

47



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
" Z A R A G O Z A "

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO
ANALITICO INDICATIVO DE ESTABILIDAD POR
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA
RESOLUCION PARA LA CUANTIFICACION DE
VERALIPRIDA EN CAPSULAS.

2972952

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
MARTHA MONROY CANO

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



LO HUMANO ES
DE NUESTRA REFLEXION

ASESOR: Q.F.B. TERESITA COSTALES G.

MEXICO, D.F.

2001

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A dios:

Por ser mi luz y mi guía, por poner en mi camino a tantas personas buenas dándome así la oportunidad de realizar uno de mis grandes sueños y compartirlo con todos ellos.

A mis padres:

Por darme la vida y brindarme a lo largo de ella lo mejor de sí mismos, apoyándome siempre para alcanzar mis metas. Gracias por su confianza y cariño.

A mis hermanas:

Por ser mis mejores amigas, mi apoyo y fortaleza en los momentos más difíciles de mi vida. Gracias por su ejemplo y ayuda incondicional.

A mis hermanos:

Por su paciencia y comprensión.

A mis amigos:

Porque juntos pasamos días duros pero también felices que nos dieron la oportunidad de saber cuanto nos importamos unos a otros.

A mis cuñados:

Porque sin tener ninguna obligación me brindaron siempre su ayuda.

A Antonio:

Quien ha compartido mis sueños e ilusiones y me ha dado siempre su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ Con orgullo y respeto a la UNAM y a la FES Zaragoza.

- ❖ Al Centro A.F. de Estudios Tecnológicos por el apoyo y las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

- ❖ Al personal de CAFET por sus consejos y orientación, en especial a;
Q.F.B. Teresita Costales González
Q. José Fidel García Temoltzi
T.Q. Federico Valenzuela Salgado

- ❖ Al jurado por dedicar parte de su tiempo a la revisión de este trabajo.

- ❖ Mil gracias a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron al desarrollo y conclusión de este trabajo.

INDICE

| | PAGINA |
|--|--------|
| Introducción | 5 |
| Planteamiento del problema | 6 |
| 1. Generalidades | 7 |
| 1.1. Monografía del fármaco | 7 |
| 1.1.1. Nombre genérico | 7 |
| 1.1.2. Nombre químico y sinónimos | 7 |
| 1.1.3. Fórmula condensada | 7 |
| 1.1.4. Fórmula desarrollada | 7 |
| 1.1.5. Peso molecular | 7 |
| 1.1.6. Análisis elemental | 7 |
| 1.1.7. Descripción | 8 |
| 1.1.8. Intervalo de fusión | 8 |
| 1.1.9. Constante de ionización | 8 |
| 1.1.10. Solubilidad | 8 |
| 1.2. Métodos de análisis | 8 |
| 1.2.1. Cromatografía en capa fina | 8 |
| 1.2.2. Análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución | 8 |
| 1.2.3. Análisis por Cromatografía de gases | 9 |
| 2. Farmacología de veraliprida | 10 |
| 3. Cromatografía de líquidos de alta resolución | 11 |
| 3.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa. | 13 |
| 3.1.1. Formas de cromatografía en fase inversa | 14 |
| 3.1.1.1. Cromatografía de apareamiento iónico | 15 |
| 3.2. Principios básicos y terminología | 17 |
| 3.2.1. Tiempo de retención | 17 |
| 3.2.2. Tiempo de retención neto o relativo | 18 |

| | | |
|----------|--|----|
| 3.2.3. | Número de platos teóricos | 18 |
| 3.2.4. | Altura equivalente a un plato teórico | 18 |
| 3.2.5. | Coefficiente de distribución | 19 |
| 3.2.6. | Factor de asimetría | 19 |
| 3.2.7. | Resolución | 19 |
| 3.2.8. | Selectividad | 20 |
| 3.2.9. | Factor de capacidad | 20 |
| 3.3. | Equipo | 21 |
| 3.3.1. | Componentes de un Sistema Cromatográfico | 22 |
| 3.3.1.1. | Recipiente para la fase móvil | 22 |
| 3.3.1.2. | Bomba | 22 |
| 3.3.1.3. | Inyector | 23 |
| 3.3.1.4. | Detector | 24 |
| 3.3.1.5. | Columna | 27 |
| 3.3.1.6. | Fase móvil | 30 |
| 3.4. | Criterios de Validación | 32 |
| 3.4.1. | Evaluación del Sistema | 33 |
| 3.4.1.1. | Linealidad | 33 |
| 3.4.1.2. | Precisión | 33 |
| 3.4.2. | Evaluación del Método | 34 |
| 3.4.2.1. | Especificidad | 34 |
| 3.4.2.2. | Linealidad | 35 |
| 3.4.2.3. | Exactitud | 36 |
| 3.4.2.4. | Precisión | 36 |
| | 3.4.2.4.1. Repetibilidad | 36 |
| | 3.4.2.4.2. Precisión Intermedia (reproducibilidad intralaboratorio) | 37 |
| 3.4.2.5. | Robustez | 38 |
| 3.4.2.6. | Estabilidad de la muestra | 38 |
| 3.4.2.7. | Tolerancia del sistema | 38 |

| | |
|--|----|
| 3.4.2.8. Intervalo | 39 |
| 4. Objetivos | 40 |
| 5. Hipótesis | 41 |
| 6. Desarrollo experimental | 42 |
| 6.1. Equipo | 42 |
| 6.2. Material | 42 |
| 6.3. Reactivos | 43 |
| 6.4. Parte experimental | 43 |
| 6.4.1. Certificación de veraliprida | 43 |
| 6.4.2. Desarrollo del sistema CLAR de separación | 48 |
| 6.4.3. Desarrollo del método de extracción | 49 |
| 6.4.4. Especificidad del método | 50 |
| 6.4.5. Selección del estándar interno (SI) | 55 |
| 6.5. Método analítico propuesto | 58 |
| 6.5.1. Sustancias de referencia | 58 |
| 6.5.2. Reactivos | 58 |
| 6.5.3. Soluciones | 58 |
| 6.5.4. Formulaciones | 58 |
| 6.5.5. Equipo | 59 |
| 6.5.6. Preparación de la solución de estándar interno (SI) | 60 |
| 6.5.7. Preparación de la solución de referencia (SR) | 60 |
| 6.5.8. Preparación de las muestras para la valoración (SM) | 60 |
| 6.5.9. Sistema cromatográfico | 60 |
| 6.5.10. Adecuación del sistema | 61 |
| 7. Validación | 62 |
| 7.1. Sistema | 62 |
| 7.1.1. Linealidad | 62 |
| 7.1.2. Precisión | 62 |

| | | |
|----------|--|----|
| 7.2. | Método | 62 |
| 7.2.1. | Especificidad | 62 |
| 7.2.1.1. | Productos de degradación | 62 |
| 7.2.1.2. | Excipientes | 63 |
| 7.2.2. | Exactitud | 63 |
| 7.2.3. | Linealidad | 63 |
| 7.2.4. | Precisión | 63 |
| 7.2.4.1. | Repetibilidad | 63 |
| 7.2.4.2. | Precisión Intermedia (reproducibilidad intralaboratorio) | 63 |
| 7.2.5. | Estabilidad de la muestra | 64 |
| 7.2.6. | Tolerancia del sistema | 64 |
| 8. | Resultados y análisis de resultados | 65 |
| 8.1. | Sistema | 65 |
| 8.1.1. | Linealidad | 65 |
| 8.1.2. | Precisión | 67 |
| 8.2. | Método | 68 |
| 8.2.1. | Especificidad | 68 |
| 8.2.1.1. | Productos de degradación | 68 |
| 8.2.1.2. | Excipientes | 72 |
| 8.2.2. | Exactitud y repetibilidad | 73 |
| 8.2.3. | Linealidad | 73 |
| 8.2.4. | Precisión Intermedia (reproducibilidad intralaboratorio) | 76 |
| 8.2.5. | Estabilidad de la muestra | 77 |
| 8.2.6. | Tolerancia del sistema | 77 |
| 9. | Conclusiones | 79 |
| 10. | Ventajas, desventajas y sugerencias | 80 |
| 11. | Bibliografía | 81 |
| Anexo I. | Fórmulas de cálculo | 83 |

INTRODUCCIÓN

La veraliprida es un compuesto no hormonal que posee actividad antidopaminérgica y antigonadotrópica, es utilizada para el tratamiento del síndrome climatérico y de las manifestaciones psicofuncionales de la menopausia comprobada, natural o quirúrgica.

En este estudio se realizó el desarrollo de un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para la cuantificación de Veraliprida en cápsulas, utilizando un sistema de apareamiento iónico. La extracción del principio activo de las cápsulas se logró a través del uso de una solución de ácido acético. En el análisis se utiliza como estándar interno sulfametoxazol, la separación se lleva a cabo en una columna Symmetry C₁₈ (150 X 4.6 mm y 5 µm de tamaño de partícula) y la detección de ambos compuestos se hace mediante un detector U.V. a un longitud de onda de 254 nm. Se investigaron además, diferentes columnas a fin de lograr la separación de principio activo, productos de degradación y excipientes de la formulación, obteniéndose finalmente la resolución necesaria para cuantificar adecuadamente el compuesto de interés.

Luego del desarrollo del método se realizó la validación del mismo siguiendo los parámetros requeridos en la USP 23 para métodos de categoría I, es decir para métodos analíticos para la cuantificación de ingredientes activos en productos farmacéuticos terminados y realizando pruebas complementarias sugeridas en Guías nacionales e internacionales (CIPAM e ICH).

Los parámetros evaluados son linealidad, exactitud, precisión, estabilidad de la muestra, tolerancia del sistema y especificidad.

Los resultados obtenidos aplicando los parámetros de validación mencionados anteriormente cumplen satisfactoriamente, por lo cual la metodología analítica desarrollada puede emplearse en el análisis de veraliprida como método de rutina para control de calidad y como método indicador de estabilidad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad, México se encuentra ante la apertura del mercado de medicamentos genéricos, de modo que si se desea que un producto farmacéutico ingrese y compita en dicho mercado, éste debe cumplir con diversos requerimientos de calidad que aseguren la eficacia y seguridad terapéutica; por lo tanto, es necesario contar con la metodología analítica que permita realizar el control de la calidad del producto durante todas sus etapas de fabricación, así como durante la realización de estudios de estabilidad.

De acuerdo con lo anterior, es necesario contar con métodos analíticos para evaluar la cantidad de principio activo en la formulación sin interferencia de los excipientes (método de control de calidad) y/o productos de degradación (método indicativo de estabilidad).

Actualmente se cuenta con un método analítico por espectrofotometría ultravioleta para cuantificar veraliprida en cápsulas, tanto en producto a granel como en producto terminado, pero debido a que este método no es indicativo de estabilidad, surge la necesidad de desarrollar y validar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución que cumpla con los requerimientos antes mencionados.

1. GENERALIDADES

1.1. MONOGRAFIA DEL FÁRMACO

1.1.1. Nombre genérico: veraliprida ⁽¹⁾

1.1.2. Nombres químicos y sinónimos:

5 - (aminosulfonil) - 2,3 - dimetoxi - N - [[1-(2-propenil) - 2 - pirrolidinil] metil] benzamida.

N - [(1 - alil - 2 - pirrolidinil) metil] - 5 -sulfamoil - o - veratramida.

1.1.3. Fórmula condensada: $C_{17}H_{25}N_3O_5S$

1.1.4. Fórmula desarrollada: se muestra en la figura 1.

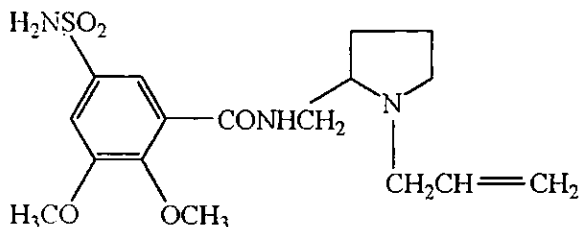


Figura No. 1 Molécula de Veraliprida

1.1.5. Peso molecular: 383.47 g / mol.

1.1.6. Análisis elemental:

| Elemento | % teórico |
|-----------|-----------|
| Carbono | 53.25 |
| Hidrógeno | 6.57 |
| Nitrógeno | 10.96 |
| Oxígeno | 20.86 |
| Azufre | 8.36 |

Tabla No. 1 Análisis elemental de veraliprida.

- 1.1.7. Descripción: polvo blanco a blanco marfil, inodoro o con olor ligero. ⁽²⁾
- 1.1.8. Intervalo de fusión: 123-129°C.
- 1.1.9. Constante de ionización: el pKa de la veraliprida, determinado por titulación potenciométrica es de 7.9 ± 0.0076 .
- 1.1.10. Solubilidad: muy soluble en diclorometano; soluble en metanol, etanol, cloroformo, acetona y ácido acético al 1%; poco soluble en ciclohexano y tolueno.

1.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

1.2.1. Cromatografía en capa fina: ⁽²⁾

Fase estacionaria: placa cromatográfica de 20 X 20 cm y 0.25 mm de espesor de sílica gel F250; Fase móvil: colocar en un embudo de separación 25 partes de etanol, 65 partes de éter isopropílico y 10 partes de solución de hidróxido de amonio en agua (1:1), agitar y eliminar la fase acuosa; Muestra: pesar con exactitud 400 mg de veraliprida y transferirlos a un matraz volumétrico de 10-mL, disolver con 5 mL de metanol, llevar a volumen con el mismo didisolvente y mezclar (concentración 40 mg/mL). Aplicar 10 μ L de la solución; Procedimiento: dejar ascender la fase móvil $\frac{3}{4}$ partes de la placa, marcar la altura del didisolvente, secar a 50°C en estufa y observar la placa bajo luz ultravioleta.

1.2.2. Análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR):

Un método de análisis por CLAR para sulpirida (análogo estructural de la veraliprida) se lleva a cabo utilizando una columna C₁₈ de acero inoxidable, 15 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno empacada con sílica gel octilsilil en micropartículas esféricas de 5 μ m; una fase móvil que consta de 10 volúmenes de acetonitrilo, 10 volúmenes de metanol y 80 volúmenes de una solución que contenga 68 g/L de fosfato monobásico de potasio y 0.76 g/L de octanosulfonato de sodio (3.4mM), ajustando el pH a 3.3 con ácido fosfórico; velocidad de flujo de 1.5 ml/minuto, detección mediante un espectrofotómetro a 240 nm, sin estándar interno y con volumen de inyección de 20 μ L de una solución en fase móvil con una concentración de 3 μ g/mL y 0.1 mg/mL. ⁽³⁾

Otro método para analizar sulpirida que utiliza veraliprida como estándar interno, requiere de las siguientes condiciones de trabajo: columna de acero inoxidable de 15 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno con empaque spherisorb ODS (C₁₈) en partículas de 5 μm de tamaño; fase móvil que consta de 29.9 volúmenes de metanol, 0.1 volúmenes de dietilamina y 70 volúmenes de solución 2.5 mM de heptanosulfonato de sodio, ajustada a un pH de 3.5 con ácido ortofosfórico; velocidad de flujo de 0.8 mL/minuto, detección de fluorescencia a 300 nm para excitación y 365 nm para emisión y un volumen de inyección de 50 μL de una solución en cloroformo y acetato de etilo (3:1) con una concentración de 0.2 mg/mL. ⁽⁴⁾

1.2.3. Análisis por cromatografía de gases masas (CGM): ⁽⁵⁾

El método de análisis por CGM para veraliprida se realiza utilizando una columna: vidrio de 2.1 m de longitud y 2 mm de diámetro interno con empaque: 3% OV-1 en Cromosorb WAW OMCS malla 80-100 (espiral); fase móvil helio, velocidad de flujo de 20 mL/minuto, espectrofotómetro de masas para la detección, como estándar interno sulpirida y veraliprida-d₃ (-OC₂H₃), volumen de inyección de 50 μL de una solución metanólica de concentración igual a 0.2 mg/mL y una temperatura de trabajo de 290°C.

2. FARMACOLOGÍA DE VERALIPRIDA ^(6, 7)

La veraliprida es un compuesto no hormonal y no esteroidal con actividad antidopaminérgica y antigonadotrópica.

Se utiliza durante el tratamiento del síndrome climatérico, es decir, para el tratamiento de los trastornos vasomotores (bochornos y sudoraciones) y de las manifestaciones psicofuncionales de la menopausia comprobada, natural o quirúrgica (agitación, depresión, irritabilidad y nerviosismo).

Tiene una acción selectiva a bajas dosis sobre los centros dopaminérgicos de la termorregulación a nivel del hipotálamo en los centros termorreguladores y neuromediadores.

Se trata de la primera molécula de las orto-veratramidas derivadas de las benzamidas sustituidas. Es un agonista de la dopamina que se opone con fuerza a la hipotermia provocada por la apomorfina.

Se metaboliza en baja proporción, la dosis ingerida es eliminada casi totalmente a las 24 horas. Su excreción es por vía renal y heces. La concentración hemática máxima se produce aproximadamente tres horas después de su administración. Los parámetros farmacocinéticos de la veraliprida no muestran cambios significativos cuando se administran dosis de 100-250 mg y la concentración plasmática puede relacionarse linealmente con la dosis administrada.

3. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN ^(8,9,10)

La cromatografía de líquidos de alta resolución ha tenido una creciente difusión y hoy representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio analítico dedicado a la investigación básica o aplicada.

La cromatografía de líquidos es, en esencia, como todos los métodos cromatográficos, un método separativo. Así, el lugar donde se produce la separación, la columna, puede considerarse el corazón del sistema cromatográfico, alrededor de la cual se monta un equipo de mayor o menor complejidad y donde la transferencia de especies se lleva a cabo mediante procesos de equilibrios de distribución.

La transferencia por medio de procesos de equilibrio se realiza en sistemas heterogéneos e implica la transferencia y distribución de los compuestos entre las dos fases distintas, generalmente no miscibles. La separación de los compuestos puede llevarse a cabo solamente si hay diferencia entre sus distribuciones. Cuando las fases están constituidas fundamentalmente por especies que no forman parte de la muestra, se trata de un equilibrio de distribuciones, por ejemplo: en los procesos de extracción y la cromatografía en todas sus modalidades. ⁽¹¹⁾

La cromatografía de líquidos de alta resolución o rendimiento (CLAR) es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil de líquidos. Las separaciones se logran por partición, adsorción o procesos de intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada. La cromatografía de líquidos de alta resolución tiene ventajas diferenciadas sobre la cromatografía de gases para el análisis de los compuestos orgánicos. Los compuestos a analizar se disuelven en un disolvente adecuado y la mayoría de las separaciones tienen lugar a temperatura ambiente. Por lo tanto, la mayoría de los fármacos, aún siendo compuestos no volátiles o térmicamente inestables, pueden analizarse por cromatografía sin descomposición o necesidad de hacer derivados volátiles.

