



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANÁLITICO
PARA LA DETERMINACIÓN DE PIROXICAM EN DIFERENTES
FORMAS FARMACÉUTICAS

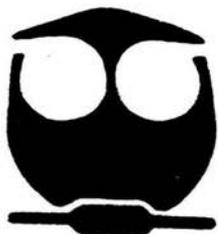
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

SAÚL SALVADOR VALIENTE CRUZ



MÉXICO, D.F. **EXAMENES PROFESIONALES**
FACULTAD DE QUÍMICA

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente Prof. Alfredo Garzón Serra
Vocal Prof. Adolfo García Osuna
Secretario Prof. Lucía Hernández Garcíadiego
1er suplente Prof. José Manuel Morales Hernández
2do suplente Prof. María de los Dolores Campos Echeverría

Sitio donde se desarrollo el tema:

Nysco de México S.A. de C.V.

Asesor del tema:



Q.F.B. Alfredo Garzón Serra

Supervisor técnico:



Q.F.B. Isabel Domínguez Suárez

Sustentante:



Saúl Salvador Valiente Cruz

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de esta honorable y distinguida casa de estudios especialmente a la Facultad de Química.

A los profesores y todas las personas involucradas en mi formación profesional.

Al Q.F.B. Alfredo Garzón Serra por darme la oportunidad de formarme, por su paciencia, consejos y tiempo empleado para poder hacer este trabajo.

Al la Q.FB. Isabel Domínguez E. por su valiosa colaboración en la supervisión técnica de esta tesis.

A Nysco de México y todas las compañeras y compañeros que ahí laboran por que gracias a su experiencia me mostraron el camino para ser un profesional en el desarrollo de mi trabajo.

Al Profesor Adolfo García Osuna por sus consejos y tiempo invertido en la revisión de esta tesis.

A la Profesora Lucía Hernández Garcíadiego por su valiosa colaboración en la revisión de esta tesis.

A mis compañeros y amigos con los que he convivido a lo largo de estos años gracias por su apoyo: Víctor Torres, Leda Gómez, Delia Gutiérrez, Eduardo Arenas, Arturo Meneses, David Puebla†, gracias por brindarme su amistad.

A todas las personas que me rodean porque gracias a ellas he logrado formarme un criterio que me permite ser una persona capaz de valorar a los demás.

A mis Padres, pero sobre todo a mi Madre que de estar aquí estaría orgullosa, de mi ya que gracias a sus consejos soy una persona honorable gracias por darme la vida y donde estés te seguiré queriendo y recordando.

ÍNDICE

	Página
Capítulo 1 Objetivo	1
Capítulo 2 Introducción	4
2.1.1 Aspectos regulatorios.....	4
Capítulo 3 Generalidades	8
3.1.1 Validación de métodos analíticos	8
3.1.2 Parámetros de la validación	8
3.1.3 Definiciones	10
3.1.4 Determinaciones	12
3.2 Parámetros básicos de la cromatografía de líquidos.....	15
3.2.1 La retención en la técnica cromatográfica.....	16
3.2.2 Principales parámetros cromatográficos	17
3.2.2.1 Tiempo de retención	17
3.2.2.2 Tiempo muerto.....	17
3.2.2.3 Tiempo de retención ajustado.....	17
3.2.2.4 Anchura de la base de las señales.....	17
3.2.2.5 Número de platos teóricos.....	18
3.2.2.6 Altura equivalente al plato teórico.....	20
3.2.2.7 Coeficiente de distribución o de reparto.....	20
3.2.2.8 Relación de capacidad.....	20
3.2.2.9 Resolución.....	21
3.2.2.10 Selectividad.....	21
3.3 Instrumentación en CLAR	23
3.3.1 Bomba cromatográfica	24
3.3.2 Sistemas de gradientes	26
3.3.3 Generación del gradiente de elución	26
3.3.4 Inyector	27
3.3.5 Columna cromatográfica	27
3.3.6 Fase estacionaria	28
3.3.7 Detector	28
3.3.8 Integradores	32
3.4 Técnicas cromatográficas de interacción	32
3.5 Análisis cuantitativo en CLAR	33
3.5.1 Medida del área y altura de los picos	33
3.6 Factores que afectan la precisión	34
3.7 Análisis cuantitativo	35
3.7.1 Análisis por calibración externa	35
3.7.2 Análisis por calibración interna	35
3.8 Preparación de muestras para CLAR	35
3.8.1 Muestreo	36
3.8.2 Almacenamiento	36
3.8.3 Extracción	36
3.8.4 Concentración / purificación	37
3.8.2.1 Técnicas de concentración / purificación.....	39
3.8.2.2 Purificación extracción líquido / líquido.....	39
3.8.2.3 Purificación: cromatografía columna clásica	40
3.8.2.4 Derivatización	40

3.9 Monografía del piroxicam	41
3.9.1 Identificación	42
3.9.2 Ensayos de pureza USP	42
3.9.3 Métodos analíticos USP	43
3.9.3.1 Cromatografía en capa fina	43
3.9.3.2 Análisis espectrofotométrico.....	43
3.9.3.3 Análisis por CLAR.....	43
3.10 Farmacología de piroxicam	45
3.10.1 Indicaciones	45
3.10.2 Reacciones secundarias	45
3.10.3 Farmacocinética	45
3.10.4 Toxicidad	46
3.10.5 Contraindicaciones	46
3.10.6 Vía de administración	46
3.10.7 Dosis	46
Capítulo 4. Parte experimental.....	47
4.0.1 Razón de validación al método original USP.....	47
4.1 Método analítico	47
4.1.1 Reactivos	47
4.1.2 Preparación de disoluciones	48
4.1.3 Procedimiento	49
Capítulo 5. Resultados.....	53
5.1.1 Linealidad del sistema para piroxicam	53
5.1.2 Precisión del sistema para piroxicam	55
5.1.3 Linealidad del método para piroxicam en tabletas.....	56
5.1.4 Linealidad del método para piroxicam en gel.....	57
5.1.5 Linealidad del método para piroxicam inyectable.....	58
5.1.6 Exactitud del método al 100 %	63
5.1.7 Reproducibilidad del método	65
5.1.8 Estabilidad de la muestra y de la solución de referencia.....	66
5.1.9 Tolerancia	68
5.1.10 Especificidad del método	71
Capítulo 6.....	76
6.1 Conclusiones.....	76
6.1 Conclusiones finales	78
6.3 Anexos	79
Bibliografía	93

CAPÍTULO 1

1. OBJETIVO

Desarrollar un método de análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificar el principio activo PIROXICAM, en tres formas farmacéuticas.

Probar que el método cumple con los requisitos de validación para métodos analíticos que establece la Secretaría de Salud.⁸

CAPÍTULO 2

2. INTRODUCCIÓN

Cuando se tiene interés en medir un componente en una muestra, es necesario contar con una metodología de medición (método analítico). Por ello las empresas de transformación (principalmente las farmacéuticas) requieren de este tipo de metodologías farmacopeicas o bien, dedicar tiempo para su desarrollo, partiendo del hecho que deben cumplir el atributo de confiabilidad. Como en muchas de las actividades de la industria farmacéutica se hace uso del método científico para alcanzar este atributo, es necesario llevar a cabo en la mayoría de las ocasiones estudios experimentales que permitan demostrar la confiabilidad de lo que se está midiendo. Un proceso que permite cumplir este fin, es la validación.

Como es bien sabido, todo producto farmacéutico debe reunir atributos de identidad, pureza, concentración, potencia, inocuidad y disponibilidad para cumplir con los aspectos normativos oficiales e internos y no menos importantes, los éticos, por lo que si un método analítico, que finalmente es el medidor de las características críticas de la calidad del producto, no es confiable, se corre el grave riesgo de afectar al usuario final que es un paciente.

Desde este enfoque la validación de métodos analíticos es un sistema involucrado en los aspectos de validación en el área de calidad de la empresa y bajo la filosofía de la Validación, las Autoridades Regulatorias verifican que las empresas sustenten estos sistemas con actividades documentadas, como se indica en la NOM-059 numerales 5.6.3, 5.7.4, 9.11.3, 9.11.5 y 9.12.3 en otros lineamientos regulatorios internacionales.⁸

2.1.1 ASPECTOS REGULATORIOS

Reglamento de Insumos para la Salud. Publicado en el Diario Oficial el 4 de febrero de 1998 referente a los establecimientos que se destinen a la fabricación de insumos (medicamentos, fármacos, materias primas y aditivos), establece lo siguiente.

ARTÍCULO 15: Los establecimientos que se destinen a la fabricación de insumos, Llevarán el control analítico de estos. Dicho control debe incluir:
III. La validación de las técnicas empleadas.

Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA-1993. Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos, establece los siguientes puntos referentes a la Validación de Métodos Analíticos.

NUMERAL DE LA NORMA	CONTENIDO
5.6	El encargado del área de producción se encargará de realizar las siguientes funciones, sin perjuicio de las obligaciones y responsabilidades que correspondan al responsable sanitario conforme a la Ley General de Salud y al Reglamento de Insumos para la Salud:
5.6.3	Que se lleven a cabo estudios de validación de los procesos de fabricación y los sistemas involucrados.
5.7	El encargado del área de calidad se encargará de realizar las siguientes funciones, sin perjuicio de las obligaciones y responsabilidades que correspondan al responsable sanitario, conforme a la Ley General de Salud y al Reglamento de Insumos para la Salud.
5.7.4	Que se lleven a cabo estudios de validación de los procesos de fabricación y los sistemas involucrados.
9.11.3	Los métodos analíticos deben ser validados, de acuerdo con lo establecido en el apartado 9.12 "control del laboratorio analítico".
9.12.3	Se debe contar con métodos de análisis validados para productos a granel, producto terminado y materia prima en caso de no aparecer en cualquier farmacopea internacional ni en la FEUM.

Norma Oficial Mexicana NOM-164-SSA1-1998, Buenas prácticas de fabricación para fármacos.

NUMERAL DE LA NORMA	CONTENIDO
16.1	Los controles de laboratorio e inspecciones deben apoyarse en normas, PNO's o manuales que contengan las especificaciones para garantizar la confiabilidad de los resultados. Tales controles deben incluir:

- 16.1.5 Validación de métodos analíticos utilizados por la empresa, no farmacopeicos que tengan desviaciones frente a la farmacopea de referencia.

Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-1993, Estabilidad de medicamentos.

NUMERAL DE LA NORMA	CONTENIDO
5.5	Cuando se cambie el método analítico durante el estudio de estabilidad, se debe demostrar que los dos métodos son equivalentes mediante el proceso de validación.
5.10.2	Información general, especificaciones y métodos analíticos:
5.10.2.3	Información de la linealidad, precisión, exactitud, reproducibilidad, repetibilidad y especificidad del método analítico indicativo de estabilidad.
6.	Fármacos
	Para fines de registro de un medicamento con fármacos nuevos en México, el fabricante debe presentar ante la S.S.A. estudios de estabilidad acelerada y/o a largo plazo de tres lotes del (los) fármaco(s) efectuados por el fabricante de los mismos utilizando métodos analíticos validados.

Las regulaciones anteriores, determinan la obligación de validar métodos analíticos⁸.

Los métodos de separación han constituido siempre una de las herramientas más importantes de la química analítica. En una época, el método esencial de separación y análisis fueron la precipitación, destilación pero poco a poco, los progresos técnicos y científicos permitieron el desarrollo de métodos de análisis que requieren un mínimo de separaciones.

Las técnicas analíticas que requieren de una separación siguen siendo indispensables en muchos casos, particularmente en el análisis de trazas o para el análisis de mezclas que contienen compuestos con propiedades y estructuras muy similares.

Entre las técnicas recientes de separación se distinguen especialmente la extracción y la cromatografía. En ambos casos la separación está basada en las diferencias de distribución de los compuestos de la muestra entre dos fases no miscibles.

La gran importancia actual de la cromatografía como método de separación proviene de su velocidad, su gran poder de resolución y de la posibilidad que ofrece para trabajar con cantidades muy pequeñas de muestra, por ejemplo, ciertas técnicas cromatográficas permiten realizar separaciones y análisis de rutina con concentraciones de compuestos del orden de los nanogramos o menos.

La cromatografía de líquidos instrumental, mejor conocida como cromatografía líquida de alta eficiencia o de alta resolución CLAE o CLAR por sus siglas respectivamente y en inglés HPLC por sus siglas en inglés "high performance liquid chromatography", se ha convertido en la actualidad en una herramienta indispensable en los laboratorios de control analítico, control de proceso y de análisis clínicos. El campo de aplicación de esta técnica es muy vasto como indica la siguiente lista, no exhaustiva, de productos que han podido separarse y analizarse exitosamente por medio de ella:

Aminoácidos	Péptidos	Ácidos nucleicos
Catecolaminas	Fármacos	Productos farmacéuticos
Plastificantes	Tensoactivos	Polímeros sintéticos
Pesticidas	Vitaminas	Líquidos fisiológicos

CAPÍTULO 3

3. GENERALIDADES

3.1.1 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS¹⁹

La validación de métodos analíticos es parte fundamental del desarrollo de una nueva formulación y de la técnica de análisis de control de calidad de una forma farmacéutica, ya que es durante esta secuencia de pruebas y análisis en donde el químico se da cuenta si el estudio, el cual está siendo evaluado sistemáticamente, cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado.⁸

Factores que deben tomarse en cuenta para el diseño de la validación de un método analítico:

- 1) Personal. Asegurar que se cuenta con el personal capacitado para la realización de las técnicas, manejo de equipos, instrumental, etc.
- 2) Equipos e instrumentos. Disponer de los equipos e instrumentos necesarios y que estos se encuentren en condiciones óptimas y calibrados.
- 3) Reactivos. Deben contar con la calidad requerida, ya sea, reactivo analítico, grado espectrofotométrico, grado CLAR, etc. según sea el caso.
- 4) Tiempo de análisis. Tiempo en el que se realiza el análisis completo de la forma farmacéutica.
- 5) Costo total del proyecto. Costo de las muestras del producto que se utilizan para efectuar los análisis durante el proyecto, el personal que interviene, los equipos, instrumentos, materiales y reactivos que se utilizan.

3.1.2 PARÁMETROS DE LA VALIDACIÓN

Cualquier proceso de medición está sujeto a error. El error de un método analítico debe evaluarse y controlarse; existen errores de dos tipos:

Errores Sistemáticos (Determinados) y Errores Aleatorios (Indeterminados)¹⁵

1.- Errores Sistemáticos (Determinados). Es posible determinar su valor y reducir su influencia y se clasifican en:

Errores Instrumentales; ocasionados por instrumentos poco confiables, así como por el equipo que se emplea para la determinación del principio activo.

Errores de operación; atribuibles al analista, son criterios que debe adoptar el analista y falta de habilidades al llevar a cabo operaciones manuales.

2.- Errores aleatorios (Indeterminados). Es imposible predecirlos, ya que se rigen por las leyes de la estadística y probabilidad, se llaman también incidentales; se manifiestan por pequeñas diferencias en mediciones sucesivas efectuadas por el mismo analista.

Los errores que no son posibles controlar son evaluados mediante la validación y aquellos cuyo control sí se pueda manejar y que influyen grandemente en la obtención de resultados deben mantenerse constantes.

Se consideran dos tipos de parámetros:

- Parámetros a Evaluar
- Parámetros a Controlar

Parámetros a Evaluar¹⁵

Son:

Para el sistema: Linealidad
 Precisión

Para el método: Linealidad
 Especificidad
 Repetibilidad
 Reproducibilidad y
 Exactitud

Parámetros a Controlar¹⁵

1.- Instrumentos y equipos, los cuales proveen resultados erróneos dependiendo de su manejo y funcionamiento, estos deben estar calibrados y en condiciones óptimas de funcionamiento.

2.- Referentes al analista: De manera general, el analista debe cumplir con las buenas prácticas de laboratorio.

Los defectos de manipulación no constituyen objeto de validación, sino que deben detectarse y corregirse.

3.- Materiales: El material volumétrico debe estar calibrado y debe ser de calidad óptima, tipo A, para evitar lecturas incorrectas.

4.- Reactivos: Estos deben ser de calidad analítica, o de alta pureza, según el tipo de análisis que se va a realizar y de preferencia evitar el uso de reactivos que sean inestables.

3.1.3 DEFINICIONES⁸

3.1.3.1 VALIDACIÓN

Proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

3.1.3.2 LINEALIDAD

Habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de una sustancia dentro de un intervalo determinado.

3.1.3.3 INTERVALO

Definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles de concentración superior e inferior de la sustancia, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

3.1.3.4 EXACTITUD

Concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el por ciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de sustancia.

3.1.3.5 PRECISIÓN

Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de Desviación Estándar o del Coeficiente de Variación.

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

- a) **REPETIBILIDAD.** Precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, equipo, laboratorio, etc.)

- b) **REPRODUCIBILIDAD.** Precisión de un método analítico expresado como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc.)

Reproducibilidad se define también como la precisión del método en diferentes laboratorios y en estudios comparativos. Esto también es llamado robustez.

3.1.3.6 LÍMITE DE DETECCIÓN

Mínima concentración de una sustancia en una muestra, la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

3.1.3.7 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Menor concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.

3.1.3.8 ESPECIFICIDAD

Habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

3.1.3.9 TOLERANCIA

Grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas sistemas de elución, tipos de empaque (soporte, fase estacionaria, etc.) condiciones ambientales, etc.

3.1.3.10 ROBUSTEZ

Medida de la capacidad del método de mantenerse sin modificación por pequeñas, pero deliberadas variaciones de los parámetros del método. Proporciona una indicación sobre su confiabilidad durante su uso normal.

3.1.3.11 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica, y la concentración de la sustancia de interés después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

3.1.4 DETERMINACIONES⁸

LINEALIDAD DE SISTEMA⁸

Se determina, construyendo una curva de calibración (concentración vs respuesta) utilizando por triplicado 5 diluciones preparadas a partir de una misma disolución de referencia y haciendo análisis cuando menos por duplicado, para cada dilución.

El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método, para control de calidad y de seguimiento de la estabilidad de un fármaco en una forma farmacéutica.

Se efectúan los siguientes cálculos:

Coefficiente de determinación	"r ² "
Pendiente	"b ₁ "
Intercepto al origen	"b ₀ "
Intervalo de confianza para la pendiente	"IC(β ₁)"

Criterio:

$r \geq 0.98$ IC(β₁) no debe incluir el cero.

PRECISIÓN DEL SISTEMA⁸

Se determina por el análisis por sextuplicado de una misma disolución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema.

Calcular; S y CV de la respuesta analítica

Criterio.

$$CV \leq 1.50$$

LINEALIDAD DEL MÉTODO⁸

Se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos 3 diferentes cantidades de la sustancia de interés, (placebos cargados), cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado.

Las concentraciones de los placebos cargados deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto, las concentraciones de las disoluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema.

Se gráfica cantidad adicionada vs. cantidad recuperada.

Se efectúan los siguientes cálculos:

Coefficiente de determinación	"r ² "
Pendiente	"b ₁ "
Intercepto al origen	"b ₀ "
Intervalo de confianza para la pendiente	"IC(β ₁)"
Intervalo de confianza para la ordenada al origen	"IC(β ₀)"
Coefficiente de variación de regresión	"CV _{y/x} "

Promedio aritmético	" \bar{y} "
Desviación estándar	"S"
Coficiente de Variación	"CV"
Intervalo de Confianza para la media poblacional del porcentaje del recobro	"IC(μ)"

Calcular el porcentaje de recobro de cada placebo adicionado, al obtener el cociente de la cantidad recuperada respecto a la cantidad adicionada expresada en porcentaje.

Criterio:

$$r^2 \geq 0.98, IC(\beta_1) \text{ debe incluir la unidad, } IC(\beta_0) \text{ debe incluir el cero, } CV_{y/x} < 2 \%,$$

Porcentaje de recobro

IC(μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro esté en el intervalo 98-102 %, CV < 2 %

PRECISIÓN DEL MÉTODO (Reproducibilidad)⁸

Se determina a partir de una muestra homogénea del producto cercana al 100% de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado.

Calcular:

Media Aritmética	" \bar{y} "
Desviación Estándar	"S"
Coficiente de Variación	"CV"

Criterio:

$$\text{El CV} \leq 2 \%$$

ESPECIFICIDAD PARA MÉTODOS DE CONTROL DE CALIDAD⁸

Con el método propuesto:

1. Analizar placebos del producto.
2. Identificar la(s) respuesta(s) del (los) activo(s), y si procede, de los excipientes y/o de otras sustancias presentes.

Criterio: Confirmar que el método desarrollado es capaz de cuantificar la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes.

ESPECIFICIDAD PARA MÉTODOS INDICADORES DE ESTABILIDAD⁸

En caso de contar con los posibles productos de degradación preparar muestras con placebo "añadido" de éstos y de la sustancia de interés y analizar con el método propuesto. Si no se cuenta con los productos de degradación es necesario degradar la muestra bajo diferentes condiciones.

La degradación debe ser tal que la concentración de la sustancia en estudio esté disminuida por lo menos en un 25% con respecto a la original.

