



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

DESARROLLO, VALIDACION Y OPTIMIZACION DE UN
METODO ANALITICO INDICATIVO DE ESTABILIDAD PARA
LA CUANTIFICACION DE ACETOFENIDO DE
DIHIDROXIPROGESTERONA Y ENANTATO DE ESTRADIOL
EN UN ANTICONCEPTIVO INYECTABLE.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A:

ANA MARIA SOLEDAD FONTES RODRIGUEZ



MEXICO, D.F.

2004



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Jurado asignado:

Presidente: Prof. Alfredo Garzón Serra

Vocal: Profra. María Teresa Buentello Rodríguez

Secretario: Profra. Georgina Margarita Maya Ruiz

1er. Suplente: Profr. Juan Manuel Rodríguez

2do. Suplente: Profra. Ma. de los Dolores Campos Echeverría

Sitio donde se desarrolló el tema:

Nysco de México S.A. de C.V.

Ermita Iztapalapa No. 436-B, Colonia Mexicaltzingo. Delegación Iztapalapa.

Asesor del tema:

Q.F.B Alfredo Garzón Serra



Sustentante:

Ana María Soledad Fontes Rodríguez

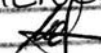


Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Ana Ma. Fontes

Rodriguez

FECHA: 22 ENERO 04

FIRMA: 

ÍNDICE

	Página
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	
1.1 Objetivo	5
1.2 Planteamiento del problema	5
1.3 Hipótesis	5
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES	
2.1 Monografías de los principios activos	
2.1.1 Acetofénido de dihidroxiprogesterona.	6
2.1.2 Enantato de estradiol.	12
2.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC, CLAR)	24
2.3 Desarrollo y validación de métodos analíticos.	
2.3.1 Desarrollo de métodos analíticos	48
2.3.2 Validación de métodos analíticos	50
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA	
3.1 Desarrollo del método analítico	60
3.2 Validación de los métodos analíticos	
3.2.1 Método para la cuantificación de acetofénido de dihidroxiprogesterona	65
3.2.2 Método para la cuantificación de enantato de estradiol	68
CAPÍTULO IV. RESULTADOS	
4.1 Método para la cuantificación de acetofénido de dihidroxiprogesterona	71
4.2 Método para la cuantificación de enantato de estradiol	81
CAPÍTULO V. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES	
5.1 Análisis de resultados	92
5.2 Conclusiones	93

CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA

95

CAPÍTULO VII. ANEXOS

97

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es lograr la optimización de un método analítico existente, para la cuantificación de enantato de estradiol y acetofénido de dihidroxiprogesterona en materia prima, producto en proceso y producto terminado; para su utilización en control de calidad, así como en el análisis de muestras sometidas a estudios de estabilidad.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se cuenta con un método analítico del cual no se tiene evidencia de haber sido validado, por lo que se planea una etapa de desarrollo en la cual se buscarán las condiciones óptimas, con las cuales se obtengan los parámetros cromatográficos adecuados para proceder con la validación. Se busca obtener un solo método analítico en el cual se puedan cuantificar de manera confiable los dos principios activos presentes en la formulación.

1.3 HIPÓTESIS

Si se realiza una manipulación adecuada de las diferentes condiciones cromatográficas que se manejan durante la etapa de desarrollo de la metodología, se obtendrá un método analítico que cumpla con los parámetros de validación establecidos en la regulación vigente.

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

2.1 MONOGRAFÍAS DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS ^(1, 2, 3)

2.1.1 Acetofénido de dihidroxiprogesterona

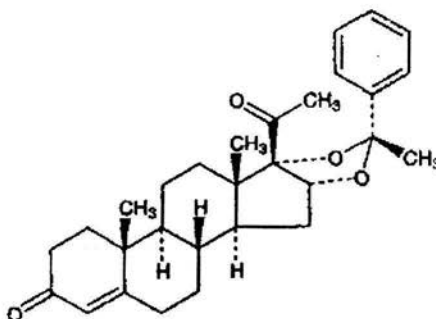
Nombre químico

[16 α (R)]-16,17-[(1-Feniletilideno)bis(oxy)]pregn-4-en-3,20-diona; acetal cíclico con acetofenona de la 16 α ,17 α -dihidroxi-pregn-4-en-3,20-diona.

Fórmula empírica

C₂₉H₃₆O₄

Fórmula estructural



Aspecto

Polvo cristalino blanco a prácticamente blanco, o cristales incoloros a blancos o ligeramente amarillos.

Solubilidad

Soluble en etanol, metanol y tetrahidrofurano. Prácticamente insoluble en agua. Ligeramente soluble en éter y cloroformo.

Identificación

IR: Los picos principales presentes en el espectro de IR de la muestra problema dispersada en KBr corresponden con los presentes en la sustancia de referencia, preparada en la misma forma.

(ver Anexo I)

Intervalo de fusión:

De 150 a 156 °C

Rotación específica:

+50.4 a +55.7°

Extinción específica:

347 a 383

Pérdida por secado:

No más de 0.5 %

Contenido de acetofenona:

No más de 0.005%

Valoración:

98.0 a 102.8%

Métodos de análisis

Se encuentran informados en la literatura metodologías para su cuantificación por medio de HPLC (High Performance Liquid Chromatography, por sus siglas en inglés) y por GC (Gas Chromatography)

Progestinas

El acetofénido de dihidroxiprogesterona se encuentra incluido en el grupo de las progestinas, que incluyen a la hormona natural progesterona, derivados de la 17 α -acetoxiprogesterona de la serie de los pregnanos, derivados de la 19-nortestosterona (estrano) y al norgestrel y compuestos relacionados de la serie de los gonanos; compuestos con actividad similar a la progesterona, se encuentran referidos con diversos nombres en la literatura, como progestinas, agentes progestacionales, progestágenos, progestógenos, gestágenos o gestógenos.

Perspectiva histórica

En 1933, Corner y Allen aislaron una hormona del cuerpo lúteo de cerdas y la denominaron progestina; al siguiente año diversos grupos europeos aislaron el compuesto en forma cristalina y la llamaron luteoesterona ignorando el nombre asignado previamente por los anteriores descubridores. Esta diferencia en nomenclatura se resolvió en 1935 cuando Sir Henry Dale convenció a ambos grupos de adoptar un nombre que incorporara elementos de ambas denominaciones y se le asignó el nombre de progesterona.

Los estudios iniciales con la progesterona se vieron obstaculizados debido a que la producción a partir de fuentes animales era bastante difícil y tomaba demasiado tiempo y los precios de la progesterona eran demasiado altos. Además la progesterona por si misma no es activa al ser administrada por vía oral debido a que sufre un extenso metabolismo hepático de primer paso, lo cual limita su utilidad farmacológica.

Estas dificultades fueron vencidas por dos de los mayores avances en la química de los esteroides; el primero de ellos fue la síntesis de progesterona, realizada por Marker, a partir de la diosgenina en los años 40, misma que fue un avance importante, ya que proveyó de cantidades importantes de la hormona a un costo relativamente barato y eliminó la contaminación cruzada con compuestos que se copurificaban junto con ella de las fuentes animales. El segundo avance químico fue la síntesis de los compuestos 19-nor, a principios de los años 50, realizado por Djerassi que sintetizó la noretindrona en Syntex y Colton que sintetizó el noretinodrel en Searle. Estos son indudablemente 2 de los avances más importantes en la química orgánica sintética del siglo XX, ya que llevaron al desarrollo de anticonceptivos orales, mismos que tuvieron un gran impacto social.

Química

A diferencia del receptor de estrógenos, que requiere de la presencia del anillo fenólico A para que se de la unión de alta afinidad, el receptor para la progesterona favorece la inversión de la estructura Δ^4 -3-ona del anillo A a la conformación $1\beta,2\alpha$. Otros receptores de hormonas esteroides también unen esta estructura no fenólica del anillo A, aunque la conformación óptima difiere de la requerida para el receptor de progesterona. Por consiguiente, las progestinas sintéticas (en especial los compuestos 19-nor) muestran unión limitada a los receptores para glucocorticoides, andrógenos y mineralocorticoides, propiedad que explica algunas de sus actividades no progestacionales.

El espectro de actividades de estos compuestos es altamente dependiente de los grupos sustituyentes específicos con los que cuente, especialmente del grupo que se encuentra en la posición 17 del anillo D, la presencia de metilo en C 19 y la presencia de etilo en C 13. Existe otro conjunto de agentes similares a la progesterona y a su metabolito 17α -hidroxiprogesterona, que es inactivo, pero algunos derivados del mismo presentan actividad progestacional y pueden ser utilizados por vía parenteral, debido a que sufren de metabolismo hepático de primer paso. Sin embargo, las sustituciones de 17-ésteres en la posición 6 del anillo B dan compuestos que resultan activos por vía oral y presentan actividad progestacional relativamente selectiva. Una segunda clase de compuestos son los denominados 19-nor, sin embargo son menos selectivos que los derivados de la 17α -hidroxiprogesterona y presentan variabilidad en el grado de actividad androgénica y en menor proporción cierta actividad estrogénica o antiestrogénica.

Síntesis y secreción

La progesterona es secretada del cuerpo lúteo durante la segunda mitad del ciclo menstrual; en realidad la secreción inicia justo antes de la ovulación a partir del folículo destinado a liberar el óvulo. La formación de progesterona a partir de precursores

esteroides se da en el ovario, testículo, corteza adrenal y placenta. La determinación de la tasa de secreción de progesterona va de unos pocos miligramos al día durante la fase folicular del ciclo hasta 10 a 20 mg durante la fase luteal y por arriba de 100 mg durante las últimas etapas del embarazo. Tasas de 1 a 5 mg/día han sido determinadas en hombres y son comparables a los valores obtenidos en mujeres durante la fase folicular.

Acciones fisiológicas y farmacológicas

a) *Acción neuroendocrina:*

La progesterona producida en la fase luteal del ciclo menstrual tiene diversos efectos fisiológicos; incrementa la tasa de liberación de la LH (hormona luteinizante) a partir de la pituitaria.

b) *Acciones en el aparato reproductor:*

La progesterona liberada durante la fase luteal del ciclo disminuye la proliferación endometrial debida al estrógeno. La baja abrupta en la liberación de la progesterona a partir del cuerpo lúteo al final del ciclo es el punto determinante para el cese de la menstruación. Si la duración de la fase luteal se prolonga artificialmente, se inducen cambios en el estroma del endometrio similares a los producidos en la etapa temprana del embarazo. Bajo circunstancias normales, el estrógeno antecede y acompaña a la progesterona en su acción sobre el endometrio y es esencial en el desarrollo del periodo menstrual normal. La progesterona también tiene efectos en las glándulas cervicales y la secreción abundante de estructuras similares a los estrógenos produce la secreción de un material escaso y viscoso. Como se mencionó anteriormente entre los efectos de las progestinas está la disminución de la penetración del cérvix por los espermatozoides. La maduración del epitelio vaginal humano inducida por los estrógenos es modificada al presentarse el embarazo por medio de la acción de la progesterona. La progesterona es muy importante para el mantenimiento del embarazo; una de las principales acciones de esta hormona es la supresión de la menstruación y la contractilidad uterina.

c) *Acciones en la glándula mamaria:*

Durante el embarazo y en menor grado durante la fase luteal del ciclo, la progesterona actúa junto con los estrógenos en la proliferación de los acinos presentes en las glándulas mamarias, para el final del embarazo estos se llenan de secreciones y se aumenta notablemente la vascularización de la glándula, solo después de que los niveles de estrógenos y progesterona disminuyen al momento del parto, da inicio la lactancia. Durante el ciclo menstrual normal, la actividad mitótica del epitelio mamario es muy baja durante la fase folicular y se incrementa en la fase luteal; este patrón se debe a la progesterona, el cual ejerce su efecto directamente en una sola ronda de actividad mitótica en el epitelio mamario. Este efecto es pasajero, sin embargo, al continuar la exposición a la hormona se detiene rápidamente el crecimiento de las células epiteliales. Esto contrasta con el endometrio, donde la proliferación se incrementa durante la fase folicular debido al incremento en los niveles de estrógeno y es opuesto por la progesterona en la segunda parte del ciclo. El control hormonal de la proliferación celular es diferente en estos dos

tejidos y se debe tener en cuenta el efecto celular-específico al momento de utilizarlos como agentes terapéuticos.

d) Acciones en el SNC:

Si la temperatura corporal se mide cuidadosamente a lo largo de un ciclo menstrual normal, se puede notar un incremento de aproximadamente 0.6 °C a la mitad del ciclo, lo cual coincide con la ovulación. El incremento de la temperatura persiste hasta el inicio del flujo menstrual. Este incremento en la temperatura se debe a la progesterona, lo que puede ser demostrado por medio de la administración de la hormona. El mecanismo central de este efecto es hasta ahora desconocido, pero se cree que puede estar involucrada una alteración en el centro hipotalámico de regulación de temperatura. La progesterona también incrementa la respuesta ventilatoria de los centros respiratorios al dióxido de carbono y lleva a reducir la presión de oxígeno arterial y alveolar en la fase luteal del ciclo y durante el embarazo. La progesterona también puede tener acciones depresivas e hipnóticas en el SNC, ya que se ha informado somnolencia después de la administración de la hormona; este potencial efecto secundario puede ser disminuido si se administran las preparaciones que contienen progesterona al momento de ir a dormir.

e) Acciones metabólicas:

Las progestinas tienen numerosas acciones metabólicas. La progesterona por sí misma incrementa los niveles basales de insulina y sus niveles después de la ingestión de carbohidratos, pero en general no causa cambios en el nivel de tolerancia a la glucosa. Sin embargo, la administración de progestinas más potentes, por largos períodos de tiempo, puede disminuir la tolerancia a la glucosa. Las progestinas estimulan la actividad de la lipoproteinlipasa y mejoran la deposición de las grasas. Se ha informado que la progesterona y sus análogos incrementan las LDL (lipoproteínas de baja densidad) y no causan efectos mayores en la reducción de las HDL (lipoproteínas de alta densidad) séricas. También puede disminuir los efectos de la aldosterona a nivel del túbulo renal y causar una baja en la reabsorción de sodio e incrementar la secreción de mineralocorticoides en la corteza suprarrenal.

Mecanismo de acción

Existe un solo tipo de gen receptor para progesteronas (PR) que produce dos isoformas del mismo, PR-A y PR-B. El primero cuenta con 164 aminoácidos, y el segundo es una forma perdida de la primera; esto ocurre al utilizarse dos promotores estrógeno-dependientes diferentes en el gen PR. Ambos PR presentan un dominio modular, estructural común a todos los miembros de la subfamilia de receptores nucleares. El dominio de unión al ligando es idéntico en las dos isoformas, de manera que no existe diferencia en la unión con el ligando como se ve en el receptor de estrógenos. En ausencia de ligando, el PR se encuentra presente en el núcleo en forma de monómero inactivo unido a proteínas, al unirse con la progesterona la unión con las proteínas se disocia y el receptor se fosforila y forma homo y heterodímeros que se unen a los PRE (elementos de respuesta a la progesterona) localizados en genes blanco. La activación transcripcional ocurre primero por acción de coactivadores o por la interacción directa de factores generales de transcripción. El complejo coactivador del receptor favorece la interacción con proteínas adicionales con actividad de histona acetilasa, lo que causa la remodelación de la cromatina e incrementa

la accesibilidad para las proteínas transcripcionales incluyendo la RNA polimerasa II. Los antagonistas de la progesterona facilitan la dimerización del receptor y la unión del DNA, pero la conformación de la unión antagonista-PR es diferente de la que tiene la unión agonista-PR, lo cual favorece la interacción del PR con sus correpresores que llaman a las histonadesacetilasas; la desacetilación de las histonas incrementa la interacción del DNA con los nucleosomas y da como resultado un promotor inaccesible al aparato general de transcripción.

Absorción, distribución y eliminación.

La progesterona sufre de un rápido metabolismo de primer paso, lo que da una baja biodisponibilidad por vía oral, lo cual limitó la administración de la hormona natural a la vía intramuscular en inyectables oleosos o a la administración en supositorios vaginales, lo cual impulsó el desarrollo de análogos para su uso oral. Sin embargo, la biodisponibilidad absoluta de estas preparaciones es baja, aunque se obtienen niveles plasmáticos eficaces. Actualmente se encuentran disponibles numerosas progestinas para su administración por vía oral e intramuscular, en implantes, que presentan un metabolismo hepático disminuido. En plasma la progesterona se une a la albúmina. La unión total de los compuestos sintéticos a proteínas plasmáticas es de 90% o más, la unión a diferentes proteínas depende del compuesto en específico.

La hormona es metabolizada primeramente en el hígado a sus metabolitos hidroxilados y a los conjugados con sulfato y ácido glucurónico, los cuales son eliminados en la orina; las progestinas sintéticas tienen vidas medias mucho más largas, que van desde 7 hasta las 24 horas. El metabolismo de las progestinas sintéticas es primeramente hepático y se eliminan por vía renal en forma de metabolitos conjugados polares diversos.

Usos terapéuticos

Los dos usos más frecuentes de las progestinas son la anticoncepción, ya sea solas o en combinación con estrógenos en anticonceptivos orales y en terapias de reemplazo hormonal en mujeres postmenopáusicas.

Las progestinas también se utilizan en el tratamiento de la amenorrea secundaria, desordenes de sangrado uterino, tratamiento de soporte en la fase luteal como ayuda en casos de infertilidad y parto prematuro. Existe el interés en su potencial en el tratamiento del síndrome premenstrual. En general estos usos son una extensión de la función fisiológica normal de la progesterona en el control neuroendocrino de la función ovárica y el endometrio. También se utilizan como tratamiento paliativo en ciertos casos de carcinoma endometrial y como tratamiento secundario en cáncer de seno.

2.1.2 Enantato de estradiol

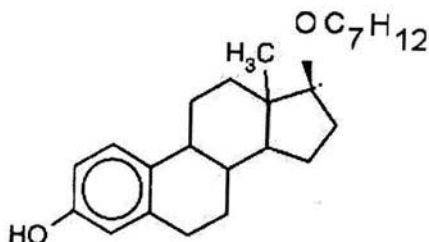
Nombre químico

(17 β heptanoato)-estra-1,3,5(10)-trien-3,17-diol

Fórmula empírica

C₂₅H₃₆O₂

Fórmula estructural



Aspecto

Polvo cristalino blanco a casi blanco.

Solubilidad

Altamente soluble en acetona, metanol, etanol, dioxano y otros disolventes orgánicos, soluble en hidróxidos alcalinos, ligeramente soluble en aceites vegetales, éter y cloroformo. Prácticamente insoluble en agua.

Identificación

IR: Los picos principales presentes en el espectro de IR de la muestra problema dispersada en KBr corresponden con los presentes en la sustancia de referencia, preparada en la misma forma

(Ver anexo I)

Intervalo de fusión:

De 92 a 98 °C

Rotación específica:

+38 a +43°

Extinción específica:

56 a 56

Contenido de agua por método de Karl Fischer:

No más de 0.10 %

Contenido:

97.0 a 103.0%

Métodos de análisis

Se encuentran informados en la literatura metodologías para su cuantificación por medio de HPLC (High Performance Liquid Chromatography, por sus siglas en inglés) y por GC (Gas Chromatography)

Estradiol

Los estrógenos son hormonas endógenas que producen diversas acciones fisiológicas. En la mujer, estos incluyen efectos en el desarrollo, acciones neuroendocrinas que involucran el control de la ovulación, la preparación cíclica del tracto reproductivo para la fertilización e implantación y acciones sobre el metabolismo de minerales, carbohidratos, proteínas y lípidos. En los hombres tienen efectos sobre el sistema óseo, la espermatogénesis y el comportamiento.

También se encuentran disponibles antagonistas de los receptores para estrógeno y progesterona, los cuales se utilizan principalmente para el tratamiento de cáncer de mama que responde a hormonas, de la infertilidad femenina y para provocar el aborto por prescripción médica.

En el medio ambiente se han encontrado diversos compuestos químicos que mimetizan la actividad de estas hormonas, así como de sus antagonistas, por lo cual se están realizando investigaciones más a fondo acerca de los efectos de estos agentes ambientales en los seres humanos.

La actividad estrogénica es compartida por diversos compuestos esteroideos y no esteroideos. Los estrógenos naturales más potentes encontrados en los seres humanos son el 17β -estradiol seguido de la estrona y el estriol.

Perspectiva histórica

Desde hace mucho tiempo han sido conocidos los efectos de la remoción de los ovarios en diversas especies, como son la atrofia uterina y la pérdida de la función sexual. La naturaleza hormonal del control ovárico en la función reproductiva femenina fue establecido por Knauer en el año de 1900, al encontrar que los trasplantes de ovario previenen los síntomas de la gonadectomía. Esta investigación fue ampliada por Halban (1900), quien

demonstró que al transplantar estas glándulas en animales inmaduros, se producía el desarrollo y la función sexual normal.

En 1923, Allen y Doisy desarrollaron un bioensayo sencillo para extractos de ovario, basado en los cambios producidos en las células vaginales de la rata. Loewe (1925) fue el primero en informar la presencia de hormonas sexuales femeninas en la sangre de diversas especies y poco después, Frank y sus colaboradores (1925) detectaron un principio activo en la sangre de cerdas en período de estro. Otro descubrimiento de gran importancia fue el hecho por Loewe y Lange (1926) de la presencia de hormonas sexuales femeninas en la orina de mujeres en período de menstruación y que esta presencia variaba de acuerdo a la fase del ciclo menstrual en que se encontraban. La excreción de grandes cantidades de estrógeno en la orina durante el embarazo fue informada por Zondek en 1928.

Este descubrimiento representó una ventaja para los químicos, ya que poco después el compuesto activo fue aislado en su forma cristalina (Butenandt, 1929; Doisy 1929,1930). Pocos años después la estructura química fue dilucidada.

Los resultados de estas primeras investigaciones indicaron que el ovario secretaba dos sustancias. En el año de 1897 Beard postuló que el cuerpo lúteo tiene una función importante durante el embarazo y Fraenkel (1903) demostró que la destrucción del cuerpo lúteo en conejas embarazadas provocaba el aborto. Las contribuciones de Corner y Allen (1929) establecieron la función hormonal del cuerpo lúteo. Estos investigadores demostraron que el aborto producto de la extirpación del cuerpo lúteo en conejas embarazadas podía ser prevenido por medio de la inyección de extractos luteales.

A principios de los años 60, los estudios de Jensen y sus colegas sugirieron la presencia de receptores intracelulares para los estrógenos en ciertos tejidos blanco, este descubrimiento es históricamente importante debido a que fue la primera demostración de la existencia de una superfamilia de receptores tiroideos/esteroideos y permitió el acercamiento experimental a la identificación de otros receptores hormonales similares. Recientemente se ha identificado un receptor para estrógenos identificado como *receptor de estrógenos β* (ER β) para distinguirlo del primer receptor identificado descubierto identificado como *receptor de estrógenos α* (ER α).

Química

Cada una de estas moléculas es un esteroide de 18 carbonos, que contiene un anillo fenólico en posición A (anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3) y un grupo cetona o β -hidroxilo en la posición 17 del anillo D.

El anillo A es la estructura más importante para el enlace selectivo de alta afinidad con el receptor de estrógenos. Muchas sustituciones de grupos alquilo en el anillo A afectan la unión con el receptor, sin embargo las sustituciones en los anillos C ó D pueden ser toleradas. Las sustituciones con grupos etnil en C17 incrementan la potencia por vía oral por medio de la inhibición del metabolismo hepático de primer paso. Se ha desarrollado un modelo para la unión ligando estrógeno-receptor para el estudio de la relación estructura-

actividad (Anstead 1997) y se ha informado la estructura cristalina de los complejos estrógeno-receptor (Brzowski, 1997).

Uno de los estrógenos no esteroideos que fue sintetizado es el dietilestilbestrol o DES, que tiene una estructura similar a la del estradiol, en conformación *trans*. En diversos estudios se descubrió que el DES es tan potente como el estradiol, activo por vía oral y presenta una vida media más larga en el organismo; el DES ya no es ampliamente utilizado, pero es importante históricamente debido a que es un estrógeno barato, abundante, y activo por vía oral.

Los compuestos no esteroideos con actividad estrogénica o antiestrogénica (incluyendo a las flavonas, isoflavonas y derivados del cumestano) se encuentran naturalmente en una gran variedad de plantas y hongos. Un número importante de agentes sintéticos, como los pesticidas (*p,p'*-DDT), plastificantes (bisfenol A), y otros químicos industriales (bifenilos policlorados), también presentan actividad hormonal o antihormonal. Muchos de estos compuestos contienen un anillo fenólico que mimetiza el anillo A de los esteroides. Aunque la afinidad de estos "estrógenos ambientales" por el receptor de estrógenos es relativamente baja su extenso número, bioacumulación en el tejido adiposo y la persistencia de los mismos en el ambiente, aumenta su toxicidad potencial para los seres humanos y la vida animal. Actualmente se encuentran disponibles en el mercado preparaciones de venta libre y de prescripción médica que contienen compuestos con actividad estrogénica obtenidos a partir de plantas, como los fitoestrógenos (genisteína), de los cuales se ha informado que tienen una selectividad relativa hacia los receptores ER β , lo cual sigue en investigación.

Síntesis y secreción

Los estrógenos esteroideos se forman a partir de la androstenediona o la testosterona como precursores inmediatos; la reacción involucra la aromatización del anillo A, la cual es catalizada en tres pasos por el complejo enzimático monooxigenasa del citocromo P450 (aromatasa o CYP 19), que utiliza NADPH y oxígeno molecular como cosustratos. En el primer paso de esta reacción el carbono 19 (grupo metilo angular en C10 de los precursores androgénicos) es hidroxilado, una segunda hidroxilación resulta en la eliminación del grupo hidroximetil recién formado en C19 y una hidroxilación final en C2 resulta en la formación de un intermediario inestable que se rearregla para formar el anillo fenólico A. La reacción completa consume 3 moléculas de oxígeno y tres moléculas de NADPH.

Los ovarios son la principal fuente de los estrógenos circulante en mujeres premenopáusicas. El producto secretado en mayor cantidad es el estradiol sintetizado en las células granulosas a partir de precursores androgénicos provenientes de las células de la teca. La actividad de la aromatasa es inducida por las gonadotropinas, las cuales actúan vía receptores en la membrana plasmática para elevar las concentraciones intracelulares de adenosina 3', 5'-monofosfato (AMP cíclico), las gonadotropinas y el AMP cíclico incrementan la actividad de la enzima de anclaje de cadena lateral del colesterol y facilitan el transporte del colesterol (precursor de todos los esteroides) hacia el interior de la mitocondria celular para sintetizar a los esteroides. El ovario contiene una forma de 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (tipo I) que favorece la producción de testosterona y estradiol a partir de androstenediona y estrona, respectivamente. Sin embargo en el hígado

otra forma de esta enzima (tipo 2) favorece la oxidación del estradiol circulante a estrona y estos tres esteroides son convertidos a estriol y posteriormente son excretados en la orina junto con sus conjugados sulfato y glucurónido. En las mujeres postmenopáusicas, la principal fuente de estrógeno es el estroma del tejido adiposo y otras fuentes no ováricas, en las cuales es sintetizado a partir de dehidroepiandrosterona, secretada por la corteza adrenal. En los hombres, los estrógenos son producidos en los testículos, pero la producción extragonadal se debe a la aromatización del C 19 de los esteroides circulantes como androstenediona y dehidroepiandrosterona, por lo tanto el nivel de estrógenos es regulado en parte por la disponibilidad de precursores androgénicos.

Los efectos estrogénicos se atribuyen en su mayoría a las hormonas circulantes, pero las producidas localmente también presentan acciones importantes. Por ejemplo, los estrógenos pueden producirse a partir de andrógenos por medio de la acción de la aromatasas o por la hidrólisis de los conjugados de estrógeno, así la producción local de estrógenos juega un factor causal importante en el desarrollo de ciertas enfermedades como el cáncer de mama y la aparición de tumores en el seno que contienen dichas enzimas.

Los estrógenos también pueden producirse a partir de andrógenos vía aromatasas presente en el sistema nervioso central (SNC) y otros tejidos y ejercer efectos locales en el sitio de producción; en los testículos, afectan la espermatogénesis y en el hueso tienen su mayor influencia en la densidad mineral de los mismos.

Altas cantidades de estrógeno son sintetizadas en la placenta, que utiliza la dehidroepiandrosterona fetal y su derivado 16α -hidroxilado para producir estrona y estriol, respectivamente; durante el embarazo, la orina humana es una importante fuente de abundantes estrógenos naturales.

Acciones fisiológicas y farmacológicas

a) Acción sobre el desarrollo:

Los estrógenos son responsables en su mayor parte de la aparición de las características sexuales secundarias que ocurren durante la pubertad en la mujer. Por medio de acción directa provocan el crecimiento y desarrollo de la vagina, útero y trompas de falopio. Actúan de manera concertada junto con otras hormonas para provocar el crecimiento de los senos por medio la promoción del crecimiento ductal, desarrollo del estroma y acumulación de grasa. También contribuyen a la formación del cuerpo y el esqueleto de la mujer, de una manera todavía no comprendida claramente, lo cual da como resultado el crecimiento de los huesos que culmina con la fusión de las epífisis. Los estrógenos también promueven el crecimiento del vello axilar y genital, así como la pigmentación de este y de los pezones y areolas que ocurre en el primer trimestre del embarazo.