El tiempo de elución depende de la naturaleza química del compuesto analizado, la composición y velocidad de flujo de la fase móvil y la composición y área superficial de la fase estacionaria. ⁽¹²⁾

Existen muchas maneras de clasificar la cromatografía de líquidos en columna. Basándose en la naturaleza de la fase estacionaria y en los procesos de separación, pueden enumerarse cuatro tipos:

- Cromatografía de adsorción.

La fase estacionaria es un adsorbente y la separación se basa en repetidas etapas de adsorción y desorción.

- Cromatografía de partición.

En esta modalidad, las moléculas de soluto se distribuyen entre dos líquidos: uno es la fase móvil, y el otro la fase estacionaria, que se encuentra homogéneamente dispersa en un soporte sólido finamente dividido.

- Cromatografía de intercambio iónico.

La fase estacionaria tiene una superficie cargada iónicamente, con carga contraria a la de la muestra. La fase móvil es un amortiguador acuoso, en el que el pH y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de elución.

- Cromatografía de exclusión.

Esta modalidad emplea materiales de porosidad controlada, que funcionan como un filtro o tamiz y clasifica la moléculas de la muestra según el orden decreciente de tamaño molecular, así pues, las moléculas más grandes son las primeras en eluir, y las más pequeñas son las últimas.

Según sea la polaridad relativa de las dos fases, en la práctica se definen dos tipos de cromatografía:

- Cromatografía en fase normal.

La fase estacionaria es de naturaleza fuertemente polar (por ejemplo sílice) y la fase móvil es apolar (por ejemplo n-hexano o tetrahidrofurano). Las muestras polares quedan retenidas en la columna durante tiempos mayores que los materiales menos polares o apolares, como puede observarse en la figura 2(a).

- Cromatografía en fase inversa.

La fase estacionaria es de naturaleza apolar (hidrocarburo), mientras que la fase móvil es un líquido polar, normalmente agua con un modificador orgánico. En este caso, cuanto más apolar sea la muestra, mayor será su retención, esto se ilustra en la figura 2(b).

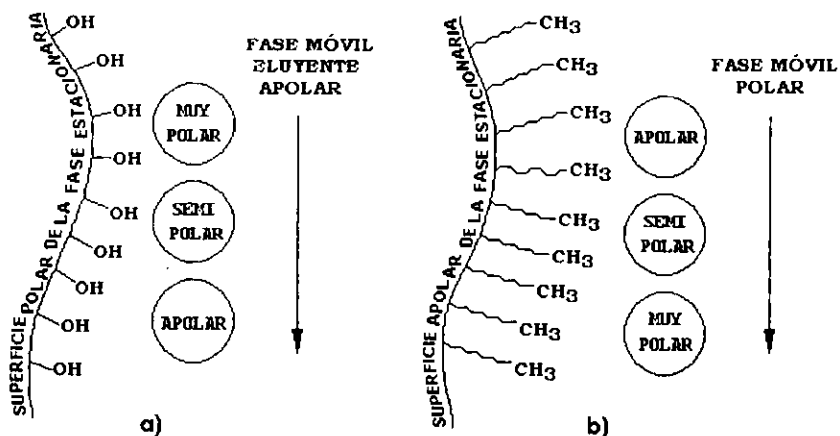


Figura No. 2 Cromatografía en fase normal (a) y cromatografía en fase inversa (b). Lo círculos representan los tipos de compuestos presentes en la muestra y su posición relativa en la dirección del flujo de la fase móvil indica su orden de elución.

3.1. CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN EN FASE INVERSA

En la actualidad, probablemente más del 70% de los análisis en cromatografía de líquidos se efectúan en fase inversa.

A pesar de haber sido ampliamente estudiado, aún no se comprende totalmente el mecanismo de retención en fase reversa. Se ha sugerido que el modo de interacción entre el soluto y la fase ligada puede ser de tres tipos, partición del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria de líquidos, adsorción sobre una fase estacionaria sólida, o bien un proceso mixto de partición-adsorción.

La cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa está basada en el uso de micropartículas apolares, en particular empaques químicos de sílicas alquílicas que hacen de ella un método operacional simple y flexible, con tiempos de análisis rápidos y con una gran resolución, como se ilustra en la figura 3.

La cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa tiene muchas ventajas, de las cuales pueden mencionarse que compuestos no iónicos, iónicos e ionizables pueden separarse en la misma columna y con la misma fase móvil; la fuerza de atracción superficie no polar-soluto es débil, la adsorción irreversible raramente ocurre, la fase móvil predominantemente es agua; el modificador orgánico predominante, metanol, es accesible en calidad y precio y el orden de elución es predecible, en función de la hidrofobicidad del compuesto a analizar.

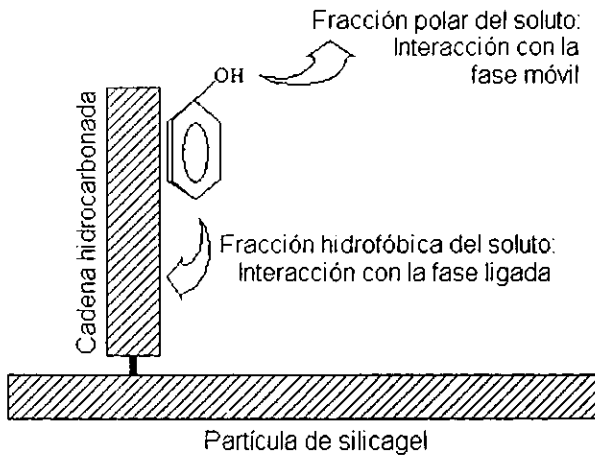


Figura No. 3 Mecanismo de retención en fase reversa.

3.1.1. FORMAS DE CROMATOGRFÍA EN FASE INVERSA ⁽¹⁰⁾

La cromatografía en fase reversa puede clasificarse, según su forma operativa en:

- Cromatografía de partición simple
- Control de la ionización
- Cromatografía de apareamiento iónico
- Complejación con iones metálicos
- Fase reversa en medio no acuoso

Se describe a continuación la cromatografía de apareamiento iónico que es el tipo de cromatografía utilizada durante la realización de este trabajo.

3.1.1.1. CROMATOGRAFÍA DE APAREAMIENTO IÓNICO ⁽⁸⁾

Frecuentemente nos encontramos con estructuras demasiado solubles en agua para ser analizadas por las técnicas convencionales de intercambio iónico. Bases o ácidos orgánicos que se mantienen en forma iónica dentro de los rangos de pH habituales o recomendados para preservar la integridad del relleno de fase reversa. Estos casos no pueden ser resueltos por control de la ionización, ya que llegar a la forma no iónica implicaría un pH demasiado ácido como para evitar la hidrólisis de la fase ligada, o demasiado alcalino para evitar la disolución de la silicagel. En estos casos, es preferible mantener el estado iónico del compuesto de interés, aplicando la cromatografía de apareamiento iónico.

En este tipo de cromatografía, la fase móvil contiene un contraión, es decir, una especie química de carga opuesta a la del compuesto de interés. Puede suponerse, en un modelo muy simplificado, que el compuesto de interés y el contraión forman un complejo "neutro" que se transporta como tal dentro de la columna, ocurriendo un equilibrio de partición entre la fase móvil y la fase estacionaria como se muestra en la figura 4.

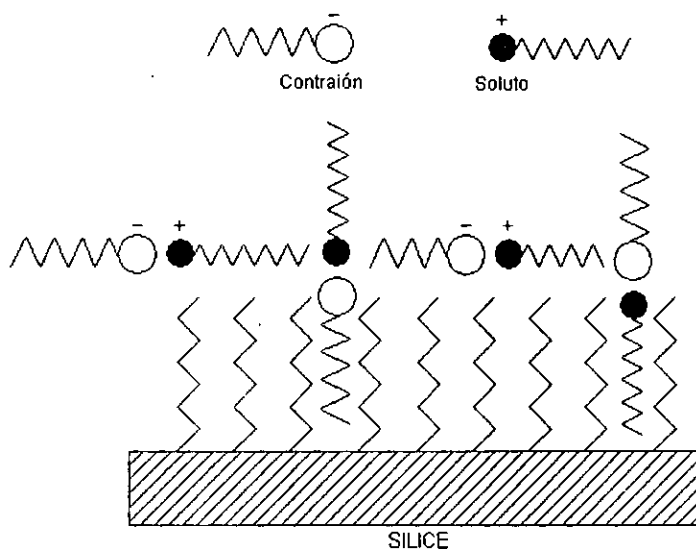


Figura No. 4 Modelo de iones apareados en Cromatografía de Apareamiento Iónico.

Debe procurarse que el compuesto de interés esté en su forma iónica (necesaria para el apareamiento), regulando el pH a 6.5-7.5 para el tratamiento de ácidos y a pH de 2.5-3.5 para el de las bases.

El tipo de contraión dependerá de la funcionalidad del compuesto de interés. Para las bases, formadoras de cationes, se emplean contraiones aniónicos, en especial alquilsulfonatos (butil a dodecil sulfonato de sodio) y para los ácidos (formadores de aniones), compuestos de alquil amonio (tetrabutil, tetraetil, tetrametil amonio, o trimetil alquilamonio).

La retención puede ser regulada, como en la cromatografía de líquidos en fase reversa, por la "fuerza" de la fase móvil (concentración del modificador orgánico), pero también por el tamaño de la cadena alquílica (y consecuentemente por la hidrofobicidad) del contraión, por su concentración y por el pH.

Un cromatograma es una gráfica en la que se representa la respuesta del detector en función del tiempo de elución, a través de estos se pueden calcular los parámetros cromatográficos descritos en el punto 3.2. para evaluar la eficiencia del sistema operativo final.

3.2. PRINCIPIOS BÁSICOS Y TERMINOLOGÍA ^(9 - 14)

Los parámetros cromatográficos se determinan por el pico del analito (cromatograma).

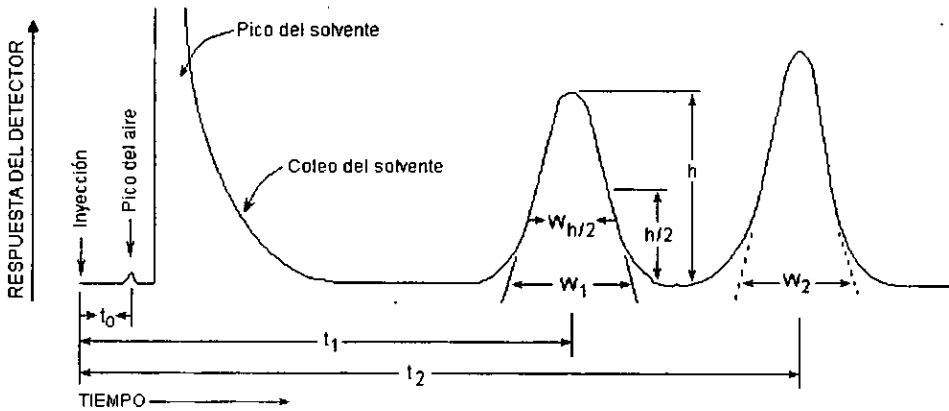


Figura No. 5 Separación cromatográfica de dos sustancias.

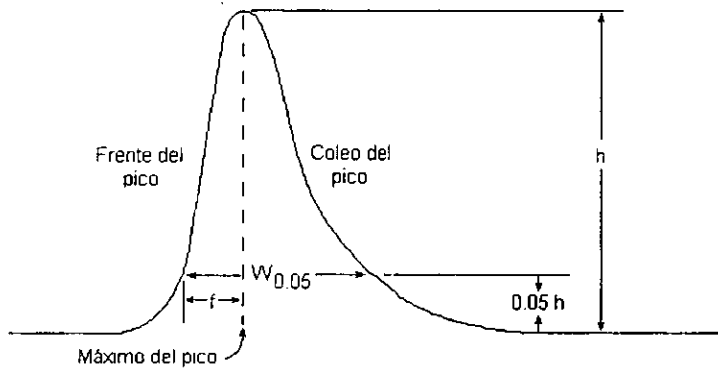


Figura No. 6 Pico cromatográfico asimétrico.

3.2.1. Tiempo de retención (t_R). Es el tiempo medido entre la inyección y la elución de la concentración máxima de soluto (máxima señal).

Cuando la muestra no experimenta ninguna interacción con la fase estacionaria, esta pasa sin ninguna retención y entonces se dice que eluye en el volumen vacío o tiempo muerto de la columna.

- 3.2.2. Tiempo de retención neto o relativo (t_n). Es la diferencia del tiempo de retención del compuesto de interés y el tiempo muerto, que se calcula por la ecuación:

$$t_n = t - t_m$$

donde:

- t_n = Tiempo de retención neto o relativo
 t = Tiempo de retención de la muestra
 t_m = Tiempo de retención de una sustancia no retenida (tiempo muerto)

- 3.2.3. Número de platos teóricos (N). Un plato teórico, es un corte imaginario dentro de la columna, donde se alcanza el equilibrio transitorio de distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria.

El número de platos teóricos, N, es una medida de la eficiencia de la columna y se determina de acuerdo con la fórmula:

$$N = 16 \left(\frac{t}{W} \right)^2 \quad \text{ó} \quad N = 16 \left(\frac{t}{W_{h/2}} \right)^2$$

donde:

- N = Número de platos teóricos
t = Tiempo de retención de la sustancia
W = Ancho del pico en su base, obtenido al extrapolar los lados relativamente rectos del pico con la línea de base.
 $W_{h/2}$ = Ancho máximo a media altura.

- 3.2.4. Altura equivalente a un plato teórico (AEPT). Es la longitud de la columna requerida para obtener un equilibrio de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. Se calcula como sigue:

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

donde:

AEPT = Altura Equivalente a un Plato Teórico
 L = Longitud de la columna
 N = Número de platos teóricos

3.2.5. Coeficiente de distribución o reparto (K). Es la relación de la cantidad de masa del soluto en la fase móvil y la fase estacionaria. Se representa por:

$$K = \frac{\text{Cantidad de muestra / mL de fase estacionaria}}{\text{Cantidad de muestra / mL de fase móvil}}$$

3.2.6. Factor de asimetría (T). Es una medida de la simetría del pico, es uno para los picos perfectamente simétricos y su valor aumenta o disminuye a medida que la asimetría es más pronunciada, se calcula con la siguiente fórmula:

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

donde:

T = Factor de asimetría
 W_{0.05} = Ancho del pico al 5% de su altura en centímetros
 f = Trazando una línea perpendicular a la línea base desde el vértice del pico, f es el ancho desde esa línea hasta el lado izquierdo del pico, al 5% de la altura de éste, en centímetros.

3.2.7. Resolución (Rs). Es una medida cuantitativa del grado de separación de dos componentes en una mezcla. Se expresa como el cociente entre la distancia del punto máximo de los dos picos y el valor medio de la anchura del pico en la base.

$$Rs = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_2 + W_1} \quad \text{ó} \quad Rs = \frac{2(t_2 - t_1)}{1.70(W_{1, h/2} + W_{2, h/2})}$$

donde:

- R_s = Resolución
 T_1 y t_2 = Tiempos de retención de los dos componentes
 W_1 y W_2 = Anchos correspondientes en las bases de los picos obtenidos al extrapolar los lados relativamente rectos de los picos con la línea de base.
 $W_{1, h/2}$ y $W_{2, h/2}$ = Anchos máximos a media altura de los dos componentes.

Se considera que a partir de una $R = 1.5$ a nivel de línea base existe una separación completa de los picos.

- 3.2.8. Selectividad (α). Es una medida de la solubilidad diferencial de dos compuestos en la fase estacionaria. Su valor debe encontrarse entre 1.0 y 2.0. Se expresa como:

$$\alpha = \frac{t_1 - t_m}{t_2 - t_m}$$

donde:

- α = Selectividad
 t_1 y t_2 = Tiempo de retención del soluto 1 y 2
 t_m = Tiempo muerto

- 3.2.9. Factor de capacidad (K'). La fase estacionaria retarda al soluto en un tiempo t , mientras t_m representa el tiempo que permanece en la fase móvil; por lo tanto el cociente entre ambos nos dará el valor de K' y su valor está generalmente entre 1 y 10. Se calcula de la siguiente manera:

$$K' = \frac{t_R - t_m}{t_m}$$

donde:

- K' = Factor de capacidad
 t_R = Tiempo de retención del compuesto
 t_m = Tiempo muerto

3.3. EQUIPO

Los equipos de cromatografía de líquidos de alta resolución pueden clasificarse en integrados y modulares. En los primeros, cada una de sus partes están reunidas en un gabinete y su intercambio o conexión con otros componentes de la misma o diferente marca es difícil. En los segundos, los módulos son instrumentos individuales que permiten no solo armar el equipo según la necesidad del analista sino aumentar su complejidad según varíe esa necesidad, un ejemplo de este se presenta en la figura 7.

Los componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución son: una bomba para impulsar el disolvente o eluyente, un dispositivo para la inyección que permita la introducción de la muestra al sistema, una columna para llevar a cabo la separación y un detector para determinar la separación que haya tenido lugar.

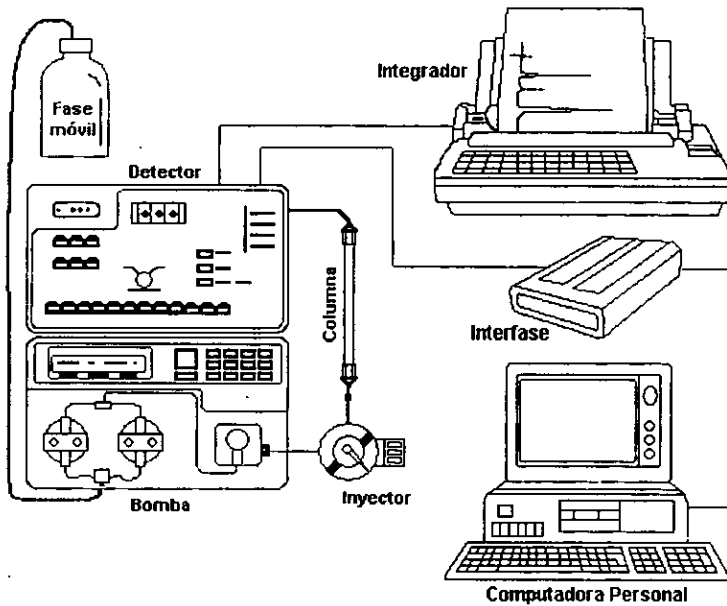


Figura No. 7 Esquema de un cromatógrafo de líquidos básico modular.