Se sugieren los siguientes métodos para degradar la sustancia; la persona que realice el estudio deberá escoger aquel que, de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas del compuesto, sea el más adecuado:

1. Colocar la sustancia de interés, el placebo y muestras del lote del producto en un horno a 70 °C – 120 °C ó a 20 °C por debajo del punto de fusión de la sustancia de interés durante un tiempo apropiado.
2. Exponer la sustancia de interés, el placebo y muestras del lote del producto a la luz U.V. o a la luz fluorescente y / o humedad.
3. Si es necesario hacer disoluciones de la sustancia de interés ajustando el pH a 1-2 y / ó 10-12 y colocarlas entre 60 °C y 80 °C durante 2 a 4 semanas.
4. Si se trata de formas farmacéuticas líquidas o semisólidas pueden degradarse por oxidación (con peróxido de hidrógeno) y permanecer 2 a 4 semanas a temperatura ambiente y/o por hidrólisis (pH 1-2 y 10-12), colocando las muestras a 60-80 °C durante 2-4 semanas.

Criterio:

Verificar que los productos de degradación y / o sustancias relacionadas no interfieran con la cuantificación de la sustancia de interés utilizando el método desarrollado.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA⁸

Se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de tres muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones.

Almacenar las muestras analizadas bajo distintas condiciones (por ejemplo: Temperatura ambiente; refrigeración, protegidas de la luz, etc.) durante un tiempo preestablecido para degradar al analito a niveles de un 15 a 30 % dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia. Reanalizarlas bajo las mismas condiciones de operación, utilizando una disolución de referencia recientemente preparada, para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido en el método analítico. La determinación debe ser efectuada por un mismo analista.

Criterio:

La respuesta del método únicamente debe ser debida al analito.

3.2 PARÁMETROS BÁSICOS DE LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS⁷

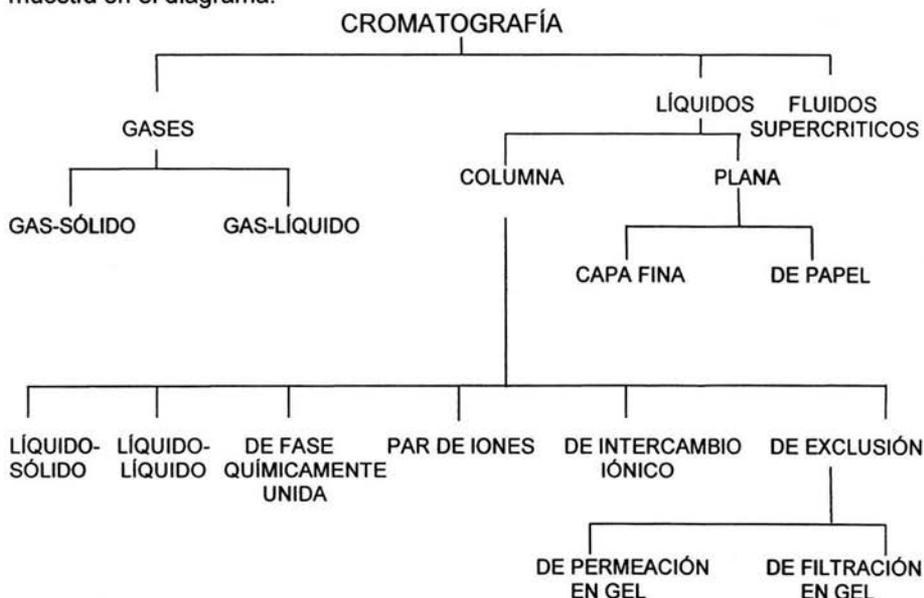
TERMINOLOGÍA

Cromatografía es una técnica general aplicada a una amplia gama de técnicas de separación que esencialmente se basan en la distribución de los componentes a separar entre dos fases; una de ellas es una fase móvil, la cual puede ser un gas o un líquido, y la otra es una fase estacionaria, la cual a su vez puede ser un líquido o un sólido.

El proceso cromatográfico tiene lugar como resultado de repetidos equilibrios de adsorción o reparto durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo de la fase estacionaria, alcanzándose la separación gracias a las diferencias en los coeficientes de distribución de los distintos componentes de la muestra.

CLASIFICACIÓN

Basándose en la naturaleza de la fase móvil, la cromatografía se divide en cromatografía de gases y cromatografía de líquidos, los cuales a su vez se subdividen al tomar en cuenta la naturaleza de la fase estacionaria, tal y como se muestra en el diagrama:



3.2.1 LA RETENCIÓN EN LA TÉCNICA CROMATOGÁFICA ⁷

En la cromatografía de líquidos, como en las otras técnicas cromatográficas, las separaciones están basadas en la diferencia de distribución de las especies entre dos fases no miscibles, una estacionaria (sólido o líquido impregnado sobre un soporte) y una móvil (disolvente o mezcla de disolventes). La fase estacionaria se encuentra en una columna a través de la cual se hace fluir, en forma continua, la fase móvil.

La distribución de cada soluto en un sistema cromatográfico dado está representada por un equilibrio al cual se asocia una constante característica denominada Coeficiente de Distribución:



Donde los subíndices "est" y "m" representan la fase estacionaria y la fase móvil respectivamente.

Si los componentes de una mezcla poseen coeficientes de distribución diferentes, su velocidad de migración a lo largo del sistema será diferente y podrán separarse. Debido a que los solutos sólo migran cuando se encuentran en la fase móvil, aquellos que tengan mayor afinidad por la fase estacionaria, interaccionarán más fuertemente con ella, tendrán un coeficiente de distribución mayor y viajarán más lentamente. Por el contrario, los solutos que se distribuyen principalmente en la fase móvil aparecerán en el efluente de la columna rápidamente.

El valor del coeficiente de distribución puede depender de la concentración inicial del compuesto. Este efecto es debido a la diferencia en el tipo de interacciones que presentan las moléculas del soluto consigo mismas y con el medio que las rodea. Se ha demostrado que en disoluciones muy diluidas este coeficiente tiene un valor fijo y, bajo esas condiciones recibe el nombre de Constante de Distribución.

En la cromatografía con fines analíticos las separaciones se realizan en general bajo condiciones en las cuales los coeficientes de distribución de los diversos componentes de la muestra son constantes. En estas condiciones, los solutos migran a lo largo de la columna en forma de bandas simétricas, con una distribución normal de concentraciones, que al salir de la columna son detectadas y representadas gráficamente por picos gaussianos. Esta representación gráfica de los compuestos eluidos de la columna recibe el nombre de cromatograma.

3.2.2 PRINCIPALES PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS.

El lenguaje común empleado en cromatografía utiliza algunos términos y símbolos característicos de esta técnica instrumental, a continuación se dan los más utilizados, indicando en los casos pertinentes su importancia operacional y la forma en que son evaluados.¹⁷

PARÁMETROS DE RETENCIÓN^{6, 7, 17}

3.2.2.1 Tiempo de retención, (t_r). Es el tiempo que la muestra permanece dentro de la columna y se mide desde el momento en que la muestra se introduce en el sistema hasta el momento en que se obtiene en punto máximo de la señal o pico (Figura 1).

El tiempo de retención es característico de la columna, la fase móvil y la temperatura. Por lo general se emplea como medida de tipo cualitativo y se expresa en segundos.

3.2.2.2 Tiempo muerto, (t_0 o t_m). Es el tiempo requerido para eluir una muestra no retenida en la columna y se determina midiendo el tiempo de retención de la fase móvil misma, o bien de una muestra similar.

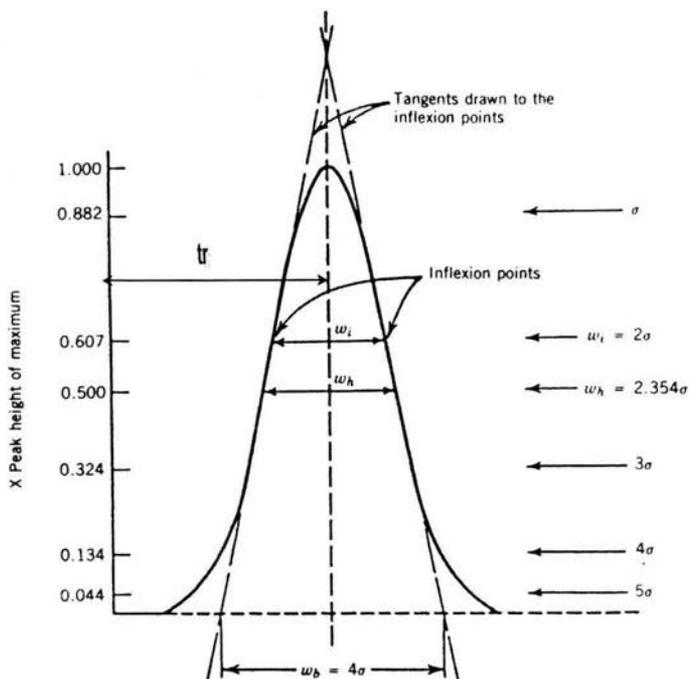
3.2.2.3 Tiempo de retención ajustado (t'_r). Es la diferencia entre t_r y t_0 , es decir la medida del tiempo que la muestra permanece retenida en el material de relleno de la columna.

Dicho de otra manera, t_r es el tiempo total de permanencia en la columna, t_0 es el tiempo que la muestra permanece en la fase móvil y, por lo tanto, t_r es el tiempo que la muestra permanece retenida en la fase estacionaria.

$$t'_r = t_r - t_0 \quad (2)$$

3.2.2.4 Anchura de la base de las señales (W_b). Es la porción de línea base interceptada por tangentes trazadas a ambos lados de una señal cromatográfica; Asumiendo que la forma de la señal es gausiana, esta anchura es aproximadamente igual o cuatro veces el valor de σ , o sea la dispersión de una distribución gausiana de valores.

Este valor de anchura se emplea en el cálculo de resolución y eficiencia de los sistemas cromatográficos.



La curva Gaussiana y su interrelación con las diferentes medidas (figura 1) ¹⁸

3.2.2.5 Número de platos teóricos (N). Un plato teórico es el equilibrio de distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria.

N se mide de acuerdo con la fórmula:

$$N = 16 (t_r / W_b)^2 \quad (3)$$

Donde t_r y W_b se expresan con las mismas unidades (tiempo, volumen, distancia, etc.)

El número de platos es una medida de la eficiencia de la columna y sistemas asociados, y es así que cuanto mayor sea N , más eficiente será la columna.

Cuando una muestra se inyecta en la fase estacionaria, los solutos que la constituyen se encuentran completamente mezclados, formando en conjunto una

banda estrecha. A medida que la fase móvil fluye, y los compuestos de la mezcla viajan a lo largo del sistema, se van alejando gradualmente uno de otro y eventualmente se separan constituyendo cada uno una banda distinta, es lo ideal. Sin embargo, durante la migración, las bandas se dispersan o ensanchan debido a varios procesos físicos y este ensanchamiento tiene efectos negativos sobre la separación. De hecho, si las bandas no se ensancharan, la separación se realizaría muy rápidamente.

El fenómeno de ensanchamiento de las bandas es muy importante ya que determina en gran parte la posibilidad de lograr una buena separación entre los compuestos. Por ello, la calidad de una columna se juzga según el grado de ensanchamiento que produce en las bandas de los solutos. Entre más pequeño sea ese ensanchamiento se dice que la columna es más eficiente.

La eficiencia de una columna se mide por el número de Platos Teóricos, N , que contiene. Es decir, el proceso cromatográfico se asemeja a un proceso de destilación fraccionada o de extracción líquido-líquido dividiendo imaginariamente la columna en una serie de platos en cada uno de los cuales la fase móvil y los solutos que ella contiene se ponen en equilibrio con la fase estacionaria contenida en el plato.

De esta manera, en vez de considerar el desplazamiento continuo de la fase móvil, se acepta que ésta avanza por pasos sucesivos, lo que permite calcular el perfil de distribución de las especies en cada paso y en cada plato. La teoría de los platos enseña que, después de un cierto recorrido por la columna, el perfil de concentraciones se puede parecer a una curva de Gauss, lo que, en primera aproximación, corresponde de manera adecuada a la forma de los picos cromatográficos observados experimentalmente⁷.

La anchura del pico gaussiano a la salida de la columna está representada por su desviación estándar σ , definida por:

$$\sigma = [t_r / \sqrt{N}] \quad (4)$$

por tanto

$$N = [t_r / \sigma]^2 \quad (5)$$

Como se puede ver en la figura 1, el valor de σ se obtiene a partir de las características geométricas del pico de Gauss:

- ❖ anchura a la base del pico (W_b), determinada por las tangentes al punto de inflexión $W_b = 4 \sigma$
- ❖ anchura del pico en el punto de inflexión $a_1 = 2 \sigma$
- ❖ anchura del pico a la mitad de su altura $W_{1/2}$ o $W_h = 2.354 \sigma$

Relacionando estos valores con la ecuación (5) se obtiene.

$$N = 16 [t_r / W_b]^2 = 5.54 [t_r / W_{1/2}]^2 \quad (6)$$

La ecuación (10) muestra claramente que a medida que el número de platos teóricos de la columna aumenta, los picos son más estrechos. Por lo tanto, una columna será más eficiente cuanto mayor sea el número de platos teóricos que contiene.

Debido a que N depende no solo de la calidad de la columna, sino también de su longitud (ya que t_r depende de la longitud de la columna), para poder comparar entre sí la eficiencia de columnas de diferente longitud se utiliza otro parámetro denominado Altura Equivalente a un Plato Teórico (HETP por sus siglas en inglés "Height Equivalent to Theoretical" o AEPT por sus siglas en español).

3.2.2.6 Altura equivalente a un plato teórico. Se representa por:

$$AEPT = L / N \quad (7)$$

Donde L es la longitud de la columna, expresada habitualmente en milímetros. Recordando la definición de plato teórico, se deduce que AEPT es la longitud de la columna requerida para obtener un equilibrio de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. Si el valor de AEPT es pequeño, esto se traduce en un mayor número de platos por unidad de longitud y, por tanto, la columna será más eficiente.

3.2.2.7 Coefficiente de distribución o de reparto (K). Se representa por:

$$K = \frac{\text{Concentración del analito en la fase estacionaria}}{\text{Concentración del analito en la fase móvil}} \quad (8)$$

El coeficiente de distribución es una propiedad física fundamental de cada sustancia. Es característico de cada muestra y del sistema de fase móvil y de fase estacionaria en consideración, y también es función de la temperatura.

3.2.2.8 Relación de capacidad (k').

$$k' = \frac{\text{Conc. del analito en fase estacionaria}}{\text{Conc. Del analito en fase móvil}} = \frac{t'_r}{t_0} = \frac{\text{tiempo en la fase estacionaria}}{\text{tiempo en la fase móvil}} \quad (9)$$

Si se combinan las definiciones anteriores también se puede expresar por:

$$K = k' * \beta \quad (10)$$

$$\text{Donde } \beta = \frac{\text{Volumen de la fase móvil}}{\text{Volumen de la fase estacionaria}}$$

3.2.2.9 Resolución (R). Es una medida cuantitativa del grado de separación obtenido entre dos compuestos :

$$R = \frac{\Delta t}{\frac{1}{2} (W_a + W_b)} = \frac{2(t_r^2 - t_r^1)}{W_a + W_b} \quad (11)$$

Δt , W_a y W_b deben ser expresados en las mismas unidades. Un valor de R igual a 1.5 significa separación completa (99.7 %).

3.2.2.10 Selectividad (α). Valores elevados de α significan mejores separaciones.

$$\alpha = \frac{t_r^2}{t_r^1} \quad (12)$$

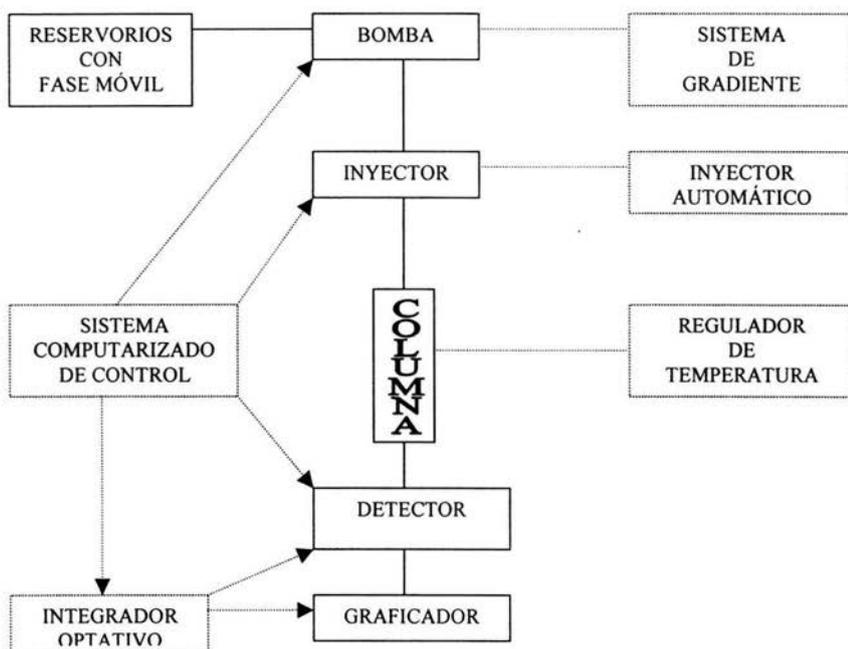
En forma práctica se puede decir que α es una medida de la solubilidad diferencial de dos compuestos en la fase estacionaria.

Donde.

t_r^2 = Es el pico que tarda más en eluir respecto a t_r^1

t_r^1 = Es el pico previo a t_r^2

DIAGRAMA DE UN SISTEMA INSTRUMENTAL DE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFECIENCIA (figura 2)



----:optativo
_:No optativo

3.3 INSTRUMENTACIÓN EN CLAR

CONSECUENCIAS TECNOLÓGICAS DE LA CLAR ⁷

El uso de fases estacionarias de granulometría fina permite lograr un gran número de platos teóricos en columnas muy cortas, lo que implica un tiempo de análisis muy reducido. Sin embargo, este importante progreso de la eficiencia en esta técnica, tiene un "costo tecnológico":

- ❖ Trabajo a alta presión.
- ❖ Manejo de volúmenes muy pequeños.

Esas dos consecuencias obligaron al desarrollo de una tecnología particular específica de la CLAE.

EL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

El sistema instrumental cromatográfico está constituido por los elementos indicados en la figura 2.

Algunos elementos son indispensables para la aplicación de la técnica:

- ❖ bomba
- ❖ contenedor de fase móvil
- ❖ inyector
- ❖ detector
- ❖ columna
- ❖ graficador y/o integrador (optativo)

Otros son opcionales:

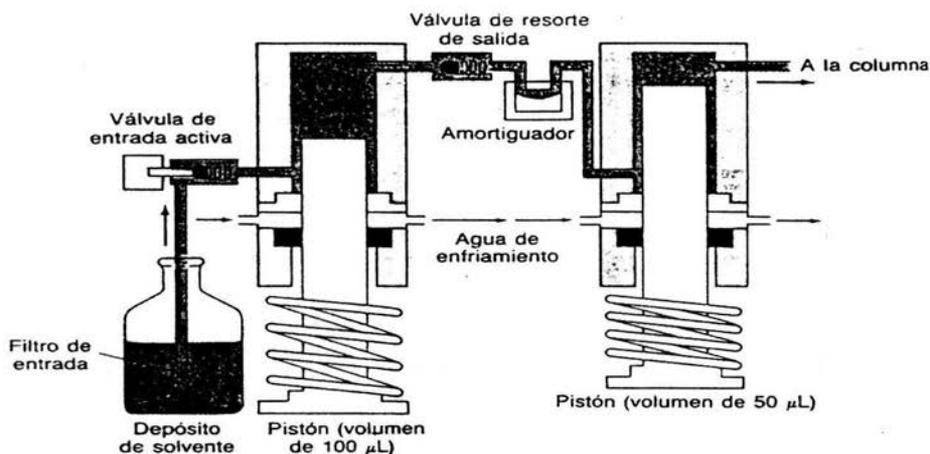
- ❖ sistema de gradiente,
- ❖ muestreador automático,
- ❖ regulación de la temperatura de la columna,
- ❖ sistema computarizado de operación del conjunto.

3.3.1 BOMBA CROMATOGRÁFICA ⁷

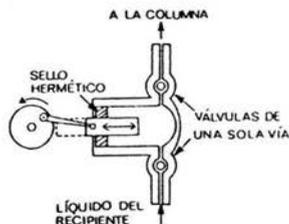
Se entiende por bomba cromatográfica al dispositivo o sistema conjunto capaz de proporcionar a la fase móvil la presión necesaria, para que operando al flujo o la velocidad precisa, atravesase la columna cromatográfica.