El desarrollo sexual en las mujeres se debe primeramente a la acción de los estrógenos, los andrógenos juegan un papel secundario. La testosterona y la androstenediona se encuentran normalmente en la sangre venosa ovárica, y contribuyen al inicio del desarrollo de vello axilar y púbico durante la pubertad, así como a la aparición de acné debida al crecimiento y las secreciones formadas en las glándulas sebáceas.

Recientemente se ha encontrado que los estrógenos juegan un papel importante en el desarrollo masculino, en los niños la deficiencia de estrógenos no afecta la edad del inicio de la pubertad, pero el inicio del crecimiento se ve disminuido, se retrasa la maduración del esqueleto y el cierre de las epífisis. La deficiencia de estrógenos en el hombre puede producir hipergonadotropismo, macroorquidismo e incrementar los niveles de testosterona y afectar el metabolismo de lípidos y la fertilidad en algunos individuos.

b) Control neuroendocrino del ciclo menstrual:

El ciclo menstrual en la mujer es controlado por medio de una cascada neuroendocrina que involucra el hipotálamo, la glándula pituitaria y los ovarios. En el hipotálamo se regula la liberación periódica de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) a la circulación portal hipotalámico-pituitaria. La GnRH interactúa con un receptor relacionado en los gonadotropos y causa la liberación de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona folículo estimulante (FSH) de la pituitaria anterior. Las gonadotropinas (FSH y LH) son las responsables del crecimiento y maduración del folículo de Graaf en el ovario y de la producción ovárica de estrógeno y progesterona, los cuales ejercen una regulación tipo feedback en la pituitaria y el hipotálamo.

Debido a que la liberación de GnRH es intermitente, la liberación en forma pulsátil de la LH y la FSH está determinada por el "reloj" neural antes mencionado, el cual está referido al generador hipotalámico pulsátil de GnRH. La naturaleza de la liberación hormonal intermitente es esencial para el mantenimiento normal de la ovulación en el ciclo menstrual, desde la infusión constante de la GnRH hasta la liberación de la LH y la GSH, un decremento en la producción de estradiol y progesterona y la amenorrea.

Cuando los ovarios son removidos o su función cesa, se da una sobreproducción de FSH y LH, las cuales son excretadas en la orina. La determinación en plasma y orina de LH es una prueba de laboratorio utilizada para evaluar la función de la pituitaria y demostrar la efectividad de las dosis de reemplazo de estrógenos, por medio de la baja en la excreción de LH. Aunque los niveles de FSH declinan una vez que se inicia la terapia de reemplazo hormonal, no regresan a sus niveles normales, debido a la producción inhibida en el ovario. Consecuentemente la determinación de los niveles de FSH para monitorear la efectividad de la terapia de reemplazo hormonal no tiene uso clínico.

c) Efectos en el tracto reproductivo:

Los cambios cíclicos en la producción ovárica de estrógeno y progesterona regulan los eventos correspondientes en las trompas de falopio, útero, cervix y vagina. Fisiológicamente, estos cambios preparan el útero para la implantación del óvulo si este es fertilizado y la secuencia apropiada de eventos en estos tejidos es esencial para un embarazo exitoso. Si el embarazo no ocurre, el endometrio es desechado, lo cual es visible externamente con la descarga menstrual.

El útero se encuentra compuesto por el endometrio y el miometrio. Estas capas de células, las trompas de falopio, el cervix y la vagina presentan respuestas características a los estrógenos y progestinas. Los cambios típicamente asociados con la menstruación ocurren en su mayoría en el endometrio, el cual es desechado durante la descarga menstrual.

Por convención, la menstruación es considerada el inicio del ciclo menstrual; durante la fase folicular o proliferativa del ciclo, el estrógeno inicia la reconstrucción del endometrio por medio de la proliferación y diferenciación: se hacen visibles numerosos procesos mitóticos, el ancho de la capa se incrementa y ocurren cambios característicos en las glándulas y vasos sanguíneos presentes en el tejido. Estos y subsecuentes efectos de los estrógenos y la progesterona son mediados en gran medida por la regulación esteroidea de los factores de crecimiento peptídicos y sus receptores que ejercen acciones paracrinas y autocrinas en el endometrio. Una respuesta importante a los estrógenos en el endometrio y otros tejidos es la inducción del receptor de progesterona, lo cual habilita a las células para responder a esta hormona durante la segunda mitad del ciclo.

En la fase secretoria del ciclo, los niveles de progesterona se incrementan marcadamente debido a la secreción del cuerpo lúteo, y los niveles de estrógenos continúan elevados. La progesterona limita el efecto proliferativo de los estrógenos en el endometrio por medio de la estimulación de la diferenciación. Sus efectos principales incluyen la estimulación de las secreciones epiteliales importantes para la implantación del blastocisto y el crecimiento característico de los vasos sanguíneos del endometrio. La progesterona es importante en la preparación para la implantación y para los cambios que tienen lugar en el útero en el sitio de implantación existe una estrecha "ventana de implantación" que se extiende de los días 19 ó 20 hasta el día 24 cuando las células epiteliales del endometrio son receptivas a la implantación del blastocisto. Debido a que el estatus endometrial es regulado por estrógenos y progestinas, la eficacia de algunos anticonceptivos se debe a que la superficie endometrial no es receptiva a la implantación. Si el embarazo no ocurre la secreción de LH continúa y los niveles de estrógeno y progesterona no pueden ser mantenidos, lo cual da como resultado el desecho del endometrio.

Si la implantación ocurre, la gonadotropina coriónica humana (hCG) es producida inicialmente por las células del trofoblasto y del blastocisto y más tarde por la placenta, la hCG interacciona con el cuerpo lúteo para mantener la síntesis de hormonas esteroideas en las primeras etapas del embarazo. En las últimas etapas la placenta se convierte el sitio de mayor síntesis de estrógenos y progesterona.

En las trompas de falopio los estrógenos estimulan la proliferación y diferenciación, mientras que la progesterona inhibe estos procesos. Los estrógenos también incrementan la contractilidad muscular de las trompas, mientras que la progesterona la disminuye, lo cual afecta el tiempo de tránsito del óvulo al útero. Los estrógenos incrementan el contenido de agua en el moco cervical lo que facilita la penetración del esperma por el cervix y favorecen la contracción rítmica del miometrio uterino, mientras que la progesterona genera el efecto contrario. Estos efectos son fisiológicamente importantes y contribuyen a algunos de los efectos anticonceptivos de los estrógenos y las progestinas.

d) Efectos metabólicos:

Los estrógenos afectan varios tejidos y tienen diversas acciones en el metabolismo de humanos y mamíferos. No en todos los casos está claro si el efecto resulta de la acción hormonal directa en el tejido en cuestión o es secundaria a la acción de la hormona en otro sitio. De cualquier manera está claro que muchos tejidos no reproductivos como el hueso, hígado, SNC y corazón, encuentran niveles bajos de receptores de estrógenos. Muchos de los efectos metabólicos resultan directamente de la acción mediada por el receptor en los

órganos afectados. Los efectos que producen en el metabolismo de lípidos, minerales, carbohidratos y proteínas son particularmente importantes para comprender su actividad farmacológica.

Es ampliamente conocido que los estrógenos tienen un efecto positivo en la masa ósea. El hueso es continuamente remodelado en diversos sitios denominados unidades de remodelación de hueso por medio de la acción resortiva de los osteoclastos y la acción formadora del hueso de los osteoblastos. El mantenimiento de la masa ósea total requiere que la tasa de formación sea igual que la tasa de resorción, lo cual ocurre en la edad adulta temprana (18–40 años), después de esta etapa el proceso predominante es la resorción. Los osteoclastos y los osteoblastos contienen receptores ERs, ARs y PRs (Receptores estrogénicos, androgénicos y de progesterona, respectivamente) funcionales. Los estrógenos regulan directamente a los osteoblastos e incrementan la síntesis de colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, osteonectina, fosfatasa alcalina y otros marcadores de la diferenciación de los osteoblastos. Sin embargo el mayor efecto de los estrógenos es la disminución del número y la actividad de los osteoclastos. La mayor parte de la acción de los estrógenos en los osteoclastos se da por medio de la alteración de las señales de las citocinas (autocrina y paracrina) hacia los osteoblastos. En los osteoblastos y en las células del estroma los estrógenos disminuyen la producción de las citocinas que estimulan a los osteoclastos (IL-1, IL-6 y factor de necrosis tumoral, TNF- α) e incrementan la producción del factor de crecimiento tipo insulina (IGF-1), la proteína ósea morfogénica (BMP-6) y el factor de transformación del crecimiento (TGF- β) los cuales son anti-resortivos.

La acción directa de los estrógenos en los osteoclastos incrementa la tasa de apoptosis, lo cual tiende a reducir su número y afectan el crecimiento óseo y el cierre de las epífisis en ambos sexos. La importancia de los estrógenos en el hombre queda ilustrada en el caso de un paciente que presenta ER completamente defectuosos y manifiesta osteoporosis, epífisis no fusionadas, disminución de la masa ósea incrementada y edad ósea retardada; además se ha observado que la osteoporosis idiopática masculina está asociada con la expresión reducida de los receptores ER- α en osteocitos y osteoblastos.

Los estrógenos presentan diversos efectos en el metabolismo de lípidos; en general elevan ligeramente los triglicéridos séricos y reducen un poco los niveles de colesterol sérico total. Sin embargo sus acciones más importantes son el incremento de los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y la disminución de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de la lipoproteína (a) [Lp(a)]; esta tasa benéfica de HDL y LDL es un efecto colateral importante que se presenta en las terapias con estrógenos en mujeres postmenopáusicas. La presencia de receptores para estrógenos en el hígado sugiere que los efectos benéficos de los estrógenos en el metabolismo de las lipoproteínas pueden estar dados en parte por medio de la acción directa sobre la función hepática. Otros sitios de acción, sin embargo, no pueden ser excluidos; en adición a estos efectos en los lípidos séricos, los estrógenos alteran la composición de la bilis por medio del incremento de la secreción de colesterol y disminuyendo la secreción de ácidos biliares. Esto conduce a incrementar la saturación de la bilis con colesterol.

Los estrógenos no parecen tener efectos mayores en el metabolismo de los carbohidratos y presentan efecto en diversas proteínas séricas, particularmente en aquellas involucradas en las cascadas de coagulación y unión de hormonas; así mismo afectan vías metabólicas

relacionadas con el sistema cardiovascular, sus efectos sistémicos incluyen cambios en el metabolismo de lipoproteínas y en la producción hepática de proteínas plasmáticas, causan un pequeño incremento en los factores de coagulación VII y XII y disminuyen los factores anticoagulantes como las proteínas C, S y la antitrombina III. También se ven afectadas las vías fibrinolíticas y en diversos estudios se ha encontrado disminuyen los niveles de la proteína inhibidora del activador de plasminógeno (PAI-1); ambos efectos opuestos pueden causar efectos adversos.

Mecanismo de acción

Ambos tipos de receptores de estrógenos son factores transcripcionales activados por ligandos que pueden incrementar o disminuir la síntesis de RNAm a partir de los genes blanco. Después de entrar a la célula por medio de difusión pasiva a través de la membrana, la hormona se une a su receptor en el núcleo, que se encuentra en forma monomérica, al unirse se da un cambio de conformación que da como resultado un dímero, el cual tiene una mayor afinidad para unirse al DNA.

El complejo ER/DNA reúne una o más proteínas coactivadoras en la región promotora, los cuales tienen actividad de histona acetilasa y/o recurren a otras proteínas para activar el complejo. La acetilación de las histonas altera la estructura de la cromatina en la región promotora, lo cual da lugar a una serie de eventos que llevan al ensamblaje del aparato de transcripción y al inicio de la misma.

Absorción, distribución y eliminación.

Varios estrógenos se encuentran disponibles para administración oral, parenteral, transdérmica y tópica. Dada la naturaleza lipofílica de los estrógenos, su absorción es buena en general. Existe una gran variedad de preparaciones para su administración por vía oral y ésteres del estradiol de base acuosa u oleosa para su administración por vía intramuscular con una frecuencia mensual o trimestral; los parches transdérmicos se cambian 1 ó 2 veces por semana y liberan estradiol o una combinación de estradiol y acetato de noretindrona, continuamente a través de la piel, también existen preparaciones para su administración vaginal.

La administración oral es la más utilizada para el estradiol, estrógenos conjugados, ésteres de estrona, etinil estradiol y otros estrógenos. El estradiol por sí mismo no se usa en este tipo de administración debido a que presenta un extenso metabolismo hepático de primer paso; las preparaciones de estradiol micronizado producen una mayor superficie de contacto, gracias a lo cual presentan una mayor absorción, pero deben utilizarse dosis altas debido a que la biodisponibilidad absoluta se mantiene baja. El etinil estradiol se utiliza frecuentemente por vía oral, solo o en combinación con progestinas; la sustitución etinil en la posición C 17 inhibe el metabolismo hepático de primer paso. La absorción de estos estrógenos en el tracto gastrointestinal es rápida y generalmente completa. Otras preparaciones orales contienen estrógenos equinos conjugados, ésteres o mezclas preparadas a partir de derivados de plantas; estos son hidrolizados por enzimas presentes en el intestino que remueven los grupos sulfato cargados y permiten la absorción de los estrógenos a través del epitelio intestinal. La estrona, presente en otro tipo de preparaciones, es solubilizada como sulfato y estabilizada con piperazina. Dadas las diferencias en el metabolismo, las potencias de las diversas preparaciones difieren

también, por ejemplo, el etinil estradiol, es mucho más potente que los estrógenos conjugados.

Varios alimentos y derivados de plantas, se encuentran disponibles sin prescripción médica, y dan beneficios similares a los compuestos antes mencionados; estos compuestos pueden contener flavonoides como la genisteína, cumestanos y lignanos, de los cuales se ha informado que poseen actividad estrogénica en pruebas de laboratorio aunque en general esta es menor a la del estradiol; sin embargo su eficacia a dosis relevantes no ha sido comprobada en humanos, y muchos de estos productos contienen otro tipo de compuestos como fitoestrógenos que pueden contribuir a tales efectos.

La administración de estradiol, vía parches transdérmicos provee de una liberación lenta y sostenida de la hormona, distribución sistémica y niveles sanguíneos más constantes que los obtenidos a partir de dosis orales; además, la ruta transdérmica no libera grandes cantidades de la hormona al hígado, vía circulación portal, como después de una administración oral, lo cual explica por que las dos rutas son asociadas con diferentes efectos sobre el perfil de las lipoproteínas.

Otras preparaciones se encuentran disponibles para su administración intramuscular; cuando los ésteres de estradiol se disuelven en vehículos oleosos y se inyectan, presentan una buena absorción; los ésteres alquílicos y arílicos del estradiol se hacen menos polares, correspondientemente la tasa de absorción de las preparaciones oleosas disminuye progresivamente y la duración del efecto se ve prolongada. Una sola dosis de valerato o cipionato de estradiol puede ser absorbida durante varias semanas después de su inyección intramuscular. Las suspensiones que contienen estrona o una combinación de ésteres también son administradas por esta vía. Las preparaciones de estradiol y estrógenos conjugados se encuentran disponibles para su administración vaginal y tienen actividad local principalmente aunque no se pueden descartar sus efectos a nivel sistémico, debido a la absorción significativa que tiene lugar en el área.

El estradiol, etinil estradiol y otros compuestos existen en la sangre extensamente unidos a proteínas plasmáticas. El estradiol y otros estrógenos que se encuentran naturalmente en la sangre se unen a la globulina de unión a esteroides sexuales (SSGB, por sus siglas en inglés) y en menor grado a la albúmina sérica. En contraste el etinil estradiol se une en su mayor parte a la albúmina pero no a la SSGB; debido a su tamaño y a su naturaleza lipofílica, los estrógenos no unidos a proteínas rápidamente abandonan el espacio plasmático para distribuirse a otros compartimentos.

Ocurren variaciones en el metabolismo del estradiol de acuerdo a la etapa del ciclo menstrual en que se encuentre y la situación pre o postmenopáusica individual. En general la hormona sufre rápida transformación hepática, con una vida media plasmática medida en minutos; el estradiol se convierte primeramente por la acción de la 17β -hidroxiesteroidehidrogenasa a estrona, la cual sufre una conversión por medio de una 16α -hidroxilación y 17 -ceterreducción a estriol, el cual es el principal metabolito excretado en la orina, también se excretan una gran variedad de metabolitos conjugados con sulfato y ácido glucurónico. Menores cantidades de estrona y estradiol se oxidan a 2-hidroxicatecoles por el CYP3A en el hígado y por el CYP1A en tejidos extrahepáticos o a 4-hidroxicatecoles por el CYP1B1 en sitios extrahepáticos cuando los 2-hidroxicatecoles se han formado en gran cantidad. Los 2- y 4-hidroxicatecoles son inactivados por las enzimas

COMT (catecol-O-metil transferasas), sin embargo pequeñas cantidades son convertidas, por medio de reacciones catalizadas por el citocromo P450 o la peroxidasa, a quinonas o semiquinonas capaces de formar aductos con el DNA o generar especies con oxígenos reactivos (vía ciclo redox) que provocan la oxidación de las bases del DNA.

Los estrógenos sufren de recirculación enterohepática por la siguiente vía:

1. Conjugación en el hígado con sulfatos y ácido glucurónico.
2. Secreción biliar de los conjugados al intestino
3. Hidrólisis en el intestino seguida de reabsorción.

Las determinaciones de estradiol en plasma y orina se utilizan para diversos propósitos. En el ciclo menstrual normal, la media diaria de excreción de estrógenos y sus metabolitos a la mitad del ciclo tiene un máximo de 25 a 100 μg ; el segundo aumento durante la fase luteal es más prolongado, pero la tasa máxima de excreción es pequeña (10 a 80 μg por día). Después de la menopausia el promedio de excreción de estrógenos en mujeres normales es de aproximadamente 5 a 10 μg diarios y la síntesis de estrógenos ocurre principalmente a partir de precursores androgénicos en tejidos no ováricos. Los valores normales en el hombre son de 2 a 25 μg por día, cantidades similares se encuentran en la orina femenina durante la primera semana del ciclo menstrual. En los niños no se encuentran cantidades detectables de estrógenos en la orina. Durante el primer trimestre del embarazo, la placenta se convierte en la principal fuente de estrógenos urinarios, la cual continúa en aumento hasta lograr niveles de 30 mg por día al término del embarazo. En el pasado las determinaciones seriadas de estrógeno en el embarazo se utilizaban para evaluar la función fetal y placentaria, en la actualidad, con el advenimiento de los monitores fetales esta práctica ha caído en desuso.

Usos terapéuticos

Los estrógenos se utilizan principalmente con dos propósitos, en la terapia de reemplazo hormonal en mujeres postmenopáusicas y como componente de formulaciones anticonceptivas.

En el primer caso tienen efecto para la prevención de la osteoporosis, antes de que la pérdida de masa ósea suceda, lo cual se ve ayudado por una ingesta adecuada de calcio y vitamina D, además de ejercicio. También ejercen sus efectos benéficos en el sistema vasomotor, evitando los bochornos y los escalofríos.

Efectos adversos

Los estrógenos resultan altamente eficaces para sus propósitos terapéuticos. La decisión acerca de su uso ha sido ampliamente discutida en base al análisis de la relación riesgo-beneficio para cada paciente.

Históricamente, la mayor preocupación acerca del uso de estrógenos tiene que ver con el cáncer, enfermedad tromboembólica, cambios en el metabolismo de lípidos y carbohidratos, hipertensión, enfermedades de la vesícula biliar, náusea, migraña, cambios de humor y otros efectos secundarios en menor grado.

Es importante considerar que en las preparaciones utilizadas como anticonceptivos la dosis de estrógenos es mayor que en las utilizadas para terapias de reemplazo hormonal y debido a que los efectos adversos son dependientes de la dosis no es adecuado extrapolar los resultados obtenidos en los estudios realizados con preparaciones anticonceptivas y que ciertos efectos que fueron atribuidos originalmente a los estrógenos se deben al componente progestínico.

En varias especies de mamíferos, la administración de estrógenos es seguida por el desarrollo de ciertos tumores, desde estudios realizados en 1936 por Lacassagne, es conocido que pueden inducir tumores en el tejido mamario, útero, testículos, hueso, riñón y otros tejidos; en reportes posteriores se encontró que el uso de estrógenos durante el embarazo incrementa la incidencia de anomalías genitales no malignas en fetos de ambos sexos. Recientes estudios han demostrado que el componente progestínico tiene más relación con el cáncer de mama que los estrógenos.

Los estrógenos orales incrementan hasta tres veces el riesgo de tromboembolismo venoso en mujeres con historia de enfermedad cardiovascular y no incrementa el riesgo de hipertensión.

La náusea y el vómito es la reacción inicial a la terapia con estrógenos en algunas mujeres, pero estos efectos desaparecen con el tiempo y se ven minimizados por medio de la ingesta junto con los alimentos o antes de dormir. Las molestias en los senos y el edema mejoran al disminuir la dosis. Un efecto más grave es que en ciertas mujeres la administración de estrógenos puede causar migraña severa y pueden reactivar o exacerbar la endometriosis.

2.2 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR, HPLC) (3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 19, 20)

La forma más moderna de cromatografía líquida en columna es la denominada de alta resolución o de alta presión (CLAR por sus siglas en español, HPLC en inglés), es un área de la química analítica cuyo crecimiento ha sido muy rápido y tiene un gran potencial dentro del análisis farmacéutico. Es una técnica que permite la separación, aislamiento y cuantificación de los diferentes componentes de una mezcla. Dicha separación se fundamenta en la distribución entre dos fases: una estacionaria sólida y una fase móvil líquida, en donde cada uno de los componentes de la mezcla es retenido selectivamente por la fase estacionaria. La separación puede darse por medio de procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, dependiendo del tipo de fase estacionaria utilizada. Esta técnica presenta muchas ventajas con respecto a otros métodos entre las cuales se encuentran las siguientes:

- Permite la separación, identificación y cuantificación de varios compuestos a la vez.
- Se pueden separar compuestos dentro de un amplio rango de masas moleculares (de 54 a 450,000 g/mol)
- Las cantidades que pueden ser detectadas varían desde picogramos y nanogramos hasta miligramos, (de acuerdo a la escala de trabajo: analítica, semipreparativa o preparativa).
- No es necesario que los analitos de interés sean volátiles o someter las muestras a un proceso de derivatización.
- Las muestras se disuelven en un disolvente adecuado y la mayoría de las separaciones se llevan a cabo a temperatura ambiente.
- Se pueden analizar compuestos con un amplio rango de polaridades en una misma corrida.
- Los compuestos termolábiles pueden ser analizados sin riesgo de descomposición.
- El tiempo de corrida en la mayoría de los análisis es menor a 30 minutos

Clasificación de los tipos de HPLC

Existen diversas maneras de clasificar a la cromatografía líquida en columna. Con base en la naturaleza de la fase estacionaria y en el proceso de separación, se pueden especificar tres tipos.

La cromatografía de adsorción, en donde la fase estacionaria es un adsorbente (como gel de sílice o cualquier empaque con sílice) y la separación se basa en repetido pasos de adsorción-desorción.

La cromatografía de intercambio iónico, donde la fase estacionaria tiene una superficie cargada iónicamente con iones de carga opuesta a los presentes en la muestra. Esta técnica se utiliza casi exclusivamente para muestras iónicas o con capacidad de ionización. El componente con mayor carga en la muestra, se atraerá a la superficie iónica y así, tardará más tiempo en eluir. La fase móvil es una solución amortiguadora, donde se usa el pH y la fuerza iónica para controlar el tiempo de elución.

La cromatografía de exclusión por tamaño de partícula utiliza una columna empacada con material de tamaño de poro controlado clasificado de acuerdo a su tamaño, y la muestra simplemente se filtra de acuerdo con su tamaño molecular. Las moléculas más grandes pasan rápidamente a través de la columna; las moléculas más pequeñas penetran dentro los poros de las partículas del empaque y eluyen después. Principalmente por las razones históricas, esta técnica también se llama filtración de gel aunque actualmente la fase estacionaria no se restringe a la utilización de geles.

La cromatografía de adsorción se subdivide en dos tipos, de acuerdo a la polaridad relativa de las dos fases: normal y reversa.

En la cromatografía de fase normal, la fase estacionaria es de naturaleza fuertemente polar (por ejemplo, gel de sílice), y la fase móvil es no polar (como hexano o tetrahidrofurano) por lo que se retienen más los analitos polares en la superficie de la columna que los componentes menos polares.

En la cromatografía de fase reversa sucede lo contrario, la fase estacionaria es de naturaleza no polar (hidrofóbica) mientras que la fase móvil es un líquido polar, como mezclas de agua y metanol o acetonitrilo. En este caso los analitos menos polares son los que presentan mayor tiempo de retención.

Casi el 90% de todas las aplicaciones cromatográficas quedan comprendidas en la clasificación anterior. La polaridad del eluyente juega el papel más importante en todos los tipos de HPLC.

Existen dos tipos de elución: isocrática y por gradiente. En el primer tipo la composición del eluyente es constante y se bombea a través de la columna durante todo el tiempo que dura el análisis. En el segundo caso la composición del eluyente se va cambiando durante el tiempo que dura la corrida.

Características principales de la HPLC

Dentro de las características principales de la HPLC se tiene el uso de columnas de acero de diámetro pequeño (2-5 mm), reutilizables, empacadas con partículas de diámetro muy pequeño (3, 5 y 10 μm), desarrollo constante de nuevas sustancias para su uso como fases estacionarias, trabajo a alta presión y flujo controlado de la fase móvil, introducción de cantidades precisas de muestra sin necesidad de utilizar grandes cantidades, tiempo de análisis rápido y alta resolución.

Inicialmente, se seleccionó a la presión como la característica principal de la HPLC. Esto era, sin embargo, un término que parece indicar que la mejora en el desempeño se debe principalmente a la presión alta que manejan los sistemas. Sin embargo, esto no es completamente verdadero. De hecho, esta mejora es el resultado de muchos factores: partículas muy pequeñas de estrecho rango de distribución y tamaño del poro uniforme, inyectoras que manejan volúmenes pequeños de manera exacta, y buenos sistemas de bombeo. Naturalmente, se necesita presión para permitir el flujo de la fase móvil; por otra parte, la presión es un factor negativo que no contribuye a la mejora en separación. Gracias a esto, actualmente es más común referirse a la técnica como cromatografía líquida de alta resolución.

Mecanismo de retención

En general, la HPLC es un proceso de adsorción dinámico. Las moléculas del analito, al moverse a través del empaque poroso, tienden a interactuar con los sitios de adsorción presentes en la superficie. Dependiendo del tipo de HPLC, pueden incluirse diferentes tipos de fuerzas de adsorción en el proceso de la retención: hidrófobo (no específico) es el tipo principal de interacción que se da en las separaciones en fase reversa, dipolo-dipolo (polar) interacciones dominantes en la fase normal, interacciones iónicas, que son las responsables de la retención en la cromatografía de intercambio iónico. Todas estas interacciones son competitivas, las moléculas del analito están compitiendo con las moléculas del eluyente por los sitios de adsorción.

Terminología y conceptos en HPLC

Parámetros de retención

La manera más fácil de conocer la retención es medir el tiempo entre el momento de la inyección y el máximo de la respuesta detectada para el compuesto correspondiente. Este parámetro normalmente se denominó tiempo de retención (T_r) y es inversamente proporcional a la velocidad de flujo de eluyente.

El producto del tiempo de retención y la velocidad de flujo, se le denomina volumen de retención (V_R), que es un parámetro de retención global y representa el volumen de eluyente que atraviesa la columna mientras eluye un componente en particular.

El V_R puede dividirse en dos partes: el volumen de retención reducido, que es el volumen de eluyente que atravesó la columna mientras el componente estaba en contacto con la superficie de la fase estacionaria y el volumen muerto que es el volumen de eluyente que atravesó la columna mientras el componente estaba siendo llevado a la columna junto con la fase líquida.

El volumen muerto (V_0) es igual al volumen de la fase líquida en la columna, y será el mismo para cualquier componente que eluya en esta columna.

El volumen de retención es independiente de los parámetros de flujo para la corrida en particular, pero depende de los parámetros geométricos de la columna. El V_r será diferente para el mismo compuesto en columnas diferentes empacadas con el mismo tipo de adsorbente.

El parámetro de retención más universal y fundamental es la proporción existente entre el volumen de retención y el volumen del muerto (k).

Esta proporción se encuentra representada por la siguiente ecuación:

$$k = V_R / V_0$$

Históricamente, un parámetro de retención ligeramente diferente conocido como factor de capacidad, (k') y fue introducido y ampliamente aceptado en la práctica.

El factor de capacidad es adimensional e independiente de cualquier parámetro geométrico de la columna o del sistema de HPLC. Podría considerarse que es una característica termodinámica del sistema específico adsorbente-compuesto-eluyente. Se encuentra descrito por la siguiente ecuación:

$$k' = (V_R - V_0) / V_0$$

Eficiencia

La eficiencia de una columna se puede determinar por medio del número de platos teóricos, que no solo evalúan la eficiencia de la columna, sino del sistema cromatográfico en su totalidad.

