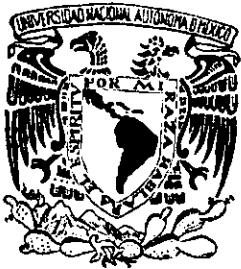


18



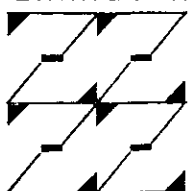
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

Desarrollo y Validación de un Método Analítico  
por Cromatografía Líquida de Alta Resolución  
para la Cuantificación de Etofenamato en  
la Forma Farmacéutica Gel.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A:  
VERONICA PEREZ RAMIREZ

U N A M  
F E S  
Z A R A G O Z A



LO HUMANO ES JE  
DE NUESTRA FLEXION

MEXICO, D. F.

524432000



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

<b>PRESIDENTE</b>	<b>M en C. A LOURDES CASTILLO GRANADA</b>
<b>VOCAL</b>	<b>M en C. PATRICIA PARRA CERVANTES</b>
<b>SECRETARIO</b>	<b>Q. F. B. GUILLERMINA ROJAS FERNANDEZ</b>
<b>SUPLENTE</b>	<b>Q. ANDRES AVILA LEAL</b>
<b>SUPLENTE</b>	<b>Q. F. B. ANTONIO HERNANDEZ CARDOSO</b>

## **SITIO DONDE SE REALIZÓ EL TEMA**

**SANOFI WINTHROP, S. A DE C V**

**A**

Toda mi familia, en especial a Luis Miguel, Anita, Demis  
y Josafath

**A**

Todos mis amigos y a Pepe

**A la M. en C. Paty Parra Cervantes**

Por su apoyo y amistad.

**Al Q. Andrés Avila Leal**

Por su apoyo para la realización de esta tesis

**Al laboratorio Sanofi Winthrop S.A. de C.V.**

Por las facilidades en la realización de este trabajo

# ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES TEÓRICOS	2
1.1 ETOFENAMATO	2
1.1.1 Propiedades Físicas	2
1.1.1.1 Descripción	2
1.1.1.2 Rango de Ebullición	2
1.1.1.3 Solubilidad	2
1.1.1.4 Índice de Refracción	2
1.1.1.5 Absorción Ultravioleta	2
1.1.2 Propiedades Químicas	3
1.1.3 Propiedades Farmacológicas	3
1.1.3.1 Acción Farmacológica	3
1.1.3.2 Metabolismo	3
1.1.3.3 Dosis y Vía de Administración	4
1.1.3.4 Toxicidad	4
1.2 PIEL	5
1.2.1 Estructura de la Piel	5
1.2.2 Factores Biológico	7
1.2.2.1 Estado de la piel	7
1.2.2.2 Topografía de la Zona de Aplicación en la piel	7

1.2.2.3	Grado de Hidratación de la piel.....	7
1.2.2.4	Otros Factores Biológicos en la piel.....	8
1.2.3.	Factores Físicoquímicos del Fármaco.....	8
1.2.3.1	Concentración del Fármaco Penetrante.....	8
1.2.3.2	Caracteres de Solubilidad del Fármaco Penetrante.....	9
1.2.3.3	Excipiente.....	9
1.2.4	Proceso para atravesar la Membrana Celular.....	10
1.2.4.1	Proceso Pasivo.....	10
1.2.4.2	Electrolitos débiles e influencia del pH.....	10
1.2.4.3	Transporte de Membrana mediada por Portadores.....	10
1.3.	SISTEMAS DISPERSOS.....	11
1.3.1	Definición.....	11
1.3.2	Clasificación.....	11
1.4.	GEL.....	12
1.4.1	Definición.....	12
1.4.2	Características Físicas.....	12
1.4.3	Clasificación.....	13
1.4.4	Mecanismo y Modo de Acción.....	14
1.4.5.	Componentes.....	14
1.4.5.1	Clasificación de los Componentes.....	14
1.4.5.2.	Requisitos de los Componentes.....	15
1.4.5.3.	Características de Agente de Gelación.....	17

1.4.5.4. Clasificación de Bases .....	18
1.4.6 Condiciones y Método de Aplicación .....	21
1.4.7 Conservación.....	21
1.4.8 Acondicionamiento .....	22
<b>1.5 CROMATOGRAFÍA .....</b>	<b>23</b>
1.5.1 Definición .....	23
1.5.1.1 Cromatografía.....	23
1.5.1.2. Fase Estacionaria.....	23
1.5.1.3. Fase Móvil.....	23
1.5.2. Clasificación .....	23
1.5.2.1. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)....	24
1.5.3. Mecanismo de Separación.....	29
1.5.3.1 Cromatografía de Adsorción .....	29
1.5.3.2 Cromatografía de Partición.....	29
1.5.3.3. Cromatografía de Intercambio Iónico.....	29
1.5.3.4 Cromatografía por Exclusión.....	30
1.5.4. Parámetros Cromatográficos .....	30
1.5.4.1 Tiempo de Retención ( $t_r$ ) .....	30
1.5.4.2 Tiempo Muerto ( $t_0$ ) .....	30
1.5.4.3 Tiempo de Retención Corregido ( $t_r'$ ) .....	30
1.5.4.4. Factor de Capacidad ( $k$ ) .....	31
1.5.4.5 Número de Platos Teóricos (N) .....	32

1. 5. 4. 6	Altura Equivalente de un Plato Teórico (AEPT).....	32
1. 5. 4. 7.	Selectividad.....	33
1. 5. 4. 8.	Resolución (R).....	34
1. 5. 4. 9	Asimetría (T).....	34
1. 5. 5.	Características de CLAR.....	35
1. 5. 5. 1.	Versatilidad.....	35
1. 5. 5. 2	Rapidez.....	35
1. 5. 5. 3	Reproducibilidad y Estabilidad.....	35
1. 5. 5. 4.	Sensibilidad.....	36
1. 5. 6	Equipo.....	36
1. 5. 6. 1	Fase Móvil.....	36
1. 5. 6. 2	Reservorio.....	37
1. 5. 6. 3	Bombas Cromatográficas.....	39
1. 5. 6. 4	Control de Flujo en CLAR.....	40
1. 5. 6. 5	Atenuadores de Pulso.....	41
1. 5. 6. 6	Sistemas de Inyección de la Muestra.....	42
1. 5. 6. 7	Precolumnas.....	42
1. 5. 6. 8.	Columna Cromatográfica.....	43
1. 5. 6. 9	Detectores.....	49
1. 6.	VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	55
1. 6. 1	Diseño.....	55
1. 6. 1. 1	Revisión Bibliográfica.....	55



1. 6. 1. 2. Adaptación Parcial.....	55
1. 6. 1. 3. Adaptación Total .....	55
1. 6. 2. Desarrollo.....	56
1. 6. 2. 1. Condiciones Cromatográficas Preliminares.....	56
1. 6. 2. 2. Eficiencia de Extracción.....	56
1. 6. 3. Definición .....	56
1. 6. 4. Parámetros .....	57
1. 6. 4. 1. Linealidad del Sistema.....	57
1. 6. 4. 2. Precisión del Sistema.....	59
1. 6. 4. 3. Linealidad del Método.....	61
1. 6. 4. 4. Exactitud del Método .....	65
1. 6. 4. 5. Precisión del Método .....	67
1. 6. 4. 5. 1. Repetibilidad.....	67
1. 6. 4. 5. 2. Reproducibilidad del Método.....	68
1. 6. 4. 6. Estabilidad de la Muestra .....	71
1. 6. 4. 7. Especificidad para control de calidad.....	74
1. 6. 4. 8. Especificidad para la Estabilidad.....	76
1. 6. 4. 9. Tolerancia.....	77
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>79</b>
<b>III. OBJETIVOS .....</b>	<b>81</b>
<b>3. 1. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>81</b>
<b>3. 2. OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>81</b>

<b>IV. HIPOTESIS</b> .....	<b>82</b>
<b>V. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>83</b>
<b>5. 1. EQUIPO</b> .....	<b>83</b>
<b>5. 2. MATERIAL</b> .....	<b>83</b>
<b>5. 3. REACTIVOS</b> .....	<b>83</b>
<b>5. 4. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO</b> .....	<b>84</b>
<b>5. 5. COMPOSICIÓN DEL GEL</b> .....	<b>86</b>
<b>5. 6. MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN</b> .....	<b>86</b>
<b>5. 7. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO</b> .....	<b>87</b>
<b>5. 7. 1. Linealidad del Sistema</b> .....	<b>87</b>
<b>5. 7. 2. Precisión del Sistema</b> .....	<b>88</b>
<b>5. 7. 3. Linealidad del Método Analítico</b> .....	<b>88</b>
<b>5. 7. 4. Exactitud del Método Analítico</b> .....	<b>88</b>
<b>5. 7. 5. Precisión del Método Analítico</b> .....	<b>88</b>
<b>5. 7. 5. 1. Repetibilidad del Método</b> .....	<b>88</b>
<b>5. 7. 5. 2. Reproducibilidad del Método</b> .....	<b>89</b>
<b>5. 7. 6. Estabilidad de la Muestra a Analizar</b> .....	<b>89</b>
<b>5. 7. 7. Tolerancia</b> .....	<b>89</b>
<b>5. 7. 8. Especificidad para Control de Calidad</b> .....	<b>90</b>
<b>5. 7. 9. Especificidad para la Estabilidad</b> .....	<b>90</b>
<b>VI. RESULTADOS</b> .....	<b>91</b>
<b>6. 1. LINEALIDAD DEL SISTEMA</b> .....	<b>91</b>

6. 2. PRECISIÓN DEL SISTEMA.....	93
6. 3. LINEALIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	94
6. 4. EXACTITUD DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	99
6. 5. PRECISIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO .....	100
6. 5. 1. Repetibilidad del método .....	100
6. 5. 2. Reproducibilidad del método .....	100
6. 6. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA .....	103
6. 7. ESPECIFICIDAD PARA CONTROL DE CALIDAD.....	104
6. 8. ESPECIFICIDAD PARA LA ESTABILIDAD .....	104
6. 9. TOLERANCIA DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	110
VII. ANALISIS DE RESULTADOS.....	111
VIII. CONCLUSIONES .....	116
IX. SUGERENCIAS.....	117
X. REFERENCIAS.....	118

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la Piel.....	6
Figura 2. Clasificación de los Sistemas Dispersos basados en su estado fisico.....	11
Figura 3. Clasificación de Cromatografía de acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas.....	24
Figura 4. Instrumentación Clásica en CLAR.....	36
Figura 5. Procedimiento para el Desarrollo de un Método Analítico.....	84
Figura 6. Tabla de Linealidad del Sistema.....	92
Figura 7. Gráfica de Linealidad del Sistema.....	92
Figura 8. Tabla de Precisión del Sistema.....	93
Figura 9. Análisis de Varianza para la Linealidad del Método Analítico.....	95
Figura 10. Gráfica de Linealidad del Método Analítico.....	98
Figura 11. Tabla de Linealidad del Método Analítico.....	98
Figura 12. Tabla de Exactitud del Método Analítico.....	99
Figura 13. Tabla de Análisis de Varianza para Reproducibilidad del Método Analítico.....	102
Figura 14. Tabla de Estabilidad de la Muestra a Analizar.....	103
Figura 15. Especificidad para Control de Calidad Placebo solo .....	104
Figura 16. Especificidad para Control de Calidad del Estándar de Etofenamato.....	105
Figura 17. Especificidad para Control de Calidad del Placebo Cargado .....	106
Figura 18. Especificidad para la Estabilidad del Estándar Hidrólisis Básica.....	107
Figura 19. Especificidad para la Estabilidad Placebo Hidrólisis Básica.....	108
Figura 20. Especificidad para la Estabilidad Placebo Cargado Hidrólisis Básica.....	109
Figura 21. Especificidad para la Estabilidad Estándar Hidrólisis Básica Espectros Normalizados..	110
Figura 22. Tabla de Tolerancia del Método Analítico.....	110

## **INTRODUCCIÓN.**

La Validación de un Método Analítico es el proceso mediante el cual queda establecido, a través de estudios experimentales, que su capacidad satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. Esta capacidad se expresa en términos de parámetros estadísticos como: linealidad, precisión, repetibilidad, reproducibilidad, especificidad, entre otros.

Durante el proceso de fabricación, los productos farmacéuticos deberán contar con un alto grado de calidad, de tal manera que el producto final tenga las características físicas y químicas especificadas, ante tales requerimientos, aumenta la necesidad desarrollar métodos de análisis confiables, que nos permitan verificar dicha calidad; así como la necesidad de validar los mismos.

Debido a que el procedimiento actual para la evaluación del principio activo Etofenamato, en la forma farmacéutica gel, es una técnica espectrofotométrica que no cumple con todos los parámetros de validación del método analítico principalmente en la reproducibilidad y exactitud, se requiere otro método que sí cumpla.

En el presente estudio se establece el desarrollo de un método analítico y los parámetros instrumentales para la cuantificación de Etofenamato en una forma farmacéutica gel, por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Una vez establecido el método se realiza la validación a través del establecimiento de los parámetros: linealidad y precisión del sistema, linealidad y exactitud del método, precisión del método (repetibilidad y reproducibilidad), estabilidad de la muestra en diferentes condiciones, tolerancia del método, especificidad del método para control de calidad y estabilidad en condiciones de degradación normal y acelerada.

# I. ANTECEDENTES.

## 1. 1. ETOFENAMATO.

### 1. 1. 1. Propiedades Físicas.

#### 1. 1. 1. 1. Descripción.

Aceite viscoso amarillo claro (1,2)

#### 1. 1. 1. 2. Rango de Ebullición.

De 130°-135° C termolábil a 180 °C (1,2).

#### 1. 1. 1. 3. Solubilidad.

Soluble en pocos alcoholes, acetato de etilo, acetona, cloroformo, éter, benceno; poco soluble en agua a 22° C a la concentración de 0 16 mg/100 mL (1,2).

#### 1. 1. 1. 4. Índice de Refracción.

$n = 1.564$  (1,2)

#### 1. 1. 1. 5. Absorción Ultravioleta.

En soluciones ácidas

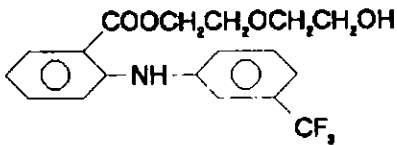
284 nm (  $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 287$  )

349 nm (  $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 165$  ) (1,2)

### 1. 1. 2. Propiedades Químicas.

Nombre químico es N - (  $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\alpha$  - Trifluoro - m - Tolil ) antranilato de 2- (2-hidroxi etoxi) etilo <sup>(1,2)</sup>

De fórmula condensada: C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>4</sub>



### 1. 1. 3. Propiedades Farmacológicas.

#### 1. 1. 3. 1. Acción Farmacológica.

El etofenamato está indicado en todas las afecciones agudas y crónicas del sistema osteomuscular, tanto de origen reumático como traumático. Tendopatías (tendinitis, inserto tendodopatías, epicondilitis). Periartropatías húmero-escapular, síndrome de hombro, brazo, síndrome lumbar, isquialgia, síndrome cervical y/o torácico. Artrosis, mialgias, miositis, sinovitis, bursitis, traumatismo cerrado (esquinces, luxaciones, contusiones) Brotes agudos localizados de artritis También útil en lesiones por la práctica de deportes <sup>(2,3,4)</sup>

#### 1. 1. 3. 2. Metabolismo.

El etofenamato es un derivado del ácido flufenámico, con acción antiinflamatoria y analgésica por vía transcutánea

En el hombre, después de la aplicación de 6g de etofenamato en la región dorsal, se encontraron niveles plasmáticos de 150 mg/L, a las 2 hrs, disminuye en forma gradual y a las 8

hrs se encontraron niveles significativos en sangre. Por medio de comparación en la eliminación renal después de la administración oral y de aplicación cutánea, se calculó que la absorción del etofenamato a través de la piel, es de más del 20% de la que se logró con la administración oral. Posterior a la aplicación cutánea del etofenamato en la articulación de rodilla inflamada, se pudo detectar su presencia en plasma y líquido sinovial, dos horas después de su aplicación

La rápida penetración en los tejidos a través de la piel, se debe a la lipofilia del etofenamato que tiene una sorprendente afinidad selectiva por los tejidos inflamados, donde se encontró una concentración 23 veces superior que en el tejido no inflamado. A pesar de esta alta afinidad tisular, no hay signos de acumulación. Después de varias semanas de administración, los niveles urinarios y particularmente plasmáticos, disminuyen rápidamente después de la supresión del medicamento (2,3,4)

### **1. 1. 3. 3. Dosis y Vía de Administración.**

Su vía es oral y cutánea. Según la intensidad de los síntomas, debe aplicarse sobre el área afectada, un cilindro del gel de 5 a 10 cm de longitud, frotando con suavidad sobre la superficie cutánea. No es recomendable el uso de apósitos. La aplicación debe repetirse de 3 a 4 veces al día (2,3,4)

### **1. 1. 3. 4. Toxicidad.**

De 10 000 pacientes sólo el 2% presentaron efectos de irritación ligera y transitoria de la piel. Eventualmente han existido reacciones alérgicas (2,3,11)



## **1. 2. PIEL.**

### **1. 2. 1. Estructura de la Piel.**

En el presente estudio se utilizó una forma farmacéutica gel, que se aplica sobre la piel, por lo que se mencionará la estructura de la misma

La piel está formada por la epidermis, dermis, hipodermis, cada una con función y estructura diferente

La epidermis, es la capa externa, relativamente deshidratada, cuya función es ser una barrera protectora; impide la fuga de agua, electrolitos y sustancias nutritivas, protege la piel de la penetración del agua y de sustancias orgánicas

Las capas de la epidermis de afuera hacia adentro son:

Estrato corneo, formado por células muertas, aplanadas, sin núcleo, de espesor variable; su función es de defensa, permite por medio de la escamación la eliminación de microorganismos, seguido al estrato corneo está el lúcido, formado por 2 o 3 hileras de células aplanadas, sin núcleo que contienen un lipoprotido, con intensa actividad queratogénica. Se continúa con el estrato granuloso, formado por 3 o 4 capas de células precursoras de grasa cutánea. En el estrato granuloso y lúcido se forma la queratina

Después está la capa mucosa Malpighi, formada por varias capas de células gruesas, las cuales resisten las acciones exteriores y dan elasticidad. En esta capa se reproducen las células. Al final se encuentra la capa basal o germinativa, esta constituida por una sola hilera de células en activa Mitosis

Por debajo de la epidermis se encuentra la dermis, cuyo grado de hidratación varía del 60 al 70%, en ella se alojan vasos sanguíneos y linfáticos, folículos pilosos, órganos nerviosos, glándulas sebáceas y sudoríparas. Es una malla esponjosa formada por una trama fibrosa, constituida por mucopolisacáridos, ácidos hialurónicos y condroitinsulfúricos.

Subyacente a la epidermis y dermis se encuentra la hipodermis, con poca vascularización formada por una capa grasa. Su misión es actuar como aislante térmico y absorbente mecánico de choques.

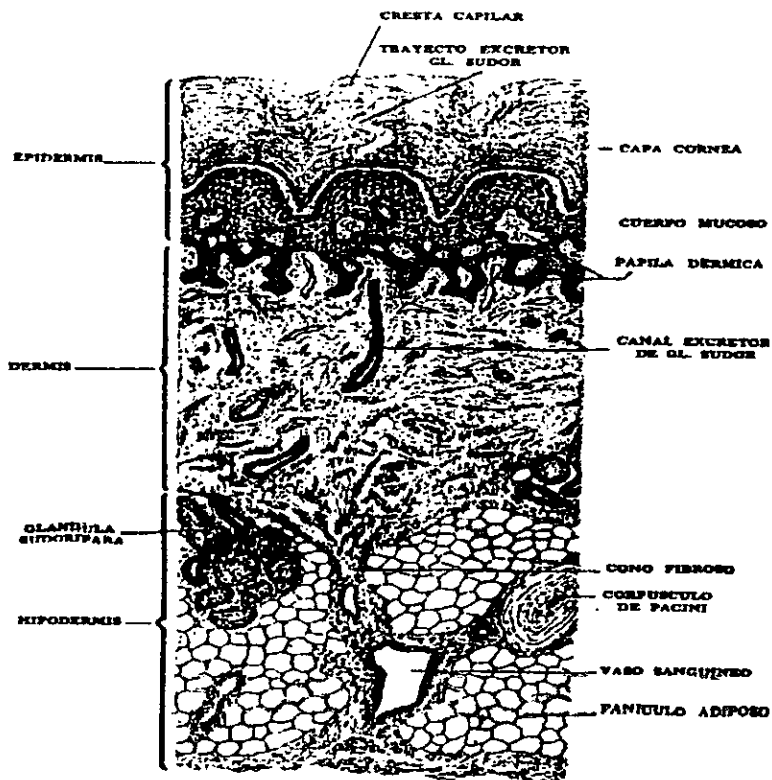


Figura 1 Estructura de la Piel

## **1. 2. 2. Factores Biológicos.**

### **1. 2. 2. 1. Estado de la piel.**

Si, la epidermis se altera en forma accidental o aún provocada, entonces la capa córnea disminuye, así mismo la capacidad oclusiva, retención hídrica y defensa

Sin embargo la permeabilidad se incrementa por trauma químico, debido a que se lesionan o destruyen los queratinocitos ...

### **1. 2. 2. 2. Topografía de la Zona de Aplicación en la piel.**

La absorción no es uniforme en la superficie corporal, se debe considerar también que hay personas con diferente permeabilidad a los fármacos, aún aplicados en los mismos sitios.

Se pueden hacer algunas generalizaciones: las palmas de las manos y pies son impermeables excepto para el agua, aunque hay lugares permeables como la piel del escroto, cara posterior de la oreja, dorso de la mano y líneas de flexión (4).

### **1. 2. 2. 3. Grado de Hidratación de la piel.**

Para una buena transferencia se debe tener un grado óptimo de hidratación del extracto córneo. Cuando la piel está a un nivel bajo de hidratación se torna quebradiza dejando atravesar fármacos e irritantes que en condiciones normales no penetrarían.

Los materiales impermeables como películas de polietileno (apósitos oclusivos) aumentan el contenido acuoso del extracto córneo, aumentando la permeabilidad de los fármacos.

Los excipientes con hidrocarburos (vaselina) y aceites son los más oclusivos al producir una mayor hidratación. Las emulsiones son menos oclusivas que los lípidos puros.

Las formas posológicas emolientes son aquellas que favorecen la hidratación óptima de la piel, imparten al mismo tiempo lubricación y suavidad a la capa superior del extracto córneo (5).

