

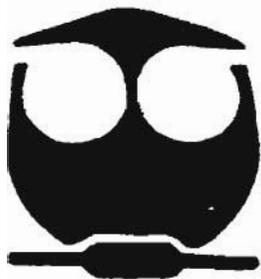


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

VALIDACION Y COMPARACION DE DOS METODOS
ANALITICOS PARA EVALUAR LA LIMPIEZA DE EQUIPOS
UTILIZADOS EN LA FABRICACION DE CAPSULAS
MULTIVITAMINICAS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
FERNANDO DANIEL DORANTES



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2005

0349851



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.

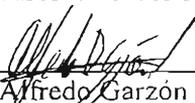
Jurado Asignado.

Presidente	Prof. Alfredo Garzón Serra
Vocal	Prof. Rosa Lorenia Mora-Tovar y Chávez
Secretario	Prof. Juan Manuel Rodríguez
Primer Suplente	Prof. Ma. de los Dolores Campos Echeverría
Segundo Suplente	Prof. Ma. de Lourdes Cervantes Ayala

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Control Analítico, Nysco de México, Calz Ermita Iztapalapa
No. 436 B, Col. Mexicaltzingo,

Asesor de Tesis



QFB. Alfredo Garzón Serra.

Supervisor Técnico de Tesis



QFB. Ma. Luisa Borbón Acosta.

Sustentante



Fernando Daniel Dorantes.

A mi madre.

Gracias a sus desvelos y sus sacrificios y a todas sus oraciones que hizo por mí y por hacerme ver que se tiene que seguir adelante a pesar de todo.

A mi padre.

Por sembrar esa semilla de superación y por enseñarme a que tengo que terminar todo lo que he empezado.

A mi hermana.

Por todo lo que eres y significas para mí, y porque es lo único y mas importante que tengo en mi vida.

A Nayeli.

Gracias por apoyarme, por dejarme conocerte y permanecer conmigo, por tu compañía y por todas las cosas que hemos compartido en la vida. Te quiero chaparra.

A mis amigos y compañeros.

Gracias a todas las personas que conocí a lo largo de este camino y su compañía, absolutamente todo se hace más simple. Gracias a todos.

A Nysco de México:

Al Q.F.B. Alfredo Garzón Serra Gracias y cada una de las personas que me enseñaron y colaboraron a que este sueño se vuelva realidad.

ÍNDICE

Página

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN.....	3
-------------------	---

CAPÍTULO 2

GENERALIDADES.

2.1. VITAMINAS.....	6
2.2. VALIDACIÓN.....	17
2.3. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).....	44
2.4. CARBONO ORGÁNICO TOTAL (TOC).....	66

CAPÍTULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

3.1. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.....	77
3.2. DETERMINACIÓN DE CARBONO ORGÁNICO TOTAL.....	108

Página

CAPÍTULO 4

ANÁLISIS DE RESULTADOS..... 133

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES..... 140

CAPÍTULO 6

BIBLIOGRAFÍA..... 142

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La validación de limpieza tiene sus orígenes en los años setenta en los Estados Unidos a través de las Buenas Prácticas de Fabricación (GMP'S). La limpieza de equipos es un requisito de las GMP (21 CFR 211.67). Estas prácticas, fueron introducidas a nuestro país por empresas transnacionales, sin embargo fue hasta la década de los ochenta, cuando el concepto de validación de limpieza se hizo presente en toda la industria farmacéutica.

La FDA ha sugerido la necesidad de contar con un método sistemático para probar la efectividad de los procedimientos de lavado, lo que ha dado lugar a muchas interrogantes en diferentes etapas del proceso, el desarrollo y validación del método analítico, la validación del procedimiento de limpieza, el establecimiento de los criterios mínimos de limpieza aceptables, la toma de la muestra en el equipo, etc. En la actualidad, no existe para la mayoría de los casos una metodología específica y lo suficientemente sensible para identificar y cuantificar los residuos de limpieza, que generalmente se encuentran a niveles de trazas.

La FDA y la Secretaría de Salud requieren que las compañías cuenten con procedimientos escritos en los cuales se detallen adecuadamente los pasos a seguir para garantizar la limpieza de las diferentes partes que conforma los equipos de producción y de acondicionamiento, tomando en cuenta el tipo de producto que se fabrica y algunas otras características de cada proceso en particular.

En los últimos años la industria farmacéutica se ha preocupado por mejorar la calidad de sus productos y entre otros aspectos se han implementado métodos por los cuales se verifica la forma en que se realiza la limpieza de los equipos. La sugerencia de la SSA para la industria farmacéutica en nuestro país, es que se cuente con métodos sistemáticos para aprobar la efectividad de los procedimientos de limpieza. Los métodos de TOC (determinación de carbono orgánico total) y HPLC (cromatografía de líquidos de alta resolución) permiten evaluar de dos formas muy diferentes la limpieza realizada a los equipos utilizados en la fabricación de medicamentos.

