del producto, tomando como mínimo 10 ampollitas de Pefloxacino Inyectable Lote:DP06704 – 02 cercana al 100% (20 mcg/ml), analizada por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

	ANALISTA 1	SUMA DE CUADRADOS A1	ANALISTA 2	SUMA DE CUADRADOS A2
DIA 1	99.97481	9994.96064	100.80744	10162.13189
	100.52932	10106.14016	100.81545	10163.74488
	100.90898	10182.60610	100.75266	10151.08641
SUMATORIA	301.4130	30283.70689	302.3754	30476.96318
DIA2	99.95556	9991.10198	100.59947	10120.22968
	99.83154	9966.32839	100.45268	10090.72734
	100.37897	10075.92357	99.08812	9818.45523
SUMATORIA	300.1659	30033.35394	300.1401	30029.41225

Tabla 22. Análisis estadístico de la reproducibilidad del método.

ANÁLISIS DE VARIANCIA

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F CRÍTICA
ANALISTA	1	0.07	0.07	0.13	5.05
DIA	2	1.09	0.55	2.19	6.61
ERROR	8	1.99	0.25		

Tabla 23. Análisis de varianza para la evaluación de la reproducibilidad del método de pefloxacino.

$$\text{Repetibilidad} = \pm (MCE)^{1/2}$$

$$\text{Repetibilidad} = 0.49969$$

EXACTITUD AL 80%

Se realizó con seis placebos cargados de Pefloxacino a una concentración cercana al 80% (16.0 mcg/ml) de manera independiente, por un mismo analista y bajo las condiciones de operación establecidas, de donde se obtuvieron los siguientes resultados:

CONCENTRACION (mcg/ml)	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (%)
16.0	89.3	100.20902
16.0	89.3	99.97847
16.0	89.3	100.09236
16.0	89.3	100.02514
16.0	89.3	99.45989
16.0	89.3	100.29814

Tabla 24. Resultados obtenidos de la exactitud del método al 80%.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Concentración del estándar	20.2 mcg/ml
Respuesta del estándar	624.25946
Promedio de cantidad recuperada	100.01050
Desviación estándar	0.29437
Coefficiente de Variación crítico (%)	1.500
Coefficiente de Variación experimental (%)	0.29434
Valor de t con cinco grados de libertad	2.571
Valor de t experimental	0.08615
Intervalo de confianza:	99.70009<100.01034<100.32059

Tabla 25. Análisis estadístico de la exactitud del método al 80%.

Al 100%

Se realizó con seis placebos cargados de Pefloxacino a una concentración cercana al 100% (20.0 mcg/ml) de manera independiente, por un mismo analista y bajo las condiciones de operación establecidas, de donde se obtuvieron los siguientes resultados:

CONCENTRACION (mcg/ml)	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (%)
20.0	111.7	99.94515
20.0	111.7	99.90936
20.0	111.7	99.31117
20.0	111.7	99.47321
20.0	111.7	99.12033
20.0	111.7	100.08347

Tabla 26. Resultados obtenidos de la exactitud del método al 100%.

ANALISIS ESTADISTICO

Concentración del estándar	20.2 mcg/ml
Respuesta del estándar	624.25946
Promedio de cantidad recuperada	99.64045
Desviación estándar	0.39201
Coefficiente de Variación crítico (%)	1.500
Coefficiente de Variación experimental (%)	0.39342
Valor de t con cinco grados de libertad	2.571
Valor de t experimental	2.24821
Intervalo de confianza:	99.22928 < 99.64047 < 100.05165

Tabla 27. Análisis estadístico de la exactitud del método al 100%.

Al 120%

Se realizó con seis placebos cargados de Pefloxacino a una concentración cercana al 120% (24.0 mcg/ml) de manera independiente, por un mismo analista y bajo las condiciones de operación establecidas, de donde se obtuvieron los siguientes resultados:

CONCENTRACIÓN (mcg/ml)	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (%)
24.2	134.4	100.49612
24.2	134.4	100.77232
24.2	134.4	100.20018
24.2	134.4	100.33341
24.2	134.4	100.53402
24.2	134.4	99.54909

Tabla 28. Resultados obtenidos de la exactitud del método al 120%.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Concentración del estándar	20.2 mcg/ml
Respuesta del estándar	624.25946
Promedio de cantidad recuperada	100.31419
Desviación estándar	0.42191
Coefficiente de Variación crítico (%)	1.500
Coefficiente de Variación experimental (%)	0.42059
Valor de t con cinco grados de libertad	2.571
Valor de t experimental	1.825
Intervalo de confianza:	99.87161 < 100.31466 < 100.75706

Tabla 29. Análisis estadístico de la exactitud del método al 120%.

ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO.

Se preparó un placebo de Pefloxacino inyectable de acuerdo a la formulación otorgada por el departamento de Desarrollo Farmacéutico, del cual se tomaron tres muestras y se analizaron con el método propuesto, también se preparó un estándar de referencia. El placebo no presentó respuesta alguna en el tiempo de retención que presenta el estándar de referencia (Pefloxacino).

Se sometió tanto placebo como muestra a diferentes condiciones, para propiciar su degradación, dichas condiciones fueron las siguientes:

CONDICION	OBSERVACION
A 40°C, durante 2 meses	Sin ningún cambio en el tiempo de retención, ni presencia de algún otro pico.
Expuesta a luz solar durante 15 días	Cambio en la apariencia del inyectable, se torna color naranja, cuando su color normal es ligeramente amarillo, ninguna modificación en el cromatograma.
Tratada con luz UV, durante 2 hrs.	Cambio brusco en el color del inyectable sin ningún cambio en el cromatograma.
Tratada con H ₂ O ₂ en baño María durante 1 hr.	Sin ningún cambio en apariencia del inyectable, presencia de un pico en el cromatograma con tiempo de retención diferente al de pefloxacino.
Hidrólisis ácida (HCl 0.1N)	Sin ningún cambio ni en el inyectable ni en el cromatograma.
Hidrólisis alcalina (NaOH 0.1 N)	Sin ningún cambio en el inyectable, ni en el cromatograma.

Tabla 30. Condiciones utilizadas para propiciar la degradación de Pefloxacino.

TOLERANCIA DEL MÉTODO

Se determinó de una muestra homogénea de producto, Pefloxacino Inyectable solución oral , cercana al 100%, analizada por un mismo analista, en un equipo diferente y por triplicado.

El equipo utilizado fue: Cromatógrafo de líquidos Merck Hitachi Manual.

MUESTRA	RESULTADO
VALORACION 1	100.62756 %
VALORACION 2	100.87259 %
C.V.	0.1719746%

Tabla 31. Resultados observados al evaluar la tolerancia del método.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA

MUESTRA	RESULTADO
VALORACION 1	100.6276 1%
VALORACION 2	99.69591 %
C.V.	0.65771 %

Tabla 32. Resultados observados al evaluar la estabilidad de la muestra analítica.

VII. ANALISIS DE RESULTADOS.

Durante el desarrollo del método se trabajaron diferentes condiciones cromatográficas, para poder finalmente establecer las definitivas para cuantificar pefloxacino en una solución inyectable, para ello se emplearon las condiciones I, bajo las cuales se analizaron estándar y muestra, siendo la muestra el inyectable Peflacina, el cual presenta una mayor respuesta, dicho aumento en la respuesta, puede deberse a que el estándar no se este solubilizando completamente en el medio de dilucion.

Además, puede notarse en los cromatogramas, que el pico que presenta el estándar es mayor que el de la muestra, contrario al área que se reporta, la del estándar es menor que la de la muestra, lo cual indica que el pico es más ancho en la muestra, entonces pudiera ser que alguna sustancia se este adicionando al pico de ésta.

Se modificó la proporción de volúmenes de la fase móvil, con la finalidad de observar una separación de picos, en caso de que existiera alguna interferencia, obteniendo una respuesta no favorable, por lo que se descarta.

Otra posible modificación par mejorar la respuesta sería incrementar el volumen del medio de dilución para el estándar, de esta forma se observaría la respuesta.

Al emplear las condiciones cromatográficas II, se analizarón estándar y muestra, siendo la muestra el inyectable Peflacina, realizando la valoración en un buffer de fosfatos a pH=3.04 obteniendo un resultado de 100.9698%.