Después de una inyección el ancho del pico correspondiente puede incrementarse durante su movimiento a través de la columna, cuanto mayor sea este incremento, disminuye la posibilidad de separar una mayor cantidad de componentes en un tiempo determinado.

El ancho del pico es dependiente de varios parámetros como la longitud de la columna, la velocidad de flujo y el tamaño de partícula. La velocidad de flujo es el único parámetro que puede cambiarse en la corrida para continuar probando en la misma columna. Por lo cual se considera mejor utilizar un valor relativo para expresar eficiencia de la columna.

En la práctica se usa normalmente el valor N, el cual se ha vuelto una expresión aceptada de la eficiencia de la columna. La razón para su utilización se relaciona al hecho que no es la desviación estándar, sino su cuadrado, la varianza, la medida básica de la distribución normal. El valor N se asigna al número de platos teóricos. El término de plato teórico viene de la analogía con la teoría de la destilación. En la práctica, es más conveniente medir el ancho del pico a la altura media.

El número de platos teóricos depende de la longitud de la columna: a mayor longitud, N es mayor. Por consiguiente, se ha introducido el término de altura de platos para determinar que tan eficazmente se ha empacado la columna. A menor altura y mayor número de platos, más eficaz se considera una columna cromatográfica.

Selectividad y Resolución

La selectividad es la proporción existente entre los factores de capacidad de dos picos y representa el poder de separación de un adsorbente específico a la mezcla en particular de estos componentes.

Este parámetro es independiente de la eficiencia de la columna, y sólo depende de la naturaleza de los componentes de la mezcla, tipo y composición del eluyente y a las características químicas del adsorbente. En general, si la selectividad de dos componentes es igual a 1, no hay ninguna manera de separarlos mejorando la eficiencia de la columna.

La resolución es el parámetro que describe el poder de separación de un sistema cromatográfico completo a los componentes particulares de una mezcla. Por convención, la

resolución (R) se expresa como la proporción de la distancia entre dos máximos del pico al valor medio del ancho del pico a la línea base.

Si nosotros aproximamos los picos a triángulos simétricos, tenemos que si R es igual o mayor a 1 los componentes están completamente separados. Si R es menor a 1, entonces se traslapan los componentes.

Ecuación de Van Deemter

Ahora se reconoce que existen tres procesos principales por medio de los cuales se ve afectada la separación de los componentes de una mezcla al momento de eluir a través de una columna, las cuales son: trayectorias múltiples de un analito a través del empaque de la columna, la difusión molecular y el efecto de transferencia de masa entre las fases.

En 1956 J.J. Van Deemter introdujo la ecuación que combinó las tres fuentes y las representó como la dependencia de la altura de los platos teóricos (HETP) y la velocidad lineal en la fase móvil. Originalmente, se introdujo para la cromatografía de gases, pero se observó que los mismos procesos físicos ocurren en HPLC, por lo cual esta ecuación puede ser utilizada.

A continuación se describen brevemente los tres factores antes mencionados:

1) Trayectoria múltiple: La velocidad de la fase móvil en la columna puede variar significativamente debido al diámetro de la columna y puede depender de la forma y porosidad de la partícula y de la estructura de la capa entera

El ensanchamiento de los picos es causado por las diferentes velocidades de flujo a través de la columna, el cual puede reducirse, incrementando la eficiencia, por medio de la reducción del diámetro de la partícula, lo que implica el aumento de la presión en la columna.

2) Difusión molecular del analito: Se sabe que las moléculas se dispersan o mezclan debido a la difusión. La difusión longitudinal, a lo largo del eje de la columna, lleva al ensanchamiento de los picos. Tenemos que a mayor velocidad del eluyente, menor es el efecto de la difusión en el ensanchamiento del pico. La difusión molecular en la fase líquida es aproximadamente cinco órdenes de magnitud menor que en fase gaseosa, este efecto es casi despreciable en las proporciones normales de flujo en HPLC.

3) Transferencia de masa: Hay dos acercamientos básicos para la descripción termodinámica de los fenómenos de retención en HPLC, uno es basado en la teoría de partición y otro en la adsorción.

La partición es un cambio de concentración en el sistema debido a la distribución de los componentes entre dos o más fases y la adsorción es el cambio de concentración en el sistema en la interfase, debida a las fuerzas de la superficie.

La fase es una materia uniforme en su composición química y estado físico; en HPLC se tienen dos fases principales: la fase móvil (eluyente) que es un disolvente líquido o mezcla de disolventes que se mueven a través de la columna cromatográfica llevando el analito y

la fase estacionaria (adsorbente) que es un sólido que consiste en partículas porosas rígidas, normalmente con base de sílice, con propiedades de superficie específicas (química de la superficie).

Se considera que las partículas del adsorbente son insolubles y no son permeables en el eluyente y que sólo introducen fuerzas de superficie en el sistema.

La descripción usual de la cromatografía líquida considera la existencia de una fase líquida separada que está en contacto con la superficie del adsorbente. Las fases químicamente modificadas normalmente son consideradas de esta manera. La fase más utilizada es la compuesta por octadecilsilano. El concepto principal es que las moléculas del analito pueden penetrar entre estas cadenas alquílicas. Este proceso se considera termodinámicamente como la disolución de las moléculas del analito en la fase alquílica de la superficie.

Instrumentación

La instrumentación básica de un sistema HPLC incluye los siguientes elementos: bomba, inyector, columna, detector y un sistema de recolección de datos, interconectados entre sí. La parte principal del sistema es la columna donde se lleva a cabo la separación. El proceso cromatográfico inicia con la inyección del soluto a la columna, la separación de los componentes ocurre al bombear la fase móvil a través de la misma, eventualmente cada componente eluye de la columna dejando una señal característica que es registrada como una banda o pico por el sistema de recolección de datos. La respuesta del detector a cada componente se muestra por lo general en la pantalla de una computadora, obteniéndose un gráfico conocido como cromatograma. Para coleccionar, analizar y almacenar los datos obtenidos se utilizan computadoras, integradores y otro tipo de procesadores de datos.

Se utilizan reservorios de fase móvil, y filtración que son importantes sin formar parte del instrumento en sí. El tipo más común de reservorios para disolventes y fases móviles son los envases de vidrio, en el mercado se encuentran disponibles recipientes con tapas especiales que evitan la evaporación y contaminación del contenido. Los filtros y tubería de teflón son los más utilizados para la conexión hacia la bomba. La eliminación de los gases presentes en los disolventes se puede realizar por medio de desgasificadores integrados al equipo.

Bombas

Se considera que la bomba es uno de los componentes más importantes en un sistema de HPLC, tiene que proporcionar un flujo constante y continuo del eluyente a través del inyector, la columna y el detector. Las dos clasificaciones básicas son las de presión constante y de flujo constante. El primero sólo se usa para columna de condensación y el segundo tipo es el más ampliamente utilizado en todas las aplicaciones de HPLC comunes.

Se necesitan bombas de alta presión para forzar a los disolventes a pasar por la tubería y la columna, entre más pequeño sea el tamaño de partícula de la fase estacionaria se requiere de una presión mayor. La estabilidad del flujo es una de las características a considerar en el sistema de bombeo. Tasas de flujo muy estables ayudan a la mejor realización del análisis.

Una característica en las bombas disponibles actualmente es el control electrónico externo, lo cual es muy importante para la automatización de los sistemas y para la utilización de gradientes.

Las bombas modernas cuentan con las siguientes características: intervalo de flujo de 0.01 a 10 mL/min, baja variabilidad en el flujo no más de 1%, intervalo de trabajo de 1 a 5000 psi.

- **Bombas de presión constante**

Las ventajas primarias de este tipo de bombas son su simplicidad y el hecho de proporcionar una línea base muy estable. Las más sencillas son normalmente baratas, fáciles de operar y de mantener. Entre sus desventajas se encuentra el hecho de que la proporción de flujo debe supervisarse cuidadosa y constantemente, ya que las proporciones de flujo varían si la viscosidad del disolvente cambia debido a la temperatura o cambio en la composición.

Estos cambios en proporción de flujo pueden influir en los análisis cualitativos, debido a que la identificación del componente se basa principalmente en la comparación de tiempos de retención. Si éstos cambian como resultado del cambio en la proporción del flujo, sobre todo durante el análisis de mezclas complejas, la identificación se torna difícil. En análisis cuantitativos, los detectores más comunes (UV e índice de refracción) son sensibles a la concentración y los cambios en la proporción de flujo afectan el tiempo en el cual la muestra pasa a través de la celda del detector, lo que implica cambios en el área bajo la curva.

- **Bombas de flujo constante**

Los sistemas de flujo constante generalmente son de dos tipos básicos: pistón recíprocante y desplazamiento positivo (jeringa). La ventaja básica de ambos sistemas es su habilidad de reproducir el volumen de elución y área de los picos, sin tener en cuenta cambios de viscosidad.

Bombas de pistón dual: Una manera más eficaz de proporcionar un flujo constante y casi libre de pulsos es el uso de bombas recíprocantes de cabezal dual; las cuales cuentan con dos cámaras que son manejadas por el mismo motor a través de una leva común; dando como resultado, que los dos perfiles de flujo no se solapan, reduciendo las pulsaciones de la bomba significativamente. Puesto que el perfil de la aceleración-desaceleración es no lineal, los tipos más eficaces de estas bombas tienen levas que permiten obtener el traslape mejor de las curvas de presión y obtener flujo constante.

Las ventajas de esta bomba son el depósito de disolvente ilimitado que permite el uso desatendido a largo plazo, el cambio rápido y la facilidad de limpieza. Sin embargo, a menos que se hayan tenido cuidados especiales al momento de su fabricación, estas bombas pueden tener varias desventajas, debido a que cada cabeza tiene dos válvulas check, la confiabilidad de la bomba depende de la limpieza de la fase móvil y la capacidad de sellado continuo de las cuatro válvulas check en cada ciclo.

Las mejoras recientes a este sistema de bombeo incluyen: un software que se usa para lograr el máximo traslape de golpes de la bomba, lo que produce pulsaciones virtualmente indetectables, líneas inlet/outlet para permitir el vaciado completo cuando se cambian disolventes o si el aire es inadvertidamente arrastrado a través de la bomba, se utilizan válvulas check de volumen pequeño para permitir a las bombas funcionar confiablemente a proporciones de flujo tan bajo como 0.001 mL/min. Esto tiene el beneficio agregado de proporcionar reproducibilidad excelente sobre todo cuando se trabaja con concentraciones sumamente bajas, los componentes requeridos para su mantenimiento se encuentran fácilmente accesibles, tienen un intervalo de flujo amplio (0.01 a 10 mL/min) sin cambio de componentes.

Las válvulas de la bomba recíproca son la parte más débil del sistema ya que pueden contaminarse fácilmente o taparse, lo que lleva al mal funcionamiento de la bomba. La mayoría de los instrumentos recientes utilizan pistones duales mejorados que tienen dos o tres válvulas check.

Bombas tipo jeringa: Las bombas tipo jeringa generalmente consisten en un cilindro que contiene la fase móvil que es expelida por un pistón. El pistón avanza por medio de un motor para proporcionar flujo libre de pulsos.

Las bombas de jeringa tienen varias ventajas. La capacidad de presión es bastante alta (hasta 78,000 psi) y el mantenimiento es poco frecuente ya que no hay ninguna válvula check que proporcione fluctuaciones.

Las desventajas del sistema son las posibilidades limitadas para la utilización de gradientes y la capacidad de depósito limitada.

Pueden combinarse dos de estas bombas fácilmente y manejarse a través de un sistema electrónico que proporciona fase móvil mixta y funcionamiento programado, o se pueden sincronizar para que una bomba pueda recambiarse mientras la otra está operando para obtener una elución continua.

Gradientes.

En muchos de los tipos de la cromatografía de líquidos moderna, se pone de manifiesto el hecho de que el sistema más práctico para la entrega de fase móvil es el que puede combinar varios líquidos en proporciones diferentes de acuerdo a las necesidades del análisis. Lo cual es de gran utilidad en el proceso de seleccionar la mezcla óptima requerida para la separación.

Desde el punto de vista de la instrumentación los dos métodos primarios para realizar este tipo de mezcla son conocidos como mezcla a alta presión y mezcla a baja presión.

En los sistemas de mezclado a alta presión, se usan bombas individuales para proporcionar cada disolvente. Cada una de las bombas se conecta a una cámara de mezclado. En este caso, los dos flujos se mezclan y se dirigen al inyector y a la columna. En otras palabras, el mezclado es llevado a cabo por las bombas.

Entre las ventajas de estos sistemas están la habilidad de lograr un control preciso y la repetibilidad en las mezclas de la fase móvil, respuesta rápida a los cambios en la

concentración y la habilidad de utilizar cada bomba separadamente si se requieren sistemas isocráticos separados.

Dentro de las desventajas se encuentra el hecho de que ni siquiera las cámaras de mezclado especiales proporcionan un mezclado completo, la exactitud de la mezcla se encuentra dentro del 0-10%.

En los sistemas de mezclado a baja presión, la proporción de flujo global es controlada por una sola bomba. En general, se usan dos tipos de sistemas de mezclado: en un primer caso, proporcionado por medio de válvulas, que entregan los disolventes individualmente; cada válvula se abre durante un periodo apropiado de tiempo. Por lo general, las válvulas entregan los disolventes individuales a una cámara de mezclado, que entonces alimenta la mezcla a la bomba.

Problemas durante el proceso de bombeo

Los problemas más comunes encontrados son la desgasificación de los disolventes, la corrosión y la compresibilidad.

En cuanto a la desgasificación ya se ha mencionado que cuando la fase móvil contiene gas excesivo, la parte disuelta gracias a la presión, pueden salir de la solución a la salida de la columna o en el detector, produciendo picos extraños producto de burbujas microscópicas que cambian la naturaleza del flujo, lo que lo hace heterogéneo, esto puede ocurrir gradualmente provocando la acumulación de burbujas, mismas que se pueden introducir en el detector. El problema principal se encuentra en el oxígeno del aire disuelto en disolventes polares, particularmente el agua,

La desgasificación puede lograrse por uno de los métodos siguientes o su combinación: sometiendo el líquido al vacío, por calentamiento, por medio de baños de ultrasonido, o burbujeando una corriente de helio. Los mejores resultados se obtienen aplicando vacío a cada disolvente aproximadamente 5 min. y purga subsecuente con helio.

En cuanto a los problemas de corrosión actualmente se construyen instrumentos con acero inoxidable tipo 316 que presenta mejor resistencia a la corrosión. Es inerte a todas las bases, los líquidos orgánicos y la mayoría de los ácidos no halogenados a valores de pH menores a 2.0. Sin embargo, es sumamente vulnerable a los ácidos halogenados, incluso a concentraciones de 0.01 N.

Inyectores

La introducción de la muestra al sistema se puede lograr de varias maneras. El método más simple es usar una válvula de inyección. En sistemas de HPLC más sofisticados, se han incorporado dispositivos automáticos donde la introducción de la muestra se hace con la ayuda de automuestreadores y microprocesadores.

En HPLC, pueden inyectarse muestras líquidas directamente y las muestras sólidas sólo necesitan ser disueltas en un disolvente apropiado. El disolvente puede no ser la fase móvil, pero frecuentemente se utiliza para evitar interferencias en el detector o en la columna. Siempre es mejor eliminar las partículas de la muestra por medio de filtración, o centrifugando para evitar el taponamiento de los dispositivos de inyección o las columnas.

La cantidad de muestra puede variar ampliamente. La disponibilidad de detectores muy sensibles frecuentemente permite el uso de cantidades de muestra muy pequeñas.

Los inyectores para los sistemas de HPLC deben dar la posibilidad de inyectar la muestra dentro de un intervalo de volumen de 0.1 a 100 μL con buena reproducibilidad y presión aceptable. También deben proporcionar un mínimo incremento en el ancho de los picos y evitar posibles perturbaciones de flujo.

- ***Inyector de rodina***

Debido a sus características se pueden introducir muestras de manera reproducible en las columnas presurizadas sin la interrupción significativa del flujo, incluso a temperaturas elevadas.

Una jeringa especialmente diseñada puede usarse para inyectar un volumen pequeño (<10 μL) aunque en este caso la precisión en la introducción de la muestra es dependiente en la precisión de la jeringa.

El movimiento del rotor de la válvula en el sentido de las agujas del reloj pone la muestra en el flujo de la fase móvil, con la inyección subsecuente de la muestra hacia la columna a través de una baja de volumen. Otro tipo de inyectores que manejan válvulas utilizan una cavidad interior que consiste en una ranura anular en una vara corrediza que se empuja en el sentido del flujo.

- ***Inyectores automáticos***

Comercialmente se cuenta con dispositivos automáticos que permiten el análisis de un gran número de muestras sin la intervención constante de un analista.

La mayoría de los automuestreadores tiene un pistón que inyecta por medio de una bomba que succiona un volumen preestablecido y lo transfiere por medio de una válvula de seis puertos normal. Los más simples utilizan un dispositivo especial con una aguja que empuja y cambia de sitio la muestra a través de una válvula. La mayoría ofrece la ventaja de poder ser controlados por medio de microprocesadores.

Columnas

Las columnas más comunes son de 10, 15 y 25 cm de longitud y de diámetro sumamente pequeño (3, 5 o 10 mm). El diámetro interior de las columnas normalmente es 4 o 4.6 mm, sin embargo, si es necesaria la recolección de las sustancias puras (fase preparativa), puede requerirse de columnas de diámetro mayor.

Las columnas utilizadas en HPLC se encuentran empacadas con la fase estacionaria elegida de acuerdo al tipo de análisis que se va a realizar.

La sílice porosa es el material más ampliamente utilizado en HPLC. Su composición química podría expresarse como $\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

La formación de la sílice porosa consiste de varios pasos:

- Formación de soles de sílice. Un sol es básicamente un tipo de emulsión de partículas de sílice coloidales de tamaño de 1 a 100 nm formados por policondensación de silicatos disueltos a pH ~ 8. Estas partículas son esféricas, no porosas y amorfas.
- Formación de hidrogeles. Las partículas de sílice dispersas en el sol tienden a agregarse para formar una estructura tridimensional de partículas unidas juntas. Este proceso lleva a la formación de una masa gelatinosa, denominada hidrogel de sílice.
- Secado del hidrogel (formación de xerogeles). Lavando el hidrogel de sílice se elimina el agua por medio de un tratamiento con calor para formar un xerogel, que es una sílice rígida y porosa cuya superficie interior no es lisa debido a la formación de enlaces cruzados entre las partículas de sílice pequeñas no porosas. Los tratamientos hidrotérmicos especiales son necesarios para la cementación de partículas de sílice por un proceso de disolución-deposición. La molienda de los xerogeles de sílice es la manera más usual de producir partículas irregulares. El cribado subsecuente permite separar partículas del cierto tamaño y distribución. La práctica ha mostrado que las columnas con partículas irregulares tienen una eficacia más baja que las columnas con partículas esféricas, estas últimas son sin embargo normalmente más caras.

Se han introducido varios procedimientos diferentes de fabricar las partículas de sílice esféricas. Los principios básicos son la emulsificación de soles de sílice en un líquido del inmiscible y la conversión de gotas en hidrogeles de sílice. El tamaño de la gota puede ser controlado por la viscosidad del sol.

Características de las partículas

La columna de HPLC normalmente contiene partículas pequeñas del adsorbente, de forma preferentemente esférica.

Tamaño y distribución de las partículas:

El tamaño de la partícula es determinado por su geometría. Para las partículas esféricas, es su diámetro. Para las partículas de superficie irregular es el diámetro de la esfera equivalente que tiene el mismo volumen que la partícula. Siempre se obtienen partículas de sílice con una distribución de tamaño de partícula específico. La mayoría de los materiales utilizados en HPLC tiene una distribución de tamaño de partícula de tipo gaussiano y la desviación estándar representa la amplitud del intervalo de distribución.

En la práctica, se puede lograr una distribución de tamaño de partícula más uniforme en la columna lo que incrementa su eficacia. La presencia de partículas muy pequeñas (menos de 1 μm), puede tapan los frits de la columna subiendo la presión excesivamente.

Distribución, forma y tamaño de poro:

Uno de los parámetros más importantes del adsorbente es el tamaño y la distribución del poro. El área del adsorbente es un factor que afecta directamente la retención del analito.

El tamaño del poro define la habilidad de las moléculas del analito para penetrar dentro de la partícula y actuar recíprocamente con su superficie interna. La superficie en que la interacción molecular ocurre principalmente en la superficie interna de la partícula.

La forma del poro es esencialmente desconocida, pero podría aproximarse a uno de los siguientes modelos de poro básicos: los poros cilíndricos (redondos en sección cruzada), poros de cuello de botella (cuello estrecho y cuerpo ancho) y de abertura con platos paralelos.

La decisión acerca de que modelo normalmente está sujeta al tipo de adsorbente particular basado en los cálculos del volumen del poro y área de la superficie y en su comparación con valores obtenidos experimentalmente.

La distribución de tamaño de poro es un parámetro secundario que podría ser medido por adsorción-desorción de un gas a baja temperatura. Para HPLC lo más importante es la ausencia de poros de diámetro menor a 50 Å.

La superficie del adsorbente es el factor que más influye en la retención. La geometría de la superficie define la accesibilidad de los sitios de adsorción.

La forma de superficie de la sílice es básicamente desconocida. El único método que permite la medida directa de la forma de la superficie es la microscopía de fuerza atómica (AFM) que se basa en el examen de la superficie con una sonda especial. La AFM sólo puede emplearse para la medida de la superficie exterior.

En cuanto a la forma de la superficie de la sílice, se asume que la geometría de la superficie interna de las partículas del adsorbente es lisa, sobre todo después del tratamiento hidrotérmico del xerogel de sílice.

Un conocimiento exacto del área superficial del adsorbente es muy importante, debido a que la retención es proporcional a la misma.

El método más popular para determinar el área superficial es el de adsorción de nitrógeno a baja temperatura. A esta temperatura la mayor parte del adsorbente no muestra ninguna interacción específica, y la adsorción de las moléculas de nitrógeno puede ser aproximada por el modelo de monocapa. Una molécula de nitrógeno normalmente ocupa 16.2 Å en la superficie polar. Así, si se conoce la cantidad de moléculas y el área superficial de una molécula, podemos calcular el área total de la superficie del adsorbente.

Estas medidas dan el valor del área superficial total del adsorbente. Las moléculas de los diferentes analitos son normalmente más grandes que las moléculas de nitrógeno, y no podrían poder penetrar todos los poros, así que el área de la superficie eficaz que participa en la retención es realmente menor que el área de la superficie total.

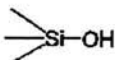
La modificación química de la superficie del adsorbente también tiene una influencia en el área de la misma y en el volumen del poro. Este efecto es muy significativo, la sílica gel tiene un área de superficie original de 350 m²/g, después de la modificación química con octadecilsilano se reduce su superficie a 170 m²/g. Este efecto depende fuertemente de la densidad de la capa y de la longitud de las cadenas enlazadas.

Química de la superficie

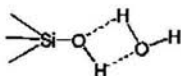
La retención de los solutos en cromatografía de adsorción es afectada por la composición del eluente y principalmente por la naturaleza química de la superficie de la sílice. La síntesis y estabilidad de superficie también son dependientes de la química de la superficie de la sílice, tipos de silanoles en la superficie y su reactividad.

Hay cinco tipos diferentes de sitios de adsorción en la superficie de la sílice totalmente hidroxilada:

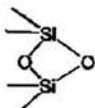
1. Silanol libre



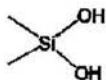
2. Silanol agrupado físicamente con el agua del adsorbente



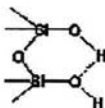
4. Uniones de siloxano



5. Grupos de silanol geminales



6. Grupos de silanol con uniones de puentes de hidrógeno



Los grupos silanol son débilmente ácidos. La concentración máxima de grupos silanol en la superficie de la sílice porosa es de 8 a 9 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ o alrededor de 5 grupos hidroxilo por 100 Å^2 .

La mayoría de las propiedades cromatográficas de la superficie de la sílice se relaciona a las interacciones con grupos silanol, aunque el siloxano y el hidrógeno también pueden contribuir a la actividad de la superficie.

La adsorción física normalmente tiene lugar a través de fuerzas de repulsión y atracción con la superficie: interacciones hidrofóbicas, fuerzas de dispersión de London, atracciones dipolo inducido, Interacciones dipolares, campo eléctrico de la superficie del adsorbente y traslado de cargas entre las moléculas del analito y el adsorbente (efecto de resonancia).

Es importante mencionar que en HPLC las interacciones superficiales son siempre competitivas. La superficie del adsorbente está en contacto permanente con el eluente. Las moléculas de este actúan recíprocamente con los sitios de adsorción de la superficie según su estructura, polaridad y capacidad de ionización. Las moléculas del analito se adsorben hacia la sílice sólo si su interacción es más fuerte que la de las moléculas del eluente.

La modificación química de la superficie de sílice incluye a todos los procesos que llevan a un cambio en la composición química de la superficie. Pueden distinguirse dos tipos básicos de modificación química: el tratamiento físico (térmico o hidrotérmico) que lleva al cambio en la concentración y proporción del silanol y el siloxano que se agrupan en la superficie y el tratamiento químico que utiliza ligandos orgánicos que modifican significativamente las propiedades de adsorción de la sílice.

Existe una gran variedad de especies químicas que pueden unirse a la superficie de la sílice. El más utilizado es el grupo alquilo R, que puede llevar sustituyentes de diversos grupos funcionales como hidroxilo, fenol, amina, carbonilo, nitrilo etc.

La parte R del grupo funcional puede unirse a los átomos de la sílice de la superficie de las maneras siguientes:

- Si-R: el grupo R se une directamente a los átomos de la sílice de la superficie. La eliminación de los grupos hidroxilo originales puede lograrse por cloración de la superficie con un tratamiento subsecuente con compuestos organometálicos. Este tipo de modificación de la superficie normalmente es muy laborioso y no da resultados reproducibles.
- Si-O-R: Este enlace es conocido como enlace éster y es formado fácilmente por la reacción entre un alcohol y grupos hidroxilo de la superficie.
- Si-O-Si-R: Esta estructura se obtiene por tratamiento de la superficie de la sílice hidroxilada con organosilanos de R_nSiX_{4-n} donde X representa los grupos reactivo como halógenos, etoxi y metoxi. Este tipo de ligandos es ampliamente usado en HPLC.

La reacción de un monoclorosilano con la superficie de la sílice hidroxilada lleva a la unión de un solo ligando de alquilsilano a un grupo silanol. El tipo de capa que involucra la formación de una capa orgánica monomolecular en la superficie de la sílice se denomina unión monomérica.

Las fases poliméricas pueden ser preparadas por medio de una reacción entre la sílice con di - o triclorosilanos en la presencia de cantidades mínimas de agua que lleva a la formación de estructuras tipo árbol que se agrupan de superficie de la sílice.

La accesibilidad de los silanoles residuales puede ser estimada por la densidad de los ligandos que tiene unidos. Este parámetro no puede medirse directamente, se calcula en base a la cantidad de carbono.

Este carbono es el peso de los átomos del carbono presentes en el adsorbente, determinado por análisis elemental. Normalmente los datos del análisis elemental son muy precisos (<0.2%). Pero las cantidades altas o bajas de carbono en el adsorbente no dicen nada sobre la densidad de enlace, porque se debe considerar para un área específica de la superficie del adsorbente.

Es importante considerar la accesibilidad de la superficie total del adsorbente durante el proceso de modificación. Si la sílice original tiene una distribución de tamaño de poro amplia y alguna cantidad de mesoporos está presente, la superficie dentro de estos poros no será accesible para las moléculas del alquilclorosilano, y esta superficie no se cubrirá. Los cálculos de la densidad basados en el carbono y área de la superficie de este tipo de sílice tendrán un mayor grado de error.

El área del adsorbente cambia significativamente después de la modificación. Considerado un modelo de poro cilíndrico se puede calcular la nueva superficie teórica del adsorbente después de la modificación.

Si se asume la posible densidad de unión más alta por las cadenas C18, entonces estas cadenas probablemente se enderezarán y el promedio del espesor de capa garantizado será de 21 - 22 Å.

El término "endcapping" se introdujo a finales de los años 70, cuando se puso de manifiesto que algunos silanoles todavía siguen accesibles después de la modificación de la superficie con ligandos de cadena larga.

El trimetilclorosilano es el reactivo más común utilizado para cubrir silanoles residuales accesibles. Esta molécula es relativamente pequeña y puede penetrar a la superficie de sílice y cubrir algunas áreas con silanoles que no reaccionaron. Generalmente este proceso lleva a la mejora significativa de las propiedades del adsorbente de fase reversa (menor y más predecible retención de compuestos polares).

Es importante considerar que aún después del endcapping, los adsorbentes basados en sílice contienen casi 50% de sus silanoles originales, pero ellos no están fácilmente accesibles a los analitos.