Aún cuando hoy en día existe una amplia gama de equipo en cuanto a costo, complejidad y tipo de instrumental, este debe cumplir con características que vayan de acuerdo con las necesidades y la utilidad que pueden prestar:

- Versatilidad

El instrumento debe ser adecuado para trabajar con muestras de diferente tipo, debe adaptarse a las diferentes técnicas cromatográficas y debe de realizar el máximo de operaciones.

- Reproducibilidad y estabilidad

Debe proveer un control adecuado sobre los parámetros de operación, tales como el flujo de la fase móvil, la temperatura, la presión, composición de la fase móvil, etc.

- Sensibilidad

Además de trabajar con pequeñas cantidades de la muestra, debe generar señales de intensidad apreciable.

3.3.1. COMPONENTES DE UN SISTEMA CROMATOGRÁFICO

3.3.1.1. RECIPIENTE PARA LA FASE MÓVIL ⁽⁸⁾

Contiene la fase móvil y se ubica generalmente sobre el nivel de la bomba para que la fuerza de gravedad dirija el disolvente hacia ésta, manteniendo llenas las conexiones.

Se pueden utilizar recipientes de vidrio, acero inoxidable o plásticos inertes, de una capacidad entre 1 y 3 litros suficiente para todo un día de operación. Al extremo del tubo de entrada de disolvente se conecta un filtro de acero con 2 a 10 μm de porosidad que impide el ingreso de partículas a la bomba.

3.3.1.2. BOMBA ^(8, 10, 12)

Las bombas impulsan la fase móvil proveniente del recipiente de disolvente hacia el inyector, y desde ahí hacia la columna.

La razón de bombear el disolvente a través del sistema es proveer, en forma constante y reproducible, de fase móvil a la columna; y a alta presión, debido a que las pequeñas partículas empleadas para empacar las columnas ofrecen una resistencia importante al flujo a través de éstas.

Las características más importantes de un sistema de bombeo son:

- Presión máxima de operación de hasta 6000 psi.
- Intervalo de flujo entre 0.001 y 10 mL/minuto.
- Flujo libre de pulsaciones (no más de 5%)
- Reproducibilidad y constancia de flujo.
- Resistente a líquidos corrosivos.
- Facilidad para el cambio de fases móviles.
- Facilidad de limpieza del sistema.
- Sistema de protección para evitar los excesos de presión.

Bombas reciprocantes

Existen varios tipos de bombas reciprocantes: de un solo pistón, de dos pistones y bomba de pistones alternados. El pistón se conecta al motor del equipo por medio de engranajes, y en su movimiento hacia adelante impulsa el disolvente despegando una esfera de rubí de su asiento de zafiro, y abriendo de esta forma la válvula de salida.

Bomba a diafragma

Es un tipo de bomba reciprocante, solo que en lugar de pistón, contiene un diafragma que separa el mecanismo de la cámara de bombeo.

Bomba jeringa

Es un dispositivo de desplazamiento continuo, es decir, el disolvente contenido en un cilindro es impulsado hacia el inyector por medio de un movimiento continuo y hacia delante del pistón.

3.3.1.3. INYECTOR ^(8, 10, 12)

El inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución, sin interrumpir el caudal del disolvente a través del sistema, debe reunir una serie de características importantes, entre ellas:

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

Inyectores manuales

Lo más sencillo es introducir la muestra con una jeringa, donde por medio de un abrir y cerrar de las válvulas manualmente, se desvía el flujo mientras se aplica la muestra en la cámara de carga y luego se reanuda completándose la inyección.

Inyector automático

La precisión obtenida con estos inyectores es en general superior a la de los métodos manuales, porque no dependen de la habilidad del operador. Los inyectores automáticos deben contener, además de la válvula de inyección y del mecanismo que permite su llenado, un dispositivo para colocar las muestras a inyectar, en general un carrusel que aloja viales donde se colocan las muestras.

3.3.1.4. DETECTOR ^(8, 10, 12)

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

Los detectores deben reunir ciertas características, entre ellas están:

- Tener un amplio rango dinámico de respuesta.
- Poseer una respuesta lineal.
- No contribuir al ensanchamiento de banda extracolumnar.
- Responder a todos los solutos.
- Tener sensibilidad apropiada.
- No afectarse por cambios de temperatura.
- Poseer una buena relación señal/ruido.
- No destruir la muestra.
- Tener una constante de tiempo baja.

Los detectores pueden clasificarse en universales y selectivos ⁽¹⁵⁾:

a) Detectores universales

Miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene el compuesto de interés en comparación con la misma fase móvil pura.

- Detector de índice de refracción

Mide la diferencia de índice de refracción entre el disolvente puro y el disolvente que contiene la muestra. Es muy sensible y se ve afectado por ligeros cambios de temperatura, lo cual limita su campo de aplicación.

- Detector de conductividad

Se usa para la detección de algunos solutos iónicos en fases móviles acuosas, su respuesta depende de la temperatura, por lo que ésta debe controlarse y también le afecta la velocidad de flujo de la fase móvil.

b) Detectores selectivos

Son aquellos sensibles a alguna propiedad única del soluto.

- Detector U.V.

Es el detector más empleado en cromatografía de líquidos de alta resolución, debido a que posee buena sensibilidad y rango lineal, y permite detectar al compuesto de interés en el orden de los nanogramos. No es destructivo y puede emplearse con gradientes de disolventes, con la única limitación de que éstos sean transparentes en la longitud de onda de trabajo. La concentración del compuesto de interés en la muestra se determina por aplicación de la Ley de Beer: $A = abC$, donde A es la absorbancia, a es la absorptividad molar del compuesto de interés, b es el camino óptico de la celda medido en centímetros y C es la concentración del compuesto de interés en la muestra expresada en moles/litro.

Existen tres tipos de detectores U.V.: los de longitud de onda fija, de longitud de onda variable y de arreglo de fotodiodos.

- Detector de onda fija

Opera a longitudes de onda prefijadas, determinadas por las líneas de emisión de su lámpara, habitualmente de mercurio a baja presión. Como longitudes de onda de trabajo se utilizan las bandas de emisión de la lámpara de mercurio, especialmente la fuerte línea de 254 nm. El verdadero monocromador del instrumento es la propia emisión de la lámpara pero, para eliminar líneas de otras longitudes de onda lejanas a la línea de trabajo se utilizan filtros de interferencia.

- Detector de onda variable

Posee una red de difracción que permite seleccionar libremente la longitud de onda de trabajo. Prodreemos así, elegir la longitud de onda de máxima absorción del compuesto de interés para aumentar la sensibilidad de medición. Emplea una lámpara de emisión continua de Deuterio o de Xenón.

- Detector de arreglo de fotodiodos

Se emplea un sistema óptico invertido: la celda se ilumina con luz "blanca", es decir, no monocromada y la luz emergente de la celda llega a la red de difracción y allí es dispersada hacia el elemento fotosensible. En lugar de una fotocelda se emplea un conjunto de fotoceldas o fotodiodos montados sobre un chip de silicio. De esta forma, se consigue medir no solo la luz transmitida a una longitud de onda, sino todo el espectro de absorción del compuesto de interés, esto se muestra en la figura 8. ⁽¹⁶⁾

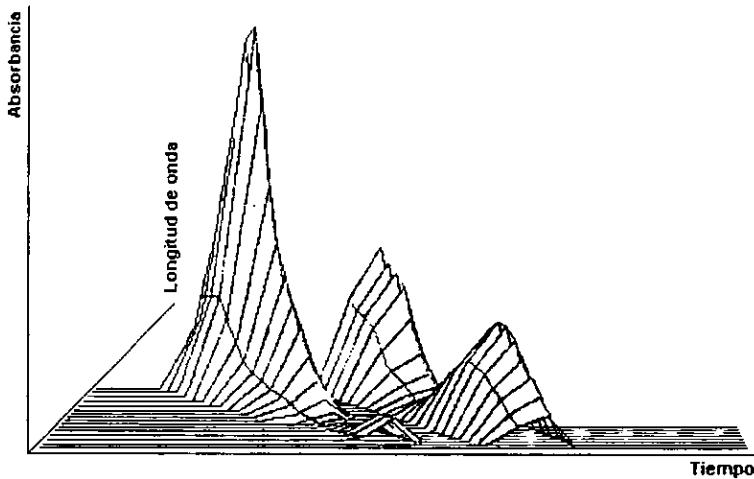


Figura No. 8 Espectro U.V. con detector de arreglo de fotodiodos.

- Detector de fluorescencia

Se utiliza para el análisis de sustancias que presentan fluorescencia "natural" o conferida por derivatización con un reactivo fluorogénico. Su alta sensibilidad y selectividad lo convierten en un detector adecuado par el análisis de trazas. La lámpara de Xenón es la fuente de emisión más ampliamente difundida por producir un espectro continuo en el rango de 260 a 660 nm y de muy alta intensidad.

- Detector electroquímico

Es un detector muy sensible, unas 1000 veces más sensible que el detector U.V. y altamente selectivo. La selectividad se debe, no sólo a que detecta compuestos capaces de ser oxidados o reducidos, sino que puede reducirse al número de esos compuestos detectados por una cuidadosa elección del potencial aplicado.

La detección de compuestos electrooxidables o electroreducibles ocurre en la superficie de un electrodo interpuesto en el paso del eluato de la columna. Este detector emplea tres electrodos: el electrodo de trabajo, el de referencia y el auxiliar.

Su principal limitación está dada por el tipo de fase móvil a emplear, que necesariamente debe ser conductiva, limitando su campo de aplicación a la cromatografía de fase reversa e intercambio iónico.

3.3.1.5. COLUMNAS ^(17,18,19)

Es la parte más importante del equipo, pues en ella se lleva a cabo la separación. Las características de la columna, como el material de empaque, las dimensiones, etc., dependerán del tipo de separación que se quiera hacer. Las más comunes son las de acero inoxidable, tiene una longitud de 10-50 centímetros y están rellenas de partículas de diámetro entre 3-10 μm y su diámetro interno puede estar comprendido entre 2 y 5 mm.

El material de relleno de una columna está constituido por partículas, definidas por una serie de características:

- Morfología

El material empleado puede adoptar básicamente dos formas, irregular o esférica, y un tamaño comprendido entre los 3 y 10 μm de diámetro. La forma resultante de las bandas depende de la velocidad de elución, de la difusión del soluto a lo largo de la columna y de la existencia de diferentes caminos que las diversas moléculas pueden seguir cuando se mueven entre partículas de la fase estacionaria.

Todos los efectos que se mencionan dependen de la velocidad, v , con que la fase móvil atraviesa la columna. La consideración detallada de los diversos mecanismos por los que la banda se ensancha conducen a la ecuación de Van Deemter para la altura de plato:

$$A.E.P.T. = A + B / v + Cv$$

donde A , B y C son constantes características de una sistema dado de columna y disolvente. La ecuación anterior indica que existe una velocidad óptima para la operación de cualquier columna, a la cual la altura de plato alcanza su valor mínimo.

- Porosidad

La porosidad de la partícula es la relación entre el volumen interno de los poros y el volumen de la partícula.

Los poros son cavidades, de mayor profundidad que de diámetro y de tamaño y morfología muy variada, lo cual se puede observar en la figura 9; se habla de microporos cuando su diámetro es menor que 20 Å, mesoporos cuando su diámetro está comprendido entre 20 y 500 Å y macroporos cuando es mayor que 500 Å.

La porosidad es responsable de los fenómenos de exclusión y de la velocidad de transferencia de masa de soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria. En general, a menor diámetro de poro corresponde mayor área superficial y consecuentemente, mayor retención.

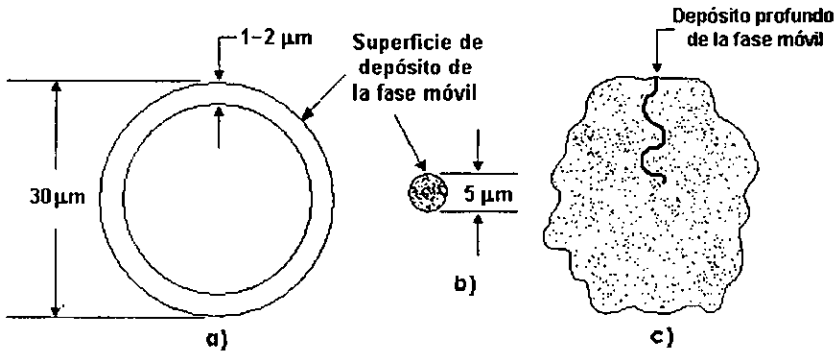


Figura No. 9 Tipos de partículas para Cromatografía De líquidos: a) partícula con superficie porosa, b) partícula muy pequeña totalmente porosa y c) partícula totalmente porosa.

- Estructura química

Para que durante el proceso cromatográfico se produzca una diferenciación entre las moléculas del compuesto de interés y las de la fase móvil, la superficie del adsorbente debe funcionar como un receptor de las moléculas del compuesto de interés.

La estructura química superficial es diferente de la interna y está constituida por grupos funcionales activos, naturales o producto de una modificación inducida y permanente.

Químicamente, puede definirse como un óxido de silicio hidratado, de tipo $(\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O})_n$, en el cual sus átomos metálicos están ligados entre sí por átomos de oxígeno (puentes siloxano Si-O-Si) y los superficiales a grupos hidroxilo, constituyendo los grupos silanoles (Si-OH). Estos silanoles pueden ser de tipo "libre", "vecinal" o "geminal" y son los responsables de la actividad superficial, como se ilustra en la figura 10. ⁽¹⁰⁾

El relleno, idealmente, debe producir la máxima resolución en el menor tiempo, debe tener la máxima capacidad de muestra, ser fácilmente empacable, producir solo pequeñas caídas de presión y ser económico.

En general, las columnas para cromatografía de líquidos tienen una gran duración y cabe esperar una larga vida de servicio útil, a menos que se utilicen en condiciones destructivas.

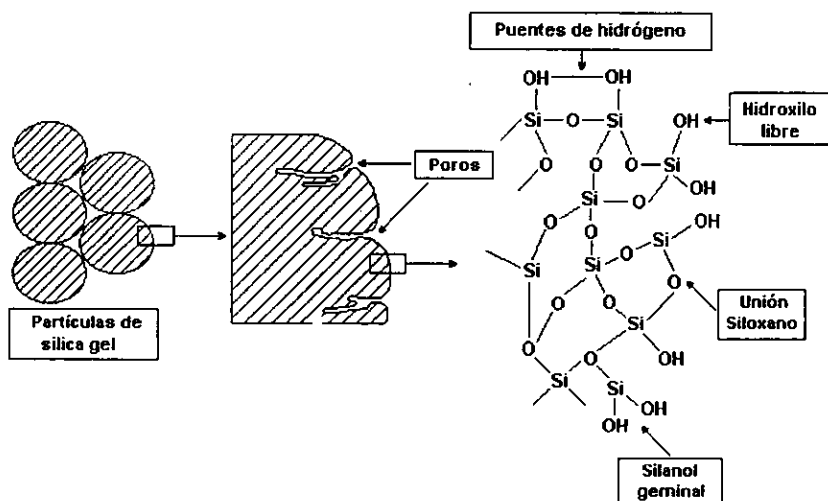


Figura No. 10 Estructura de la sílica gel, mostrando sus poros y la estructura química interna y externa.

3.3.1.6. FASE MÓVIL ^(8,10)

La fase móvil en cromatografía de líquidos de alta resolución cumple un papel fundamental, ya que puede por sí misma modificar completamente la selectividad de las separaciones en fase normal y es, a la vez, el verdadero "motor" de las separaciones en fase reversa ⁽²⁰⁾, y es posible lograr un número muy grande de diferentes separaciones con una columna, tan solo variando la composición de la fase móvil.

No todos los disolventes son adecuados para trabajar en cromatografía de líquidos de alta resolución, ya que la condición de estado líquido no es suficiente por sí misma para que una sustancia se pueda emplear como fase móvil. Un disolvente apropiado para Cromatografía De líquidos de Alta Resolución debe cumplir con algunos requisitos, entre los cuales podemos destacar los siguientes:

- Alto poder solubilizante de las muestras

La muestra a inyectar debe estar completamente disuelta y es conveniente que el disolvente de la muestra sea la misma fase móvil. Si esto no es posible debe tenerse en cuenta tanto la miscibilidad entre el disolvente de la muestra y la fase móvil por la posible precipitación de los componentes de la muestra al estar en contacto con la fase móvil.

- Baja reactividad

Los disolventes con un elevado grado de reactividad no se utilizan en cromatografía de líquidos de alta resolución, ya que pueden reaccionar con la muestra, la fase estacionaria, o los componentes del equipo cromatográfico.

- Compatibilidad con el detector utilizado

Teniendo en cuenta que el detector más difundido en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es el espectrofotométrico, es habitual elegir un disolvente "transparente" a la longitud de onda de trabajo y que no contenga impurezas que puedan aumentar la absorbancia.

- Adecuado punto de ebullición

En general, se prefieren los disolventes de punto de ebullición intermedio. Si el disolvente tiene bajo punto de ebullición, su volatilidad es alta y la composición de la fase móvil puede variar durante la jornada de trabajo. Por el contrario, un alto punto de ebullición se correlaciona, por lo general, con alta viscosidad.

- Baja viscosidad

La viscosidad de los disolventes está estrechamente relacionada con la presión del sistema. Con disolventes viscosos, se reduce la permeabilidad de la columna, la eficiencia de la separación es menor debido a que el coeficiente de difusión de la muestra se reduce, y se dificulta la transferencia de masa del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

- Seguridad

En la cromatografía de líquidos de alta resolución, como en cualquier otro método analítico, debe evitarse el empleo de disolventes que por sus características, representen un serio riesgo para el operador.

- Alto grado de pureza

La presencia de impurezas puede inducir modificaciones de la selectividad de la fase móvil, y contribuir a una señal de base importante en el detector.

Disolventes y aditivos de fase reversa ⁽²¹⁾

Las fases móviles de fase reversa están constituidas por mezclas de disolventes polares, en general agua, y un modificador orgánico (metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano), con o sin el agregado de aditivos (sales inorgánicas o reactivos de apareamiento iónico).