Eluente cromatográfico

- ❖ El depósito del eluente aspirado por la bomba cromatográfica no necesita tener características especiales, sin embargo, es recomendable tomar las siguientes precauciones:
- ❖ utilizar un filtro de aspiración del eluente para evitar la introducción de partículas sólidas en suspensión que pueden dañar empaques y válvulas de las bombas y tapar la cabeza de la columna por acumulación. Este filtro está constituido por un cilindro de acero inoxidable fritado de granulometría variable (0.5 a 10 μm).
- ❖ desgasificar el eluente antes de utilizarlo, mediante aspiración con vacío y sonicando al mismo tiempo por 30 segundos. En efecto, el oxígeno y nitrógeno disueltos en el eluente puede provocar generación de burbujas indeseables durante la aspiración de la bomba.
- ❖ mantener tapada o cubierta la reserva de disolvente para evitar la entrada de polvo y la evaporación de los solventes volátiles que puede provocar daños a la salud y cambiar la composición de la fase móvil, y cambiar la pureza de éste ya que puede contaminarse con partículas del ambiente, etc.



Bomba de pistón de alta presión para CLAR (figura 3a)⁶



Bomba recíproca (figura 3b)¹⁷

La totalidad de las bombas actuales son recíprocas de diafragma o de pistón. Como se puede ver en la figura (3a y 3b), el elemento unitario está constituido por:

- ❖ una cámara de bombeo de alta presión y bajo volumen,
- ❖ un elemento móvil alternativo que provoca el movimiento del líquido (diafragma o pistón),
- ❖ dos válvulas para asegurar el flujo.

PRINCIPALES TIPOS DE BOMBAS ⁷

Bomba de diafragma es muy confiable pero necesita un sistema de regulación más sofisticado para asegurar un flujo constante debido a la deformación elástica del acero de la membrana en función de la presión.

La bomba de pistón permite una excelente regulación del flujo pero necesita un empaque especial para el pistón. Es mucho más utilizada.

En efecto, el movimiento recíproco del pistón para cargar y descargar la cámara provoca pulsaciones de flujo que afectan el buen funcionamiento de los otros elementos (columna y detector).

Bombas de una sola cabeza

La supresión de las pulsaciones se realiza por retroacción a nivel de la velocidad del pistón:

- ❖ regreso acelerado para llenar la cámara.
- ❖ compensación de compresibilidad.

Este sistema requiere además un amortiguador de pulsaciones eficiente.

Estas bombas son sencillas, confiables y de bajo costo.

Bombas de dos cabezas

Los pistones tienen un movimiento alternado y las cabezas pueden colocarse en serie o en paralelo.

Permite lograr un mejor amortiguado de las pulsaciones.

Bombas de tres cabezas

Los pistones tienen un desfase de 120 grados:

- ❖ excelente amortiguado de pulsaciones.
- ❖ costo elevado.

3.3.2 SISTEMAS DE GRADIENTES

La fase móvil puede ser alterada para manipular las interacciones de los componentes de la muestra con la fase estacionaria esto da como resultado, diferentes tipos de mezclado de la fase móvil:

- ❖ Eluyente isocrático
- ❖ Elución con gradiente

Elución isocrática: los componentes son eluidos usando una composición constante de la fase móvil.

Elución con gradiente: los diferentes componentes son eluidos incrementando la concentración de alguno de los solventes orgánicos, durante el tiempo de análisis que se haya establecido.

3.3.3 GENERACIÓN DEL GRADIENTE DE ELUCIÓN ⁷

Para realizar mezcla continua y programable de 2 o más eluentes se utilizan dos técnicas:

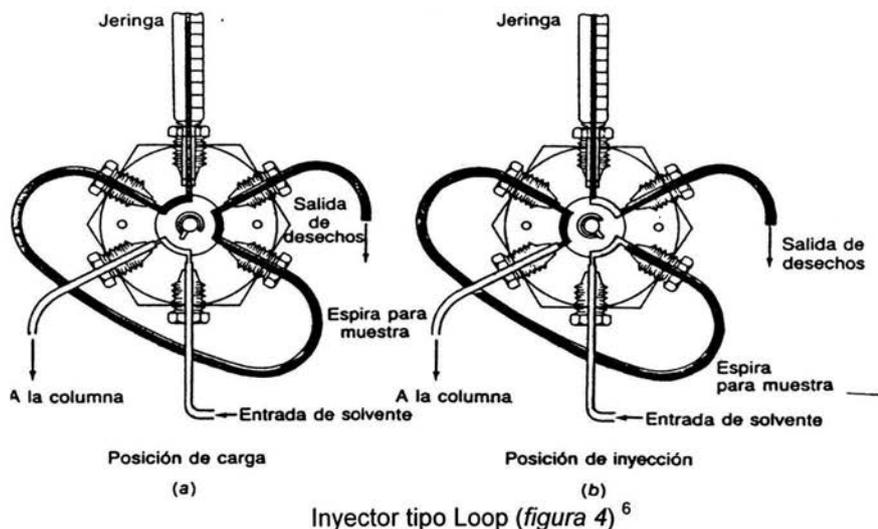
- ❖ mezcla a baja presión, antes de la bomba, con válvulas proporcionales,
- ❖ mezcla de alta presión después de la bomba, lo que requiere una bomba por eluyente a mezclar.

En general, los sistemas con una sola cabeza utilizan la primera técnica mezcla a baja presión porque el regreso rápido del pistón facilita el uso de válvulas proporcionales, mientras que los sistemas a 2 o más cabezas usan en general la mezcla a alta presión.

3.3.4 INYECTOR

Se usan válvulas de inyección tipo "loop" (tubería de muestra). Como se puede ver en la figura 4, este inyector es una válvula de alta presión con 4 (ó 6) puertas y 2 posiciones. Una de las posiciones comunica directamente el paso de la fase móvil de la bomba a la columna mientras que se puede introducir la muestra en el "loop"

a baja presión. El "loop" es en general un tubo capilar externo de s.s. con un volumen conocido o, para volúmenes muy pequeños.



3.3.5 COLUMNA CROMATOGRÁFICA ⁷

La columna cromatográfica esta constituida por un tubo de acero inoxidable que contiene la fase estacionaria. El tubo tiene una superficie interior con excelente nivel de pulido, diámetros interiores (D. I.) más comunes: 4.6, 2.3, 6.7 mm. Diámetros exteriores (D. E.): 1/4", 3/8", 1/2". Longitud: de 3 a 30 cm.

Las dos extremidades tienen conexiones de reducción para recibir capilares y contienen una pastilla de acero inoxidable fritado poroso que permite mantener la fase estacionaria en la columna. Esas conexiones deben ser cuidadosamente diseñadas para:

- ❖ tener un volumen muerto mínimo.
- ❖ lograr una repartición regular de la fase móvil en la columna.

Según los casos, será útil usar pre-columna o micro filtro para proteger la columna de partículas y/o de impurezas irreversiblemente adsorbidas. Aquí también, es preciso verificar los volúmenes muertos.

3.3.6 FASE ESTACIONARIA

Se deduce una primera exigencia para la fase estacionaria empleada: debe ser estable y resistente a las altas presiones, cualquier diferencia de presión no debe ocasionar variación en la permeabilidad del relleno respecto a los solutos.

La columna cromatográfica es el elemento central del sistema y hay que tener algunas precauciones para obtener un tiempo de vida correcto y una buena reproducibilidad de las características cromatográficas.

- ❖ evitar las partículas en suspensión en los eluentes porque se acumulan en el fritado de entrada de la columna, lo que va a tapar progresivamente la columna.
- ❖ evitar muestras con impurezas que se adsorben irreversiblemente, en la columna y modifican sus características.
- ❖ evitar eluentes con un pH superior a 8 cuando la fase estacionaria tiene una matriz de sílice.

3.3.7 DETECTOR ⁷

La detección del soluto fue durante mucho tiempo una de las principales dificultades de la CLAR. La fase móvil está constituida por uno o varios disolventes, lo que dificulta la posibilidad de utilizar detectores universales sensibles como lo son los detectores utilizados en cromatografía de gases.

Hay dos tipos de detectores:

- ❖ el detector universal que detecta también el eluyente y funciona por diferencia entre la respuesta del soluto y la del solvente. Este tipo de detector tiene forzosamente una sensibilidad limitada.
- ❖ el detector selectivo que tiene una respuesta variable según el tipo de molécula detectada. Se busca entonces detectores que tengan una respuesta mínima con respecto al eluyente y máxima con respecto al soluto.

Principales características del detector ideal

- ❖ Universal o selectivo.
- ❖ Tener una alta sensibilidad y una respuesta estable en el tiempo.
- ❖ Tener una celda y conexiones de bajo volumen.
- ❖ Tener un amplio intervalo de linealidad de respuesta.

Principales especificaciones de los detectores

- ❖ Límite de sensibilidad. Está definida por una señal igual a dos veces el ruido. Se expresa en la unidad del fenómeno físico observado por el detector.

- ❖ Límite de detección. Esta definida por la cantidad mínima detectable para un soluto dado. En general, el límite de detección es diferente para cada producto mientras que el límite de sensibilidad es único por ser un valor de señal.
- ❖ Intervalo de linealidad. Es el intervalo de concentración en el cuál la respuesta es proporcional a la cantidad inyectada. Depende del fenómeno físico observado y en general del soluto pero también del sistema electrónico de amplificación de la señal que tiene su propia linealidad.
- ❖ Deriva. Es la variación continua de una señal constante a largo plazo.
- ❖ Tiempo de respuesta del detector. En general los fenómenos físicos observados tienen tiempos de respuesta despreciables. Sin embargo, para suprimir el ruido de alta frecuencia de la señal se agregan filtros electrónicos que introducen una constante de tiempo adicional al sistema. Si esta constante de tiempo es grande, se observará un pico cromatográfico mas bajo que su altura real, lo que se traduce por una pérdida de sensibilidad y de eficiencia. Es necesario mantener la constante de tiempo de este filtro inferior a aproximadamente 10 % del tiempo de salida del pico cromatográfico.
- ❖ Volumen de la celda y de las conexiones. Este parámetro tiene importancia en CLAR porque un volumen de celda demasiado grande con respecto al volumen del pico cromatográfico provoca una disminución de la respuesta y un ensanchamiento de banda adicional. Para no afectar la eficiencia, el volumen de la celda no debería ser superior a 10 % del volumen del pico cromatográfico. Actualmente, muchos detectores tienen un volumen de celda de aproximadamente 10 μl . Para microcromatografía (columnas de D. I. de 2 mm o menos) se recomiendan volúmenes menores (1 μl en general).
- ❖ Ciertos detectores tienen capilares largos antes de la celda para poder lograr una mejor regulación de temperatura del efluente (refractómetros, conductímetros, etc.). El volumen correspondiente y sobre todo el diámetro del capilar tienen importancia.

DETECTORES ⁷

Refractómetro

Es un detector universal. La señal es la diferencia entre el índice de refracción de la celda de medida que recibe el efluente de la columna y la celda de referencia

que contiene el eluyente empleado. El soluto provoca una variación proporcional a la concentración del índice de refracción en la celda de medida. El detector refractométrico no es muy sensible y sus límites de detección son en general del orden de 0.1 a 1 µg inyectados (10 ppm). Además es sensible a la temperatura y a las variaciones de flujo y no puede utilizarse para gradiente de elución.

DETECTOR DE LUZ ULTRAVIOLETA^{6,7}

Son los detectores más utilizados y representan aproximadamente el 80 % de los detectores vendidos de CLAR.

El principio de la detección está basado en la absorción de luz provocada por el soluto. La concentración del soluto en la celda está relacionada a la fracción de luz transmitida por la ley de Lambert-Beer:

$$A = \log I_0/I = \epsilon l c \quad (14)$$

Donde

A = absorbancia

I_0 = intensidad de la luz incidente

I = intensidad de la luz transmitida

ϵ = coeficiente de extinción molecular del soluto a la longitud de onda de trabajo

l = longitud del camino óptico en la celda

c = concentración del soluto

ϵ ; varia con respecto a la longitud de onda y la naturaleza del compuesto (es posible encontrar valores de entre 0.1 y 10^6). Si se escoge un eluyente constituido por solventes de bajo ϵ , es posible obtener sensibilidades altas y, en casos favorables, límites de detección muy bajos (hasta menos de 0.1 ng inyectados).

Algunas moléculas tienen absorbancia en la zona UV y la gran mayoría en UV de baja longitud de onda es decir que, según la longitud de onda, el detector UV es selectivo. Sin embargo, a baja longitud de onda, existen pocos disolventes de baja absorbancia (agua, acetonitrilo, hidrocarburos saturados).

Los detectores UV no necesitan en la actualidad celda de referencia y la eventual absorbancia del eluyente está compensada electrónicamente. Son poco sensibles a la temperatura y a las variaciones de flujo. Tiene varias gamas de sensibilidad expresadas en fracciones de unidad de absorbancia ("Absorbance Units Full Scale"=AUFS), por su nombre y siglas en inglés.

Se pueden tener los siguientes tipos de detectores UV

- Detector de longitud de onda fija

Es el detector más sencillo y menos caro. La fuente UV es una lámpara de vapor de mercurio que proporciona una longitud de onda de 254 nm.

- Detector de longitud de onda variable

Es el detector más utilizado, permite trabajar en general de 190 a 600 nm con selección continua manual de la longitud de onda. Los instrumentos integrados y computarizados permiten el cambio de longitud de onda programable a tiempos preestablecidos.

- Espectrofotómetros

Algunos detectores de longitud de onda variable son también espectrofotómetros y permiten trazar el espectro del soluto deteniendo la bomba cromatográfica cuando el soluto se encuentra en la celda.

- Detectores de arreglo de diodos

Este detector no posee monocromador para elegir la longitud de onda. Un haz de luz policromática atraviesa la celda y es dispersada. Un conjunto de diodos electroluminiscentes recibe el haz fraccionado, lo que permite determinar a varias longitudes de onda en forma simultánea.

DETECTOR DE FLUORESCENCIA

Utiliza las propiedades de fluorescencia de ciertas moléculas. En casos favorables, es un detector muy sensible que permite detectar hasta picogramos de soluto (10^{-12} g). Es un detector altamente específico que puede utilizarse con gradiente de elución. Es poco sensible a las variaciones de flujo o de temperatura. Pocas moléculas, presentan fluorescencia natural, lo que limita el uso de este detector. Sin embargo, la aparición de reactivos de derivatización eficientes ha permitido un desarrollo importante, sobre todo en el análisis de productos biológicos.

OTROS DETECTORES

- ❖ Detector electroquímico: en general amperométrico. Detector de alta sensibilidad pero de uso más limitado que el detector de fluorescencia. Su desventaja es la eventual contaminación de los electrodos que lo constituyen.
- ❖ Detector conductimétrico: detector en principio universal pero de hecho utilizado únicamente para análisis de aniones y cationes en sistemas acuosos.
- ❖ Espectrómetro de masas: la presencia del eluyente dificulta mucho el acoplamiento con respecto a la cromatografía de gases. Un cierto número de

técnicas son disponibles. Sin embargo, la técnica todavía es delicada a operar y existen limitaciones en las moléculas de alto peso molecular.

- ❖ Detector de radioactividad: equipo muy específico pero de uso relativamente importante en estudios biológicos y en farmacocinética.

3.3.8 INTEGRADORES ⁷

En la actualidad, la totalidad de los integradores son electrónicos. El principio básico de la integración consiste en fraccionar la señal del detector en elementos unitarios de superficie muy pequeños. Estos elementos se agrupan después por múltiplos del elemento unitario según la sensibilidad escogida. La comparación entre la superficie de un conjunto y del siguiente permite detectar el inicio y el fin de un pico en función de las pendientes escogidas.

Existen aparatos dedicados a la integración o software de integración que se adaptan a microcomputadoras.

3.4 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS DE INTERACCIÓN

INTERACCIÓN Y POLARIDAD ⁷

La molécula de soluto en la fase móvil está rodeada por las moléculas del eluente y las diferentes atracciones y repulsiones que va a ejercer sobre sus vecinos inmediatos se llaman interacciones. Se conocen diferentes tipos de interacciones:

- ❖ interacciones de dispersión: corresponden a la atracción eléctrica producida por las fluctuaciones instantáneas de las nubes electrónicas de los átomos.
- ❖ interacción dipolo-dipolo: atracción electrostática entre los dipolos formados por funciones químicas con átomos de electronegatividades diferentes (átomos donador y aceptor de electrones por ejemplo $>C=O$, $-C=NH_2$, $C-Cl$, etc.). Dentro de esta interacción, se pueden desglosar las interacciones de orientación y de inducción, interacción por formación de puente de H: caso particular de interacción entre un donador y un aceptor de protones.

La polaridad de una molécula traduce su capacidad de generar interacciones fuertes con las moléculas vecinas. La energía de los diferentes tipos de interacciones es muy diferente:

puente H > dipolo-dipolo» dispersión

Es decir que las moléculas con grupos funcionales que pueden formar puentes H tendrán una polaridad fuerte (grupos $-OH$, $=NH$, $-COOH$ por ejemplo) mientras que las moléculas que pueden generar únicamente interacciones de dispersión serán las menos polares (hidrocarburos alifáticos).

3.5 ANÁLISIS CUANTITATIVO EN CLAR ⁷

POSIBILIDADES DE ANÁLISIS CUANTITATIVO POR CLAR

Un aspecto muy importante de la cromatografía de líquidos moderna es su fácil adaptación para el análisis cuantitativo.

Actualmente por CLAR se obtienen resultados cuantitativos de calidad comparable a los obtenidos por cromatografía de gases.

Con los detectores diferenciales utilizados comúnmente en cromatografía de líquidos (fotómetros, espectrofotómetros, refractómetros, etc.) se obtienen picos cuya área o altura son proporcionales a la cantidad de soluto que pasa por la celda del detector.

3.5.1 MEDIDA DEL ÁREA Y DE LA ALTURA DE LOS PICOS ^{6,7}

La medida del área del pico se puede efectuar manualmente sobre el cromatograma registrado (triangulación, planimetría, corte y peso del papel, etc.) o electrónicamente mediante un integrador que toma la señal directamente del detector y la digitaliza.

Bajo condiciones experimentales constantes, es posible reemplazar la medida del área de los picos por la de su altura ^{7,16}.

El método de medida de alturas es más empleado porque es muy simple de realizar, aunque es mucho más sensible a variaciones en las condiciones cromatográficas de operación y no debe emplearse cuando los picos están muy distorsionados o son fuertemente asimétricos. Por el contrario, la precisión de este método está poco influenciada por los picos vecinos no bien resueltos o por cambios ligeros en la velocidad de flujo.

La precisión del método de medida de áreas esta muy influenciada por los picos vecinos que no estén completamente resueltos pero, por el contrario, esta poco influenciada por cambios ligeros en la forma de los picos o en algunos parámetros instrumentales o cromatográficos (p. ej. cambios en la composición del eluente, en la actividad del adsorbente, en las características de la columna, etc... que influyen sobre k' y N , o cambios en la temperatura). La precisión media que se puede obtener de los diferentes métodos de medida de áreas es:⁷

Método	Precisión Promedio.
planimetría	3%
triangulación	3%
corte y peso del papel	2%
altura x anchura a la mitad de la altura	2%
integrador electrónico digital	0.5%
integrador computarizado	0.25%

3.6 FACTORES QUE AFECTAN LA PRECISIÓN ⁷

Las condiciones operatorias son de gran importancia para lograr una buena precisión y en particular ésta se requiere en cada una de las etapas desde, la preparación de la muestra hasta la obtención y tratamiento de los resultados. En el análisis cromatográfico, propiamente dicho, se tienen las siguientes etapas críticas:

❖ La bomba cromatográfica.

La estabilidad y la reproducibilidad del flujo son elementos importantes para una buena precisión de la medida del área o de la altura del pico.

❖ La inyección.

Debido a la dificultad para introducir con precisión pequeñas cantidades de muestra mediante una jeringa, en análisis cuantitativo se utilizan siempre los inyectoros de válvula, o bien, los inyectoros automáticos con que se cuenta en algunos equipos.

❖ Integrador.

Un integrador descompone el pico cromatográfico en pequeños elementos de superficie cuya suma corresponde a la superficie total.

Sin embargo, el instrumento necesita criterios numéricos para detectar el inicio y el fin del pico cromatográfico, generalmente con base en valores límites de la pendiente de la línea base y el ancho del pico.

Resulta de esos criterios que la precisión de la medida será mejor cuando:

- ❖ La eficiencia del pico es mayor, lo que corresponde a variaciones más rápidas de las pendientes de la línea de base al inicio y al final del pico, la resolución con los picos vecinos es mayor.

❖ La detección.

La precisión depende de la sensibilidad, linealidad y especificidad del detector, así como de su sensibilidad a las variaciones de temperatura y flujo.

Uno de los factores más importantes en la precisión de la medida es el cociente señal/ruido proporcionado por el detector. Es decir que la precisión será mejor cuando la superficie del pico es muy grande con respecto a la superficie producida por el ruido a corto plazo del detector. Obviamente, los análisis de trazas con detección cerca del límite de sensibilidad presentan precisiones bajas.

Una vez conocidos el área o la altura del pico cromatográfico, es necesario calcular la concentración del soluto en la muestra analizada.