Dentro de las fases estacionarias más comunes se tienen a las siguientes:

- **C1, C4, C8, C18:** los adsorbentes basados en sílice modificada con trimetilclorosilano (C1) y butildimetilclorosilano (C4) tienen aplicaciones en HPLC, principalmente para separación o purificación de proteínas. Estos adsorbentes muestran interacciones

polares significativas, aunque no tienen interacciones específicas causadas por silanoles ácidas. Los adsorbentes octil (C8) y octadecil (C18) son los más populares.

- **Fenil:** Los ligandos de propilfenilsilano se unen a la muestra de gel de sílice por interacciones de dipolo débiles inducidas por analitos polares. Normalmente este tipo de fase se utiliza para las separaciones de mezclas complejas. Los compuestos amino muestran algunas interacciones específicas con este tipo de adsorbente.
- **CN:** Una superficie modificada con grupos ciano es muy ligeramente polar. Las columnas con esta fase son útiles para las separaciones rápidas de mezclas con componentes muy diferentes. Estas mezclas podrían mostrar un intervalo muy amplio de tiempos de retención en las columnas usuales. Este tipo de columnas pueden utilizarse para separaciones en fase normal y en fase reversa.
- **NH₂:** La fase amino es un intercambiador de aniones débil. Este tipo de columna es utilizada principalmente en modo de fase normal, sobre todo para la retención selectiva de compuestos aromáticos.
- **Diol:** Los dioles son adsorbentes ligeramente polares utilizados para las separaciones en fase normal. Éstos son útiles para la separación de mezclas complejas de compuestos con polaridad diferente, y que normalmente muestran una retención muy fuerte en sílice sin modificar.
- **Fases quirales:** Este tipo de fases estacionarias son las más comunes para la separación de enantiómeros. Para poder separar una mezcla racémica de estereoisómeros, la fase quiral tiene que formar un complejo diastereomérico con uno de los isómeros, o tiene que tener cualquier otro tipo de interacciones estereoespecíficas. El mecanismo detallado del reconocimiento de grupos quirales no se entiende bien todavía.

Columnas preparativas y precolumnas

Existen diversos tipos de columnas que son secundarias a la columna de separación o a la fase estacionaria. Estos son: guard, derivatizante, capilar, columnas rápidas, y preparatorias.

Las precolumnas guard se colocan antes de la columna de separación y sirven como una protección que prolonga la vida y utilidad de la columna de separación. Están diseñadas para filtrar o quitar partículas; compuestos y iones que podrían causar "tendencia básica" y disminuir la resolución, la sensibilidad y crear picos falsos; sustancias que pueden precipitar en contacto con la fase estacionaria o móvil; y compuestos que pueden co-eluir y causar picos extraños que interfieren con la identificación y/o cuantificación. Este tipo de precolumnas deben cambiarse regularmente para mantener su función. El tamaño varía con el tipo de protección requerida.

Las columnas derivatizantes pueden ser relevantes en el análisis de la muestra alterando el compuesto inicial a una molécula secundaria químicamente relacionada o a un fragmento que proporcione datos importantes que puedan complementar otros resultados o el análisis

anterior. Las técnicas de derivatización incluyen principalmente a la acetilación, silylación e hidrólisis ácida.

Columnas capilares: los avances en HPLC llevaron a la utilización de columnas analíticas más pequeñas, también conocidas como microcolumnas, tienen un diámetro menor a un milímetro y existen tres tipos: de abertura tubular, de condensación parcial y condensación hermética; lo que le permite al usuario trabajar con diferentes volúmenes y diferentes proporciones de flujo utilizando poca cantidad de disolvente. Sin embargo, la mayoría de las condiciones y la instrumentación deben miniaturizarse, la proporción de flujo puede ser difícil de reproducir, y se deben cuidar los volúmenes de muestra que se inyectan.

Columnas preparativas: Estas columnas se utilizan cuando el objetivo es preparar cierto volumen (miligramos) de muestra para otro tipo de aplicaciones en el laboratorio. Una columna preparatoria normalmente tiene un diámetro grande que se diseña para facilitar la inyección de grandes volúmenes de muestra.

Para realizar el empaque de las columnas con partículas de diámetro pequeño se requiere de equipo especializado. Por esta razón, se recomienda el uso de columnas preempacadas, ya que es difícil reproducir los resultados de otra manera.

En general, las columnas son bastante durables y se puede esperar una vida útil larga a menos que se usen bajo condiciones intrínsecamente destructivas, como eluentes muy básicos, o con numerosas inyecciones de muestras no filtradas o crudas.

Detectores

Actualmente se utilizan detectores ópticos en la mayoría de los sistemas de HPLC. Estos detectores pasan un haz de luz a través del efluente que sale de la columna hacia la celda de flujo a volúmenes bajos (~ 10 mL). Las ligeras variaciones en la intensidad son debidas a la absorción de UV, emisión de fluorescencia, o cambio en el índice refractivo (dependiendo del tipo de detector utilizado) de los componentes de la muestra que atraviesan la celda. Se registran los cambios de voltaje en un registrador y se alimentan a un integrador o computadora para obtener el tiempo de la retención y el área bajo la curva.

El detector normalmente usado en HPLC es el detector de absorción ultravioleta que es capaz de manejar longitudes de onda de 190 a 460-600 nm.

Otros detectores de uso común incluyen: índice de refracción (RI), fluorescencia (FL), electroquímico (CEE) y espectrometría de masas (MS). El detector de RI es universal pero también el menos sensible, los detectores de FL y CEE son bastante sensibles y selectivos. El detector de MS es el más poderoso pero también el más complicado de manejar y más caro.

Casi todos los detectores de HPLC trabajan a flujo continuo. El único detector fuera de línea relativamente exitoso es el FTIR de disco espiral que requiere del traslado de la muestra en el disco de germanio y para detectarla en el FTIR. Los detectores de HPLC siempre se utilizan bajo condiciones de flujo continuas y la muestra puede estar presente en una cantidad de ng en el detector, sin embargo en análisis de trazas, esta cantidad podría ser incluso menor. La fase móvil es un factor que siempre debe ser considerado.

En la última década ha existido un progreso significativo en el desarrollo de LC/MS que une ambos sistemas. Se dice que MS es el detector de HPLC en línea más sensible, selectivo y al mismo tiempo el detector más universal. Pero todavía es el más caro.

Realmente, no se puede recomendar ningún detector universal, debido a las diferentes aplicaciones que tiene cada uno.

En la presente revisión se mencionaran los detectores de HPLC más comunes: Índice de refracción, UV/Vis de longitud de onda fija, UV/VIS de longitud de onda variable, arreglo de diodos, fluorescencia, conductividad y espectrometría de masas (LC/MS).

- **Requisitos básicos de un detector.**

Sin tener en cuenta el principio de funcionamiento, un detector de HPLC ideal debe tener las siguientes propiedades: bajos niveles de fluctuación y de ruido (particularmente importante en el análisis de trazas), alta sensibilidad, tiempo de respuesta rápido, amplio rango dinámico lineal (esto simplifica la cuantificación), bajo volumen muerto (ensanchamiento mínimo de los picos), celda que evite la mezcla de diferentes muestras, mínima sensibilidad a los cambios en el tipo de disolvente, proporción de flujo y temperatura, simplicidad operacional y confiabilidad, debe permitir el ajuste para que el desarrollo pueda perfeccionarse para compuestos diferentes, no-destrutivo.

Ruido y fluctuaciones:

En HPLC se manejan procesos dependientes del tiempo. La presencia de un componente en la columna y en el detector representado por el cambio o desviación en la señal es básico. Es importante distinguir entre la señal que corresponde al componente y la señal causada por la fluctuación de presión, burbujeo, cambio de composición, etc. Si los picos son bastante grandes, no representa mayor problema el distinguirlos. Sin embargo, en picos más pequeños, es básico contar con una línea poco ruidosa.

El ruido es básicamente la variación en un tiempo corto de la línea base recta causada por fluctuaciones eléctricas, inestabilidad de la lámpara, fluctuaciones de temperatura y otros factores. El ruido entre pico y pico es normalmente moderado: es decir, la distancia del máximo de un pico al valle del próximo. A veces, el ruido se promedia en un periodo previamente especificado de tiempo. El ruido es el factor que limita la sensibilidad del detector. En análisis de trazas, se debe poder distinguir entre el ruido y los picos correspondientes al componente de interés. Un límite práctico para esto es una proporción mayor o igual a 3 en la relación señal/ruido, pero sólo para propósitos cualitativos. El límite práctico para análisis cuantitativos se considera con una relación señal/ruido mayor o igual a 10 y con menos de 2% variación. Esto asegura que la cuantificación de las trazas es correcta.

Otro parámetro relacionado a la fluctuación de la señal del detector es la estabilidad. Un requisito adicional es que la línea base debe desviarse tan poco como sea posible de una línea horizontal. Esto es normalmente determinado durante un tiempo especificado, por ejemplo media hora o una hora.

Sensibilidad:

La sensibilidad es una de las propiedades más importantes de un detector de HPLC y se define como una medida de su habilidad para distinguir entre diferencias pequeñas en la concentración del analito. Por lo general es necesaria la extrapolación con una curva de calibración.

La sensibilidad de un detector no es la cantidad mínima que puede detectar. Este valor es influenciado por las condiciones del sistema cromatográfico. Los primeros picos en eluir son normalmente afilados y los que se obtienen a tiempos de retención más largos, son anchos y a veces más difíciles de distinguir del ruido.

Selectividad:

La selectividad es otra propiedad deseable en los detectores de HPLC. Un detector selectivo permite ver sólo a los componentes de interés a pesar de su coelución con otros. El índice de refracción es un ejemplo de un detector poco selectivo. Cualquier componente podría dar una respuesta, y en casos de mezclas pobremente resueltas no permite distinguir a los diferentes componentes.

Los detectores electroquímicos y de fluorescencia son los más selectivos entre los detectores comunes, sin embargo únicamente el 10% de los compuestos orgánicos son capaces de fluorescer y esto limita su utilización. Escogiendo la excitación y longitud de onda de emisión específica para el compuesto en particular, sólo este puede ser detectado.

Normalmente, a mayor selectividad, el ruido es más bajo, y más alta la sensibilidad.

Los detectores electroquímicos son altamente selectivos debido a que cada analito responde de manera diferente a cambios en el potencial durante la reacción, de esta manera controlando el potencial, controlamos la selectividad.

- **Detector de índice de refracción (RI)**

El detector de índice de refracción (RI) es el único que podría denominarse universal en HPLC.

El principio de su funcionamiento involucra medir el cambio en el índice de refracción del efuente de la columna que atraviesa la celda de flujo. Entre mayor sea la diferencia de entre la muestra y la fase móvil, más grande será el desequilibrio. Así, la sensibilidad será más alta para diferencias más grandes en el índice de refracción entre la muestra y la fase móvil. Por otro lado, en mezclas complejas, los componentes de la muestra pueden cubrir una gama amplia de valores de índice de refracción y algunos pueden emparejarse estrechamente con el de la fase móvil y volverse invisibles al detector. Este detector un instrumento puramente diferencial, y cualquier cambio en la composición del eluente requiere el reacondicionamiento del detector. Este factor limita el uso de este detector en los análisis que requieren el uso de gradientes, donde la composición de la fase móvil se cambia durante el análisis para efectuar la separación.

Actualmente se encuentran disponibles dos tipos básicos de detectores de índice de refracción. Ambos requieren el uso de una celda de dos partes donde el lado que contiene a la muestra constantemente se compara con el lado de la referencia.

Las ventajas de este tipo de detector son: la respuesta universal, la sensibilidad baja a la suciedad y burbujas de aire en las celdas y la habilidad de cubrir el intervalo del índice de refracción de 1.000 a 1.750. Las desventajas son la sensibilidad relativamente baja y la dificultad para quitar fácilmente y limpiar o reemplazar la celda

El índice de refracción de un analito esta en función de su concentración, por lo que los cambios en la concentración se reflejan como un cambio en el valor obtenido. Un detector de índice de refracción para HPLC debe ser sensible los cambios tan pequeños como 10^{-7} (correspondiendo a un cambio en la concentración de 1 ppm). La presencia de aire disuelto, cambios en composición del disolvente y mal mezclado contribuirán a la disminución de la sensibilidad. Para operar a sensibilidades altas, el detector debe tener un termostato ($\pm 0.01^{\circ}\text{C}$), para obtener mejores resultados.

- **Detectores de ultravioleta/visible**

Cualquier compuesto químico podría actuar recíprocamente con un campo electromagnético. La banda de radiación electromagnética que atraviesa la celda de flujo del detector experimentará algún cambio en su intensidad debido a esta interacción. La medida de este cambio es la base de los detectores ópticos en HPLC.

La absorbancia de la radiación depende de la longitud de onda de la misma y de los grupos funcionales del compuesto químico. EL campo electromagnético depende de su energía (frecuencia) puede actuar recíprocamente con electrones que causan su excitación y puede transferirlos hacia un nivel energético más alto, o puede excitar enlaces moleculares que causan la vibración o rotación de un grupo funcional. La intensidad de la banda de energía corresponde a las posibles transiciones disminuirá mientras está atravesando la celda de flujo. Según la ley de Lambert la absorbancia es proporcional a la concentración del compuesto en la celda y la longitud de la misma.

El espectro electromagnético se divide en varias regiones entre las que se encuentran: infrarrojo lejano (IR) de 2,500 - 50,000 nm, infrarrojo cercano de 800 - 2,500 nm, visible de 400 - 800 nm y ultravioleta (UV) de 190 - 400 nm

Las tres regiones (IR, visible y UV) se utilizan en espectroscopía. En HPLC, los espectrofotómetros de IR han tenido uso limitado, debido a que hay pocos líquidos polares transparentes que pueden usarse como fase móvil. Por otro lado los que trabajan en el rango de 200 a 600 nm se usan ampliamente como detectores de cromatografía.

La mayoría de los compuestos orgánicos puede ser analizada por detectores de UV/VIS. Este hecho se debe a la facilidad relativa de su funcionamiento, lo que lo hace el más ampliamente utilizado.

Absorbancia UV: La absorbancia es el logaritmo de la proporción de las intensidades de la luz incidente y la luz transmitida. Está relacionado según la ley de Lambert a la absorptividad molar, al espesor de la celda y a la concentración molar de la sustancia. En el UV, se expresa el intervalo del detector en unidades de absorbancia.

- **Detectores de longitud de onda fija**

Los detectores de HPLC que no permiten cambiar la longitud de onda son llamados detectores de longitud de onda fija. Normalmente son muy baratos, Una lámpara de vapor de mercurio emite una luz muy intensa a 253.7 nm. Filtrándose fuera todas las otras longitudes de onda emitidas, los fabricantes han podido utilizar este 254 nm que era escogido ya que la línea más intensa proporcionada por la lámpara de mercurio es de 254 nm, y la mayoría los compuestos absorben a esta longitud de onda.

- **Detectores de la longitud de onda variable**

Los detectores que permiten la selección de la longitud de onda se denominan detectores de longitud de onda variable y son particularmente útiles ya que ofrecen mayor sensibilidad para cualquier componente seleccionando la longitud de onda apropiada, cuando los componentes de una muestra presenten absorptividad alta a longitudes de onda diferentes y dependiendo del tipo de detector, el cambio de la longitud de onda se hace a mano o se programa en la memoria del sistema.

- **Detectores de arreglo de diodos**

Como ya se mencionó, una característica especial de los detectores de longitud de onda variable es la habilidad de realizar análisis espectroscópicos y dar lecturas de absorbancia precisas. Sin embargo los detectores de arreglo de diodos agregan una nueva dimensión de capacidad analítica a la HPLC porque permite obtener información cualitativa más allá de identificación simple por tiempo de retención.

Existen dos ventajas mayores en este tipo de detector. En primer lugar, permite la selección de la mejor longitud de onda para llevar a cabo el análisis, lo cual es particularmente importante cuando no se cuenta con ninguna información disponible de la absorptividad molar en las diferentes longitudes de onda.

La segunda ventaja se relaciona al problema de la pureza del pico. A menudo, la forma del pico en sí mismo no revela si realmente corresponde a dos o más componentes. En semejante caso, la absorbancia que tiene a varias longitudes de onda es particularmente útil para decidir si el pico representa un solo compuesto o, es de hecho, un pico compuesto.

- **Detectores de fluorescencia**

Los detectores de fluorescencia probablemente son los más sensibles entre los detectores de HPLC modernos. Es posible descubrir la presencia de inclusive una sola molécula del analito en la celda de flujo. Típicamente, la sensibilidad de este tipo de detectores es de 10 -1000 veces más alto que el detector de UV, además de ser muy específicos y selectivos. Esto normalmente se usa como una ventaja en la medida en que se cuente con especies fluorescentes específicas en las muestras.

Aproximadamente el 15% de todos los compuestos tienen una fluorescencia natural. La presencia de electrones π conjugados da la actividad fluorescente más intensa sobre todo

en los componentes aromáticos. También los compuestos alifáticos y alicíclicos con grupos carbonilo y compuestos conjugados presentan fluorescencia, pero en menor grado.

La intensidad de la fluorescencia depende de la excitación y la longitud de onda de emisión lo que permite selectivamente ver algunos componentes mientras se suprime la emisión de otros.

Los detectores disponibles en el mercado difieren en el modo en el que la longitud de onda se controla. Los instrumentos menos caros utilizan filtros; los de costo medio ofrecen un monocromador y controlan por lo menos la longitud de onda de emisión y los instrumentos para investigación de alta calidad proporcionan los monocromadores que controlan la longitud de onda de excitación y de emisión.

- ***Detectores electroquímicos***

El detector electroquímico también es un detector popular en HPLC. Debe ser considerado por su selectividad y sensibilidad para algunos compuestos.

Este detector se basa en la medida de la corriente resultado de una reacción de oxidación-reducción del analito con un electrodo conveniente. Debido a que el nivel de la corriente es directamente proporcional a la concentración del analito, este detector se puede utilizar para cuantificación.

Los eluentes deben contener electrolitos y poseer conductividad eléctrica. La mayoría de los analitos requieren de realizar ajustes de pH.

Las áreas de aplicación de este detector son muy grandes, pero los compuestos para los que es útil, incluyen algunos fármacos importantes, contaminantes y productos naturales. La especificidad y la sensibilidad son muy útiles para el monitoreo de estos compuestos en matrices complejas como fluidos corporales y productos naturales.

La pureza del eluyente es muy importante, ya que la presencia de oxígeno, la contaminación por metales y haluros pueden causar ruido e inestabilidad en la línea base.

- ***Detector de conductividad electrolítica***

La conductividad del efluente de la columna es medida continuamente y la presencia del analito en la celda se indica por un cambio en conductividad.

Normalmente se utiliza un flujo muy bajo a través de un capilar equipado con dos electrodos que detectan variaciones en la conductividad de la fase móvil debida a los componentes de la muestra. La respuesta es lineal en una gama amplia de concentraciones. Su uso más común es en análisis isocráticos.

Sistemas de recolección de datos

Puesto que la señal del detector es electrónica, el uso de software especializado puede ayudar en el análisis. Además, algunos sistemas pueden guardar datos en una forma fácilmente recuperable para su análisis posterior. El objetivo principal del uso de este tipo

de sistemas es aumentar la exactitud y precisión del análisis, reduciendo el tiempo de atención del analista. En análisis rutinario, un sistema que pueda ser preprogramado y cuente con un integrador pueden ser suficientes. Si se desean niveles de eficiencia más altos, es necesario un dispositivo más inteligente, como una estación de datos. Estos cuentan con diversas ventajas como opciones de automatización adicionales fáciles de llevar a cabo, el análisis de datos complejos es más factible. Además se cuenta con la opción de optimizar parámetros en la corrida y sobreposición de picos. Finalmente, pueden diseñarse resguardos del software para reducir el mal uso accidental del sistema. Debido a la alta demanda de estos sistemas se está reduciendo su costo y resultan más prácticos.

Se pueden obtener otras ventajas como el control computarizado de los inyectores automáticos, programación de sistemas multi-bomba y colectores de muestra.

Fases móviles

En HPLC el tipo y composición de la fase móvil (eluyente) es una de las variables que tienen gran influencia en la separación. A pesar de la gran variedad de disolventes utilizados en HPLC, todos deben tener las siguientes propiedades comunes: alta pureza, compatibilidad con el detector, solubilidad de la muestra, baja viscosidad, químicamente inertes y costo razonable.

Cada tipo de HPLC tiene sus propios requisitos, los disolventes utilizados en fase normal son principalmente no polares, para fase reversa normalmente se utiliza una mezcla de agua con algún disolvente orgánico polar como acetonitrilo, para HPLC de exclusión por tamaño de partícula existen requerimientos especiales, deben ser capaces de disolver polímeros y suprimir todas las posibles interacciones de la molécula de la muestra con la superficie del material del empaque.

La fase móvil es el parámetro más importante en HPLC de fase reversa ya que el tipo de fase móvil utilizado puede tener un gran efecto en la retención. Puede promover o suprimir la ionización de las moléculas del analito o cubrir silanoles residuales accesibles o cualquier otra adsorción activa en la superficie del adsorbente.

La selección apropiada de la fase móvil es el segundo paso más importante en el desarrollo del método de separación (el primero es la selección del tipo de adsorbente). El requisito principal para la fase móvil es que tiene que disolver al analito a la concentración conveniente para ser detectado.

La fase móvil en cromatografía de fase reversa tiene que ser polar y mantener una competencia razonable por los sitios de adsorción con las moléculas del analito.

Composición y viscosidad del eluyente.

La variación de la composición del eluyente permite el ajuste de los tiempos de retención de los componentes de la mezcla a los valores deseados. La recomendación usual para este ajuste es guardar los factores de capacidad entre 1 y 10.

La dependencia de la retención con la composición del eluyente tienen una forma exponencial. La separación se puede obtener ajustando las concentraciones de los

diferentes componentes del eluente. La presencia de algún exceso de algunos componentes orgánicos cerca de la superficie del adsorbente disminuirá la interacción del analito y por lo tanto la retención.

La viscosidad del eluente cambia de manera no lineal con la composición, por lo que los cambios en la presión de la columna dependerán de la composición del eluente.

Utilización de gradientes.

De esta manera se denomina a los cambios de la composición de la fase móvil durante la corrida cromatográfica. El propósito principal del uso de gradientes es hacer que los componentes fuertemente retenidos de la mezcla se muevan más rápido, pero conservando una buena resolución con respecto al componente de interés.

Los gradientes también pueden aumentar la eficacia de la columna. En la elución isocrática, el componente más retenido presenta picos más anchos. En un gradiente las moléculas en la cola del pico se moverán más rápidamente. Esto tenderá comprimir la zona y a estrechar el pico del resultante.

La eficacia de un gradiente es fuertemente dependiente de la instrumentación, como se menciona en el apartado correspondiente.

Efecto de la temperatura

La temperatura en HPLC no es tan significativa como en cromatografía de gases debido a que no se maneja el mismo intervalo de temperatura. Por lo general se trabaja en un intervalo de temperatura de 20 a 60 o 70°C.

Los disolventes volátiles no permiten subir demasiado la temperatura, también la estabilidad de los ligandos puede ser influenciada por la temperatura alta. Al aumentar la temperatura disminuye el valor de k' , así el tiempo de la retención real disminuirá.

Hay otros dos efectos significativos en la separación a temperatura elevada; la estabilización de la columna normalmente requiere de más tiempo y si no es la adecuada afecta de manera importante los tiempos de retención. El origen de este efecto no se entiende bien todavía, la posible explicación es que la viscosidad del disolvente disminuye y se requiere mayor tiempo para evitar las fluctuaciones de temperatura locales debido a la fricción provocada por el paso del disolvente a través de la columna, aunque esto torna más uniforme el proceso de adsorción-desorción.

Otro efecto es el aumento de la eficacia de la columna: a temperatura elevada se observa una disminución en la viscosidad de los líquidos y un aumento en el coeficiente de difusión.

2.3 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

2.3.1 Desarrollo de métodos analíticos ^(4, 7, 8, 10, 17, 19, 21)

Antes de iniciar el proceso de validación es importante llevar a cabo la etapa de desarrollo del método, que permite establecer las mejores condiciones de operación, para evitar en la mayor medida posible, problemas críticos durante la validación.

Lo primero que se debe tomar en cuenta al iniciar un desarrollo es de donde partimos, es decir, la forma farmacéutica, el contenido, la manera en la cual se deberá informar el resultado, y el alcance del método, es decir, el uso al cual será destinado.

El desarrollo es un proceso que involucra la investigación previa de las propiedades físicas y químicas del analito o analitos a determinar y de la matriz en la que se encuentra presente, como pKa o pKb, estructura de la molécula, grupos funcionales presentes en ella, tamaño y polaridades de los solutos, propiedades espectrales (UV/VIS etc.), comportamiento redox, intervalo de concentración, solubilidad etc.

De igual manera es importante conocer lo mejor posible los otros componentes presentes en la formulación, principalmente otros activos y conservadores, ya que son los que pueden proporcionar algún tipo de interferencia durante el análisis o en la extracción del componente de interés.

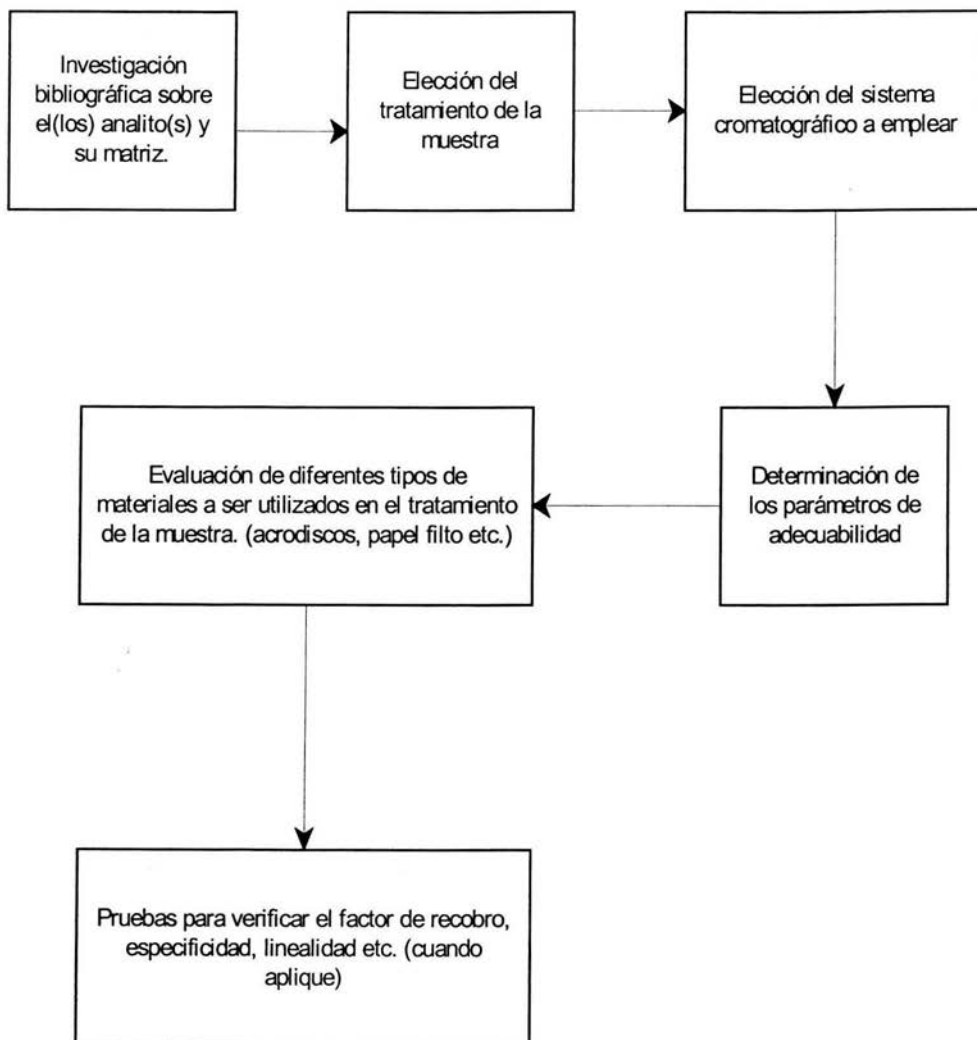
En el caso de los excipientes, puede ser necesario conocer que tipo y en que cantidad se encuentran en la formulación, en el caso de que se presenten problemas y se determine que estos no provienen de los activos o conservadores.

Basándose en estos datos se puede decidir que tipo de columnas probar, composición y proporción de la fase móvil, velocidad de flujo, tipo de detector, manejo de condiciones isocráticas o gradiente, tipo de tratamiento que se le debe dar a la muestra para extraer el compuesto de interés, etc.

Una vez que se han determinado las condiciones de operación tentativas, se debe realizar una etapa de optimización, para tratar de mejorar las condiciones obtenidas hasta encontrar la mejor separación posible de los componentes, con el menor tiempo de análisis y en el caso de determinaciones de trazas o impurezas, verificar el límite de detección y/o cuantificación según aplique, para garantizar que el método es funcional a estas concentraciones.

En general los parámetros de adecuabilidad del método son establecidos durante esta etapa previa a la validación.