Numerosos métodos cromatográficos requieren el uso de sales en la fase móvil, generalmente para el control y regulación del pH o de la fuerza iónica. Otros aditivos comunes son los reactivos de apareamiento iónico, empleados para el análisis de sustancias orgánicas iónicas o ionizables. Básicamente, existen dos tipos de reactivos de apareamiento iónico: las sales de tetraalquilamonio empleadas para el análisis de solutos ácidos y los alquilsulfonatos, para los solutos básicos. Estos aditivos, al igual que los disolventes, deberán tener un alto grado de pureza.

3.4. CRITERIOS DE VALIDACIÓN

Validación es la acción de probar, de acuerdo con buenas prácticas de manufactura y/o laboratorio, que un procedimiento, proceso, equipo, material, actividad o sistema conduce a el resultado esperado. ⁽²²⁾

La validación de métodos analíticos es parte fundamental durante el desarrollo de un método de análisis para el control de una forma farmacéutica, ya que durante esta secuencia de pruebas y análisis se evalúa si éste cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado.

La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. Consta de la evaluación de los siguientes parámetros:

Sistema

Linealidad
Precisión

Método

Especificidad
- Excipientes
- Productos de degradación

Exactitud
Linealidad
Precisión
- Repetibilidad
- Reproducibilidad (Precisión Intermedia)

Estabilidad de la muestra
Tolerancia del sistema
Intervalo

3.4.1. Evaluación del sistema

3.4.1.1. Linealidad

La linealidad de un sistema es la habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo dado. Se evalúa al determinar la relación que existe entre la concentración "x" y la respuesta "y", al preparar una curva de calibración con 5 niveles y 3 réplicas por nivel de concentración a partir de pesadas independientes, en el intervalo de 50 a 150% de lo propuesto en el método analítico.

- a) Cálculos: ver anexo I.
- b) Criterios de aceptación

- b = Intercepto

$$LIIC \leq 0 \leq LSIC$$

$$H_0: \text{Intercepto} \approx 0$$

$$H_a: \text{Intercepto} \neq 0$$

$$LIIC = \text{Límite inferior del intervalo de confianza}$$

$$LSIC = \text{Límite superior del intervalo de confianza}$$

- Coeficiente de determinación (r^2)
$$r^2 \geq 0.98$$
- Coeficiente de variación del factor respuesta menor o igual a 2.0%.

3.4.1.2. Precisión

Es el grado de concordancia de las medidas individuales de un proceso. Se determina por el análisis sextuplicado de una misma Solución de Referencia a la concentración del 100% de lo indicado por el método.

- a) Cálculos: ver anexo I.
- b) Criterio de aceptación

- Coeficiente de variación de la respuesta $\leq 2.0\%$.

3.4.2. Evaluación del método

3.4.2.1. Especificidad

Es la habilidad de un método analítico para determinar solamente el (los) componente(s) que se va(n) a analizar. Se demuestra estableciendo experimentalmente que el excipiente y sustancias relacionadas al principio activo, como precursores de síntesis, productos de degradación o de formación, no interfieran con la medición, es decir, que el método sea capaz de separar y cuantificar sin interferencias únicamente el (los) compuesto(s) de interés.

La especificidad de un método analítico se demuestra al comparar los resultados del análisis de muestras que contienen impurezas, placebo, o productos de degradación o formación, con muestras que no los contienen. Cuando las impurezas o productos de degradación no son conocidas, la especificidad se demuestra obteniendo los primeros y más importantes productos de degradación a través de reacciones simuladas y controladas de degradación. Para esto, se somete a degradación, por las vías más comunes (hidrólisis ácida y básica, oxidación y fotólisis) a la formulación.

A) Principios activos

B) Formulación o placebo cargado

a) Cálculos: ver anexo I.

b) Criterio de aceptación

- a. Se seleccionan las condiciones adecuadas de degradación hasta tener una descomposición de la molécula del 10-30%, y así se obtienen los primeros y más importantes productos de degradación y que éstos se encuentran en una concentración tal que pueda ser detectada por el método analítico.
- b. Al repetir la degradación, la diferencia entre los porcentajes degradados no debe ser más de 5%, para asegurar que el porcentaje de descomposición obtenido, se debe a la ruta de degradación elegida y no a la casualidad.
- c. El análisis espectral de las muestras degradadas, utilizando un sistema computarizado adaptado a un detector de arreglo de fotodiodos debe mostrar que la señal cromatográfica de la Veraliprida es pura, mediante la comparación de los diferentes espectros de absorción o diferentes tiempos de elución del compuesto de interés.

- d. Realizar la comparación del espectro de absorción de la sustancia patrón de referencia correspondiente con el espectro de absorción del compuesto de interés y éstos deben ser similares.
- e. En el caso de especificidad a excipientes, la formulación placebo no debe presentar ninguna señal que pudiese interferir en la región cromatográfica de Veraliprida y Sulfametoxazol.

3.4.2.2. Linealidad

La linealidad de un método analítico es la habilidad de obtener resultados, dentro de un intervalo determinado, que sean directamente proporcionales a la cantidad de analito en la muestra. Se estableció comprobando que la gráfica obtenida de la cantidad adicionada (cantidad conocida de principio activo que se adiciona a la matriz de la formulación) contra cantidad recuperada (cantidad de principio activo recuperado con el método de análisis que se propone) describe un comportamiento de $y = mx + b$, donde la pendiente (m) y el intercepto (b) no son estadísticamente diferentes de 1 y 0, respectivamente.

a) Cálculos: ver anexo I.

b) Criterio de aceptación

- Coeficiente de determinación (r^2)

$$r^2 \geq 0.98$$

- b = Intercepto

$$t_{bcal} \ t_{95\%} \ n-2 \ g.l.$$

$$H_0: \text{Intercepto} \approx 0$$

$$H_a: \text{Intercepto} \neq 0$$

$$LIIC \leq 0 \leq LSIC$$

- m = Pendiente

$$t_{mcal} \ t_{95\%} \ n-2 \ g.l.$$

$$H_0: \text{Pendiente} \approx 1$$

$$H_a: \text{Pendiente} \neq 1$$

$$LIIC \leq 1 \leq LSIC$$

- Promedio del por ciento recuperado por nivel y en el intervalo de 98.0 a 102.0%.
- Coeficiente de variación del por ciento recuperado en cada nivel y global menor o igual a 2.0%.
- Intervalo de confianza al 95% para el por ciento recuperado global entre 98.0 y 102.0%.

3.4.2.3. Exactitud

Es el grado de concordancia de medidas individuales con un nivel aceptado de referencia. Se determinó por el análisis sextuplicado de placebos cargados al 100% de la cantidad a analizar, determinando el por ciento recuperado.

- a) Cálculos: ver anexo I.
- b) Criterios de aceptación

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

$$LIIC \leq 100 \leq LSIC$$

$$98.0\% \leq \bar{x} \leq 102.0\%$$

3.4.2.4. Precisión

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o coeficiente de variación. La precisión puede describirse en términos de:

3.4.2.4.1. Repetibilidad

Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, etc).

El estudio está evaluado por el coeficiente de variación de los estudios de exactitud al 100%, se analizan al menos 6 placebos cargados utilizando el método propuesto y se calcula el por ciento recuperado.

- a) Cálculos: ver anexo I.
- b) Criterio de aceptación

Coefficiente de variación $\leq 2.0\%$

3.4.2.4.2. Precisión intermedia (reproducibilidad intralaboratorio)

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio por diferentes analistas, en diferentes días, diferentes equipos, etc.

Se lleva a cabo analizando una muestra homogénea por triplicado por al menos dos analistas en dos días diferentes, utilizando un modelo anidado, de efectos aleatorios de dos factores (A: analista, D: día), el cual se representa con el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_{j(i)} + E_{k(ij)}$$

donde:

Y_{ijk} = Porcentaje cuantificado asociado a la k ésima repetición en el j ésimo día para el i ésimo analista.

μ = Cantidad de principio activo en la muestra

A_i = Efecto del analista en el porcentaje cuantificado

$D_{j(i)}$ = Efecto del j ésimo día en el i ésimo analista sobre el porcentaje cuantificado.

$E_{k(ij)}$ = Error experimental

- a) Cálculos: ver anexo I.
- b) Criterio de aceptación

C.V. $\leq 2.0\%$

Análisis de varianza

$F_{a\ cal} \leq F_{a\ teo}$

$F_{d\ cal} \leq F_{d\ teo}$

3.4.2.5. Robustez

La robustez de un método analítico es una medición de su capacidad para permanecer inafectado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método. Se evalúa a través de las pruebas de estabilidad de la muestra y tolerancia del sistema.

3.4.2.6. Estabilidad de la muestra

Es el tiempo en el cual una muestra lista para su análisis permanece sin cambio bajo condiciones dadas. Se determina cuantificando una muestra por triplicado preparada para su análisis después de un tiempo razonable, almacenada en diferentes condiciones. Se establece el tiempo y las condiciones bajo las cuales los resultados analíticos no difieren de los resultados originales.

a) Cálculos: ver anexo I.

b) Criterio

La diferencia relativa del promedio del por ciento cuantificado obtenido de las tres muestras analizadas a las diferentes condiciones con respecto al promedio de las tres muestras analizadas al tiempo cero es menor o igual a 2.0%.

3.4.2.7. Tolerancia del sistema

Es la determinación de los factores que afectan al sistema de medición. Se evalúa modificando ciertas condiciones del sistema, tales como las proporciones de los disolventes de la fase móvil, el pH, concentración de la solución amortiguadora, etc., y observando de que manera se alteran los resultados que se obtienen cuantificando una muestra homogénea por triplicado, determinando así, los puntos críticos del sistema de análisis.

a) Cálculos: ver anexo I.

b) Criterio

La diferencia relativa del promedio del por ciento cuantificado obtenido con las tres muestras analizadas en cada una de las condiciones respecto al promedio del por ciento cuantificado de las tres muestras analizadas con las condiciones originales no debe ser mayor de 2.0%.

Los productos de degradación no deben presentar respuesta en el área cromatográfica de Veraliprida y Sulfametoxazol.

3.4.2.8. Intervalo

El intervalo de un método analítico es el rango existente entre la concentración (cantidad) superior e inferior del compuesto a analizar en la muestra (incluyendo estas concentraciones), en el que se ha demostrado que el método analítico tiene un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad.

- a) Cálculos: ver anexo I (mismos de linealidad, exactitud y precisión).
- b) Criterio

El intervalo se considera apropiado si se cumple con los criterios de exactitud, linealidad y precisión.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de veraliprida en cápsulas por cromatografía de líquidos de alta resolución para el control del producto durante sus etapas de fabricación y en estudios de estabilidad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Establecer las condiciones del sistema para el análisis de veraliprida por cromatografía de líquidos de alta resolución.
2. Comprobar que las condiciones de análisis establecidas son específicas a excipientes y productos de degradación de veraliprida en cápsulas, de no ser así hacer los ajustes necesarios hasta obtener la especificidad requerida.
3. Establecer las condiciones de extracción de la veraliprida a partir de la formulación.
4. Validar el método analítico de acuerdo con los propósitos establecidos.

5. HIPÓTESIS

Al establecer las condiciones de análisis y controlar las variables que influyen en la obtención de resultados cuantitativos y específicos se podrá establecer un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificar Veraliprida en cápsulas, para el control del producto durante sus etapas de fabricación así como en estudios de estabilidad.

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.1 Equipo

- Cromatógrafo de líquidos para el desarrollo

Bomba Waters 600
Inyector Waters 712 Wisp
Detector de absorbancia Waters 486
Controlador Waters 600E
Software Millenium versión 2.15.01

- Cromatógrafo de líquidos para la especificidad

Bomba Waters 515
Inyector Waters 717 Plus
Detector de absorbancia con arreglo de fotodiodos Waters 996
Software Millenium versión 2.15.01

- Balanza analítica Mettler AE260
- Baño de ultrasonido Cole-Palmer 452E
- Potenciómetro Beckman PHI45
- Espectro infrarrojo Nicolet 205
- Espectrofotómetro ultravioleta Hewlett Packard 8452A.

6.2 Material

- Equipo de filtración Millipore
- Membranas de filtración Millipore para soluciones reguladoras tipo HVLP de 0.45 μ de tamaño de poro.
- Matraz volumétrico de 1000, 100, 50, 25 y 10 mL.
- Papel filtro Whatman No. 5
- Embudos de plástico
- Micropipeta Fisherbrand 200-1000 μ L 064503.
- Pipeta automática Eppendorf.

6.3 Reactivos

- Agua HPLC
- Metanol, Caledon HPLC
- Acetonitrilo, Caledon HPLC
- Fosfato monobásico de potasio, Mallinckrodt, RA ACS*
- Heptanosulfonato de sodio, Mallinckrodt, RA.
- Ácido fosfórico, Merck RA.
- Ácido acético glacial, J.T.Baker, RA ACS*
- Sustancias de referencia: veraliprida y sulfametoxazol.

* ACS (especificaciones de la American Chemical Society)

6.4 Parte experimental

6.4.1 Certificación de veraliprida

El primer paso en el trabajo experimental consistió en la certificación de una Sustancia de Referencia Secundaria para utilizarla durante el desarrollo y la validación del método analítico.

Para su certificación se llevaron a cabo pruebas físicas y químicas que permitieron asegurar su identidad, pureza, calidad y potencia, y así establecer su uso adecuado como Sustancia de Referencia Secundaria. Se trabajó con un lote único de Veraliprida materia prima, al cual se le realizaron diversas pruebas, entre las que pueden mencionarse el análisis por espectroscopia al infrarrojo y ultravioleta, calorimetría diferencial y determinación de solubilidad.

Los resultados de todas las pruebas realizadas para la Certificación de el Lote No. 62449-A21 de Veraliprida materia prima como Sustancia de Referencia Secundaria, se resumen en la tabla 2.

| Determinación | Especificaciones | Resultados |
|---------------------------------|---|---|
| Descripción | Polvo blanco a blanco marfil. | Cumple |
| Solubilidad | 1 parte de veraliprida soluble en: 10 partes de ácido acético al 1% 10 partes de metanol 10 partes de cloroformo | Cumple |
| Temperatura de fusión* | 123-129°C | Capilar 125-129°C Calorimetría 128.7°C |
| Espectro U.V. | Presenta: Máximo a 291 ± 2 nm Mínimo a 267 ± 2 nm | Cumple |
| Espectro I.R. | Presenta máximos de absorción a 1300, 1120, 3000 y 1650. | Cumple |
| Residuos de ignición* | No más de 0.1%. | Cumple |
| Pérdida por secado* | No más de 0.5%. | Cumple |
| Metales pesados* | No más de 20 ppm | Cumple |
| Fierro* | No más de 30 ppm. | Cumple |
| pH* | Entre 8.5 y 9.5 | 8.7 |
| Cloruros* | No más de 200 ppm. | Cumple |
| Pureza cromatográfica (por CCF) | No más de 0.5%. | Cumple |
| Valoración (Potenciométrica) | 98.0 a 102.0% | 100.4 % |

Tabla No. 2 Pruebas para la Certificación de veraliprida

* Pruebas realizadas de acuerdo a la USP XXIII.

6.4.1.1 Solubilidad:

En la Tabla 3 se presenta la solubilidad de veraliprida en distintos didisolventes a 25°C.

| Didisolvente | Solubilidad en 1 g |
|---------------------|--------------------|
| Ácido acético al 1% | 1 en 30 partes |
| Cloroformo | 1 en 10 partes |
| Metanol | 1 en 10 partes |
| Etanol | 1 en 50 partes |
| Agua | 1 en 2000 partes |

Tabla No. 3. Solubilidad de veraliprida a 25°C.

6.4.1.2 Espectro de absorción ultravioleta:

El espectro de absorción al ultravioleta de veraliprida en solución de ácido acético al 1% en el intervalo de 200 a 350 nm se presenta en la figura 11.

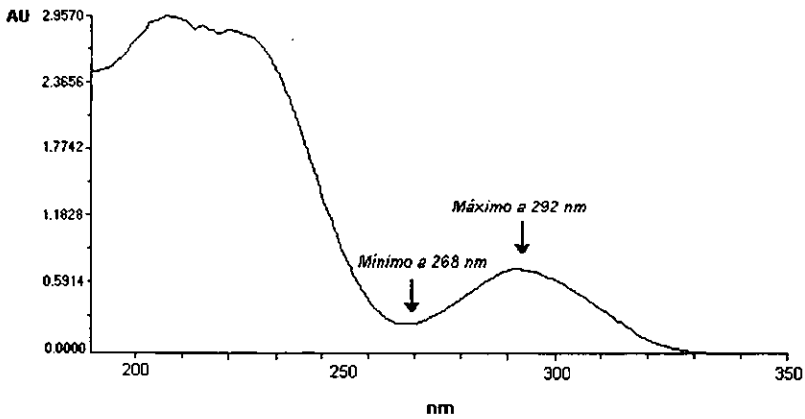


Figura No. 11 Espectro de absorción en la región ultravioleta característico de veraliprida.

6.4.1.3 Espectro de absorción al infrarrojo:

El espectro de absorción al infrarrojo de veraliprida obtenido en pastilla de bromuro de potasio al 2% en el intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} , se muestra en la figura 12. Los máximos de absorción característicos de los grupos funcionales presentes en la molécula de veraliprida son: 1278 y 1078 para éteres, 1158 y 1313 para sulfonamida, 3000 para el anillo aromático, 1638 para amida y 3325 para amina terciaria.

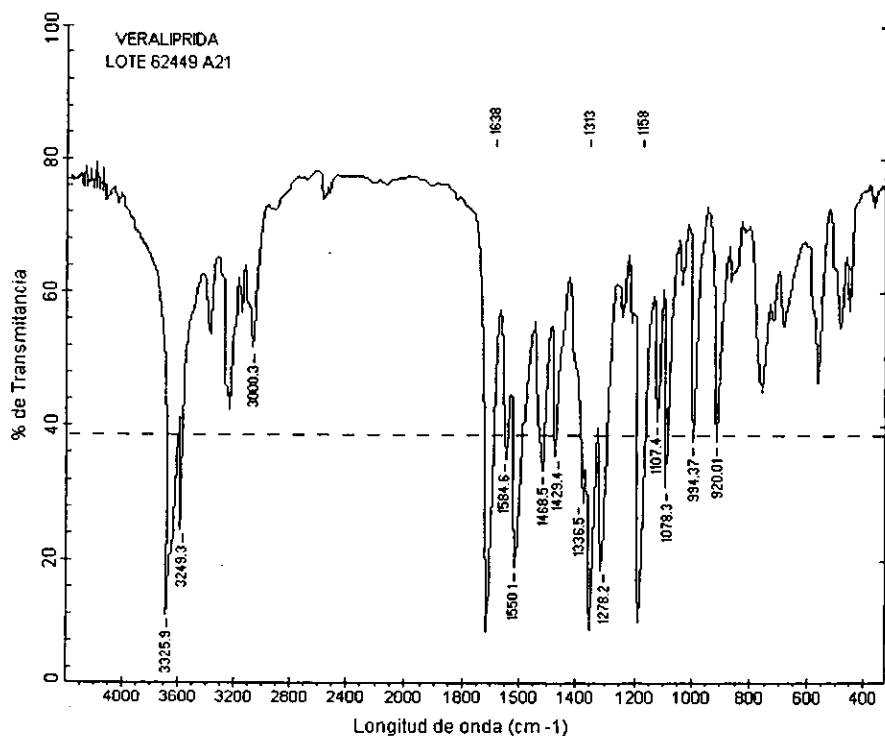


Figura No. 12 Espectro de absorción en la región infrarroja característico de veraliprida.