3.7 ANÁLISIS CUANTITATIVO

3.7.1 ANÁLISIS CUANTITATIVO POR CALIBRACIÓN EXTERNA (ESTÁNDAR EXTERNO) ⁷

El cálculo de los coeficientes de respuesta se puede efectuar, inyectando cantidades variables, pero conocidas, del soluto y trazando una gráfica de área (o altura) vs concentración inyectada. En condiciones adecuadas de trabajo, la curva es lineal y de ordenada al origen igual a cero, entonces el coeficiente de respuesta (unidades de peso/unidades de área) es el inverso de la pendiente de esta recta. Alternativamente, se pueden inyectar volúmenes iguales de soluciones estándar de diferente concentración, conocida, del soluto y trazar una curva de calibración de área vs concentración posteriormente se inyecta el mismo volumen de la muestra problema y el área del pico de interés se relaciona con el gráfico de calibración, obteniéndose directamente la concentración del soluto en la muestra.

3.7.2 ANÁLISIS POR CALIBRACION INTERNA (ESTÁNDAR INTERNO) ^{6,7}

En este método, no se requiere inyectar volúmenes de muestra con mucha precisión, y se compensan en algunos casos, errores producidos durante la preparación de la muestra u otros errores debidos a variaciones instrumentales porque tanto el compuesto problema como el patrón o estándar interno se analizan en las mismas condiciones.

Para el cálculo de los coeficientes de respuesta se utiliza una mezcla, de composición conocida, que contenga al soluto y a un compuesto de referencia. El área (o altura) del pico del soluto se relaciona con la del compuesto de referencia, al cual se le asigna un coeficiente de respuesta, generalmente igual a la unidad, ya que se conoce exactamente su concentración. El método del estándar interno permite que los efectos de los errores, sobre los picos de los solutos se compensen con un efecto proporcional sobre el pico del estándar interno.

3.8 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA EN CLAR ⁷

Cuando se trata de analizar una muestra por CLAR, la parte cromatográfica del análisis no es en general el único paso y serán necesarias varias etapas previas para poder obtener una muestra compatible con la técnica cromatográfica y con las condiciones de separación que fueron desarrolladas con la mezcla de las moléculas de interés.

El procedimiento general es el siguiente:

- ❖ muestreo
 - colecta
 - almacenamiento
- ❖ preparación de la muestra
 - extracción
 - concentración
 - purificación
- ❖ análisis cromatográfico
 - separación
 - identificación
 - cuantificación

3.8.1 MUESTREO

La selección de la muestra es crítica para que un análisis sea válido, ya que tiene que ser representativa del lote, de que se tomó, y como se tomó la colecta.

3.8.2 ALMACENAMIENTO

Se deberá almacenar las muestras en un lugar apropiado, en condiciones ambientales con las que se pueda evitar al máximo la degradación de ésta, se deberán almacenar por un tiempo determinado, de acuerdo a bibliografía USP, FEUM, etc.

COMPATIBILIDAD DE LA MUESTRA CON EL SISTEMA CLAR ⁷

Para poder ser inyectada en un cromatógrafo de líquidos, la muestra debe ser una disolución homogénea. En particular, es indispensable que la muestra no contenga ni sólidos en suspensión ni coloides y que sea soluble en la fase móvil.

3.8.3 EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA ⁷

Si la muestra es un líquido heterogéneo o un sólido no soluble, es necesario darle un tratamiento fisicoquímico preliminar que permita extraer cuantitativamente los compuestos a analizar en un líquido homogéneo.

Según los tipos de muestras, se usa en general uno de los caminos indicados en la figura (5).

Es necesario verificar si la extracción es cuantitativa (lo que puede ser difícil en caso de muestras naturales, hierbas, etc.) y, muchas veces, varias extracciones son necesarias debido a la adsorción de los solutos sobre el sólido o su solubilidad en la otra fase líquida (en ciertos casos una extracción con Soxhlet es necesaria).

NOTA: muchas muestras pueden ser físicamente homogéneas y compatibles con la CLAR pero ser químicamente heterogéneas por contener:

- ❖ ultra micro emulsiones (leche, etc.)
- ❖ micelas (surfactantes)
- ❖ proteínas o polímeros orgánicos

Los solutos pueden entonces repartirse entre las pseudo-fases (solubilización en las emulsiones o las micelas, o adsorción en los sitios activos de proteínas y polímeros), lo que daría una concentración anormalmente baja por CLAR por el hecho de que el cromatograma sólo proporciona la concentración de soluto libre en la disolución. En ciertos casos este problema es muy difícil de resolver (estudio de fluidos biológicos, formulaciones, detergentes, pinturas)

3.8.4 CONCENTRACIÓN / PURIFICACIÓN ⁷

COMPATIBILIDAD DE LA MUESTRA CON LAS CONDICIONES CLAR

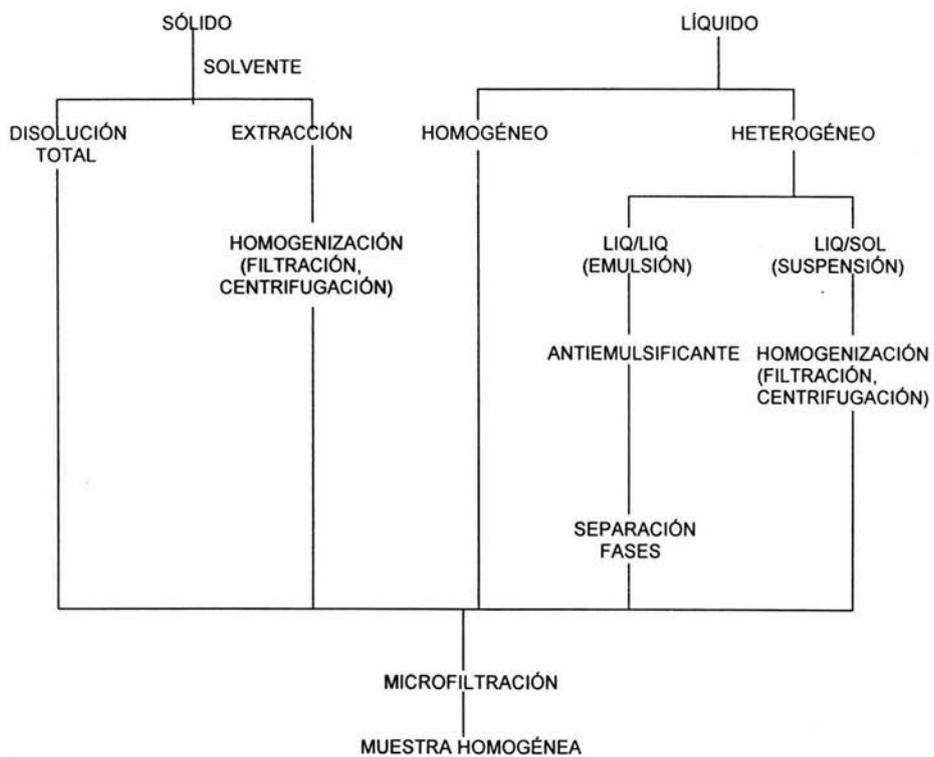
En muchos casos, por ejemplo:

El extracto homogéneo todavía no puede analizarse directamente porque la matriz va a interferir con el sistema cromatográfico e impedir un análisis correcto de los solutos de interés. Esta interferencia se puede traducir de diferentes maneras:

- ❖ matriz demasiado compleja: los solutos de interés no pueden cuantificarse debido a la presencia de interferencias.
- ❖ una purificación previa o una pre-separación será necesaria.
- ❖ una derivatización específica del soluto puede también resolver el problema.
- ❖ presencia de impurezas irreversiblemente adsorbidas en la columna: la acumulación progresiva va a dañar rápidamente la columna.
- ❖ purificación previa o uso de una pre-columna.
- ❖ presencia de impurezas eluidas con tiempo de retención muy grande: el tiempo de análisis es demasiado largo porque es necesario esperar la elución de las impurezas para poder realizar la siguiente inyección.
- ❖ purificación previa.
- ❖ uso de gradiente de elución para acelerar la elución de las impurezas.
- ❖ concentración de los solutos a analizar inferior al límite de detección.
- ❖ pre-concentración.
- ❖ derivatización para aumentar el coeficiente de respuesta del soluto con respecto al detector.
- ❖ solvente de la muestra incompatible con las condiciones cromatográficas.

Por todo esto se debe implementar un método de extracción para una muestra en particular, así como su método de análisis, tomando en cuenta lo anterior.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA CLAR ⁷
(figura 5)



3.8.2.1 TÉCNICAS DE CONCENTRACIÓN / PURIFICACIÓN

CONCENTRACIÓN ^{6,7}

Existen 3 tipos principales de técnicas:

- ❖ evaporadores rotativos,
- ❖ cromatografía en columna, se hace pasar por una columna corta cromatográfica de fase invertida desechable, grandes volúmenes de muestra a analizar.
- ❖ mini evaporadores de corriente de gas que permiten tratar varias muestras al mismo tiempo en condiciones suaves y con volúmenes reducidos de solvente.

3.8.2.2 PURIFICACIÓN: EXTRACCIÓN LÍQUIDO / LÍQUIDO ⁷

Se aprovecha la habilidad de las moléculas de repartirse entre dos fases líquidas no miscibles.

La constante de distribución es el cociente de concentración de un soluto al equilibrio entre las dos fases.

La selectividad de una extracción se evalúa comparando las constantes de distribución de los productos de interés con las de las impurezas a eliminar.

Las posibilidades de extracción con sistema binario de disolventes son limitadas por la necesidad de escoger dos disolventes de diferencia de polaridad muy grande para asegurar la no miscibilidad. Sin embargo, los sistemas ternarios con un tercer disolvente de polaridad intermedia permiten lograr una gama de selectividades muy amplia.

Ventajas de la extracción líquido-líquido:

- ❖ operación unitaria sencilla y rápida,
- ❖ baja inversión en equipos.

Desventajas:

- ❖ en general varias extracciones son necesarias: con el mismo sistema para lograr una extracción cuantitativa de los productos de interés, o con varios sistemas sucesivos para lograr una selectividad suficiente.

Esto implica:

- ❖ un consumo importante de disolvente de alta pureza.
- ❖ una dilución de la muestra.
- ❖ un tiempo total de preparación elevado.

3.8.2.3 PURIFICACIÓN – CROMATOGRAFÍA POR COLUMNA CLÁSICA ⁷

Se usan adsorbentes de granulometría mayor (40 - 100 μ metros) para poder separar la muestra en varias familias de diferentes polaridades.

Para esas separaciones es posible encontrar una gran variedad de adsorbentes (sílice normal o injertada, alúminas, florisil, celita, hidroxapatita, poliestireno normal o injertado, intercambiadores de iones, etc.) o fases estacionarias de permeación de gel (sephadex, styragel, agarosas, sílices, etc.)

Ventajas de la técnica:

- ❖ posibilidad de realizar la concentración al mismo tiempo, posibilidad de lograr excelentes selectividades gracias a la gama importante de adsorbentes disponibles,
- ❖ Inversión baja.

Desventajas:

- ❖ operaciones lentas.
- ❖ costo elevado de operación (disolvente + adsorbentes).

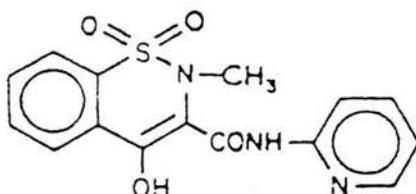
3.8.2.4 DERIVATIZACIÓN ⁷

El objetivo de la derivatización en CLAR es muy diferente al de la cromatografía de gases. En cromatografía de gases se trata de bloquear las funciones más polares para bajar el punto de ebullición y reducir las adsorciones residuales: para ampliar la gama de moléculas analizables.

En CLAR la derivatización corresponde a 2 necesidades principales:

- ❖ amplificación del coeficiente de respuesta de solutos poco favorables para la detección en UV,
- ❖ formación de derivados para detección selectiva (UV a alta longitud de onda o fluorescencia) de moléculas particulares en muestras complejas.

3.9 MONOGRAFÍA DEL PIROXICAM



FÓRMULA DESARROLLADA ³ :

NOMBRES QUÍMICOS ³ : 4-Hidroxi-2-metil-N-2-piridinil-2H-1,2-benzotiazina-3-carboxamida 1,1-dioxido; 3,4-dihidro-2-metil-4-oxo-N-2-piridinil-2H-1,2-benzotiazina-3-carboxamida 1,1-dióxido.

NOMBRES COMERCIALES ³ : Artroxicam, Baxo; Bruxicam; Caliment; Erazón; Feldene; Flogobene; Geldene; Impronta; Lorapam; Pirkam; Piroflex; Reudene; Riacen; Roxicam; Roxiden; Sasulen; Solocalm; Zunden.

FÓRMULA CONDENSADA ³ : C₁₅H₁₃N₃O₄S.

PESO MOLECULAR ³ : 331.35 g/mol.

COMPOSICIÓN ³ : C 54.37%, H 3.95%, N 12.68%, O 19.31%, S 9.68%.

USO TERAPÉUTICO ³ : Anti-inflamatorio no esteroideal de larga vida.

DESCRIPCIÓN ³ : Cristales blancos, funde alrededor de 200 °C.

SOLUBILIDAD ³ : Muy poco soluble en agua, en ácidos diluidos y en la mayoría de los disolventes orgánicos; poco soluble en alcohol y en soluciones acuosas alcalinas.

DL₅₀ oral en ratones 360 mg/Kg ³ .

USOS ⁴ : Es un derivado del oxicam no relacionado químicamente con otros antiinflamatorios no esteroideales. Su uso más frecuente es para el alivio agudo o a largo plazo de los signos y síntomas de *artrosis* y *artritis reumatoidea*. También se usa para el alivio sintomático del dolor asociado con procedimientos quirúrgicos.

ALMACENAMIENTO ³ : Preservar en contenedor bien cerrado, de color ámbar, protegido de la luz.

3.9.1 IDENTIFICACIÓN

A: Absorción infrarroja, no se necesita la muestra seca.

B: Absorción ultravioleta ¹

Una disolución de 10 µg/mL ó 0.001 % en disolución 0.01N de HCl presenta máximos a 242 y 332 nm y mínimos a 229 y 270 nm.

C: Preparar la disolución de prueba en una mezcla de cloroformo y metanol (1:1) conteniendo 1 mg/ml. Similarmente preparar una disolución estándar usando piroxicam USP. Por separado aplicar 20 µL de disolución de prueba y solución estándar en una placa para cromatografía en capa fina, impregnada con una capa de 0.25 mm de sílica gel, secar las disoluciones, someter la placa a un sistema de disolventes consistente en una mezcla de tolueno y ácido acético glacial (95:5), hasta que el frente de elución recorra entre tres o cuatro partes del tamaño de la placa. Remover la placa de la cámara de elución marcando el frente de elución y secar con aire. Localizar las marcas en la placa usando una lámpara de luz ultravioleta de onda corta: el valor de R_f obtenido de la disolución prueba corresponderá con el R_f obtenido de la solución estándar.¹

3.9.2 ENSAYOS DE PUREZA USP¹

AGUA, Método I < 921 USP>: no más de 0.5%

RESIDUO DE IGNICIÓN <281 USP> : No más de 0.3 %

METALES PESADOS Método II <231 USP> 0.005 %

3.9.3 MÉTODOS ANALÍTICOS¹ USP

3.9.3.1 A: CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.

Se utiliza para identificación de piroxicam y sus productos de degradación

Disolución patrón de referencia: Pesar exactamente 50 mg de piroxicam estándar de referencia, colocarlos en un matraz volumétrico de 50 ml, disolver a volumen con metanol.

Disolución de la muestra: Pesar exactamente 50 mg de piroxicam, colocarlos en un matraz volumétrico de 50 ml, disolver y llevar a volumen con metanol, mezclar y filtrar.

Procedimiento: Aplicar en una cromatoplaça cubierta con sílica GF254 en carriles separados 50 µl de la disolución de referencia y 50 µl de la disolución de la muestra, dejar un carril como blanco. Dejar secar y desarrollar en la cámara con una fase móvil de cloroformo:etanol (10:1), hasta que el frente del disolvente cubra tres cuartas partes de la placa. Retirar la placa de la cámara y secar con corriente de aire.

Revelar con lámpara de luz U.V. el Rf del piroxicam debe ser de 0.64.

3.9.3.2 B: ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO¹

Disolución patrón de referencia.- Pesar 10 mg de piroxicam patrón de referencia, pasar a un matraz volumétrico de 100 ml, disolver, llevar a aforo con disolución 0.01 N de hidróxido de sodio metanólico y mezclar. Pasar una alícuota de 5 ml a un matraz volumétrico de 100 ml, llevar a volumen con la misma disolución y mezclar concentración 5 µg/ml.

Disolución de la muestra.- Pesar 10 mg de piroxicam, pasar a un matraz volumétrico de 100 ml, disolver, y llevar a aforo con disolución 0.01 N de hidróxido de sodio metanólico y mezclar. Pasar una alícuota de 5 ml a un matraz volumétrico de 100 ml, llevar a volumen con la misma solución y mezclar. (concentración 5µg/ml).

Leer las disoluciones en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 333 nm utilizando solución 0.01 N de hidróxido de sodio metanólico como blanco.

3.9.3.3 ANÁLISIS POR CLAR¹

Disolución reguladora.- Disolver 7.72 g de ácido cítrico anhidro en 400 ml de agua, transferir a un matraz volumétrico de 1000 ml. Por separado, disolver 5.35 g de fosfato dibásico de sodio en 100 ml de agua, transferir esta solución al matraz volumétrico de 1000 ml, llevar a aforo con agua y mezclar.

Solución patrón de referencia.- Pesar con precisión una cantidad del patrón de referencia equivalente a 12.5 mg de piroxicam, transferir a un matraz volumétrico de 25 ml, disolver y llevar a volumen con solución de ácido clorhídrico metanólico, 0.01 N, mezclar.

Transferir una alícuota de 10 ml de disolución anterior a un matraz volumétrico de 100 ml, llevar a volumen con la solución de ácido clorhídrico metanólico 0.01 N y mezclar (concentración 50 µg/ml).

Preparación de la muestra.- Pesar con precisión 50 mg de piroxicam, transferir a un matraz volumétrico de 100 ml, disolver y llevar a volumen con solución 0.01 N de ácido clorhídrico metanólico y mezclar. Transferir una alícuota de 10 ml de la disolución anterior a un matraz volumétrico de 100 ml, llevar a volumen con la disolución 0.01 N de ácido clorhídrico metanólico y mezclar (concentración 50 µg/ml).

CONDICIONES DEL EQUIPO ¹

Fase móvil	: Mezcla de disolución reguladora y metanol (55:45), filtrada y desgasificada.
Detector	: Ultravioleta.
Longitud de onda	: fijar la longitud de onda a 254 nm.
Columna	: 3.9 x 300 mm, empacada con partículas de cerámica o sílica porosa de 5 a 10 micras de diámetro, recubiertas químicamente con octadecilsilano (C18).
Flujo	: 1.2 ml/minuto.

PROCEDIMIENTO ¹

Injectar al cromatógrafo por duplicado, 25 µl, de la preparación del patrón de referencia y registrar la respuesta de los picos. La eficiencia de la columna determinada por el pico analítico no debe ser menor de 500 platos teóricos, y el factor de coleo para el pico analítico no debe ser menor de 1.5.

Una vez cumplidas estas especificaciones, inyectar al cromatógrafo por duplicado, 25 µl, de la preparación del patrón de referencia y de la preparación de la muestra, obtener sus correspondientes cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales.

Parámetros cromatográficos ¹

Eficiencia de la columna	500
Factor de coleo	≤ 1.5
Desviación estándar entre replicas de inyecciones	no más de 2.0 %

3.10 FARMACOLOGÍA DEL PIROXICAM ⁴

Pertenece al grupo más moderno de antiinflamatorios no esteroideos, posee una estructura química completamente diferente a todos los otros antipiréticos analgésicos, que deriva de la benzotiacina.

3.10.1 INDICACIONES ⁴

El piroxicam es capaz de aliviar el dolor que nace en estructuras somáticas, el dolor antiinflamatorio principalmente en los animales y en el hombre en caso de fracturas, esguinces y en el post-operatorio. También produce analgesia satisfactoria en las afecciones reumáticas, como en la artritis reumatoide, osteoartritis o artrosis, espondilitis y fibrosis. Tiene acción antiflogística, inhibe la inflamación aguda eritema, edema, exudación en los animales. En el hombre la acción antiinflamatoria se observa en afecciones reumáticas crónicas de tipo inflamatorio, como artritis juvenil, en cuyo caso no solamente aminora el dolor espontáneo y por compresión articular, sino también la tumefacción, la rigidez y la limitación de los movimientos articulares. Cede el proceso inflamatorio en el ataque agudo de gota, con alivio del dolor, tumefacción y restricción del movimiento. La acción antipirética es similar a la de los salicilatos, con leve disminución de la temperatura corporal en casos de fiebre.