La técnica de TOC permite evaluar de forma general si el procedimiento de lavado es eficaz sin conocer el tipo de contaminante, mientras que por el método cromatográfico se pueden evaluar específicamente la sustancia química contaminante en el equipo después de su lavado.^{1,2,3,4}

En el presente trabajo se evaluará la limpieza de los equipos utilizados en fabricación de las cápsulas polivitamínicas por las técnicas de TOC y HPLC y posteriormente se realizará una comparación estadística con los resultados obtenidos durante la validación.

CAPÍTULO 2

VITAMINAS

Las vitaminas son sustancias orgánicas imprescindibles en los procesos metabólicos que tienen lugar en la nutrición de los seres vivos. Una vitamina es un compuesto orgánico necesario en pequeñas cantidades para el metabolismo corporal normal y que las células del cuerpo no pueden producir. Las vitaminas no aportan energía, son compuestos que son utilizados como combustible, ya que sin ellas el organismo no es capaz de aprovechar los elementos constructivos y energéticos suministrados por la alimentación.⁸

Las vitaminas deben aportarse a través de la alimentación, excepto la vitamina D que se puede formar en la piel por exposición al sol, y las vitaminas K, B₁, B₁₂ y ácido fólico, que se forman en pequeñas cantidades en la flora intestinal.⁸

Con una dieta equilibrada y abundante en productos frescos y naturales, se dispondrá de todas las vitaminas necesarias y no se requerirá ningún aporte adicional en forma de suplemento. Un aumento en las necesidades biológicas requiere un incremento de estas sustancias.

Las vitaminas son elementos esenciales en el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y lípidos al actuar como coenzimas. Las vitaminas son compuestos orgánicos no relacionados, que se requieren para el crecimiento normal y mantenimiento de las funciones metabólicas.⁸

Como el cuerpo es incapaz de sintetizarlas, se deben obtener de fuentes exógenas, sin embargo son básicas para la transformación de energía y regulación de procesos metabólicos.

Las vitaminas por sus características de solubilidad se clasifican en:

- Hidrosolubles. Son aquellas que se disuelven en el agua, por ejemplo: vitamina C y las que forman parte del complejo B
- Liposolubles. Se disuelven en aceites y grasas, como son: vitamina A, D, E y K

El Food and Nutrition Board of the National Research Council en Estados Unidos y en México la Secretaría de Salud, establecen las dosis diarias para cada una de ellas. Estas dosis representan cantidades que proporcionan nutrición adecuada en la mayoría de las personas.⁸

Producto de Interés.

El producto farmacéutico que nos ocupa, son cápsulas de gelatina dura con la siguiente formulación cualitativa:

Ácido ascórbico (vitamina C)

Clorhidrato de tiamina (vitamina B₁)

Riboflavina (vitamina B₂)

Nicotinamida

Pantotenato de calcio

Clorhidrato de piridoxina (vitamina B₆)

Excipiente, c.b.p. 1 cápsula.

Indicaciones terapéuticas:

Está indicado en la deficiencia de las vitaminas del complejo B y vitamina C, como sucede en el alcoholismo, lactancia, senilidad, regímenes de alimentación deficientes y neuropatías por deficiencia de vitaminas B.⁵

Contraindicaciones:

Hipersensibilidad a cualquiera de los componentes de la formulación.⁵

Precauciones o restricciones de uso durante el embarazo y la lactancia:

No existen restricciones de uso durante el embarazo y la lactancia.⁵

Reacciones secundarias y adversas:

La administración por vía oral de las vitaminas hidrosolubles rara vez produce reacciones adversas. con dosis altas se pueden presentar náuseas regurgitación con sabor a vitaminas, diarrea, constipación, salpullido cutáneo en personas susceptibles.⁵

Precauciones y restricciones de uso durante el embarazo e interacciones medicamentosas y de otro género:

Grandes dosis de vitamina C pueden interferir con el efecto anticoagulante de la warfarina. La piridoxina puede actuar como antagonista de la levodopa e interactúa con hidralazina, isoniazida, cicloserina y penicilamina.⁵

Alteraciones de prueba de laboratorio:

Grandes concentraciones de ácido ascórbico pueden afectar los resultados de la prueba húmeda para glucosuria usada por muchos diabéticos para regular la dosis de hipoglucemiantes. La prueba de Clinitest da falsamente positiva. Megadosis también pueden causar resultados falsos positivos cuando es usada la solución de Benedict como una prueba para glucosuria.⁵

Precauciones y relación con efectos de carcinogénesis, mutagénesis, teratogénesis y sobre la fertilidad:

En algunos casos, la vitamina C favorece la litiasis renal, no hay datos que indiquen efectos de carcinogénesis, mutagénesis, teratogénesis y efectos sobre la fertilidad.⁵

Dosis y vía de administración:

Oral. Una o dos cápsulas con cada alimento o de acuerdo a la prescripción medica.⁵