#### **1. 2. 2. 4. Otros factores biológicos en la piel.**

La variación de temperatura y humedad ambientales tienen importancia para la cosmética, un descenso térmico produce un enfriamiento superficial y la permeabilidad desciende

Una vasodilatación, por aplicación de calor, masaje o patológico, incrementa la transferencia de los fármacos y tóxicos vía extracto córneo

Se debe tener presente que con la edad la piel cambia, si es de un anciano su permeabilidad es alterada mientras que la de los bebés es permeable

El área de la superficie absorbente determina la velocidad de absorción de los fármacos, que se absorben rápidamente en grandes superficies como el epitelio alveolar pulmonar, la mucosa intestinal, y en algunos casos también en la piel después de suficientes aplicaciones (4).

#### **1. 2. 3. Factores Físicoquímicos del fármaco.**

##### **1. 2. 3. 1. Concentración del fármaco Penetrante.**

La concentración de la droga influye en la velocidad de absorción. Las drogas ingeridas o inyectadas en solución de gran concentración se absorben más rápidamente que las drogas en soluciones de baja concentración (1).

Un incremento en la cantidad del fármaco presente en el sistema, por lo común se refleja en una mayor cantidad absorbida (5).

### **1. 2. 3. 2. Caracteres de Solubilidad del fármaco.**

Es importante considerar a las constantes de permeabilidad de los fármacos, ya que se incrementan cuando el coeficiente de reparto se aproxima a la unidad.

La velocidad de transferencia depende de la velocidad con que el fármaco es liberado del excipiente. Por lo tanto la liberación es más rápida en donde este solubilizado, y menos rápida en donde se haya insoluble o en fase dispersada (11)

Los factores que influyen en la solubilidad son

#### **- Tamaño de Partícula del fármaco.**

Aumenta la disolución del fármaco a medida de que el tamaño de partícula disminuye, debido a que se incrementa el área de transferencia (5)

#### **- Polimorfismo del fármaco.**

La solubilidad va a ser diferente para cada polimorfo, debido a que cada uno presenta su propio perfil de solubilidad (5)

#### **- El pH en el fármaco.**

Los excipientes imparten un pH al medio que contenga agua afectando la solubilidad de fármaco ionizable. La solubilidad del aniónico se verá favorecida en la forma no ionizada a pH ácido; para los catiónicos se recomienda pH ligeramente básico (5)

### **1. 2. 3. 3. Excipiente.**

El excipiente promueve o interfiere con el pasaje del fármaco a través de la epidermis, debido a la interacción fármaco-excipiente

El excipiente vehiculiza al fármaco, si la piel es permeable se acelera la transferencia, incluso puede hacerse óptima. Al incluir disolventes en el excipiente se modificará la barrera epidérmica y se promoverá la penetración del mismo (1).

#### **1. 2. 4. Procesos del fármaco para atravesar la Membrana Celular.**

##### **1. 2. 4. 1. Procesos Pasivos.**

Los fármacos cruzan las membranas mediante procesos pasivos o por mecanismos de membrana. En el primer caso, las moléculas de los fármacos penetran por difusión pasiva, debido a un gradiente de concentración a través de canales acuosos de la membrana o disolviéndose en ella. Casi todos los iones inorgánicos son lo suficientemente pequeños para penetrar los canales de las membranas, su gradiente de concentración está gobernado por el potencial de transmembrana o por el transporte activo (1).

##### **1. 2. 4. 2. Electrolitos débiles e influencia del pH.**

Casi todas las fármacos son ácidos o bases débiles y están presentes en solución en forma no ionizada o ionizada. Atraviesan la membrana por difusión mediante los componentes lípidos de la membrana. Las moléculas no ionizadas son generalmente liposolubles, mientras la fracción ionizada es incapaz de penetrar (1).

##### **1. 2. 4. 3. Transporte de membrana mediado por portadores.**

El transporte activo de algunas drogas se produce a través de las membranas neuronales, los plexos coróides, las células tubulorenales y los hepatocitos (1).

# 1. 3. SISTEMAS DISPERSOS.

## 1. 3. 1. Definición.

Esta formado por una fase dispersa que está distribuida homogéneamente en otra fase continua o vehículo (1,6,9).

## 1. 3. 2. Clasificación.

De acuerdo a la combinación de fase dispersa y continua se clasifican los diversos tipos de sistemas dispersos como se muestra en la figura 2 (1,7)

FASE DISPERSA	MEDIOS DE DISPERSIÓN	SISTEMAS DISPERSOS
LÍQUIDO	GAS	AEROSOL LÍQUIDO
SÓLIDO	GAS	AEROSOL SÓLIDO
GAS	LÍQUIDO	ESPUMA
LÍQUIDO	LÍQUIDO	EMULSIÓN
SÓLIDO	LÍQUIDO	SUSPENSIÓN, GEL
GAS	SÓLIDO	ESPUMA SÓLIDA
LÍQUIDO	SÓLIDO	EMULSIÓN SÓLIDA
SÓLIDO	SÓLIDO	SUSPENSIÓN SÓLIDA

Figura 2. Clasificación de los Sistemas Dispersos basados en su estado fisico

## **1. 4. GEL.**

### **1. 4. 1. Definición.**

#### **1. 4. 1. 1. Gel.**

Un gel es una forma farmacéutica semisólida, que contiene él o los principios activos y aditivos, es un sólido en un líquido que puede ser agua, alcohol o aceite, de tal manera que forme una red de partículas atrapadas en la fase líquida. Se fabrican a partir de hidrocoloides, usualmente aumentan su concentración, por un cambio del medio de dispersión o por la disminución de la temperatura, se aplica por vía oral y cutánea (1,8)

### **1. 4. 2. Características Físicas**

#### **1. 4. 2. 1. Consistencia**

Son de consistencia semirígida, generalmente sin agentes grasos (1,8)

#### **1. 4. 2. 2. Color**

Su color varía dependiendo del principio activo, casi siempre son transparentes y a veces translúcidos (1,8)

Algunos geles son en apariencia transparentes como el agua, visualmente agradables y estéticos, como una gelatina. Otros son turbios, como los polímeros que no se disuelven molecularmente o forman agregados, los cuales dispersan la luz.

Su rango de claridad es de claro a translucido blanquecino no diferente al de petrolato (6)



### **1. 4. 3. Clasificación**

#### **1. 4. 3. 1. Gel Orgánico.**

El gel orgánico consiste en macromoléculas distribuidas en fase simple, las macromoléculas se detienen en el interlazamiento del sistema por fuertes fuerzas polares. Frecuentemente un gel puede estar formado desde un sol hidrofílico: por usar una alta concentración del hidrocóide, por un cambio en el medio de dispersión, o por la disminución de la temperatura.

Al enfriar una gelatina al 2%, se reduce la energía cinética de las macromoléculas de gelatina las cuales son asociadas por una interacción dipolo - dipolo en agregados alargados. El número de esa asociación es incrementado hasta que en el medio de dispersión es detenido por el interlazamiento del sistema y el incremento de viscosidad es para el semisólido.

La mayoría de las gomas farmacéuticas, por ejemplo: agar, algin, pectina y tragacanto, forman gel por ese mecanismo <sup>(9)</sup>.

#### **1. 4. 3. 2. Gel Inorgánico.**

Consisten en agregados de partículas inorgánicas coloidales. La bentonita es un coloide hidratado de silicato de aluminio que es insoluble en agua. El veegum y la bentonita son un tipo especial de arcilla en el cual las unidades en la estructura de la arcilla se unen por una asociación débil de oxígeno - oxígeno. En presencia de agua esa asociación débil de oxígeno - oxígeno se rompen en algún grado, y la arcilla absorbe agua. Como el agua es absorbida dentro de esta estructura, la arcilla se hincha y efectivamente son dispersadas hacia afuera; la interferencia con el movimiento de partículas da como resultado un incremento en la viscosidad.

La magna terapéutica es un gel inorgánico para la administración oral. Las magnas son fabricadas por simple hidratación o por reacción química. Si la reacción química es utilizada la solución puede ser calentada y ligeramente diluida con objeto de obtener partículas coloidales. Otros geles inorgánicos utilizados como antiácidos son leche de magnesia, gel de hidróxido de aluminio, gel de fosfato de aluminio y magna de aminoacetato de dihidroxialuminio (6).

#### **1. 4. 4. Mecanismo y Modo de Acción.**

El gel tiene una consistencia semirígida, destinada a aplicarse sobre membranas. En la membrana se debe considerar que hay factores biológicos y fisicoquímicos para que se lleve a cabo una adecuada transferencia percutánea. Los factores biológicos son inherentes a la piel, mientras los factores fisicoquímicos, son determinados por el fármaco y su vehículo (6).

#### **1. 4. 5. Componentes.**

**1. 4. 5. 1. Los componentes para la fabricación de las formas farmacéuticas para aplicarse sobre la piel, se clasifican en:**

**- El fármaco.**

Son todas aquellas sustancias que pueden curar, prevenir o aliviar

**- El coadyuvante.**

Actúa sinérgicamente con el activo, facilitan u optimizan la transferencia epidérmica

Son las sustancias que diluyen, dan consistencia y transporte formada por

- Diluyente.

Está formado por agua y soluciones, sustancias hidrofílicas ó hidrofóbicas, sistemas dispersos de agua más aceite.

- Espesantes

- Emulsiones y dispersantes

- 

- Estabilizantes.

- Antisépticos y conservadores.

- Antioxidantes

- Otros (Humectantes, Colorantes, etc ) (5)

#### **1. 4. 5. 2. Requisitos de los componentes:**

##### **Terapéutica.**

Su objeto es la mejoría sintomática con las siguientes características:

- Protección. Frente a irritantes químicos, físicos (ultravioleta, desecación) lubricación, secreción excesiva, etc.

- Supresión de sensación Efectos anestésicos.

- Aseo. Eliminación de aplicaciones previas, suciedad exudados, costras, coágulos, etc.

- **Acción Atifongística.** Combate la inflamación por efecto refrescante, vaso constrictor y astringente antiexudativo.

- **Acción emoliente y lubricación.** Con respecto al grado de hidratación.

- **Acción Antimicrobiana** Para inhibir bacterias y hongos (s)

### **Fisiopatológica.**

Principalmente el estado de la piel a tratar (s)

### **Farmacotécnico.**

Todo lo referente al diseño para la elección de los excipientes (s)

### **Compatibilidad.**

De cada uno de los excipientes no debe reaccionar entre sí o con el activo. Las interacciones pueden ser físicas, químicas o farmacológicas (s)

### **Estabilidad.**

La composición del excipiente y del fármaco en la formulación deberá ser constante a efectos tales como: temperatura y tiempo

La forma tópica no perderá sus cualidades físicas (calor, homogeneidad, consistencia, contenido acuoso, etc.), ni las terapéuticas. Por efectos de cambios drásticos de temperatura ambientales de  $-2^{\circ}\text{C}$  a  $+50^{\circ}\text{C}$  no deberá presentarse cristalización ni separación. Especialmente en la estabilidad, en la consistencia y viscosidad (5).

### **Inercia Biológica.**

Donde los excipientes son promotores de absorción. Serán no tóxicos, no irritantes, ni tampoco sensibilizadores o alergizantes (5).

### **Promoción de Biodisponibilidad.**

Cuando el fármaco necesite de aumento de permeabilidad epitelial, entonces el excipiente será promotor de absorción (5).

### **Fácil Empleo.**

Se extenderá en forma rápida y cómoda sobre la piel, de consistencia y untuosidad controlable y regulable (5).

### **No contaminante.**

Ser estéril, es decir incluir sustancias conservadoras (5).

### **1. 4. 5. 3. Agentes de gelación.**

A continuación se listan algunos agentes, como por ejemplo:

- Goma de tragacanto.
- Glicerado de almidón.

- Pectina.
- Alginatos
- Gelatina
- Metilcelulosa y derivados de celulosa
- Hidroxipropil metilcelulosa
- Carboximetil celulosa sódica.
- Carbopol
- Polietilenglicoles (5)

#### **1. 4. 5. 4. Clasificación de bases para aplicar sobre la piel.**

##### **Bases Hidrófobas.**

Materiales de naturaleza no polar, oclusivas y emolientes, presentes para elaborar pomadas, bases de absorción, algunas pastas, en sistemas emulsionados como lociones, cremas, etc.

Las principales son:

- Lípidos naturales y derivados
- Lípidos sintéticos
- Siliconas
- Hidrocarburos
- Hidrocarburos derivados de petróleo (5)

##### **Bases de Absorción Anhidra.**

Están formadas de materiales no polares, que absorben agua sin perder su consistencia de pomada. Durante su uso, la transpiración insensible en forma de vapor es incorporada por este excipiente (5)

### **Bases de Absorción.**

Están formadas por sistemas emulsionados donde la porción no polar está en la fase continua, o bien son emulsiones agua en aceite. Estos excipientes captan el agua, por ejemplo la lanolina (5).

### **Bases Emulsionados.**

Son bases oleosas con acción emoliente y lubricante, mientras las bases acuosas son hidratantes y refrescantes. Cuando se combinan ambas bases es para formar sistemas bifásicos, de acuerdo al efecto predominante que se desee.

Debido a su elevado contenido de agua de las bases pueden favorecer la transferencia de principios activos (5).

### **Bases hidrosolubles Anhidras.**

Un ejemplo muy representativo son los polietilenglicoles cuyas propiedades son ser inertes, inactivos, emolientes y neutros.

Se utilizan separadamente o en mezclas, en la preparación de pomadas y cremas (5).

### **Bases Hidrodispersantes o Gelantes.**

Las más importantes son:

- Pectina. Se utiliza en la elaboración de pastas

- Alginato de sodio. Se usa en pomadas.
  
- Metilcelulosa y carboximetilcelulosa Tiene grupos hidrófilos libres que le permite hincharse al contacto con el agua
  
- Goma de tragacanto. Forma un gel de almidón de trigo muy compatible, requiere la presencia de conservadores.
  
- Carbopol. Da un gel hidrico estable y neutro (4)

#### **Bases Hidratadas.**

- Bentonita. Es un silicato hidratado coloidal que gelifica con el agua.
  
- Atapulgita. Forma un gel de silicato de aluminio y magnesio coloidal (5)

#### **Bases para pastas dérmicas.**

Esta formada por excipientes en polvo como por ejemplo:

- Pasta lassar Es de naturaleza oleosa, está constituida de oxido de zinc, almidón y vaselina.



- Pasta unna y zinc. Esta gelatinizada, se prepara con gelatina, glicerol y óxido de zinc <sup>(5)</sup>

#### **1. 4. 6. Condiciones y Método de Aplicación.**

Se introducen a través de la piel las sustancias ionizables

Un método usado es la iotoforesis se inhiben las soluciones en un polo absorbente de la misma carga, y con otro polo en una zona distal se hace pasar una corriente galvánica, el ión del fármaco migrará hacia el otro polo penetrando en forma rápida a través de la piel

El procedimiento más comun es el de inunción. se vierte el producto farmacéutico sobre el área epidérmica afectada Optativamente se realiza un masaje o frotamiento para movilizar mecánicamente las porciones últimas del extracto córneo y ocurre la penetración.

El vendaje oclusivo ayuda a la hidratación óptima y favorece la trasferencia de algunos fármacos (corticoides) Produce además una hipertemia local, con la consiguiente fluidización de los lipidos, tanto los propios de la piel como los de la formulación. La aplicación no debe prolongarse, debido a que favorece el desarrollo de microorganismos.

La introducción de fármacos a través de la piel se puede realizar mediante “inyección sin aguja”. Esta técnica consiste en una solución o suspensión acuosa, estéril, del fármaco, se carga el aplicador. Se ubica este en el área a tratar y se dispara, un chorro muy fino y potente de la solución o suspensión, penetra en forma instantánea, labrando su propio camino hasta la dermis <sup>(4)</sup>

#### **1. 4. 7. Conservación**

El producto envasado se debe conservar en un lugar limpio y seco, protegido de la luz <sup>(4)</sup>

#### **1. 4. 8. Acondicionamiento**

El área de fabricación del gel deberá estar aprobada previamente por control de calidad.

El gel fabricado a granel por producción se vierte en tubos metálicos aprobados que posteriormente se cierran; durante el proceso se debe realizar el control de peso del contenido de gel en los tubos mediante gráficas de control para la variación del peso, a intervalos de tiempo durante todo el proceso de fabricación; así mismo la realización de pruebas de hermeticidad

El producto a granel se traslada al área de cuarentena hasta que se de el dictamen de aprobado por control de calidad y aseguramiento de calidad, para que posteriormente se traslade al área de acondicionado. En el área de acondicionado se verifica que el producto cumpla con las especificaciones como tipo de envase primario, secundario, lote de envase primario y secundario, fechas de caducidad, presentación, leyendas, registro ante la secretaria de salubridad y asistencia, etc (10)

## **1. 5. CROMATOGRAFÍA.**

### **1. 5. 1. Definición.**

#### **1. 5. 1. 1. Cromatografía.**

La Cromatografía es una técnica desarrollada a principios de siglo, la cual permite la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla. En general, la cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil, gas o líquido y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido (6.11.13).

#### **1. 5. 1. 2. Fase Estacionaria.**

Se utiliza este término para denominar a la fase fija cuya estructura debe ser análoga a la sustancia que se quiere separar, que puede estar empaquetada en una columna, extendida en forma de capa fina formada por óxidos metálicos, óxidos hidratados y sales, como gel de sílice y la alúmina (6.11.13).

#### **1. 5. 1. 3. Fase Móvil.**

Término usado para fase que acarrea a los activos, durante el proceso de separación cromatográfica, que puede ser un líquido o gas (6.11.13).

### **1. 5. 2. Clasificación.**

Como se muestra en la figura 3, la cromatografía se divide de acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas

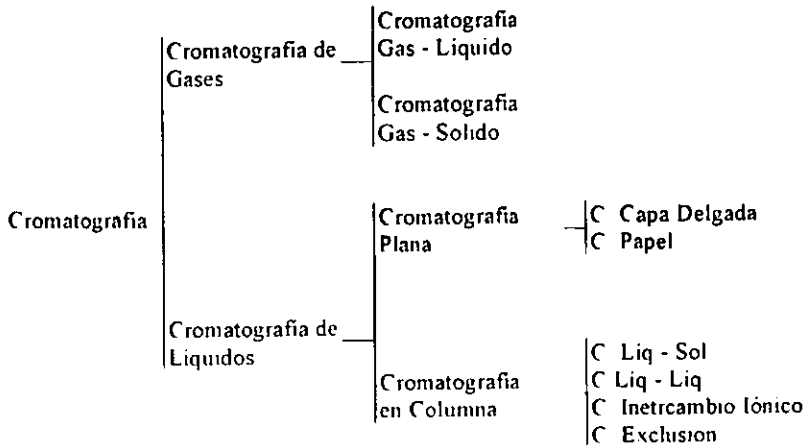


Figura 3 Clasificación de Cromatografía de acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas

### 1. 5. 2. 1. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

En 1968 se produjo un avance considerable en la cromatografía líquida, debido a la introducción de altas presiones de operación y sistemas de detección continua. En este momento se creó la cromatografía líquida de alta presión, actualmente, cromatografía líquida de alta resolución. Se basa en las fuerzas competitivas de dos fases, una fija o estacionaria y otra continuamente renovada o móvil.

La tendencia a solubilizar las moléculas del soluto por el solvente habrá de imperar sobre las fuerzas de retención del relleno de la columna, consiguiendo arrastrar al soluto disuelto hasta el exterior de la columna, proceso denominado elución.

El contenido de la columna debe ser capaz de establecer fuerzas de retención hacia un soluto, cuyo solvente pase continuamente por la columna y establezca fuerzas de disolución con respecto al soluto.

Las fuerzas de retención por parte de la fase estacionaria y las de disolución (elución) por parte de la fase móvil, dependen de la estructura molécula del soluto. Una mezcla de varios fármacos, o solutos depositados en la cabeza de la columna saldrán al final de tal modo que cada componente eluirá antes o después que los otros, diferenciado de ellos. El proceso se denomina migración diferencial, cuya consecuencia es la separación cromatográfica.

En el método de cromatografía de líquidos de alta resolución se usan columnas de diámetro muy reducido, por ejemplo 4 mm, rellenas de materiales especiales pulverulentos, cuyo tamaño de partícula no es mayor de 30-40 micras y con frecuencia hasta 5 o 10 micras, generalmente con una distribución de tamaño no mayor de 2 micras. La columna ofrece una gran resistencia al flujo de la fase móvil, con gran caída de presión. Por lo que se necesitan sistemas de bombeo de alta presión (hasta 400 atm) que hagan fluir la fase móvil a una velocidad razonable a través de la columna. Debido a que la cantidad de la fase estacionaria es pequeña, se requieren cantidades pequeñas de muestra, entre 1 y 10 mg.

Si la presión de entrada a la columna no es muy elevada (1000 atm o menos), la muestra se introduce en la cámara de inyección mediante una jeringa de alta presión; a presiones más elevadas se utilizan válvulas de inyección.

Un detector se coloca a la salida de la columna, proporcionando un registro continuo de la composición del líquido que sale, obteniéndose un cromatograma para cuantificar a cada uno de los componentes presentes en la muestra.<sup>(8, 11)</sup>

## **Diferentes tipos de Cromatografía en CLAR.**

### **Cromatografía Líquido-Líquido.**

El mecanismo de separación en cromatografía líquido-líquido, o mecanismo de distribución, se basa en la distinta solubilidad que presenta una molécula de la muestra en la fase móvil y en la

fase estacionaria. Entonces los compuestos más solubles en la fase estacionaria serán selectivamente retenidos y los menos solubles serán transportados más rápidamente por la fase móvil

En cromatografía líquido-líquido se utilizan compuestos moderadamente polares, con pesos moleculares inferiores a 1500. Las columnas utilizadas son de 15 a 50 cm de longitud y de 3 a 4 mm de diámetro interno, la caída de presión depende de las variables como longitud, tamaño de partícula del relleno, flujo de fase móvil, temperatura, viscosidad de la fase móvil, etc.; esta caída puede ser de 350 atm (8.11).

### **Cromatografía de Fase Químicamente Unida.**

Esta técnica cromatográfica surgió como consecuencia a los problemas asociados con la cromatografía líquido-líquido. Dado que su fase estacionaria está químicamente unida a la superficie de un soporte, la fase móvil difícilmente produce deterioro alguno en la columna.

Al variar los grupos funcionales de la fase estacionaria se obtienen diferentes tipos de selectividad. Los grupos pueden ser de naturaleza polar, grupo amino ( $-NH_2$ ), grupo nitrilo ( $-CN$ ), en cromatografía de fase normal, o bien no polar como grupo octilo ( $-C_8H_7$ ), octadecilo ( $-C_{16}H_{34}$ ), fenilo ( $-C_6H_5$ ) etc., en cromatografía de fase inversa (8.14).