Además, se modificó ligeramente la proporción de volúmenes en la fase móvil (85 buffer:15 Acetonitrilo), obteniendo una respuesta buena, sin embargo el tiempo de retención se ve modificado, siendo éste menor al inicial, al realizar una comparación se considera mejor la proporción (87:13).

Con la finalidad de observar un pico más simétrico se modifica la proporción de fase móvil a 80 : 20 (Buffer : Acetonitrilo), observando un desplazamiento en el tiempo de retención hacia el volumen muerto por lo que estas condiciones (III) se descartan también.

Al emplear las condiciones cromatográficas IV, para determinar pefloxacino en el estándar y una muestra, empleando para ello un búffer de Acetatos/Citratos a pH=4.805 preparado de la siguiente manera:

2g Acido cítrico , 2g acetato de sodio, Agua c.b.p 1Lt. ajustando el pH con trietilamina hasta 4.8.

Obteniendo un resultado de 101.7675% y una respuesta muy buena, un tiempo de retención adecuado, por lo que estas condiciones también pueden ser empleadas en la metodología.

Finalmente las condiciones cromatográficas IV, se consideran las definitivas puesto que el pico cromatográfico obtenido es más simétrico que los anteriores, el resultado de valoración es satisfactorio, por lo que bajo las condiciones de trabajo establecidas es adecuado validar el método.

En cuanto a la validación del sistema:**LINEALIDAD DEL SISTEMA**

- Dado que $F_{\text{regresión calculada}} > F_{\text{regresión crítica}}$, existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y el área.
- Dado que $F_{\text{Falta de ajuste calculada}} < F_{\text{Falta de ajuste crítica}}$, no existe falta de ajuste a la regresión lineal simple cantidad adicionada -área.
- De acuerdo al análisis de regresión, existe una relación lineal simple entre el área determinada con la cantidad de fármaco presente, por lo que el sistema es lineal.

PRECISION DEL SISTEMA

- Dado que el coeficiente de variación (C.V.) calculado es menor al C.V. crítico 1.5% entonces el sistema es preciso.

En la validación del método:**LINEALIDAD DEL METODO**

- Dado que $F_{\text{regresión calculada}} > F_{\text{regresión crítica}}$, existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad determinada.
- Dado que $F_{\text{ajuste calculada}} < F_{\text{ajuste crítica}}$, No existe falta de ajuste a la regresión lineal simple cantidad adicionada -cantidad determinada.
- De acuerdo al análisis de regresión, existe una relación lineal entre la propiedad medida (cantidad de fármaco determinado) y el valor real de la propiedad (cantidad de fármaco adicionado). Por lo que el Método es lineal.

PRECISION DEL METODO (REPRODUCIBILIDAD).

- Dado que $F_{analista\ calculada}$ es $<$ $F_{analista\ critica}$ entonces el Método Analítico es reproducible por los analistas.
- Dado que $F_{día\ calculada}$ es $<$ $F_{día\ critica}$ entonces el Método Analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.
- El Método Analítico es repetible ya que el C.V. calculado $<$ al C.V. crítico

EXACTITUD

- Como $t_{95experimental}$ es $<$ que $t_{95\ critico}$ entonces el método es EXACTO a este nivel de concentración.(80 %).
- Como $t_{95experimental} <$ $t_{95\ critico}$ entonces el método es EXACTO a este nivel de concentración (100%).
- Como $t_{95\ experimental}$ es $<$ que $t_{95\ critico}$ entonces el método es EXACTO a este nivel de concentración. (120%).

ESPECIFICIDAD

- El Método es Específico ya que no existe respuesta alguna por parte del placebo en el tiempo de retención del Pefloxacino.

TOLERANCIA

- Dado que el coeficiente de variación entre las dos determinaciones es menor a 1.5 %, el método es capaz de soportar cambios durante el proceso de análisis, por lo tanto el método es tolerable, cuando se cambia de equipo.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA

- Dado que el coeficiente de variación entre las dos determinaciones es menor a 1.5 %, se concluye que la muestra analítica es estable hasta por 12 horas, puesto que se puede obtener un resultado confiable en este intervalo de tiempo de análisis.

VIII. CRITERIOS DE ACEPTACION⁽¹⁹⁾

Norma Oficial Mexicana (NOM-EM-003-SSAI-1998)

LINEALIDAD DEL SISTEMA.

CARACTERISTICA	ESPECIFICACION	RESULTADO
COEFICIENTE DE DETERMINACION (r^2)	≥ 0.98	0.999457
COEFICIENTE DE CORRELACION (r)	≥ 0.99	0.999728
ORDENADA AL ORIGEN (b)	El intervalo de confianza al 95% debe considerara al 0.0 (-16.9731 < b < 1.9384)	-7.517348
REGRESION	$F_{REGRESION\ CALCULADA} \geq F_{REGRESION\ CRITICA\ (1,13)\ (4.67)}$	24867.16
FALTA DE AJUSTE	$F_{FALTA\ DE\ AJUSTE\ CALCULADA} \leq F_{FALTA\ DE\ AJUSTE\ CRITICA\ (3,10)\ (3.71)}$	0.17

LINEALIDAD DEL METODO

CARACTERISTICA	ESPECIFICACION	RESULTADO
COEFICIENTE DE DETERMINACION (r^2)	≥ 0.98	0.998546
COEFICIENTE DE CORRELACION (r)	≥ 0.99	0.999273
ORDENADA AL ORIGEN (b)	El intervalo de confianza al 95% debe considerara al 0.0 (-0.16686 < b < 0.40692)	0.120030
PENDIENTE (m)	El intervalo de confianza al 95% debe considerara al 1.0 (0.9728 < m < 1.00619)	0.989495
REGRESION	$F_{REGRESION\ CALCULADA} \geq F_{REGRESION\ CRITICA\ (1,13)\ (4.67)}$	15110.77
FALTA DE AJUSTE	$F_{FALTA\ DE\ AJUSTE\ CALCULADA} \leq F_{FALTA\ DE\ AJUSTE\ CRITICA\ (3,10)\ (3.71)}$	0.41

PRECISION DEL SISTEMA

CARACTERISTICA	ESPECIFICACION	RESULTADO
COEFICIENTE DE VARIACION (C.V.)	$\leq 1.5\%$	0.4826 %

PRECISION DEL METODO (REPRODUCIBILIDAD).

CARACTERISTICA	ESPECIFICACION	RESULTADO
REPRODUCIBILIDAD ENTRE DIAS	$F_{DIAS\ CALCULADA} \leq F_{DIAS\ CRITICA}$ (6.61).	2.1867
REPRODUCIBILIDAD ENTRE ANALISTAS	$F_{ANALISTAS\ CALCULADA} \leq$ $F_{ANALISTAS\ CRITICA}$ (5.05).	0.1339

EXACTITUD

CARACTERISTICA	ESPECIFICACION	RESULTADO
PRUEBA DE t (STUDENT)	$t\ CALCULADA \leq t\ CRITICA$ (2.571).	2.248
C.V.	$< 2.0\%$	0.393 %

ESPECIFICIDAD

CARACTERISTICA	ESPECIFICACION	RESULTADO
SEPARACION	QUE HAYA SEPARACION DE COMPONENTES	CUMPLE

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA

CARACTERISTICA	ESPECIFICACION	RESULTADO
C.V.	< 2.0 %	0.6577 %

TOLERANCIA

CARACTERISTICA	ESPECIFICACION	RESULTADO
C.V.	< 2.0 %	0.17197 %

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

IX. CONCLUSIONES.

- 13.1** Se desarrolló un método analítico adecuado para cuantificar Pefloxacino, presente en una forma farmacéutica inyectable, obteniendo una respuesta analítica adecuada y un resultado analítico confiable.

- 13.2** Los resultados analíticos obtenidos al utilizar la metodología desarrollada para Pefloxacino – Inyectable, demuestran que dicho método es reproducible, confiable y específico.