Sobredosificación o ingesta accidental:

Dada las características hidrosolubles de las vitaminas, la sobre dosis es rápidamente eliminada por vía urinaria y/o secreciones corporales. En el remoto caso de hipersensibilidad, debe de suspenderse la administración del medicamento.⁵

Recomendaciones para el almacenamiento y leyendas de protección:

Consérvese en un lugar fresco y seco. No se deje al alcance de los niños, su venta requiere receta médica.⁵

Farmacocinética y farmacodinámica en humanos:

Las vitaminas son esenciales en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos al actuar como coenzimas, Las cápsulas polivitamínicas, contiene vitaminas fácilmente absorbibles por vía oral, las cuales son utilizadas en las reacciones de anabolismo y catabolismo.⁵

Ácido ascórbico, Vitamina C

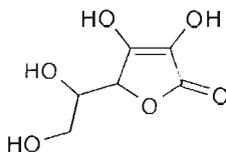


Figura 1. Estructura molecular del Ácido Ascórbico.

Propiedades fisicoquímicas:

Cristal o polvo blanco o ligeramente amarillo, inodoro, en estado seco es estable al aire, por exposición a la luz se descompone gradualmente y en solución se oxida rápidamente. Soluble fácilmente en agua, parcialmente soluble en alcohol, insoluble en cloroformo, éter y benceno, rotación óptica de + 20° a + 21.5°, punto de fusión de 190 °C - 192 °C, densidad 1.65 g/mL, longitud máxima de absorción 245 nm.^{6,7}

Actúa como un agente reductor y antioxidante. Es esencial para la síntesis de colágeno y material intracelular. Está involucrado en el metabolismo de la tirosina, conversión de ácido fólico en ácido folínico, metabolismo de carbohidratos, síntesis de lípidos y proteínas, metabolismo del hierro, resistencias a las infecciones y en la respiración celular. A diferencia de otros mamíferos, el hombre carece de la enzima necesaria para convertir el gluconato a vitamina C, por esta razón el ácido ascórbico se debe de suplir por vía exógena. El ácido ascórbico se absorbe rápidamente por tracto gastrointestinal y se distribuye ampliamente por todos los tejidos corporales. Las concentraciones plasmáticas normales son de 10 a 20 µg/mL. Se ha reportado que cerca de un 25%, se une a proteínas plasmáticas. La concentración es más alta en hígado, tejidos glandulares, ojos, leucocitos y plaquetas que en eritrocitos y plasma. Cuando hay deficiencia de Vitamina C, hay disminución en la concentración de leucocitos.⁸

El ácido ascórbico es reversiblemente oxidado a ácido dehidroascórbico; parte es metabolizado a ascorbato-2-sulfato, el cual es inactivo y al igual que el ácido oxálico son excretados por orina. Un exceso de ácido ascórbico es excretado por la orina rápidamente. El ácido ascórbico es capaz de atravesar por la placenta y acumularse en la leche materna.⁸

Clorhidrato de tiamina, vitamina B₁

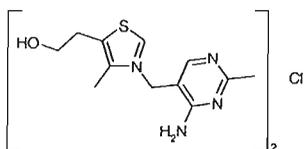


Figura 2. Estructura molecular del Clorhidrato de Tiamina.

Propiedades fisicoquímicas:

Cristales o polvo cristalino, fácilmente soluble en agua, soluble en glicerol, y ligeramente soluble en etanol, insoluble en cloroformo, éter y benceno, temperatura de fusión 248 °C, pH de una solución al 1%, 3.1.^{6,7}

Es una coenzima esencial en el metabolismo de carbohidratos que da lugar a la producción de energía, se combina con ATP en el hígado, riñones y leucocitos, para formar el pirofosfato de tiamina, también conocido como cocarboxilasa, coenzima que interviene en la descarboxilación de ácidos pirúvicos y alfa-cetoglutarico. La tiamina ejerce una acción antineurítica y desintoxicante del sistema nervioso e interviene en la síntesis del mediador neuronal acetilcolina. Es rápidamente absorbida en el intestino delgado por mecanismo de difusión y transporte activo. Se distribuye ampliamente en los tejidos y la concentración mas alta se encuentra en hígado, cerebro, riñón y corazón.⁸

La tiamina se metaboliza en el hígado y se han identificado varios metabolitos urinarios en el hombre, la excreción de la tiamina es mínima salvo en casos de sobredosificación.⁸

Riboflavina, vitamina B₂

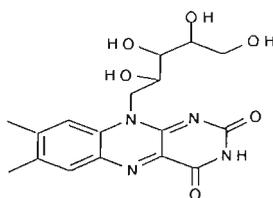


Figura 3. Estructura molecular de la Riboflavina.