### **Cromatografía Líquido-Sólido.**

El mecanismo de separación de la cromatografía líquido-sólido, o de adsorción, se basa en la competencia que existe entre las moléculas de la muestra y las de la fase móvil o disolvente por ocupar los sitios activos en la superficie de un sólido. Los materiales empleados con más frecuencia son alúmina y gel de sílice.

Se aplica a moléculas de baja o mediana polaridad, de peso molecular no mayor de 1000. Las columnas utilizadas varían de 15 a 25 cm de longitud, cuyo diámetro interno es de 2 a 3 mm (8.14).

### **Cromatografía Líquida por Exclusión.**

Es conocida también como cromatografía de permeación o cromatografía de filtración, efectúa la separación de acuerdo al tamaño de las moléculas

La columna se rellena de un gel, cuyos poros son de tamaño al de las moléculas de la muestra. Las moléculas pequeñas pueden penetrar dichos poros quedando retenidas, y en tanto las grandes no

El intervalo de peso molecular a utilizar varía desde 50 inclusive menos hasta varios millones. Las columnas empleadas pueden ser muy largas (varios metros), es muy útil cuando se desea separar muestras cuyos pesos moleculares están distribuidos en intervalos muy amplios.

La cromatografía por exclusión tiene dos variantes cromatografía de permeación y cromatografía de filtración, su mecanismo es similar. La cromatografía de filtración emplea materiales blandos, incapaces de resistir presiones mayores de 4 atm y se aplica en estudios de biopolímeros

La cromatografía de permeación emplea materiales de relleno rígido o semirígidos, los cuales pueden resistir presiones muy elevadas (100 atm)

### **Cromatografía por Intercambio Iónico.**

La separación se basa en la competencia entre la fase móvil y la muestra iónica por los sitios o grupos activos de una resina intercambiadora de iones

Las columnas varían entre 25 y 50 cm de longitud, cuyo diámetro interno varía de 3 a 4 mm; el tamaño mayor de la columna radica en la baja eficiencia de los materiales intercambiadores de iones.

Esta separación se aplica a compuestos de un intervalo de pesos moleculares muy amplio, por ejemplo péptidos y aminoácidos (11).

### **Par iónico.**

Esta técnica es útil para cromatografía líquido-líquido y /o para cromatografía de adsorción, cuyo fin es el de analizar sustancias iónicas sin la necesidad de comprar otra columna

Al tener muestras iónicas solubles en agua, la fase móvil será acuosa y taponada

La fase móvil constará de las siguientes partes una fase acuosa, taponada, un cosolvente orgánico para establecer un equilibrio de partición, y un ion de carga contraria a la que se va a cromatografiar, llamado contraión, por lo general es orgánico y de elevado peso molecular, para que el par iónico que se forme con la muestra problema resulte soluble en el cosolvente orgánico

En general el complejo (muestra problema - contraión) ha de ser soluble en la fase orgánica, el contraión es una molécula orgánica relativamente grande. Se emplean trialkilaminas como contraión catiónicos o alcoholes como contraión aniónicos. Cuanto mayor es el número de átomos de carbono del radical alquilo, tanto en las aminas como en los alcoholes, mayor será la retención total en la fase reversa y menor la fase normal, por su mayor afinidad con la fase orgánica (11).

### **Fase Normal.**

En este tipo de cromatografía la fase estacionaria es de naturaleza polar (como la sílica gel) y la fase móvil es no polar (ejemplo hexano, benceno, tolueno, tetrahidrofurano, etc) Las muestras polares eluirán después que las muestras menos polares o apolares, obteniéndose tiempos de retención mayores para las polares que las menos polares o apolares (11).



## **Fase Reversa.**

En la cromatografía de fase inversa, involucra una fase estacionaria relativamente poco polar con cadenas hidrocarburadas de 8 a 18 unidas a los grupos silano de soporte y se utilizan por lo general fases móviles muy polares (como el agua) para separar componentes poco polares (6)

### **1. 5. 3. Mecanismos de Separación.**

#### **1. 5. 3. 1. Cromatografía de Adsorción.**

La fase estacionaria es un sólido, la fase móvil, puede ser un líquido o un gas. La separación se lleva a cabo cuando uno de los componentes de la mezcla es más adsorbido que el otro por el sólido y mediante el proceso de adsorción-desorción de sustancias contenidas en el disolvente móvil sobre un sólido estacionario.

La velocidad en que los solutos se separan depende de su afinidad por la fase estacionaria (1,5,16)

#### **1. 5. 3. 2. Cromatografía de Partición.**

La fase estacionaria es un líquido soportado sobre las partículas sólidas del relleno, inmiscible con el líquido de la fase móvil. La fase móvil puede ser un gas, o una mezcla de líquidos. Su separación depende de la solubilidad del soluto entre las dos fases y del valor de la constante de reparto y las fuerzas de fase estacionaria-soluto (1,5,16)

#### **1. 5. 3. 3. Cromatografía de Intercambio Iónico.**

La fase estacionaria se constituye por partículas que se modificaron químicamente, de modo que presenten grupos iónicos de carga opuesta a la del soluto. Como consecuencia, ambas intercambian el grupo inicial con el mismo signo de las moléculas cargadas iónicamente de la

muestra problema. Las fuerzas de la fase estacionaria-soluto son de tipo iónico; sus fases móviles son generalmente líquidas.<sup>(11)(15)(16)</sup>

#### **1. 5. 3. 4. Cromatografía por Exclusión.**

En ella no hay fuerzas de unión fase estacionaria-soluto. Se fundamenta en la mayor o menor posibilidad que tienen para entrar las moléculas en los poros de las partículas del relleno. Las moléculas muy grandes no podrán penetrar y no quedarán retenidas, siendo excluidas. Las otras según su tamaño, se introducirán más o menos en los poros. Cuanto menores sean, más profundamente entrarán y más tarde eluirán de la columna por hallar un camino total más tortuoso. La fase estacionaria es sólida, y de un relleno de partículas porosas, de tamaño de poro conocido. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa.<sup>(11)(15)(16)</sup>

#### **1. 5. 4. Parámetros Cromatográficos.**

##### **1. 5. 4. 1. Tiempo de Retención ( $t_r$ ).**

Es el tiempo que transcurre desde el momento en que la muestra es introducida al sistema, hasta el momento en que se obtiene una señal o pico máximo debido a la mayor concentración del activo.<sup>(17)</sup>

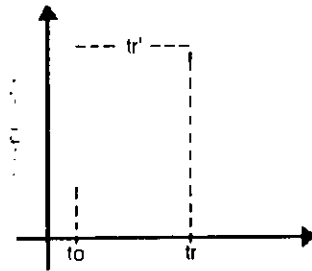
##### **1. 5. 4. 2. Tiempo Muerto ( $t_0$ ).**

Al tiempo del trayecto de un compuesto no retenido, o de la fase móvil para trasladarse de un extremo al otro de la columna.<sup>(17)</sup>

##### **1. 5. 4. 3. Tiempo de Retención Corregido ( $t_r'$ ).**

Es la distancia entre  $t_r$  y  $t_0$ , es el tiempo en que la muestra permanece retenida en el material de relleno de la columna. O bien,  $t_r'$  es el tiempo total de la permanencia de la muestra en la

columna.  $t_r'$  es el tiempo en que la muestra permanece retenida en la fase estacionaria  $t_r' = t_r - t_0$  (17).



#### 1. 5. 4. 4. Factor de Capacidad (K)

Es un término que indica el tiempo de retención de un soluto en la columna. Se determina como a continuación

$$K = \frac{t_r' - t_r - t_0}{t_0} = \frac{\text{Tiempo en la fase estacionaria}}{\text{Tiempo en la fase móvil}} \dots \dots \dots \text{ec(1)}$$

Despejando  $t_r$  de ec(1)

$$t_r = t_0(1 + k) \dots \dots \dots \text{ec(2)}$$

Se puede determinar el tiempo de retención de un compuesto conociendo el Factor de capacidad

El factor de capacidad en la práctica, tiende a 1. Para asegurar la separación del pico de interés de sus posibles impurezas y del frente de fase móvil, las cuales eluyen al tiempo  $t_0$ , se determina el tiempo de retención  $t_r$ .

### 1. 5. 4. 5. Número de Platos Teóricos (N).

Los parámetros a considerar para que se lleve a cabo una buena separación son el factor de capacidad K' y el número de platos teóricos

$$N = 16 \frac{t_r^2}{wb} \dots\dots\dots N = 5.545 \frac{t_r^2}{wh}$$

N = Número de platos Teóricos

tr = tiempo de retención del pico

wb = ancho del pico en la base

wh = ancho del pico tomado a la mitad de la altura

El número de platos teóricos mide la eficiencia de la columna, o la capacidad de ésta para propiciar picos estrechos y bien separados en una misma muestra. A un mayor valor de N, la columna tendrá una mayor eficiencia.

### 1. 5. 4. 6. Altura Equivalente de un Plato Teórico (AEPT).

El número de platos Teóricos (N) es proporcional a la longitud de la columna (L), entonces al aumentar la longitud de la columna se aumentará el número de platos teóricos; la ecuación que relaciona al número de platos con la longitud de la columna es la altura equivalente a un plato teórico (AEPT) como se muestra a continuación

$$H = \frac{L}{N}$$

H = Altura equivalente a un plato teórico

L = Longitud de la columna

N = Número platos teóricos

De la anterior ecuación se puede deducir, que a menor altura de cada plato y mayor número de platos teóricos, la columna será más eficiente (61).

#### 1. 5. 4. 7. Selectividad

La cromatografía efectúa la separación de los componentes de una mezcla en base a las diferencias en la distribución de los componentes entre la fase móvil y la fase estacionaria. El equilibrio de esta distribución se representa por el coeficiente de distribución:

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

K = Coeficiente de distribución

C<sub>s</sub> = Concentración del soluto en la fase estacionaria

C<sub>m</sub> = Concentración del soluto en la fase móvil

La selectividad de la columna (α) es la medida de la separación relativa de los picos de los compuestos y está en función de los coeficientes de distribución.

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} \dots \dots \dots \alpha = \frac{T_{r(B)}}{T_{r(A)}}$$

Donde K<sub>A</sub> y K<sub>B</sub> = coeficiente de distribución de los componentes A y B respectivamente

La selectividad de la columna puede modificarse variando el pH y la composición de fase móvil, modificando la superficie de la fase estacionaria, cambios en la temperatura de separación y/o cambiando la naturaleza química del soluto (61).

#### 1. 5. 4. 8. Resolución (R).

La resolución indica la separación entre 2 picos adyacentes en un cromatograma y es un factor importante a considerar en una columna, a mayor valor de R la separación será mejor, como se muestra en la siguiente ecuación

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2}$$

$t_2$  = tiempo de Retención del componente 2

$t_1$  = tiempo de Retención del componente 1

$W_2$  = Ancho de la base del pico del componente 2

$W_1$  = Ancho de la base del pico del componente 1 (6,17)

#### 1. 5. 4. 9. Asimetría.

Es útil establecer un factor de coleo para limitarlo al máximo, con relación a la asimetría del pico. Para propósitos farmacéuticos el factor de coleo, T, se define como la relación de la distancia de uno a otro lado del pico  $W_{0.05}$ , dividido entre 2 veces la distancia f, del máximo del pico hacia el lado izquierdo del pico. Esta distancia se mide a un 5% de la altura partiendo de la línea base

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

T = Factor de coleo

W = ancho del pico a un 5% de altura partiendo de la línea base

f = Máximo del pico hacia el lado izquierdo del pico

Para un pico asimétrico el factor de coleo es la unidad y el valor de T aumenta conforme el coleo, y va siendo más pronunciado (61)

### **1. 5. 5. Características de CLAR.**

Los cromatógrafos de líquidos de alta resolución día con día son mejorados, por lo que se deben evaluar sus características. Entre las más importantes están:

#### **1. 5. 5. 1. Versatilidad.**

El instrumento debe separar y purificar a cada uno de los componentes químicos de una mezcla cuyo propósito es apoyar un proyecto de investigación, asegurar la pureza de la materia prima, aislar un componente específico, analizar diferentes productos, realizar estudios de principios activos susceptibles a cambio, controlar la calidad de producción, conocer cuantos y cuales principios activos están presentes en una mezcla (17)

#### **1. 5. 5. 2. Rapidez.**

Durante el análisis es necesario contar con columnas de diámetro pequeño (2 a 5 mm.), rellenas de partículas de 5-10 micras de diámetro, de forma regular homogéneamente distribuidas, para la obtención de alta eficiencia. Además es necesario que el instrumento tenga sistemas de bombeo de alta presión y flujo controlado de la fase móvil (17)

#### **1. 5. 5. 3. Reproducibilidad y Estabilidad.**

El instrumento debe tener un alto grado de reproducibilidad y una máxima resistencia a la corrosividad, para un funcionamiento efectivo a largo plazo. Algunos tienen sensores que indican las fallas y/o errores durante el manejo con la finalidad de utilizarlo a largo plazo en condiciones óptimas (17)

#### 1. 5. 5. 4. Sensibilidad.

La sensibilidad del instrumento depende del sistema de detección utilizado. El cual deberá tener las siguientes características: ser universal o específico, tener una alta sensibilidad, su respuesta deberá ser estable con el tiempo, contar con celdas y conexiones de bajo volumen muerto, así como un alto rango de linealidad en su detección (17).

A continuación se describe en la figura 4. La instrumentación básica del CLAR.

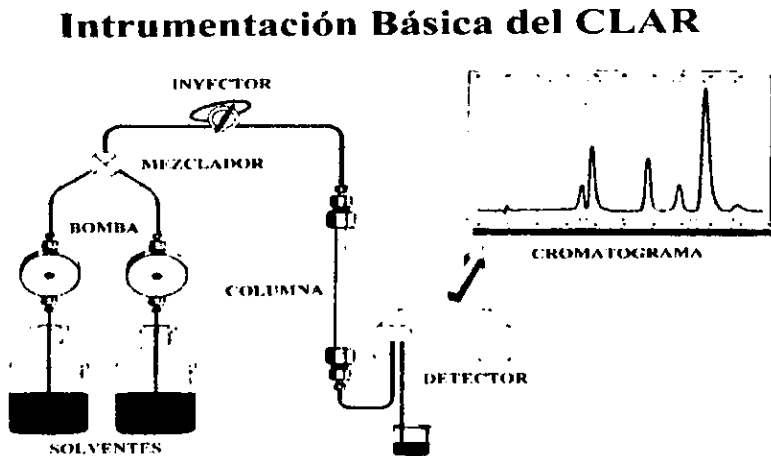


Figura 4 Instrumentación Clásica del CLAR

#### 1. 5. 6. Sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

##### 1. 5. 6. 1. Fase Móvil.

Los componentes de la fase móvil, son líquidos que requieren para ser empleados en CLAR un estricto control de pureza química (grado HPLC), se deben filtrar a través de membrana y



gasificarse en una atmósfera de gas inerte (Helio, etc.), o a través de un baño de ultrasonido, medios antioxidantes, estabilización de la temperatura, etc.

Aunque la fase móvil no es parte del sistema cromatográfico, es necesario controlar la presión que genere, la velocidad de flujo y la composición de la misma

Para utilizar la fase móvil se deben hacer las siguientes consideraciones:

Se deberá disolver la muestra.

No deberá reaccionar con la fase estacionaria

Deberá ser miscible con la muestra

Debe tener baja viscosidad

Deberá ser compatible con el detector utilizado

Tendrá que tener alta pureza

El frente de la fase móvil deberá de ser diferente al tiempo de retención del activo

Se puede mantener constante la composición de la fase móvil durante un análisis o bien cambiarla. El primer método se denomina operación isocrática y el segundo de gradiente

Existen dos tipos de sistemas de gradientes en CLAR: gradientes de flujo y gradientes de elución. El gradiente de flujo se utiliza cuando se modifica la velocidad de flujo de la fase móvil. El gradiente de elución cuando se cambia la composición de la fase móvil y se mantiene la velocidad de flujo en el análisis, y se puede aplicar para cualquier tipo de CLAR (11).

#### **1. 5. 6. 2. Reservorio.**

Su misión será contener los disolventes que se emplean como fase móvil. Si se emplea una fase móvil compuesta por varios disolventes, y se desea que varíe su composición, será más efectivo hacer previamente esa mezcla e incorporarla a un único reservorio, también se puede disponer de varios reservorios, uno para cada disolvente puro, y de una cámara de mezcla; no sólo para

realizar la mezcla de los disolventes en la proporción deseada, sino también para que dicha mezcla sea homogénea

La función del reservorio puede variar desde el frasco propio hasta un sistema capaz de filtrar, desoxigenar, termostalizar, etc , el disolvente

Las características de un buen reservorio son

En primer lugar, su boca será lo menor posible para evitar la eventual evaporación de los disolventes, que pueden alterar la composición de la misma

El material puede ser de plástico, aunque sus polímeros pueden pasar en pequeña medida a la fase móvil. Sin embargo el plástico se prefiere al vidrio, los cuales pueden ceder iones metálicos al solvente. Si se emplean disolventes acuosos de pH muy ácidos o básicos, tal vez el acero inoxidable resulte más adecuado

A través del tapón discurre el tubo que conduce la fase móvil a la cámara de mezcla primero y a la bomba después. Este tubo succionador, de acero o de teflón finaliza en un filtro, que garantiza más la limpieza física del disolvente.

Algunos sistemas cromatográfico pueden disponer de una cavidad de reservorio hasta 2, e incluso 3, capaces de suministrar distintos disolventes, en ellos contenidos, de forma variable, cuyo conjunto va a parar a una cámara de mezcla, es decir, los disolventes aislados en cada reservorio se succionan de manera individual y pasan luego a la bomba o bien, en sistema de dos bombas (o tres), se bombean previamente a su llegada a la cámara de mezcla (11)

### **1. 5. 6. 3. Bombas Cromatográficas.**

Es aquel dispositivo o conjunto de sistema capaz de proporcionar a la fase móvil la presión necesaria para que, operando a flujo (mililitros por minuto) o velocidad precisa, atraviese la columna cromatográfica (11).

Su objeto es impulsar el fármaco en la fase móvil a través de la columna, y debe cumplir ciertas especificaciones de reproducibilidad y precisión, manteniendo un flujo constante (6).

Básicamente existen dos tipos de bombeo y cada uno tiene sus ventajas y desventajas, y son:

#### **Bombas de flujo constante**

Mantienen una velocidad de flujo de la fase móvil constante. Entre estas están las bombas reciprocantes que funcionan a partir de pistones que impulsan el disolvente que entra a cámaras con una capacidad de volumen pequeña, en estas bombas se generan pulsaciones de la fase móvil que produce perturbaciones en la línea base, estas pulsaciones se pueden corregir a través de dispositivos (6).

Otro tipo de Bombas de flujo constante son las de bombas de desplazamiento positivo que pueden tener dos formas:

De jeringa o con amplificador hidráulico. La primera tiene un embolo que actúa mediante una espiral, que empuja el disolvente y la segunda amplifica la presión del disolvente mediante un sistema hidráulico. Este tipo de bomba reduce las pulsaciones del disolvente.

#### **Bombas de presión constante.**

Su desventaja es que se debe mantener la viscosidad del disolvente, la temperatura de la columna y la presión constantes. La ventaja es que al mantener estos parámetros constantes, se

controlan totalmente las pulsaciones. Estas bombas emplean presión de un gas inerte para presurizar el disolvente. El problema es que parte del gas se disuelve y esto forma burbujas en el sistema. Otro sistema para estas bombas emplea un amplificador neumático que reduce el efecto del gas utilizando un pistón, reduciendo el contacto del disolvente con el gas comprimido (6).

Estos sistemas son isocráticos, porque mantienen constante la proporción de los disolventes en la fase móvil, estos sistemas no son aplicables a separaciones en mezclas de solutos con valores variables de factor de capacidad, en donde es necesario utilizar sistemas de elución congradiante. Estos sistemas utilizan dos bombas que son programables para modificar, en forma lineal o exponencial, las proporciones iniciales de los disolventes. El inconveniente del gradiente es que su uso es muy difícil con ciertos detectores como los refractómetros (6).

#### **1. 5. 6. 4. El control del flujo en CLAR.**

Es importante controlar el flujo, porque pequeñas variaciones en la línea base ocasionarían error en las áreas del pico.

El área de pico, a igual a la velocidad del papel - registro, resulta inversamente proporcional al flujo de fase móvil

Por lo anterior se debe considerar la influencia de la constancia o no de flujo sobre las áreas y tiempos de retención. En todas las bombas existen ciertas oscilaciones del valor de flujo, por lo que es necesario considerar lo siguiente:

#### **Ruido de flujo**

Es el tiempo en el cual la variación apreciable de flujo (visible en la línea base) resulta inapreciable, influye sobre el tiempo de retención, aunque no apreciablemente. La posible causa es que el atenuador de pulso no sea eficaz, o tal vez las bombas no estén bien ajustadas, ocurre

comúnmente en sistema dual o sistema gradiente de elución con variaciones en la viscosidad de la fase móvil (11).

### **Error de flujo.**

En el tiempo en que sucede una variación apreciable del flujo y que coincide con el ancho de banda de un eventual pico. Su efecto sobre los tiempos de retención es despreciable, pero es muy importante sobre el valor de las áreas

Las causas de su aparición son la formación periódica de burbujas en la fase móvil, desde las bombas o desde los reservorios, diámetros grandes de tubo, la temperatura, por todo lo anterior se puede evaporar parte de la fase móvil, A la presencia de partículas sólidas en el disolvente, que a la larga obstruirá o deteriorará válvulas e incluso bombas y capilares. Otra causa podrían ser pequeñas perdidas, no apreciables, de los pistones de la bomba, filtros, inyectores, etc (11).

### **Derivación de flujo.**

Afecta al tiempo de retención y también al área, variándolas análogamente. Al aumentar el flujo, disminuirá el tiempo de retención y el área y viceversa. Las causas pueden ser por cambio de la temperatura del entorno, temperatura de la columna o viscosidad de la fase móvil (y por lo tanto en la pérdida de carga de la columna), sobre todo al emplear gradientes de elución (11).