6.4.1.4 Calorimetría diferencial de barrido:

El termograma de veraliprida obtenido con 0.5 mg de muestra en crisol de aluminio para cerrar, en una atmósfera de nitrógeno a una velocidad de calentamiento de 10°C por minuto, se muestra en la figura 13.

No se observaron endotermas adicionales que pudieran corresponder a impurezas en la muestra.

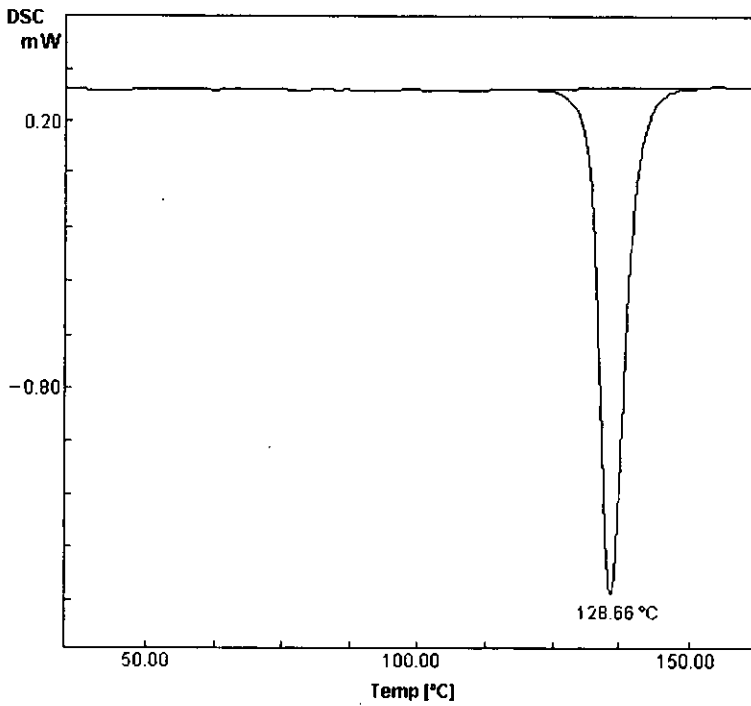


Figura No. 13 Termograma de veraliprida

6.4.2 Desarrollo del sistema CLAR de separación

El siguiente paso en el trabajo experimental consistió en establecer las condiciones del sistema por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para el análisis de veraliprida, partiendo de sistemas reportados en la literatura para el análisis por Cromatografía De líquidos de Alta Resolución de un compuesto que tiene analogía estructural con la veraliprida. El sistema cromatográfico propuesto fue el siguiente:

Fase móvil: acetonitrilo: metanol: solución buffer de fosfatos con heptanosulfonato de sodio 3.45 mM (10:10:80).

Columna: C₁₈ de 15 cm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula.

Detector: U.V.de onda fija.

Longitud de onda: 254 nm

Flujo: 1.5 mL/minuto

Volumen de inyección: 20 µL

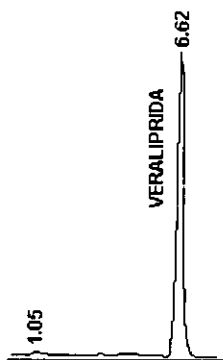


Figura No. 14 Cromatograma de veraliprida obtenido con las condiciones preliminares de trabajo.

Bajo estas condiciones de trabajo el sistema cromatográfico utilizado, tuvo adecuada precisión con una solución de veraliprida de 0.1 mg/mL, además de que la forma y el tamaño de la señal son adecuadas, como puede apreciarse en la figura 14.

6.4.3 Desarrollo del método de extracción

Con el fin de obtener un método adecuado para el tratamiento de la muestra problema, se realizaron estudios para determinar:

- a) Las condiciones óptimas de extracción de la muestra con solución de ácido acético al 1%, ya que la veraliprida es libremente soluble en este disolvente, y,
- b) Las condiciones óptimas de filtración de la muestra.

Dichos estudios llevaron a definir que para tener recobros adecuados, las mejores condiciones de extracción se obtienen empleando una solución de ácido acético al 1% y sonicando la muestra durante 15 minutos, así mismo, las condiciones óptimas de filtración se obtienen utilizando papel filtro Whatman No.5 desechando los primeros 10 mL de filtrado.

Los por cientos cuantificados bajo estas condiciones se observan en la tabla 4.

| Muestra | % Cuantificado |
|---------|----------------|
| 1 | 101.2 |
| 2 | 100.2 |
| 3 | 98.8 |
| 4 | 98.4 |
| x | = 99.7 |
| C.V. | = 1.3 |

Tabla No. 4 Resultados de extracción de veraliprida.

6.4.4 Especificidad del método

Una vez establecidas las condiciones de separación del sistema CLAR, se procedió a retar su especificidad para la cuantificación de veraliprida empleando muestras de principio activo y formulación degradadas bajo las condiciones descritas en la tabla 5.

| Degradante | Temperatura | Tiempo |
|-----------------------------------|----------------------|----------|
| NaOH 0.1M | 60 °C | 45 horas |
| HCl 0.1M | 60 °C | 45 horas |
| H ₂ O ₂ 30% | 60 °C | 45 horas |
| Luz U.V. | Temperatura ambiente | 1 semana |

Tabla No. 5 Condiciones preliminares de degradación.

Las pruebas preliminares mostraron la incapacidad del sistema cromatográfico para separar el compuesto de interés de los productos de degradación lo cual se observa claramente en la figura 15, por lo que se cambió la columna Ultrasphere C₁₈ de 4.6 mm de diámetro interno, 15 cm de longitud y 5 µm de tamaño de partícula por una columna Symmetry C₁₈ de 3.9 mm de diámetro interno, 15 cm de longitud y 5 µm de tamaño de partícula, empleando las mismas condiciones cromatográficas. Este cambio se hizo con el propósito de mejorar la eficiencia de la separación, ya que la columna Symmetry posee mayor porcentaje de fase enlazada y un diámetro interno menor que la Ultrasphere.

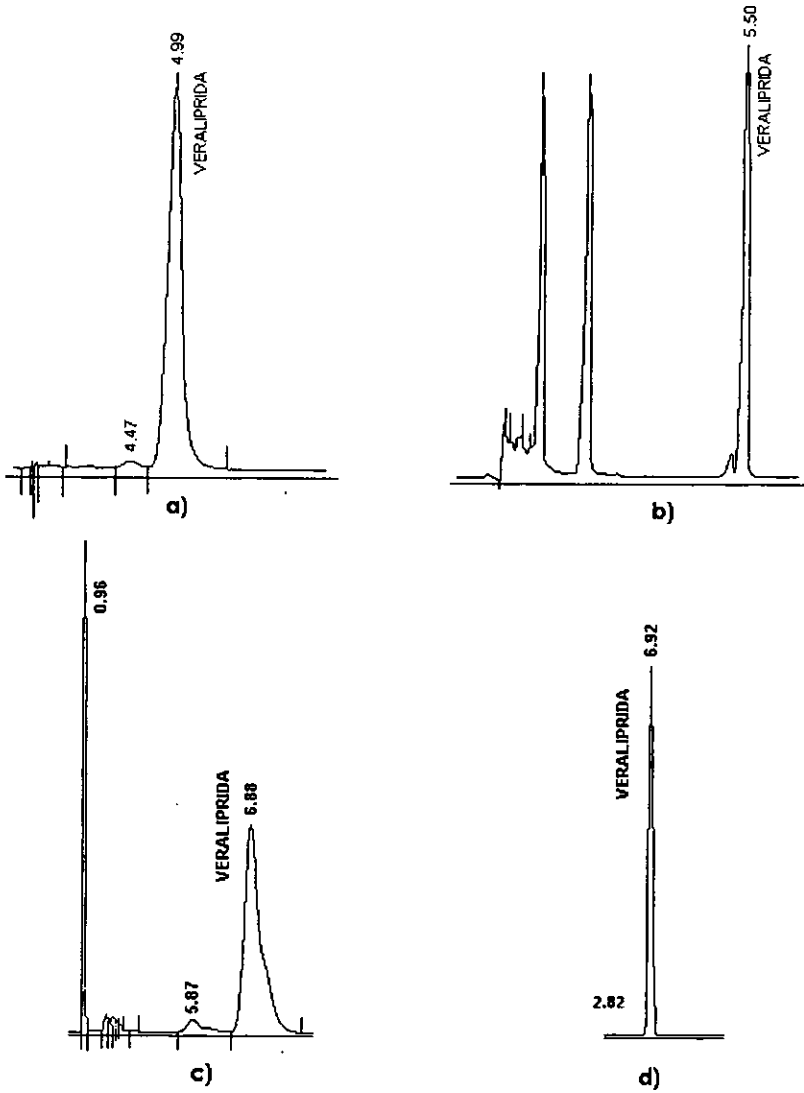


Figura No. 15 Cromatogramas de veraliprida materia prima sometida a condiciones de degradación: a) ácida, b) básica, c) oxidación y d) luz U.V.

Dado que con las condiciones preliminares de trabajo no se logra la completa resolución entre el compuesto de interés y sus productos de degradación, se propone el siguiente sistema cromatográfico:

Fase móvil: acetonitrilo: metanol: solución buffer de fosfatos con heptanosulfonato de sodio 3.45 mM (10:10:80).

Columna: Symmetry C₁₈ de 15 cm de longitud, 3.9 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula.

Detector: U.V. de onda fija.

Longitud de onda: 254 nm

Velocidad de flujo: 1.5 mL/minuto.

Volumen de inyección: 20 µL

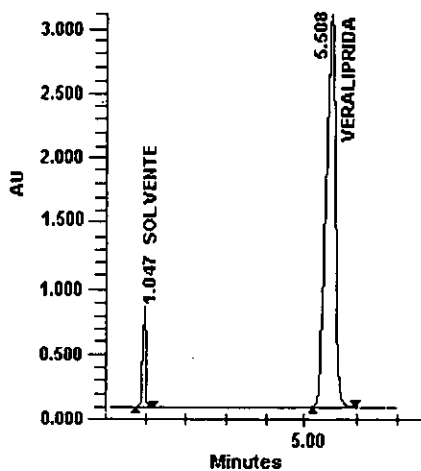


Figura No. 16 Cromatograma de veraliprida obtenida con las nuevas condiciones de trabajo.

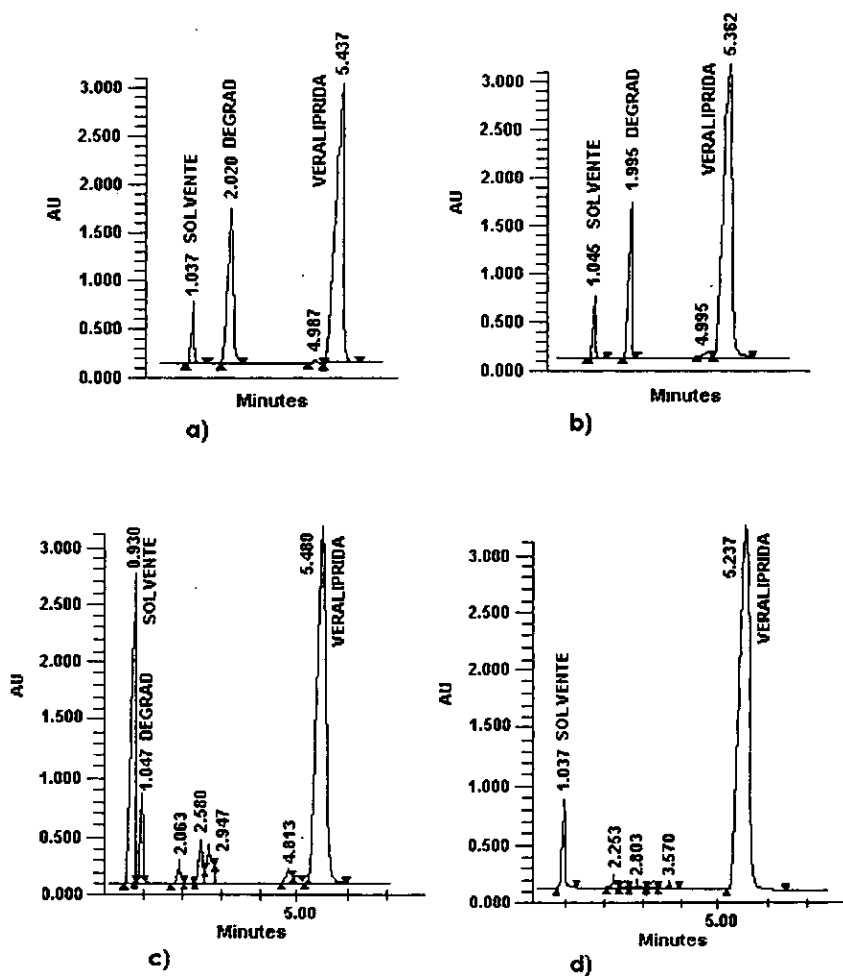


Figura No. 17 Cromatogramas de veraliprida materia prima y su productos de degradación: a) ácida, b) básica, c) oxidación y d) luz U.V.

Usando estas condiciones cromatográficas, se obtuvieron picos más simétricos y delgados, lográndose una mayor separación entre los productos de degradación y el compuesto de interés, tanto en la materia prima como en la formulación y esto se ilustra en la figura 17.

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas adecuadas, se procedió a confirmar la selectividad del método, este estudio se realizó sometiendo muestras de materia prima y formulación a condiciones de degradación controladas, para obtener aquellos productos de degradación que pudieran formarse durante el almacenamiento del producto.

Selección de las condiciones óptimas de degradación.

Se llevó a cabo analizando por duplicado muestras de veraliprida materia prima y formulación en solución acuosa, a las cuales se les adicionó un agente degradante y sometiénolas, además, a condiciones de temperatura (tabla 6). En los casos en que fue posible, se detuvo la reacción de degradación antes de realizar la cuantificación a 254 nm y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7.

| Muestra | Agente degradante | Condiciones |
|---------|-----------------------------------|------------------|
| MP y F | HCl 5N | 80°C/24 horas |
| MP y F | NaOH 5N | 80°C/31/2 horas |
| MP y F | H ₂ O ₂ 30% | 80°C/3 horas |
| MP y F | Luz U.V. | T.amb./5 semanas |

Tabla No. 6 Condiciones finales de degradación.

MP = Materia prima
F = Formulación

| Muestra | Agente degradante | % degradado | |
|---------------|-----------------------------------|-------------|------|
| | | 1 | 2 |
| Formulación | HCl 5N | 29.6 | 25.8 |
| | NaOH 5N | 25.4 | 23.6 |
| | H ₂ O ₂ 30% | 26.7 | 30.8 |
| | Luz U.V. | 18.4 | 16.9 |
| Materia Prima | HCl 5N | 27.2 | 27.3 |
| | NaOH 5N | 27.1 | 27.5 |
| | H ₂ O ₂ 30% | 33.1 | 34.6 |
| | Luz U.V. | 20.8 | 22.2 |

Tabla No. 7 Porcentaje de degradación de muestras independientes de veraliprida sometidas a condiciones de degradación.

Análisis espectral

Para obtener la pureza cromatográfica, se realizó el análisis espectral del pico correspondiente a veraliprida, en cada una de las muestras degradadas. Los espectros U.V. fueron tomados a diferentes tiempos de elución y distribuidos a lo largo de todo el pico de interés.

Se compararon los espectros obtenidos con el espectro de veraliprida sustancia de referencia secundaria (obtenido bajo las mismas condiciones de análisis cromatográfico), sobreponiendo los espectros para comparar los contornos y establecer así, la existencia de diferencias o si el pico cromatográfico es monocomponente (puro) y si corresponde a veraliprida.

6.4.5 Selección del estándar interno (SI)

Con el propósito de optimizar la precisión en la cuantificación en métodos por cromatografía de líquidos de alta resolución, se recurre frecuentemente al empleo de una sustancia patrón de referencia interna, que debe reunir las siguientes características: ⁽¹⁰⁾

- a. Similar estructuralmente al compuesto de interés
- b. Poseer un tiempo de retención cercano al del compuesto de interés sin interferir con éste.
- c. No formar parte de la muestra
- d. Ser estable a las condiciones de trabajo
- e. No interferir con los productos de degradación del compuesto de interés cuando se trate de un método indicativo de estabilidad.

El uso de un estándar interno hace al método más preciso, menos susceptible a errores técnicos y compensa algunas fallas que hayan ocurrido durante los pasos de aislamiento y preparación de la muestra, tales como errores aleatorios asociados a la toma de muestras, alicuotas y las debidas a variaciones instrumentales, todo ello en virtud de que cantidad de fármaco y el patrón interno se conservan en una proporción constante durante todos los pasos de la preparación de la muestra para el análisis, y el valor de ésta proporción es el que se utiliza con fines de cuantificación.

Debido a que existen una gran variedad de compuestos que se pueden evaluar y cumplen con las características requeridas para ser empleados como estándares internos, se consideró el siguiente criterio para elegir a aquellos compuestos que pudieran servir como estándar interno:

- 1) sustancias similares en estructura al compuesto de interés, y,
- 2) sustancias que se analizan bajo condiciones similares de fase móvil.

Las sustancias evaluadas para ser utilizadas como estándar interno, se presentan en la tabla 8.

| Sustancia | Tiempo de retención |
|---------------------|---------------------|
| Hidroclorotiazida | 2.49 |
| Metilparabeno | 15.41 |
| Metronidazol | 1.91 |
| Acetaminofen | 1.84 |
| Sulfametoxazol | 9.52 |
| Quinidina gluconato | 14.86 |
| Cimetidina | 2.32 |
| Sulpirida | 2.67 |
| Trimetoprim | 8.17 |

Tabla No. 8 Sustancias de prueba para elegir estándar interno.