Se puede esquematizar el proceso de desarrollo de una manera sencilla por medio del siguiente diagrama de flujo:



2.3.2 Validación de métodos analíticos ^(13, 16, 18)

El objetivo principal de la validación de un método analítico es producir los mejores resultados analíticos posibles.

Una definición formal de la validación de un método analítico es la siguiente: proceso por el cual se demuestra, por medio de estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada. De igual manera debemos tener en cuenta que para el desarrollo farmacéutico de un nuevo medicamento es imprescindible la utilización de un método analítico que permita cuantificar los compuestos de interés ya sea en la materia prima o como ingrediente de una formulación. Para asegurar confiabilidad, los métodos analíticos se deben someter a un proceso de validación por medio del cual se comprueba si el método es confiable y si los resultados previstos se obtienen dentro de las condiciones establecidas. La validación de los métodos analíticos se fundamenta en la determinación de diversos parámetros, que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan.

Para el cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio la validación es un requisito imprescindible que está establecido por agencias regulatorias y por comisiones de farmacopeas para el registro de nuevos medicamentos.

Partiendo del criterio de que no existe un modelo único para validar y que los parámetros a evaluar cambian de acuerdo con los requisitos legales de diferentes organizaciones en diferentes países, el presente trabajo se basó en los requerimientos que solicita la Guía de Validación de Métodos Analíticos, propuesta por el Colegio Nacional de QFB's de México, con base en la legislación vigente aplicable.

Clasificación de los métodos analíticos.

Los métodos analíticos se pueden clasificar bajo diferentes criterio dentro de los que se encuentran los siguientes:

a) En función de su estado regulatorio:

Métodos farmacopeicos, que son todos aquellos que se encuentran incluidos en cualquier farmacopea (USP, BP, JP, EP, FEUM etc.) y métodos no farmacopeicos.

b) En función de su aplicación (NOM 073 y 059):

Se pueden dividir en métodos para producto a granel, para producto terminado, para materia prima e indicadores de estabilidad.

c) En función de la naturaleza de la respuesta analítica que proporcionan:

Se pueden dividir en métodos fisicoquímicos, cuando la respuesta es de carácter físico como absorción o emisión de luz, o química como en el caso consumo de iones o agentes

complejantes; y métodos biológicos que presentan una respuesta de carácter biológico como crecimiento de un microorganismo o inhibición del mismo, muerte etc.

d) En función de la naturaleza del sistema de medición utilizado:

Se pueden clasificar en métodos cuyo sistema de medición proporcionan una respuesta analítica que permite la determinación de una señal de ruido como el HPLC y CG, y métodos que no lo permiten como los potenciómetros.

e) En función de su propósito analítico:

Se pueden dividir en métodos para cuantificar el analito de interés, para establecer su presencia a un límite establecido o para identificarlo.

La última clasificación mencionada es la que se utiliza para establecer los parámetros de desempeño que se deben evaluar al momento de realizar la validación de cada método analítico en particular.

Los parámetros de desempeño a evaluar se muestran en la siguiente tabla:

Parámetro de desempeño	Contenido Potencia Valoración	Pruebas de impurezas		Identificación
		Contenido Valoración	Límite	
Precisión, adecuabilidad del sistema.	SI	SI	SI	*
Linealidad del sistema	SI	SI	NO	NO
Especificidad	SI	SI	SI	SI
Exactitud y repetibilidad	SI	SI	NO	NO
Linealidad del método	SI	SI	NO	NO
Precisión intermedia	SI	SI	NO	NO
Estabilidad analítica de la muestra	*	*	NO	NO
Límite de detección	NO	SI	SI	NO
Límite de cuantificación	NO	NO	NO	NO
Robustez	*	*	*	NO
Tolerancia	*	*	*	NO

Las etapas marcadas con un * pueden ser requeridas dependiendo de la naturaleza del método.

Es importante mencionar que la falta de especificidad de un método puede ser compensada por medio de la utilización de otra metodología analítica de soporte, como cromatografía en capa fina y que un método que es exacto y lineal, por definición es específico al placebo analítico o a los otros componentes presentes en la muestra.

Procedimiento de validación

Para iniciar el procedimiento de validación es importante contar con las materias primas necesarias que cuenten con certificados de análisis o bien con especificaciones bien definidas para realizar su análisis previo, sustancias de referencia primarias o secundarias vigentes con su certificado de análisis correspondiente, equipos e instrumentos que cuenten con certificados de calificación y/o calibración vigentes, personal capacitado y se debe trabajar tomando en cuenta la legislación correspondiente a las buenas prácticas de fabricación, validación documentación y de laboratorio.

Etapas de validación

a) Precisión del sistema

La precisión se define como el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferente porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia. Esta se realiza por un analista que debe preparar, por lo menos por sextuplicado, soluciones a la concentración que represente el 100% de la muestra procesada para su medición o la concentración utilizada para preparar la solución de la sustancia de referencia, ya sea por dilución o por pesadas independientes y se debe determinar la respuesta analítica bajo las mismas condiciones y calcular el coeficiente de variación (C.V.) y la desviación estándar (S) de la respuesta. En el caso de métodos biológicos se deben cumplir los criterios inherentes al tipo de diseño del bioensayo.

Los criterios de aceptación establecidos son los siguientes: para métodos fisicoquímicos C.V. $\leq 1.5\%$ y para métodos biológicos C.V. $\leq 3.0\%$

b) Adecuabilidad del sistema

Se define como la verificación de que el sistema (instrumento, analista, equipo, sustancia de referencia, entre otros) opera con base a criterios preestablecidos, que permiten asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico. Esta etapa se realiza inyectando por quintuplicado una solución de la sustancia de referencia. Se informa la respuesta del analito y se calcula el C.V. y en el caso de que se requiera también se deben informar los valores correspondientes al factor de capacidad (k'), resolución (R), factor de coleccionamiento (T) y número de platos teóricos (N).

Los criterios de aceptación establecidos son los siguientes: C.V. $\leq 2.0\%$, $k' \geq 2$, $R \geq 2$ y $k' \leq 2$.

c) Linealidad del sistema

Es la habilidad del sistema para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado. En esta etapa el analista debe preparar, mínimo por triplicado 5 niveles de concentración (intervalo) de la solución de referencia, ya sea por dilución (a partir de una misma solución concentrada) o por pesadas independientes (cuando no sea posible prepararlas por dilución). La concentración central debe ser igual a la que se utiliza para la solución de referencia en el método o la que represente el 100% de la muestra preparada para su medición. El intervalo debe incluir las especificaciones en el caso de métodos utilizados para determinación de contenido, potencia o valoración. Se mide la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de medición y se informa la relación de concentración contra respuesta analítica. Se informa el valor de la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$). El intervalo de concentraciones que se utiliza está en función del propósito del método y por lo general se expresa como el porcentaje de la concentración de la solución de referencia o en función del contenido del analito en la muestra procesada para su medición.

Los intervalos sugeridos para métodos de determinación de concentración van de un mínimo de $\pm 20\%$, en caso de impurezas desde un nivel apropiado hasta un 20% por encima de la especificación y para métodos indicadores de estabilidad desde un nivel apropiado hasta un 120%. Es crítico que el intervalo no excluya valores de concentración que potencialmente puedan dar lugar al contenido del analito en la muestra.

d) Especificidad

De acuerdo al conocimiento previo del analito y del tipo de muestra con el que se esta trabajando, se deben establecer las posibles sustancias que puedan presentar una interferencia y adicionar cantidades conocidas, solas o combinadas a la muestra y evaluar su respuesta al método, bajo las mismas condiciones de análisis. En el caso de métodos de identificación se deben seleccionar sustancias que potencialmente interfieran en la determinación con base en la estructura molecular del analito, precursores, sustancias relacionadas, productos de degradación, etc. Para métodos de determinación de concentración se deben analizar placebos del producto, como lo indica el método, muestras de producto y cuando proceda muestras de sustancias relacionadas, precursores, homólogos y una mezcla del producto con ellos o cualquiera de ellos. Para métodos en los que realiza la valoración o contenido de impurezas, en el caso de que se disponga de las mismas se deben adicionar al analito y/o muestra analítica a los niveles que incluya la especificación y se deben analizar como lo indica el método analítico propuesto.

En el caso de que no se disponga de las impurezas, se debe someter la muestra que contiene el analito, a condiciones que generen su inestabilidad química como luz, calor, humedad, hidrólisis ácido-básica, oxidación etc. y aplicar el método a la muestra resultante. En el caso de métodos límite de impurezas se deben analizar muestras individuales de la impureza (orgánicas, inorgánicas, o disolventes residuales), del producto y de la mezcla de ambos como lo indica el método. Para los métodos indicadores de estabilidad se deben preparar muestra de placebo adicionado con los productos de degradación, en caso de contar con estos, placebo adicionado con el analito y la mezcla de ambos y analizar. Si no se cuenta con los posibles productos de degradación, de acuerdo a la naturaleza química

del analito se puede someter al analito, placebo y muestra a las siguientes condiciones para favorecer su degradación:

- Horno a 70 –120°C o 20°C por debajo del punto de fusión del analito durante 2 a 4 semanas.
- Exposición a luz fluorescente, UV y/o humedad relativa, por un tiempo adecuado.
- Realizar cambios en el valor del pH acidificando hasta 1 ó 2 y/o aumentándolo hasta 10 ó 12, y someter las muestra a 60 – 80°C por un tiempo apropiado.
- Para formas farmacéutica líquidas o semisólidas, adicionar peróxido de hidrógeno para favorecer la oxidación del analito.

Es importante tener en cuenta que este tipo de estudios no se deben de llevar a cabo para analitos, que según la bibliografía, tengan propiedades reactivas que puedan dar lugar a condiciones peligrosas al someter las muestras a las condiciones mencionadas previamente.

El tiempo y las condiciones se deben seleccionar con el fin de degradar los niveles del analito de un 15 a 30%.

En el caso de métodos no selectivos, como los métodos volumétricos, la especificidad para los componentes de la muestra queda sustentada con los resultados de linealidad y exactitud del método, si estos cumplen con los criterios de aceptación respectivos.

Cuando haya duda acerca de la especificidad de un método, esta debe ser investigada por una metodología de soporte.

El criterio de aceptación manejados para esta etapa indica que la respuesta del método analítico debe ser debida únicamente al analito.

e) Exactitud y repetibilidad del método

La exactitud del método se define como la concordancia entre un valor obtenido, empleando el método analítico propuesto, y el valor de referencia; la repetibilidad de un método analítico se puede definir como la precisión del mismo, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, utilizando el mismo método e instrumentos. En el momento de realizar esta etapa se pueden presentar 2 casos: que se conozcan los componentes de la muestra y sea posible preparar un placebo analítico o que no se conozcan los mismos. En el primer caso se prepara el placebo analítico y a la cantidad equivalente a una muestra analítica se le adiciona la cantidad del analito (puede ser una sustancia de referencia primaria o secundaria) correspondiente al 100% de este en la muestra, esto se debe realizar por sextuplicado y deben ser analizadas por el mismo analista, bajo las mismas condiciones, utilizando como referencia la sustancia empleada en la adición del placebo analítico y se determina la cantidad recuperada del analito. En caso de no conocer la composición de la muestra, un analista debe preparar por lo menos 6 muestras adicionadas del analito y analizarlas de igual manera que en el primer caso.

Si no es posible adicionar de manera directa el analito a la muestra, la adición puede llevarse a cabo en alguna de las etapas del método, de preferencia en las primeras, para poder asegurar que las etapas posteriores no dan lugar a resultados incorrectos.

En ambos casos se informa el porcentaje recuperado y se calcula el promedio aritmético (\bar{x}), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (C.V.), y el intervalo de confianza para la media poblacional ($IC(\mu)$) del porcentaje de recobro.

Los criterios de aceptación son los siguientes: el $IC(\mu)$ debe incluir el 100% o que el promedio del porcentaje de recobro se incluya en el intervalo, considerando que los porcentajes de recobro deben encontrarse entre 98-102% para métodos cromatográficos y volumétricos, entre 97-103% para métodos químicos o espectrofotométricos y entre 95-105% para métodos microbiológicos. El C.V. debe ser menor al 2% en métodos cromatográficos y volumétricos, menor al 3% en el caso de métodos químico o espectrofotométrico y menor al 5% para métodos microbiológicos.

f) Linealidad del método

Se define como la habilidad del método analítico para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado.

En esta etapa se pueden presentar los mismos casos que en la etapa anterior, es decir que se conozca o no la composición de la muestra para determinar si es factible la preparación de un placebo analítico. En el primer caso se prepara el placebo y por triplicado se le adiciona la cantidad del analito que represente el 100% en la muestra y se seleccionan al menos dos niveles, superior e inferior, a los cuales también se les adiciona el analito, por triplicado, manteniendo constante la cantidad de placebo analítico en todos los niveles. En caso de no conocer la composición de la muestra se procede como en la etapa anterior, manejando tres niveles mínimo. Las muestras o placebos adicionados resultantes deben ser analizados por un mismo analista, bajo las mismas condiciones, utilizando como referencia la sustancia adicionada y se determina la cantidad recuperada del analito.

El intervalo de concentraciones del analito adicionado depende del propósito del método y debe incluir la especificación. Se debe informar la relación de la cantidad adicionada contra la cantidad recuperada, utilizando el método de estimación por mínimos cuadrados y calcular el valor de la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), el coeficiente de determinación (r^2), el intervalo de confianza para pendiente ($IC(\beta_1)$), el intervalo de confianza para la ordenada al origen ($IC(\beta_0)$) y el coeficiente de variación de regresión (C.V._{y/x}). Se calcula el porcentaje de recobro de cada placebo o muestra adicionada, al obtener el cociente de la cantidad recuperada con respecto a la cantidad adicionada, expresada en porcentaje y se calcula el promedio aritmético (\bar{x}), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (C.V.) y el intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro ($IC(\mu)$).

Para esta etapa de la validación se manejan los siguientes criterios de aceptación:

- Para la cantidad adicionada vs. cantidad recuperada: $r^2 \geq 0.98$, el $IC(\beta_1)$ debe incluir a la unidad, el $IC(\beta_0)$ debe incluir el cero el C.V._{y/x} del porcentaje de recobro debe ser menor al 2% para métodos volumétricos y cromatográficos, menor al 3% para

métodos químicos o espectrofotométricos y menor al 5% para métodos microbiológicos.

- Para el porcentaje de recobro: el $IC(\mu)$ debe incluir el 100% o el promedio aritmético del porcentaje de recobro debe estar incluido en el intervalo, los límites recomendados son los siguientes, entre 98-102 para métodos volumétricos y cromatográficos, entre 97-103% para métodos químicos o espectrofotométricos y entre 95-105 para métodos microbiológicos. El C.V. del porcentaje de recobro debe ser menor al 2% para métodos volumétricos y cromatográficos, menor al 3% para métodos químicos o espectrofotométricos y menor al 5% para métodos microbiológicos.

g) Precisión del método (precisión intermedia o tolerancia interdía / interanalista)

Se define como la precisión de un método analítico, expresada como la concordancia relativa entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días.

En este caso se debe analizar por triplicado una muestra homogénea del producto que tenga un nivel cercano o igual al 100%, en el caso de métodos para determinar contenido, potencia o valoración, o una muestra homogénea cuyo contenido esté incluido en el intervalo lineal de concentración obtenido en la etapa de linealidad del método para el caso de impurezas; en dos días diferentes y por dos analistas diferentes. Utilizar de preferencia la misma sustancia de referencia y los mismos instrumentos y/o equipos. Informar el contenido, potencia o valoración del analito de todas las muestras y calcular el promedio aritmético (\bar{x}), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (C.V.) del contenido, potencia o valoración.

Los criterios de aceptación en esta etapa son los siguientes: El C.V. debe ser menor al 2% para métodos volumétricos y cromatográficos, menor al 3% para métodos químicos o espectrofotométricos y menor al 5% para métodos microbiológicos.

Los resultados pueden ser analizados, utilizando otros métodos estadísticos apropiados, que permitan sustentar que la precisión del método es aceptable. Puede ser utilizado un modelo estadístico lineal de diseño experimental considerando como factores al analista y al día o considerando al analista como un factor jerárquico respecto al día. Este modelo permite investigar el efecto del analista y del día, así como estimar la variabilidad entre días (reproducibilidad interanalistas), la variabilidad entre días (reproducibilidad interdía) y la variabilidad del método analítico (repetibilidad). Este análisis es de utilidad cuando se tiene interés en determinar el grado de tolerancia del método a estas fuentes de variación.

h) Estabilidad analítica de la muestra

Es la propiedad de una muestra preparada para su análisis, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Para llevar a cabo esta parte de la validación se debe establecer la etapa de la preparación de la muestra en la cual se desea evaluar la estabilidad, además de determinar si en dicha etapa es posible fraccionar (muestras dependientes) o no las condiciones de almacenaje (muestras independientes); para determinar la estabilidad analítica de las muestras

dependientes el analista debe procesar muestras homogéneas, por lo menos por triplicado, hasta la etapa preestablecida y fraccionar cada una de las preparaciones de acuerdo a las condiciones de almacenaje de interés y llevar a cabo el análisis de cada una de las porciones de cada preparación al término de la condición de almacenaje, utilizando una solución de referencia recientemente preparada, si el método contempla el uso de la misma. Informar el contenido, potencia o valoración de cada fracción de cada preparación.

Para muestras independientes, a partir de una muestra homogénea, el analista debe determinar por triplicado el contenido, potencia o valoración inicial y simultáneamente y de las mismas muestras procesar el número de muestras necesarias para cada condición de almacenaje hasta la etapa preestablecida, al menos por triplicado. Se prosigue con el análisis de cada una de las preparaciones al término de cada condición de almacenaje utilizando una solución de referencia recientemente preparada, si el método contempla el uso de la misma. Informar el contenido, potencia o valoración de cada fracción de cada preparación.

En ambos casos se calcula el promedio del análisis inicial (y_0) y de cada condición de almacenaje (y_i) y a partir de estos datos se calcula la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto al análisis inicial ($|d_i|$)

Los criterios de aceptación son: $|d_i| \leq 2\%$ métodos volumétricos y cromatográficos, $|d_i| \leq 3\%$ para métodos químicos o espectrofotométricos y $|d_i| \leq 5\%$ para métodos microbiológicos.

i) Límite de detección

Se define como la concentración mínima del analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

Para la estimación del límite de detección se sugieren los siguientes métodos:

- Con base en la señal de ruido: este procedimiento aplica a métodos que utilizan instrumentos para medir la respuesta analítica y que presentan una señal de ruido basal. Un analista debe determinar la respuesta de muestras blanco (reactivos, placebos analíticos, etc.) y la respuesta de muestras analíticas (analito, placebos adicionados, etc.) en un intervalo de concentraciones del analito que incluya la especificación de la prueba de impurezas límite. Determinar aquella cantidad del analito que genera una respuesta con respecto a la muestra blanco en una proporción de por lo menos de 3 a 1, lo que corresponde a la concentración asociada al límite de detección. Este procedimiento se utiliza para verificar el límite de detección estimado por otros procedimientos.

El criterio de aceptación en este caso es que el LD debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas límite.

- Con base en curva de calibración y desviación estándar de los blancos: este procedimiento aplica tanto a métodos instrumentales como a no instrumentales. Un analista debe preparar por lo menos 3 concentraciones de la sustancia de interés (analito, placebos adicionados, etc.) a valores menores o que incluya la especificación de la prueba de impurezas límite; ya sea por dilución o por pesada

independiente del analito. Simultáneamente, preparar por lo menos 5 blancos (reactivos, placebos analíticos, etc.). Medir las respuestas analíticas. Para la curva de calibración, sin incluir los blancos, calcular el valor de la pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$). Para los blancos, calcular la desviación estándar (S_b). El valor estimado debe ser verificado utilizando el procedimiento de la señal de ruido.

Los criterios de aceptación establecidos son los siguientes: $r^2 \geq 0.98$, el $IC(\beta_1)$ no debe incluir el cero, el LD debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas límite, cualquier otro criterio de aceptación, debe justificarse.

- Con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión: este procedimiento aplica tanto a métodos instrumentales como a no instrumentales. Un analista debe preparar por lo menos 3 concentraciones de la sustancia de interés (analito, placebos adicionados, etc.) a valores menores o que incluya la especificación de la prueba de impurezas límite; ya sea por dilución o por pesada independiente del analito. Medir las respuestas analíticas. Calcular el valor de la pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2), la desviación estándar de regresión ($S_{y/x}$) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$). El valor estimado debe ser verificado utilizando el procedimiento de la señal de ruido.

Los criterios de aceptación establecidos son los siguientes: $r^2 \geq 0.98$, $IC(\beta_1)$ no debe incluir el cero, el LD debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas límite, cualquier otro criterio de aceptación, debe ser justificado.

- Con base en la curva de calibración y la desviación estándar de la ordenada al origen:

Este procedimiento aplica a métodos instrumentales y no instrumentales. Un analista debe preparar por lo menos 3 concentraciones de la sustancia de interés (analito, placebos adicionados, etc.) a valores menores o que incluya la especificación de la prueba de impurezas límite; ya sea por dilución o por pesada independiente del analito. Medir las respuestas analíticas. Calcular el valor de la pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2), la desviación estándar de la ordenada al origen (S_{b0}) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$). El valor estimado LD debe ser verificado utilizando el procedimiento de la señal de ruido.

j) Límite de cuantificación

Es la concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas.

Para la estimación el límite de cuantificación aplican los mismos métodos utilizados para la determinación del LD, cambiando en el primer caso los criterios de aceptación, quedando una proporción de 1 a 10 en lugar de 1 a 3 y en los demás casos cambian las ecuaciones para calcular el LC, conservándose los criterios de aceptación.

k) Robustez

Se define como la capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método.

Se deben establecer aquellos factores instrumentales (en cromatografía por ejemplo: temperatura de la columna, presión en la columna, velocidad de flujo, etc.) y/o factores no instrumentales (pH de fases, volúmenes de disolventes orgánicos para una extracción, etc), relacionados al propio método, que se consideren críticos. En cada condición incluyendo a la condición normal, analizar la misma muestra por lo menos por triplicado. Informar el contenido, potencia o valoración del analito para las muestras de condición normal de operación y para la(s) muestra(s) de las otra(s) condición(es) de operación, expresada(s) como %.

Calcular la media aritmética de la condición normal de operación (y_0) y de cada condición de operación diferente a la normal (y_i). Calcular la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto a la condición normal ($|d_i|$)

Los criterios de aceptación son: $|d_i| \leq 2\%$ métodos volumétricos y cromatográficos, $|d_i| \leq 3\%$ para métodos químicos o espectrofotométricos y $|d_i| \leq 5\%$ para métodos microbiológicos.

l) Tolerancia

Es la reproducibilidad entre resultados analíticos obtenidos, por el análisis de la misma muestra, bajo diferentes condiciones de operación como pueden ser equipos, columnas, etc. La robustez y la tolerancia son conceptos diferentes, ya que el primero se refiere a la influencia de factores internos del método, mientras que la tolerancia se refiere a factores externos al método.

Para realizar la evaluación de esta etapa de la validación se deben establecer aquellos factores ajenos al método como diferentes equipos, lotes de reactivos, columnas etc. que se puedan presentar al reproducir el método en otras condiciones de uso y fijar por lo menos 2 condiciones de uso y analizar por triplicado cada condición. Informar al contenido, potencia o valoración del analito en todas las muestras y calcular la media aritmética (\bar{x}), el coeficiente de variación (C.V.) y la desviación estándar (S) de estos resultados.

Los criterios de aceptación son: C.V. $\leq 2\%$ métodos volumétricos y cromatográficos, C.V. $\leq 3\%$ para métodos químicos o espectrofotométricos y C.V. $\leq 5\%$ para métodos microbiológicos.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ACETOFÉNIDO DE DIHIDROXIPROGESTERONA Y ENANTATO DE ESTRADIOL,

Contenido

Acetofénido de dihidroxiprogesterona	75 mg
Enantato de estradiol	5 mg
Vehículo c.b.p	1 mL

Reactivos

Agua grado HPLC
Acetonitrilo grado HPLC Burdick & Jackson
Metanol grado HPLC Burdick & Jackson
Tetrahidrofurano grado HPLC Burdick & Jackson
Metanol R.A. Tecsiquim
Fosfato monobásico de potasio R.A. J.T. Baker
Ácido fosfórico R.A. J.T. Baker
Peróxido de hidrógeno al 30% R.A. J.T. Baker
Ácido clorhídrico R.A. J.T. Baker
Hidróxido de sodio R.A. J.T. Baker

Acetofénido de dihidroxiprogesterona sustancia de referencia de trabajo.
Pureza 99.92%, factor de valoración: 0.9992
Enantato de estradiol sustancia de referencia de trabajo
Pureza 100.03%, factor de valoración: 1.0003

Material y equipo

Material de vidrio
Balanza analítica
Potenciómetro Beckman Φ 360
Sistema de microfiltración:
Membrana de nylon 47 mm, 0.45 μm de tamaño de poro
Acrodiscos Gelman nylon 25 mm, 0.2 μm de tamaño de poro
Columna: X-Terra C8, 150 x 4.6 mm DI, 5 μm
Precolumna: X-Terra C8, 20 x 3.9 mm DI, 5 μm
Cromatógrafo de líquidos Waters equipado con:
Módulo de separación Waters modelo 2690 D
Detector Waters modelo 2487

Monitor Dell Trinitron P780
Impresora Hewlett Packard Laser Jet 4000N
Procesador Dell Optiplex MMP

Selección de las condiciones cromatográficas

A partir de metodologías existentes, en las cuales se cuantificaba cada activo en un método separado, se realizaron pruebas con diferentes tipos de columnas cromatográficas para intentar la adecuada detección y separación de ambos picos en una sola corrida, dentro de las que se encuentran las siguientes:

- Nova Pak C18, 3.9 x 75 mm
- Nova Pak C18, 3.9 x 300 mm
- Spherisorb ODS 2, 3.9 x 300 mm
- Symmetry C18, 3.9 x 150 mm

Utilizando para la fase móvil diferentes proporciones de agua, metanol y acetonitrilo, para buscar un incremento en la resolución del pico de acetofénido de dihidroxiprogesterona, ya que junto con él eluyen otros componentes del producto y se probaron gradientes variando la proporción de los componentes, para intentar obtener un tiempo de corrida corto.

A pesar de que logró reducir el tiempo de corrida a 20 minutos, la separación del pico de enantato de estradiol de los otros componentes que coeluyen con él en estos sistemas fue deficiente, por lo que se decidió cambiar el tipo de columna.

La siguiente columna a probar fue una Polarity (Atlantis) C18 de 3 μ m y 3.9 x 100 mm, en la cual se logró una disminución del tiempo de corrida, aunque esta no fue significativa (menor a 2 minutos), se encontró que la separación se mejoraba y se realizaron pruebas adicionando un porcentaje bajo de tetrahidrofurano (2%) a la fase móvil para tratar de mejorar la resolución.

Al no obtenerse picos puros, con buena resolución y factores de coeeficiente de retención bajos, se decidió cambiar la columna por una YMC-Pak ODS-AQ de 3 μ m y 4.6 x 100 mm, en la cual se logró una mejora de los parámetros cromatográficos, con una fase móvil compuesta por acetonitrilo:agua, en una proporción de 80:20.

El siguiente paso realizar pruebas para la determinación de la linealidad del método, después de las cuales se decidió trabajar con una concentración de 600 μ g/mL para acetofénido de dihidroxiprogesterona y de 100 μ g/mL para enantato de estradiol, ya que se encontró que en concentraciones mayores el método no era lineal.

En esta etapa del desarrollo se presentó el problema de incremento acelerado de la presión conforme se realizaban las inyecciones, iniciando ésta en aproximadamente 2500 psi hasta superior a 4000 psi. Debido a este problema se realizaron diferentes acciones, que fueron el lavado y regeneración de la columna, lavado y revisión del equipo y la utilización de una precolumna. A pesar de esto, el incremento de presión se siguió presentando, por lo cual se decidió reemplazar la columna por una nueva, misma que se acondicionó de acuerdo a

las instrucciones del fabricante, empleando inicialmente el disolvente en el cual venía almacenada, y posteriormente la fase móvil a emplear.

Se decidió iniciar la validación, pero al realizar la etapa de linealidad del sistema, se presentó el mismo problema, a pesar de que la columna fue debidamente lavada, este problema se informó al proveedor, el cual envió una nueva columna, misma que al ser utilizada presentó el mismo problema, se realizaron pruebas por parte del proveedor, obteniéndose los mismos resultados, los cuales se atribuyeron a una interacción entre alguno de los principios activos o de los componentes de la fórmula y la fase estacionaria, además de que se consideró que el tamaño de partícula de la fase estacionaria empleada era demasiado pequeño.

Con base en estos resultados se decidió realizar pruebas con una columna X-Terra C8 de 150 x 4.6 mm DI y con un tamaño de partícula de 5 µm, pero se obtuvieron tiempos de corrida demasiado largos (25 a 30 minutos) y un factor de coeico cercano a 2.0 para el acetofénido de dihidroxiprogesterona, con la fase móvil propuesta anteriormente (acetonitrilo:agua, 80:20); por lo cual se decidió obtener métodos separados, para cada principio activo en particular.