### **1. 5. 6. 5. Atenuadores de Pulsos**

El uso de atenuadores de impulso se encuentra en las bombas para disminuir los efectos de compresibilidad de los disolventes

Se emplea para estabilizar la línea base, útil para detectores muy sensibles, que necesiten atenuar la variación de flujo precedente de la bomba

Los atenuadores más comunes son el entubado de Bourdon o un diafragma especial, o bien sistemas que introducen una burbuja de gas (aire) en un tubo, para que este gas absorba las fluctuaciones de presión, etc. (11)

#### **1. 5. 6. 6. Sistemas de Inyección de Muestra**

Para obtener una buena resolución en la separación es la adecuada introducción de la muestra al sistema. Al introducir o inyectar la muestra es en forma de paquete, para obtener picos simétricos y angostos

Hay varios mecanismos de inyección. La forma más sencilla de introducir la muestra, es mediante una jeringa, esta soporta la presión del sistema aunque hay dispositivos que desvían el flujo del disolvente mientras se introduce la muestra reanudándolo posteriormente a través del inyector mediante un sistema de válvulas, o bien, se suspende el flujo mientras se introduce la muestra y posteriormente se reanuda. El sistema que minimiza errores por inyección en la introducción de la muestra es el inyector automático. Este dispositivo ayuda mantener la reproducibilidad entre las inyecciones y elimina los errores en la medición del volumen por inyectar (11)

#### **1. 5. 6. 7. Precolumnas**

La precolumna es una segunda columna anterior a ésta, se utiliza en CLAR, en los nuevos tipos de cromatografía líquida, tales como la de formación de pares iónicos, supresión iónica y solvofóbica

El empleo de precolumna mejora la eficiencia cromatográfica. Esto se demuestra en los resultados cromatográficos al usar o no precolumna. La duración de las columnas resultaba

muy limitada, debido a las altas presiones, aumento en volúmenes muertos y pérdida de resolución, así mismo se debe cuidar el pH de la muestra y sobre todo de la fase móvil, debido a que el gel de sílice es atacado por solventes a pH menor de 7, o bien la disminución del pH o el aumento de la ionicidad, aceleran la disolución del gel de sílice por la fase móvil disminuyendo la vida de la columna. Este problema afecta a la cromatografía de intercambio iónico, formación de par iónico y similares, para las de absorción, partición incluso en fase reversa, no son dañadas dado que las fases móviles no suelen portar ácidos, bases o sales.

La precolumna se disuelve mínimamente por la fase móvil, debido a que la fase móvil se satura el gel de sílice, y al llegar a la columna ya no la disolverá. La ventaja es que las precolumnas pueden conservar durante mucho tiempo la columna analítica. Las precolumnas y el guarda columna protegen la columna analítica de manera afectiva (11).

#### **1. 5. 6. 8. La columna cromatográfica.**

La columna es la parte central del sistema cromatográfico. Las primeras fases estacionarias estaban formadas por partículas de 35 a 70 micras, que proporcionaban 3000 platos teóricos. En la actualidad es posible alcanzar 50 000 platos teóricos con rellenos de 5 micras o menores (11).

#### **Fases estacionarias.**

La fase estacionaria debe ser estable y resistente a las altas presiones que se emplean. Cualquier variación en la presión no debe variar la permeabilidad del relleno respecto a los solutos. Los rellenos inorgánicos deben cumplir estas condiciones hasta 600 atm.

Los tipos de soportes utilizados en las columnas de CLAR son de varios tipos: no porosos, totalmente porosos y porosos (11).

#### - Rellenos no porosos

Un poro es una cavidad susceptible de albergar el soluto, y el relleno sólido va a recubrir superficialmente a la fase estacionaria, los solutos penetrarán más o menos en el recubrimiento superficial. Los rellenos superficialmente porosos consisten en partículas inertes de sílice de 10 a 40 micras, sobre cuya superficie hay una fase absorbente de 1-2 micras (11).

#### - Rellenos totalmente porosos

Están integrados totalmente por partículas de gel de sílice o alúmina. Estas partículas suelen tener forma irregular, en su conjunto son de mayor capacidad y menor volumen muerto (0.2 ml/g). Estos rellenos se utilizan en separaciones por CLAR de adsorción, en fase normal y fase reversa. Su diámetro medio está entre 10 y 50 micras. Tiene como inconveniente el no ser estable a altas presiones (11).

#### - Rellenos porosos

Tiene un soporte inerte ligado a la fase estacionaria igual al relleno no poroso. La capa que recubre al soporte inerte es delgada y consta de poros muy pequeños (1 a 3 micras, con diámetro pequeño de 30 a 40 micras). Generalmente se construyen con vidrios, que se recubren, según el caso de gel de sílice, alúmina, resinas intercambiadoras, poliamidas, etc. Producen mayor eficiencia que los rellenos semejantes pero totalmente porosos (11).

#### **Fases estacionarias utilizadas en CLAR de adsorción.**

Son lechos porosos o totalmente porosos que proporcionan áreas superficiales a  $2 \text{ m}^2/\text{g}$  o incluso mayores ( $15 \text{ m}^2/\text{g}$  para algunos geles de sílice). Son muy estables a la presión.

El gel de sílice y la alúmina son los materiales recubridores utilizados en estos rellenos. El gel de sílice es la más utilizada en columnas comerciales bien conocidas (Lichrosorb, Spherisorb



Zorbar, Nucleosil, Partisil, Spherosil, etc ). También se emplea el gel de sílice como soporte para fases estacionarias en cromatografía de partición. Es importante considerar la naturaleza tamaño y número de poros. La retención cromatográfica está en función de su área superficial. Sus grupos silanol pueden formar enlaces de hidrógeno con moléculas hidroxiladas; precisamente el agua se adsorbe por enlace de hidrógeno y para eliminarla se debe calentar la columna a 50 °C. Dada su naturaleza ácida, los álcalis y sobre todo los eluyentes polares, son muy retenidos mucho más que las sustancias neutras y muchísimas más que las ácidas.

Al utilizar una fase móvil de polaridad media como agua, metanol o acetonitrilo, su reacción con formación de enlace de hidrógeno puede ser de efectos desastrosos; no suele existir otros problemas de reactividad. Por modificaciones químicas de los grupos silanol superficiales; se pueden conseguir grupos hidrofóbicos para el empleo de fase reversa. Las propiedades de estos rellenos nada tienen que ver con los de fase normal.

El otro tipo de relleno es la alúmina. Posee alta área superficial, de 100 a 200 m<sup>2</sup>/g, con un volumen de poro de 0.2 a 0.3 ml/g, tiene poros de diámetro que oscila entre 100 y 200 Å. En su absorción la alúmina no solo forma enlaces puente de hidrógeno con los grupos OH<sup>-</sup> o grupos O, es susceptible de producir interacciones entre sus átomos de aluminio, el proceso de absorción irreversible puede descomponer a los solutos insertos en la columna. En las separaciones que emplean columnas de alúmina, la retención es mayor que en las de sílica gel, por lo cual y por las anteriores interferencias, se emplean poco las fases estacionarias de alúmina. (11)

### **Fases estacionarias utilizadas en CLAR de partición.**

En la cromatografía de partición implica situar, sobre los grupos OH<sup>-</sup> superficiales del gel de sílice, una fase estacionaria líquida, que se soporta sobre ellos, bien mecánicamente o químicamente por enlaces. Esta última técnica cromatográfica implica modificar químicamente los grupos superficiales del gel de sílice o alúmina. La selectividad de la fase estacionaria obtenida varía según la composición del radical unido.

El principal problema de los compuestos SiO es su inestabilidad hidrolítica, por lo que su uso es muy limitado, aunque se utiliza mucho en cromatografía gaseosa. Los del tipo Si CN, que por tratamiento posterior conducen a aminas del gel de sílice con un segundo grupo; su intervalo de estabilidad se extiende desde pH 4 a pH 7.5

Los alcoxisilanos Si-O-Si son el grupo más numeroso y con más aplicación. Las fases móviles seleccionadas deben ser absolutamente inmiscibles con el nuevo recubrimiento pues de lo contrario se dañaría irremediablemente la columna. Las ventajas con este tipo de columnas son: se pueden utilizar fases móviles no saturadas previamente de fase líquida que rodea el gel de sílice, el equilibrio establecido es estable incluso con variaciones de gradiente, temperatura, etc. No hay erosión mecánica y la fase estacionaria no se contamina con el solvente o solventes pues al haber partición, tarde o temprano eluyen.

Al contrario que en las cromatografías de adsorción aquí, en fase reversa, la fase estacionaria es apolar y la fase móvil polar. También se invierte el orden de elución, siendo en fase normal los solutos apolares mucho más retenidos que los polares. Operando en fase reversa se logran separaciones de compuestos apolares.

Las columnas fabricadas son desde 40 micras a 10 o 5 micras de tamaño medio de partícula. Los grupos funcionales que los integran son muy variables: alquilos, arios, alquilaminos, nitrito, nitrodioles, etc., y dentro de ellos según la longitud de la cadena del radical (11).

### **Fases estacionarias utilizadas en CLAR de intercambio iónico.**

Uno de los logros para la CLAR de intercambio iónico, es la obtención de columnas con rellenos de  $d_p = 20$  micras o menos físicamente estables hasta 200 atm, inicialmente utilizadas en separación de aminoácidos. Con gran capacidad intercambiadora (3 a 5 meg/g) tienen entre sus desventajas la poca repetibilidad de los análisis, muy variables en función del pH, temperatura, composición del eluyente y concentración iónica del relleno. Los rellenos de

columnas de intercambio iónico, son a base de derivados de silano, en los que se sustituyen los OH terminales por grupos intercambiadores de muy variada naturaleza. En la actualidad la mayoría de las fases estacionarias de intercambio iónico por CLAR se fabrican con grupos alquilo o arilo ligados por enlace covalente al gel de sílice, con valores de dp de 5 a 10 micras, con capacidad (de 700 a 1000 microeq/g) (11).

### **Fases estacionarias utilizadas en CLAR de exclusión.**

En la cromatografía de exclusión no intervienen ningún tipo de fuerza soluto - fase estacionaria, sino que la retención se establece por la accesibilidad del soluto a los poros, grandes y numerosos del relleno. Al principio, se usaban geles de naturaleza polimérica como los dextranos (Sephadex), las poli(acrilamidas) (Bio-gelP), la agarosa (Bio-gelA) todos para fases acuosas, paralelamente se desarrollaron para fases orgánicas algo menos polares: Styragel, Poragel, Bio-Beads S. Después llegaron los geles de acetato de polivinilo, como Merck o gel OR. Hidrofóbicos no estables a altas presiones, por lo que los análisis eran a bajas presiones, lentos y las columnas se deterioraban rápidamente.

Los geles de 15 micras pudieron alcanzar velocidades más aceptables. Se comercializaron los nuevos Styragel, Merck gel OR, Merck gel PGM, polietilenglicolmetacrilato, polietilenglicolacrilato (apto para fases acuosas), etc., resistiendo presiones de 60 atm.

Pero la resistencia a la presión y la permeabilidad eran las principales ventajas de gel de sílice y lechos de vidrio.

Después se investigó la síntesis de un gel de sílice poroso cuyos poros, en tamaño y número, podían ser variados a voluntad según las condiciones de síntesis. Entonces se creó los Linchrospher Porasil, Spheroporasil e incluso el Lichrosorb, basándose en gel de sílice y la de CPG - 10 o Bioblass, a partir de vidrio sólido con tamaño de poro desde 60 hasta 2500 Å, e incluso 25 000 Å o más, aptos para eluyentes polares y no polares (11).

### **La selección de la fase estacionaria adecuada.**

Para seleccionar la columna se puede realizar tras de unos ensayos previos (solubilidad, incluso CCF) se puede decidir la compra de la columna

Al seleccionar una columna se debe considerar las propiedades fisicoquímicas de la muestra problema, principalmente su estructura química

Básicamente se reflexiona de la siguiente forma si la muestra presenta solutos de gran peso molecular, se puede separar con columnas de exclusión, bien por filtración, por geles o permeabilidad por geles, que puede ser en fase normal o reversa, Si la muestra es de bajo peso molécula (100 a 1000 g/mol) se debe confirmar su solubilidad y su ionicidad. Siendo la muestra problema soluble en agua e iónica, se elige una columna de CLAR de intercambio iónico (aniónica o catiónica); para muestras hidrosolubles no iónicas, serán útiles las columnas de CLAR de adsorción, CLAR de partición, de fase reversa para muestras hidrofóbicas (11).

### **Manejo y Cuidados de la Columna.**

La columna es la parte más delicada del instrumento, un daño le puede disminuir la eficiencia y resolución cromatográfica Como en el caso de la columna de absorción líquido - sólido (de gel de sílice y alúmina) Tras de usarlas continuamente, la columna se desactiva, a causa del uso de disolventes indebidos, aunque estén en mínima proporción Al desactivarse, la resolución disminuye y la selectividad se pierde

Es recomendable la colocación de filtros microrreticulares a la entrada y a la salida de la columna, es necesario filtrar los disolventes y las muestras

Cuando el filtro se deteriore la presión aumentará de sobremanera, de modo que será fácil de detectar

Se deben almacenar correctamente las columnas que de momento no se usen; deberán estar en un lugar protegido de la humedad ambiental, para evitar que se dañe la fase estacionaria interna, incluso se pueda oxidar el exterior metálico. También se ha de tener cuidado con los golpes, debido a que pueden ocasionar ligeros movimientos del relleno, ocasionando modificaciones a la homogeneidad del empaquetado.

Nunca se deben guardar cuando se le ha pasado soluciones buffer o sales, ya que se pueden cristalizar las sales dentro de la columna, dando como resultado una alta presión; es necesario pasarle agua, después acetonitrilo o metanol antes de almacenarlas.

Es muy conveniente tener en el laboratorio una bitácora de uso de columnas, en la cual se registrará un historial de cada columna: la fecha de adquisición, fecha de uso día por día, disolventes, muestra analizada, número de platos teóricos, y observaciones (pérdida de eficiencia, aumento de presión, cambio de frits, etc.)

Cuando la columna se deteriora aumenta la presión y se pierde la eficacia, y durante el análisis donde había un pico puede aparecer con todos y hombros, se debe intentar que la columna vuelva a su eficiencia inicial mediante métodos de regeneración de columnas, estos métodos consisten en lavados de columnas con diferentes disolventes dependiendo del tipo de columna (11).

#### **1. 5. 6. 9. Detectores.**

La cromatografía no fue una técnica completamente autónoma hasta la incorporación de los detectores al equipo instrumental. El detector posibilita el análisis continuo del frente de la fase móvil, eluida de la columna (detectores con sistema de porta muestras de flujo continuo), con una extraordinaria sensibilidad y precisión, de acuerdo con la gran resolución de las modernas columnas microparticulares.

Un buen detector debe ser universal o específico, deberá ser de una alta sensibilidad, así como una respuesta estable con el tiempo y alto rango de linealidad, la celda y las conexiones serán de bajo volumen muerto.

**Los Detectores se clasifican en:**

- Detectores Universales

Son para todo tipo de muestras

- Detectores Selectivos

Detectan una muy limitada serie de compuestos o grupos funcionales

- Detectores Específicos

Solo pueden responder a un muy limitado grupo de moléculas

La respuesta debe ser lineal a la concentración de la muestra, de tal forma que la molécula problema debe producir señal en el detector, donde la intensidad de la señal es proporcional al número de moléculas que pasan por la cubeta de flujo continuo. Existen 3 parámetros fundamentales para el detector: Límite de detección, linealidad y sensibilidad.

Los detectores en CLAR se pueden clasificar como a continuación:

- Detectores ópticos: refractómetros, fotómetros, espectrofotómetros de UV - Vis e IR, fluorímetros, fotómetros de flama, espectrofotómetros de absorción atómica, etc.

- Detectores eléctricos: electroquímicos, amperimétricos, conductímetros, polarógrafos, constante dieléctrica, etc.

- Otros detectores: radiométricos, de ionización por flama, de captura electrónica, analizadores térmicos, espectrómetros de masas, viscosímetros, densímetros, etc (11)

### **Tipo de Detectores.**

#### **Refractómetros.**

Miden cambios en el índice de refracción de la porción de fase móvil que pasa por una cubeta de flujo continuo. Así cuando un soluto sea eluido se apreciará una banda como resultado del cambio de índice de refracción. Cuando se opera a alta sensibilidad, se obtienen frecuentes y marcadas bandas, las variaciones de temperatura originan variaciones del índice de refracción. Al termo estabilizar se alcanzan detecciones del orden de ppm, este es el actual límite de estos detectores.

Estos detectores son útiles para compuestos que no absorban radiaciones UV - Vis o sean difíciles de derivatizar, pero no se puedan emplearse junto a gradientes de elución, pues implican grandes variaciones en el índice de refracción.

Se aplican para determinación de carbohidratos, polímeros, determinación de compuestos con diferentes pesos moleculares. Los compuestos con estructura grande o pesos moleculares grandes desvían la luz satisfactoriamente (11).

#### **Espectrofluorimétricos.**

Consisten en recoger la fluorescencia emitida por cada soluto en una celda de flujo continuo. Se excita la molécula en solución con cada  $\lambda$  excitación, recogiendo un microdetector la  $\lambda$  emitida generalmente a  $90^\circ$  respecto al haz excitador. La luz entra a la muestra, la absorbe, para después emitirla por fluorescencia, y finalmente un fotomultiplicador la detecta.

La probabilidad de que las moléculas coincidan en la energía de excitación y la energía de emisión es rara, debido a que la espectrofluorimetría es una técnica selectiva, aún más que la espectrofotometría

El detector de fluorescencia de flujo continuo es utilizado para análisis de trazas, productos que contengan vitamina B<sub>2</sub>, aminoácidos, es muy sensible y específico (11)

### **Electroquímicos.**

Alcanzan buena selectividad, semejante a los detectores espectrofotométricos El empleo de estos confiere una gran selectividad, en determinaciones complejas

Las soluciones buffer a alta concentración y los cambios bruscos de temperatura afectan al detector, así como la eventual contaminación de los electrodos, aunque estos pueden ser cambiables

El detector es muy sensible porque realiza determinaciones en mg / L y picogramos / mL

Se utilizan para análisis en

Fenoles 20%, aminas 20%, catecolaminas 30%, compuestos nitrosados 5 0%, compuestos sulfurados 5 0%, compuestos inorgánicos 5 0% y otros compuestos 15% (11)

### **Fotómetros y Espectrofotómetros.**

Miden el cambio de absorbancia A, definida por la ley de Lambert - Beer

$$A = \frac{\log(I_0)}{I}$$



Donde  $I_0$  = Intensidad de radiación incidente sobre la muestra

$I$  = Intensidad de radiación convergente al traspasar la muestra problema

La medida de absorbancia es de modo continuo a muy pequeños intervalos de tiempo. Esto implica utilizar celdas de flujo continuo especiales, de volumen pequeño, de 10 microlitos o menos, y solventes de alta pureza poco detectables a las longitudes de onda UV - Vis empleadas. Estos detectores no son destructivos y muy sensibles a pequeñas variaciones en la concentración.

Los detectores Uv - Vis se clasifican en Longitud de onda fija, longitud de onda variable, longitud de onda múltiple, arreglo de diodos.

Se emplean lámparas de mercurio para obtener bandas fijas a 254 nm, o bien a 280 nm. La mayoría de las moléculas de interés farmacológico, clínico o bromatológico es detectada a estas dos longitudes de onda fija, entonces el detector será un fotómetro.

Se usa una lámpara de deuterio para una emisión continua, mediante un monocromador se selecciona la longitud de onda más adecuada, la señal se envía al detector espectrofotométrico; se obtienen mejores resultados que el de longitud de onda fija. Estos detectores contrarrestan la absorción de la fase móvil, equilibrando la línea base. Hay detectores de flujo continuo de doble haz, que pueden pasar el flujo del eluyente para realizar un barrido espectral de cada pico.

Los sistemas ópticos de los detectores se clasifican en

- Sistema óptico convencional

Un haz de luz de la fuente es seleccionado por el monocromador a través de la abertura, después este atraviesa la muestra que posteriormente es detectada.

- Sistema óptico de arreglo de diodos.

Toda la fuente incide sobre la muestra completamente, después el monocromador lo emite, posteriormente la señal llega al detector que lee cada 2 nm debido a que cuenta con aproximadamente 1024 elementos de arreglo de diodo, la cuantificación mejora dado que se detectan impurezas en los picos, en este sistema se optimizan la sensibilidad y la resolución. (11)

### **Espectrómetro de masas.**

Trata la muestra de la siguiente forma, recoge el líquido eluido en una cámara de evaporación, donde se elimina la fase móvil líquida, ionizando los solutos eventuales, después se introducen en el espectrofotómetro de masas

Este detector es universal debido a que se determinan todas las estructuras químicas, es de alta sensibilidad, funciona con pequeñas cantidades de muestra. (11)

### **De captura de electrones.**

Detecta halógenos de la siguiente forma El eluyente, que sale de la columna, se volatiliza y purga con  $N_2$ , detectando a los productos halogenados Las técnicas de absorción son utilizadas y la fase móvil, como fase normal suele ser hexano Se aplica en determinaciones de insecticidas clorados, DDT, bifenoles, policlorados, etc (11)

## **1. 6.VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

Para establecer un método analítico se deben considerar las siguientes etapas.

- 1 Diseño
- 2 Desarrollo
- 3 Validación

### **1. 6. 1. El diseño se divide:**

#### **1. 6. 1. 1. Revisión Bibliográfica.**

En esta etapa del diseño se recopila toda la información documentada para conocer las propiedades físicas, químicas, la estabilidad y las interacciones con el principio activo (18).

#### **1. 6. 1. 2. Adaptación Parcial.**

Tiene la finalidad de adaptar parcialmente las condiciones cromatográficas de un método analítico, descrito en la literatura, para el análisis de la sustancia de interés. Estas condiciones pueden ser tipo de cromatografía, columna, fase móvil, preparación de muestra, etc , utilizadas en el diseño de un nuevo método analítico (18)

#### **1. 6. 1. 3. Adaptación Total.**

Consiste en la adaptación completa de las condiciones cromatográficas, para reproducir fielmente un método analítico reportado en la literatura, en el análisis de la sustancia de interés (18).

## **1. 6. 2. Desarrollo.**

Se define como: El conjunto de actividades que se realizan dentro del conocimiento de la ciencia, la tecnología, el arte y la ética farmacéutica, destinado a obtener el máximo aprovechamiento de un medicamento.

Los medicamentos están formados por el principio activo y excipientes, para el análisis del principio activo se necesitará desarrollar un método analítico <sup>(18)</sup>.

Partiendo de una adaptación parcial se desarrollará un método analítico, tomando a consideración la siguiente:

### **1. 6. 2. 1. Condiciones Cromatográficas preliminares.**

**Optimización de:**

Columna, fase móvil, pH, fuerzas iónicas, velocidad de flujo, detección.

### **1. 6. 2. 2. Eficiencia de Extracción.**

**Optimización de:**

Solvente de elección, fase móvil, pH, tipo de columna, detección, resolución, tiempo de retención, tiempo de disolución, coeol.

### **1. 6. 3. Definición.**

La Validación de un Método Analítico se define como: El proceso mediante el cual queda establecido, a través de estudios experimentales, que su capacidad satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. Esta capacidad se expresa en términos de parámetros

estadísticos como: linealidad, precisión, repetibilidad, reproducibilidad, especificidad, entre otros.

El objetivo principal de la validación es producir los mejores resultados analíticos posibles. Para validar una metodología analítica se realiza analizando muestras similares en todos los aspectos a las muestras en las que se aplicará el método y comparando los valores obtenidos con los esperados (19).