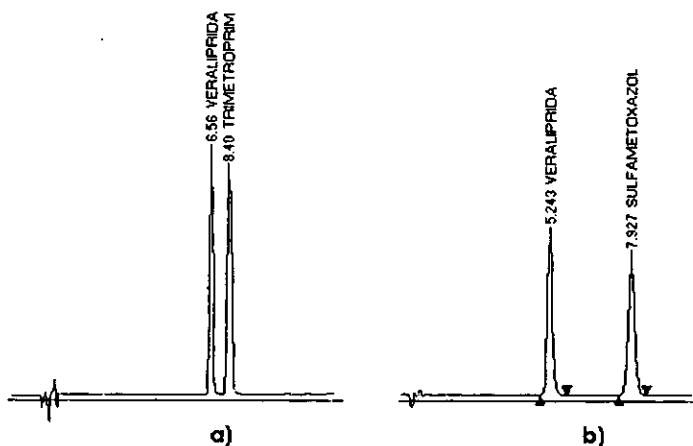


Figura No. 18 Cromatogramas de veraliprida con trimetoprim (a) y sulfametoxazol (b).

La sustancia a emplear como estándar interno tenía que cumplir además con los siguientes requisitos:

- Absorber significativamente a 254 nm.
- Presentar un tiempo de retención de 8-10 minutos, para evitar la sobreposición de su señal con la del compuesto de interés o sus productos de degradación.

De entre todos los compuestos probados, los que presentaron un tiempo de retención entre 8 y 10 minutos y que además presentaron una señal adecuada y una absorción significativa a 254 nm, fueron trimetoprim y sulfametoxazol (figura 18). Se eligió al sulfametoxazol como estándar interno, ya que presenta mayor absorción al U.V. que el trimetoprim por lo cual se requiere menor cantidad para su preparación, y además presenta mayor resolución con respecto a la veraliprida con lo cual se evitarían problemas de resolución si la columna perdiese eficiencia.

6.5 Método analítico propuesto

6.5.1 Sustancias de referencia

- Veraliprida SR, clave No. ER046, No. de análisis ER99007. Secar durante 2 horas a 105°C.
- Sulfametoxazol SR, clave No. ER125, No. de análisis ER99009. Usar sin secar.

6.5.2 Reactivos

- Heptanosulfonato de sodio, OR, Mallinckrodt. Lote No.3565-SS
- Fosfato monobásico de potasio, RA, Mallinckrodt. Lote No. 7100KTHD.
- Acetonitrilo, HPLC, Caledon. Lote 30347.
- Metanol, HPLC, Caledon. Lote 29702.
- Ácido fosfórico, RA, Merck. Lote No. K23841773 715
- Ácido acético glacial, RA ACS, J.T.Baker. Lote No. K27483 y J42481.
- Ácido clorhídrico, RA, Merck. Lote No. K25039614 814
- Hidróxido de sodio, RA, Mallinckrodt. Lote No. 7708 KPTC
- Peróxido de hidrógeno, RA, Merck. Lote No. K24864410 820
- Agua, HPLC. Varios lotes.

6.5.3 Soluciones

Fase móvil

Mezclar 400 mL de una solución de fosfato monobásico de potasio y heptanosulfonato de sodio con 50 mL de metanol y 50 mL de acetonitrilo, previamente mezclados. Ajustar el pH de la solución final a 3.3 con ácido fosfórico. Filtrar y degasificar la solución con vacío y agitación magnética.

6.5.4 Formulaciones

- Cápsulas de veraliprida de 100 mg. Lote No. 901025.
- Veraliprida formulación placebo. Lote No. 990044.

6.5.5 Equipo

Equipo cromatografico para realizar, linealidad y precisión del sistema; exactitud y linealidad del método; especificidad a productos de degradación y tolerancia del sistema:

- Inyector automático marca Waters modelo 717 plus, No. de serie F9771P-618M, clave INY014.
- Detector de absorbancia con arreglo de fotodiodos marca Waters modelo 996, No. de serie G97996815M, clave DAF002.
- Bomba de flujo constante marca Waters modelo 515, No. de serie F97515738M, clave BMB017.
- Programa de procesamiento de datos Millenium versión 2.15.01

Equipo cromatográfico para realizar precisión intermedia y estabilidad de la muestra:

- Inyector marca Waters modelo 712 WISP, No. de serie 712-004146, clave INYO06.
- Detector de absorbancia marca Waters modelo 486, No. de serie 486-PRC452, clave DPL010.
- Programa de procesamiento de datos Millenium versión 2.15.01.
- Controlador marca Waters modelo 600E, No. de serie 6PLEPG257, clave CTL002.
- Bomba marca Waters modelo 600, No. de serie 600PF4661, clave BMB015.

Equipo cromatográfico para realizar especificidad a excipientes:

- Detector de absorbancia marca Waters modelo 440, No. de serie 440-011642, clave DAB002.
- Bomba marca Waters modelo 510, No. de serie 510-141582, clave BMB011.
- Controlador marca Waters modelo 600E, No. de serie 6PLEPC220, clave CTL003.
- Inyector marca Waters modelo 700 WISP, No. de serie 71S-000732, clave SAT001.
- Integrador marca Beckman modelo 427, No. de serie 075/20174, clave INT001.
- Columna cromatográfica C₁₈ Symmetry, No. de serie T71571NO1, clave CA9801; de 15 cm de longitud, 3.9 mm de diámetro interno y partículas de 5 µm.

- Columna cromatográfica C₁₈ Symmetry, No. de serie T71541026, clave CA19753; de 15 cm de longitud, 3.9 mm de diámetro interno y partículas de 5 µm.

Potenciómetro marca Beckman modelo PHI45, No. de serie 166001, clave POT004.

Balanza analítica marca Mettler modelo AE260, No. de serie H97799, clave BAL050.

Horno de vacío marca Precision modelo 19, No. de serie 29AU-9, clave HOR005.

Horno programable marca Fisher Scientific modelo 838F, No. de serie 40400060, clave HOR007.

6.5.6 Preparación de la solución de estándar interno(SI)

Preparar una solución de sulfametoxazol en metanol-ácido acético 1% (50:50), a una concentración final de 6.25 mg/mL.

6.5.7 Preparación de la solución de referencia (SR)

Preparar una solución de veraliprida sustancia de referencia y sulfametoxazol sustancia de referencia en solución de ácido acético al 1%, a una concentración final de 0.1 mg/mL y 0.025 mg/mL, respectivamente.

6.5.8 Preparación de las muestras para la valoración (SM)

Obtener el peso neto de 20 cápsulas y mezclar perfectamente su contenido, tomar el equivalente a 100 mg de veraliprida y adicionar una cantidad adecuada de solución de estándar interno, extraer el principio activo con ácido acético al 1%, y diluir la solución hasta obtener una concentración final de 0.1 mg/mL de veraliprida y 0.025mg/mL de sulfametoxazol.

6.5.9 Sistema cromatográfico

Fase móvil: acetonitrilo: metanol: solución buffer de fosfatos con heptanosulfonato de sodio 3.45 mM (10:10:80)

Columna: Symmetry C₁₈ de 15 cm de longitud, 3.9 cm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula.

Detector: U.V.

Longitud de onda: 254 nm.

Velocidad de flujo: 1.5 mL/minuto.

Volumen de inyección: 20 μ L.

Modo de integración: áreas

Respuesta: área relativa (área de veraliprida/área de sulfametoxazol).

6.5.10 Adecuación del sistema ⁽¹²⁾

Las pruebas de aptitud del sistema son una parte integral de los métodos de cromatografía líquida. Se emplean para comprobar que la resolución y la reproducibilidad del sistema cromatográfico son aptas para realizar el análisis. Las pruebas se basan en el concepto de que el equipo, la electrónica, las operaciones analíticas y las muestras a analizar constituyen un sistema integral que puede evaluarse como tal.

La resolución, R_s , es función de la eficiencia de la columna, N , y se especifica para asegurar que los compuestos que eluyen muy cercanos se resuelvan entre sí, para establecer el poder de resolución general del sistema, y para asegurar que los estándares internos se resuelvan del compuesto de interés.

Las inyecciones repetidas de una preparación estándar empleada en la valoración u otra solución estándar se comparan para evaluar si se reúnen los requisitos para la precisión. Se emplean los datos de cinco inyecciones repetidas del compuesto de interés para calcular la desviación estándar relativa, si el requisito es 2.0% o menor.

Las inyecciones repetidas de la preparación estándar requeridas para demostrar que la precisión del sistema es apta pueden hacerse antes de inyectar las muestras o intercalarse entre las inyecciones de las muestras.

Se considera que el sistema cromatográfico es adecuado cuando el coeficiente de variación de la respuesta de veraliprida de cinco inyecciones consecutivas de la SR es menor de 2.0% y la resolución entre veraliprida y sulfametoxazol no es menor de 5.

7. Validación

7.1 Sistema

7.1.1 Linealidad

Se evaluó la linealidad al determinar la relación que existe entre la concentración "x" y la respuesta "y", al preparar una curva de calibración con 5 niveles y 3 réplicas por nivel de concentración a partir de pesadas independientes, en el intervalo de 0.050 a 0.150 mg/mL de lo propuesto en el método analítico. Con los datos obtenidos se evaluó lo siguiente: la ecuación de la recta mediante un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, la ordenada al origen (A) y su intervalo de confianza al 95%, la pendiente (B), el coeficiente de determinación (r^2) con su respectiva gráfica y el número de datos (n), coeficiente de variación (C.V.), promedio y desviación estándar (D.E.) del factor respuesta para cada nivel probado.

7.1.2 Precisión

Se determinó al inyectar seis veces una solución al 100% de la concentración teórica. Con la respuesta de las seis inyecciones, se obtuvo el número de datos (n), promedio, desviación estándar (D.E.) y coeficiente de variación (C.V.).

7.2 Método

7.2.1 Especificidad

7.2.1.1 Productos de degradación

Se determinó mediante el análisis en el intervalo de 200 a 400 nm, por duplicado de muestras de materia prima y placebos adicionados al nivel de 100%, sometidas a condiciones de degradación por hidrólisis ácida, hidrólisis básica, oxidación y fotólisis (Tabla 6). Tanto para materia prima como para los placebos adicionados se registraron las señales producidas a la longitud de onda de 254 nm, se obtuvo el por ciento degradado para cada una de las muestras y se realizó un análisis de índice espectral y análisis de pureza de la señal de veraliprida.

7.2.1.2 Excipientes

Se evaluó al analizar cuatro muestras independientes de formulación placebo al 100% de lo especificado en el método analítico, se determinó que los componentes de la formulación placebo que no presentaran señales que interfirieran con las señales correspondientes a veraliprida y sulfametoxazol.

7.2.2 Exactitud

Se evaluó al analizar por sextuplicado placebos adicionados al nivel de 100% preparados de forma independiente. Se determinó el número de datos (n), promedio, desviación estándar (D.E.), coeficiente de variación (C.V.) e intervalo de confianza al 95% para el por ciento recuperado de las 6 muestras analizadas.

7.2.3 Linealidad

Se evaluó a través del análisis por triplicado de muestras independientes de placebos adicionados de veraliprida a los niveles de 50, 100 y 150% de la cantidad seleccionada como 100%. Se prepararon tres réplicas por cada nivel. Con los datos obtenidos de mg adicionados como "x" y mg recuperados como "y" se determinó: la ecuación de la recta mediante un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, la pendiente (B) y su intervalo de confianza al 95%, la ordenada al origen (A) y su intervalo de confianza al 95%, el coeficiente de determinación (r^2) y la gráfica; el número de datos (n), promedio, desviación estándar (D.E.) y coeficiente de variación (C.V.) del por ciento recuperado a cada nivel probado y el número de datos (n), promedio, desviación estándar (D.E.), coeficiente de variación (C.V.) e intervalo de confianza al 95% para el por ciento recuperado global.

7.2.4 Precisión

7.2.4.1 Repetibilidad

Se evaluó con el coeficiente de variación de los por cientos recuperados de los datos obtenidos en la prueba de exactitud.

7.2.4.2 Precisión intermedia (reproducibilidad intralaboratorio)

Se determinó del análisis por triplicado de una muestra homogénea de producto por dos analistas en dos días diferentes, empleando un modelo anidado. Con el por ciento cuantificado de veraliprida en la muestra se obtuvo el coeficiente de variación global y adicionalmente se hizo un análisis de varianza.

7.2.5 Estabilidad de la muestra

Se evaluó mediante el análisis con el método propuesto de las muestras preparadas para la precisión intermedia por el analista 1 en el día 1, almacenadas a temperatura ambiente y refrigeración y analizadas a las 24, 48 y 72 horas de haber sido preparadas y utilizando una solución de referencia recién preparada a cada tiempo de análisis.

Con los datos obtenidos se calculó el promedio del por ciento cuantificado para las muestras almacenadas en cada condición y tiempo de almacenamiento y se comparó con el promedio del por ciento cuantificado al tiempo cero.

7.2.6 Tolerancia del sistema

Se determinó por el análisis por triplicado de una muestra homogénea de producto y de las muestras de placebos adicionados sometidas a degradación ácida, básica y por oxidación, analizadas en las condiciones descritas en la tabla 9:

| CONDICION No. | COMPOSICIÓN DE LA FASE MOVIL | pH DE LA FASE MÓVIL | COLUMNA | Concentración (mM)del Contraión |
|---------------|-------------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| 1 | ACN:MEOH:BUFFER (10:10:80) | 3.1 | Symmetry C18 | 3.00 |
| 2* | ACN:MEOH:BUFFER (10:10:80) | 3.3 | Symmetry C18 | 3.45 |
| 3 | ACN:MEOH:BUFFER (10:10:80) | 3.5 | Symmetry C18 | 4.00 |
| 4 | ACN:MEOH:BUFFER (10:10:80) | 3.3 | Symmetry C18 (Dif. Columna) | 3.45 |
| 5 | ACN:MEOH:BUFFER (12:12:76) | 3.3 | Symmetry C18 | 3.45 |
| 6 | ACN:MEOH:BUFFER (8:8:84) | 3.3 | Symmetry C18 | 3.45 |

Tabla No. 9 Cambios realizados para realizar la tolerancia del sistema.

* Condiciones originales.

ACN = Acetonitrilo
MEOH = Metanol
BUFFER = Solución reguladora de fosfatos 0.5M

Se obtuvo el promedio del por ciento cuantificado para las muestras, en cada una de las condiciones probadas y se compararon con el promedio del por ciento cuantificado de las muestras analizadas en las condiciones originales. Por otro lado con las muestras degradadas se verificó que no presentaran señales que interfirieran con el tiempo de retención de la veraliprida y sulfametoxazol.

8. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

8.1 Sistema

8.1.1 Linealidad

| Nivel % | Concentración (mg/mL) | Respuesta (Área Relativa) | Factor Respuesta |
|----------|-----------------------|---------------------------|------------------|
| 50 | 0.0500 | 0.4663 | 9.326 |
| 50 | 0.0500 | 0.4725 | 9.450 |
| 50 | 0.0500 | 0.4677 | 9.354 |
| 75 | 0.0750 | 0.6981 | 9.308 |
| 75 | 0.0750 | 0.7045 | 9.393 |
| 75 | 0.0750 | 0.7016 | 9.355 |
| 100 | 0.1000 | 0.9195 | 9.195 |
| 100 | 0.1000 | 0.9359 | 9.359 |
| 100 | 0.1000 | 0.9386 | 9.386 |
| 125 | 0.1250 | 1.1596 | 9.277 |
| 125 | 0.1250 | 1.1733 | 9.386 |
| 125 | 0.1250 | 1.1634 | 9.307 |
| 150 | 0.1500 | 1.3953 | 9.302 |
| 150 | 0.1500 | 1.4070 | 9.380 |
| 150 | 0.1500 | 1.4101 | 9.401 |
| n | = | | 15 |
| Promedio | = | | 9.345 |
| D.E. | = | | 0.062 |
| % C.V. | = | | 0.7 |

Tabla No. 10 Respuesta de veraliprida en todos los niveles.

Ecuación de la recta

$$y = 9.3385 x + 0.0004$$

$$r^2 = 0.9998$$

Intervalo de confianza al 95% g.l = 13 para la ordenada al origen

Límite superior 0.0028
 Límite inferior -0.0022

LINEALIDAD DE SISTEMA PARA VERALIPRIDA

$$y = 9.3385x + 0.0004, \quad r^2 = 0.9998$$

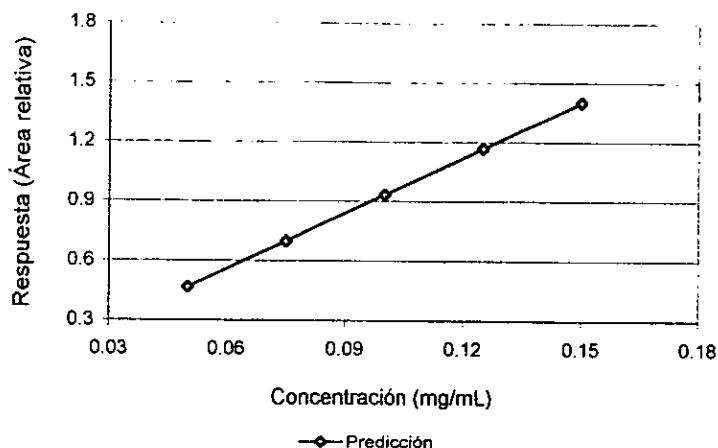


Figura No. 19 Gráfica de linealidad del sistema.

En la tabla 10 se presentan los datos con los que se realizó el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados utilizando como variable independiente (x) a la concentración y como variable dependiente (y) a la respuesta, se presenta la ecuación de la recta y los resultados estadísticos donde se observa que el coeficiente de determinación (r^2) es mayor a 0.98 y la ordenada al origen no es significativamente diferente de cero, ya que el intervalo de confianza al 95% incluye al cero. En la figura 19 se muestra la gráfica de esta relación donde se observa que existe una relación lineal entre la concentración y la respuesta obtenida.

En la misma tabla 10 se presentan los resultados de la precisión del factor respuesta obtenido en el estudio de linealidad donde se observa que el coeficiente de variación global es menor a 2.0%.