Propiedades fisicoquímicas:

Polvo cristalino amarillo, higroscópico, muy poco soluble en agua, prácticamente insoluble en alcohol, acetona, muy soluble en soluciones alcalinas diluidas, rotación específica de + 37° a + 42°, pH de una solución saturada 5.0 - 6.5, máximo de absorción 560 nm.^{6,7}

Es una coenzima del flavin-adenin-dinucleotido (FAD), un importante elemento que participa en el sistema de transporte de electrones en la cadena respiratoria para la producción de energía. La riboflavina se absorbe rápidamente en el intestino, lugar donde es fosforilada; es convertida a flavin mononucleotido (FMN), mismo que se transforma en flavin-adenin-dinucleotido. Ambos ampliamente distribuidos en el organismo, incluyendo las células de la mucosa gastrointestinal, eritrocitos e hígado; se almacena en pequeñas cantidades en el hígado, bazo, riñón y corazón, principalmente en forma de FAD.⁸

En sangre se encuentra unida a proteínas en un 60%. El 9% es excretado sin cambios, mediante secreción tubular y filtración glomerular.⁸

Niacinamida

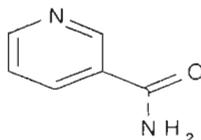


Figura 4. Estructura molecular de la Niacinamida

Propiedades fisicoquímicas:

Polvo blanco cristalino, fácilmente soluble en agua y en metanol, soluble en glicerina, significativamente soluble en eter y cloroformo, temperatura de fusión 128 °C a 131 °C, longitud máxima de absorción a 261 nm.^{6,7}

Es un componente del NAD y NADP, que participan como cofactores importantes en varias reacciones bioquímicas, como el transporte de electrones en la cadena respiratoria, glucólisis y síntesis de lípidos, se distribuye en tejidos corporales y en leche materna, es metabolizada en el hígado a N-metilniacinamida y ácido nicotínico, metabolitos que son excretados en la orina.⁸

Pantotenato de calcio

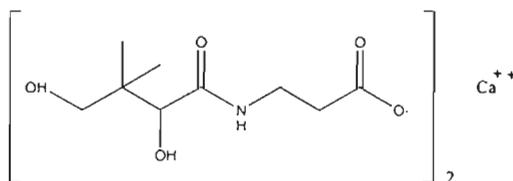


Figura 5. Estructura molecular del Pantotenato de Calcio.

Propiedades fisicoquímicas:

Polvo blanco, inodoro, de sabor amargo, higroscópico, soluble en agua, glicerol y parcialmente soluble en alcohol, cloroformo y éter.^{6,7}

Es derivado cálcico del ácido pantoténico, vitamina hidrosoluble del complejo B, es precursor de la coenzima A y es esencial en el metabolismo intermediario de lípidos, carbohidratos y proteínas, es rápidamente absorbido en el tracto gastrointestinal y sus concentraciones plasmática son 100 µg/mL; se distribuye ampliamente en tejidos como coenzima A. Las concentraciones más altas se localizan en hígado, glándulas adrenales, corazón y riñones; el 70% es excretado sin cambios en la orina y el 30% en heces.⁸

Piridoxina clorhidrato, vitamina B₆

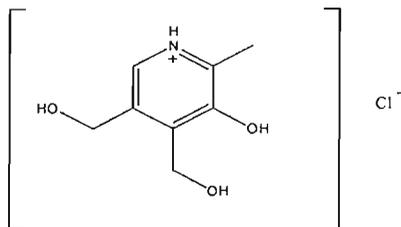


Figura 6. Estructura molecular de Piridoxina Clorhidrato.

Propiedades fisicoquímicas:

Polvo blanco cristalino o casi blanco, estable en el aire seco, se descompone lentamente en la luz, soluble en agua y ligeramente soluble en etanol, casi insoluble en éter, pH de una solución al 10 %, 2.4-3.0, absorción máxima en una solución al 0.1 N de HCl, 290 nm.^{6,7}

Interviene como coenzima en diversas reacciones del metabolismo de vitaminas y aminoácidos, así como en el metabolismo de carbohidratos y lípidos. En el metabolismo proteico, participa en la descarboxilación de los aminoácidos, conversión del triptofano a niacina o a serotonina, desaminación, transaminación y transulfuración de aminoácidos. En el metabolismo de carbohidratos es responsable de la ruptura del glucógeno a glucosa 1-fosfato.⁸

La vitamina B6 regulariza el metabolismo de los ácidos glutámico y gamaaminobutírico que son importantes en el funcionamiento cerebral. Se absorbe bien en el tracto digestivo, las concentraciones séricas son 30 – 80 ng/mL. Se almacena principalmente en hígado y en menor proporción en músculo y cerebro. Atraviesa la placenta y la concentración plasmática en el feto es 5 veces mayor que la concentración materna. La piridoxina es convertida a fosfato de piridoxal en los eritrocitos.⁸

En hígado la piridoxina es fosforilada a fosfato de piridoxina y transaminada a piridoxal y piridoxamina, los cuales son rápidamente fosforilados. Las formas principales de la vitamina en sangre son piridoxal y fosfato de piridoxal.⁸

VALIDACIÓN

Día a día surgen nuevos instrumentos y equipos más eficientes, los cuales requieren de alto grado de supervisión y que sustituyen a maquinarias muy voluminosas, generalmente de operación manual. El proceso de fabricación de un producto debe de ser reproducido lo más fielmente lote tras lote, por lo que es imprescindible operar y controlar a cada equipo de tal forma que efectúe de manera óptima el trabajo para el cual fue diseñado.