Los parámetros de evaluación comunes para la validación de métodos analíticos son los siguientes:

- Linealidad del Sistema
- Linealidad del Método
- Precisión del Método:
  - Repetibilidad del Método
  - Reproducibilidad del Método.
- Especificidad para la Estabilidad.

Los demás parámetros se utilizan según lo requiera el método analítico o de acuerdo a las necesidades de la empresa farmacéutica como son: Tolerancia del sistema, Cantidad Mínima Detectable, Cantidad Mínima Cuantificable, Estabilidad de la Muestra, etc.

#### **1. 6. 4. Parámetros.**

##### **1. 6.4. 1. Linealidad del Sistema.**

###### **Definición.**

Es la habilidad que tiene un sistema para asegurar que los resultados analíticos son proporcionales a la concentración de sustancia dentro de un rango determinado (19,20).

### Determinación Experimental.

Se determinará, construyendo una curva de calibración de la concentración contra la respuesta, de una misma solución patrón utilizando cuando menos 5 diluciones y haciendo análisis por triplicado para cada dilución.

Para propósitos de control de calidad y de seguimiento de la estabilidad del activo en la forma farmacéutica, se deberá incluir el cien por ciento de la dosis.

### Cálculos.

Tabularán los resultados como se indica a continuación:

Nivel	Concentración de la dilución de la solución patrón (X)	Respuesta
1	X <sub>1</sub>	Y <sub>1</sub>
	X <sub>2</sub>	Y <sub>2</sub>
	X <sub>3</sub>	Y <sub>3</sub>
2	X <sub>4</sub>	Y <sub>4</sub>
	X <sub>5</sub>	Y <sub>5</sub>
	X <sub>6</sub>	Y <sub>6</sub>
3	X <sub>7</sub>	Y <sub>7</sub>
	X <sub>8</sub>	Y <sub>8</sub>
	X <sub>9</sub>	Y <sub>9</sub>
4	X <sub>10</sub>	Y <sub>10</sub>
	X <sub>11</sub>	Y <sub>11</sub>
	X <sub>12</sub>	Y <sub>12</sub>
5	X <sub>13</sub>	Y <sub>13</sub>
	X <sub>14</sub>	Y <sub>14</sub>
	X <sub>15</sub>	Y <sub>15</sub>

Se calculará la sumatoria de x ( $\Sigma x$ ), la sumatoria de y ( $\Sigma y$ ), la sumatoria de  $x^2$  ( $\Sigma x^2$ ), la sumatoria de  $y^2$  ( $\Sigma y^2$ ), la sumatoria de xy ( $\Sigma xy$ ) en base a las siguientes ecuaciones :

$$\begin{aligned} \sum x &= x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_{13} + x_{14} + x_{15} \\ \sum y &= y_1 + y_2 + y_3 + \dots + y_{13} + y_{14} + y_{15} \\ \sum x^2 &= x_1^2 + x_2^2 + x_3^2 + \dots + x_{13}^2 + x_{14}^2 + x_{15}^2 \\ \sum y^2 &= y_1^2 + y_2^2 + y_3^2 + \dots + y_{13}^2 + y_{14}^2 + y_{15}^2 \\ \sum xy &= x_1y_1 + x_2y_2 + x_3y_3 + \dots + x_{13}y_{13} + x_{14}y_{14} + x_{15}y_{15} \end{aligned}$$

Se calculará la pendiente (m), la ordenada al origen ( b ) y el coeficiente de correlación ( r<sup>2</sup> ) de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} m &= \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \\ b &= \frac{\sum y - m \sum x}{n} \\ r^2 &= \frac{(n \sum xy - \sum x \sum y)^2}{(n \sum x^2 - (\sum x)^2)(n \sum y^2 - (\sum y)^2)} \end{aligned}$$

### **Criterios de Aceptación.**

Coefficiente de Determinación (r<sup>2</sup>) ≥ 0.98

Coefficiente de Correlación (r) ≥ 0.99

#### **1. 6. 4. 2. Precisión del Sistema.**

##### **Definición.**

Es el grado de concordancia obtenida entre determinaciones independientes cuando el procedimiento se aplica (19,20).

### **Determinación Experimental.**

Se determinará realizando el análisis por sextuplicado de una misma solución, correspondiente al 100% que se indica el método analítico.

### **Cálculos.**

$$\begin{aligned}\sum y &= y_1 + y_2 + \dots + y_6 \\ \sum y^2 &= y_1^2 + y_2^2 + \dots + y_6^2 \\ y_p &= \frac{\sum y}{6}\end{aligned}$$

Calcular la desviación estándar (DE) basándose en la siguiente ecuación:

$$DE = \sqrt{\frac{N\sum y^2 - (\sum y)^2}{N(N-1)}}$$

Calcular el coeficiente de variación (CV) basándose en la siguiente ecuación:

$$CV = \frac{DE}{y_p} \times 100$$

### **Criterios de Aceptación.**

El coeficiente de variación es menor o igual a 5% (métodos microbiológicos).

El coeficiente de variación es menor o igual a 1.5% (los demás métodos).



### 1. 6. 4. 3. Linealidad del Método.

#### Definición.

Es la habilidad que tiene un método analítico para asegurar que los resultados analíticos son proporcionales a la concentración de sustancia dentro de un rango determinado (19.20).

#### Determinación Experimental.

Se prepararán por triplicado y por separado, se adicionará al placebo correspondiente al 100% muestras del principio activo correspondientes al 50, 75, 100, 125 y 150% de la cantidad requerida por el método analítico. La adición puede realizarse pesando las cantidades del principio activo o agregando alícuotas de una solución Stock. Se calculará los miligramos recuperados para cada una de las muestras.

#### Cálculos

Se tabularán los resultados como se indica a continuación:

Nivel	mg Adicionados	mg Recuperados
1	X <sub>1</sub>	Y <sub>1</sub>
	X <sub>2</sub>	Y <sub>2</sub>
	X <sub>3</sub>	Y <sub>3</sub>
2	X <sub>4</sub>	Y <sub>4</sub>
	X <sub>5</sub>	Y <sub>5</sub>
	X <sub>6</sub>	Y <sub>6</sub>
3	X <sub>7</sub>	Y <sub>7</sub>
	X <sub>8</sub>	Y <sub>8</sub>
	X <sub>9</sub>	Y <sub>9</sub>
4	X <sub>10</sub>	Y <sub>10</sub>
	X <sub>11</sub>	Y <sub>11</sub>
	X <sub>12</sub>	Y <sub>12</sub>
5	X <sub>13</sub>	Y <sub>13</sub>
	X <sub>14</sub>	Y <sub>14</sub>
	X <sub>15</sub>	Y <sub>15</sub>

Se calcularán las sumatorias de  $x$  ( $\Sigma x$ ), la sumatoria de  $y$  ( $\Sigma y$ ), la sumatoria de  $x^2$  ( $\Sigma x^2$ ), la sumatoria de  $y^2$  ( $\Sigma y^2$ ), la sumatoria de  $xy$  ( $\Sigma xy$ ) y la sumatoria de  $y_i^2$  ( $\Sigma y_i^2$ ) en base a las siguientes ecuaciones:

$$\Sigma x = x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_{13} + x_{14} + x_{15}$$

$$\Sigma y = y_1 + y_2 + y_3 + \dots + y_{13} + y_{14} + y_{15}$$

$$\Sigma x^2 = x_1^2 + x_2^2 + x_3^2 + \dots + x_{13}^2 + x_{14}^2 + x_{15}^2$$

$$\Sigma y^2 = y_1^2 + y_2^2 + y_3^2 + \dots + y_{13}^2 + y_{14}^2 + y_{15}^2$$

$$\Sigma xy = x_1y_1 + x_2y_2 + x_3y_3 + \dots + x_{13}y_{13} + x_{14}y_{14} + x_{15}y_{15}$$

$$\Sigma y_i^2 = (y_1 + y_2 + y_3)^2 + (y_4 + y_5 + y_6)^2 + (y_7 + y_8 + y_9)^2 + (y_{10} + y_{11} + y_{12})^2 + (y_{13} + y_{14} + y_{15})^2$$

Se calculará la pendiente ( $m$ ), la ordenada al origen ( $b$ ) y el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

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

$$b = \frac{\Sigma y - m \Sigma x}{n}$$

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

Se calculará la suma de Cuadrados de la regresión ( $SCr$ ), la suma de cuadrados del error de regresión ( $SCer$ ), la suma de cuadrados de la falta de ajuste ( $SCfa$ ) y la suma de cuadrados del error puro ( $SCep$ ) de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$SCr = m \Sigma xy + b \Sigma y - \frac{(\Sigma y)^2}{n}$$

$$SCer = \Sigma y^2 - m \Sigma xy - b \Sigma y$$

$$SCep = \Sigma y^2 - \frac{(\Sigma y_i)^2}{r}$$

$$SCfa = SCer - SCep$$

Se construirá la tabla de análisis de varianza (ANADEVA):

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	$F_{calculada}$
Regresión	1	SCr	SCr	$Fr = SCr / MCer$
Error de Regresión	n - 2	SCer	$SCer / g.l.e.r$	
Falta de Ajuste	$(n - 2) - t(r - 1)$	SCfa	$SCfa / g.l.fa$	$Ffa = MCfa / MCep$
Error Puro	$t(r - 1)$	SCep	$SCep / g.l.e.p$	

En la tabla de distribución F se localizará el valor para F con los grados de libertad de la regresión en el numerador y los grados de libertad del error de regresión en el denominador y con un nivel de confianza del 99%;  $F_{(g.l.r / g.l.e.r; 0.99)}$ .

En la tabla de distribución F se localizará el valor para F con los grados de libertad de la falta de ajuste en el numerador y los grados de libertad del error puro en el denominador y con un nivel de confianza del 95%;  $F_{(g.l.fa / g.l.e; 0.95)}$ .

Se compararán los valores de Fr y Ffa con los valores de F de tablas. Si:

Fr es mayor o igual que  $F_{(g.l.r / g.l.e.r; 0.99)}$  y Ffa es menor o igual que  $F_{(g.l.fa / g.l.e; 0.95)}$ , el modelo lineal es correcto para describir la relación entre miligramos adicionados y miligramos recuperados

Se calculará la media cuadrática del error de regresión (  $MCerrReg$  ), la media cuadrática de regresión (  $MCreg$  ), la desviación estándar de la pendiente (  $S_m$  ) y la desviación estándar para la ordenada al origen (  $S_b$  ) de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$McErr Reg = \frac{\sum y^2 - m \sum xy - b \sum y}{n - 2}$$

$$MCreg = b \sum y + m \sum xy - (\sum y)^2 / n$$

$$S_m = \left| McErr Reg \left( \frac{x_p^2}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} + \frac{1}{n} \right) \right|^{1/2}$$

$$S_b = \left| MCreg \left( \frac{1}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \right) \right|^{1/2}$$

Se calculará  $t_m$  y  $t_b$  de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$t_m = \frac{1 - m}{s_m}$$

$$t_b = \frac{0 - b}{s_b}$$

En la tabla de distribución t de Student se puede localizar el valor para la t con n - 1 grados de libertad y un nivel de significancia de 0.95  $t(n, 0.95)$

Se compararán los valores de  $t_m$  y  $t_b$  con  $t(n, 0.95)$ :

Si, el valor de  $t_m$  es menor que  $t(n, 0.95)$ , el método analítico es lineal con una pendiente estadísticamente igual a uno y si el valor de  $t_b$  es menor que  $t(n, 0.95)$ , el método analítico es lineal con una ordenada al origen estadísticamente igual a uno.

### **Criterios de Aceptación.**

Se comparará el valor de  $t$  de tablas contra los valores calculados de  $t_m$  y  $t_b$  :

Sí el valor absoluto de  $t_m$  es menor que  $t(14 ; 0.95)$ , estadísticamente la pendiente es igual a 1.

Sí el valor absoluto de  $t_b$  es menor que  $t(14 ; 0.95)$ , estadísticamente la ordenada al origen es igual a cero.

### **1. 6. 4. 4. Exactitud del Método.**

#### **Definición.**

Es la concordancia que existe entre los datos obtenidos por el método y el valor real esperado (100%). Se expresa como por ciento de recobro obtenido del análisis de placebos cargados

(19,20)

#### **Determinación Experimental.**

Se preparará seis muestras del placebo cargado al 100% a partir de una solución Stock de estándar y se analizarán por el mismo analista en las mismas condiciones de operación.

#### **Cálculos.**

Para el porcentaje recuperado para cada recobro ( $y$ ).

$$y = \left( \frac{x}{y_p} \right) 100$$

Media del porcentaje recuperado ( $y_p$ ).

$$y_p = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar del porcentaje recuperado ( $s$ ).

$$s = \frac{\sum (y - y_p)^2}{n - 1}$$

Coefficiente de variación (CV)

$$CV = \left( \frac{s}{y_p} \right)$$

Se calculará el valor de t de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$t_c = (y_p - 100)(n)^{1/2}$$

Intervalo de confianza para la media.

$$IC = y_p + t(g, n - 2, 0.95) \dots s / \text{raiz}(n)$$

Donde  $n$  = Número de recobros independientes

$x$  = cantidad recuperada

$y$  = cantidad adicionada

### **Criterio de Aceptación.**

Se comparará los valores de la t calculada con el valor de t ( $n-1, 0.95$ ) y se establecerá la siguiente regla de decisión:

Si el valor absoluto de la t calculada es menor que el valor de t (9, 0.95) el método es exacto.

#### **1. 6. 4. 5. Precisión del Método.**

##### **1. 6. 4. 5. 1. Repetibilidad del Método.**

###### **Definición.**

Es la precisión expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un día por un mismo analista usando los mismos aparatos y reactivos (19,20)

###### **Determinación Experimental.**

A los porcentajes de recobros obtenidos al realizar la exactitud, se calculará el promedio ( $y_p$ ) y la desviación estándar (s). Con los datos anteriores se determinará el coeficiente de variación.

###### **Cálculos.**

Con los datos anteriores se determinará el coeficiente de variación:

$$C.V. = \frac{100s}{y_p}$$

###### **Criterio de Aceptación.**

El método será repetible si el coeficiente de variación es menor o igual a 2.

### 1. 6. 4. 5. 2. Reproducibilidad del Método.

#### Definición.

Es la precisión expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas, diferentes días, laboratorios y/o equipos (19,20)

#### Determinación Experimental.

Elegir al azar 2 analistas que realizarán la prueba. El primer analista será el encargado de homogeneizar la muestra, se determinará previamente el peso promedio si es necesario. Esta muestra será usada por ambos analistas durante los 2 días del análisis, por lo que deberá ser manipulada cuidadosamente.

Cada analista realizará el análisis de la muestra por triplicado anotando sus resultados.

#### Cálculos.

Se tabularán los resultados de la siguiente forma:

D I A	A N A L I S T A	
	1	2
1	y111	y211
	y112	y212
	y113	y213
2	y121	y221
	y122	y222
	y123	y223



Se calculará la suma de las combinaciones analista - día (  $y_{ij}$  ):

$$y_{1.} = y_{111} + y_{112} + y_{113}$$

$$y_{12.} = y_{121} + y_{122} + y_{123}$$

$$y_{21.} = y_{211} + y_{212} + y_{213}$$

$$y_{22.} = y_{221} + y_{222} + y_{223}$$

Se calculará la suma para cada analista ( $y_{i.}$ )

$$y_{1.} = y_{111} + y_{112} + y_{113} + y_{121} + y_{122} + y_{123}$$

$$y_{2.} = y_{211} + y_{212} + y_{213} + y_{221} + y_{222} + y_{223}$$

Se calculará la suma total ( $y_{...}$ )

$$y_{...} = y_{1.} + y_{2.}$$

Se calculará la suma del cuadrado de cada analista en cada día:

$$\sum y_{i.}^2 = (y_{11.})^2 + (y_{12.})^2 + (y_{21.})^2 + (y_{22.})^2$$

Se calculará la suma del cuadrado de cada analista en los dos días:

$$\sum y_{i.}^2 = (y_{1.})^2 + (y_{2.})^2$$

Se calculará la suma de cada dato elevado al cuadrado:

$$\sum \sum \sum y_{ijk}^2 = (y_{111})^2 + (y_{112})^2 + (y_{113})^2 + \dots + (y_{221})^2 + (y_{222})^2 + (y_{223})^2$$

Se calculará la suma de cuadrados del analista (SCa), efecto del factor analista, con la siguiente fórmula:

$$SCa = \frac{\sum y_{i..}^2}{dr} - \frac{y_{...}^2}{adr}$$

donde : a = número de analistas  
d = número de días  
r = número de repeticiones

Se calculará la suma de cuadrados del día anidado en el analista (SCd), con la siguiente fórmula:

$$SCd = \frac{\sum \sum y_{ij.}^2}{r} - \frac{\sum y_{i..}^2}{dr}$$

Se calculará la suma de cuadrados del error (SCe) con la siguiente fórmula:

$$SCe = \sum \sum \sum y_{ijk}^2 - \frac{\sum \sum y_{ij.}^2}{r}$$

Con los datos anteriores se construirá la tabla de Análisis de Varianza:

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F calculada
Analista	a - 1	SCa	SCa	Fa = SCa / MCd Fd = MCd / MCE
Día	gd1 = (d - 1) a	SCd	SCd / gld	
Error	gle = (r - 1) ad	SCfe	SCe / gle	

En la tabla de F se obtendrán los valores de F con los grados de libertad para el analista en el numerador y los grados de libertad para el día en el denominador con un  $\alpha$  de 0.05 (  $F_{gla, gld; 0.05}$  )

En la tabla de F se obtendrán los valores de F con los grados de libertad para el día en el numerador y los grados de libertad para el error en el denominador con un  $\alpha$  de 0.05 (  $F_{gld, gle; 0.05}$  )

Se compararán los valores de  $F_a$  contra  $F_{gla, gld; 0.05}$  y  $F_d$  contra  $F_{gld, gle; 0.05}$ .

### **Criterios de Aceptación.**

$F_a < F_{gla, gld; 0.05}$  el método analítico será reproducible por los analistas.

$F_d < F_{gld, gle; 0.05}$  el método analítico será reproducible en distintos días por un mismo analista.

### **1. 6. 4. 6. Estabilidad de la Muestra.**

#### **Definición.**

Son las condiciones en las cuales la muestra mantiene constante su propiedad medible en un lapso determinado (19,20)

#### **Determinación Experimental.**

La determinación se hará por triplicado bajo tres condiciones de almacenamiento. De las 10 muestras preparadas para la exactitud, sólo se utilizarán 9 y se dividirán en tres grupos bajo las siguientes condiciones: temperatura ambiente, obscuridad, refrigeración.

Después de 24 horas de realizar la determinación para la exactitud, se tomará una porción de cada uno de los grupos y se analizará, preparando nuevamente la solución estándar. Calculará el porcentaje de recobro.

**Cálculos.**

Se tabularán los resultados como a continuación:

tiempo ( h )	Condición		
	Obscuridad	Luz	Refrigeración
0	$y_{111}$	$y_{211}$	$y_{311}$
	$y_{112}$	$y_{212}$	$y_{312}$
	$y_{113}$	$y_{213}$	$y_{313}$
24	$y_{121}$	$y_{221}$	$y_{321}$
	$y_{122}$	$y_{222}$	$y_{322}$
	$y_{123}$	$y_{223}$	$y_{323}$
48	$y_{131}$	$y_{231}$	$y_{331}$
	$y_{132}$	$y_{232}$	$y_{332}$
	$y_{133}$	$y_{233}$	$y_{333}$

Se calculará el total de la combinación condición tiempo( $y_{ij}$ ) de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned}
 y_{11} &= y_{111} + y_{112} + y_{113} \\
 y_{21} &= y_{211} + y_{212} + y_{213} \\
 y_{31} &= y_{311} + y_{312} + y_{313} \\
 &\dots \bullet \dots \bullet \dots \bullet \dots \bullet \dots \\
 &\dots \bullet \dots \bullet \dots \bullet \dots \bullet \dots \\
 y_{13} &= y_{131} + y_{132} + y_{133} \\
 y_{23} &= y_{231} + y_{232} + y_{233} \\
 y_{33} &= y_{331} + y_{332} + y_{333}
 \end{aligned}$$

Se calculará la suma de cuadrados de la propiedad medida ( $\sum\sum\sum y_{ijk}^2$ ) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\sum\sum\sum y_{ijk}^2 = y_{111}^2 + y_{112}^2 + y_{113}^2 + \dots + y_{331}^2 + y_{333}^2$$

Se calculará la suma de los cuadrados del total de la combinación condición tiempo ( $\sum\sum y_{ij}^2$ ) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\sum\sum y_{ij}^2 = (y_{.11})^2 + (y_{.12})^2 + (y_{.13})^2 + \dots + (y_{.31})^2 + (y_{.32})^2 + (y_{.33})^2$$

Se calculará la suma de cuadrados del error (SCe) y la media de cuadrados del error (MCe) en base a las siguientes ecuaciones, en donde r es el número de replicaciones y t es el número de tratamientos:

$$SCe = \sum\sum\sum y_{ijk}^2 - \sum\sum y_{ij}^2$$

$$MCe = \frac{SCe}{t(r-1)}$$

Se calculará la  $t_D$  (t de Dunnet) para cada interacción de acuerdo a la siguiente fórmula, donde  $y_{pt}$  es el promedio del tratamiento,  $y_{pc}$  es el promedio del tratamiento al tiempo cero:

$$t_D = \frac{y_{pt} - y_{pc}}{\left(MCe \left(2 \frac{1}{r}\right)\right)^{1/2}}$$

Se tabularán los valores obtenidos a continuación:

Tiempo ( h )	Condición		
	Oscuridad	Luz	Refrigeración
0	-----	-----	-----
24	$t_{D1}$	$t_{D2}$	$t_{D3}$
48	$t_{D4}$	$t_{D5}$	$t_{D6}$

En la tabla  $t_D$  se localizará el valor para la  $t$  con  $t(r-1)$  grados de libertad en el numerador,  $m$  (número de comparaciones a realizar contra el tratamiento control) en el denominador y un nivel de significancia de 0.95.

Se comparará a cada uno de los valores de  $t_{D1}$  contra el valor de  $t$  de tablas.

#### **Criterio de Aceptación.**

El valor absoluto de la  $t$  calculada deberá ser menor que el valor de tablas para considerar que la muestra es estable bajo esas condiciones y tiempo

#### **1. 6. 4. 7. Especificidad para Control de Calidad.**

#### **Definición.**

Se usa para comprobar que los productos de degradación no interfieran con los excipientes en las determinaciones de productos en Control de Calidad. (19,20)

### **Determinación Experimental.**

Se analizarán 6 muestras del estándar al 100% de acuerdo al método analítico.