X. BIBLIOGRAFIA

1. Alcántara Pineda Alejandro; et al. Validación de Métodos Analíticos. material de apoyo al curso . CSEBIOFAR AP (1989) p. 101 - 104.
2. Avadhanulu B., A.R.R. Pantulu . Spectrophotometric determination of pefloxacin in its dosage forms . Indian Drugs . Vol. 31 . No. 6 . July (1993) . Pag. 258-262.
3. Barre J., Houin G and Tillement J.P. Dose dependent Pharmacokinetics study of pefloxacin, A new antibacterial agent, in humans . Journal Pharmaceutical Sciences . Vol. 73 . No. 10 . Oct.(1984) . Pag. 1379-1382.
4. Chen.Y.P., Shaw.C.Y., chang B.L. Simultaneous determination of six quinolone antibacterial agents by HPLC . Journal Food Drug Analysis Vol.4 No.2 . (1996) . Pag. 155-164 .
5. Comité de Validación de Métodos Analíticos . (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A.C.), p. 1-73.
6. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, (PLM) , 1994, Pefloxacino . Pág. 1284-PEF.
7. Especificaciones Internas . PCQ-040 Procedimiento General de Calificación de columnas cromatográficas. Abril-1997.
8. Especificaciones Internas . PCQ-049 Procedimiento General de Calificación de equipo cromatográfico. Agosto-1997.

9. Especificaciones Internas . PCQ-052 Procedimiento General de Desarrollo de Métodos analíticos. Agosto-1997.
10. Especificaciones Internas . PGVM-01 Procedimiento General de Validación de Métodos analíticos. Abril-1997.
11. Faouzi M.A, T.Dine, et. al. Stability and compatibility studies of pefloxacin, ofloxacin and ciprofloxacin with PVC infusion bags . International Journal of Pharmaceutics . Vol. 1 . No. 89 . (1993) . Pag. 125-131.
12. Garzón A. Memorias del curso de : Validación de Métodos analíticos . Impartido por CANITEC.
13. Krisztina T.,Bela Noszal, Istvan Hermeecz . Protonation equilibria of quinolone antibacterials . Journal Pharmaceutical Sciences . Vol.79 . No. 11 . Nov. (1990) . Pag. 023-1028..
14. Mehri Michea, Christine Lucain, Jean Claude P. Resistance to Pefloxacin in Pseudomona aeruginosa . Antimicrobial agents and Chemotherapy . Vol. 35 No. 3 . Mar (1991) . Pag. 512-518.
15. Montay G.and J.P.Tassel . Improved high performance liquid chromatographic determination of pefloxacin and its metabolite norfloxacin in human plasma and tissue. Journal of Chromatography . No. 339 . (1985) Pag. 214-218.
16. Munera M.I, F.Cuesta. A.Abadia, J.Vazquez and M.Restrepo . Determination of pefloxacin Concentration in mesenteric Lymph nodes by High Performance cromatography. Antimicrobial agentes and chemotherapy Vol. 38 . No. 3 . (Mar. 1994) . Pag. 632-634.

17. Nicole Janin, Helene M., Jean Francois D. Roger W., Jean Fleurette. Recovery of *Pefloxacin in saliva and feces and its action on oral and fecal floras of healthy volunteers*. Antimicrobial agents and chemotherapy . Vol.31 . No. 11 . Nov.(1987) . Pag. 1665-1668.
18. Norma ICH (International Conference Homologation).
19. Norma oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-0003-SSAI-1998. Medicamentos genéricos intercambiables. Criterios y requisitos de las pruebas para demostrar la intercambiabilidad y requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados.
20. Petitjean O., B.Pangon, N.Brion, et al. *Pharmacokinetics and bactericidal activities of one 800 milligram dose versus two 400 milligram doses of intravenously administred pefloxacin in healthy volunteers*. Antimicrobial agentes and chemotherapy . Vol. 37. No. 4 . Apr .(1993) . Pag. 737-740.
21. Pharma News 1a. parte (1991) p. 16-17. 2a. parte (1991) p. 14-20.
22. Philippe Deloron, MD, PhD , et. al. *Pefloxacin for Falciparum malaria: Only modest success* . Annals of Internal Medicine . Vol.114 .No. 10 May (1991). Pag. 874-875.
23. Proveedor, información. Química Alkano, S.A. de C.V.
24. Quattrochi O.A. *Introducción a la HPLC . Aplicación y práctica* . Artes gráficas Farro . S.A. Argentina . 1992. Pág. 7-15, 25-98, 125-236.
25. Remo M. Bergoglio . *Antibióticos y Quimioterápicos* . Editorial Médica Panamericana . Quinta edición . Buenos Aires, Argentina . 1993 . Pág. 260-287 .

26. Soberón Mobarak E. Memorias del curso de : Cromatografía de Líquidos de alta resolución . Impartido por IMECAQUIF (Instituto Mexicano de capacitación de la Industria Farmacéutica y Químico Farmacéutica.
27. Ulrich J., Fritz S., walter s. Effect of an antacid containing magnesium and aluminum on absorption, metabolism, and mechanism of renal elimination of pefloxacin in humans . Antimicrobial agents and chemotherapy . Vol.38 . No. 5 . May. (1994) Pag. 1129-1133.
28. USP XXIII The National Formulary XVIII (1995). p. 1982 – 1982
29. Windholz M., Badavari S., Blumetti R., 12ª. Edición . Index Merck . Merck & CO. Inc. 1990 . Pág. 1118.
30. Wolfson J., Hooper P. Minireview : "The Fluoroquinolones : Structures, Mechanisms of action and restance, and spectra of activity in vitro" . Antimicrobial agents and chemotherapy . Vol.28 . No. 4 . Oct.(1985) . Pág. 581-586.

ANEXO

I

CROMATOGRAMAS

1.- Espectro de absorción UV de Pefloxacino.

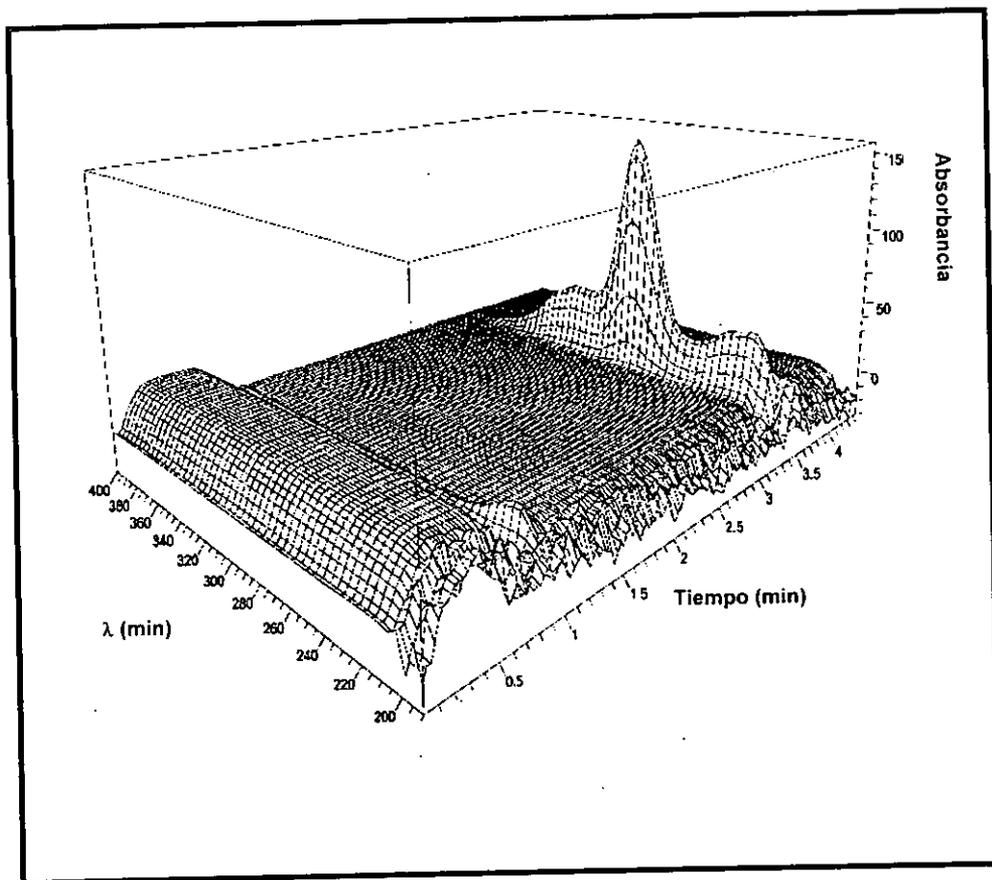


Figura 7. Topograma del estándar de Pefloxacino, asociado a los tres ejes: minutos, nanómetros y unidades de absorbancia.