La comprobación, verificación y documentación de la efectividad y reproducibilidad de una técnica, una operación o un proceso se ha llamado validación. Con el desarrollo de una validación se debe identificar todas las variables potenciales en el proceso que afecten la calidad de un producto farmacéutico.^{9,10}

Las razones por las cuales se debe de validar un proceso son los siguientes:

- Reducción de costos.
- Reducción de rechazos y reprocesos.
- Menos quejas en el proceso
- Reducción de pruebas en proceso y en producto terminado
- Fácil mantenimiento del equipo
- Automatización mas rápida.

Finalmente una razón más para validar un proceso, es que como resultado de ésta, se va asegurar la calidad de un producto y el producto será operado dentro de los límites previamente establecidos.⁹

La **validación** es la prueba documentada de que un proceso de manufactura, un proceso de limpieza o un método analítico, produce consistentemente resultados que cumplen con los criterios de aceptación predeterminados.^{10,11}

Cuando se pretende realizar una validación de proceso, se debe primeramente pensar en formular procedimientos que cumplan con las GMP's, los cuales nos ayudan a verificar que la operación básica de fabricación se encuentra validada.⁹

Se puede clasificar a las validaciones de procesos en tres tipos, estas son:

- Validación retrospectiva
- Validación prospectiva.
- Validación concurrente

La **validación retrospectiva** es la evidencia documentada basada en datos acumulados de producción y control que demuestran que el producto ya está siendo fabricado bajo condiciones controladas.^{9,10,11}

La **validación prospectiva** es la evidencia documentada generada desde el desarrollo del producto hasta la producción industrial. Esta validación es aplicable a nuevos productos, reformulaciones o cambios de equipo en el proceso.^{9,10,11}

La **validación concurrente** es aplicable sólo a procesos que están bajo control, con el solo análisis de muestras representativas en diferentes etapas; este tipo de validación tiene lugar cuando se escala un proceso, en un reprocesamiento de lotes y en un proceso continuo.^{9,10,11}

Sin embargo, una vez realizado los procesos de fabricación de medicamentos, debemos asegurarnos que tanto las áreas y equipos utilizados deben limpiarse, mantenerse y sanitizarse a intervalos apropiados. para evitar un mal funcionamiento o contaminación que pudiera alterar la seguridad, identidad, potencia, calidad o pureza de un producto farmacéutico.

Antes de la emisión de la Guía para la inspección de la validación del proceso de limpieza, la industria farmacéutica no le daba la importancia que se debía a los procesos de limpieza, sin embargo las autoridades sanitarias actualmente se han enfocado en un nuevo tipo de validación, la validación de limpieza y aunque en este momento todavía no es adaptada por el total de la industria farmacéutica, éste es un requisito de las Buenas Prácticas de Fabricación, por lo que se tiene que llevar a cabo.

Validación de Limpieza

La **validación de limpieza**, es el proceso por el cual se establece la evidencia documentada de que un proceso, en particular de limpieza, va a reducir los residuos de la superficie del equipo hasta un nivel predeterminado como aceptable.^{2,9,12}

Antes de continuar definiremos la palabra **residuo**, se refiere a cualquier producto intermediario, excipiente, agente de limpieza, el cual pueda encontrarse en la superficie de cualquier equipo seguido de un proceso de fabricación.^{2,9,12}

Un proceso de limpieza eficiente disminuye o no permite que los contaminantes se acumulen hasta ciertos niveles que lleguen a interferir con el proceso de fabricación de un producto, particularmente para aquellos equipos utilizados en la fabricación de más de un producto. Las validaciones de limpieza son muy importantes ya que de esta forma se asegura que todos los equipos que tienen un contacto directo con el producto durante su manufactura, se deben de limpiar adecuadamente para asegurar que los residuos que queden en la superficie no excedan los criterios de limpieza predeterminados.

Cuando se pretende realizar una validación de limpieza, se deben de considerar una serie de factores como son: detergente de limpieza, solvente a emplear, éste no debe de ser constituyente del siguiente producto a fabricar, conocer la formulación, toxicidad de las materias primas utilizadas en la formulación y lo más importante, la capacidad del método para identificar los residuos, ya sea de activo o de el agente limpiador.^{2,9,12}

Parámetros de limpieza.