Debido a que el coeficiente de determinación es mayor a 0.98 y que el coeficiente de variación del factor respuesta es menor de 2.0%, se considera que el sistema es lineal en el intervalo de 0.050 a 0.150 mg/mL de veraliprida.

Se cumple con los criterios para la evaluación de la linealidad del sistema puesto que se demostró que las respuestas obtenidas son función de la concentración y se describen por la ecuación de la recta $y = mx + b$ ($y = 9.3385x + 0.0004$), la desviación de los datos alrededor de la recta de regresión ajustado no es significativa; el intercepto no es significativamente diferente de cero y el coeficiente de determinación es cercano a uno (0.9998), por lo tanto el comportamiento del sistema es lineal, en el intervalo de concentraciones trabajado.

8.1.2 Precisión

| Réplica No. | Concentración (mg/mL) | Respuesta (área relativa) |
|-------------|-----------------------|---------------------------|
| 1 | 0.100 | 0.9132 |
| 2 | 0.100 | 0.9145 |
| 3 | 0.100 | 0.9165 |
| 4 | 0.100 | 0.9152 |
| 5 | 0.100 | 0.9139 |
| 6 | 0.100 | 0.9145 |
| n | = | 6 |
| Promedio | = | 0.9146 |
| D.E. | = | 1.134^{-3} |
| % C.V. | = | 0.1 |

Tabla No. 11 Respuestas para la precisión del sistema.

En la tabla 11 se presentan los resultados obtenidos para la precisión del sistema, en donde puede observarse que el coeficiente de variación de la respuesta de las seis inyecciones es menor a 2.0%, lo cual indica que el sistema tiene una precisión adecuada.

Se cumple con los requisitos establecidos para considerar que el sistema es preciso, ya que el coeficiente de variación de las respuestas obtenidas (0.1%) es menor a 2.0%.

8.2 Método

8.2.1 Especificidad

8.2.1.1 Productos de degradación

| Muestra | Agente degradante | Réplica | Por ciento degradado |
|--------------------|-----------------------|---------|-----------------------------------|
| Materia prima | Acido clorhídrico | 1 | 17.1 |
| | | 2 | 16.2 |
| | Hidróxido de sodio | 1 | 18.6 |
| | | 2 | 17.7 |
| | Peróxido de hidrógeno | 1 | 22.4 |
| | | 2 | 23.5 |
| | Luz U.V. | 1 | No hay degradación significativa. |
| | | 2 | No hay degradación significativa. |
| Placebo adicionado | Acido clorhídrico | 1 | 15.1 |
| | | 2 | 16.3 |
| | Hidróxido de sodio | 1 | 14.7 |
| | | 2 | 14.7 |
| | Oxidación | 1 | 13.7 |
| | | 2 | 12.3 |
| | Luz U.V. | 1 | No hay degradación significativa. |
| | | 2 | No hay degradación significativa. |

Tabla No. 12 Porcentajes de degradación de veraliprida materia prima y formulación.

En la tabla 12 se presentan los por cientos degradados para cada una de las muestras de materia prima y placebos adicionados sometidas a degradación de acuerdo a lo indicado en la tabla 6, los cuales se encuentran en el intervalo de 10 a 30% y no se observan diferencias significativas entre las réplicas de cada condición, lo cual nos asegura que el porcentaje degradado no es obra de la casualidad sino específicamente de la ruta de degradación correspondiente.

La especificidad del método analítico desarrollado fue tal vez el objetivo más importante por alcanzar, ya que esta es la capacidad del método para proveer una respuesta que se deba exclusivamente al compuesto de interés lo que conlleva a que el método pueda ser utilizado durante estudios de estabilidad. Para evaluar dicha especificidad se demostró la pureza cromatográfica de la señal correspondiente a veraliprida, de dos formas diferentes: La primera de ellas consistió en hacer un análisis espectral, en el cual se realizaron cortes a distintos tiempos de elución sobre el pico eluido y sobreponiendo los espectros de absorción U.V. correspondientes a cada uno de estos cortes. El criterio tomado

para considerar al pico puro, fue que la sobreposición de los espectros U.V. de absorción fuera completa, es decir, que no se observaran discrepancias en la sobreposición de los espectros de absorción debidas a la presencia de contaminantes.

La segunda forma de demostrar la pureza cromatográfica de la señal de veraliprida se llevó a cabo mediante la sobreposición del espectro de absorción obtenido a partir del pico eluido y el espectro de absorción de la Sustancia de Referencia Secundaria, tomando como criterio que el espectro de absorción obtenido a partir del pico eluido debía corresponder sin diferencia alguna al espectro de absorción de la sustancia de referencia secundaria.

Se muestra en primer término en las figuras 20 y 21 el análisis del pico cromatográfico de veraliprida contenida en las muestras sometidas a degradación para materia prima y formulación, respectivamente. En la parte inferior puede observarse el cromatograma con la selección de diferentes tiempos de elución, de los cuales se obtuvo el espectro de absorción en el intervalo de longitudes de onda de 200-600nm, la sobreposición de dichos espectros se encuentra en la parte superior de la figura donde se observa que no hay distorsión en el contorno espectral U.V. de la veraliprida.

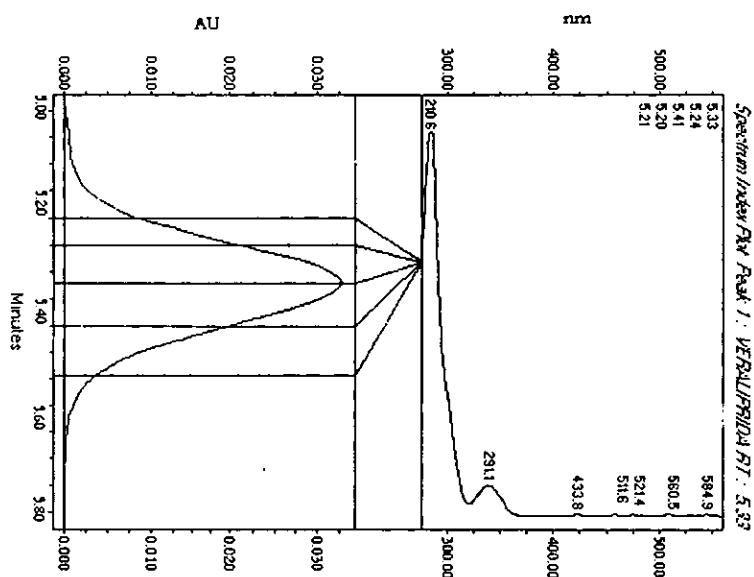


Figura No. 20 Análisis espectral del cromatograma de veraliprida materia prima sometida a condiciones de degradación por oxidación.

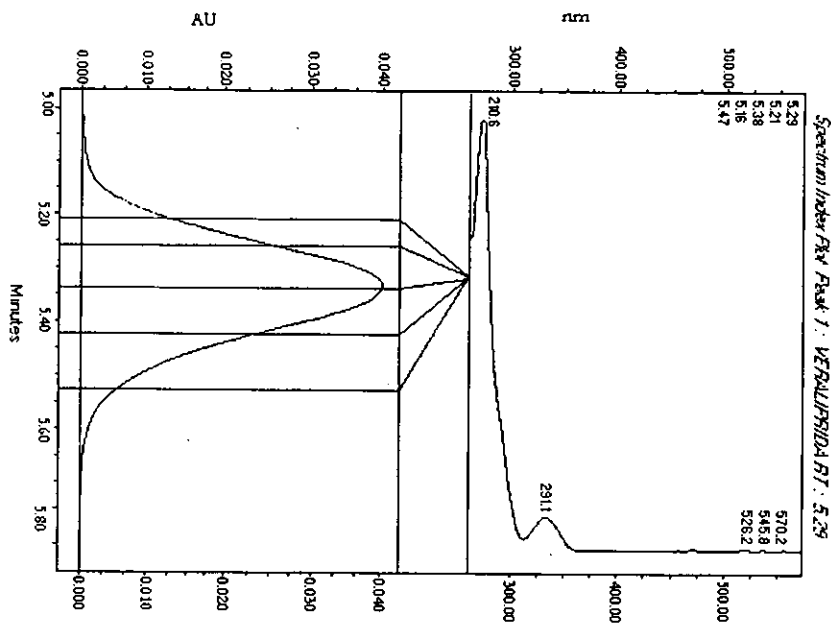


Figura No. 21 Análisis espectral del cromatograma de veraliprida en la formulación sometida a condiciones de degradación por oxidación.

Las muestras de materia prima y formulación sometidas a las condiciones de degradación por hidrólisis básica, hidrólisis ácida y fotólisis presentan igual análisis espectral.

En segundo lugar se llevó a cabo la comparación de los espectros de veraliprida sustancia de referencia secundaria y un espectro de las muestras sometidas a cada una de las condiciones de degradación. En las figuras 22 y 23 se muestra esta comparación para las muestras degradadas en condiciones de oxidación.

Las muestras de materia prima y formulación sometidas a las condiciones de degradación por hidrólisis ácida, hidrólisis básica y fotólisis presentan igual sobreposición de espectros con la sustancia de referencia secundaria de veraliprida.

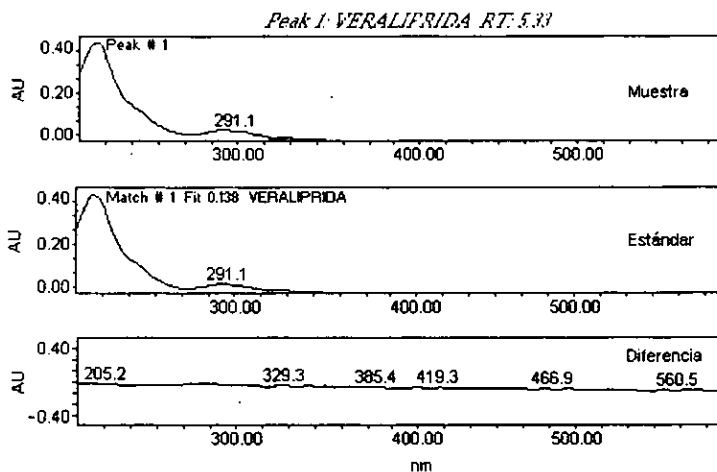


Figura No. 22 Comparación de los espectros de veraliprida sustancia patrón de referencia secundaria y materia prima sometida a degradación oxidativa.

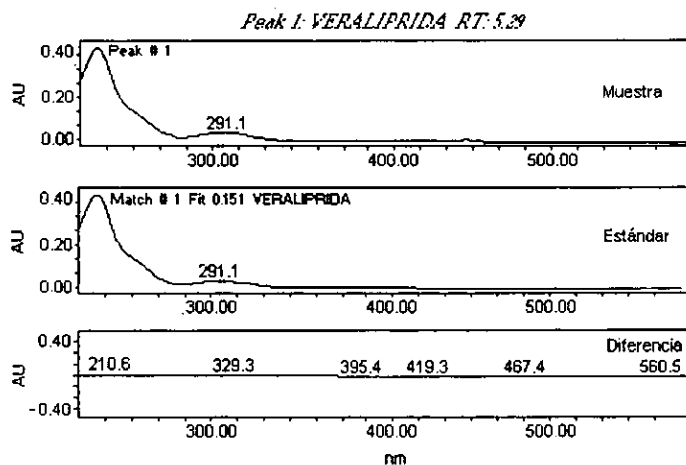


Figura No. 23 Comparación de los espectros de veraliprida sustancia patrón de referencia secundaria y en la formulación sometida a degradación oxidativa.

En el análisis espectral de los picos de veraliprida sometida a las diferentes condiciones de degradación: hidrólisis ácida, hidrólisis básica, oxidación y fotólisis (luz ultravioleta), no se encontraron señales atribuibles a la presencia de otro compuesto ya que los espectros sobrepuestos, tomados a diferentes tiempos de elución fueron iguales. Además se observó la identidad espectral entre veraliprida sustancia patrón de referencia secundaria y veraliprida materia prima y formulación sometidas a reacciones de degradación. Por lo cual se puede asegurar que el método analítico propuesto es específico a la cuantificación de veraliprida en presencia de productos de degradación.

8.2.1.2 Excipientes

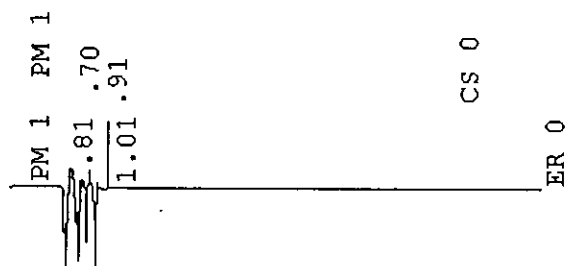


Figura No. 24 Especificidad a excipientes.

En la figura 24 se muestran los cromatogramas de la especificidad a excipientes donde se observa que no existe señal por parte de éstos que interfiera con veraliprida y sulfametoxazol por lo que el método propuesto es específico a la cuantificación de veraliprida en presencia de los excipientes.

8.2.2 Exactitud y repetibilidad

| Réplica No. | mg adicionados | % recuperado |
|-------------|----------------|--------------|
| 1 | 100.0 | 100.4 |
| 2 | 100.0 | 100.1 |
| 3 | 100.0 | 100.4 |
| 4 | 100.0 | 101.0 |
| 5 | 100.0 | 100.4 |
| 6 | 100.0 | 101.2 |
| n | = | 6 |
| Promedio | = | 100.6 |
| D.E. | = | 0.4215 |
| % C.V. | = | 0.4 |

Tabla No. 13 Resultados de exactitud y repetibilidad al 100 %.

Intervalo de confianza al 95% n-1 g.l.

| | | |
|-----------------|---|-------|
| Límite superior | = | 100.9 |
| Límite inferior | = | 100.3 |

Los por cientos recuperados de las seis muestras analizadas se presentan en la tabla 13. Se observa que el promedio del por ciento recuperado y su intervalo de confianza al 95% se encuentra dentro del intervalo de 98.0 a 102.0%, lo cual indica que no se obtendrá un error mayor al 2.0% en cualquier determinación y por lo tanto el método presenta una exactitud adecuada.

8.2.3 Linealidad

| Nivel % | mg adicionados | mg recuperados |
|---------|----------------|----------------|
| 50 | 50.0 | 50.4 |
| | 50.0 | 50.0 |
| | 50.0 | 50.1 |
| 100 | 100.0 | 100.4 |
| | 100.0 | 99.3 |
| | 100.0 | 99.9 |
| 150 | 150.0 | 150.5 |
| | 150.0 | 149.7 |
| | 150.0 | 149.7 |

Tabla No. 14 Miligramos cuantificados de veraliprida en todos los niveles.

Ecuación de la recta

$$y = 0.998x + 0.2$$

$$r^2 = 0.9999$$

Intervalo de confianza al 95% g.l.= 7 para la pendiente y la ordenada al origen.

| | Ordenada al origen | Pendiente |
|-----------------|--------------------|-----------|
| Límite superior | 0.8918 | 1.0044 |
| Límite inferior | -0.5991 | 0.9916 |

Por ciento recuperado de veraliprida en cada nivel.

| % Recuperado | | | | |
|---------------|--------|--------|--------|--------|
| Nivel/Réplica | 50 | 100 | 150 | Global |
| 1 | 100.8 | 100.4 | 100.3 | |
| 2 | 100.0 | 99.3 | 99.8 | |
| 3 | 100.2 | 99.9 | 99.8 | |
| n = | 3 | 3 | 3 | 9 |
| Promedio = | 100.3 | 99.9 | 100.0 | 100.1 |
| D.E. = | 0.4163 | 0.5508 | 0.2887 | 0.4304 |
| % C.V. = | 0.4 | 0.6 | 0.3 | 0.4 |

Tabla No. 15 Porcentajes recuperados de veraliprida en todos los niveles.

Intervalo de confianza al 95% g.l.=7 para el promedio global.

| | |
|-----------------|---------|
| Límite superior | 100.4 % |
| Límite inferior | 99.8 % |

En la tabla 14 se muestran los datos utilizados para el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados utilizando como variable independiente (x) a los mg adicionados y como variable dependiente (y) a los mg recuperados, en la misma tabla se puede observar que el coeficiente de determinación (r^2) es mayor a 0.98, que la pendiente y la ordenada al origen no son significativamente diferentes de 1 y 0, ya que los intervalos de confianza al 95% incluyen al uno y cero, respectivamente y que el promedio del por ciento recuperado y su intervalo de confianza al 95% están en el intervalo de 98.0 a 102.0%. Lo anterior indica que no se tiene un error mayor al \pm 2.0%.

LINEALIDAD DE MÉTODO PARA VERALIPRIDA

$$y = 0.998x + 0.2, \quad r^2 = 0.9999$$

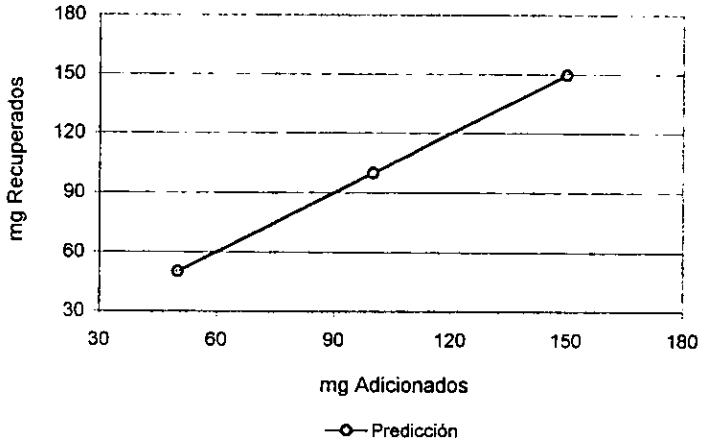


Figura No. 25 Gráfica de linealidad del método.

La gráfica que muestra la correlación existente entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada se presenta en la figura 25, donde se observa que hay una relación lineal entre los mg adicionados y los mg recuperados.

Todo lo anterior indica que el método es lineal.

Se demostró así la correlación existente entre la cantidad adicionada y la cantidad cuantificada descrita por la ecuación de la recta $y = mx + b$ ($y = 0.998x + 0.2$), con un coeficiente de determinación mayor a 0.98 (0.9999) y pendiente e intercepto que no son significativamente diferentes de uno y cero, respectivamente; lo cual sustenta que el método es lineal. Además de que el promedio del porcentaje de recobro se encuentra en el intervalo de 98 a 102.0%.