2.- Cromatograma obtenido de las condiciones cromatográficas I.

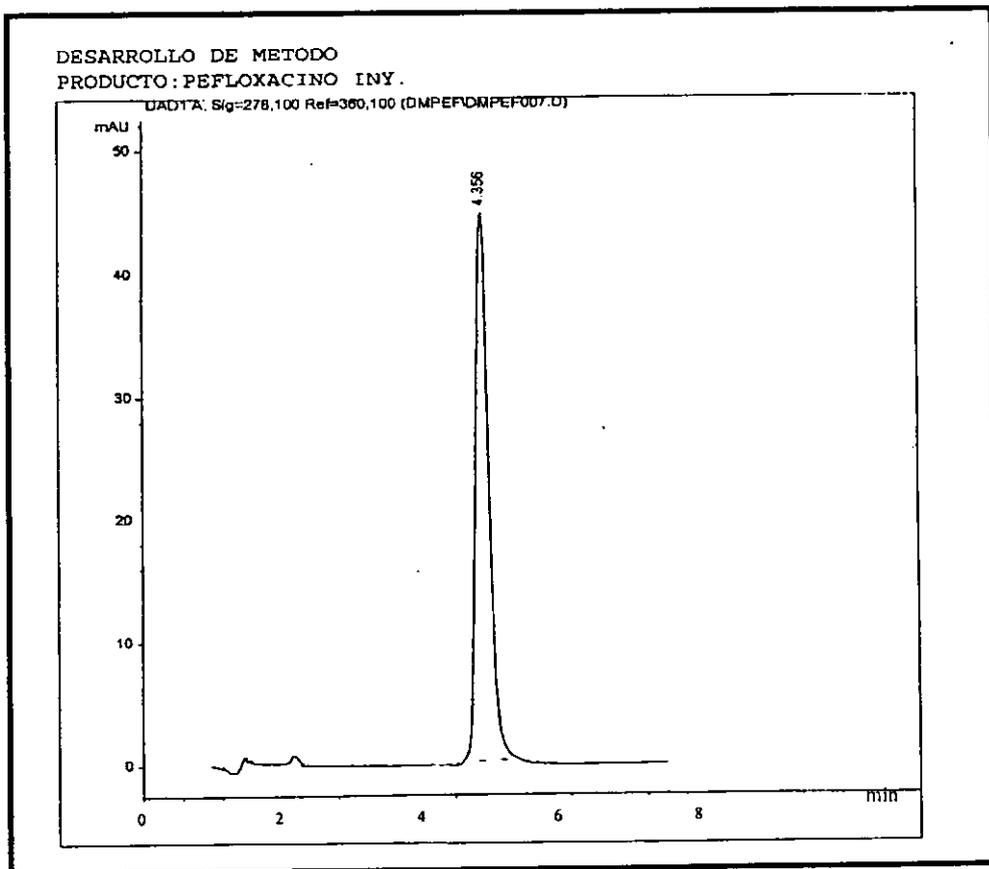


Figura 8. Cromatograma de una muestra de Pefloxacino inyectable, empleando las condiciones experimentales I.

3.- Cromatogramas obtenidos de las condiciones cromatográficas II.

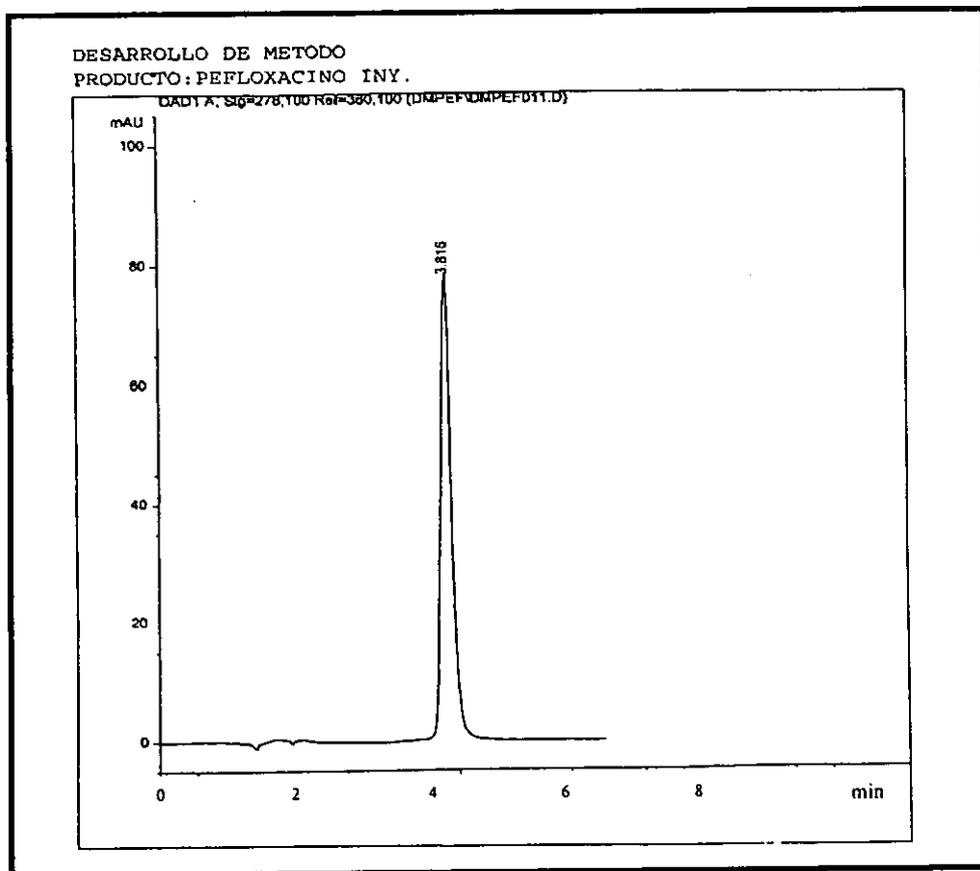


Figura 9. Cromatograma de una muestra de Pefloxacino inyectable, empleando las condiciones experimentales II.

4.- Cromatogramas obtenidos de las condiciones cromatográficas III.

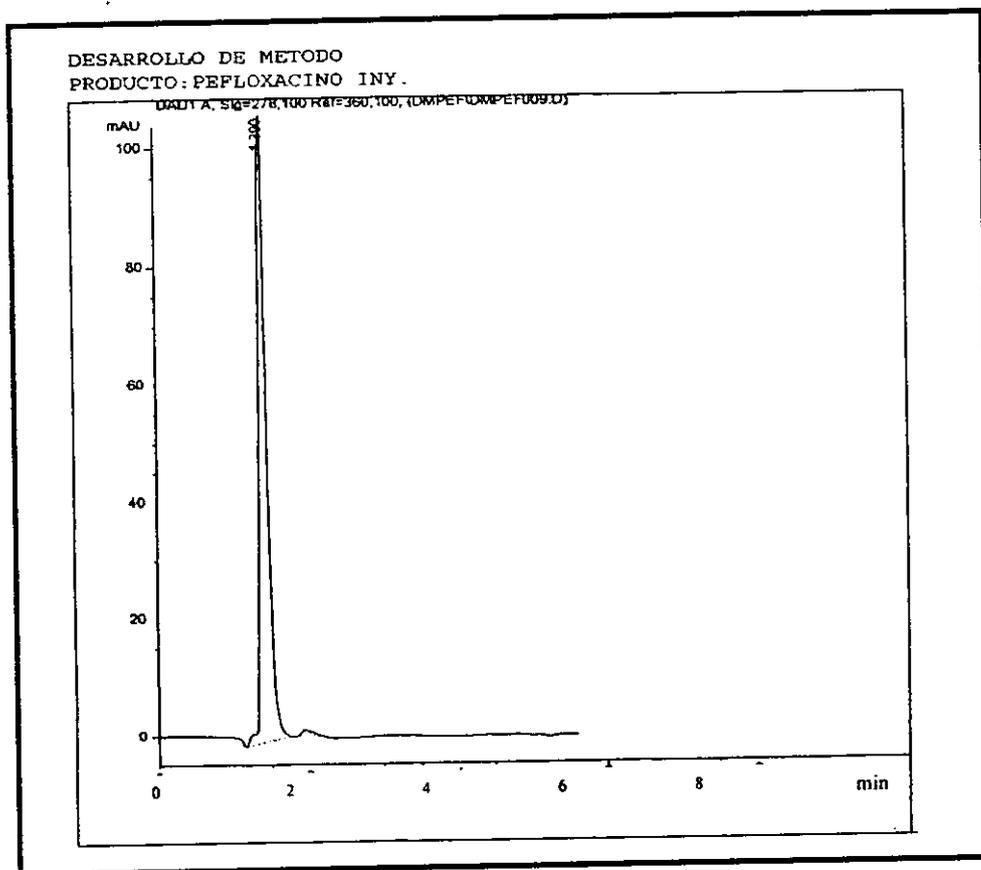


Figura 10. Cromatograma de una muestra de Pefloxacino inyectable, empleando las condiciones experimentales III.