A otras 6 muestras de estándar al 100% se añadirá el placebo y se analizará de acuerdo al método analítico

### **Cálculos.**

Se calculará el promedio ( $y_{p1}$ ) y la varianza ( $s_1^2$ ) de los resultados obtenidos para las muestras de estándar, así como el promedio ( $y_{p2}$ ) y la varianza ( $s_2^2$ ) de las muestras con placebo añadido.

Se calculará la varianza ponderada ( $s_p^2$ ), de acuerdo a la siguiente ecuación:  
, donde n es el número total de muestras analizadas.

$$S_p^2 = 5 \left( \frac{s_1^2 + s_2^2}{n - 2} \right)$$

Se calculará el valor de t de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$t = \frac{y_{p1} - y_{p2}}{n - 2}$$

En la tabla de distribución t de Student se localizará el valor para la t con n -2 grados de libertad y un nivel de significación del 95%  $t_{(n-2, 0.95)}$ .

### **Criterios de aceptación.**

Si el valor de t calculada es menor que  $t_{(n-2, 0.95)}$  el método analítico será específico para control de calidad.

#### **1. 6. 4. 8. Especificidad para Estabilidad.**

##### **Definición.**

Se utiliza para valorar el principio activo durante una prueba de estabilidad, y demostrar que los productos de degradación debidos al principio activo y/o a los excipientes no interfieren en la cuantificación (19,20).

##### **Determinación Experimental.**

Como normalmente no se cuenta con los estándares de los productos de degradación y en algunas ocasiones ni siquiera se sabe cual es la ruta de degradación, se seguirá el procedimiento general:

Se colocará por duplicado en frascos de vidrio adecuados, muestras de: principio activo, de placebo y de placebo cargado, de acuerdo a la cantidad que indique el método que se está validando. Cada una de las muestras será sometida a las siguientes condiciones:

Hidrólisis básica, hidrólisis ácida, oxidación etc.

El análisis se realizará de acuerdo al método analítico.

##### **Cálculos.**

Se realizarán como para especificidad para control de calidad.

En caso de que no se cuente con estándares de los productos de degradación y si se conoce cual es la posible ruta de degradación del principio activo y excipientes, se someterá por duplicado muestras de principio activo, principio activo más placebo y placebo a tales condiciones, durante un tiempo prudente. Se podrá realizar una prueba preliminar, determinado



bajo que condiciones se llevará acabo más rápidamente la degradación. Se permitirá que el principio activo se degrade hasta un 20%.

En caso de que se haya utilizado alguna solución ácida o básica, neutralizar las muestras y proceder a analizar cada una de ellas.

### **Criterio de Aceptación.**

Es el mismo como para estabilidad para control de calidad.

### **1. 6. 4. 9.Tolerancia.**

#### **Definición.**

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, diferentes temperaturas, lotes de reactivos, etc. (19,20)

#### **Determinación Experimental.**

Se evaluará la tolerancia del método estableciendo cuales son las condiciones que puedan afectar el resultado del análisis. Para esto se cambiarán las condiciones del método que a juicio del analista puedan ser criticas. Estas condiciones pueden ser: cambios en el pH; para métodos cromatográficos, ligeros cambios en la composición de la fase móvil, se probarán columnas con menor eficiencia, etc.

Cada análisis se efectuará por triplicado y siempre se analizará con muestras bajo las condiciones normales del método, también por triplicado y que servirá como control.

### Cálculos.

Para cada tratamiento se calculará el promedio ( $y_{pi}$ ) y la varianza ( $s_i^2$ ).

Se calculó la varianza ponderada ( $s_{pi}^2$ ) del tratamiento y del tratamiento control de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$s_{pi}^2 = \frac{(N_0 - 1)s_0^2 + (N_i - 1)s_i^2}{(N_0 - 1) + (N_i - 1)}$$

Donde  $N_i$  = número de repeticiones del tratamiento i

$N_0$  = número de repeticiones del tratamiento control

$s_0^2$  = varianza del tratamiento i

$s_i^2$  = varianza del tratamiento control

Se calculará el valor de t de acuerdo a la siguiente ecuación:

En tablas de distribución t de Student se localizó el valor para la t con ( $N_i + N_0 - 2$ ) grados de libertad y un nivel de significancia del 95%.

$$t = \frac{y_{p0} - y_{pi}}{s_{pi} \left( \frac{1}{N_i} + \frac{1}{N_0} \right)^{1/2}}$$

### Criterio de Aceptación.

Para un tratamiento dado, el cambio el método no afecta al resultado si el valor de la t calculada es menor que la t de tablas.

**ESTA COPIA NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

## **II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

El reumatismo se define, como el dolor, rigidez o deformidad de los músculos y elementos anatómicos vecinos. Las enfermedades reumáticas incluyen un grupo extenso de padecimientos músculo-esqueléticos caracterizados por alteraciones de las estructuras articulares (sinovial, cápsula, cartilago y hueso) o del tejido conjuntivo que rodea las articulaciones y de los tendones.

En estudios estadísticos presentados en Estados Unidos se demostró que más de 14 millones de personas sufren alguna forma de reumatismo, ocupando el segundo lugar como enfermedad crónica e invalidez, después de los padecimientos mentales y nerviosos. Más de la mitad tiene menos de 45 años. En otros países como Gran Bretaña la mitad de la población tiene síntomas reumáticos no incapacitantes, 7 por ciento está incapacitada por lo menos un día al año, y una sexta parte de las faltas en la industria se debe al reumatismo. Entre las enfermedades crónicas las reumáticas son las que causan mayor invalidez y tienen menor cifra de mortalidad.

El etofenamato está indicado en todas las afecciones agudas y crónicas del sistema osteomuscular, tanto de origen reumático como traumático. Es un derivado del ácido flufenámico, con acción antiinflamatoria y analgésica por vía transcutánea.

El procedimiento actual para la evaluación del principio activo Etofenamato, en la forma farmacéutica gel, es una técnica espectrofotométrica que no cumple con todos los parámetros de validación del método analítico principalmente reproducibilidad y exactitud.

Debido a que los productos farmacéuticos deben cumplir con un alto grado de calidad se desarrolló un método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución, basándose en la polaridad de los grupos funcionales presentes en la estructura química del fármaco en su separación. Esta técnica es muy poderosa y versátil debido a que se pueden analizar una amplia variedad de compuestos y muestras. Su versatilidad es debido a que se pueden modificar

variables como: precisión en la respuesta del pico, reproducibilidad en el dato obtenido, exactitud en el resultado, sensibilidad de la detección y selectividad en la separación. Un buen control de las variables antes mencionadas darán como resultado la obtención de información consistente y confiable. Determina en forma confiable, rápida y específica al activo, así como sus impurezas, productos de degradación, etc., presentes en diferentes productos farmacéuticos. Las ventajas que ofrece la cromatografía de líquidos de alta resolución son:

Permite separar y purificar a cada uno de los componentes químicos de una mezcla.

Tiempos de análisis cortos.

Manejo de concentraciones pequeñas de muestra.

Estudios de principios activos susceptibles a cambio. Permite controlar adecuadamente la Calidad en Producción.

Determina la estabilidad de activos en diferentes presentaciones farmacéuticas.

Comparación de métodos por CLAR, en la determinación del más adecuado, etc.

Una parte integral en el desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, principalmente por que se debe probar que cumple con los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

Los parámetros a evaluar en la validación del método analítico son: Linealidad y precisión del sistema, linealidad y exactitud del método, precisión del método (repetibilidad y reproducibilidad), estabilidad de la muestra en diferentes condiciones, tolerancia del método, especificidad del método para control de calidad y estabilidad en condiciones de degradación acelerada. Para el análisis de rutina del producto farmacéutico en proceso y terminado.

### **III. OBJETIVOS.**

#### **3. 1. OBJETIVO GENERAL.**

Desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de etofenamato en gel, empleando Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

#### **3. 2. OBJETIVOS PARTICULARES.**

3. 2. 1. Desarrollar un método analítico para la cuantificación de Etofenamato por medio de la utilización de técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

3. 2. 2. Validar el método desarrollado para el uso de los análisis de rutina en Control de Calidad.

## IV. HIPÓTESIS.

Considerando que el grupo funcional éster y los enlaces conjugados en los anillos aromáticos presentes en el fármaco Etofenamato le confieren poca polaridad a la estructura, el mecanismo de adsorción en la columna será el adecuado por la presencia de cargas electrostáticas generadas, de tal forma que la separación por fase reversa permitirá la cuantificación del fármaco presente en la forma farmacéutica gel.

## **V. DESARROLLO EXPERIMENTAL.**

### **5. 1. INSTRUMENTOS Y EQUIPO.**

Balanza Analítica Metter AM100.

Espectrofotómetro Beckman DU 7500.

Cromatógrafo Beckman Sistem Gold. Detector UV/Vis con arreglo de Diodos modelo 168.

Automuestrador y/o inyector Beckman 502.

Columna Novapack C18 de 4 micrómetros y de 3.9 x 75 mm; de forma regular y distribución homogénea.

Sofwer Sistem Gold 681.

Procesador de datos (PC) IBM 386, con impresora EPSOFX850.

### **5. 2. MATERIAL.**

Matraces volumétricos de diversas capacidades.

Pipetas volumétricas de diversas capacidades.

Frascos viales con tapa.

Filtros Millex de 0.45 micras y filtro Membrana de 0.45 micras Millipore.

Equipo Clarificador Millipore.

Equipo purificador de agua grado HPLC Milli-Q con cartuchos EPA 41237-NH-1.

### **5. 3. REACTIVOS.**

Agua Milli-Q grado HPLC.

Acetonitrilo grado HPLC Mallinckrod Chromar.

Metanol grado HPLC Mallinckrod Chromar.

Etofenamato estándar de referencia Sanofi Pharma.

## 5. 4. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO.

El procedimiento para desarrollar en Método Analítico se muestra a continuación en el siguiente diagrama:

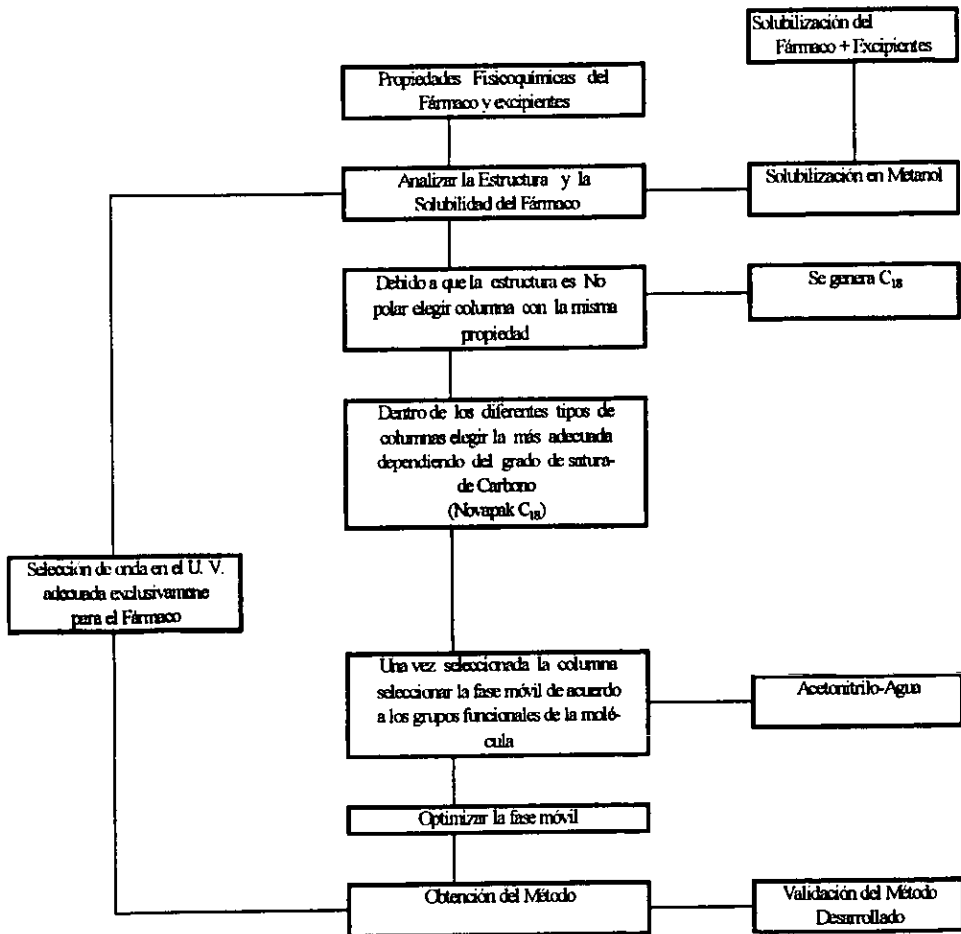


Figura 5. Procedimiento para el Desarrollo de un Método Analítico.



Como se muestra en el Figura 5. el procedimiento para desarrollar un Método Analítico es el siguiente:

Se inició con la revisión bibliográfica del fármaco, los excipientes y la forma farmacéutica. Sobre la base de esa información se desarrolló el método analítico. Con la información obtenida se descartó la posible interacción del fármaco con cada uno de los excipientes en la formulación.

Se determinó la solubilidad del fármaco más excipiente en el disolvente apropiado; se analizó la estructura química del fármaco para determinar los grupos funcionales que imparten a la molécula las características polares. Por presentar anillos aromáticos en la estructura el fármaco se considera de naturaleza hidrófoba motivo principal para elegir una columna no polar, y además de contener dentro de la misma un grupo funcional éster no polar. Se eligió la longitud de onda de trabajo adecuada, obtenida del coeficiente de extinción, para obtener la máxima absorbancia del fármaco. Dentro de las columnas para CLAR se eligió la columna dependiendo al grado de saturación de carbono para su mayor o menor retención del fármaco. La selección de la fase móvil se basó en la estructura del fármaco para disolverlo y poder cuantificarlo con respecto a un estándar de referencia certificado.

Se demostró la no-interferencia por parte del disolvente realizando una corrida del mismo, obteniéndose tiempos de retención diferentes. Otra corrida se realizó para el placebo, y no interfirió en la cuantificación del fármaco.

Se continuó con la optimización de las condiciones cromatográficas preliminares y la eficiencia de extracción. Posteriormente se realizó un análisis al 100% del producto obteniéndose un coeficiente de variación no mayor al 2%, para la realización de la validación del método analítico desarrollado.

## 5. 5. COMPOSICIÓN DEL GEL.

Cada 100 gramos contienen:

Etofenamato	5 g
Excipiente c. b. p.	100 g

## 5. 6. MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.

### Fase Móvil:

Preparar una mezcla de Acetonitrilo y agua grado HPLC en una proporción de 1: 1, mezclar y degasificar por filtración a través del equipo de clarificación de disolventes.

### Solución Estándar:

Transferir a un matraz aforado de 100 mL, 65 mg de Etofenamato estándar de referencia, agregar aproximadamente 65 mL de metanol grado reactivo y agitar hasta disolver, diluir y aforar con el mismo disolvente.

Transferir una alícuota de 2 mL a un matraz aforado de 50 mL diluir y aforar con una mezcla de metanol grado HPLC y agua HPLC en una proporción de 1:1, pasar la solución a través de un filtro Millex de 0.45 micras o equivalente (concentración final: 26 microgramos / mL).

### Solución Problema:

En un vaso de precipitado de 50 mL pesar la cantidad de producto equivalente a 32.5 mg de Etofenamato, agregar 35 mL de metanol grado reactivo y agitar hasta homogeneizar.

Transferir cuantitativamente a un matraz aforado de 100 mL. Enjuagar el vaso con 3 porciones de 15 mL de metanol, recibiendo los lavados en el matraz aforado. Diluir y aforar con el mismo

disolvente. Dejar reposar por 5 min. Filtrar a través de papel Whatman No. 44 o equivalente, desechando los primeros 10 mL del filtrado. Transferir 4 mL a un matraz aforado de 50 mL, diluir y aforar con una mezcla de metanol grado HPLC y agua grado HPLC en una proporción de 1:1. Pasar la solución a través de un filtro Millex de 0.45 micras o equivalente (concentración final: 26 microgramos / mL).

### **Sistema Cromatográfico.**

Columna : Novapack C<sub>18</sub>, 3.9 diámetro x 75 mm de longitud.

Detector : 350 nm.

Flujo : 1.3 mL / min.

Volumen de Inyección: 20 microlitros.

Fase Móvil: Acetonitrilo - Agua (1:1).

Tiempo de Corrida: 5 min.

Tiempo de Retención del fármaco: 3.0 min.

### **Procedimiento :**

Inyectar 6 veces la solución estándar y calcular el coeficiente de variación para la respuesta del pico correspondiente a Etofenamato. Si el coeficiente de variación es menor a 1.5 %, inyectar la solución problema, en caso contrario dejar estabilizar el sistema y repetir las inyecciones del estándar hasta que el coeficiente de variación sea menor del 1.5 %.

## **5. 7. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.**

### **5. 7. 1. Linealidad del Sistema.**

Se preparó a partir de una solución stock de estándar, muestras con concentración del 48.5, 72.6, 100, 121.5 y 144.9% de la cantidad requerida por el método analítico por triplicado y se analizaron.

### **5. 7. 2. Precisión del Sistema.**

Se determinó por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% indicado en el método analítico.

### **5. 7. 3. Linealidad del Método Analítico.**

A partir de una solución stock estándar de referencia, se prepararon por triplicado placebos cargados con porcentajes de principio activo correspondientes al 48.6, 69.6, 100, 122.8 y 146.3 % de la cantidad requerida por el método analítico y se analizó cada una de las muestras.

### **5. 7. 4. Exactitud del Método Analítico.**

Para demostrar la exactitud del método analítico, se prepararon seis muestras de placebo cargado al 100% a partir de una solución stock de estándar de referencia y se analizaron.

### **5. 7. 5. Precisión del Método Analítico.**

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a una muestra homogénea del producto. Para la evaluación de este parámetro se determinó la repetibilidad y la reproducibilidad del método.

#### **5. 7. 5. 1. Repetibilidad del Método.**

Tiene como objetivo demostrar que existe una concordancia entre mediciones repetidas e independientes de una misma propiedad bajo las mismas condiciones (mismo equipo, analista, día del análisis, etc.). Para la cuantificación de este parámetro se utilizaron los resultados obtenidos en la evaluación de exactitud del Método.

#### **5. 7. 5. 2. Reproducibilidad del Método.**

Su objetivo es demostrar que los resultados obtenidos al utilizar el método analítico son independientes del laboratorio, analista, día de análisis o equipo utilizado en la determinación. Se tomó la diferencia que podría existir entre 2 analistas y 2 días diferentes para la determinación.

Se eligieron al azar 2 personas para realizar la prueba.

Al primer analista se le encargó el homogeneizar la muestra, determinando previamente el peso promedio si es necesario. Esta muestra se uso por ambos analistas durante dos días de análisis, con un manipuleo cuidadoso

Cada analista realizó el análisis de la muestra del producto terminado, por triplicado.

#### **5. 7. 6. Estabilidad de la muestra a Analizar.**

Al evaluar este parámetro de determina cuanto tiempo puede transcurrir desde que la muestra está lista para cuantificarse hasta el momento de la determinación, almacenándola bajo diferentes condiclones. Se tomaron 3 muestras de las utilizadas para determinar exactitud del método, cada una de ellas se dividió en 3 partes iguales, almacenándolas bajo diversas condiciones: obscuridad, luz y refrigeración; y se analizaron a diferentes intervalos de tiempo: inicio, 24 y 48 hrs

#### **5. 7. 7. Tolerancia.**

En la evaluación de la tolerancia de la tolerancia del método se establecen cuales condiciones pueden afectar el resultado del análisis. Para esto, se cambian las condiciones del método que a juicio del analista pueden ser críticas. Estas condiciones pueden ser: cambios en el pH; para métodos cromatográficos, ligeros cambios en la composición de la fase móvil, probar columnas

con menor eficiencia, etc. Cada análisis se efectuó por triplicado y se analizó en paralelo una muestra bajo condiciones normales del método, también por triplicado ya que servirá de control.

#### **5. 7. 8. Especificidad para Control de Calidad.**

Para probar la especificidad para Control de Calidad, se analizó una muestra de placebo y una de placebo cargado. Se verificó que los excipientes no presentaran ningún pico con tiempo de retención similar al activo.

#### **5. 7. 9. Especificidad para la estabilidad.**

Para probar la especificidad del método analítico para estabilidad, se almacenaron muestras de principio activo, placebo y placebo cargado en condiciones drásticas para favorecer la degradación del activo y excipientes. Después de 2 días las muestras se sometieron al análisis de acuerdo al método analítico.

## VI. RESULTADOS.

### 6. 1. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

$$n = 15$$

$$\sum x = 391.8501$$

$$\sum y = 117.9342$$

$$\sum x^2 = 11496.4283$$

$$\sum y^2 = 1041.8855$$

$$\sum xy = 3460.8448$$

#### Pendiente

$$m = \frac{15(3460.8448) - (391.8501)(117.9342)}{15(11496.4283) - (391.8501)^2} = 0.3016$$

#### Ordenada al origen

$$b = \frac{117.9342 - (0.3016)(391.8501)}{15} = -0.0164$$

#### Coefficiente de Determinación

$$r^2 = \frac{(15(3460.8448) - (391.8501)(117.9342))^2}{(15(11496.4283) - (391.8501)^2)(15(1041.8855) - (117.9342)^2)} = 0.9996$$

$$r^2 = 0.9996 \Rightarrow r = 0.9998$$

#### Criterio de Aceptación

El coeficiente de Determinación ( $r^2$ )  $> \alpha = 0.98$

El coeficiente de Correlación ( $r$ )  $> \alpha = 0.99$

Concentración (mcg/ml) X	Area Y	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	XY	Curva Corregida
0.0000		0.0000		0.0000	-0.0164
12.9929	3.9613	168.8155	15.6915	51.4681	3.9022
12.9929	3.9128	168.8155	15.3096	50.838	3.9022
12.9929	3.9192	168.8155	15.3597	50.9211	3.9022
19.4644	5.8334	378.8629	34.0282	113.543	5.854
19.4644	5.8402	378.8629	34.1075	113.6752	5.854
19.4644	5.8614	378.8629	34.3554	114.0877	5.854
26.7734	7.998	716.8149	63.9675	214.1328	8.0583
26.7734	7.9836	716.8149	63.7375	213.7476	8.0583
26.7734	8.1289	716.8149	66.0785	217.6375	8.0583
32.557	9.7548	1059.9582	95.1567	317.588	9.8026
32.557	9.7524	1059.9582	95.1083	317.5073	9.8026
32.557	9.7516	1059.9582	95.0945	317.4841	9.8026
38.829	11.6969	1507.6912	136.8168	454.1778	11.6943
38.829	11.7121	1507.6912	137.174	454.7703	11.6943
38.829	11.8279	1507.6912	139.8997	459.2663	11.6943
Σ =	391.8501	117.9342	11496.4283	1041.8855	3460.8448

Figura 6. Tabla de Linealidad del Sistema.