Para el caso del acetofénido de dihidroxiprogesterona se decidió emplear solución de fosfato monobásico de potasio 0.01M, con un pH de 3.0, para lograr disminuir su tiempo de retención y mejorar su factor de coeico.

Para el enantato de estradiol se decidió modificar la fase móvil con la cual se estaba trabajando, ya que se observó que los parámetros cromatográficos mejoraban al sustituir el acetonitrilo por metanol.

Se realizaron pruebas para determinar la mejor longitud de onda para la cuantificación de cada principio activo, el volumen de inyección adecuado y la velocidad de flujo que permitiera un menor tiempo de corrida sin un incremento considerable de la presión y que lograra mantener los parámetros cromatográficos dentro de los criterios de aceptación establecidos.

Finalmente se decidió que las condiciones óptimas para la validación eran las siguientes:

Para la cuantificación del acetofénido de dihidroxiprogesterona:

Columna: X-Terra RP8, 150 x 4.6 mm DI, 5 µm

Precolumna: X-Terra RP8, 200 x 3.9 mm DI, 5 µm

Fase móvil: Solución 0.01 M de fosfato monobásico de potasio pH 3.0 : acetonitrilo : metanol, 9 : 10 : 10

Velocidad de flujo: 1.5 mL/min

Volumen de inyección: 10 µL

Longitud de onda: 254 nm

Temperatura: ambiente

Disolvente para las muestras: metanol

Preparación de soluciones:

a) Solución 0.01 M de fosfato de monobásico de potasio pH 3.0

Pesar 1.36 g de fosfato monobásico de potasio en un matraz volumétrico de 1L, disolver, llevar a volumen con agua y mezclar. Ajustar el pH a 3.0 ± 0.05 con ácido fosfórico.

b) Solución patrón de referencia

Pesar aproximadamente y con exactitud 30 mg de acetofénido de dihidroxiprogesterona sustancia de referencia, transferirlos a un matraz volumétrico de 50 mL. Adicionar 15 mL de metanol y disolver. Llevar a volumen con metanol y mezclar. Filtrar por acrodisco Gelman Nylon de 25 mm, 0.2 μm de tamaño de poro.

c) Preparación de la solución muestra

Transferir una alícuota de 2 mL de una muestra homogénea de producto terminado a un matraz volumétrico de 250 mL, dejar escurrir la pipeta 10 minutos. Adicionar 100 mL de metanol y mezclar. Llevar a volumen con metanol y mezclar. Filtrar por acrodisco Gelman Nylon de 25 mm, 0.2 μm de tamaño de poro.

Para la cuantificación del enantato de estradiol:

Columna: X-Terra RP8, 150 x 4.6 mm DI, 5 μm
Precolumna: X-Terra RP8, 200 x 3.9 mm DI, 5 μm
Fase móvil: Metanol : agua, 80 : 20
Velocidad de flujo: 1.2 mL/min
Volumen de inyección: 10 μL
Longitud de onda: 280 nm
Temperatura: ambiente
Disolvente para las muestras: metanol

Preparación de soluciones:

a) Solución patrón de referencia

Pesar aproximadamente y con exactitud 25 mg de enantato de estradiol sustancia de referencia, transferirlos a un matraz volumétrico de 50 mL. Adicionar 25 mL de metanol y disolver. Llevar a volumen con metanol y mezclar. Tomar una alícuota de 10 mL y transferirla a un matraz volumétrico de 50 mL. Llevar a volumen con metanol y mezclar. Filtrar por acrodisco Gelman Nylon de 25 mm, 0.2 μm de tamaño de poro.

c) Preparación de la solución muestra

Transferir una alícuota de 2 mL de una muestra homogénea de producto terminado a un matraz volumétrico de 100 mL, dejar escurrir la pipeta 10 minutos. Adicionar 25 mL de

metanol y mezclar. Llevar a volumen con metanol y mezclar. Filtrar por acrodisco Gelman Nylon de 25 mm, 0.2 μm de tamaño de poro.

3.2 VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

3.2.1 Método indicador de estabilidad para la determinación de acetofénido de dihidroxiprogesterona

Adecuabilidad del sistema

Se determinó a partir de una muestra con una concentración aproximada de 600 µg/mL, a partir de la cual se realizaron 5 inyecciones de un mismo vial y se determinaron los siguientes parámetros: tiempo de retención del pico de interés, factor de coeleo, eficiencia, resolución, factor de capacidad y coeficiente de variación de las respuestas.

Linealidad del sistema

Se prepararon por triplicado, muestras independientes del componente de interés, a los niveles de concentración del 50, 75, 100, 125 y 150% (300, 450, 600, 750, y 900 µg/mL, respectivamente), a partir de las cuales se graficó la concentración real contra la respuesta obtenida y se determinó el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente (IC_m), se calculó el factor (concentración / área) a partir del cual se determinó el coeficiente de variación.

Precisión del sistema

Se determinó a partir de una muestra con una concentración aproximada de 600 µg/mL, a partir de la cual se realizaron 6 inyecciones de un mismo vial y se determinó el promedio y el coeficiente de variación de las respuestas.

Linealidad del método

Se prepararon por triplicado, muestras independientes de placebos cargados con el componente de interés, a los niveles de concentración del 50, 75, 100, 125 y 150% (correspondientes a las concentraciones de 300, 450, 600, 750, y 900 µg/mL, respectivamente), se calcularon las cantidades adicionadas y recuperadas para cada muestra, a partir de las cuales se graficó la cantidad adicionada contra la cantidad recuperada y se determinó el coeficiente de determinación (r^2), la pendiente (m), la ordenada al origen (b), la media del porcentaje recuperado y los intervalos de confianza para la pendiente (IC_m), la ordenada al origen (IC_b) y la media poblacional (IC_µ) y el coeficiente de variación del porcentaje recuperado.

Exactitud y repetibilidad del método al 100 %

Se prepararon por sextuplicado, muestras independientes de placebos cargados con el componente de interés, al nivel de concentración del 100% (correspondiente a una concentración de 600 µg/mL), se calculó la cantidad adicionada y recuperada para cada muestra y se determinó la media del porcentaje recuperado, el intervalo de confianza para la media poblacional (IC_µ) y el coeficiente de variación del porcentaje recuperado.

Precisión intermedia

Para la precisión intermedia del método, 2 analistas prepararon muestras independientes a partir de una mezcla homogénea de producto terminado, por triplicado, en dos días diferentes, obteniéndose un total de 12 resultados a partir de las cuales se determinó el contenido del componente de interés, en mg/mL y el porcentaje correspondiente para cada muestra.

Se calculó el promedio del mismo y el coeficiente de variación por cada analista/día y del total de los doce análisis.

Estabilidad de la muestra y de la solución patrón de referencia

Se prepararon muestras independientes a partir de una mezcla homogénea de producto terminado, por triplicado y muestras de la solución patrón de referencia por duplicado, las cuales se filtraron en viales y se analizaron inmediatamente después de su preparación y posteriormente se almacenaron durante 24 horas a temperatura ambiente, protegidas de la luz y tomando las precauciones necesarias para evitar la evaporación del disolvente y se analizaron al término del período de almacenaje. A partir de los resultados obtenidos se determinó el contenido del componente de interés, en mg/mL y el porcentaje correspondiente para cada muestra, y se calculó la diferencia absoluta de la media aritmética de la condición de almacenaje con respecto al análisis inicial ($|d_i|$).

Especificidad del método

Se prepararon muestras del placebo, producto terminado y materia prima, que fueron sometidas a la acción de la luz ultravioleta y a 60°C, durante 15 días; a hidrólisis ácida, con ácido clorhídrico 3N y ebullición, hidrólisis básica con hidróxido de sodio 3N y ebullición, así como a condiciones oxidantes con peróxido de hidrógeno al 30% y ebullición.

Todas las muestras se analizaron empleando un detector de arreglo de diodos, se realizó el análisis espectral por medio de su correspondiente barrido, conjuntamente con la normalización de áreas a diferentes tiempos de elución del pico de interés, se determinó el porcentaje de recobro para cada una de las muestras, así como el ángulo de pureza y el ángulo de ruido.

Robustez

Se modificó la proporción orgánica de la fase móvil de acuerdo a la siguiente tabla:

Condición	Solución 0.01 M de fosfato monobásico de potasio pH 3.0	Acetonitrilo	Metanol	Proporción acuosa	Proporción orgánica
Normal	9	10	10	31%	69%
Condición 1	10	12	12	29%	71%
Condición 2	10	10	10	33%	67%

Los parámetros cromatográficos (eficiencia, tiempo de retención, factor de capacidad, factor de coe, porcentaje de recobro) fueron calculados para el compuesto de interés de tres muestras independientes a partir de una mezcla homogénea de producto terminado, y se calculó la diferencia absoluta de los promedios obtenidos del porcentaje de recobro en cada condición de análisis con respecto a la condición normal ($|d_i|$).

3.2.2 Método indicador de estabilidad para la determinación de enantato de estradiol

Adecuabilidad del sistema

Se determinó a partir de una muestra con una concentración aproximada de 100 µg/mL, a partir de la cual se realizaron 5 inyecciones de un mismo vial y se determinaron los siguientes parámetros: tiempo de retención del pico de interés, factor de coeleo, eficiencia, resolución, factor de capacidad y coeficiente de variación de las respuestas.

Linealidad del sistema

Se prepararon por triplicado, muestras independientes del componente de interés, a los niveles de concentración del 50, 75, 100, 125 y 150% (50, 75, 100, 125, y 150 µg/mL, respectivamente), a partir de las cuales se graficó la concentración real contra la respuesta obtenida y se determinó el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente (IC_m), se calculó el factor (concentración / área) a partir del cual se determinó el coeficiente de variación.

Precisión del sistema

Se determinó a partir de una muestra con una concentración aproximada de 100 µg/mL, a partir de la cual se realizaron 6 inyecciones de un mismo vial y se determinó el promedio y el coeficiente de variación de las respuestas.

Linealidad del método

Se prepararon por triplicado, muestras independientes de placebos cargados con el componente de interés, a los niveles de concentración del 50, 75, 100, 125 y 150% (correspondientes a las concentraciones de 50, 75, 100, 125, y 150 µg/mL, respectivamente), se calcularon las cantidades adicionadas y recuperadas para cada muestra, a partir de las cuales se graficó la cantidad adicionada contra la cantidad recuperada y se determinó el coeficiente de determinación (r^2), la pendiente (m), la ordenada al origen (b), la media del porcentaje recuperado y los intervalos de confianza para la pendiente (IC_m), la ordenada al origen (IC_b) y la media poblacional (IC_μ) y el coeficiente de variación del porcentaje recuperado.

Exactitud y repetibilidad del método al 100 %

Se prepararon por sextuplicado, muestras independientes de placebos cargados con el componente de interés, al nivel de concentración del 100% (correspondiente a una concentración de 100 µg/mL), se calculó la cantidad adicionada y recuperada para cada muestra y se determinó la media del porcentaje recuperado, el intervalo de confianza para la media poblacional (IC_μ) y el coeficiente de variación del porcentaje recuperado.

Precisión intermedia

Para la precisión intermedia del método, 2 analistas prepararon muestras independientes a partir de una mezcla homogénea de producto terminado, por triplicado, en dos días diferentes, obteniéndose un total de 12 resultados a partir de las cuales se determinó el contenido del componente de interés, en mg/mL y el porcentaje correspondiente para cada muestra. Se calculó el promedio del mismo y el coeficiente de variación por cada analista/día y del total de los doce análisis.

Estabilidad de la muestra y de la solución patrón de referencia

Se prepararon muestras independientes a partir de una mezcla homogénea de producto terminado, por triplicado y muestras de la solución patrón de referencia por duplicado, las cuales se filtraron en viales y se analizaron inmediatamente después de su preparación y posteriormente se almacenaron durante 24 horas a temperatura ambiente, protegidas de la luz y tomando las precauciones necesarias para evitar la evaporación del disolvente y se analizaron al término del período de almacenaje.

A partir de los resultados obtenidos se determinó el contenido del componente de interés, en mg/mL y el porcentaje correspondiente para cada muestra, y se calculó la diferencia absoluta de la media aritmética de la condición de almacenaje con respecto al análisis inicial ($|d_i|$).

Especificidad del método

Se prepararon muestras del placebo, producto terminado y materia prima, que fueron sometidas a la acción de la luz ultravioleta y a 60°C, durante 15 días; a hidrólisis ácida, con ácido clorhídrico 3N y ebullición, hidrólisis básica con hidróxido de sodio 3N y ebullición, así como a condiciones oxidantes con peróxido de hidrógeno al 30% y ebullición.

Todas las muestras se analizaron empleando un detector de arreglo de diodos, se realizó el análisis espectral por medio de su correspondiente barrido, conjuntamente con la normalización de áreas a diferentes tiempos de elución del pico de interés, se determinó el porcentaje de recobro para cada una de las muestras, así como el ángulo de pureza y el ángulo de ruido.

Robustez

La proporción del componente orgánico de la fase móvil (metanol) fue modificada proporcionalmente de 80% a 82% y 78%.

Los parámetros cromatográficos (eficiencia, tiempo de retención, factor de capacidad, factor de coleo y porcentaje de recobro) fueron calculados para el compuesto de interés de tres muestras independientes a partir de una mezcla homogénea de producto terminado, y

se calculó la diferencia absoluta de los promedios obtenidos del porcentaje de recobro en cada condición de análisis con respecto a la condición normal ($|d_i|$).

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1 Método indicador de estabilidad para la determinación de acetofénido de dihidroxiprogesterona

Adecuabilidad del sistema

Peso de la muestra: 149.7 mg

Diluciones:

Peso de la muestra \longrightarrow 250 mL

Concentración: 598.32 μg / mL

ÁREA
5760880
5753506
5776103
5796706
5783995

	Obtenido	Criterio de Aceptación
Tiempo de retención:	4.5	≈ 4.5
Factor de coleo:	1.0	≤ 2.0
Eficiencia:	4477	≥ 25
Resolución:	N/A	≥ 1.5
Factor de capacidad:	3.5	≥ 1.5
Coefficiente de variación:	0.3%	$\leq 2.0\%$

Precisión del sistema

Peso de la muestra: 149.7 mg

Diluciones:

Peso de la muestra → 250 mL

Concentración: 598.32 µg / mL

ÁREA
5760880
5753506
5776103
5796706
5783995
5790354

	Obtenido	Criterio de Aceptación
Media	5776924	N/A
Coefficiente de variación (C.V.)	0.3%	≤ 1.5%

LINEALIDAD DEL SISTEMA (GRÁFICA No. 1, VER ANEXO II)

Diluciones:

Peso de la muestra \longrightarrow 250 mL

PESO (mg)	NIVEL %	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	RESPUESTA OBTENIDA (Area)	FACTOR (Conc./Area) $\times 10^{-4}$
75.2	50	300.56	2922339	1.03
75.1	50	300.16	2919261	1.03
74.8	50	298.96	2901412	1.03
112.6	75	450.04	4377636	1.03
112.4	75	449.24	4351100	1.03
112.4	75	449.24	4346039	1.03
149.7	100	598.32	5778363	1.04
150.3	100	600.72	5801976	1.04
149.8	100	598.72	5785029	1.03
187.4	125	749.00	7194457	1.04
187.5	125	749.40	7223122	1.04
187.6	125	749.80	7223885	1.04
225.5	150	901.28	8729869	1.03
224.6	150	897.68	8616817	1.04
224.9	150	898.88	8596015	1.05

	Obtenido	Criterio de Aceptación
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9999	≥ 0.98
Coefficiente de variación (C.V.)	0.6%	$\leq 1.5\%$
Intervalo de confianza para la pendiente (ICm)	9492.8269 , 9620.7409	no debe incluir el cero

LINEALIDAD DEL MÉTODO (GRÁFICA No. 2 VER ANEXO II)

Peso de estándares:

S1 = 29.8 mg

S2 = 30.1 mg

Factor de recobro: 99.1%

Diluciones:

Estándar: Peso del estándar → 50 mL

Peso de la muestra → 250 mL

+ 2 mL de placebo

Estándar 1 (Área)	Estándar 2 (Área)
5690650	5750150
5680681	5837007
5684022	
5683611	
5667867	
5669796	
5647573	
$\bar{X} = 5674886$ C.V. = 0.3	$\bar{X} = 5793579$

PESO (mg)	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CONCENTRACIÓN FINAL (µg/mL)	RESPUESTA OBTENIDA (ÁREA)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% RECUPE- RADO	C.V.
75.0	74.94	299.76	2879338	75.54	100.8	
75.0	74.94	299.76	2873588	75.39	100.6	0.1%
75.0	74.94	299.76	2877416	75.49	100.7	
112.4	112.31	449.24	4300882	112.83	100.5	
112.5	112.41	449.64	4318915	113.31	100.8	0.3%
112.5	112.41	449.64	4289474	112.53	100.1	
150.1	149.98	599.92	5707007	149.72	99.8	
150.1	149.98	599.92	5704696	149.66	99.8	0.1%
149.9	149.78	599.12	5711645	149.85	100.0	
187.5	187.35	749.40	7106000	186.43	99.5	
187.6	187.45	749.80	7102390	186.33	99.4	0.2%
187.2	187.05	748.20	7064107	185.33	99.1	
224.9	224.72	898.88	8503781	223.10	99.3	
224.9	224.72	898.88	8493361	222.82	99.2	0.2%
224.8	224.62	898.48	8474473	222.33	99.0	

	Obtenido	Criterio de Aceptación
Pendiente (m)	0.9821	≈ 1
Intervalo de confianza para la pendiente (ICm)	0.9609 , 1.0033	debe incluir la unidad
Ordenada al origen	2.2207	≈ 0
Intervalo de confianza para la ordenada al origen (Icb) Cuando C.V. =2.0%	-1.1271 , 5.5685	debe incluir el cero
Coefficiente de determinación (r^2)	1.0000	≥ 0.98
Media del porcentaje recuperado	99.9%	98.0 – 102.0%
Intervalo de confianza para la media poblacional (IC μ)	99.5 , 100.3	el promedio aritmético se incluye en el intervalo
Coefficiente de variación (C.V.)	0.6%	$\leq 2.0\%$

El C.V. para cada nivel debe ser menor al 2.0%

EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO AL 100%

Peso de estándares:

S1 = 29.8 mg

S2 = 30.1 mg

Factor de recobro: 99.1%

Diluciones:

Estándar: Peso del estándar → 50 mL

Peso de la muestra → 250 mL

+ 2 mL de placebo

Estándar 1 (Área)	Estándar 2 (Área)
5690650	5750150
5680681	5837007
5684022	
5683611	
5667867	
5669796	
5647573	
$\bar{X} = 5674886$ C.V. = 0.3	$\bar{X} = 5793579$

PESO (mg)	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CONCENTRACION FINAL (µg/mL)	RESPUESTA OBTENIDA (Área)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% RECUPERADO
150.1	149.98	599.92	5707007	149.72	99.8
150.1	149.98	599.92	5704696	149.66	99.8
150.0	149.88	599.52	5711645	149.85	100.0
149.9	149.78	599.12	5716008	149.96	100.1
149.9	149.78	599.12	5606535	149.45	99.8
149.8	149.68	598.72	5687381	149.21	99.7

	Obtenido	Criterio de Aceptación
Media del porciento recuperado	99.9%	98.0 – 102.0%
Intervalo de confianza para la media poblacional (ICµ)	99.7, 100.1	el promedio aritmético se incluye en el intervalo
Coefficiente de variación (C.V.)	0.2%	≤ 2.0%

PRECISIÓN INTERMEDIA

Diluciones:

Estándar: Peso del estándar → 50 mL

2 mL de producto terminado → 250 mL

	Analista 1		Analista 2	
	Estándar 1	Estándar 2	Estándar 1	Estándar 2
D I A 1	5650703	5769391	5776732	5727077
	5666406	5754948	5780022	5724015
	5650814		5770717	
	5652716		5782122	
	5667046		5767767	
Peso (mg) = g= C.V. = Factor de recobro=	29.8	30.1	30.1	30.0
	5657536	5762170	5775472	5725546
	0.1		0.1	
	99.1		100.6	
D I A 2	5745303	5767844	5790965	5787183
	5750968	5766298	5781608	5785177
	5768812		5773680	
	5768848		5771330	
	5746265		5783252	
Peso (mg) = g= C.V. = Factor de recobro =	30.0	30.1	30.0	30.1
	57560309	5767071	5780167	5786180
	0.2		0.1	
	100.2		100.2	

	Analista 1 (%)	Analista 2 (%)
D I A 1	108.1	108.9
	108.8	107.8
	108.9	107.9
D I A 2	107.2	108.1
	106.9	108.9
	108.0	106.5
X (n=6)	108.0%	108.0%
C.V. (n=6)	0.8	0.8

Contenido teórico: 75 mg/mL. (Contiene un 10% de exceso)

	Obtenido	Criterio de Aceptación
Media	108.0%	N/A
Coefficiente de variación (C.V.)	0.8%	≤ 2.0%

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA Y DE LA SOLUCIÓN PATRÓN DE REFERENCIA

Se utilizaron las muestras correspondientes a la etapa de precisión intermedia del A1D1

Producto terminado. Temperatura ambiente

MUESTRA	ANÁLISIS INICIAL (%)	ANÁLISIS 24 h (%)
1	108.1	107.1
2	108.8	107.6
3	108.9	109.0
Media (n=3)	108.6	107.9
d _i		0.7

Acetofénido de dihidroxiprogesterona solución patrón de referencia. Temperatura ambiente

MUESTRA	ANÁLISIS INICIAL (%)	ANÁLISIS 24 h (%)
1	99.2	99.4
2	100.8	100.6
Media (n=2)	100.0	100.0
d _i		0.0

Criterio de Aceptación:

La diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto al análisis inicial $|d_i|$ debe ser $\leq 2.0\%$.

ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO

MEDIO DEGRADANTE	PLACEBO	MATERIA PRIMA			PRODUCTO TERMINADO		
		% Recobro	Ángulo de Pureza	Ángulo de ruido	% Recobro	Ángulo de Pureza	Ángulo de ruido
MEDIO ÁCIDO HCl 3N (3 mL, 10 minutos, ebullición)	s/interferencia	90.0	0.101	0.269	104.3	0.082	3.639
MEDIO ÁCIDO HCl 3N (5 mL, 15 minutos, ebullición)	N/A	76.4	0.052	0.278	85.7	0.045	1.134
MEDIO BÁSICO NaOH 3N (1 mL, 5 minutos, ebullición)	s/interferencia	100.3	0.073	0.273	108.1	0.040	1.133
MEDIO BÁSICO NaOH 3N (5 mL, 15 minutos, ebullición)	N/A	97.2	0.062	0.263	107.2	0.044	1.123
MEDIO OXIDATIVO H ₂ O ₂ 30% (5 mL, 5 minutos, ebullición)	s/interferencia	99.4	0.065	0.263	106.6	0.060	4.353
Luz UV (15 días)	s/interferencia	96.2	0.118	0.340	98.0	0.047	1.252
Temperatura 60°C (15 días)	s/interferencia	101.8	0.070	0.272	100.7	0.042	1.484

El método es específico, ya que los picos de degradación no interfieren con el pico al tiempo de retención correspondiente a Acetofénido de dihidroxiprogesterona (aproximadamente 4.5 min).

Ver Anexo III

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

ROBUSTEZ

Condiciones de trabajo manejadas:

- Condición normal: Solución 0.01 M de fosfato monobásico de potasio pH 3.0: acetónitrilo:metanol, 9:10:10
- Condición 1: Solución 0.01 M de fosfato monobásico de potasio pH 3.0: acetónitrilo:metanol, 10:12:12
- Condición 2: Solución 0.01 M de fosfato monobásico de potasio pH 3.0: acetónitrilo:metanol, 10:10:10

CONDICIÓN	EFICIENCIA	TIEMPO DE RETENCIÓN	FACTOR DE CAPACIDAD	FACTOR DE COLEO	(%) RECOBRO	(%) di
Condición 1	4433	3.9	2.9	1.1	107.7	0.3
Normal	4590	4.1	3.1	1.1	107.4	N/A
Condición 2	4785	5.0	4.0	1.0	107.5	0.1

Criterio de Aceptación:

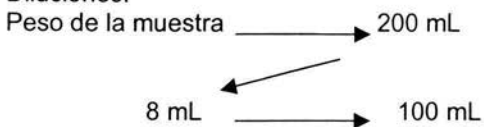
La diferencia absoluta entre los promedios obtenidos del porcentaje de recobro en cada condición de análisis no es mayor al 2.0% respecto al porcentaje de recobro de la condición normal.

4.2 Método indicador de estabilidad para la determinación de enantato de estradiol

Adecuabilidad del sistema

Peso de la muestra: 249.9 mg

Diluciones:



Concentración: 99.99 µg / mL

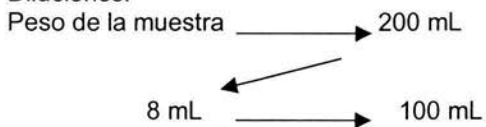
ÁREA
242961
242910
242406
241832
241801

	Obtenido	Criterio de Aceptación
Tiempo de retención:	7.1	≈ 4.5
Factor de coleo:	1.1	≤ 2.0
Eficiencia:	3722	≥ 25
Resolución:	N/A	≥ 1.5
Factor de capacidad:	3.7	≥ 1.5
Coefficiente de variación:	0.2%	≤ 2.0%

Precisión del sistema

Peso de la muestra: 249.9 mg

Diluciones:



Concentración: 99.99 $\mu\text{g} / \text{mL}$

ÁREA
242961
242910
242406
241832
241801
241100

	Obtenido	Criterio de Aceptación
Media	242168	N/A
Coefficiente de variación (C.V.)	0.3%	$\leq 1.5\%$

LINEALIDAD DEL SISTEMA (GRÁFICA No. 3, VER ANEXO IV)

Peso del stock : 249.9 mg

Diluciones:

Peso del stock → 200 mL

alícuota ← 100 mL

ALÍCUOTA (mL)	NIVEL %	CONCENTRACIÓN (µg / mL)	RESPUESTA OBTENIDA (Área)	FACTOR (Conc./Área) x 10 ⁻⁴
4	50	49.99	120300	4.16
	50	49.99	120513	4.15
	50	49.99	120722	4.14
6	75	74.99	180652	4.15
	75	74.99	181504	4.13
	75	74.99	180422	4.16
8	100	99.99	240732	4.15
	100	99.99	240769	4.15
	100	99.99	241296	4.14
10	125	124.99	301142	4.15
	125	124.99	300283	4.16
	125	124.99	300936	4.15
12	150	149.98	362266	4.14
	150	149.98	362764	4.13
	150	149.98	362086	4.14

	Obtenido	Criterio de Aceptación
Coefficiente de determinación (r ²)	1.0000	≥ 0.98
Coefficiente de variación (C.V.)	0.2%	≤ 1.5%
Intervalo de confianza para la pendiente (ICm)	2405.8978 , 2423.6734	no debe incluir el cero

LINEALIDAD DEL MÉTODO (GRÁFICA No. 4 VER ANEXO IV)

Peso de estándares:

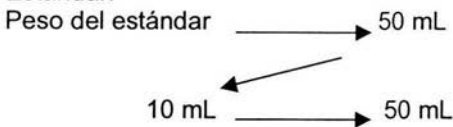
S1 = 25.1 mg

S2 = 25.2 mg

Factor de recobro: 99.2%

Diluciones:

Estándar:



Stock:

250.3 mg → 200 mL

Muestras

Alícuota del stock → 100 mL

+ 2 mL de placebo

Estándar 1 (Area)	Estándar 2 (Area)
240201	245317
242668	245683
243721	
243939	
245417	
244289	
244419	
$\bar{X} = 243522$ C.V. = 0.7	$\bar{X} = 245500$

ALÍCUO TA (mL)	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CONCENTRACIÓN FINAL (µg/mL)	RESPUESTA OBTENIDA (ÁREA)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% RECUPE RADO	C.V.
4	5.01	50.10	119933	4.95	98.8	0.9%
	5.01	50.10	120166	4.96	99.0	
	5.01	50.10	121901	5.03	100.4	
6	7.51	75.10	181069	7.47	99.5	0.6%
	7.51	75.10	179272	7.39	98.4	
	7.51	75.10	179263	7.39	98.4	
8	10.02	100.20	241022	9.94	99.2	0.3%
	10.02	100.20	239936	9.90	98.8	
	10.02	100.20	239628	9.88	98.6	
10	12.52	125.20	298671	12.32	98.4	0.4%
	12.52	125.20	298445	12.31	98.3	
	12.52	125.20	300478	12.39	99.0	
12	15.02	150.20	361286	14.90	99.2	0.3%
	15.02	150.20	361834	14.92	99.3	
	15.02	150.20	359889	14.84	98.8	

	Obtenido	Criterio de Aceptación
Pendiente (m)	0.9883	≈ 1
Intervalo de confianza para la pendiente (ICm)	0.6732 , 1.3034	debe incluir la unidad
Ordenada al origen	0.0074	≈ 0
Intervalo de confianza para la ordenada al origen (Icb) Cuando C.V. =2.0%	-3.3400 , 3.3548	debe incluir el cero
Coefficiente de determinación (r ²)	0.9998	≥ 0.98
Media del porcentaje recuperado	99.9%	98.0 – 102.0%
Intervalo de confianza para la media poblacional (ICµ)	98.6 , 99.2	el promedio aritmético se incluye en el intervalo
Coefficiente de variación (C.V.)	0.6%	≤ 2.0%