5.- Cromatogramas obtenidos de las condiciones cromatográficas IV.

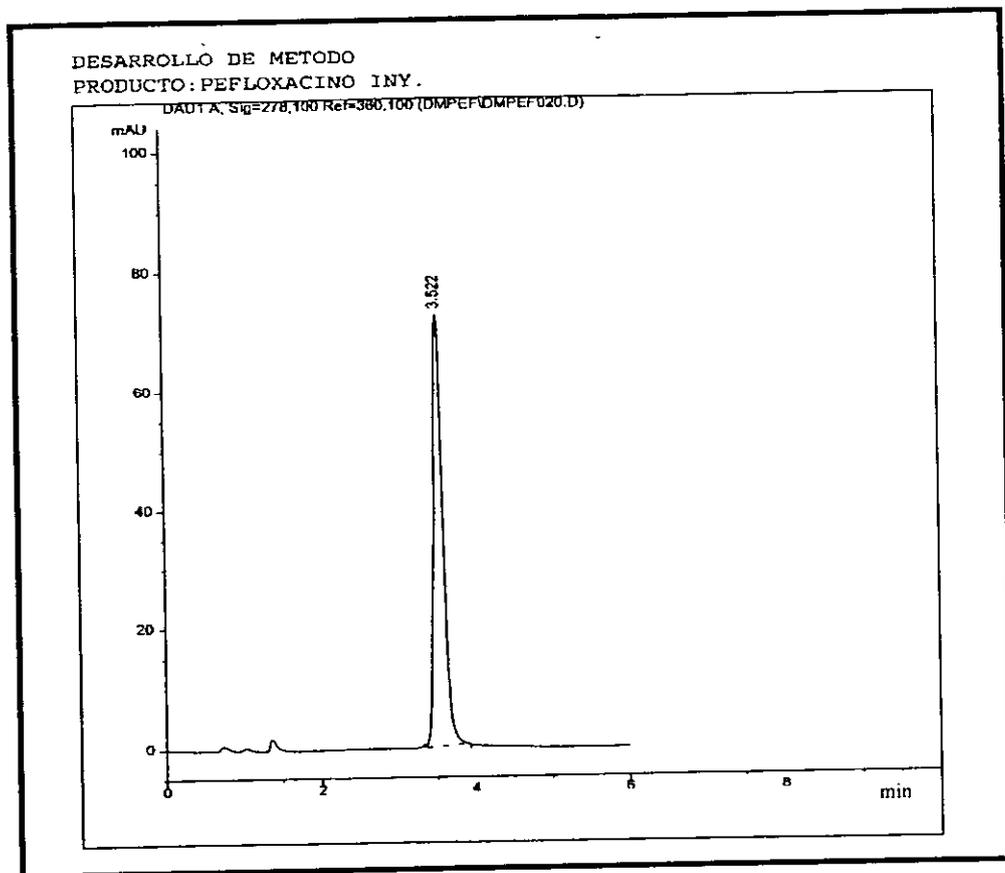


Figura 11. Cromatograma de una muestra de Pefloxacino inyectable, empleando las condiciones experimentales IV.

6.- Cromatogramas correspondientes a la especificidad del inyectable Pefloxacin.

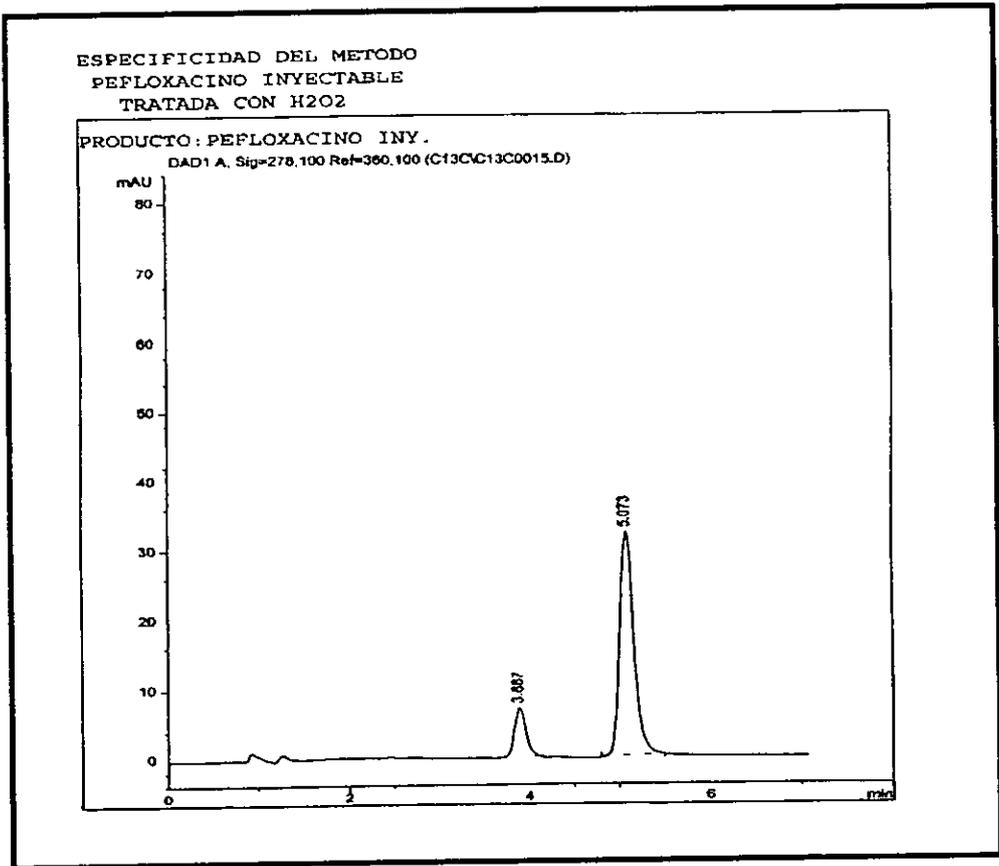


Figura 12. Cromatograma de una muestra de Pefloxacin inyectable, tratada con H₂O₂, empleando las condiciones experimentales IV.

7.- Isogramas correspondientes a Pefloxacinio inyectable.