El piroxicam inhibe la síntesis principalmente de las prostaglandinas PGE₂, PGF₂, alfa, PGD₂, actuando sobre la enzima ciclooxigenasa o prostaglandinastetasa. Dicha inhibición enzimática explica el mecanismo de acciones antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas del piroxicam.

3.10.2 REACCIONES SECUNDARIAS ⁴

En dosis usuales algunas veces se puede observar mareo y somnolencia. Tiene acción gástrica irritante y es capaz de provocar trastornos gastrointestinales.

3.10.3 FARMACOCINÉTICA ⁴

El piroxicam se absorbe fácilmente por todas las vías. Después de la administración oral, la concentración máxima en sangre se observa a las 2.5 horas, para descender luego muy lentamente ya que su vida media es muy prolongada y todavía existe en forma evidente a las 120 horas. Los niveles plasmáticos se encuentran alrededor de 0.3 µg/dl con una dosis diaria de 10 mg. El fármaco se encuentra combinado con las proteínas plasmáticas en un 99 %. La vida media de eliminación del piroxicam es de alrededor de 40 horas, que es prolongada y permite una sola toma diaria por vía oral.

3.10.4 TOXICIDAD ³

El piroxicam no es un fármaco muy tóxico pero puede provocar náuseas, dolor epigástrico, vómito, úlcera y la aparición de sangre oculta en las heces en los tratamientos a largo plazo. Algunas veces puede ocasionar mareos, somnolencia y cefalea, también urticaria y prurito, aunque son raras.

3.10.5 CONTRAINDICACIONES ⁴

Úlcera gastroduodenal activa o reciente o cuando existe hipersensibilidad al fármaco.

PRESENTACIÓN ⁴

Cápsulas de 20 mg, Gel al 0.5 %, e Inyectable 20 mg/ml

3.10.6 VIA DE ADMINISTRACIÓN ⁴

Oral, tópica e intramuscular

3.10.7 DOSIS ⁴

Dosis usual: 20 mg una vez al día. Puede elevarse en casos necesarios a 30 mg y aún a 40 mg diarios. En los casos agudos 40 mg durante dos días para continuar con dosis de mantenimiento de 20 mg diarios.

CAPÍTULO 4

PARTE EXPERIMENTAL

4.1 RAZÓN DE VALIDACIÓN AL MÉTODO ORIGINAL USP

El método original USP se modificó, adecuándose a las necesidades propias del laboratorio, y poder utilizar una misma técnica para las tres formulaciones.

Se hicieron diferentes pruebas; variando la concentración del buffer de ácido cítrico utilizando diferentes columnas, fases móviles, a diferentes flujos; hasta obtener como resultado picos simétricos, con un tiempo de retención, adecuado y específico para los tres productos.

El método quedó con las siguientes condiciones:

	Método	
	USP	Propuesto
Fase Móvil (Buffer:MeOH)	55:45	45:55
Columna C18	3.9 x 300 mm	3.9 x 150 mm
Flujo	1.2 ml/min.	1.0 ml/min.
Eficiencia (N)	No menos de 500	No menos de 4500
Coleo (T)	No más de 1.5	No más de 1
Tiempo de Retención	Aprox. 7 min.	Aprox. 4.3 min.

4.1.1 MÉTODO ANALÍTICO

4.1.1.1 REACTIVOS:

Agua grado CLAR
Metanol, grado CLAR Burdick & Jackson
Ácido clorhídrico R.A. J.T. Baker
Fosfato dibásico de potasio, R.A. J.T. Baker
Piroxicam, sustancia de referencia USP

4.1.1.2 EQUIPO Y MATERIAL:

Material de vidrio perfectamente limpio y seco
Balanza analítica calibrada
Baño de ultrasonido
Sistema de microfiltración:
Membrana de nylon 47 mm, 0.45 µm WATO200532

Membrana Millipore HA 13 mm, 0.45 μ m HAWP 02500
Viales de 1 ml y 5 ml
Columna: Symetry C18 150 mm x 3.9 mm D.I. 5 μ WATO054205
Cromatógrafo de líquidos Waters equipado con:
Inyector automático Waters modelo 717 Plus
Bomba Waters, modelo 510
Detector Tunable Absorbance Waters 486
Monitor Hewlett Packard 1024
Impresora Hewlett Packard Láser Jet 4000N
Procesador Hewlett Packard Vectra VE
Detector de arreglo de diodos Waters modelo 996

4.1.1.3 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

1. Disolvente de dilución
Transferir 42.5 ml de ácido clorhídrico a un matraz con agua, aforar con ésta. Concentración de la solución de HCl 0.5 N.
Transferir 20 ml de solución 0.5 N de ácido clorhídrico a un matraz volumétrico de 1000 ml, llevar a volumen con metanol y mezclar.
2. Disolución reguladora de ácido cítrico pH 3.0
Transferir 8.44 g de ácido cítrico monohidratado a un matraz volumétrico de 1000 ml, agregar 400 ml de agua. Por separado disolver 5.35 g, de fosfato dibásico de sodio en 100 ml de agua, adicionar la solución al matraz volumétrico de 1000 ml, llevar con agua y mezclar, pH final de 3.6 aproximadamente.
3. Fase móvil
Mezclar 45 partes de solución reguladora de ácido cítrico, y 55 partes de metanol grado CLAR. Filtrar a través de membrana de nylon 0.45 μ , y desgasificar al vacío durante 5 minutos aproximadamente.
4. Disolución de referencia
Transferir alrededor de 20 mg pesados con precisión piroxicam sustancia de referencia a un matraz volumétrico de 50 ml, agregar 15 ml de disolvente de dilución, sonicar por 15 minutos y llevar a aforo con disolvente de dilución, agitar. Transferir 5 ml de la dilución anterior a un matraz volumétrico de 50 ml, llevar a aforo con fase móvil y mezclar. Filtrar la disolución por membrana de nylon 0.45 μ ; Ésta será la disolución de referencia 1. Preparar la solución por duplicado. Concentración final 40 μ g/ml.

5.A Disolución problema para tabletas.

Pesar y pulverizar 20 tabletas de 20 mg cada una. Transferir una cantidad de polvo equivalente a 20 mg de piroxicam a un matraz volumétrico de 100 ml; por duplicado. Adicionar 60 ml de disolvente de dilución y colocar en un baño de ultrasonido durante 15 minutos, llevar a aforo con disolvente de dilución y mezclar. Filtrar la disolución a través de papel whatman No. 22. Transferir 5 ml a un matraz volumétrico de 25 ml, llevar a volumen con fase móvil y mezclar. Filtrar las muestras por membrana de nylon de 0.45 μ m. Preparar la disolución por duplicado. Concentración final 40 μ g/ml.

5.B Disolución problema para gel al 0.5 %

Homogenizar el contenido de dos tubos de muestra y pesar con exactitud alrededor de 4 gramos de gel, en un matraz volumétrico de 100 ml; adicionar 60 ml de disolvente de dilución y colocar en baño de ultrasonido durante 15 minutos, llevar a volumen con solvente de dilución y mezclar. Transferir 10 ml a un matraz volumétrico de 50 ml, llevar a volumen con fase móvil y mezclar. Filtrar las muestras por membrana de nylon de 0.45 μ m. Preparar la solución por duplicado. Concentración final 40 μ g/ml.

5.C Disolución problema para ampollitas 20 mg/ml.

Homogenizar el contenido de 10 ampollitas, tomar una alícuota de 2 ml de disolución, transferirla a un matraz volumétrico de 100 ml; llevar a volumen con disolvente de dilución y mezclar. Transferir una alícuota de 5 ml a un matraz volumétrico de 50 ml, llevar a volumen con fase móvil y mezclar. Filtrar las muestras por membrana de nylon de 0.45 μ m. Preparar la disolución por duplicado. Concentración final 40 μ g/ml.

4.1.1.4 PROCEDIMIENTO

4.1-Condiciónes Cromatográficas.

Columna Symetry C18, 150mm x 3.9 mm DI, 5 μ m

Fase móvil: Disolución reguladora de ácido cítrico pH 3: metanol, 45:55

Flujo: 1.0 ml/min.

Volumen de inyección: 25 μ L

Longitud de onda: 254 nm

Horno: temperatura ambiente (20-25°C).

4.2-Acondicionar el sistema cromatográfico durante 40 minutos o hasta obtener una línea base estable, inyectar por lo menos 5 veces la solución de referencia "1" (punto 4) y calcular el C.V. el cual debe ser menor a 2.0%. Inyectar por triplicado la solución de referencia "2" (punto 4), calcular la relación o factor de recobro para la solución estándar, el cual debe ser aproximadamente de 100 % ± 2.0 %.

Si el parámetro anterior no cumple, preparar una 3ª solución de referencia, inyectar y recalcular. Inyectar las muestras, e inyectar la solución de referencia "2", al final.

Cumplir con los parámetros de adecuabilidad establecidos.

4.3-Parámetros cromatográficos

Tiempo de retención (piroxicam)	≈ 4.3 min.
Tiempo total de corrida	≈ 6 min
Factor de coleo	≈ 1
Eficiencia de la columna	≈ 4500

4.4.A Cálculos para tabletas:

Calcular el contenido de piroxicam en la muestra de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{mg}_{\text{PIROXICAM}}/\text{tableta} = \frac{A_m \times P_{\text{std}} \times FV_{\text{std}} \times 5 \times 100 \times 25 \times P_p \times 100}{A_{\text{std}} \times 50 \times 50 \times P_{\text{mtra}} \times 5 \times CT}$$

Donde:

A_m = Área de la muestra

A_{std} = Área promedio de la solución de referencia

P_{std} = Peso de la sustancia de referencia (mg)

FV_{std} = Factor de valoración de la sustancia de referencia (%/100)

P_p = Peso promedio de las tabletas

CT = Concentración teórica = 20 mg/Tableta

El resto de los dígitos son factores de dilución y concentración.

4.4.B Cálculos para gel:

4.4.1 Calcular el contenido de piroxicam en la muestra de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{mg}_{\text{PIROXICAM}}/\text{g} = \frac{A_m \times P_{\text{std}} \times FV_{\text{std}} \times 5 \times 100 \times 50}{A_{\text{std}} \times 50 \times 50 \times P_{\text{mtra}} \times 10}$$

Donde:

A_m = Área de la solución muestra

A_{std} = Área promedio de la solución de referencia

P_{std} = Peso promedio de la sustancia de referencia (mg)

FV_{std} = Factor de valoración de la sustancia de referencia (%/100)

P_m = Peso de la muestra (g)

El resto de los dígitos son factores de dilución y concentración.

4.4.C Cálculos para ampollitas:

4.4.1 Calcular el contenido de piroxicam en la muestra de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{mg}_{\text{PIROXICAM}}/\text{mL} = \frac{A_m \times P_{\text{std}} \times FV_{\text{std}} \times 5 \times 100 \times 50}{A_{\text{std}} \times 50 \times 50 \times A \times 5}$$

Donde:

A_m = Área de la solución muestra

A_{std} = Área promedio de la solución de referencia

P_{std} = Peso promedio de la sustancia de referencia (mg)

FV_{std} = Factor de valoración de la sustancia de referencia (%/100)

A = Alicuota de la muestra (mL)

El resto de los dígitos son factores de dilución y concentración.

4.5- Sustancia de referencia de piroxicam

Valoración: 99.88%, $FV_{\text{std}} = 99.88 \% / 100 \% = 0.9988$

4.6- Placebo

El placebo para la especificidad, linealidad y exactitud del método analítico fue preparado de acuerdo a la fórmula y al procedimiento de manufactura de Nysco de México.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS EXPERIMENTALES Y SU ANÁLISIS

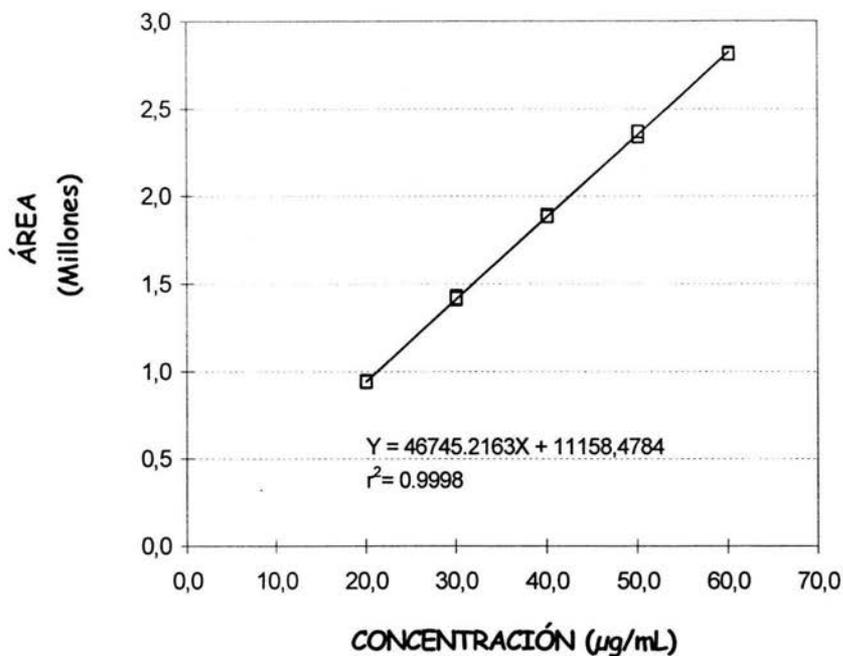
5.1.1 LINEARIDAD DEL SISTEMA PARA PIROXICAM

El analista debe preparar por lo menos por triplicado 5 niveles de concentración (intervalo) de la disolución de referencia, ya sea por dilución, a partir de una solución STOCK . La concentración central debe ser la que represente el 100 % en la muestra procesada para su medición. Reportar la relación Concentración vs Respuesta.

Calcular el valor de la pendiente, la ordenada al origen el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente

INTERVALO DE CONC. %	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	RESPUESTA OBTENIDA (Área)	FACTOR (Conc./Área) $\times 10^{-5}$
50	20.06	945615	2.12
50	20.06	939375	2.14
50	20.06	942472	2.13
75	30.08	1410790	2.13
75	30.08	1430460	2.10
75	30.08	1417451	2.12
100	40.11	1891001	2.12
100	40.11	1892911	2.12
100	40.11	1885127	2.13
125	50.14	2359450	2.13
125	50.14	2341110	2.14
125	50.14	2368629	2.12
150	60.17	2817982	2.14
150	60.17	2818532	2.13
150	60.17	2812126	2.14

**LINEARIDAD DEL SISTEMA
PARA: PIROXICAM**



	Obtenido	Criterio de Aceptación
Coeficiente de Determinación (r^2)	0.9998	≥ 0.98
Intervalo de Confianza para la Pendiente $IC(\beta_1)$ No debe incluir al Cero	46367.65, 47056.28	

5.1.2 PRECISIÓN DEL SISTEMA PARA PIROXICAM

El analista debe preparar por lo menos un sextuplicado de disoluciones a la concentración del analito que represente el 100 % de la muestra procesada. Calcular: S y C.V. de la respuesta analítica.

Disoluciones: 50 mg del STD de piroxicam → 200 ml

Tomar alícuotas de: 4, 6, 8, 10, 12 ml → 50 ml

Concentración: 40.11 µg / mL

ÁREA
1892911
1883397
1890380
1894071
1894374
1893818

	Obtenido	Criterio de Aceptación
Desviación Estándar	4222.58	
Coefficiente de Variación (C.V.)	0.22%	≤ 1.5%

5.1.3 LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA PIROXICAM TABLETAS

A la cantidad de placebo analítico equivalente a una muestra analítica por triplicado, adicionarle la cantidad de analito, correspondiente al 100 % de éste en la muestra. Seleccionar al menos dos niveles superior e inferior de la cantidad de analito (intervalo) y preparar el placebo adicionado al menos por triplicado a cada nivel, manteniendo constante la cantidad de placebo analítico en los tres niveles. Los placebos adicionados deben ser analizados por un mismo analista bajo las mismas condiciones, utilizando como referencia la sustancia empleada en la adición al placebo analítico. Determinar la cantidad recuperada del analito.

Reportar la relación cantidad adicionada vs Cantidad recuperada, calcular el valor de la pendiente, la ordenada al origen el coeficiente de determinación, y el coeficiente de variación.

Calcular el porcentaje de recobro de cada placebo adicionado o muestra adicionada, al obtener el cociente de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada expresada en porcentaje. Calcular el promedio, la desviación estándar, coeficiente de variación.

CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CONCENTRACIÓN FINAL (µg/mL)	RESPUESTA OBTENIDA (ÁREA)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% RECUPERADO	C.V.
9.99	19.98	988204	10.00	100.10	0.45%
9.99	19.98	984040	9.96	99.70	
9.99	19.98	979146	9.91	99.20	
14.98	29.96	1461691	14.80	98.80	0.41%
14.98	29.96	1465475	14.84	99.07	
14.98	29.96	1473966	14.92	99.60	
19.98	39.96	1959827	19.84	99.30	0.18%
19.98	39.96	1966790	19.91	99.65	
19.98	39.96	1964559	19.89	99.55	
24.97	49.94	2444809	24.75	99.12	1.48%
24.97	49.94	2505895	25.37	101.60	
24.97	49.94	2440764	24.71	98.96	
29.96	59.92	2976044	30.13	100.57	0.51%
29.96	59.92	3005565	30.43	101.57	
29.96	59.92	2984000	30.21	100.83	

5.1.4 LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA PIROXICAM GEL

CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CONCENTRACIÓN FINAL (µg/mL)	RESPUESTA OBTENIDA (ÁREA)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% RECUPERADO	C.V.
10.09	20.18	993985	10.24	101.49	0.66%
10.09	20.18	985295	10.15	100.59	
9.99	19.98	987639	10.18	101.90	
15.18	30.36	1481600	15.27	100.59	0.65%
15.08	30.16	1489563	15.35	101.79	
14.98	29.96	1464909	15.09	100.73	
20.18	40.36	1959565	20.19	100.05	0.40%
20.18	40.36	1973565	20.34	100.79	
20.18	40.36	1972272	20.32	100.69	
25.07	50.14	2430202	25.04	99.88	0.11%
25.27	50.54	2454130	25.29	100.08	
25.17	50.34	2441128	25.15	99.92	
30.16	60.32	2899265	29.56	98.01	1.45%
29.96	59.92	2931119	30.20	100.80	
30.16	60.32	2929126	30.18	100.07	

5.1.5 LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA PIROXICAM INYECTABLE

CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CONCENTRACIÓN FINAL (µg/mL)	RESPUESTA OBTENIDA (ÁREA)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% RECUPERADO	C.V.
20.18	20.18	988283	20.09	99.55	0.43%
19.98	19.98	969722	19.72	98.70	
19.98	19.98	973928	19.80	99.10	
29.96	29.96	1463317	29.75	99.30	0.20%
30.06	30.06	1473371	29.96	99.67	
29.96	29.96	1467585	29.84	99.60	
39.95	39.95	1943448	39.51	98.90	0.88%
39.95	39.95	1932708	39.29	98.35	
39.95	39.95	1966210	39.97	100.05	
50.04	50.04	2444872	49.71	99.34	0.15%
50.04	50.04	2452073	49.85	99.62	
49.94	49.94	2445815	49.73	99.58	
59.93	59.93	2922528	59.42	99.15	0.21%
59.93	59.93	2926286	59.49	99.27	
59.93	59.93	2934244	59.66	99.55	

CUADRO DE CRITERIOS PARA LINEARIDAD DEL MÉTODO

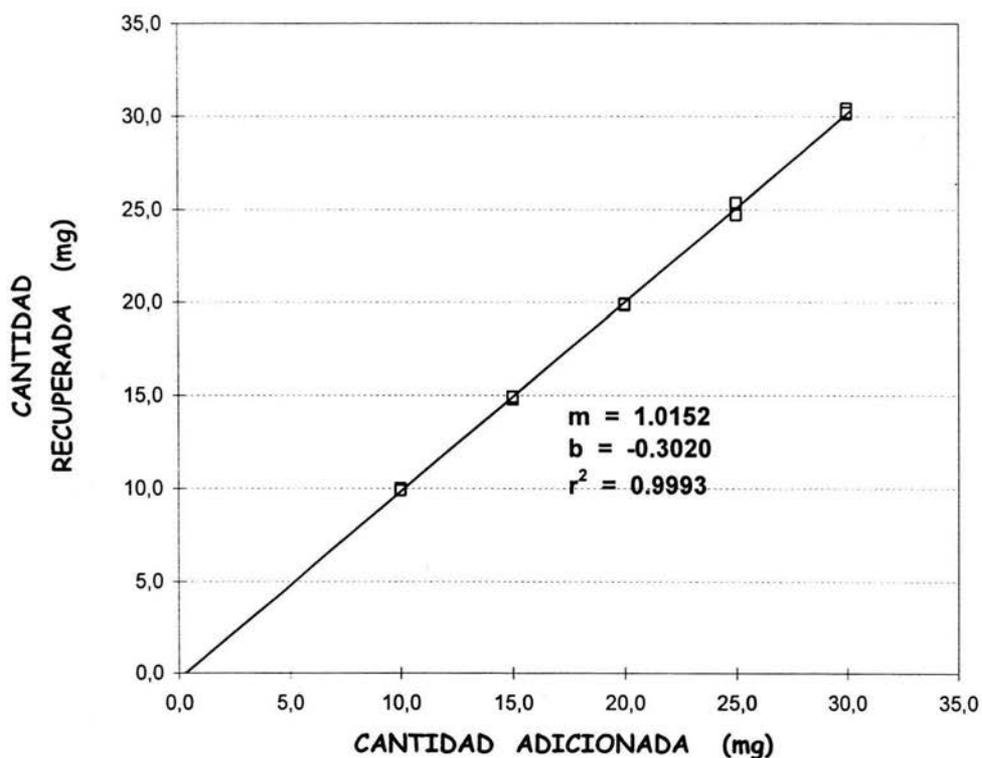
	Obtenido Tabletas	Obtenido Gel	Obtenido Inyectable	Criterio de Aceptación
Pendiente (b_1)	1.0152	0.9868	0.9944	Sin especifica ción
Intercepto (b_0)	-0.3020	0.3201	-0.0421	
Coefficiente de Determinación (r^2)	0.9993	0.9994	0.9998	$r^2 \geq 0.98$
Intervalo de Confianza Pendiente IC(β_1)	-3.2997 5.3301	0.8303 1.1433	0.9154 1.0734	Debe incluir la Unidad
Intervalo de Confianza Ordenada al origen IC(β_0)	-3.6449 3.0409	-3.0535 3.6937	-1.1574 1.0732	Debe incluir el Cero
Coefficiente de Variación de Regresión ($CV_{Y/X}$)	0.9920	0.9251	0.4327	No mayor a 2%
Para el Porcentaje de recobro:				
Promedio Aritmético (\bar{Y})	99.8413	100.4920	99.3153	Sin especifica ción
Desviación Estándar (S)	0.8789	0.9100	0.4156	
Coefficiente de Variación ($C.V.$)	0.8803	0.9056	0.4185	No mayor a 2%
Intervalo de Confianza para la Media Poblacional IC (μ)	99.3545 100.3281	99.9880 100.9960	99.0851 99.5455	*

*El IC(μ) debe incluir el 100 % o que el promedio aritmético (Y) del % de recobro se incluya en el intervalo.

LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA PIROXICAM TABLETAS

LINEALIDAD DEL MÉTODO

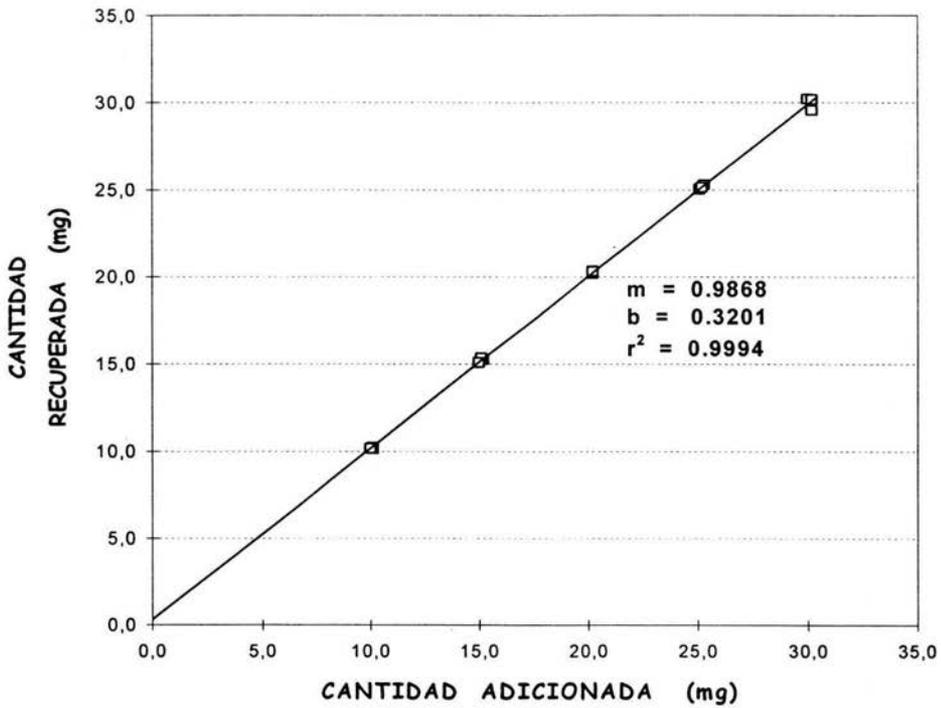
Piroxicam
tabletas 20 mg



LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA PIROXICAM GEL

LINEALIDAD DEL MÉTODO

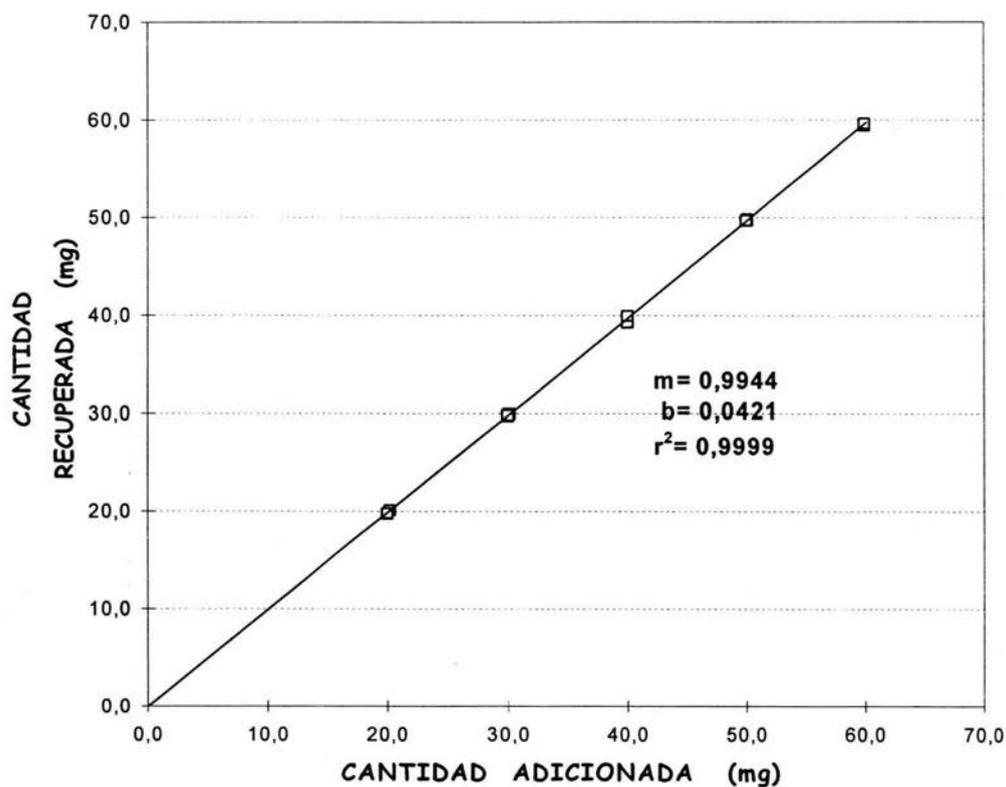
Piroxicam Gel



LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA ARTINOR INYECTABLE

LINEALIDAD DEL MÉTODO

Piroxicam Inyectable



5.1.6 EXACTITUD DEL MÉTODO AL 100 %

A la cantidad de placebo analítico equivalente a una muestra analítica por sextuplicado, adicionarle la cantidad de analito, correspondiente al 100 % de éste a la muestra. Los placebos adicionados deben ser analizados por un mismo analista bajo las mismas condiciones. Determinar la cantidad recuperada del analito.

	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CONCENTRACIÓN FINAL ($\mu\text{g/mL}$)	RESPUESTA OBTENIDA (Área)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% RECUPERADO
T A B S	19.98	39.96	1959827	19.84	99.30
	19.98	39.96	1966790	19.91	99.65
	19.98	39.96	1964559	19.89	99.55
	19.88	39.96	1978294	20.03	100.25
	19.88	39.96	1979095	20.04	100.30
	19.88	39.96	1960769	19.85	99.35
G E L	20.08	40.36	1959565	20.19	100.05
	20.18	40.36	1973565	20.34	100.79
	20.18	40.36	1972272	20.32	100.69
	20.18	40.16	1947733	20.07	99.95
	20.18	40.36	1947107	20.06	99.41
	20.18	40.36	1951302	20.11	99.65
I N Y E C T	39.95	39.95	1943448	39.51	98.90
	39.95	39.95	1932708	39.29	98.35
	39.95	39.95	1966210	39.97	100.05
	39.95	40.05	1953767	39.72	99.18
	39.95	40.05	1959879	39.85	99.50
	39.95	39.95	1958252	39.81	99.65

CUADRO DE CRITERIOS PARA EXACTITUD DEL MÉTODO AL 100 %

	Obtenido tabletas	Obtenido Gel	Obtenido Inyectable	Criterio de Aceptación
Media del Por ciento Recuperado (X)	99.7 %	100.1 %	99.3 %	98 - 102 %
Promedio Aritmético (y)	99.7 %	100.1 %	99.2 %	
Desviación Estándar (S)	0.44 %	0.55 %	0.60 %	
Coficiente de Variación (C.V.)	0.44 %	0.55 %	0.60 %	≤ 2.0 %
Intervalo de Confianza para la Media Poblacional del Porcentaje de Recobro	99.27	99.51	98.64	98 %
IC(μ)	a	a	a	a
	100.19	100.67	99.90	102 %

El IC (μ) debe incluir el 100 % o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo.

98 – 102 % si el método es cromatográfico

5.1.7 REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO

Se determina de una muestra homogénea del producto cercana al 100 % de la concentración teórica analizada cuando menos. Por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado. Calcular el coeficiente de variación.

	TABLETAS		GEL		INYECTABLE	
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
D I A 1	96.14 %	99.80 %	96.18 %	97.09 %	98.76 %	97.57 %
	95.82 %	100.37 %	96.13 %	97.46 %	99.10 %	97.61 %
	96.22 %	100.52 %	96.01 %	96.90 %	99.17 %	100.67 %
D I A 2	96.31 %	97.04 %	96.68 %	98.36 %	99.45 %	99.52 %
	96.23 %	97.54 %	96.87 %	97.51 %	99.78 %	98.55 %
	96.46 %	96.69 %	96.95 %	96.88 %	99.23 %	98.90 %
\bar{x} (n=6)	96.20 %	98.68 %	96.47 %	97.37 %	99.25 %	98.80 %
C.V. (n=6)	0.22%	1.76%	0.43%	0.57%	0.35%	1.20%

	Obtenido Tabletas	Obtenido Gel	Obtenido Inyectable	Criterio de Aceptación
Media (\bar{y})	97.43 %	96.92 %	99.03 %	98 - 102%
Desviación Estándar (S)	1.75 %	0.66 %	0.86 %	
Coficiente de Variación (C.V.)	1.80 %	0.68 %	0.87 %	≤ 2.0 %

La reproducibilidad del método se llevó a cabo utilizando el lote 9DY578 de Artinor tabletas fabricado el 10 de abril de 1999.

La reproducibilidad del método se llevó a cabo utilizando el lote 9G1085 de Artinor Gel fabricado el 21 de julio de 1999.

La reproducibilidad del método se llevó a cabo utilizando el lote 9G2105 de Artinor Inyectable fabricado el 05 de septiembre de 1999.

5.1.8 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA Y DE LA DISOLUCIÓN DE REFERENCIA⁹

El analista debe establecer la etapa de análisis en la cual se desea evaluar la estabilidad, además de determinar las condiciones de almacenaje.

Para determinar la estabilidad analítica mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales a partir de 3 de muestras, con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones. El químico analista debe analizar por triplicado las muestras sometidas a diferentes condiciones, procesar el número de muestras necesarias para cada condición de almacenaje. Proseguir el análisis de cada una de las preparaciones al término de cada condición de almacenaje, utilizando una solución de referencia recientemente preparada. Reportar la valoración de cada preparación.

Calcular la media aritmética del análisis inicial y de cada condición de almacenaje.

MUESTRA	<i>Piroxicam tabletas, Temperatura ambiente</i>		<i>Piroxicam gel, Temperatura ambiente</i>		<i>Piroxicam inyectable, Temperatura ambiente</i>	
	ANÁLISIS INICIAL	ANÁLISIS 24 h	ANÁLISIS INICIAL	ANÁLISIS 24 h	ANÁLISIS INICIAL	ANÁLISIS 24 h
1	96.14 %	96.75 %	96.18 %	97.29 %	99.45 %	98.38 %
2	95.82 %	96.43 %	96.13 %	97.24 %	99.78 %	98.87 %
3	96.22 %	96.97 %	96.01 %	97.04 %	99.23 %	99.94 %
x (n=3)	96.06 %	96.72 %	96.11 %	97.19 %	99.49 %	99.06 %
I 1	-----	100.63 %	-----	101.15 %	-----	98.92 %
I 2	-----	100.64 %	-----	101.15 %	-----	99.09 %
I 3	-----	100.78 %	-----	101.07 %	-----	100.72 %
(x_I)	-----	100.68 %	-----	101.12 %	-----	99.58 %

Piroxicam solución de referencia. Temperatura ambiente

MUESTRA	ANÁLISIS INICIAL	ANÁLISIS 21 h.	ANÁLISIS INICIAL	ANÁLISIS 18 h.	ANÁLISIS INICIAL	ANÁLISIS 21 h.
1	100.01	101.42	99.63	100.97	100.30	101.14
2	99.99	101.16	100.37	101.50	99.70	99.36
x (n=2)	100.00%	101.29%	100.00%	101.24%	100.00%	100.25%
I 1	-----	101.41	-----	101.34	-----	100.84
I 2	-----	101.17	-----	101.13	-----	99.66
(x_I)	-----	101.29%	-----	101.24%	-----	100.25%

Las muestras listas para su análisis se mantuvieron en sus matraces de preparación, protegidas de la luz a temperatura ambiente en el laboratorio.

Criterio de Aceptación:	La magnitud del factor I debe ser $\leq 2\%$, el valor I, debe estar comprendido entre 98% - 102 %
--------------------------------	--

5.1.9 TOLERANCIA

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. Fijar por lo menos dos condiciones de uso y analizar una misma muestra por lo menos por triplicado a cada condición.

Reportar el contenido del analito de todas las muestras.

Calcular la media aritmética, desviación estándar y el coeficiente de variación del contenido del analito.

La proporción de metanol en la fase móvil fue modificada de 50%, 55% y 60%. Los parámetros cromatográficos para piroxicam se calcularon de tres inyecciones diferentes.

PIROXICAM TABLETAS

CONDICIÓN	TIEMPO DE RETENCIÓN	FACTOR DE COLEO	EFICIENCIA	CONTENIDO (%)
Solución reguladora MeOH 50:50	4.06 min	1.2	2787	95.95
				95.59
				96.14
Solución reguladora MeOH 45:55	3.6 min	1.2	2796	96.37
				96.06
				96.46
Solución reguladora MeOH 40:60	3.16 min	1.2	2553	95.33
				95.03
				94.92
Promedio (x)				95.76
Desviación Estándar (S)				0.57
C.V.				0.59

Criterio de Aceptación:	$CV \leq 2\%$,
--------------------------------	----------------------------------

PIROXICAM GEL

CONDICIÓN	TIEMPO DE RETENCIÓN	FACTOR DE COLEO	EFICIENCIA	CONTENIDO (%)
Solución reguladora MeOH 50:50	5.56 min	1.5	2761	98.09
				98.01
				97.97
Solución reguladora MeOH 45:55	3.95 min	1.6	2398	98.20
				97.43
				97.12
Solución reguladora MeOH 40:60	3.00 min	1.7	2117	98.15
				97.43
				97.02
Promedio (x)				97.71
Desviación Estándar (S)				0.46
C.V.				0.47

Criterio de Aceptación:	$CV \leq 2\%$,
--------------------------------	----------------------------------

PIROXICAM INYECTABLE

CONDICIÓN	TIEMPO DE RETENCIÓN	FACTOR DE COLEO	EFICIENCIA	CONTENIDO (%)
Solución reguladora MeOH 50:50	5.67 min	1.3	2803	99.25
				98.88
				98.18
Solución reguladora MeOH 45:55	4.00 min	1.2	2829	99.31
				98.82
				98.83
Solución reguladora MeOH 40:60	3.17 min	1.2	2449	99.21
				98.41
				98.34
Promedio (x)				98.8
Desviación Estándar (S)				0.42
C.V.				0.42

Criterio de Aceptación:	CV ≤ 2%,
--------------------------------	-----------------

5.1.10 ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO

Partiendo de la experiencia en el análisis de la muestra, se deben establecer las posibles sustancias interferentes, y adicionar cantidades conocidas de éstas, solas o combinadas a la muestra y evaluar su respuesta al método, bajo las mismas condiciones de análisis.

Si no se cuenta con los posibles productos de degradación se pueden emplear, dependiendo de la naturaleza química del analito y si es posible, las siguientes condiciones para favorecer la inestabilidad del analito en la muestra:

1. Someter al analito, el placebo y la muestra en un horno a 20 °C por debajo del punto de fusión del analito de 2 a 4 semanas.
2. Exponer el analito, placebo y muestra a la luz UV, por un tiempo apropiado.
3. Hacer soluciones del analito ajustando el pH de 1 a 2 y/o de 10 a 12 y someterlas a 60 °C – 80 °C por un tiempo apropiado.
4. Para formas farmacéuticas líquidas o semisólidas, adicionar peróxido de hidrógeno para favorecer la oxidación del analito.

El tiempo y las condiciones se seleccionan con el fin de degradar al analito a niveles de un 15% a 30 %.

Criterio de aceptación: La respuesta del método únicamente debe ser debida al Analito.

Se prepararon muestras de placebo, producto terminado y sustancia de referencia, sometiéndose a la acción de diferentes agentes degradantes.

Las muestras se analizaron obteniéndose los siguientes resultados:

PIROXICAM TABLETAS

MEDIO DEGRADANTE	PLACEBO	MATERIA PRIMA			PRODUCTO TERMINADO		
		% Recobro	Ángulo de Pureza	Umbral de Pureza	% Recobro	Ángulo de Pureza	Umbral de Pureza
MEDIO ÁCIDO HCl 6N 24 hrs	s/interferencia	100.77	0.041	1.025	99.25	0.032	1.03
MEDIO BÁSICO NaOH 6N 24 hrs NH ₄ OH 5 min 60 °C	s/interferencia	33.41	0.038	1.066	98.26	0.034	1.04
MEDIO OXIDATIVO H ₂ O ₂ 30% 24 h	s/interferencia	44.66	0.038	1.089	95.59	0.028	1.126
MEDIO OXIDATIVO H ₂ O ₂ 30% (20 min, 80 °C)	*****	*****	*****	*****	77.51	0.030	0.239
LUZ UV 15 días	s/interferencia	97.53	0.038	1.043	93.69	0.032	1.067
TEMPERATURA 60 °C 15 días	s/interferencia	96.98	0.34	1.056	98.20	0.036	1.043

PIROXICAM GEL

MEDIO DEGRADANTE	PLACEBO	MATERIA PRIMA			PRODUCTO TERMINADO		
		% Recobro	Ángulo de Pureza	Umbral de Pureza	% Recobro	Ángulo de Pureza	Umbral de Pureza
MEDIO ÁCIDO HCl 6N 24 h HCl 6N 5 min 60 °C	s/interferencia	100.77	0.41	1.025	68.35	0.036	2.14
MEDIO BÁSICO NaOH 6N 24 h NH ₄ OH 5 min 60 °C	s/interferencia	33.41	0.038	1.066	60.65	0.039	2.17
MEDIO OXIDATIVO H ₂ O ₂ 30% 20 min, 80°C H ₂ O ₂ 15 min 60 °C	s/interferencia	44.66	0.038	1.089	84.86	0.278	1.083
LUZ UV 15 días	s/interferencia	97.53	0.038	1.043	103.1 4	0.348	1.073
TEMPERATURA 60 °C 15 días	s/interferencia	96.98	0.034	1.056	89.54	0.120	1.047

PIROXICAM INYECTABLE

MEDIO DEGRADANTE	PLACEBO	MATERIA PRIMA			PRODUCTO TERMINADO		
		% Recobro	Ángulo de Pureza	Umbral de Pureza	% Recobro	Ángulo de Pureza	Umbral de Pureza
MEDIO ÁCIDO HCl 6N 24 h	*****	100.77	0.41	1.025	*****	*****	*****
MEDIO ÁCIDO HCl conc, 5 min, ebullición	s/interferencia	*****	*****	*****	63.30	0.032	0.21
MEDIO BÁSICO NaOH 6N 1 mL, 30 min, ebullición	*****	33.41	0.038	1.066	*****	*****	*****
MEDIO BÁSICO NH ₄ OH conc, 1 min, ebullición	s/interferencia	*****	*****	*****	94.33	0.029	0.218
MEDIO OXIDATIVO H ₂ O ₂ 30% 24 h	*****	44.66	0.038	1.089	*****	*****	*****
MEDIO OXIDATIVO H ₂ O ₂ 30% 10 min, ebullición	s/interferencia	*****	*****	*****	81.83	0.028	1.061
LUZ UV 15 días	s/interferencia	97.53	0.038	1.043	95.34	0.029	0.216
TEMPERATURA 60 °C 15 días	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****

Todas las muestras se analizaron empleando detector de arreglo de diodos. Se realizó análisis espectral por medio de su correspondiente barrido conjuntamente con la normalización de áreas a diferentes tiempos de elución del pico de interés, observando la presencia de un solo pico a 254 nm, confirmando que el pico de piroxicam es puro, ya que el ángulo de pureza es menor que el umbral de ruido.