Con el objeto de facilitar el proceso de limpieza, debemos de seleccionar las condiciones de concentración, tiempo, temperatura, de tal manera que permitan la eficiencia del trabajo al menor costo; cada una de estas variables se selecciona de acuerdo al método de limpieza utilizado y al tipo de suciedad o manchas a remover, de esta forma, se puede variar independientemente hasta ajustar la operación de la limpieza.

La evaluación y control de cada uno de los parámetros que a continuación se describen son esenciales para asegurar la eficiencia del método de limpieza.¹²

- **Factor térmico.** Se refiere a la temperatura del agente de limpieza a la cual se favorece la remoción de los residuos, el aumento de la temperatura ocasiona que el enlace entre la mancha y el lugar en el que está adherida disminuya e incrementa la solubilidad facilitando de esta forma el proceso de limpieza. Pero al aumentar demasiado la temperatura se puede provocar que los residuos se fijen a la superficie del equipo disminuyendo la eficiencia del lavado.
- **Factor Mecánico.** Se refiere al proceso de limpieza en el que se incrementa la acción mecánica sobre la suciedad. Este factor se debe principalmente al cepillado o al choque de partículas de agua por un sistema de alta presión.

- **Factor Químico.** Los agentes de limpieza son detergentes (tensoactivos) o solventes compuestos por una mezcla de surfactantes, secuestrantes y reguladores de pH, logrando la remoción de los residuos. Los solventes son generalmente utilizados para extraer algo que no se quita con el detergente o para sanitizar.
- **Tiempo.** El agente de limpieza debe dejarse actuar durante el tiempo necesario para que logre ejercer su acción, entre mayor sea el tiempo, se va a lograr remover una mayor cantidad de residuo, sin embargo, a un tiempo determinado aunque se prolongue el tiempo, ya no va aumentar la cantidad eliminada de manera significativa, por lo que es importante establecer la relación tiempo secuencia

Muchas industrias empiezan a adoptar estrategias que de acuerdo a sus necesidades individuales establecen límites de aceptación de residuos químicos, detergentes y principios activos para cada proceso de limpieza.

Técnicas de limpieza.

Existen varios tipos de técnicas de limpieza, sin embargo es importante hacer notar que para fines de validación de limpieza, no existe una diferencia fundamental entre ellas ni una superioridad de una con respecto a otra, sólo importa que el método de limpieza seleccionado debe demostrar que se producen consistentemente los niveles deseados de limpieza; a continuación se muestra una clasificación de las técnicas de limpieza, aunque cabe señalar que no es una clasificación formal.¹³

- **Por el sistema empleado**

- **Automatizada.** Actualmente existen procedimientos de limpieza automatizados, los cuales son más fáciles de validar y generalmente proporcionan mejor reproducibilidad.
- **Manual.** La limpieza manual es todavía la técnica empleada, sin embargo su principal desventaja es la variabilidad en la eficiencia de la limpieza, que depende totalmente de la motivación y disciplina del operador que la realice.

- **Por el lugar en que se realiza**

- **Limpieza Fuera del Sitio (COP = Clean Out of Place).** Se refiere a la limpieza de partes desarmadas del equipo, se realiza en un tanque especial de lavado donde el agua y la solución de limpieza son recirculadas por una bomba centrífuga a través de la salida y entrada del tanque. Esta técnica se utiliza principalmente para partes de equipo que no pueden limpiarse armadas.
- **Limpieza en el Sitio (CIP = Clean In Place).** Es la limpieza de un equipo por recirculación controlada de agua, soluciones de limpieza o soluciones desinfectantes, sin desarmar el equipo; estos sistemas están diseñados para permitir que las soluciones de limpieza entren en contacto íntimo con las superficies sucias y además que en este contacto se continúe cuanto sea necesario. Esto implica que un alto volumen de solución sea aplicado a las superficies sucias durante tiempos que varían entre 5 minutos y una hora.

- **Dependiendo de lo que se fabrique**
 - **Seriadas.** Es la que se realiza cuando una serie de lotes del mismo producto son fabricados consecutivamente, manufacturado en un periodo de no más de una semana. En ellos no se requiere de una limpieza profunda y generalmente se requiere que el equipo sea lavado y enjuagado con agua purificada. Estas medidas dejan esencialmente libre de cualquier producto visible.
 - **No seriadas.** Es aquella que se usa periódicamente al final de una serie de lotes que dejan un nivel específico de residuos o en el cambio de producto a fabricar en ese equipo, este tipo de limpieza es más riguroso.

Ciclo de Limpieza.

Los pasos para llevar a cabo un ciclo de limpieza van a variar de acuerdo al producto y equipo a lavar, sin embargo en forma general, los ciclos de limpieza serían los siguientes:¹⁴

- **Desarmado del equipo, (si es necesario).** Muchos equipos o instalaciones requieren de ser desarmados para facilitar su limpieza.
- **Pre-lavado.** Ésta es una de las etapas más importantes y es la que depende del operador. El propósito de esta etapa es el eliminar los materiales residuales de gran tamaño. En esta etapa se realiza un lavado ligero con agua caliente (>65°C) para remover los residuos de gran tamaño.