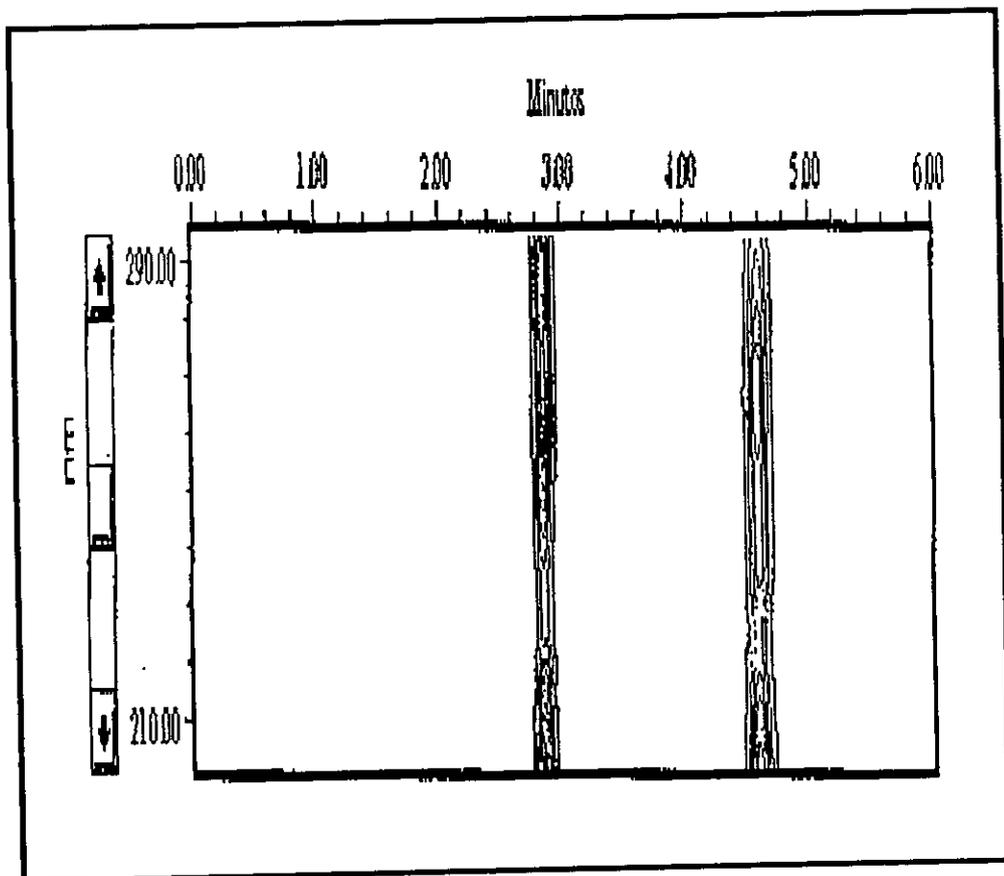


Figura 13. Isograma correspondiente a una muestra de Pefloxacinio inyectable.

8.- Análisis de pureza de Pefloxacino.

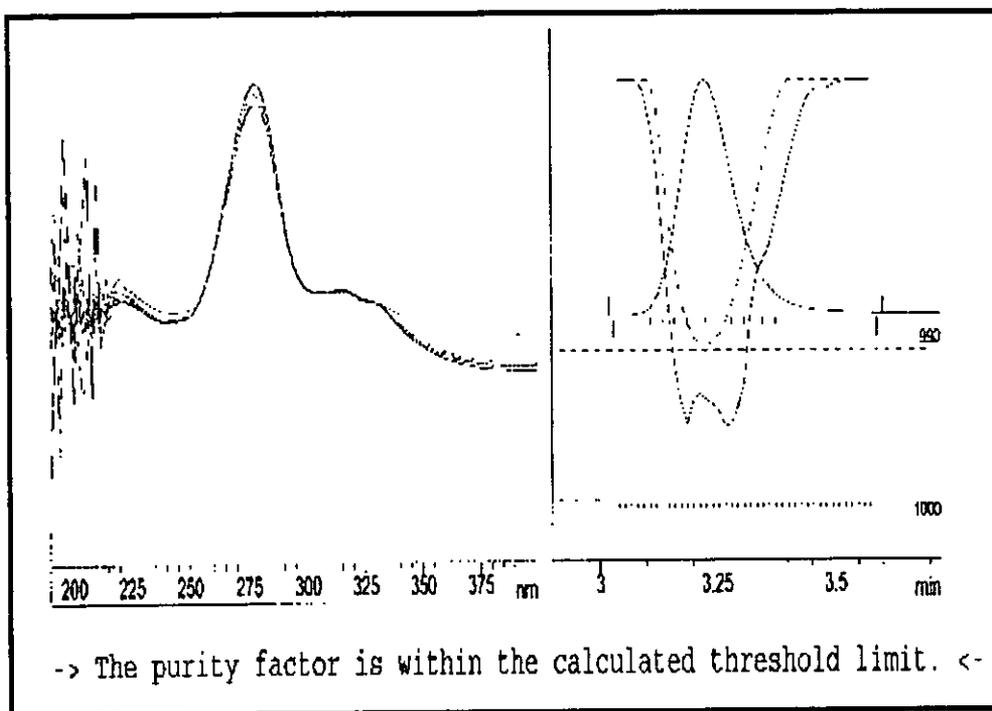


Figura 14. Análisis de pureza del pico correspondiente a una solución del estándar de Pefloxacino, utilizando todos los espectros, se observa que el factor de pureza es de 990, por lo que esta dentro del limite (1000) permitido.

ANEXO

II

**CALIFICACIÓN
DEL EQUIPO
CROMATOGRÁFICO**

I. OBJETIVO

- 1.1 Calificar el equipo cromatográfico Hewlett Packard, Asterix 1100, para determinar si éste necesita ser calibrado o se encuentra en condiciones adecuadas para ser utilizado.

II. INTRODUCCION

El reservorio es el recipiente que contiene la fase móvil, generalmente son frascos de vidrio o polímero resistente que no interactue con la fase móvil y bien cerrado para prevenir la introducción de partículas ambientales al sistema.

Las bombas en HPLC tienen la función de impulsar la fase móvil proveniente del reservorio hacia el inyector y de allí hacia la columna, están constituidas en forma general de acero inoxidable, zafiro, rubí y teflón evitando con esto alguna interacción de la fase móvil con la bomba.

El inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal de solvente a través del sistema, este debe ser fácil de operar, inerte a la muestra o fase móvil, preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida al sistema, no debe provocar diluciones importantes de la muestra inyectada.

El detector es la parte del equipo que permite "ver" y "ubicar" en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica, hay de varios tipos, pueden ser generales o selectivos, los detectores deben tener ciertas características como son:

1. Amplio rango de respuesta
2. Responder a todos los componentes
3. No afectarse por cambios en la temperatura.
4. Poseer una buena relación señal/ruido
5. No contribuir al ensanchamiento de banda extracolumnar
6. Poseer una respuesta lineal
7. Ser sensible
8. No destruir la muestra

III. EQUIPO

- 5.1 Cromatografo de líquidos de alta resolución (Automático)
Bomba cuaternaria G1311A, Serie: US53600781.
Columna con termostato (ColComp) G1316A, SERIE-US54001027
Detector con arreglo de diodos G1315A, Serie - DE61801174
Automuestreador (ALS) G1313A, Serie- DE54901581
Bomba desgasificadora (Degasser) G1322A, Serie - JP63202175
Procesador Pentium Ultra VGA 128 Hewlett Packard
- 5.2 Balanza analítica Toledo
- 5.3 Equipo de filtración Millipore

IV. MATERIAL

- 6.1 Material de vidrio utilizado comúnmente.
- 6.2 Membranas Millipore 0.45 micras
- 6.3 Viales con tapón.
- 6.4 Probeta de 10 ml

V. REACTIVOS

- 7.1 Metil y propil parabeno (estándar secundario)
- 7.2 Agua desionizada grado HPLC o equivalente
- 7.3 Metanol grado HPLC

VI. PROCEDIMIENTO

8.1 Condiciones cromatográficas

Columna:	Fase reversa.	Fase móvil:	Metanol:Agua (50:50)
Vel.Flujo:	1.0 ml/min.	Inyección:	20 mcl
Long.de onda:	254 nm	Detector:	(UV/V)

8.2 Fase móvil:

- 8.2.1 Filtrar 1000 ml de agua desionizada, utilizando un equipo de filtración Millipore, mediante una membrana HA, Millipore de 0.45 micras y colocarlo en un reservorio, identificar correctamente.
- 8.2.2 Filtrar 1000 ml de metanol grado HPLC, utilizando un equipo de filtración Millipore, mediante una membrana HV, Millipore de 0.45 micras, y colocarlo en un reservorio, identificar correctamente.
- 8.2.3 Filtrar 1000 ml de Acetonitrilo grado HPLC, utilizando un equipo de filtración Millipore, mediante una membrana HV, Millipore de 0.45 micras, y colocarlo en un reservorio, identificar correctamente.

8.3 Preparación de un estándar de referencia.

Pesar 20 mg de metilparabeno y 20 mg de Propilparabeno y transferir a un matraz volumétrico de 100 ml, disolver con una mezcla de Metanol : Agua (50:50), aforar con el mismo medio, transferir una alicuota de 5 ml en un matraz volumétrico de 100 ml y aforar con la mezcla metanol : Agua (50:50), mezclar y filtrar a través de membranas de 0.45 micras y colocar en un vial.