CAPÍTULO 6

6.1 CONCLUSIONES

1. El sistema es lineal para piroxicam en un intervalo de concentración de 20.06 a 60.17 $\mu\text{g/mL}$, y una r^2 de 0.9998
2. El sistema es preciso para una concentración de 40.11 $\mu\text{g/mL}$ con un C.V. de 0.22%.
3. El método es lineal para piroxicam tabletas en un intervalo aproximado de 9.99 a 29.96 mg, (19.98 a 59.92 $\mu\text{g/mL}$ de concentración final), con una r^2 de 0.9993. Los C.V. para cada nivel son menores al límite del criterio de aceptación.
El método es lineal para piroxicam gel, en un intervalo de 9.99 a 30.16 mg (19.98 a 60.32 $\mu\text{g/ml}$ de concentración final), con una r^2 de 0.9994. Los C.V. para cada nivel son menores al límite del criterio de aceptación.
El método es lineal para piroxicam inyectable en un intervalo aproximado de 19.98 a 59.93 mg, (19.98 a 59.93 $\mu\text{g/ml}$ de concentración final), con una r^2 de 0.9999. Los C.V. para cada nivel son menores al límite del criterio de aceptación.
4. El método es exacto para piroxicam tabletas una, para cantidad aproximada de 19.98 mg, correspondiente al 100 %, con una media del por ciento recuperado de 99.7 % y un C.V. de 0.44 %.
El método es exacto para piroxicam en gel, para una cantidad aproximada de 20.18 mg, correspondiente al 100 %, con una medida del por ciento recuperado de 100.1 % y un C.V. de 0.55 %.
El método es exacto para una cantidad aproximada de 39.95 mg, correspondiente al 100%, con una medida del por ciento recuperado de 99.3 % y un C.V. de 0.60 %.
5. El método resultó reproducible para la formulación cuando se determinó de muestras homogéneas de Artinor tabletas lote 9DY578. El C.V. total de doce análisis de dos analistas en dos corridas diferentes fue de 1.80%.
El método resultó reproducible para la formulación cuando se determinó de muestras homogéneas de Artinor gel lote 9G1085. El C.V. total de doce análisis de dos analistas en dos corridas diferentes fue de 0.68%.
El método resultó reproducible para la formulación cuando se determinó de muestras homogéneas de Artinor inyectable del lote 9G2105. El C.V. total de doce análisis de dos analistas en dos corridas diferentes fue de 0.87%.

6. La muestra y la solución de referencia listas para el análisis de Artinor tabletas e inyectable, son estables cuando menos por un período de 24 hrs a temperatura ambiente y en la oscuridad, ya que cumple con los criterios establecidos.

La muestra y la solución de referencia listas para el análisis son estables cuando menos por un período de 18 hrs a temperatura ambiente y en la oscuridad, ya que cumple con los criterios establecidos.

7. El método es específico para control de calidad y para monitorear la estabilidad del producto ya que el placebo y los productos de degradación no interfieren en la respuesta de piroxicam.
8. El sistema es tolerante a cambios de $\pm 5\%$ de metanol sin que los resultados se vean modificados.

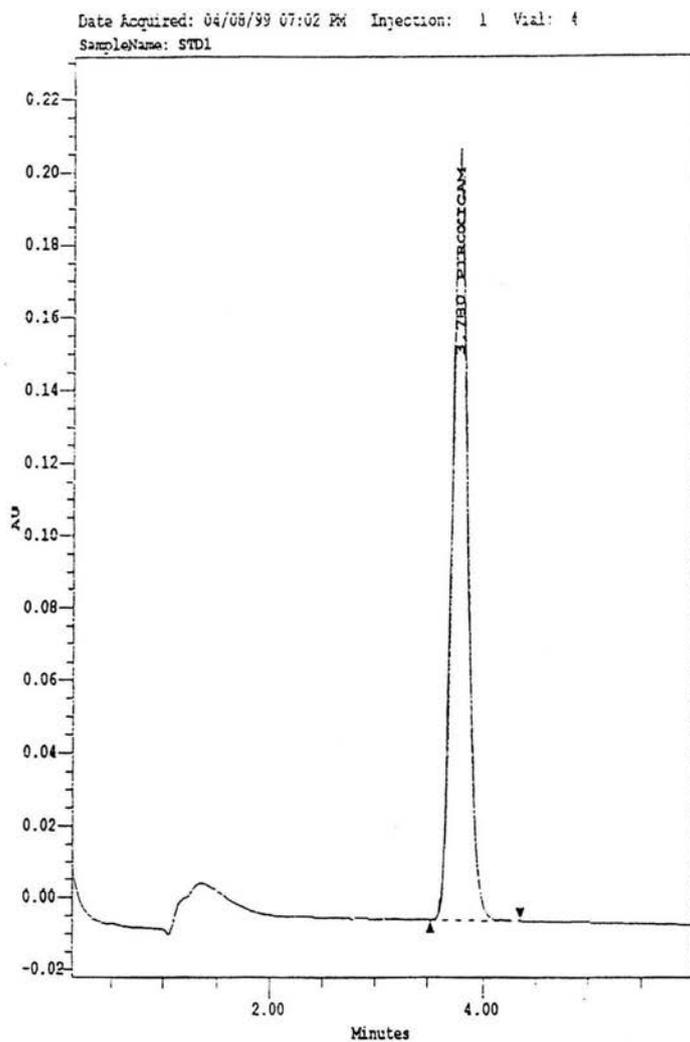
6.2 CONCLUSIONES FINALES

- I. Las normas internacionales y nacionales exigen que los medicamentos que se lancen al mercado cumplan con una serie de características encaminadas a minimizar hasta donde sea posible los riesgos para el paciente y poner mucho énfasis en el aseguramiento de la calidad de los medicamentos. Para poder cumplir estas exigencias, la industria cuenta con varias herramientas que a través de las prácticas adecuadas de fabricación, y las buenas prácticas de laboratorio, logran un control aceptable de las formulaciones, que producen en sus instalaciones. Una parte importante de estas herramientas; es la validación, de los procesos, métodos y sistemas que son utilizados para la producción y control de las diferentes formas farmacéuticas.
- II. La industria farmacéutica en la actualidad necesita métodos analíticos que cumplan con las siguientes características, que sean: confiables, sencillos, económicos, accesibles, y de los cuales se pueda obtener resultados confiables, y en tiempos cortos.
- III. Se implementó un método por CLAR para la determinación de Piroxicam en tres diferentes formas farmacéuticas.
Se llevaron a cabo modificaciones y adaptaciones al método USP, para utilizarse para estudios de estabilidad, es decir, ser específico para los excipientes de las tres formulaciones y los productos de degradación.
Se validó el método de acuerdo a los requisitos de la Secretaría de Salud, resultando lineal, exacto, preciso, reproducible y específico para las tres formulaciones.
- IV. El método es sencillo, utiliza materiales y reactivos de fácil acceso y se obtienen resultados en un tiempo reducido, el tiempo de retención del piroxicam es de alrededor de 4 minutos y el tiempo total de corrida es de 6 minutos.

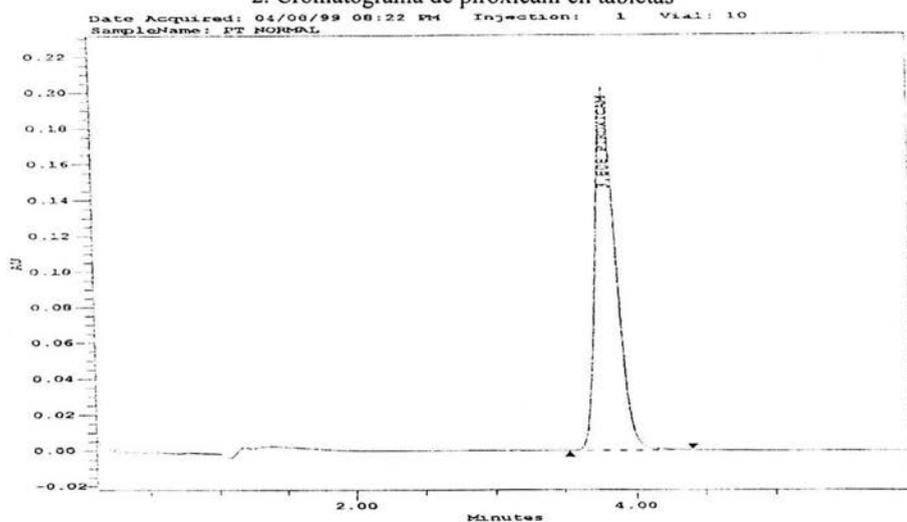
6.3 ANEXOS

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

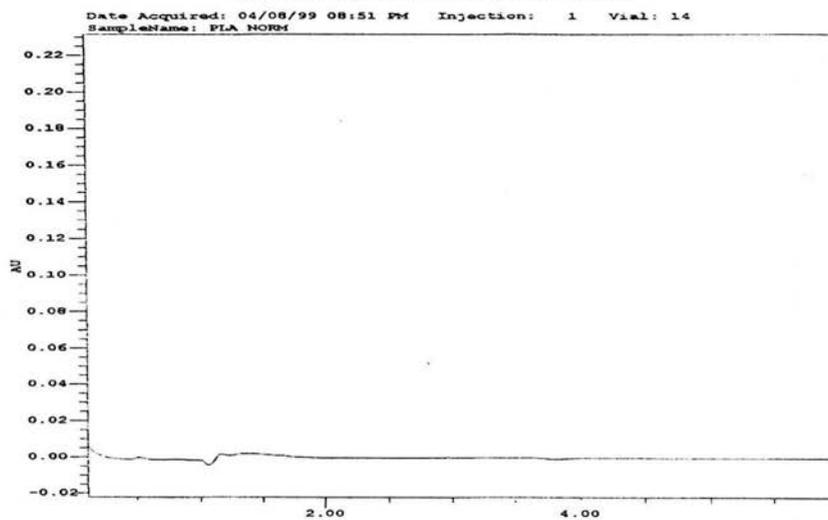
1. Cromatograma de la solución estándar de Piroxicam



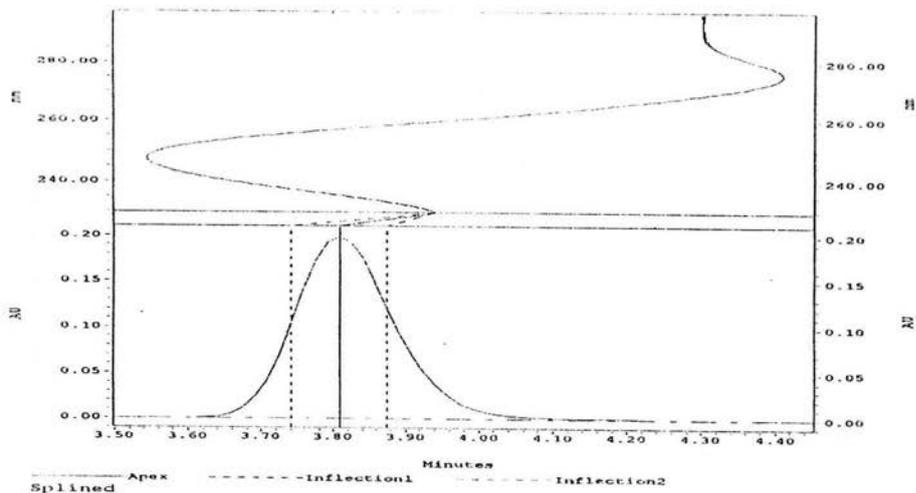
2. Cromatograma de piroxicam en tabletas



3. Cromatograma de placebo de tabletas



4. Análisis espectral de Piroxicam en tabletas

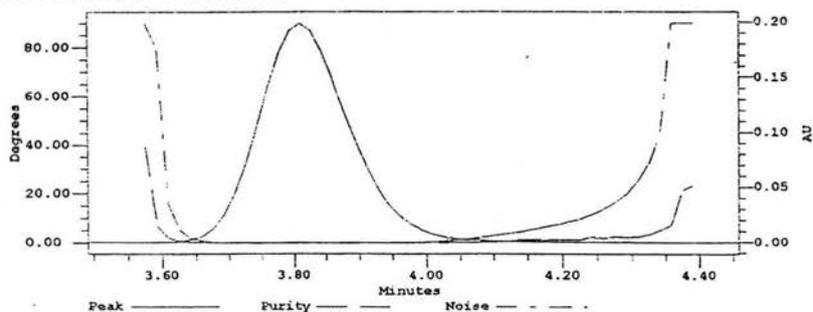


5. Análisis espectral de piroxicam en tabletas

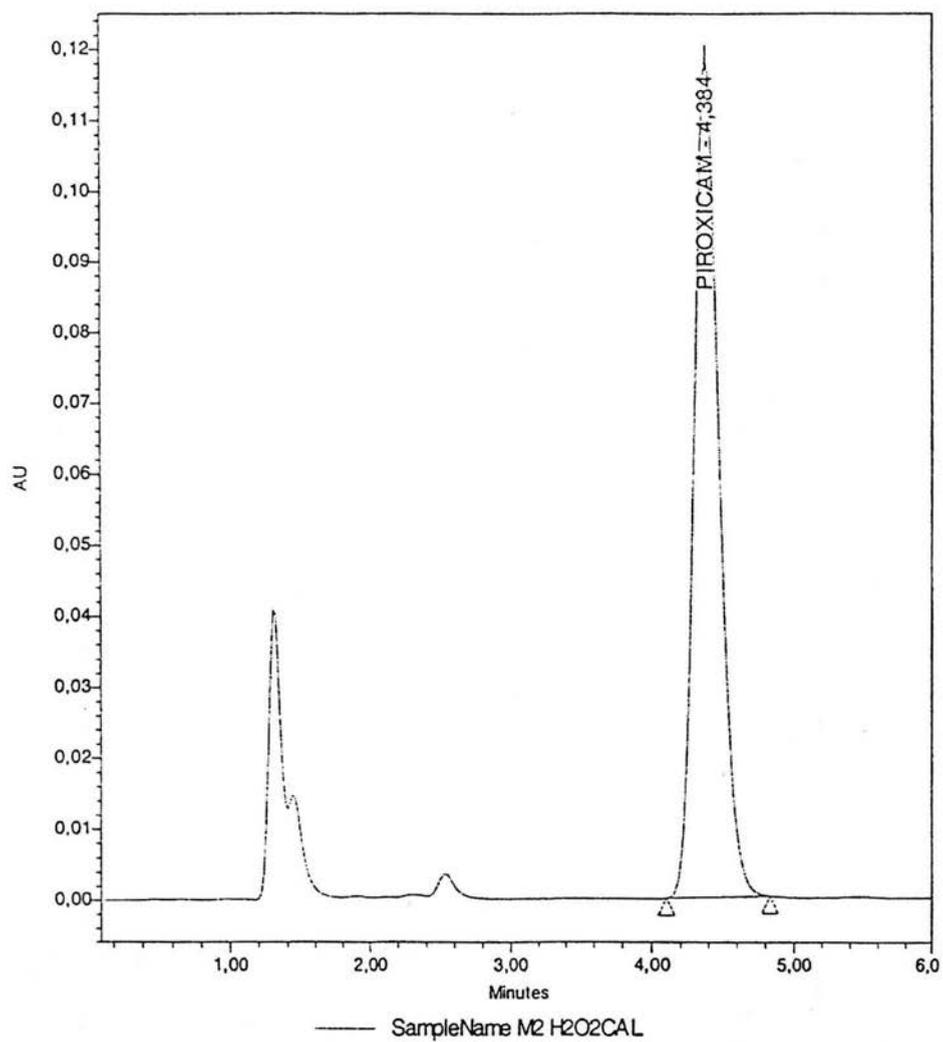
Purity Result for Peak 1: PIROXICAM
 Retention Time: 3.81 Purity Angle: 0.03 Threshold Angle: 1.05

Matching Spectra List

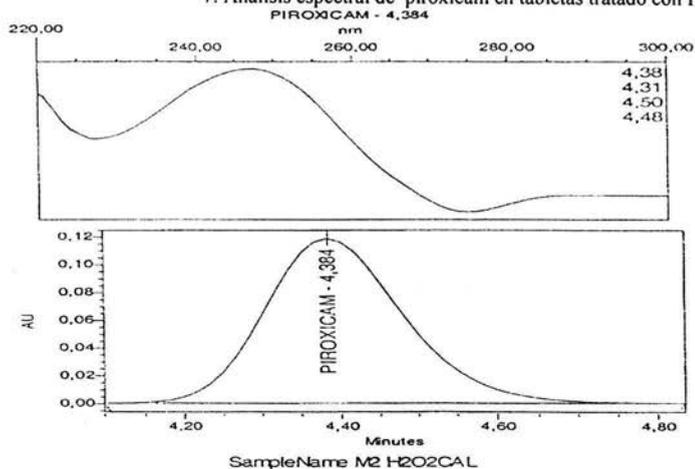
#	Match Errors
1	
2	
3	



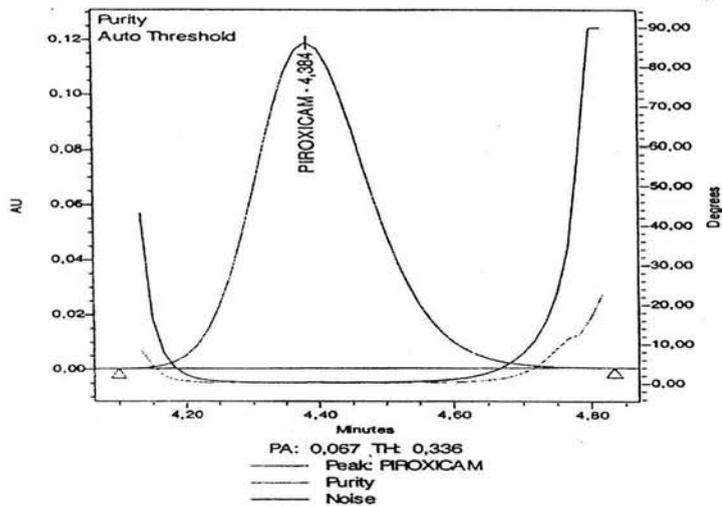
6. Cromatograma de piroxicam en tabletas tratado con H₂O₂



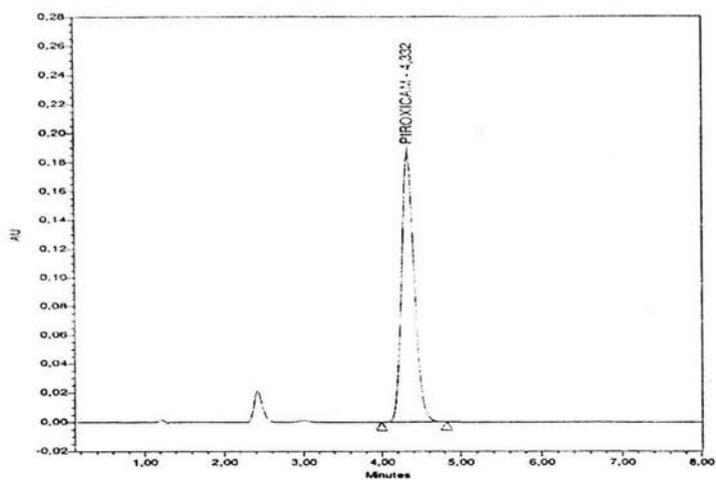
7. Análisis espectral de piroxicam en tabletas tratado con H₂O₂



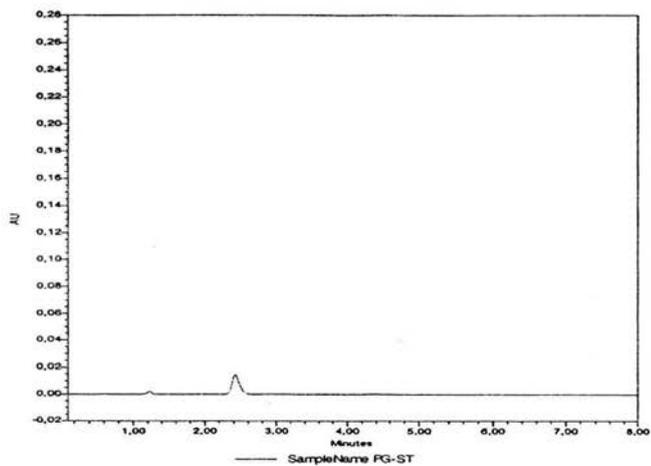
8. Análisis espectral de piroxicam en tabletas tratado con H₂O₂