- **Lavado.** En esta etapa se incluye el lavado de cada pieza en particular y para ello se requiere de agentes químicos como son los detergentes, los cuales deben tener bien definidas sus concentraciones para poder ser utilizados. La función del lavado es la remoción de residuos.
- **Enjuague inicial.** En este paso generalmente se disuelven la mayoría de los residuos materiales. Para el enjuague inicial es preferible el uso de agua purificada, agua destilada o agua para inyección, sin embargo el uso de agua potable es válido siempre y cuando se demuestre que ésta es suficiente para obtener buenos resultados, también en esta parte del proceso, es importante tomar en cuenta la temperatura del agua a utilizar (>65°C), por lo que es necesario especificar claramente esta situación.
- **Lavado intermedio.** Se realiza un lavado con agua caliente del tanque de recuperación y posteriormente se hace otro lavado con agua caliente (>65°C) del tanque de agua fresca, para con ello remover los residuos del primer lavado.
- **Enjuague final.** Se lleva acabo un enjuague con agua grado inyectable caliente y la finalidad de éste es remover los residuos de detergente o desinfectante, así como un lavado de seguridad cuando la supuesta limpieza después del lavado intermedio no se ha obtenido.
- **Desinfección.** Se realiza con solución desinfectante; sin embargo, ésta puede ser opcional ya que en el caso de que no exista contaminación microbiana durante la limpieza, la desinfección es innecesaria, así mismo, la desinfección involucra una contaminación del sistema por la introducción del desinfectante y su uso continuo puede promover la resistencia microbiana.

- **Secado.** Empleando vacío y calor latente del equipo después del enjuague final con agua caliente, o con aire comprimido caliente se evaporan los restos de agua.
- **Rearmado. (si es necesario).** Las instrucciones y orden del rearmado deben de incluirse en el procedimiento de limpieza.

Calidad del agua de enjuague y lavado

La calidad del agua está directamente relacionada con el uso para el que esté destinada y se da en función de los componentes orgánicos, inorgánicos y microbiológicos. Los enjuagues finales deben de ser siempre con agua purificada. Uno de los factores más importantes para efectos de limpieza, es la dureza. La dureza de las aguas son responsables del consumo excesivo de jabones y detergentes y de la formación de películas y de precipitados indeseables, además provoca la formación de depósitos en la superficie del equipo.

Volumen de enjuague y lavado.

Es esencial establecer un volumen, ya que podemos estar aplicando una cantidad inadecuada de volumen de enjuague y lavado que puede llegar a ser innecesario, o bien puede o no enjuagarlo o limpiarlo completamente.

Elementos para llevar a cabo una validación de limpieza.

Protocolo de validación.

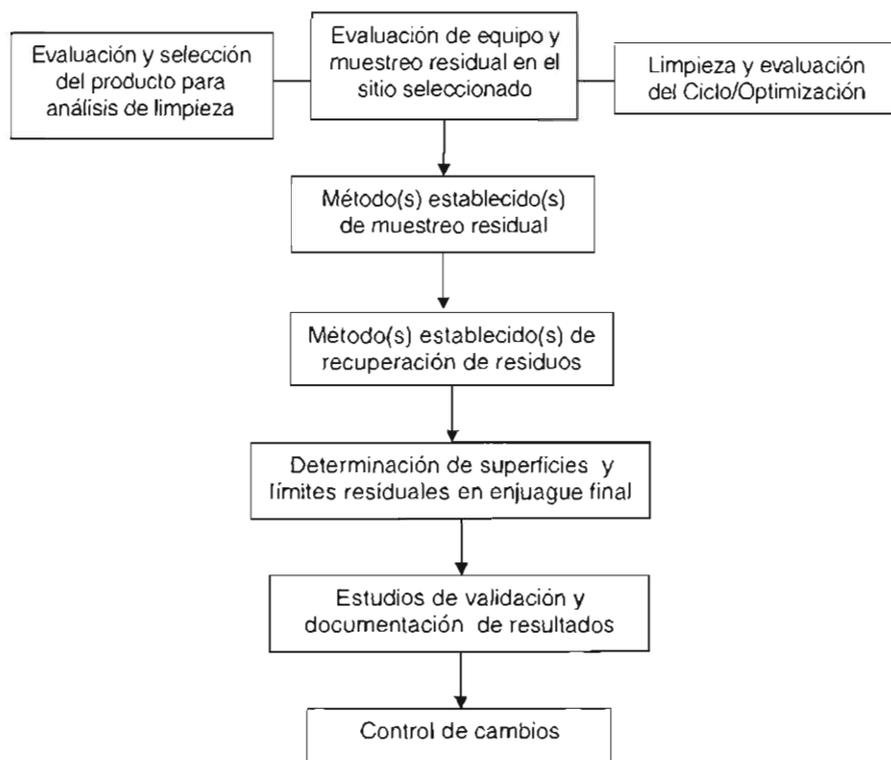
La validación del proceso de limpieza asegura que los procedimientos de limpieza de equipo eliminan residuos a niveles previamente determinados como aceptables. Como mínimo, el protocolo de validación de limpieza debe de contener datos como métodos de muestreo y límite máximo de residuos permisibles, es por ésto que un protocolo de validación es un documento importante debido a que es la clave para llevar a cabo el proceso de validación de limpieza.¹⁵