8.4 Preparación del equipo .

Depurar las tuberías, haciendo pasar por ellas:

- 1.- 100% de agua
- 2.- 100% de Metanol
- 3.- 100% de Acetonitrilo

Repetir el paso 3, 2, 1, en este orden.

8.5 Preparación de la columna.

Si se trata de una columna nueva debe hacerse pasar 100% de acetonitrilo durante 30 minutos, posteriormente hacer pasar la fase móvil, hasta obtener una línea base estable.

Si se trata de una columna en uso, se realiza el método de lavado correspondiente, y posteriormente se hace pasar la fase móvil hasta obtener una línea base estable.

8.6 Procedimiento:**EVALUACION DE LA BOMBA**

Respuesta a medir: Volumen de fase móvil liberada y Presión registrada.

Especificación: C.V. < 1%

- 1.- Realizar 6 mediciones repetidas del solvente liberado en los siguientes niveles de flujo y registrar los volúmenes medidos.
- 2.- Registrar las presiones observadas para cada nivel de flujo.
- 3.- Calcular media, desviación estándar y coeficiente de variación.

EVALUACION DEL INYECTOR

Respuesta a medir : Volumen inyectado.

- 1.- Preparar una solución de concentración conocida de un estándar de pureza conocida e inyectar por triplicado 5 diferentes volúmenes de dicha muestra, registrar la respuesta del detector en una tabla y relacionarla con el volumen inyectado, de la siguiente forma:

VOL.INYECTADO	RESPUESTA 1	RESPUESTA 2	RESPUESTA 3
10			
20			
30			
40			
50			

- 2.- Calcular la ordenada al origen (b), pendiente (m), coeficiente de determinación (r) y coeficiente de correlación (r^2), mediante un análisis de regresión lineal.

Especificación : $b \approx 0$ $m \approx 1$ $r \approx 0.99$ $r^2 \approx 0.98$

EVALUACION DEL DETECTOR

Respuesta a medir: Picos obtenidos.

- 1.- Preparar 5 soluciones de concentraciones conocidas de un estándar incluyendo la del 100% de dicho método, inyectar por triplicado cada concentración.
- 2.- Realizar las determinaciones de absorbancia de las mismas muestras (las 5 concentraciones por triplicado) en el Espectrofotómetro Hewlett Packard 8453, previamente calibrado y a la misma longitud de onda.
- 3.- Registrar las respuestas de cada determinación en una tabla como la siguiente:

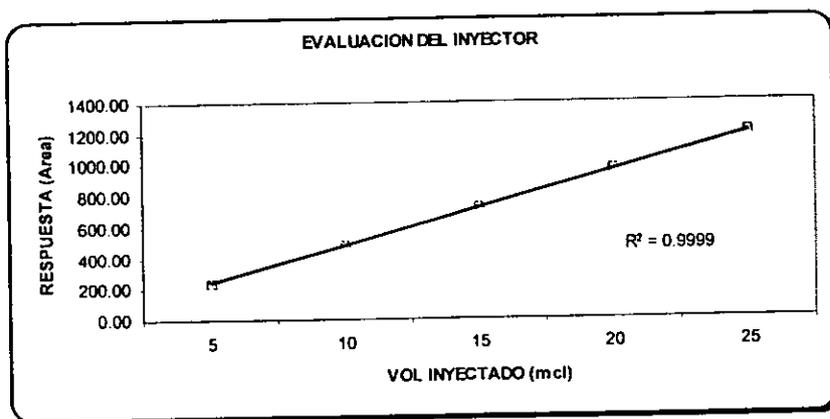
CONCENTRACION	RESPUESTA 1		RESPUESTA 2		RESPUESTA 3	
	AREA	ABS.	AREA	ABS.	AREA	ABS.
60%						
80%						
100%						
120%						
140%						

- 4.- Determinar la equivalencia entre el detector del HPLC y el de otro instrumento, comparando las linealidades de ambas curvas, para ello realizar un análisis de regresión de Concentración vs. Area y Concentración vs. Absorbancia.
- 6.- Evaluar m, b, r y r^2 para cada curva y evaluar paralelidad.

EVALUACION DEL INYECTOR

VOL.INY.	AREA
5	235.83
5	236.95
5	236.85
10	473.93
10	475.34
10	477.07
15	718.81
15	724.97
15	723.82
20	965.45
20	964.85
20	960.66
25	1193.81
25	1196.14
25	1192.64

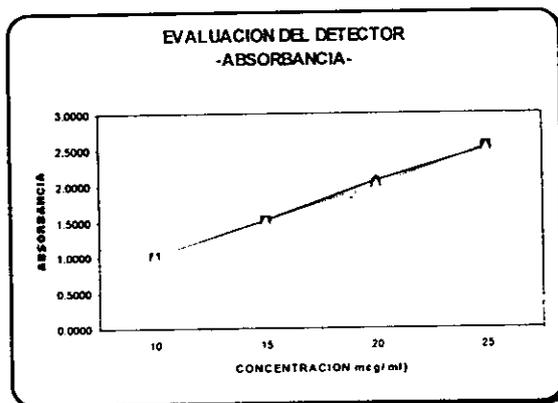
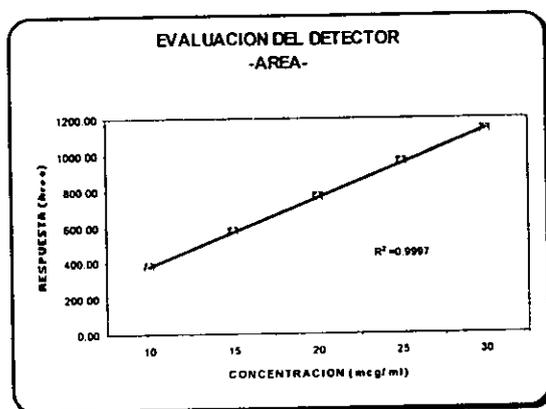
ANALISIS DE REGRESION	
m=	48.0703708
b=	-2.58107267
r ² =	0.999846022
r=	0.999923008



EVALUACION DEL DETECTOR

CONCENTRACION	AREA	ABSORBANCIA
10	379.58	1.0080
10	380.28	1.0072
10	379.68	1.0075
15	565.96	1.5032
15	567.38	1.5068
15	567.25	1.4976
20	757.67	2.0493
20	758.09	1.9856
20	758.11	1.9946
25	955.88	2.5090
25	956.66	2.5350
25	954.98	2.5037
30	1128.47	*
30	1127.56	*
30	1130.08	*

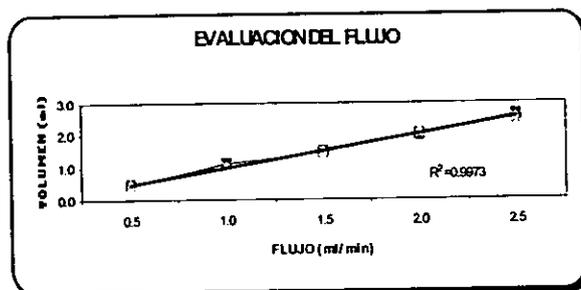
ANALISIS DE REGRESION AREA	ANALISIS DE REGRESION CONCENTRACION
m= 37.7336624	m= 0.100646
b= 3.168784667	b= -0.002346667
r ² = 0.999615792	r ² = 0.999184178
r= 0.999807878	r= 0.999592006



EVALUACION DE LA BOMBA

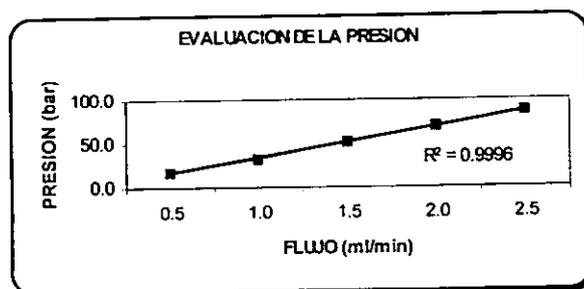
EVALUACION DEL FLUJO

FLUJO ml/min	VOLUMEN OBSERVADO ml		
	0.5	0.5	0.5
1.0	1.1	1.0	1.0
1.5	1.5	1.5	1.5
2.0	2.0	2.1	2.0
2.5	2.6	2.5	2.5



EVALUACION DE LA PRESION EN LA COLUMNA

FLUJO ml/min	PRESION bar
0.5	17.0
1.0	33.0
1.5	51.0
2.0	69.0
2.5	86.0



ANEXO

III

**CALIFICACIÓN DE
LA COLUMNA
CROMATOGRÁFICA**

VI. CONCLUSION

De acuerdo a los resultados obtenidos de la evaluación de las características del cromatografo, y según especificaciones de trabajo de éste, se concluye que se encuentra en condiciones óptimas de trabajo.