El C.V. para cada nivel debe ser menor al 2.0%

EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO AL 100%

Peso de estándares:

S1 = 25.1 mg

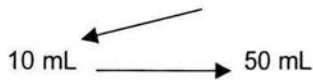
S2 = 25.2 mg

Factor de recobro: 99.2%

Diluciones:

Estándar:

Peso del estándar → 50 mL



Stock:

250.3 mg → 200 mL

Muestras

8 mL del stock → 100 mL
+ 2 mL de placebo

Estándar 1 (Área)	Estándar 2 (Área)
240201 242668 243721 243939 245417 244289 244419	245317 245683
$\bar{X} = 243522$ C.V. = 0.7	$\bar{X} = 245500$

CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CONCENTRACIÓN FINAL (µg/mL)	RESPUESTA OBTENIDA (Área)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% RECUPERADO
10.02	100.20	241022	9.94	99.2
10.02	100.20	239936	9.90	98.8
10.02	100.20	239628	9.88	98.6
10.02	100.20	240055	9.90	98.8
10.02	100.20	240004	9.90	98.8
10.02	100.20	240107	9.90	98.8

	Obtenido	Criterio de Aceptación
Media del porcentaje recuperado	98.8%	98.0 – 102.0%
Intervalo de confianza para la media poblacional (IC _μ)	98.6, 99.0	el promedio aritmético se incluye en el intervalo
Coefficiente de variación (C.V.)	0.2%	≤ 2.0%

PRECISIÓN INTERMEDIA

Diluciones:

Estándar: Peso del estándar \longrightarrow 50 mL

10 mL \longleftarrow \longrightarrow 50 mL

2 mL de producto terminado \longrightarrow 100 mL

	Analista 1		Analista 2	
	Estándar 1	Estándar 2	Estándar 1	Estándar 2
D I 1 A	239916	243041	243340	244095
	240395	246411	243347	244312
	243103		244531	
	244208		243873	
	243850		243814	
Peso (mg) =	25.0	25.2	25.0	25.0
8=	242294	244726	243781	244204
C.V. =	0.8		0.2	
Factor de				
recobro=	99.6		99.8	
D I 2 A	243143	242722	245810	241212
	242583	243521	245421	244011
	242916		245014	
	242744		245016	
	242803		245357	
Peso (mg) =	25.0	24.9	25.0	25.0
8=	242838	243122	245324	242612
C.V. =	0.1		0.1	
Factor de				
recobro =	99.5		101.1	

	Analista 1 (%)	Analista 2 (%)
D I 1 A	111.5	110.8
	108.1	111.6
	110.6	111.4
D I 2 A	112.2	109.8
	111.5	109.2
	112.2	108.8
\bar{X} (n=6)	111.1%	110.3%
C.V. (n=6)	1.4	1.1

Contenido teórico: 5 mg/mL. (Contiene un 10% de exceso)

	Obtenido	Criterio de Aceptación
Media	110.7%	N/A
Coefficiente de variación (C.V.)	1.2%	≤ 2.0%

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA Y DE LA SOLUCIÓN PATRÓN DE REFERENCIA

Se utilizaron las muestras correspondientes a la etapa de precisión intermedia del A1D1

Producto terminado. Temperatura ambiente

MUESTRA	ANÁLISIS INICIAL (%)	ANÁLISIS 24 h (%)
1	112.2	112.3
2	111.5	112.0
3	112.2	112.8
Media(n=3)	112.0	112.4
d _i		0.4

Enantato de estradiol solución patrón de referencia. Temperatura ambiente

MUESTRA	ANÁLISIS INICIAL (%)	ANÁLISIS 24 h (%)
1	100.2	100.8
2	99.1	100.1
Media (n=2)	99.7	100.5
d _i		0.8

Criterio de Aceptación:	La diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto al análisis inicial d _i debe ser ≤ 2.0%.
--------------------------------	---

ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO

MEDIO DEGRADANTE	PLACEBO	MATERIA PRIMA			PRODUCTO TERMINADO		
		% Recobro	Angulo de Pureza	Angulo de Ruido	% Recobro	Angulo de Pureza	Angulo de ruido
MEDIO ÁCIDO HCl 3N (5 mL, 20 minutos, ebullición)	s/interferencia	59.9	0.201	0.369	63.9	0.072	3.758
MEDIO ÁCIDO HCl 3N (5 mL, 15 minutos, ebullición)	N/A	76.0	0.145	0.578	81.6	0.125	1.954
MEDIO BÁSICO NaOH 3N (5 mL, 20 minutos, ebullición)	s/interferencia	19.3	0.095	0.473	44.3	0.450	1.84223
MEDIO BÁSICO NaOH 3N (5 mL, 15 minutos, ebullición)	N/A	96.6	0.078	0.553	90.5	0.304	1.784
Luz UV (15 días)	s/interferencia	98.6	0.102	0.390	96.4	0.947	1.571
Temperatura 60°C (15 días)	s/interferencia	89.9	0.099	0.782	97.7	0.412	1.787

El método es específico, ya que los picos de degradación no interfieren con el pico al tiempo de retención correspondiente a enantato de estradiol (aproximadamente 7.4 min).

Ver Anexo V

ROBUSTEZ

Condiciones de trabajo manejadas:

- Condición normal: Metanol:agua, 80:20
- Condición 1: Metanol:agua, 82:18
- Condición 2: Metanol:agua, 78:22

CONDICIÓN	EFICIENCIA	TIEMPO DE RETENCIÓN	FACTOR DE CAPACIDAD	FACTOR DE COLEO	(%) RECOBRO	(%) di
Condición 1	3446	5.7	2.8	1.1	110.4	0.3
Normal	3156	7.1	3.8	1.1	110.1	N/A
Condición 2	3312	8.9	4.9	1.1	111.8	1.7

Crterio de Aceptación:

La diferencia absoluta entre los promedios obtenidos del porcentaje de recobro en cada condicin de anlisis no es mayor al 2.0% respecto al porcentaje de recobro de la condicin normal.

CAPÍTULO V. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

5.1 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Al revisar los resultados obtenidos se observa que se logró obtener métodos analíticos que pueden ser utilizados para la cuantificación de enantato de estradiol y acetofénido de dihidroxiprogesterona en materia prima y producto terminado, tanto para su utilización en control de calidad y análisis de producto terminado y en proceso, así como en el análisis de muestras sometidas a estudios de estabilidad.

Durante la etapa de desarrollo se presentaron diversos problemas para lograr obtener un solo método analítico por medio del cual se pudieran cuantificar ambos activos en la misma corrida, con parámetros cromatográficos dentro de los criterios de aceptación establecidos, ya que si la columna utilizada presenta problemas de presión después de un pequeño número de inyecciones, esta no es la adecuada para su uso cotidiano en el laboratorio de control de calidad, ya que a pesar de obtener los 2 picos en una sola corrida, en un tiempo aceptable, el costo final del análisis se incrementa considerablemente al ser necesario un cambio constante de la columna, esto sin contar con el hecho de ser una columna de alto costo.

Después de analizar lo anterior se decidió separar los métodos de análisis, con lo cual se logró obtener métodos analíticos confiables y reducir el costo total del análisis.

5.2 CONCLUSIONES

5.2.1 Método indicador de estabilidad para la determinación de acetofénido de dihidroxiprogesterona

- El sistema para acetofénido de dihidroxiprogesterona es preciso para una concentración de 598.32 $\mu\text{g/mL}$ con un C.V. de 0.3%.
- El sistema es lineal para acetofénido de dihidroxiprogesterona en un intervalo de concentración de 298.96 a 901.28 $\mu\text{g/mL}$, con un C.V. en todo el intervalo de 0.6%, una r^2 de 0.9999 y cumple con el intervalo de confianza para la pendiente.
- El método es lineal para acetofénido de dihidroxiprogesterona en un intervalo aproximado de 74.94 a 224.72 mg, (299.76 a 898.88 $\mu\text{g/mL}$ de concentración final), con un C.V. total de 0.6% y una r^2 de 1.0000. Los C.V. para cada nivel son menores al límite establecido para el criterio de aceptación. Cumple con los intervalos de confianza para la pendiente y la ordenada al origen cuando se considera como máximo un C.V. de regresión de 2.0%. Cumple con el intervalo de confianza para la media del porcentaje recuperado en el intervalo de trabajo establecido.
- El método para acetofénido de dihidroxiprogesterona es exacto y repetible para una cantidad aproximada de 149.98 mg, correspondiente al 100% (concentración final 599.92 $\mu\text{g/mL}$), con una media del porcentaje recuperado de 99.9% y un C.V. de 0.2%. Cumple con el intervalo de confianza para la media poblacional.
- El método resultó reproducible para la formulación cuando se determinó en el lote 21Y698 de producto terminado. El C.V. total de doce análisis de dos analistas en dos corridas diferentes fue de 0.8% para acetofénido de dihidroxiprogesterona.
- Las soluciones patrón de referencia y solución muestra listas para el análisis son estables cuando menos por un período de 24 h a temperatura ambiente protegidas de la luz, ya que cumple con los criterios establecidos.
- El método es específico ya que el placebo y los productos de degradación no interfieren en la cuantificación de acetofénido de dihidroxiprogesterona.
- El sistema es robusto a cambios de $\pm 2\%$ de proporción orgánica (mantenimiento constante la relación entre ellos) en la fase móvil.
- Cumpliendo con los criterios establecidos el método analítico para la determinación acetofénido de dihidroxiprogesterona en el producto terminado por HPLC es aplicable en el control de calidad del producto y para monitorear la estabilidad del mismo.

5.2.2 Método indicador de estabilidad para la determinación de enantato de estradiol

- El sistema para enantato de estradiol es preciso para una concentración de 99.99 $\mu\text{g/mL}$ con un C.V. de 0.3%.
- El sistema es lineal para enantato de estradiol en un intervalo de concentración de 49.99 a 149.98 $\mu\text{g/mL}$, con un C.V. en todo el intervalo de 0.2%, una r^2 de 1.0000 y cumple con el intervalo de confianza para la pendiente.
- El método es lineal para enantato de estradiol en un intervalo aproximado de 5.01 a 150.20 mg, (50.10 a 150.20 $\mu\text{g/mL}$ de concentración final), con un C.V. total de 0.6% y una r^2 de 0.9998. Los C.V. para cada nivel son menores al límite establecido para el criterio de aceptación. Cumple con los intervalos de confianza para la pendiente y la ordenada al origen cuando se considera como máximo un C.V. de regresión de 2.0%. Cumple con el intervalo de confianza para la media del porcentaje recuperado en el intervalo de trabajo establecido.
- El método para enantato de estradiol es exacto y repetible para una cantidad aproximada de 10.02 mg, correspondiente al 100% (concentración final 100.20 $\mu\text{g/mL}$), con una media del porcentaje recuperado de 98.8% y un C.V. de 0.2%. Cumple con el intervalo de confianza para la media poblacional.
- El método resultó reproducible para la formulación cuando se determinó en el lote 21Y698 de producto terminado. El C.V. total de doce análisis de dos analistas en dos corridas diferentes fue de 1.2% para enantato de estradiol.
- Las soluciones patrón de referencia y solución muestra listas para el análisis son estables cuando menos por un período de 24 h a temperatura ambiente protegidas de la luz, ya que cumple con los criterios establecidos.
- El método es específico ya que el placebo y los productos de degradación no interfieren en la cuantificación de enantato de estradiol.
- El sistema es robusto a cambios de $\pm 2\%$ de proporción orgánica (mantenimiento constante la relación entre ellos) en la fase móvil.
- Cumpliendo con los criterios establecidos el método analítico para la determinación enantato de estradiol en el producto terminado por HPLC es aplicable en el control de calidad del producto y para monitorear la estabilidad del mismo.

CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA

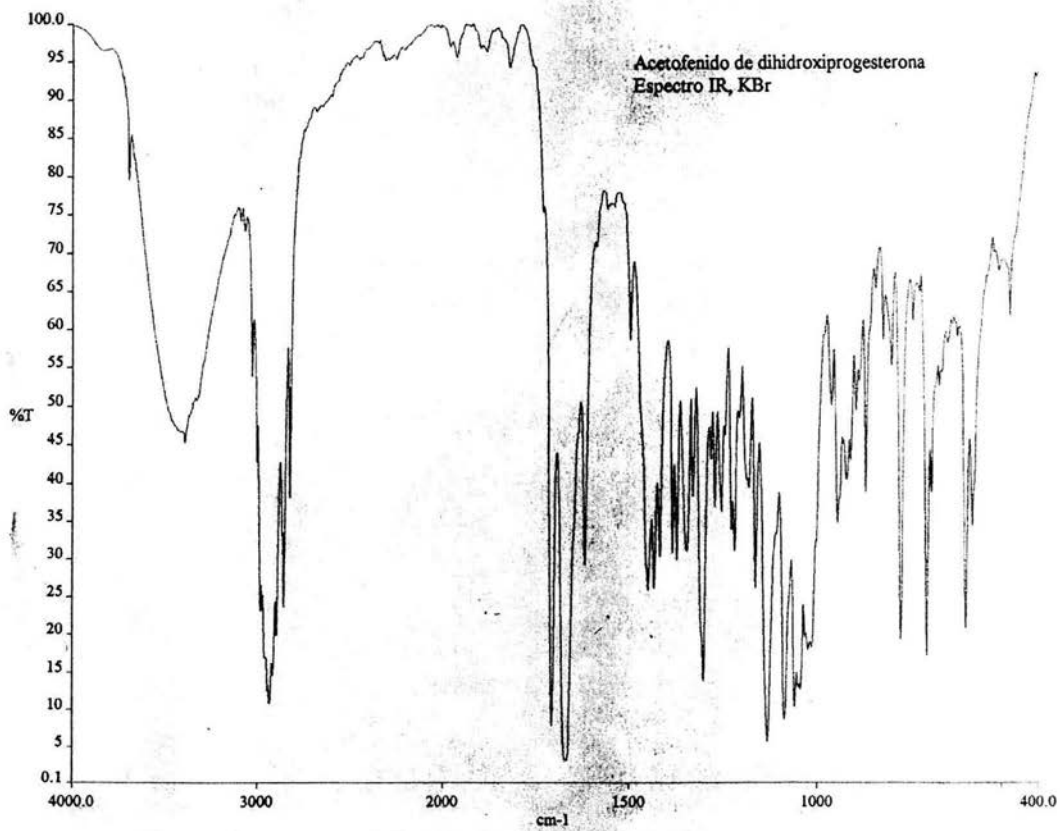
1. Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics. Edited by Hardman, J. Limbird, L. 10th edition. Mc Graw Hill, 2001. USA. págs. 1597-1634.
2. The Merck Index. 13th dition. Merck & Co. Inc. 2001 USA. págs. 46, 193, 659-660.
3. Clarke's. Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids and Post-Mortem Material. 2nd edition. The Pharmaceutical Press. London. 1986. págs. 201-220, 830-831,929-930.
4. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. 2nd Edition. Volume I. Edited By Swarbrick, J. Boylan, J. Marcel Dekker Inc. 2002. USA. págs. 414-425.
5. A Practical Guide to Instrumental Analysis. Einö Pungor. CRC Press. 1995 . USA. págs. 229-250.
6. Practical High Performance Liquid Chromatography. Meyer, V. John & Wiley sons. 1989. págs. 4-6, 15-99, 150-155.
7. Principles and Practice of Chromatography. Ravindranath, B. John & Wiley sons. 1988. págs. 54-85, 235-261, 405-413, 417-431, 441-456.
8. Practical HPLC Methodology and Application. Bidlingmeyer, B. John & Wiley sons. 1992. págs. 1-25, 68-103, 104-317.
9. Journal of Chromatography Library Volume 51-A, 5th edition. Part A. Fundamentals and Techniques. Edited by Etterman. Elsevier. 1992. págs. A151-A221.
10. Journal of Chromatography Library Volume 51-B, 5th edition. Part B. Applications. Edited by Etterman. Elsevier. 1992. págs. B393-B433.
11. Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals. Edited by Adamovics, J. A. Marcel dekker Inc. 1990. USA. págs. 9-20, 27-31, 49-53, 167-185.

12. High pH Mobile Phase Effects on Silica-Based Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic Columns; J.J. Kirkland, M.A. van Straten, H.A. Claessens, Journal of Chromatography A, (1995)
13. United States Pharmacopeia. 2002. págs. 1453-1455, 689-697, 1982-1994, 2256-2259.
14. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 7ª edición. 2000. págs. 489-490, 655-656, 764-767.
15. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. Ediciones PLM. 2002. México. pág. 2564.
16. Operator's Guide. PDA Detector. Waters 996. Waters. 1997. págs. 5-1, 5-9.
17. Stability-Indicating HPLC Method Development. A Systematic Approaching using pH and Column Selectivity. págs. 1-14. Waters. 2002.
18. Guía de Validación de Métodos Analíticos. Editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, A.C. 2002. págs. 8-11, 17-39, 56-91.
19. Chromatography Columns and Supplies Catalog 2003-2004. Waters. 2003. págs. 89-111.
20. Curso Básico de Cromatografía de Líquidos. Memorias. Perkin Elmer de México, S.A. 2000.
21. Curso de Selección de Columnas. Memorias. Waters. 2002

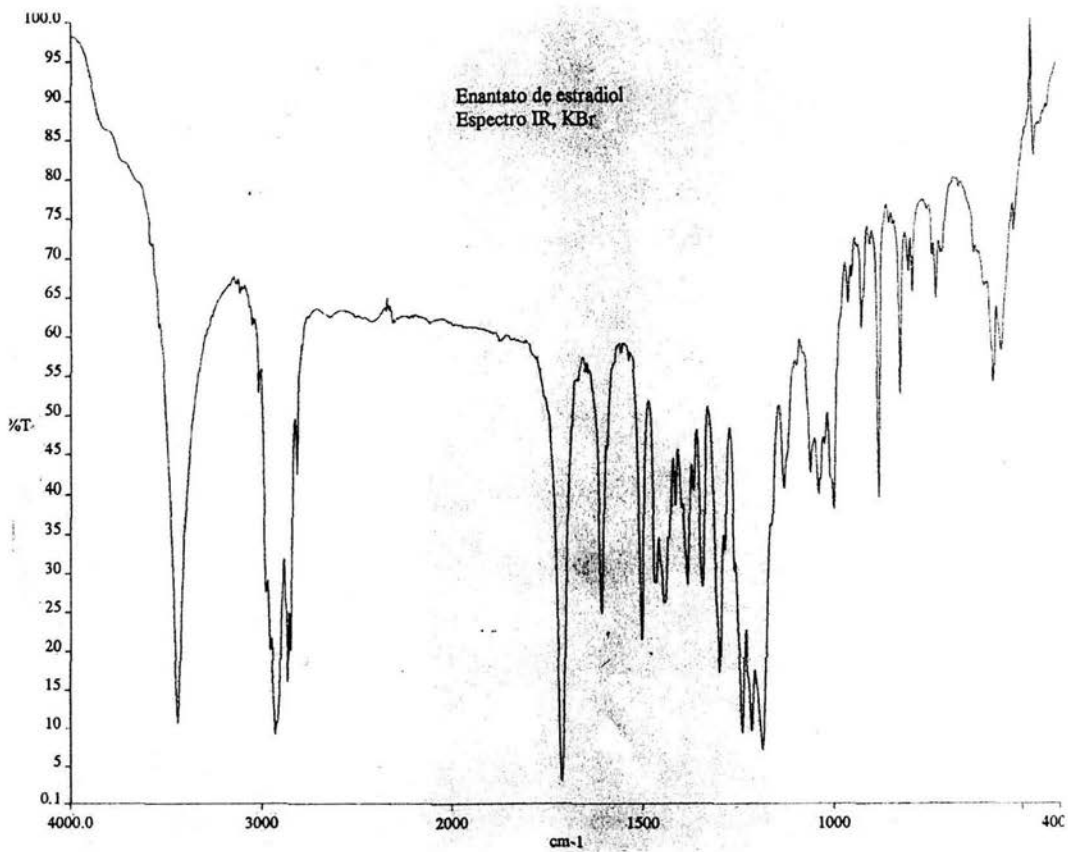
CAPÍTULO VII. ANEXOS

ANEXO I

a) Espectro de infrarrojo de acetofénido de dihidroxiprogesterona

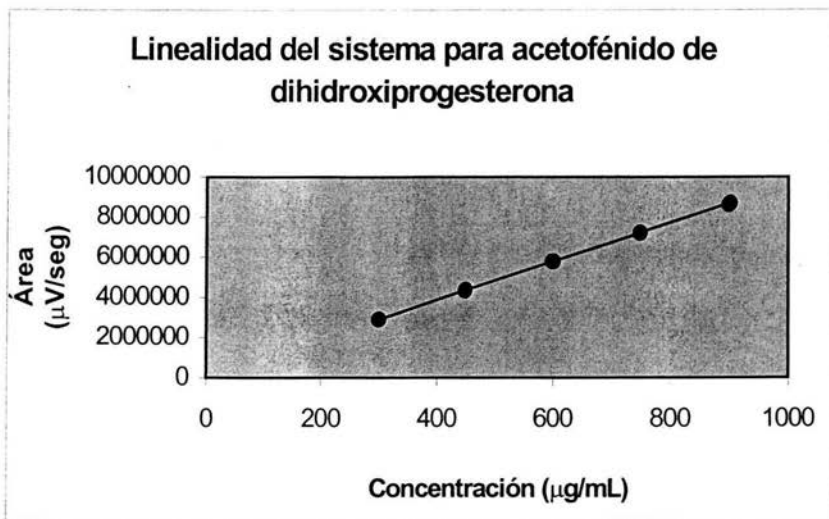


b) espectro de infrarrojo de enantato de estradiol

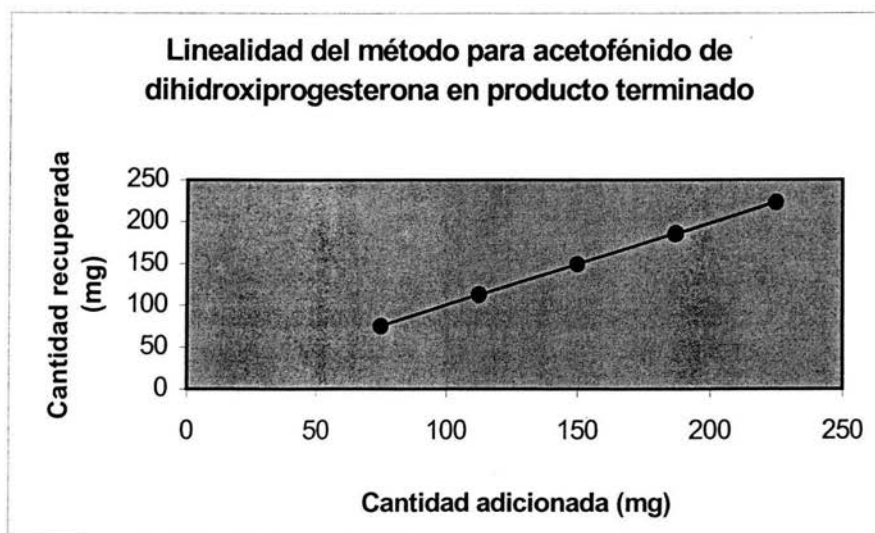


Anexo II.

Gráfica No. 1. Linealidad del Sistema para Acetofénido de Dihidroprogesterona

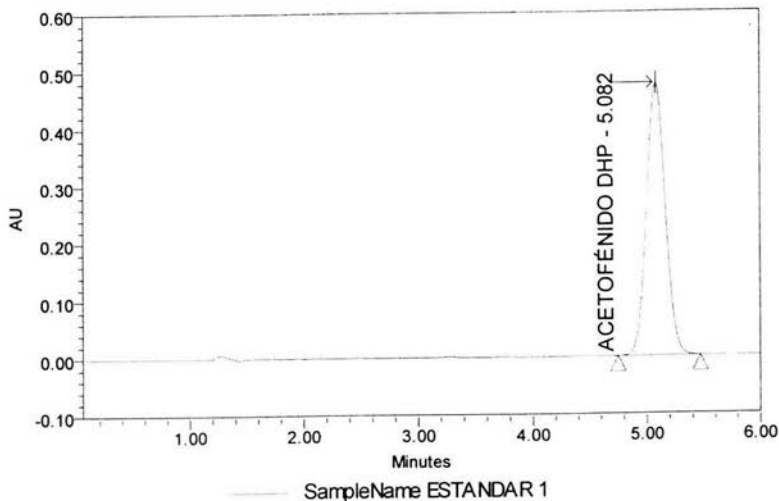


Gráfica No. 2. Linealidad del Método para Acetofénido de Dihidroprogesterona

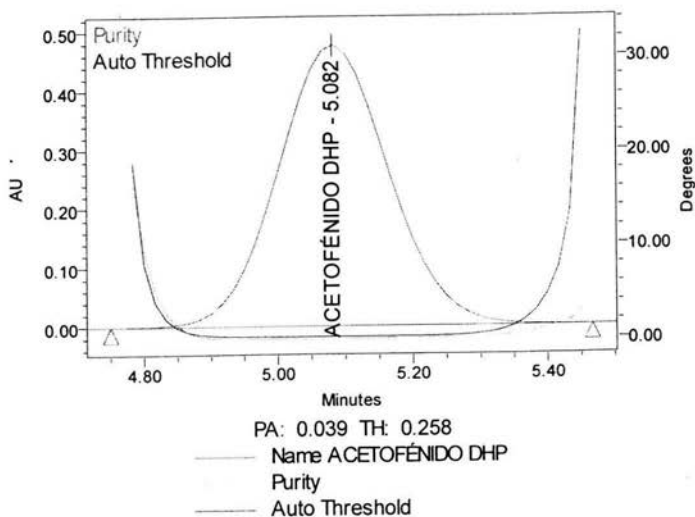


ANEXO III.

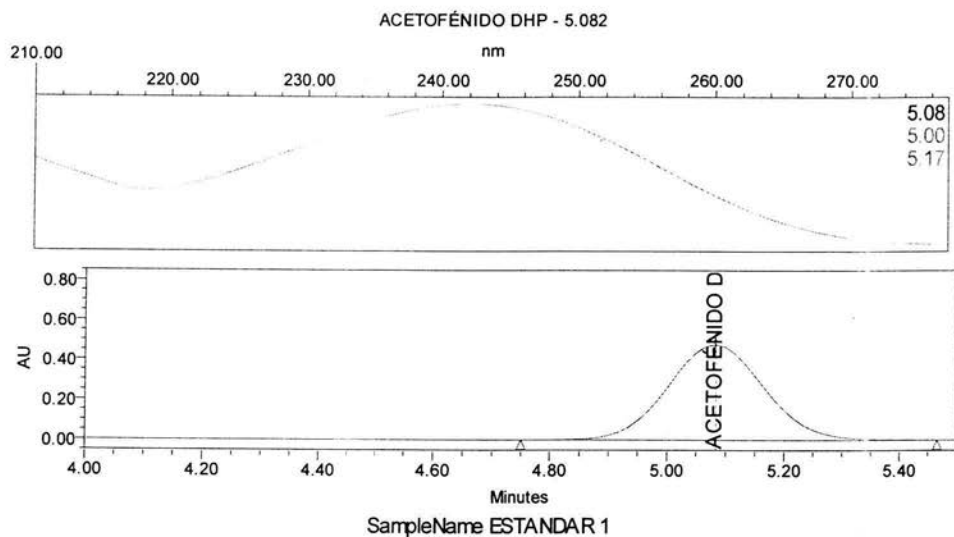
1. Cromatograma de la solución patrón de referencia de acetofénido de dihidroxiprogesterona.