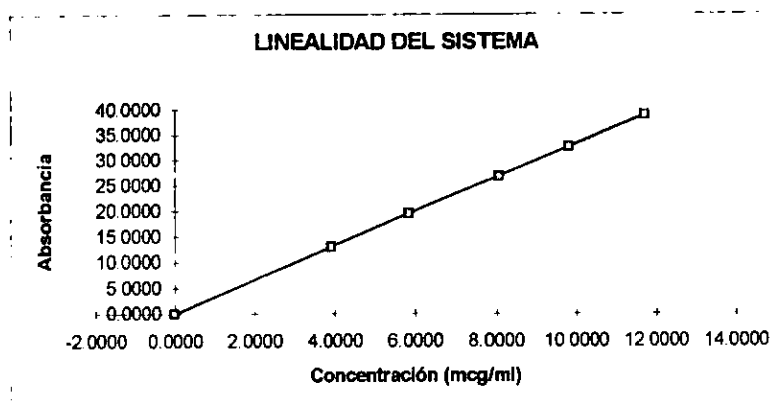


Figura 7. Gráfica de Linealidad del Sistema



RESULTADOS	
M =	0.3018
B =	-0.0164
r <sup>2</sup> =	0.9998

## 6. 2. PRECISIÓN DEL SISTEMA.

Desviación Estándar.

Número de Determinaciones	Respuesta (Y)
1	8.023
2	8.0043
3	7.9942
4	7.998
5	7.9836
6	8.1289

Figura 8. Tabla de Precisión de sistema.

$$N = 6$$

$$\sum y = 48.1320$$

$$\sum y^2 = 386.1295$$

$$Yp = 8.0220$$

$$DE = \left\| \frac{6(386.1295) - (48.1320)^2}{6(6-1)} \right\|^{1/2} = 0.054$$

### Coefficiente de Variación

$$CV = \frac{0.054}{8.022} \times 100 = 0.6727$$

RESULTADOS	
Yp =	8.022
DE =	0.054
C.V. =	0.6727

### Criterio de Aceptación

El coeficiente de variación es menor o igual a 5% para métodos microbiológicos.

El coeficiente de variación es menor o igual a 1.5% para los demás métodos.

### 6. 3. LINEALIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO.

$$n = 15$$

$$\sum x = 38.7090$$

$$\sum y = 38.7367$$

$$\sum x^2 = 112.9287$$

$$\sum y^2 = 113.1808$$

$$\sum xy = 113.0427$$

### Pendiente

$$m = \frac{15(113.0427) - (38.709)(38.7367)}{15(112.9287) - (38.7090)^2} = 1.003255$$

### Ordenada al Origen

$$b = \frac{38.7367 - (1.003255)(38.7090)}{15} = -0.006555$$

### Coefficiente de Determinación.

$$r^2 = \frac{(15(113.0427) - (38.709)(38.7367))^2}{(15(112.9287) - (38.709)^2)(15(113.1808) - (38.7367)^2)} = 0.998173$$

$$r^2 = 0.998173 \Rightarrow r = 0.999086$$

$$SCer = 1.003255(113.0427) + (-0.006555)(38.7367) - (38.7367)^2 / 15 = 13.1213$$

$$Scer = 113.1808 - 1.003255(113.0427) - (-0.006555)(38.7367) = 0.0240$$

$$Scep = (113.1808) - (339.4798 / 3) = 0.0209$$

$$Scfa = 0.024 - 0.0209 = 0.0031$$

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F calculada	F de tablas
Regresión	1	Scr 13.1213	Scr 13.1213	Fr = SCr/MCcr  7.101.1210	F (g.l.r; g.l.cr; 0.99) F (1; 13; 0.99)  9.07
Error de Regresión	n-2 13	SCcr 0.0240	SCcr / g.l.e.r. 0.0018		
Falta de Ajuste	(n-2) - t (r-1) 3	SCfa 0.0031	SCfa / g.l.f.a. 0.0010	Ffa = MCfa / Mcep  0.5016	F (g.l.fa; g.l.ep; 0.95) F (3; 10; 0.95)  3.71
Error puro	t (r-1) 10	Scep 0.0209	Scep / g.l.e.p. 0.0021		

Figura 9. Análisis de Varianza para la Linealidad del Método Analítico.

RESULTADOS	
SCr =	13.1213
SCer =	0.024
SCep =	0.0209
SCfa =	0.0031

RESULTADOS	
m =	1.0033
b =	-0.0066
r <sup>2</sup> =	0.9982

### **Criterio de Aceptación.**

En la tabla de distribución F se localizará el valor para F con los grados de libertad de la regresión en el numerador y los grados de libertad del error de regresión en el denominador y con un nivel de confianza del 99%;  $F (g. l. r / g. l. er; 0.99)$

En la tabla de distribución F se localizará el valor para F con los grados de libertad de la falta de ajuste en el numerador y los grados de libertad del error puro en el denominador y con un nivel de confianza del 95%;  $F (g. l. fa / g. l. e.; 0.95)$

Comparar los valores que Fr y Ffa con los valores de F tablas, Si:

Fr es mayor o igual que  $F (g. l. r / g. l. er; 0.99)$  y Ffa es menor o igual que  $F (g. l. fa / g. l. e.; 0.95)$  el modelo lineal es correcto para describir la relación entre mg adicionados y mg recuperados

$$McErr Reg = \frac{113.1808 - (1.03255)(113.0427) - (-0.006555)(38.7367)}{15 - 2} = 0.00185$$

$$MCreg = -0.006555 + (1.03255)(113.0427) - (387367)^2 / 15 = 13.1213$$

$$S_m = 0.00185 \left\| \frac{(2.5806)^2}{15(112.9287) - (38.709)^2} + \frac{1}{15} \right\|^{1/2}$$

$$S_m = 0.01365$$

$$S_b = 13.1213 \left\| \frac{1}{15(112.9287) - (38.709)^2} \right\|^{1/2}$$

$$S_b = 0.2590$$

$$t_m = \frac{1 - 1.03255}{0.01365} = -0.2385$$

$$t_b = \frac{0 - (-0.006555)}{0.2590} = 0.0253$$

En las tablas de distribución t de Student, se determinara el valor para la t con n - 1 grados de libertad y un nivel de significancia de 0.95 (  $t_{(n-1; 0.95)}$  );  $t_{(14; 0.95)} \approx 2.145$

### **Criterio de Aceptación.**

Se compara el valor de t de tablas contra los valores calculados de  $t_m$  y  $t_b$ :

Si el valor de absoluto de  $t_m$  es menor que  $t_{(14; 0.95)}$ , estadísticamente la pendiente es igual a 1 y

Si el valor absoluto de  $t_b$  es menor que  $t_{(14; 0.95)}$ , estadísticamente la ordenada al origen es igual a cero.

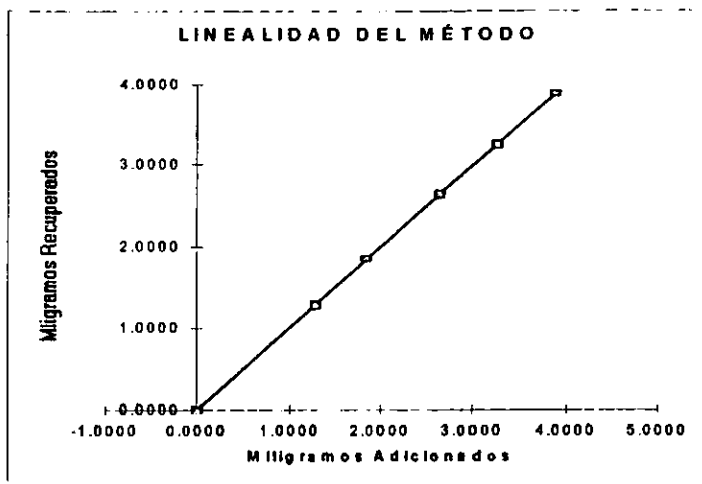


Figura 10. Gráfica de Linealidad del Método Analítico.

Concentración (mcg/ml) X	Area Y	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	XY	Y <sup>2</sup>	Curva Corregida
0.0000		0.0000		0.0000		-0.0066
1.286	1.268	1.6538	1.6078	1.6306		1.2836
1.286	1.2805	1.6538	1.6397	1.6467		1.2836
1.286	1.2883	1.6538	1.6597	1.6568	14.721	1.2836
1.844	1.8411	3.4003	3.3898	3.395		1.8434
1.844	1.8466	3.4003	3.4099	3.4051		1.8434
1.844	1.8357	3.4003	3.3698	3.385	30.5079	1.8434
2.648	2.7049	7.0119	7.3165	7.1626		2.6501
2.648	2.6619	7.0119	7.0857	7.0487		2.6501
2.648	2.656	7.0119	7.0543	7.0331	64.3653	2.6501
3.251	3.2419	10.569	10.5099	10.5394		3.255
3.251	3.2271	10.569	10.4142	10.4913		3.255
3.251	3.2344	10.569	10.4613	10.515	94.156	3.255
3.874	3.9015	15.0079	15.2217	15.1144		3.8801
3.874	3.778	15.0079	14.2733	14.636		3.8801
3.874	3.9708	15.0079	15.7673	15.3829	135.7295	3.8801

S = 38.709	38.7367	112.9287	113.1808	113.0427	339.4798
------------	---------	----------	----------	----------	----------

Figura 11. Tabla de Linealidad del Método Analítico.

#### 6. 4. EXACTITUD DEL MÉTODO ANALÍTICO.

Observación (n)	% recuperado (y)
1	101.09064
2	98.48254
3	100.78115
4	99.65000
5	100.84656
6	101.12220
7	100.00000
8	102.85500
9	100.60180
10	99.77545

Figura 12. Tabla de Exactitud del Método Analítico.

$$\bar{y}_p = \frac{1005.2053}{10} = 100.5205$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum (y - 100.5205)^2}{10 - 1}} = 1.1573$$

$$CV = \frac{1.1573}{100.5205} = 0.0115$$

$$t_c = \frac{(100.5205 - 100)(10)^{1/2}}{1.1573} = 1.4223$$

$$IC' = 100.60332 \pm 2.262 * 1.1573 / \sqrt{10}$$

$$IC = 100.60332 \pm 2.6279$$

### **Criterio de Aceptación.**

Se compara el valor de t calculada con el valor de t (9, 0.95) y se establece la regla de decisión siguiente:

Sí el valor absoluto de la t calculada es menor que el valor de t (9, 0.95) el método es exacto.

## **6. 5. PRECISIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.**

### **6. 5. 1. Repetibilidad del Método.**

$$S = 1.1573$$

$$Yp = 100.5205$$

$$CV = \frac{(1.1573)(100)}{100.5205} = 1.1573$$

### **Criterio de Aceptación.**

El Método es repetible sí el coeficiente de variación es menor o igual a 2.

### **6. 5. 2. Reproducibilidad del Método.**

Se calculó de la suma de las combinaciones analista día ( $Y_{ij}$ .)



$$Y_{11} = 307.78$$

$$Y_{12} = 308.90$$

$$Y_{21} = 303.78$$

$$Y_{22} = 305.83$$

Se calculó de la suma para cada analista ( $Y_{i.}$ )

$$Y_{1.} = 616.68$$

$$Y_{2.} = 609.61$$

Se calculó la suma total ( $Y_{...}$ )

$$Y_{...} = 1226.29$$

Se calculó la suma del cuadrado de cada analista en cada día.

$$\sum \sum Y_{it}^2 = 375962$$

Se calculó la suma del cuadrado de cada analista en los dos días.

$$\sum Y_{i.}^2 = 751918.6$$

Se calculó la suma de cada dato elevado al cuadrado.

$$\sum \sum Y_{it}^2 = 125330$$

Se calculó la suma de los cuadrados del analista ( $SCa$ ), efecto del factor analista.

$$SCa = \frac{751918.6}{2(3)} - \frac{(1226.29)^2}{2(2)(3)} = 4.167$$

Se calculó la suma de cuadrados del día anidado en el analista, ( SCd ):

$$SCd = \frac{375962}{3} - \frac{751918.6}{2(3)} = 0.9$$

Se calculó la suma de cuadrados del error, ( SCe ):

$$SCe = 125330 - \frac{375962}{3} = 9.3333$$

Con los datos obtenidos se construyó la tabla de análisis de varianza.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE	FCALCULADA	FTABLAS
Analista	a-1 1	Sca = 4.1654	Sca = 4.1654	Fa = Sca /MCd = 9.16	F (g.L.a; g.L.d; 0.95) = F ( 1; 2; 0.95 ) = 38.51
día	(d-1) a 2	SCd = 0.9095	SCd/g. L. d = 0.4547		
error	(r-1) ad 8	SCe = 9.3724	SCe/g.L.e = 1.1715	Fd = MCd/Mce = 0.39	F(g.L.d.;g.L.e; 0.95) = F ( 2; 8; 0.95 ) = 6.06

Figura 13. Tabla de Análisis de Varianza para la Reproducibilidad del Método Analítico.

### Criterio de Aceptación.

Comparar el valor de Fa y Fd con los valores de F ( 1; 2; 0.95 ) y F ( 2; 8; 0.95 ) respectivamente.

Si el valor de Fa es menor que F ( 1; 2; 0.95 ) el método analítico es reproducible por los analistas

Si el valor de Fd es menor que F ( 2; 8; 0.95 ) el método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

## 6.6. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

Para cada muestra y condición (tratamiento) se calculó el promedio ( $Y_{pi}$ ) y la varianza ( $S_i^2$ ).

Se calculó la varianza ponderada ( $S_{pi}^2$ ) del tratamiento y la condición inicial:

$$S_{pi}^2 = \frac{S_o^2}{C} + \frac{S_i^2}{C + 1} \quad \text{donde } C = \text{número de condiciones a comparar (2)}$$

Para cada uno de los tratamientos se calculó el intervalo de confianza:

$$IC = (Y_i - Y_o) + t_D * (2/3 * S_{pi}^2)^{1/2}$$

Donde  $t_D = t$  de Dunnet con  $c$  comparaciones y  $2(c-1)$  grados de libertad y una probabilidad Acumulada de 0.975. Este valor es 2.86.

CONDICIÓN TIEMPO (horas)	LÚZ			OBSCURIDAD			REFRIGERACIÓN		
	0	24	48	0	24	48	0	24	48
Y1	101.09	98.76	98.54	99.65	99.51	97.1	100	98.67	96.76
Y2	98.48	98.18	97.5	100.85	99.8	96.63	102.86	99.02	97.67
Y3	100.78	99.79	96.57	101.12	99.23	97.59	100.6	99.08	97.33
Promedio ( $Y_{pi}$ )	100.118	98.912	97.537	100.539	99.513	97.103	101.152	98.926	97.254
Varianza ( $S_i^2$ )	1.354	0.442	0.648	0.408	0.525	0.154	1.51	0.033	0.142
Varianza ponderada ( $S_{pi}^2$ )	-	0.599	0.667	-	0.153	0.187	-	0.514	0.551
$t^* (2/3 * S_{pi}^2)^{1/2}$	-	1.807	1.907	-	0.91	1.01	-	1.675	1.733
$(Y_i - Y_0)$	-1.206	-2.581	-	-1.03	-3.44	-	-2.23	-3.9	-
$(Y_i - Y_0) + t_D^*$ $(2/3 * S_{pi}^2)^{1/2}$	-	0.6	-0.674	-	-0.11	-2.43	-	-0.55	-2.17
$(Y_i - Y_0) - t_D^*$ $(2/3 * S_{pi}^2)^{1/2}$	-	-3.013	-4.489	-	-1.94	-4.45	-	-9.03	-5.63
Conclusión	-	Estable	Inestable	-	Inestable	Inestable	-	Inestable	Inestable

Figura 14. Tabla de Estabilidad de la Muestra a Analizar.

**Criterio de Aceptación.**

Para un tratamiento dado, la muestra es estable si en el intervalo de confianza está incluido el valor de cero.

**6. 7. ESPECIFICIDAD PARA CONTROL DE CALIDAD.**

Para probar la especificidad para Control de calidad, se analizó una muestra de placebo y una de placebo cargado.

Se verificó que los excipientes no presentaran ningún pico con un tiempo de retención similar a la de los componentes del extracto de centella asiática, se anexan cromatogramas.

**6. 8. ESPECIFICIDAD PARA LA ESTABILIDAD.**

Columna : Novapak C<sub>18</sub>, 3.9 diametro x 75 mm de longitud.  
 Detector : 350 nm.  
 Flujo : 1.3 ml. / min.  
 Volumen de Inyección: 20 microlitros.  
 Fase Móvil: Acetonitrilo - Agua (1:1).  
 Tiempo de Corrida: 5 min.  
 Tiempo de Retención del fármaco: 3.0 min.

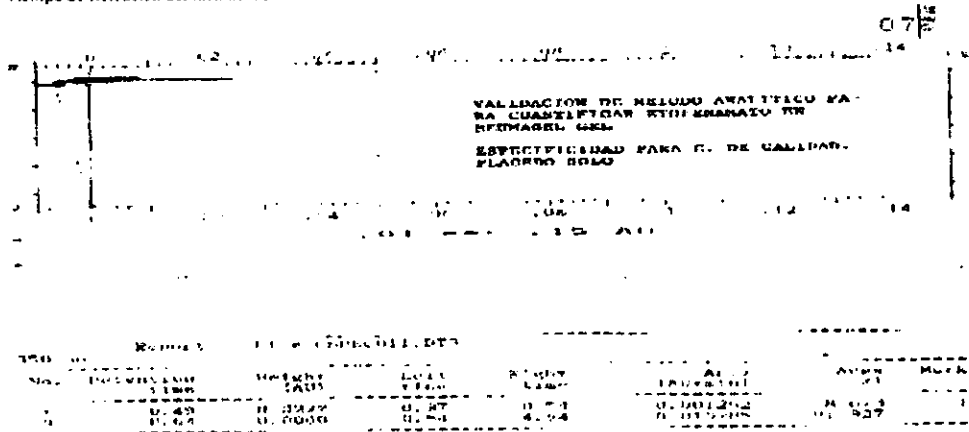
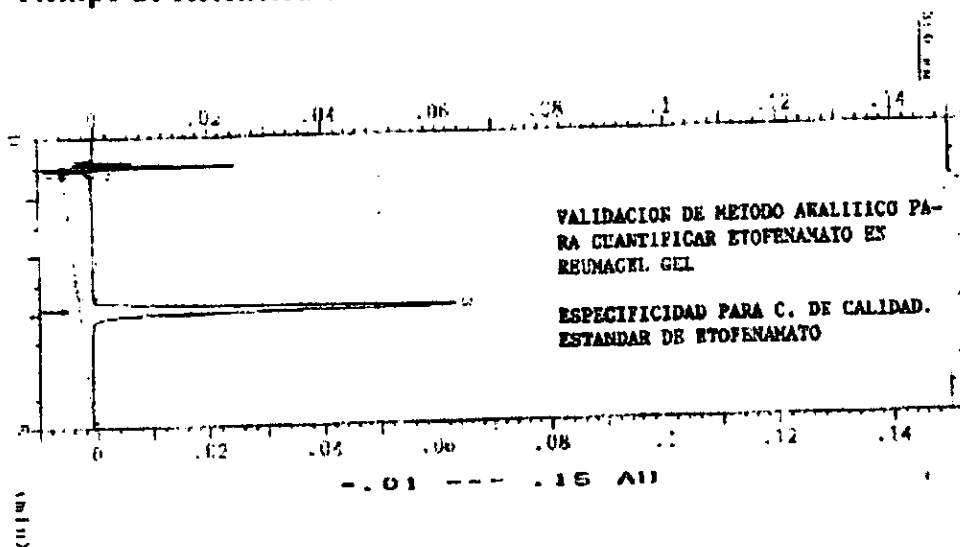


Figura 15. Especificidad para Control de Calidad Placebo solo.

**Columna : Novapack C<sub>18</sub>, 3.9 diámetro x 75 mm de longitud.**  
**Detector : 350 nm.**  
**Flujo : 1.3 mL / min.**  
**Volumen de Inyección: 20 microlitros.**  
**Fase Móvil: Acetonitrilo - Agua (1:1).**  
**Tiempo de Corrida: 5 min.**  
**Tiempo de Retención del fármaco: 3.0 min.**



064

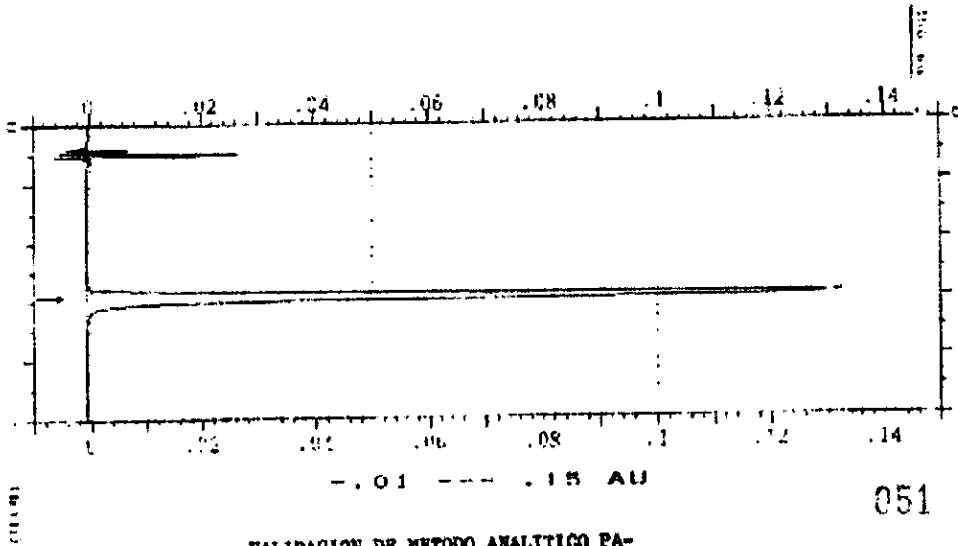
Report File: ESPST083.D03

350 nm

No.	Retention time	Height (AU)	Left time	Right time	Area (AU*min)	Area (%)	Mark
1	0.50	0.0227	0.36	0.54	0.001096	5.572	L
2	0.63	0.0049	0.54	2.72	0.008009	40.713	
3	2.93	0.0957	2.72	4.90	0.010567	55.716	V

Figura 16. Especificidad para Control de Calidad del Estándar de Etofenamato.