I. OBJETIVO

- Asegurar la eficiencia de la columna utilizada en cromatografía líquida de alta resolución, para el análisis de Pefloxacino en una forma farmacéutica inyectable.

II. INTRODUCCION

COLUMNAS.

La columna empleada para HPLC puede considerarse como el corazón del sistema cromatográfico, pues en ella tiene lugar la separación de los componentes presentes en las muestras, por consecuencia algún defecto o deterioro en la columna conducirá inevitablemente a separaciones pobres y resultados no confiables, independientemente de otros factores que pudieran afectar al análisis.

El material de relleno de la columna no es tan resistente como el acero que la rodea, por lo que su uso debe ser el más correcto y tener cuidados especiales, además de darle mantenimiento. La vida útil de una columna depende de muchos factores como pueden ser: tipo, naturaleza de la muestra, tipo de solvente, temperatura de trabajo, etc. afectando con ello el número de inyecciones probables a realizar.

Es un hecho que si una columna se emplea sólo para un tipo de muestras, tiene un mayor tiempo de vida útil que aquella que se emplea para varias muestras.

Para evaluar los defectos de cada fase móvil y tipo de muestra sobre la columna cromatográfica, con la finalidad de evaluar las metodologías y tener un historial de la columna, es necesario destinar una columna para cada tipo de muestra y llevar por lo tanto un registro de estas.

EFICIENCIA DE LA COLUMNA.

La pérdida de la eficiencia de las columnas de HPLC, esta dado en forma normal por el uso, esto es el número de inyecciones que se realicen, esto puede no constituir un problema, ya que las columnas deben descartarse luego de unas 2,000 ó 3,000 inyecciones, siendo esta una regla muy general, ya que depende muchas veces del tipo de separación efectuada, naturaleza de la muestra, limpieza de la columna, tipo de fase móvil empleada, mantenimiento que en general se le da a la columna, cuando la pérdida de la eficiencia es notoria hay que determinar en que condiciones de la columna se esta trabajando, para poder evaluar dichas condiciones es necesario aplicar un método de calificación de columnas, en el cual se determinen los parámetros condicionantes de la eficiencia, tales como:

➤ **Factor de capacidad (K)**

$$K = \frac{\text{No. de moles del soluto en la fase estacionaria}}{\text{No. de moles del soluto en la fase móvil}} = \frac{(T_n - T_o)}{T_o}$$

Donde: T_n = Tiempo de retención del enésimo pico.

T_o = Tiempo de la primera respuesta evidente del cromatograma.

➤ **Factor de separación (α),**

Es el cociente entre los factores de capacidad de un par de picos:

$$\alpha = (K'2/K'1)$$

➤ **Resolución (Rs).**

Esta expresión se calcula para un par de picos adyacentes como:

$$R = \frac{(T_2 - T_1)}{1/2 (W_2 + W_1)}$$

Donde :

T_1 y T_2 son los tiempos de retención de los picos 1 y 2

W_1 y W_2 son los anchos de los picos medidos desde su base.

➤ **Platos teoricos (N)**

$$N = 16 (T_n / W_{TAN})^2$$

Donde: T_n = Tiempo de retención del pico enésimo
 W_{TAN} = Ancho del pico medido sobre la línea base.

➤ **Asimetría de picos (As).**

$$As (10\%) = b/a$$

$$As (5\%) = b'/a'$$

Donde a, b, son las medidas entre la línea que une al máximo del pico con la línea base y los extremos anterior y posterior del pico, tomados al 10% de su altura y b' y a' son los mismos parámetros al 5% de la altura.

III. EQUIPO

- Cromatografo de líquidos de alta resolución (Automático)
 Bomba cuaternaria G1311A, Serie: US53600781.
 Columna con termostato (ColComp) G1316A, sERIE-US54001027
 Detector con arreglo de diodos G1315A, Serie - DE61801174
 Automuestreador (ALS) G1313A, Serie- DE54901581
 Bomba desgasificadora (Degasser) G1322A, Serie - JP63202175
 Procesador Pentium Ultra VGA 128 Hewlett Packard
- Balanza analítica Toledo
- Equipo de filtración Millipore

IV. MATERIAL

- Material de vidrio utilizado comúnmente.
- Membranas Millipore 0.45 micras
- Viales con tapón

V. REACTIVOS

- Metil y propil parabeno .
- Agua desionizada grado HPLC o equivalente
- Metanol grado HPLC

VI. PROCEDIMIENTO

➤ Condiciones cromatográficas

Columna: C-18

Fase móvil: Metanol:Agua (50:50)

Vel.Flujo: 1.0 ml/min.

Inyección: 20 µl

Detector: Detector con arreglo de diodos (UV/V)

Long.de onda: 254 nm

➤ Medio de dilución:

En un recipiente adecuado colocar 500 ml de agua desionizada (HPLC), adicionar 500 ml de metanol (HPLC) y mezclar para obtener una proporción 50:50.

➤ Fase móvil:

Metanol : Agua (50:50)

- Filtrar 1000 ml de agua desionizada, utilizando un equipo de filtración Millipore, mediante una membrana HA, Millipore de 0.45 micras y colocarlo en un reservorio, identificar correctamente.
- Filtrar 1000 ml de metanol grado HPLC, utilizando un equipo de filtración Millipore, mediante una membrana HV, Millipore de 0.45 micras, y colocarlo en un reservorio, identificar correctamente.

➤ **Preparación de un estándar de referencia.**

Pesar aproximadamente 20 mg de propilparabeno y 20 mg de metilparabeno y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar 50 ml del medio de dilución y agitar por un periodo de 10 minutos, aforar con medio de dilución, transferir una alícuota de 5 ml de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100 ml, aforar con medio de dilución y mezclar.

➤ **Preparación del equipo .**

Depurar las tuberías, haciendo pasar por ellas:

- 1.- 100% de agua
- 2.- 100% de Metanol
- 3.- 100% de Acetonitrilo.

Repetir el paso 3, 2, 1, en este orden.

➤ **Preparación de la columna.**

- 1.- Hacer pasar 100% de acetonitrilo durante 30 minutos, posteriormente hacer pasar la fase móvil metanol: agua (50:50), hasta obtener una línea base estable.

➤ **Procedimiento:**

Inyectar por triplicado 20 µl de la solución patrón hasta que el C.V. entre cada una de las respuestas por cada inyección, no sea mayor a 1.0%.

➤ **Determinar los parámetros de evaluación de la columna.**

- * Factor de capacidad
- * Factor de separación
- * Resolución
- * Número de platos teóricos
- * Altura equivalente de un plato teórico
- * Asimetría de picos

RESULTADOS DE LA EVALUACION DE LA COLUMNA
--

COLUMNA: SYMMETRY WATERS
 No. SERIE: T62931-F31
 PRODUCTO : PEFLOXACINO INYECTABLE.

TIPO: C-18
 15cm x 3.9mm.

CARACTERISTICA	ESPECIFICACIONES PROVEEDOR	RESULTADO INICIAL
N	2000-10,000	2905.67 7772.33
Rs	>20	31.4216
K'	>1	1.1435 5.2258
α	>1	4.5698
As	0.8-1.2	1.6217 1.1407

CONDICIONES DE EVALUACION

COMPUESTOS: METIL Y PROPIL PARABENO
 FASE MOVIL: METANOL:AGUA (50:50)
 CONCENTRACION: 10 mcg/ml
 LONG. ONDA. 254 nm
 FLUJO: 1.0 ml/min
 VOL. INYECCION: 20 mcl

CONCLUSION: La columna se encuentra en condiciones óptimas para ser utilizada y obtener picos simétricos y resueltos según la metodología que se utilice.