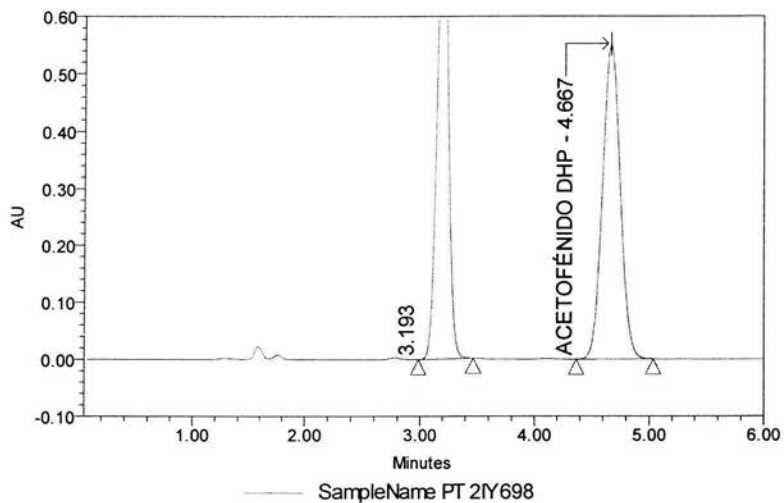
2. Análisis de pureza de la solución patrón de referencia de acetofénido de dihidroxiprogesterona



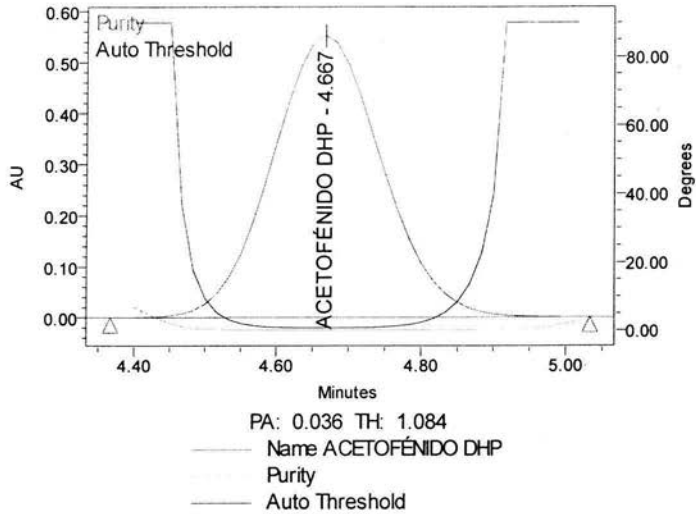
3. Análisis espectral de la la solución patrón de referencia de acetofénido de dihidroxiprogesterona.



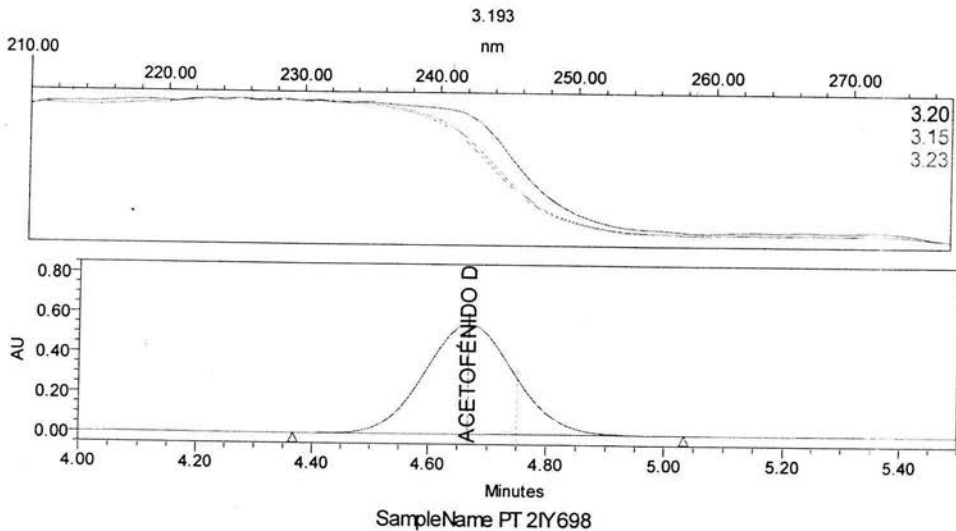
4. Cromatograma del producto terminado.



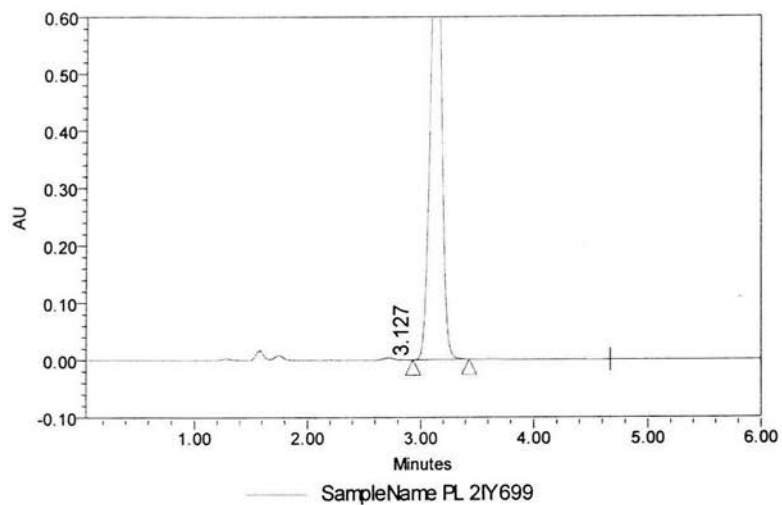
5. Análisis de pureza de acetofénido de dihidroxiprogesterona en producto terminado.



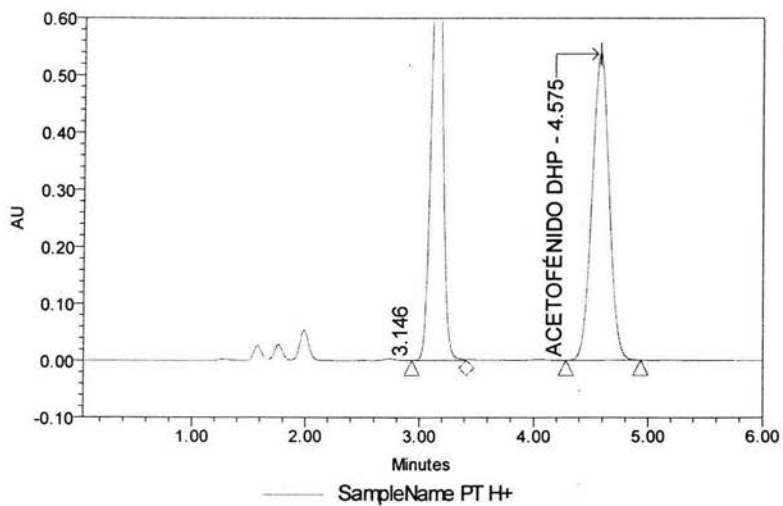
6. Análisis espectral de acetofénido de dihidroxiprogesterona en producto terminado.



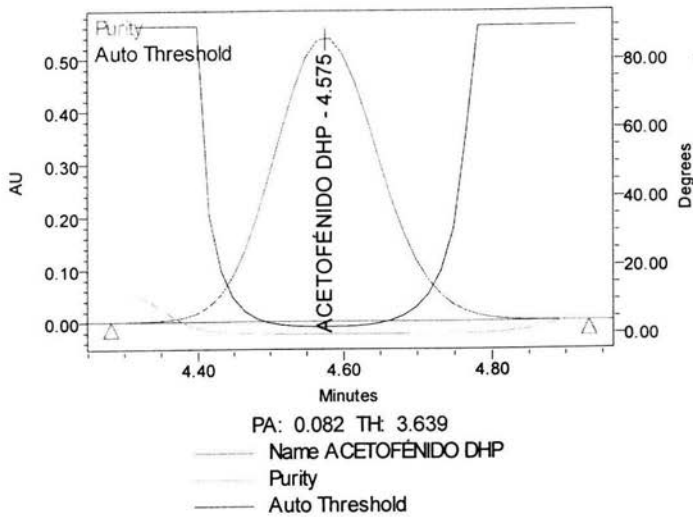
7. Cromatograma de placebo.



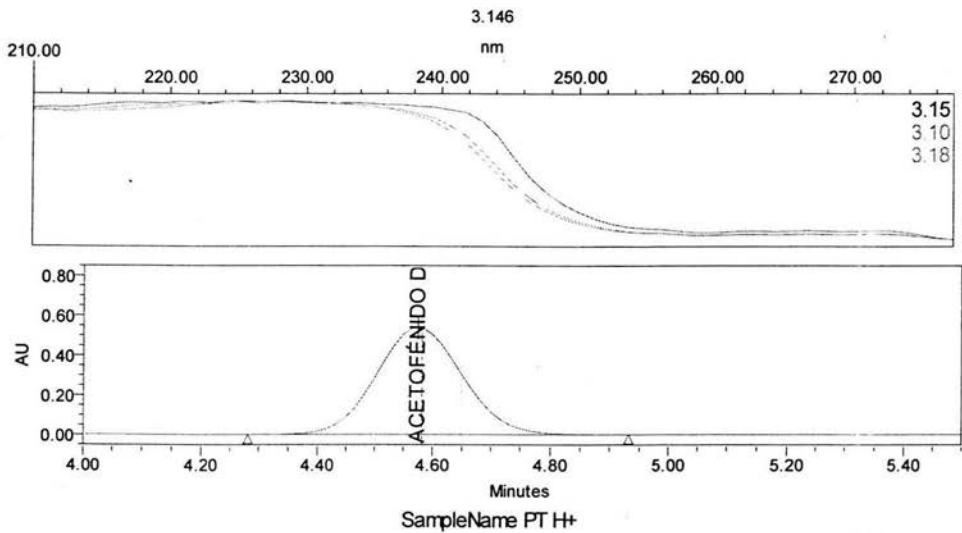
8. Cromatograma de producto terminado tratado con ácido clorhídrico 3N.



9. Análisis de pureza de acetofénido de dihidroxiprogesterona en producto terminado tratado con ácido clorhídrico 3N.

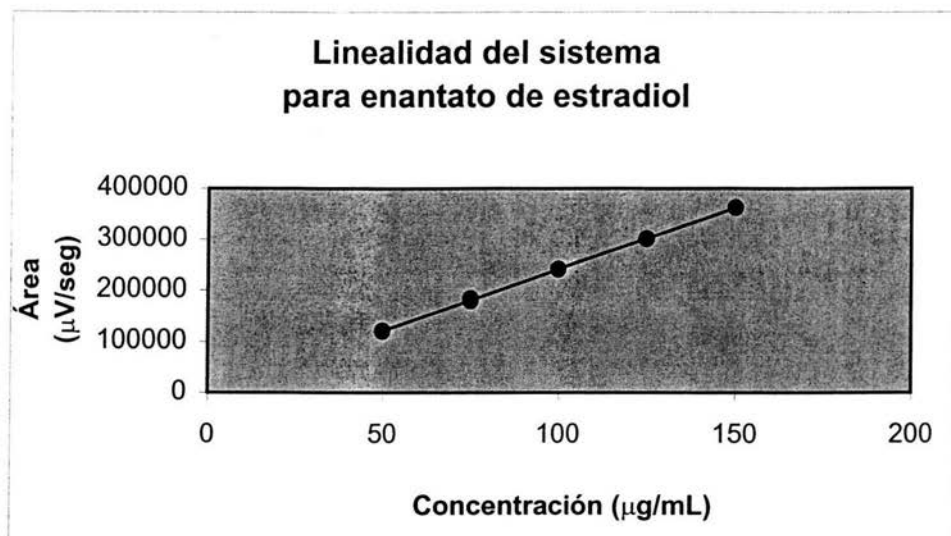


10. Análisis espectral de acetofénido de dihidroxiprogesterona en producto terminado tratado con ácido clorhídrico 3N.

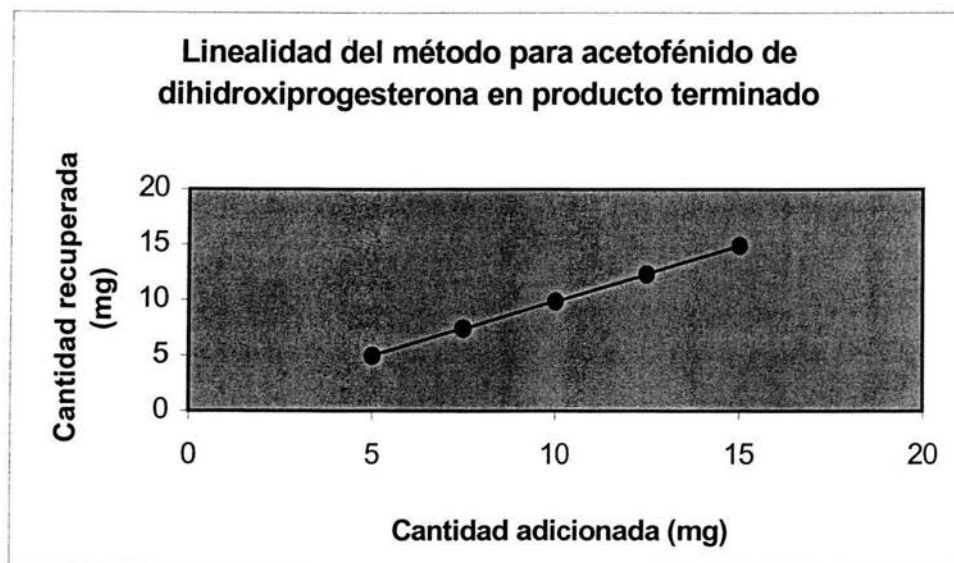


ANEXO IV.

Gráfica No. 3. Linealidad del Sistema para Enantato de Estradiol

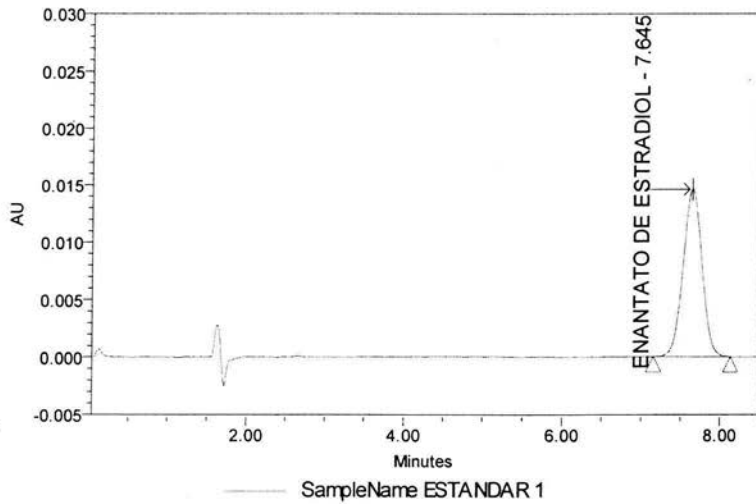


Gráfica No. 4. Linealidad del Método para Enantato de Estradiol

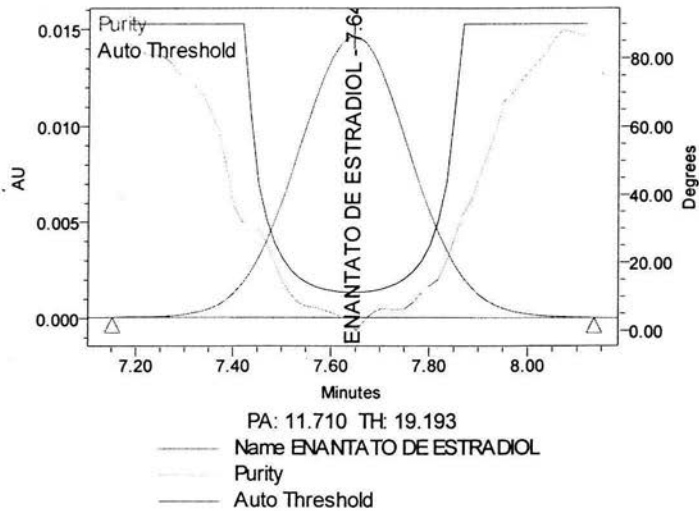


ANEXO V.

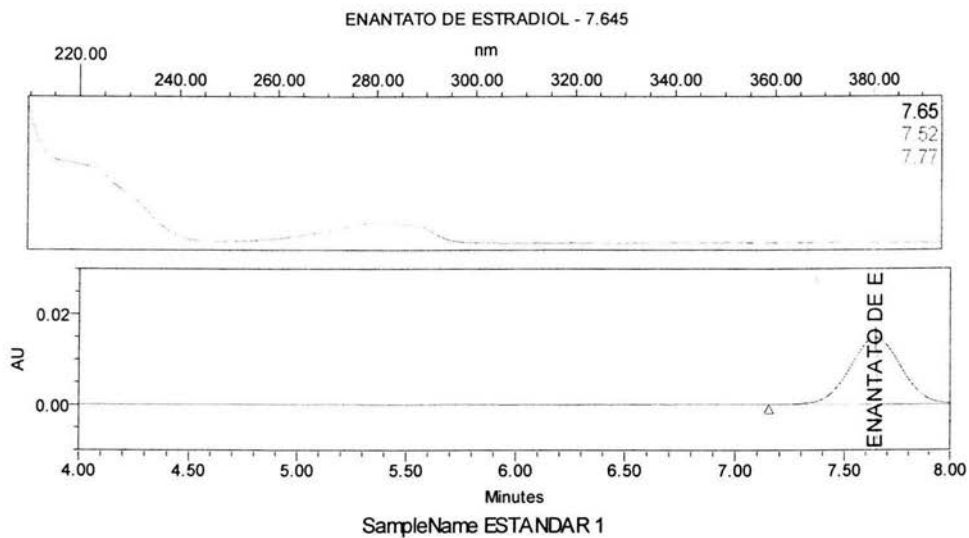
1. Cromatograma de la solución patrón de referencia de enantato de estradiol.



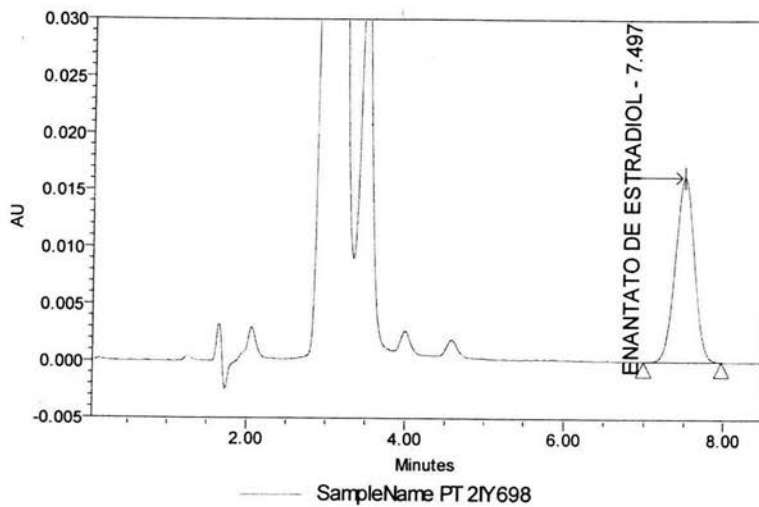
2. Análisis de pureza de la solución patrón de referencia de enantato de estradiol.



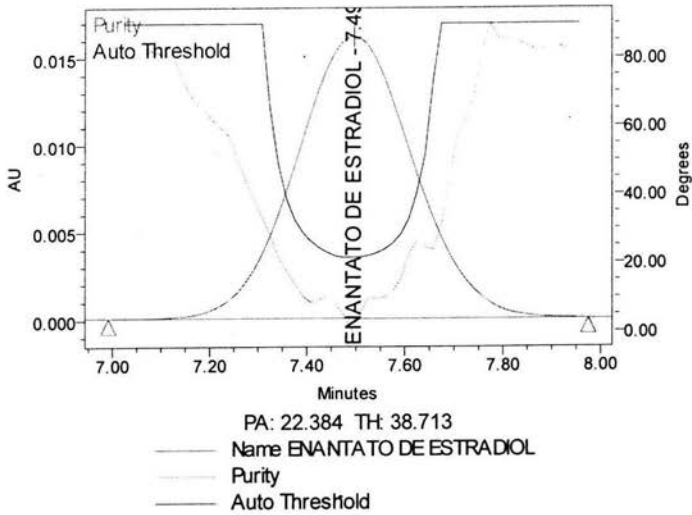
3. Análisis espectral de la la solución patrón de referencia de enantato de estradiol.



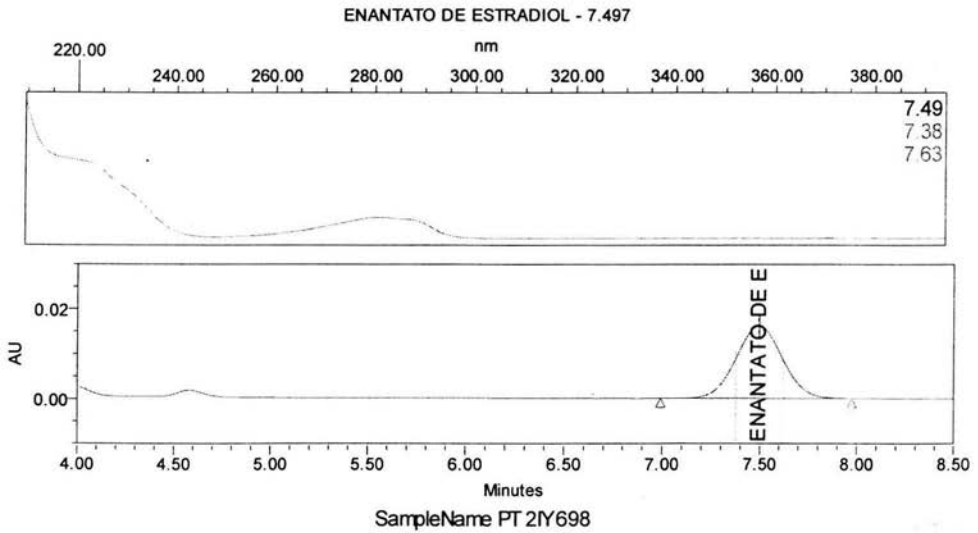
4. Cromatograma del producto terminado.



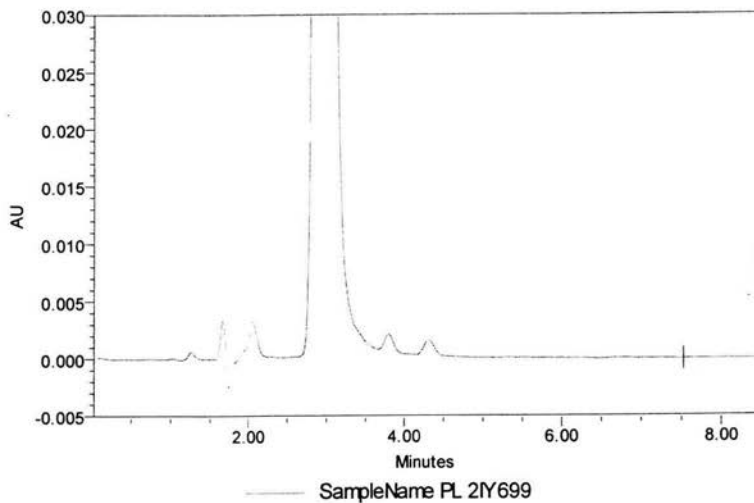
5. Análisis de pureza de enantato de estradiol. en producto terminado.



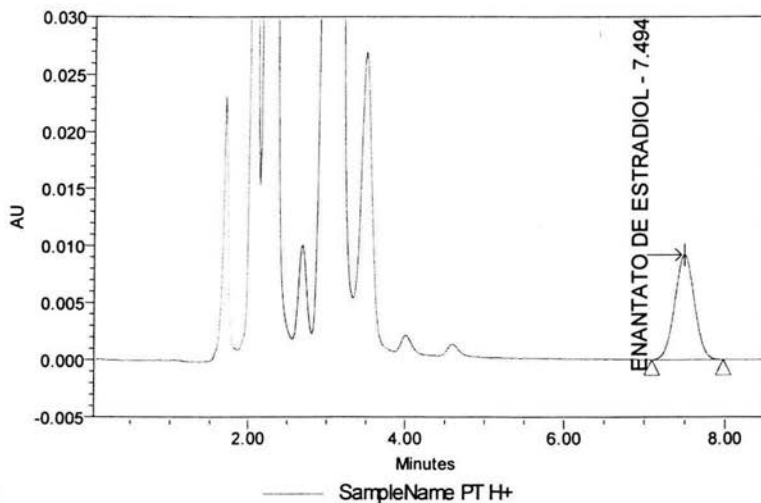
6. Análisis espectral de enantato de estradiol en producto terminado.



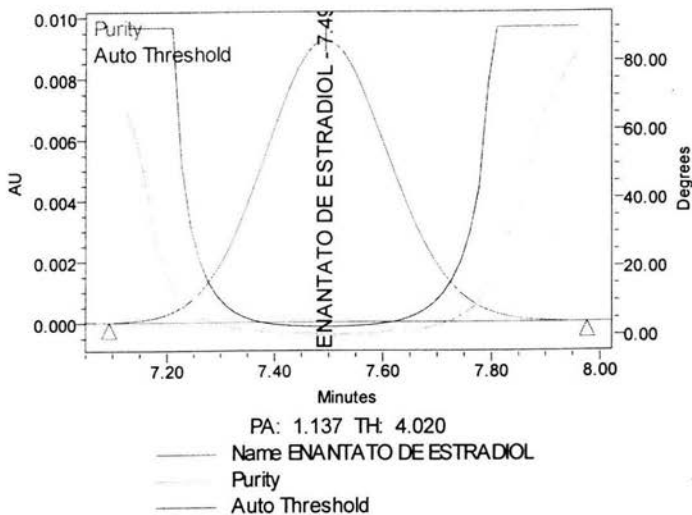
7. Cromatograma de placebo.



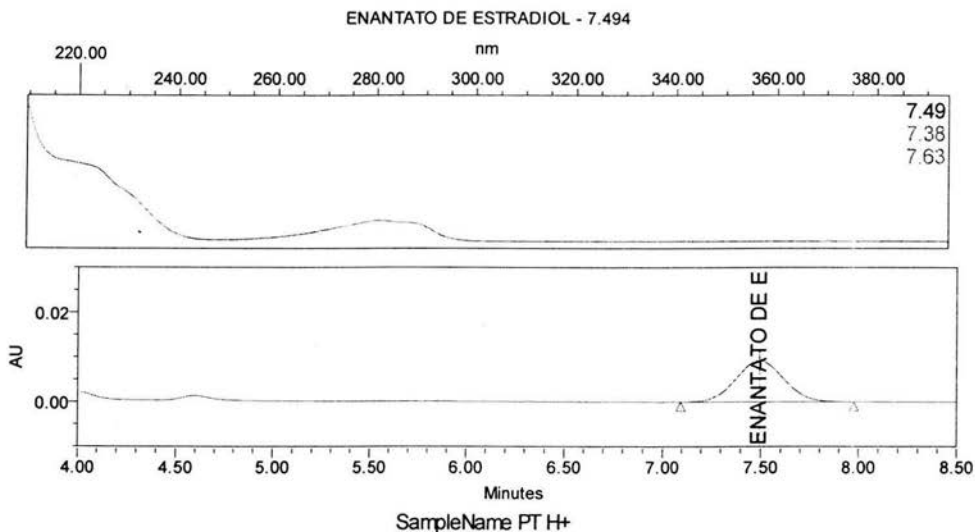
8. Cromatograma de producto terminado tratado con ácido clorhídrico 3N.



9. Análisis de pureza de enantato de estradiol en producto terminado tratado con ácido clorhídrico 3N.



10. Análisis espectral de enantato de estradiol en producto terminado tratado con ácido clorhídrico 3N.



ANEXO VI.

Formulas realizar los cálculos correspondientes a las diferentes etapas de la validación.

a) Factor de recobro

$$F.R. = \frac{R_{S1} \times P_{S2} \times 100}{R_{S2} \times P_{S1}}$$

Donde:

R_{S1} = Respuesta promedio de las primeras cuatro inyecciones del estándar 1

R_{S2} = Respuesta promedio de las inyecciones del estándar 2

P_{S1} = Peso del estándar 1 (mg)

P_{S2} = Peso del estándar 2 (mg)

b) Cantidad adicionada

$$\text{Cantidad adicionada (mg)} = \text{Peso(mg)} \times F.V$$

Donde:

F.V. = Factor de valoración del estándar (valoración % / 100)

c) Concentración

$$\text{Concentración } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Cantidad adicionada(mg)} \times 1000 \times \text{alícuota (mL)}}{\text{aforo (mL)} \times \text{alícuota}}$$

d) Cantidad recuperada

$$\text{Cantidad recuperada (mg)} = \frac{R_m \times F.V. \times P_{S1}(\text{mg}) \times \text{alícuota (mL)}}{R_{STD} \times \text{aforo (mL)} \times \text{alícuota}}$$

Donde :

R_m = Respuesta de la muestra

R_{STD} = Respuesta del estándar

F.V. = Factor de valoración del estándar

P_{S1} = Peso del estándar 1

e) Porcentaje de recobro de producto terminado

$$\% \text{ recuperado} = \frac{R_m \times F.V. \times P_{S1}(\text{mg}) \times \text{alícuota (mL)} \times 1}{R_{STD} \times \text{aforo (mL)} \times \text{alícuota} \times \text{contenido en la formulación (mg)}}$$

Donde :

R_m = Respuesta de la muestra

R_{STD} = Respuesta del estándar

F.V. = Factor de valoración del estándar

P_{S1} = Peso del estándar 1

f) Porcentaje de recobro de la sustancia de referencia

$$\% \text{ recuperado} = \frac{R_m \times F.V._{STD} \times P_{STD} \text{ (mg)} \times 100}{R_{STD} \times F.V. \text{ m} \times P_m \text{ (mg)}}$$

Donde :

R_m = Respuesta de la muestra

R_{STD} = Respuesta del estándar

F.V. m = Factor de valoración de la muestra

F.V. _{STD} = Factor de valoración del estándar

P_{STD} = Peso del estándar

P_m = Peso de la muestra