**Columna : Novapack C<sub>18</sub>, 3.9 diámetro x 75 mm de longitud.**  
**Detector : 350 nm.**  
**Flujo : 1.3 mL / min.**  
**Volumen de Inyección: 20 microlitros.**  
**Fase Móvil: Acetonitrilo - Agua (1:1).**  
**Tiempo de Corrida: 5 min.**  
**Tiempo de Retención del fármaco: 3.0 min.**



VALIDACION DE METODO ANALITICO PA-  
 RA CUANTIFICAR ETOFENAMATO EN  
 REUMAGEL GEL

ESPECIFICIDAD PARA C. DE CALIDAD  
 PLACEBO CARGADO.

Report File ESPM1251.DT3

350 nm

No.	Retention time	Height (AU)	Left time	Right time	Area (AU*min)	Area %	Mark
1	2.93	0.1296	2.71	3.51	0.015917	100.000	1

Figura 17. Especificidad para Control de Calidad Placebo Cargado.

Columna : Novapack C<sub>18</sub>, 3.9 diámetro x 75 mm de longitud.

Detector : 350 nm.

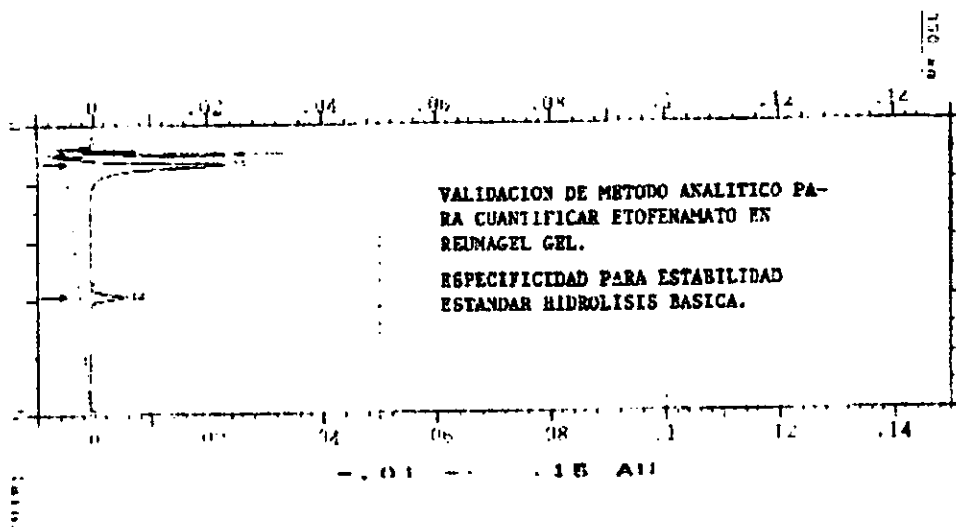
Flujo : 1.3 mL / min.

Volumen de Inyección: 20 microlitros.

Fase Móvil: Acetonitrilo - Agua (1:1).

Tiempo de Corrida: 5 min.

Tiempo de Retención del fármaco: 3.0 min.



No.	Retention time	Height (AU)	Width	Right time	Area (AU min)	Area (%)	Block
1	0.40	0.0288	2.38	0.53	0.007650	0.028	I
2	0.67	0.0251	3.54	2.71	0.010285	0.039	I
3	2.93	0.0078	2.71	4.92	0.003237	0.013	V

Figura 18. Especificidad Para la Estabilidad Estándar Hidrólisis Básica.

Columna : Novapack C<sub>18</sub>, 3.9 diámetro x 75 mm de longitud.

Detector : 350 nm.

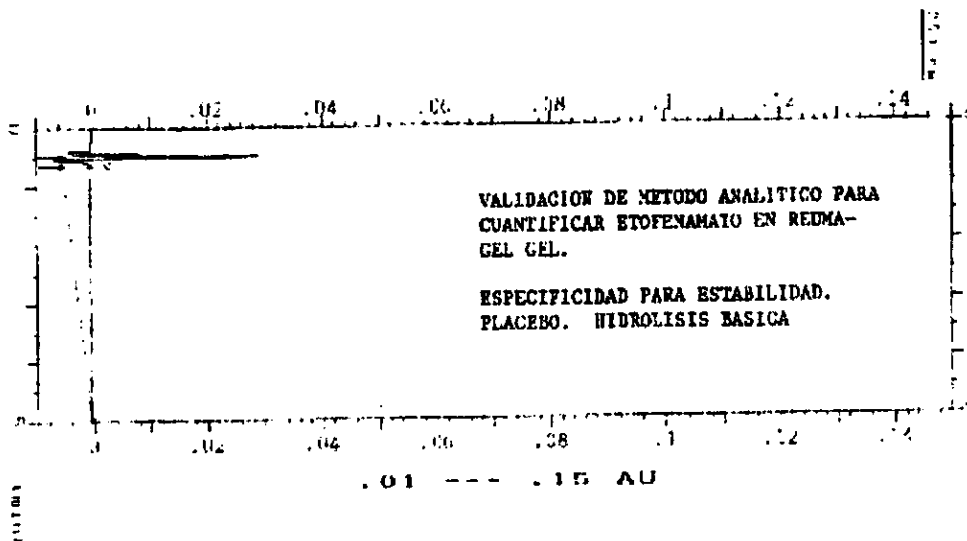
Flujo : 1.3 mL / min.

Volumen de Inyección: 20 microlitros.

Fase Móvil: Acetonitrilo - Agua (1:1).

Tiempo de Corrida: 5 min.

Tiempo de Retención del fármaco: 3.0 min.



Report File: ESPECIFICIDAD							
350 nm							
No.	Retention Time	Height (AU)	Ret. Time	Height	Area (AU*min)	Area (%)	Mark
1	0.43	0.0258	0.38	0.53	0.001441	11.713	I
2	0.65	0.0051	0.55	4.94	0.012863	88.287	I

Figura 19. Especificidad para la Estabilidad Placebo. Hidrólisis Básica.



Columna : Novapack C<sub>18</sub>, 3.9 diámetro x 75 mm de longitud.

Detector : 350 nm.

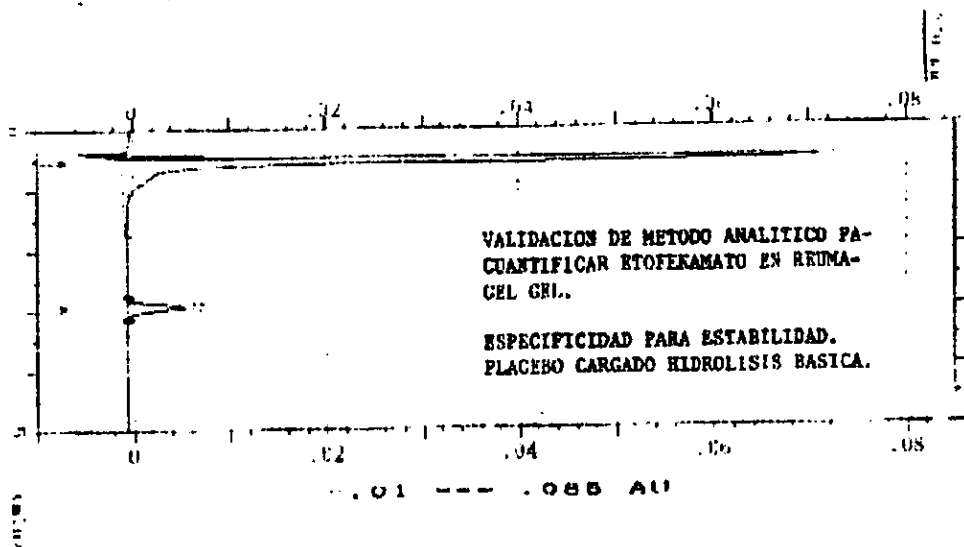
Flujo : 1.3 mL / min.

Volumen de Inyección: 20 microlitros.

Fase Móvil: Acetonitrilo - Agua (1:1).

Tiempo de Corrida: 5 min.

Tiempo de Retención del fármaco: 3.0 min.



Report File: ESM1201.D13

350 nm

No.	Retention time	Height (AU)	Left time	Right time	Area (AU)	Area (%)	Mark
1	3.52	0.0719	3.37	3.76	0.00779	91.447	
2	2.93	0.0050	2.76	3.16	0.00729	8.553	1

Figura 20. Especificidad para la Estabilidad Placebo Cargado Hidrólisis Básica.

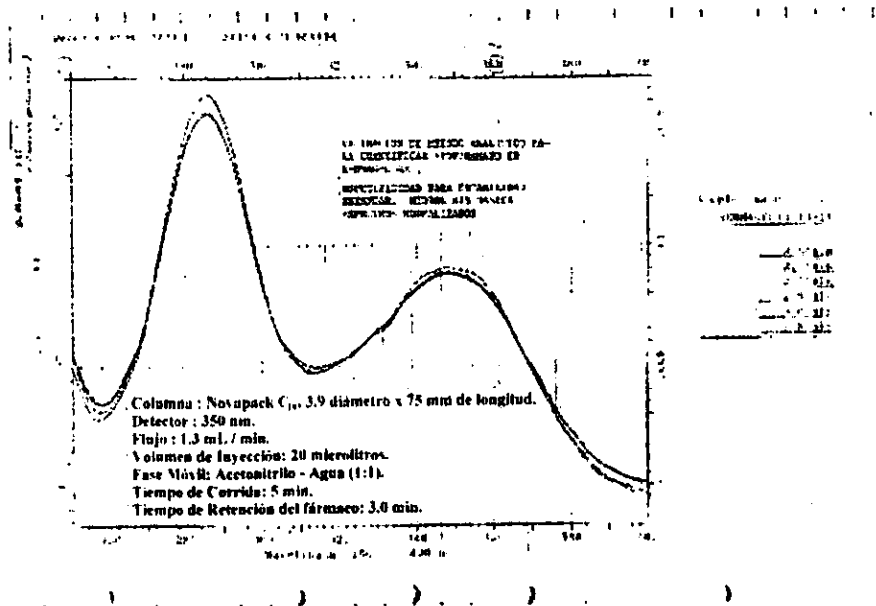


Figura 21 Especificidad para la Estabilidad Estándar. Hidrólisis Básica Espectros Normalizados.

### 6. 9. TOLERANCIA DEL MÉTODO ANALÍTICO.

Condición	Tratamiento Control	Fase Móvil	Fase Móvil
		55 : 45 ACN : H2O	48 : 52 ACN : H2O
Y <sub>1</sub>	100.72	100.12	100.16
Y <sub>2</sub>	100.76	99.85	100.24
Y <sub>3</sub>	100.88	100.12	100.31
promedio (Y <sub>p</sub> )	100.79	100.03	100.24
varianza (S <sub>p</sub> <sup>2</sup> )	0.0048	0.0162	0.0039
Y <sub>1</sub> - Y <sub>0</sub>	---	0.7578	0.5511
var. poderada (S <sub>p</sub> <sup>2</sup> )	---	0.0105	0.0044
t calculada	---	88.24	154.5
t tablas	---	2.78	2.7

Figura 22. Tabla de Tolerancia del Método Analítico.

## **VII. ANALISIS DE RESULTADOS.**

### **Linealidad del Sistema.**

De acuerdo con los datos proporcionados por Servicios Técnicos en Sanofi de México la linealidad del sistema deberá tener un valor de coeficiente de correlación mayor de 0.98; el resultado obtenido para el coeficiente de correlación es de 0.9996, es mayor que 0.98 por lo tanto el sistema es lineal

### **Precisión del Sistema.**

De acuerdo con la información contenida en el manual de validación de métodos analíticos de Sanofi de México la precisión del sistema deberá tener un valor de coeficiente de variación menor a 1.5; el resultado obtenido para el coeficiente de variación es de 0.67, es menor de 1.5 por lo que el sistema es preciso.

### **Linealidad del Método Analítico.**

De acuerdo con los datos proporcionados por Servicios Técnicos en Sanofi de México en el análisis de varianza para la linealidad del método; se comparan los valores de  $F$  calculada contra  $F$  de tablas.  $F_r$  será mayor o igual que  $F(1; 13; 0.99)$  y  $F_a$  será menor o igual  $F(3; 10; 0.95)$ ; el modelo será lineal para describir la relación existente entre miligramos adicionados y miligramos recuperados.

En los resultados obtenidos para la linealidad del método el valor de  $F_r$  es de 7100.95, es mayor que 9.07 y  $F_a$  es de 0.5014, es menor que 3.71 por lo tanto el modelo lineal es correcto.

A los valores obtenidos de la pendiente y ordenada se analizaron de la siguiente forma:

De acuerdo con la información contenida en el manual de validación de métodos analíticos de Sanofi de México la linealidad del método; se comparan los valores de  $t$  de tablas contra los calculados de  $t_m$  (pendiente) y  $t_b$  (ordenada). El valor absoluto de  $t_m$  será menor que  $t(14; 0.95)$ , estadísticamente la pendiente es igual a 1, y el valor absoluto de  $t_b$  será menor que  $t(14; 0.95)$ , estadísticamente la ordenada al origen es igual a cero.

En los resultados obtenidos para la linealidad del método el valor  $t_m$  es de 0.125, es menor que 2.145 por lo tanto el método analítico, estadísticamente, tiene una pendiente igual a uno, y  $t_b$  es 0.0253 es menor que 2.145 por lo tanto el método analítico es lineal con una ordenada al origen igual a cero.

#### **Exactitud del Método Analítico.**

De acuerdo con los datos proporcionados por Servicios Técnicos en Sanofi de México en la exactitud del método deberá de tener el valor absoluto  $t$ , será menor que el valor de  $t(9; 0.95)$ .

El resultado obtenido para la exactitud del método el valor de  $t$  es de 1.606, es menor que 2.262 por lo tanto el método analítico es exacto.

#### **Precisión del Método Analítico.**

Para evaluar la precisión de un método analítico se determinó la repetibilidad y la reproducibilidad del método.

De acuerdo con la información contenida en el manual de validación de métodos analíticos de Sanofi de México la repetibilidad del método deberá tener un coeficiente de variación menor o igual a 2; el resultado obtenido del coeficiente de variación es de 1.12, es menor que 2 por lo tanto el método analítico es repetible.

De acuerdo con los datos proporcionados por Servicios Técnicos en Sanofi de México en el análisis de varianza para reproducibilidad del método se comparan el valor de  $F_a$  y  $F_d$  calculados con los valores de  $F(1; 2; 0.95)$  y  $F(2; 8; 0.95)$  de tablas. El valor de  $F_a$  será menor de  $F(1; 2; 0.95)$  el método analítico es reproducible por los analistas; el resultado obtenido es de 9.16, es menor que 38.51 por lo que el método analítico es reproducible por los analistas.

El valor de  $F_d$  será menor que  $F(2; 8; 0.95)$  el método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista; el resultado obtenido es de 0.39, es menor que 6.06 por lo que el método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

### **Estabilidad de la Muestra.**

Para evaluar la Estabilidad de la Muestra a analizar se determina cuanto tiempo puede transcurrir desde que la muestra está lista para cuantificarse hasta el momento de la determinación, almacenándola bajo diferentes condiciones.

Para la estabilidad de la muestra, la única condición a la cual resultó ser estable la muestra es a la luz/ 24 horas.

En la muestra de obscuridad/ 24 horas a pesar de que el promedio de recuperación es mayor que en el de obscuridad resultó ser inestable. Esto es debido a que en la muestra inicial de luz la varianza es mayor.

### **Tolerancia.**

En todas las condiciones probadas en Tolerancia del Método, la  $t$  calculada es mayor que la  $t$  de tablas, como es muestra en la figura 20; por lo que cualquier cambio en la fase móvil afecta el resultado

### **Especificidad para la Estabilidad.**

Para probar la Especificidad, se analizó una muestra de placebo y una de placebo cargado.

Se verificó que los excipientes no presentaran ningún pico con un tiempo de retención similar a la de los componentes del extracto de centella asiática, como se observa en la figuras 15, 16, 17

Para probar la especificidad del método analítico para estabilidad, se almacenaron muestras de principio activo, placebo y placebo cargado a condiciones drásticas para favorecer la degradación del activo y excipientes. Después de 2 días las muestras se sometieron análisis de acuerdo al método analítico:

Se verificó que la muestra de placebo no mostrara ningún pico en la región en la cual aparece el etofenamato. Se anexa el cromatograma obtenido.

En la muestra de placebo cargado y con la ayuda del detector de arreglo de diodos, se comprobó que el pico identificado como etofenamato era puro:

Se obtuvo el espectro de absorción en 6 puntos del pico correspondiente al etofenamato (3 puntos antes y 3 puntos después del máximo de retención); los espectros se normalizaron y se compararon entre sí. El criterio para considerar puro el pico es que los seis espectros de absorción normalizados sean similares, se puede aceptar ligera diferencia en los espectros obtenidos al inicio y al final del pico, ya que en estas regiones, al ser las regiones del pico con menor absorbancia, al normalizar los espectros se puede reflejar interferencia debida a fase móvil.

Se anexan los cromatogramas y los espectros normalizados.

Aunque se sometieron muestras a degradación en medio ácido, básico, oxidante y luz, la única condición en la cual se observó una degradación apreciable fue en medio básico, por lo que fueron estas muestras las que se utilizaron para realizar el análisis espectral.

## VIII. CONCLUSIONES.

8.1. Se desarrolló un método analítico para la cuantificación de etofenamato por cromatografía de líquidos de alta resolución, en base a la estructura del etofenamato (hidrófoba) se eligió una columna Novapack C18, 3.9 diámetro x 75 mm de longitud y de fase móvil ACN : Agua ambas grado HPLC.

8.2. Los resultados de la validación del método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución, determinaron que el sistema resultó ser lineal y preciso. El método es exacto, repetible, reproducible y específico para control de calidad y estable. Por lo tanto queda validado.

8.3. Para determinar la especificidad del método para estabilidad se utilizó el arreglo de diodos. Concluyéndose a partir de este, que el cromatograma corresponde al principio activo puro.

8.4. En las pruebas de estabilidad la muestra resultó ser estable a la luz por 24 horas.



## **IX. SUGERENCIAS.**

Se sugiere que se respeten estrictamente las condiciones marcadas en el método analítico debido a que en todas las condiciones probadas en la tolerancia del método, resultó ser no tolerante al realizar cambios en la composición de la fase móvil.

En la determinación especificidad del método para la estabilidad se obtuvo el cromatograma correspondiente al principio activo que es puro, sin embargo no se probó por ningún otro método la presencia de algún otro componente en el pico de interés por lo que se deberá probar.

La limitante del arreglo de diodos, es que si dos compuestos tienen un tiempo de retención similar se detectarán como un solo componente, por lo que se sugiere analizar la muestra en un equipo de CLAR que lo pueda detectar.

Se indicará en el método analítico que las muestras se deberán cuantificar antes de 24 horas independientemente de la condición bajo la cual se almacenen.

## X. REFERENCIAS.

1. The Merck Index. 10a. ed. Index Merck and Co. Inc. , New York, 1983; p 3824.
2. Moffat, A.C. (editor). "Clarke s Isolation and Identification of Drugs", The Pharmaceutical Press: London, 1986; p 607.
3. Martindale "The Extrapharmacopoeia", 29a. ed. Pharmaceutical Press. , London, U. K., 1989, p 252.
4. Goodman, A. "Las Bases Terapéuticas de la Farmacología", 8a. ed. Panamericana: México, 1983; p 646.
5. Helman, J. " Farmacotécnia Teoría y Práctica", Tomo VII. Continental. : México, 1984, p 2079- 2129.
6. FÁRMACOPEA NACIONAL DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS, Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 6a. De. Secretaria de Salud: México, 1994; p 101-112.
7. Banker, G. S.; Rhodes, C. T. "Modern Pharmaceutics", Marcel Dekker, Inc. : New York, 1990; p 298-323.
8. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J. "Introduction to Modern Liquid Chomatography", 2a. de. John Wiley and Sons, Inc. : New York, 1979; p 15-50.
9. Parrot, E. L. "Pharmaceutical Techology", Burgess Publishig Company. : U. S. A., 1970, p 320-322

10. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA EL AREA DE ACONDICIONAMIENTO, Productos Medix: México, 1999; p 1-20.
11. García, M. A.; Castillo, B “Cromatografía Líquida de Alta Resolución”, Limusa: México, 1984; p 27-70.
12. Connors, K. A. “A Textbook of Pharmaceutical Analysis”, 2a. de. Wiley Interscience publication New York, 1975; p 364-400.
13. Abbott, D.; R. S. A. “Introducción a la Cromatografía”. 3a. de. Alhambra : Madrid, 1973; p 4-25
14. James, M. M. “Chromatography Concepts and Contrasts”, John Wiley and Sons. : U.S.A., 1988, p 154-193.
- 15 Parris, N. A. “Instrumental Liquid Chromatography a Practical Manual on High Performace Liquid Chromatography Metods”, Elsevier Scientific : Amsterdan, 1976; p 127-141.
- 16 Lawrence, J. F. “Organic Trace Analysis by Liquid Chromatography”, Academic Press, Inc U S A , 1981, p 110-140
- 17 Maricela, R. C. “ Comparación Estadística de la Validación de 2 Métodos Analíticos para Cuantificar Nitrofurazona en Ovulos “, UNAM F.E.S.Z., México D. F. 1993, p 1-40.
18. D, R. F. “Innovación y Desarrollo Farmacéutico”, Asociación Farmacéutica Mexicana: México, 1990; p 239-297.
- 19 MÉTODOS ANALÍTICOS VALIDACIÓN, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C.: México, 1991; p 1-46.

20. MANUAL DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS, Sanofi de México: México, 1988; p 1-17.
21. Pryde, A.; Gilbert M.T. "Applications of High Performance Liquid Chromatography", Chapman and Hall: London, 1989; p 41-53.
22. Engelhardt, H. (Editor). "Practice of High Performace Liquid Cromatography", Springer-Verlag: Berlin, 1986; p 4-64.
23. Runser, D. J. "Maitaining and Troobleshooting HPLC Systems", John Wiley and Sons: U S A , 1980; p 69-90.
24. Lachman, L.; Lieberman, H. A. "The theory and Practice of industrial Pharmacy". 2a. de. Lea and Febiger: Philadelphia, 1976; p 215-243.
25. Knox, J. H.; Loheac, J. "Applications of Hig Speed Liquid Chromatography", John Wiley and Sons · U.S.A., 1974; p 3-37.
26. Perry, S. G, et. Al. , "Practical Liquid Cromatography", A Plenum Rosetta: U.S.A., 1973, p 1-5.
27. Engelhard, H. "High Performace Liquid Chromatography", Springer Verlag: U.S.A., 1979, p 120-128
28. Scott, R. P. "Liquid Chromatography Column Theory", John Wiley and Sons. · U.S.A., 1992, p 1-13.
29. Lin, K. Ch, et. Al. "Determination of two Fenamates in plasma by High Performace Liquid Chromatography", J. Pharm. Sci. , 69, 5, (1980), p 95-97.