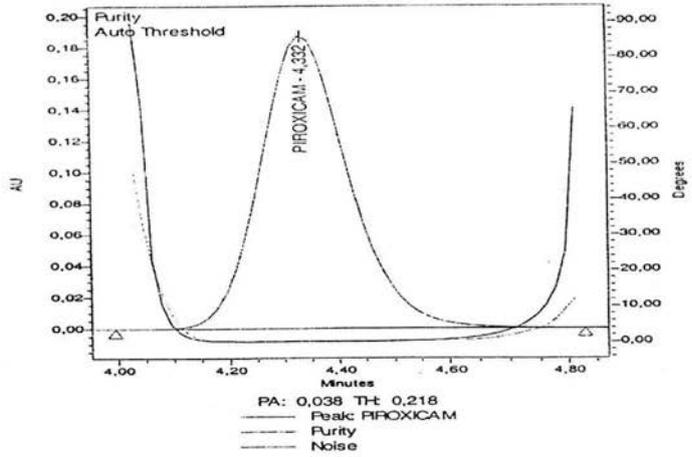
9. Cromatograma de Piroxicam en gel producto terminado



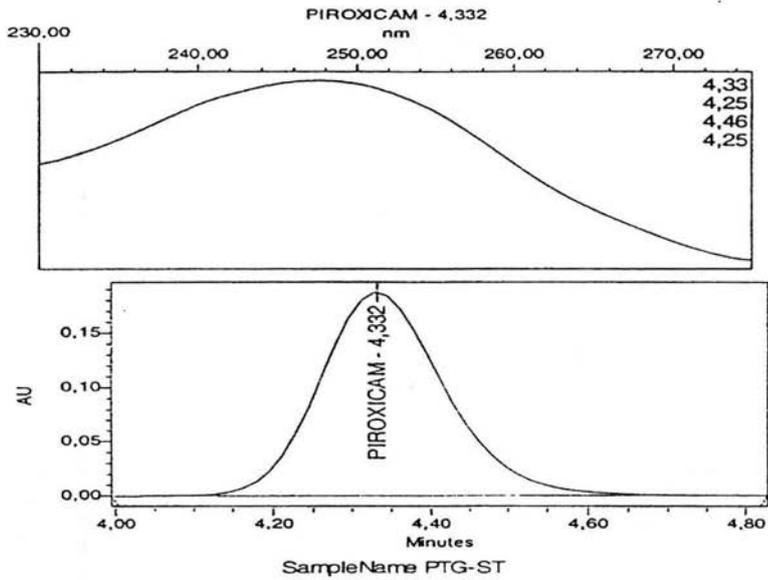
10. Cromatograma de placebo del gel producto terminado



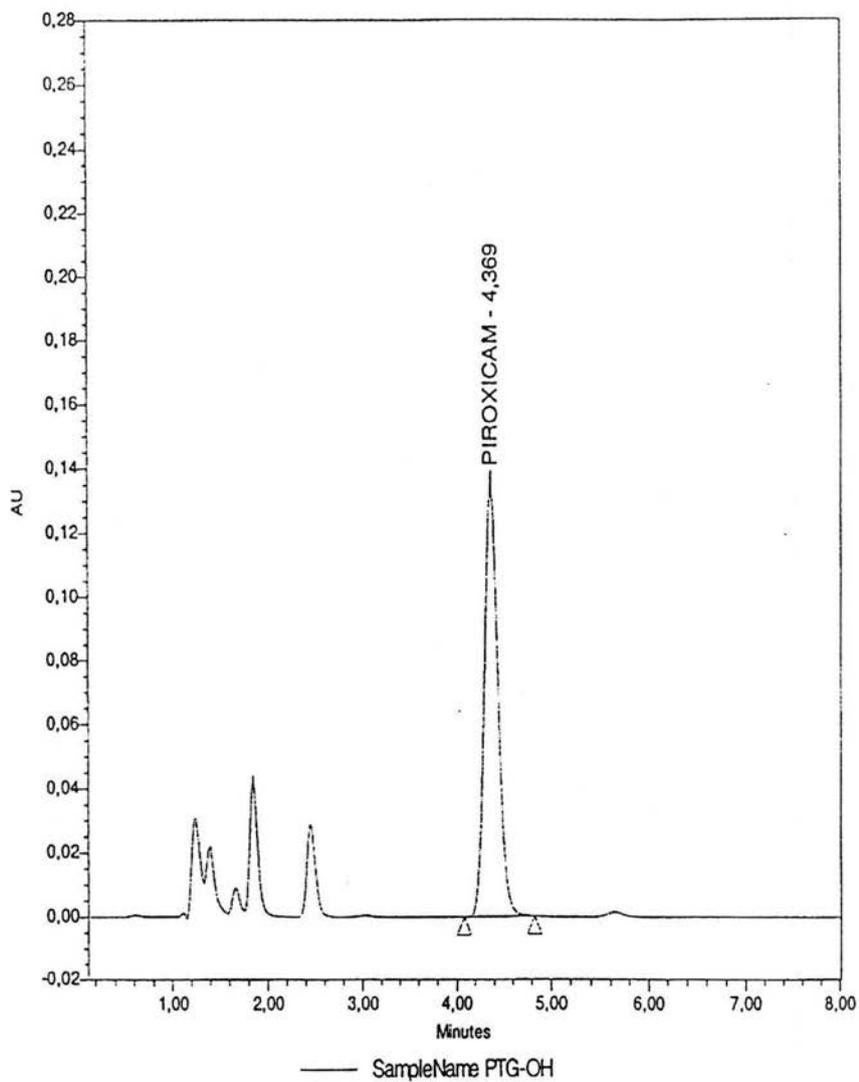
11. Análisis espectral de Piroxicam en Gel



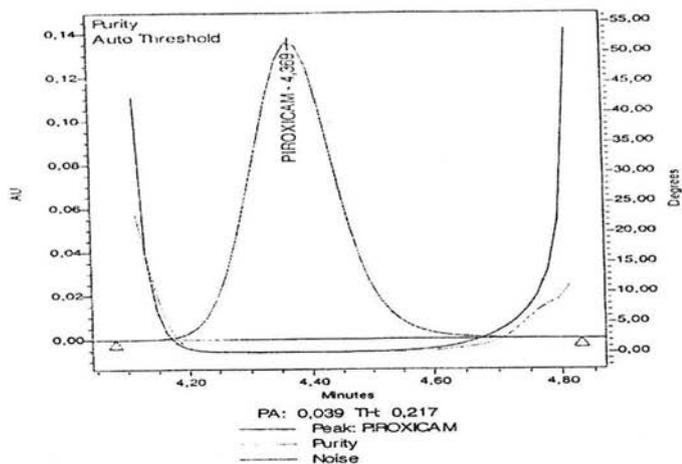
12. Análisis espectral de Piroxicam en gel producto terminado



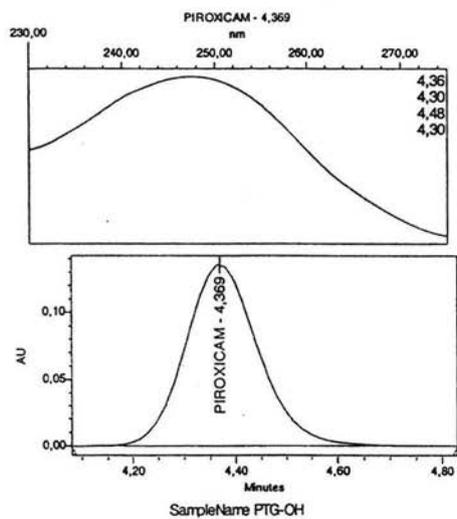
13. Cromatograma de Piroxicam en gel tratado con NH_4OH



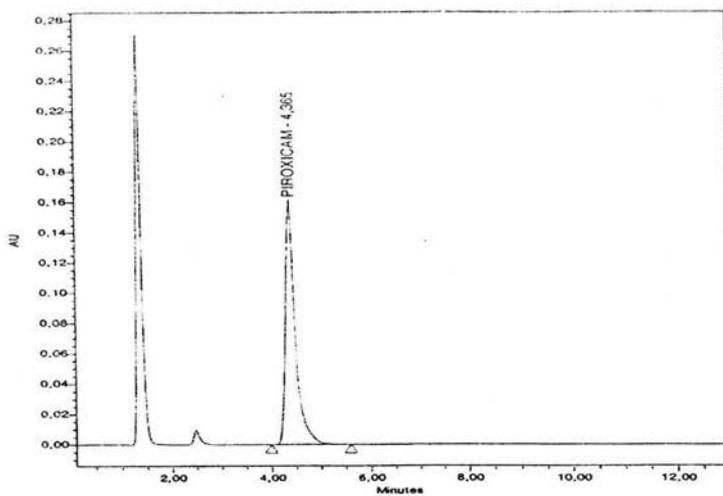
14. Análisis espectral de Piroxicam en gel tratado con NH₄OH



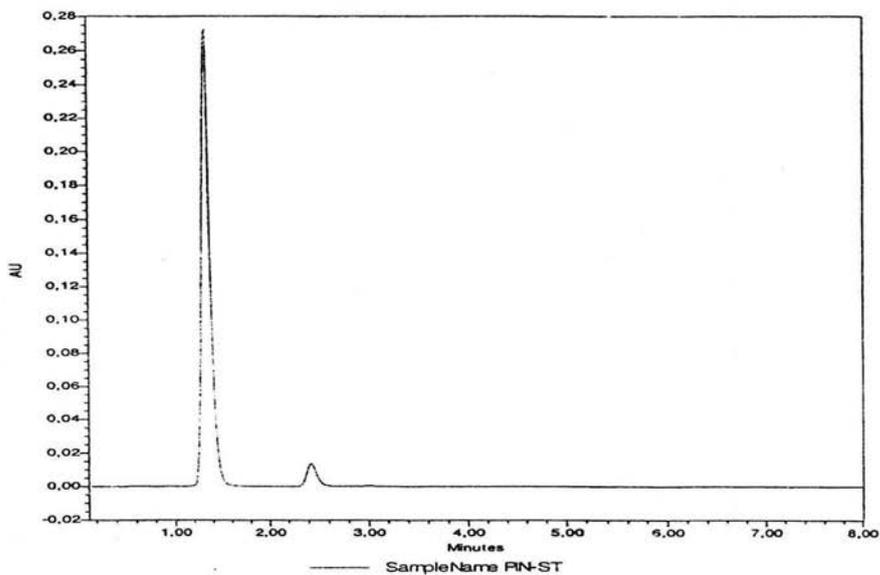
15. Análisis espectral de Piroxicam en gel tratado con NH₄OH



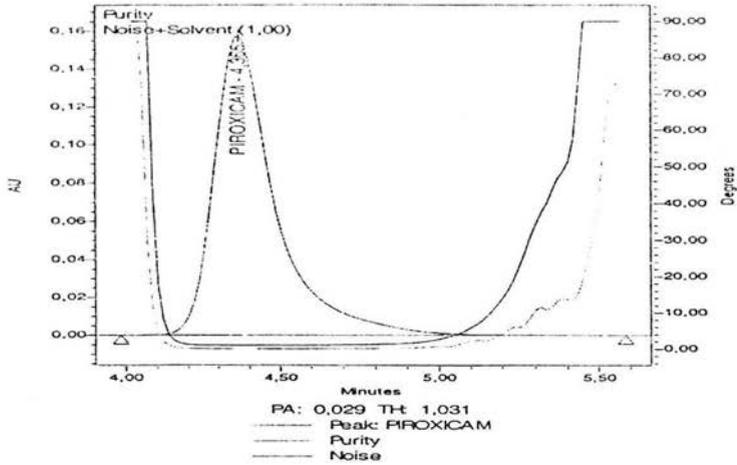
16. Cromatograma de Piroxicam en solución inyectable producto terminado



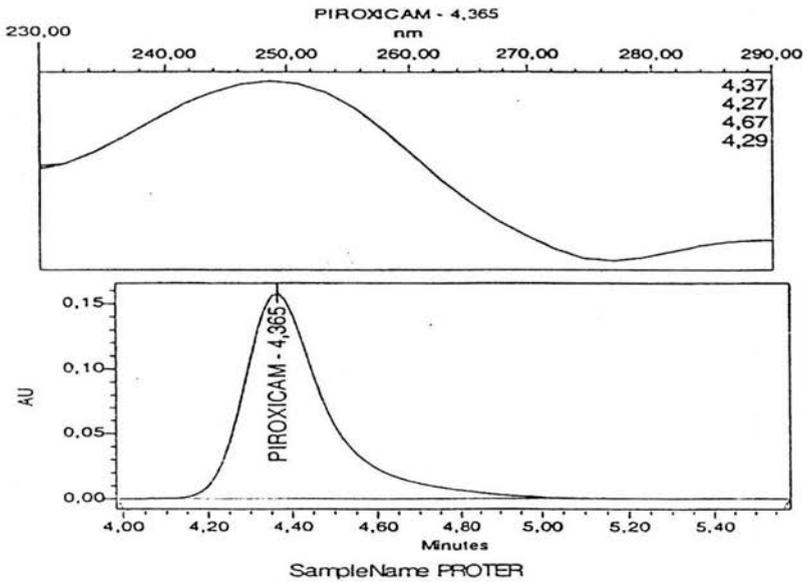
17. Cromatograma de placebo en solución inyectable



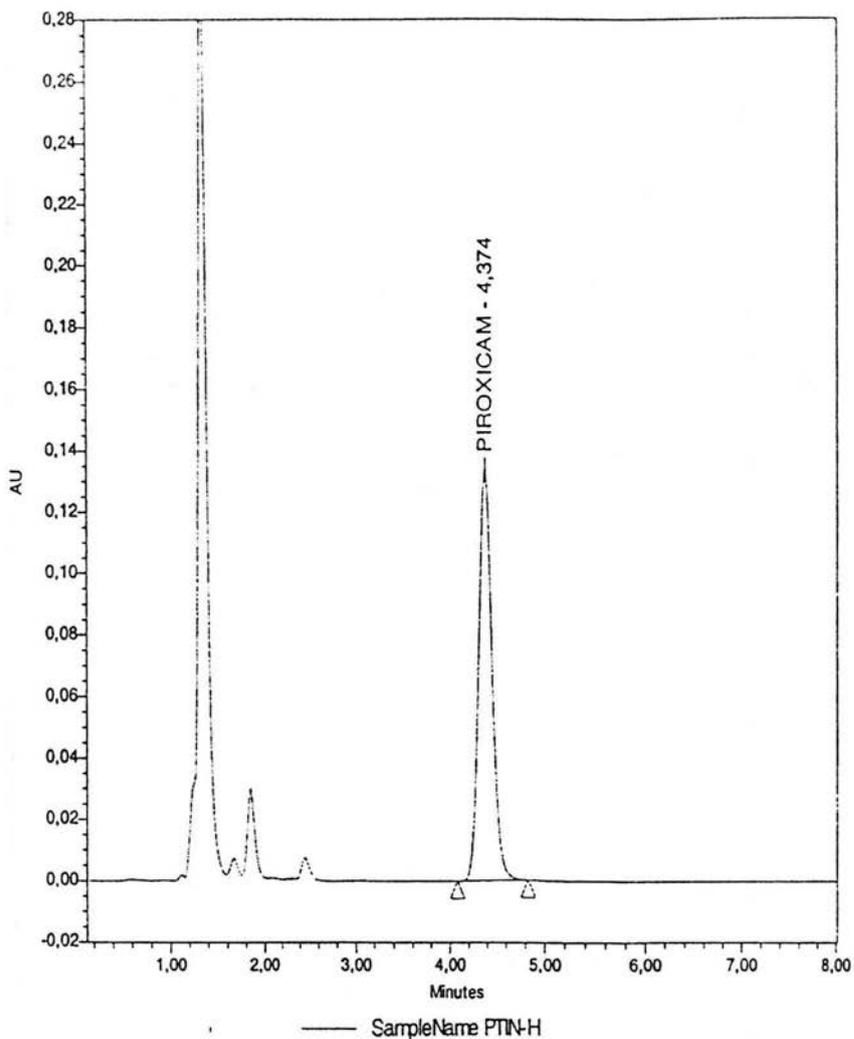
18. Análisis espectral de Piroxicam en solución Inyectable



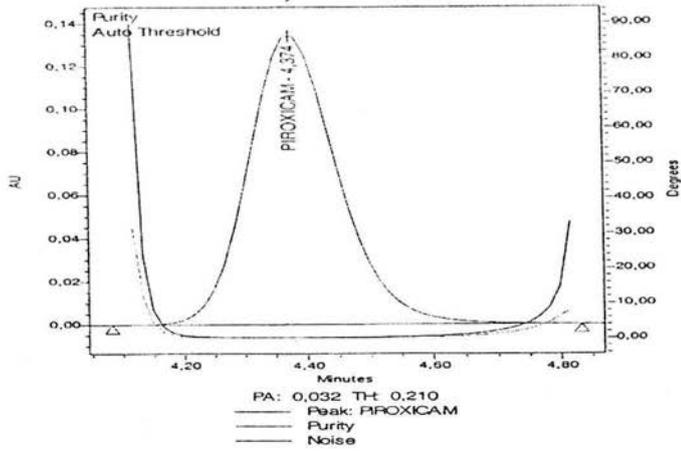
19. Análisis espectral de Piroxicam en solución inyectable



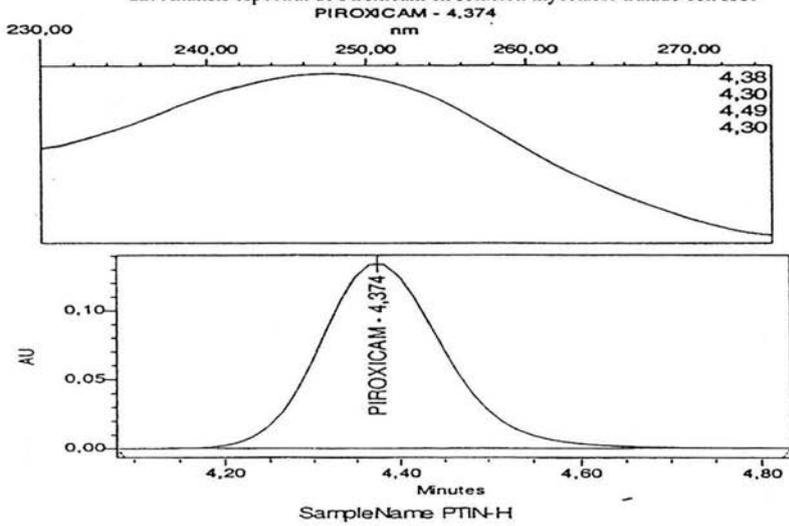
20. Cromatograma de piroxicam en solución inyectable tratado con HCL



21. Análisis espectral de Piroxicam en solución inyectable tratado con HCl



22. Análisis espectral de Piroxicam en solución inyectable tratado con HCl



7. BIBLIOGRAFÍA

1. - U.S. Pharmacopeia XXIV, ed. National Formulary 2002.
2. -Farmacopea de los E.U.M. 6ª Edición 2001.
- 3.-The Merck Index. 20th edición, 1997. Merk & Co; Inc. USA.
4. -VADEMECUM 2002, IPE, Versión digital 2002.
- 5.-Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 6ª edición 1990. Editorial Médica Panamericana.
- 6.-Harris C. Daniel. Análisis Químico Cuantitativo. 3ª Edición, 1991. Grupo Editorial Iberoamérica S.A. de C.V.
7. -LEACSA, S.A. de C.V. Curso de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia. Del 27 de agosto al 1º de septiembre de 1998.
- 8.-Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. Guía de Validación de Métodos Analíticos.2002
9. -Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C Curso Validación de métodos Analíticos, Instructor: QFB Amparo Chárbel Gáos; México D.F. 22 al 24 de Julio de 1999.
10. -WATERS. Validación de Métodos Analíticos por CLAR; México D.F, 8 diciembre del 2001.
- 11.-Colin F. Poole & Salwa K. Poole, Chromatography Today, Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, The Netherlands, 1992.
12. -NORMA Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-1993
- 13.-Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA-1993. Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica.
14. -Norma Oficial Mexicana NOM-164-SSA1-1998, Buenas prácticas de fabricación para fármacos.
15. -Validación de Métodos Analíticos por Cromatografía de Líquidos
PNO A 002-01 Nysco de México
16. -Cromatografía Líquida de Alta Resolución; Adrián García de Marina, Benito del Castillo, Editorial LIMUSA S:A. de C.V. México 1988.
17. -Cromatografía Líquida de Alta Presión; MacNair M. Harold y Benjamín Esquivel H; Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Segunda Edición actualizada 1980. Washington, D.C.
- 18.-Practical CLAR Method Development; Lloyd R. Snyder, Joseph L. Glajch & Joseph J. Kirkland. John Wiley & Sons 1988, Printed in the United States of America.

19.-Harlett Donald I. Introducción al Análisis Estadístico. Addison-Wesley Iberoamericana
pp 411-428 México (1987).