8.2.4 Precisión intermedia (reproducibilidad intralaboratorio)

| | | % Cuantificado | |
|----------|---|----------------|-------|
| | | Analista | |
| | | 1 | 2 |
| Día | 1 | 99.9 | 99.9 |
| | | 99.9 | 100.0 |
| | | 100.0 | 99.8 |
| | 2 | 100.0 | 99.7 |
| | | 99.5 | 99.8 |
| | | 99.5 | 99.7 |
| n | = | 12 | |
| Promedio | = | 99.8 | |
| D.E. | = | 0.1782 | |
| % C.V. | = | 0.2 | |

Tabla No. 16 Resultados de precisión intermedia para veraliprida

| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Media de cuadrados | F calculada | F de tablas |
|---------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------|-------------|
| Analista | 1 | 0.0009 | 0.0009 | 0.0751 | 18.51 |
| Día | 2 | 0.1483 | 0.0742 | 0.0259 | 4.46 |
| Error | 8 | 0.2000 | 0.0250 | | |

Tabla No. 17 Tabla de análisis de varianza.

Los resultados se muestran en la tabla 16, donde se observa que el coeficiente de variación global por los dos analistas en los dos días, del por ciento cuantificado es menor a 2.0%.

En la tabla 17 se observa que mediante un análisis de varianza para los analistas y para el día anidado en el analista, pudo demostrarse que no existe un efecto de día o de analista sobre los resultados obtenidos, ya que éstos no resultaron estadísticamente diferentes a un nivel de significancia del 95% y dado que F_{cal} es menor que $F_{95\%}$ para evaluar el efecto del analista y el efecto del día, se puede decir que el método es reproducible en cualquier día y por cualquier analista.

8.2.5 Estabilidad de la muestra

| Condición de almacenamiento | Tiempo (hrs) | % cuantificado | % de diferencia relativa |
|-----------------------------|--------------|----------------|--------------------------|
| Inicial | 0 | 99.9 | --- |
| Temperatura ambiente | 24 | 99.8 | 0.1 |
| | 48 | 99.3 | 0.6 |
| | 72 | 99.2 | 0.7 |
| Refrigeración (4°C) | 24 | 99.8 | 0.1 |
| | 48 | 99.2 | 0.7 |
| | 72 | 99.0 | 0.9 |

Tabla No. 18 Porcentajes cuantificados de veraliprida a temperatura ambiente y en refrigeración y las diferencias relativas con respecto al análisis inicial.

En la tabla 18 se muestran los resultados de estabilidad de la muestra, en ella se observa que la diferencia relativa del promedio del por ciento cuantificado en cada condición evaluada (temperatura ambiente/24, 48 y 72 horas y refrigeración/24, 48 y 72 horas) con respecto al promedio del por ciento cuantificado en el análisis inicial es menor a 2.0% por lo que los resultados son confiables si el análisis de la muestras almacenadas a temperatura ambiente o refrigeración se realiza dentro de 72 horas a partir de la preparación de dichas muestras.

8.2.6 Tolerancia del sistema

| Condición No. | Compuesto | Resolución | Factor de capacidad (K') | Factor de asimetría (T) | Número de platos teóricos (N) | Selectividad (α) |
|---------------|----------------|------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| 1 | Veraliprida | --- | 4.1 | 1.1 | 4280 | --- |
| | Sulfametoxazol | 8.1 | 7.0 | 1.1 | 6485 | 1.7 |
| 2* | Veraliprida | --- | 4.5 | 1.2 | 4302 | --- |
| | Sulfametoxazol | 6.7 | 7.2 | 1.0 | 5464 | 1.6 |
| 3 | Veraliprida | --- | 4.8 | 1.1 | 4271 | --- |
| | Sulfametoxazol | 5.7 | 7.0 | 1.0 | 6120 | 1.5 |
| 4 | Veraliprida | --- | 4.6 | 1.1 | 3995 | --- |
| | Sulfametoxazol | 6.8 | 7.4 | 1.0 | 5077 | 1.6 |
| 5 | Veraliprida | --- | 2.0 | 1.1 | 3489 | --- |
| | Sulfametoxazol | 10.4 | 4.6 | 1.1 | 5858 | 2.3 |

Tabla No. 19 Parámetros cromatográficos para veraliprida y sulfametoxazol

| Condición | Por ciento cuantificado | % de diferencia relativa |
|-----------|-------------------------|--------------------------|
| 1 | 100.0 | 0.20 |
| 2* | 100.2 | --- |
| 3 | 100.8 | 0.60 |
| 4 | 99.5 | 0.70 |
| 5 | 99.4 | 0.80 |
| 6 | --- | --- |

Tabla No. 20 Diferencias relativas del por ciento cuantificado con respecto al análisis inicial.

En la Tabla 20 se muestran los resultados de la tolerancia del sistema. Puede observarse que la cuantificación de veraliprida no se ve afectada por el uso de las diferentes condiciones, pues la diferencia relativa del por ciento recuperado obtenido de las muestras analizadas con cada una de las condiciones probadas respecto al promedio del por ciento recuperado de las tres muestras analizadas en las condiciones originales es menor de 2.0% en todos los casos excepto en la condición 6 en la que se disminuye la cantidad de modificadores orgánicos (metanol y acetonitrilo) en la fase móvil donde el sistema no permitió la adecuada separación de la señal de veraliprida y sulfametoxazol. Por otro lado, en la tabla 19 se presentan los parámetros cromatográficos promedio obtenidos para cada condición probada.

En el análisis espectral de la señal correspondiente a veraliprida se muestra que con cada una de las condiciones probadas, se mantiene la pureza del pico y la ausencia de coelución.

Se observó también que los productos de degradación no interfieren en la cuantificación de veraliprida en las diferentes condiciones analizadas.

De acuerdo a lo anterior se dice que el sistema es tolerante a los pequeños cambios realizados en el sistema a excepción de la condición 6 y se puede concluir que el sistema cromatográfico se considera exacto, preciso y específico cuando los parámetros cromatográficos se encuentren dentro de los reportados en la tabla 19.

En el caso de la tolerancia del sistema, se observa que a excepción de la disminución de la proporción de los modificadores orgánicos en la fase móvil, ninguna de las variaciones restantes determinan cambios significativos en la resolución de los picos, ni en la cuantificación del activo, por lo cual el sistema se considera tolerante bajo cinco de las seis condiciones de prueba ensayadas.

9. CONCLUSIONES

Se desarrolló y validó un método analítico para la cuantificación de veraliprida en cápsulas de 100 mg por cromatografía de líquidos de alta resolución para el control del producto durante sus etapas de fabricación así como para estudios de estabilidad, mediante el establecimiento de las condiciones del sistema de análisis.

Mediante las condiciones establecidas se logra la resolución total de la señal del compuesto de interés respecto a su patrón de referencia interna (sulfametoxazol), que demostró ser estable en solución y útil para llevar a cabo la cuantificación del principio activo en este sistema, y se logra también la separación de compuestos de degradación, por lo que el método analítico es específico a excipientes y productos de degradación.

La extracción del principio activo de la formulación se alcanza utilizando solución de ácido acético al 1% y la separación de los excipientes insolubles en dicha solución se realiza filtrando con papel filtro Whatman No. 5.

El método analítico desarrollado cumple satisfactoriamente con los parámetros de validación evaluados, es decir, es lineal, exacto, preciso, estable, tolerante y específico, por lo tanto, puede ser utilizado en el análisis de materia prima, producto en proceso, producto terminado y para estudios de estabilidad, proporcionando un alto grado de confianza en los resultados obtenidos.

10. VENTAJAS, DESVENTAJAS Y SUGERENCIAS.

- Método útil para el control del producto en proceso, terminado y para darle seguimiento durante estudios de estabilidad.
- La técnica desarrollada es muy sencilla de realizar, ya que no presenta problemas en cuanto al manejo excesivo de muestras y reactivos.
- La fase móvil empleada contiene una alta concentración de sales, por lo que es necesario realizar una limpieza exhaustiva del equipo luego de terminada una corrida analítica.
- Se sugiere que las columnas empleadas para cromatografía de par iónico, solo deben ser utilizadas con este fin, dada la gran afinidad que tienen los formadores de par iónico por la fase estacionaria.

11. BIBLIOGRAFIA

1. The Merck Index. Tenth edition. U.S.A. Published by Merck & Co., Inc. 1983: 1421.
2. Manual de Control de Calidad A.H. Robins de México, S.A. de C.V.
3. British Pharmacopoeia. The stationery office. 1998. Compact disc Ver. 2.0.
4. Nicolas P., Fauvelle F., Ennachachibi A. and Co. Improved determination of sulpiride in plasma by ion-pair liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr.*, 381 (2). 1986: 393-400.
5. Staveris S., Jung L., Jamet G. and Koffel J.C. Quantitative analysis of veralipride in plasma and urine by gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography with flame-ionization detection. *J. Chromatogr.*, 338. 1985: 79-88.
6. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. Edic. 45. México. Ediciones P.L.M., S.A. de C.V. 1999: 273.
7. Staveris S., Houin G., Tillement J.P. and Co. Primary dose-dependent pharmacokinetic study of veralipride. *J. Pharm. Sci.*, 74 (1). 1985: 94-96.
8. Yost R.W., Etre L.S. and Conlon R.D. Introducción a la cromatografía de líquidos práctica. U.S.A. Perkin-Elmer Corp. 1981: 17-57, 112-1154.
9. Snyder, L.R. and Kirkland. Introduction to Modern Liquid Chromatography. Second Edition. U.S.A. John Wiley & Sons, Inc. 1979: 125-234, 453-482.
10. Quatrocchi O.A. Introducción a la HPLC. Buenos Aires, Argentina. Laboratorios Dr. Gador. 1992: 3-7, 10-36, 42-51, 66-88, 92-98.
11. Jonsson A.J. Chromatographic theory and basic principles. U.S.A. Edit. Marcel Dekker, Inc. 1987: 96-134.
12. U.S. Pharmacopeia XXIII. National Formulary 19. U.S.A. 1999: 1914-1926.
13. Liquid Chromatography Course. Beckman. México D.F. 1992.

14. Perrone P.A. A Laboratory Manual for Liquid Chromatography. U.S.A. Perkin Elmer Corporation. 1986: 92-113.
15. Scott R.P.W. Liquid Chromatography Detectors . Journal of Chromatography Library. Vol 33: Elsevier Science Publishers. Second edition. 1986: 23-165.
16. Willard H.H. Métodos Instrumentales de análisis. México. Grupo Editorial Iberoamérica, S.A. de C.V. 1991: 143-144.
17. Berendson G.E. and Galan L. Role of the change length of chemically bonded phases and the retention mechanism in reversed phase liquid chromatography . J. Chromatogr. 1196 (1980): 21-37.
18. Goldberg A.P. Comparison of columns for reversed phase liquid chromatography. Anal. Chem. 154 (1982): 342-345.
19. Pauls R.E. and Meloy R.W. Testing procedures for liquid chromatography columns. J. Chromatogr Sci. 124 (1986): 66-69.
20. Traisnel M. and Gayot A.T. Practice of validation, Drug Develop. Ind. Pharm. 21 (1) 1995: 79-91.
21. Gupta V.D and Mathew M. Effect of mobile phase pH on the separation of drugs using High Performance Liquid Chromatography. Drug Develop. Ind. Pharm. 21(7) 1995:833-837.
22. Guía ICH-Q2A. Guideline for Industry Text on Validation of Analytical Procedures.
23. Pryde A and Gilbert M.T. Applications of High Performance Liquid Chromatography. London. Chapman & Hall, Inc. 1979: 6-19, 41-53.
24. Christensen H.B. Estadística paso a paso. México. Editorial Trillas, S.A. 1983: 309-371, 499-513.
25. Marques de Cantú M.J. Probabilidad y Estadística. México. Editorial Mc Graw Hill Interamericana de México, S.A. de C.V. 1991: 231-307, 361-471.
26. Validación de Métodos Analíticos. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud.

ANEXO I. Fórmulas de cálculo

a) Linealidad de sistema

Intercepto (A)

$$\text{donde: } A = \frac{\sum y - B(\sum x)}{n}$$

Pendiente (B)

$$B = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Coefficiente de determinación (r^2)

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

Limites de confianza para el intercepto

$$LC_A = A \pm t_{95\% n-2 \text{ g.l.}} S_{y/x} \sqrt{\frac{\bar{x}^2}{\sum x^2 - (\sum x)^2/n} + \frac{1}{n}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - A(\sum y) - B(\sum xy)}{n - 2}}$$

donde:

- n = Número de réplicas hechas a cada nivel por el número de niveles.
- $S_{y/x}$ = Estimado de $\sigma_{y/x}$ (desviación estándar de la regresión).
- x = Cantidad adicionada (concentración o mg adicionados)
- \bar{x} = Promedio de la cantidad adicionada en x
- y = Propiedad medida (respuesta o mg recuperados)
- \bar{y} = Promedio de la propiedad medida
- S_x = Desviación estándar de las "x" $n-1$ grados de libertad
- Σx = Sumatoria de la cantidad adicionada
- Σx^2 = Sumatoria de los cuadrados de la cantidad adicionada
- Σy = Sumatoria de la propiedad medida
- Σy^2 = Sumatoria de los cuadrados de la propiedad medida
- Σxy = Sumatoria del producto de la cantidad adicionada y la propiedad medida
- $t_{95\% n-2 g.l.}$ = t de Student a una probabilidad acumulada de 0.95 y $n-2$ grados de libertad.

b) Precisión del sistema

$$\% C.V. = \left(\frac{DE}{\bar{y}} \right) * 100$$

donde:

- \bar{y} = Media del porcentaje recuperado
- $D.E.$ = Desviación estándar
- $\%C.V.$ = Por ciento del coeficiente de variación

c) Especificidad

$$\% \text{ Degradado} = 100 - \% \text{ recuperado}$$

$$\% \text{ Recuperado} = \frac{A.B.C. \text{ problema} \times 100}{A.B.C. \text{ estándar}}$$

donde:

$$A.B.C. = \text{Area bajo la curva}$$

d) Exactitud

Por ciento recuperado para cada recobro (x)

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

Media del por ciento recuperado (\bar{x})

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Intervalo de confianza para la media

$$IC = \bar{x} \pm t_{95\% \text{ } n-1 \text{ g.l.}} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

donde:

- n = Número de recobros independientes
- x = Cantidad adicionada
- y = Cantidad recuperada
- S = Desviación estándar
- $\sum x$ = Sumatoria de x
- $t_{95\% \text{ } n-1 \text{ g.l.}}$ = t de Student a una probabilidad acumulada de 0.95 y $n-1$ grados de libertad.

e) Linealidad de método

*Pendiente**

*Intercepto**

*Coefficiente de determinación**

Límites de confianza al 95% para la pendiente

$$LC_B = B \pm t_{95\% n-2} \text{ g.l. } S_{yx} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - (\sum x)^2/n}}$$

*Límite de confianza para el intercepto**

* calcular de acuerdo con las fórmulas descritas en la evaluación de la linealidad del sistema.

f) Repetibilidad

*Calcular la media del porcentaje recuperado***

*Calcular la desviación estándar del porcentaje recuperado***

*Calcular el coeficiente de variación***

*** ver cálculos de exactitud*

g) Reproducibilidad (precisión intermedia)

Se tabulan los datos de la siguiente manera:

| | | | |
|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | Analista | |
| | | 1 | 2 |
| Día | 1 | Y_{111} | Y_{211} |
| | | Y_{112} | Y_{212} |
| | Y_{113} | Y_{213} | |
| | 2 | Y_{121} | Y_{221} |
| Y_{122} | | Y_{222} | |
| Y_{123} | | Y_{223} | |

Análisis de reproducibilidad.

| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Media de cuadrados | Fcal | Fteo |
|---------------------|--------------------|---|-------------------------|------------------------|------------|
| Analista | $gla = a - 1$ | $SCa = \frac{\sum Y_{i..}^2}{dr} - \frac{Y^2...}{adr}$ | $MCa = \frac{SCa}{gla}$ | $Fa = \frac{MCa}{MCd}$ | $Fgla/gld$ |
| Día | $gld = a (d - 1)$ | $SCd/a = \frac{\sum \sum Y_{ij.}^2}{r} - \frac{\sum Y_{i..}^2}{dr}$ | $MCd = \frac{SCd}{gld}$ | $Fd = \frac{MCd}{MCE}$ | $Fgld/gle$ |
| Error | $gle = ad (r - 1)$ | $SCe = \sum \sum Y_{ijk}^2 - \frac{\sum \sum Y_{ij.}^2}{r}$ | $MCE = \frac{SCe}{gle}$ | — | — |

Análisis de varianza

$$\begin{aligned}
SY^2... &= (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + Y_{123} + \dots + Y_{223}) \\
SY^2ijk &= Y^2_{111} + Y^2_{112} + Y^2_{113} + Y^2_{121} + Y^2_{122} + \dots + Y^2_{223} \\
SY^2.j &= (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + Y_{123})^2 + (Y_{211} + Y_{212} \\
&\quad + Y_{213} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223})^2 \\
SY2ij. &= (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113})^2 + (Y_{121} + Y_{122} + Y_{123})^2 + (Y_{211} + \\
&\quad Y_{212} + Y_{213})^2 + (Y_{221} + Y_{222} + Y_{223})^2 \\
SY^2i.. &= (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{211} + Y_{212} + Y_{213})^2 + (Y_{121} + Y_{122} \\
&\quad + Y_{123} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223})^2
\end{aligned}$$

donde:

- a = Número de analistas
- d = Número de días
- r = Número de replicaciones por día y por analista
- Y = Porcentaje del principio activo cuantificado
- $SY^2...$ = Suma total de los porcentajes cuantificados por los analistas al cuadrado.
- $SY^2.j$ = Suma total de los porcentajes cuantificados en un día.
- $SY^2i..$ = Suma total de los cuadrados de los porcentajes cuantificados por un analista.
- SY^2ijk = Suma total de los cuadrados de los porcentajes cuantificados por los analistas.
- $SY^2ij.$ = Suma total de los cuadrados de los porcentajes cuantificados por un analista en un día.
- Fa = Valor de F de Fisher a un nivel acumulado de 0.95 con gla grados de libertad en el numerador y gld grados de libertad en el denominador.
- Fd = Valor de F de Fisher a un nivel acumulado de 0.95 con gld grados de libertad en el numerador y gle grados de libertad en el denominador.

h) Tolerancia del sistema y estabilidad de la muestra

$$\% \text{ Diferencia relativa} = \left| \frac{\%Ai - \%Ac}{\%Ai} \right| * 100$$

donde:

- $\%Ai$ = Por ciento cuantificado en el análisis inicial.
- $\%Ac$ = Por ciento cuantificado en cada condición.