Un protocolo de validación de limpieza, debe de indicar lo siguiente:

- Identificación y presentación
- Objetivo
- Características del equipo
- Descripción del procedimiento de limpieza del equipo
- Plan de muestreo del equipo
- Método de muestreo y recuperación de trazas de detergente, sanitizante y activo
- Método de análisis de residuos de detergente, sanitizante y activo
- Criterios de aceptación para trazas de detergente, sanitizante y activo
- Información adicional
- Bibliografía
- Cambios

El protocolo de validación deberá de ser aprobado antes de su ejecución y el proceso de validación contemplar los pasos que se muestran en el siguiente diagrama de flujo:

Figura 7. Diagrama de flujo del proceso de validación de limpieza de un equipo



Procedimientos normalizados de operación para limpieza de equipos

Dentro de la validación de limpieza de un equipo, un elemento esencial es el desarrollo de un procedimiento de limpieza del equipo. Éste deberá ser específico para cada equipo y describir cada parte del equipo; además deberá ser claro y conciso de manera que sea posible capacitar a los operarios del área a la que corresponda el equipo para que cumplan con el procedimiento al 100% y la limpieza pueda ser reproducible.¹⁵

El objetivo del procedimiento indicará los pasos a seguir para realizar la limpieza del equipo para que éstos no representen una fuente de contaminación para los productos que se manejen en él.

En el procedimiento se deberán especificar puntos como son:

- Los materiales y equipos
- El equipo de seguridad
- La periodicidad de la limpieza
- El tiempo de cada paso
- El volumen y la temperatura del agua a emplear así como el tipo de agua
- Los criterios de aceptación
- Las acciones correctivas

Evaluación y selección del producto para análisis de limpieza (Peor de los casos)

La validación de limpieza de equipos debe comenzar con la evaluación de los productos fabricados. Cuando en un equipo se fabrican diferentes productos, resulta más práctico limitar la cantidad de análisis a realizar, ya que el evaluar cada uno de los productos fabricados en cada equipo resultaría muy caro para la empresa. Es por eso que se emplea la situación de “el peor caso”.^{15,16}

Para ello se evalúan todos los productos, intermediarios y excipientes según su toxicidad, potencia y solubilidad y/o reactividad química con el agente de limpieza o sistema de solventes utilizados. También es importante hacer una revisión histórica acerca de cuál es el producto de mayor dificultad para limpiar y en que parte del equipo es donde se retiene más.

En la mayoría de los casos, se establece una matriz de los residuos potenciales asociados con un proceso. Lo ideal es que sólo se seleccione un peor caso, sin embargo, es muy probable que se requiera evaluar una serie de residuos. Por ejemplo, cuando un producto es el más difícil de limpiar según la experiencia del operador, éste puede que no sea el más tóxico. En estos casos es prudente verificar la efectividad del proceso de limpieza tanto en el producto más tóxico como en el más difícil de limpiar basado en la experiencia. Finalmente se deben documentar las razones por las cuales se está determinado el producto en el programa de validación.^{15,16}

La selección del peor caso para el equipo se va a basar en la toxicidad del principio activo, el ciclo de limpieza, los productos fabricados en el equipo, la solubilidad del principio activo.

Toxicidad del principio activo

La toxicidad de cualquier principio activo que se emplea para ser usado en la fabricación de una forma farmacéutica final, se expresa como la Dosis Diaria Aceptable (ADI). La ADI es definida como la cantidad de miligramos de fármaco a los que una persona puede ser expuesta por un período de 8 h. sin presentar ninguna respuesta farmacológica.¹²

Solubilidad del principio activo

El valor de solubilidad se emplea para determinar el peor caso en ciclos basados en agua/solvente. Cuando dos productos presentan el mismo valor de solubilidad, entonces se selecciona aquel que presente el valor de límite residual aceptable más bajo.¹²

Selección de sitios de muestreo

Siguiendo la evaluación del producto por un equipo, la evaluación comienza con la identificación de las superficies de contacto del producto con cada pieza del equipo, además de todos los componentes auxiliares, los cuales pueden ser difíciles de limpiar o pueden absorber producto o el agente de limpieza.¹⁷

Se debe de establecer durante la limpieza del equipo cómo se van a evaluar todos estos componentes auxiliares, ya que si comparamos el área superficial de contacto de estos componentes no es igual a el área total del equipo que tiene contacto con el producto, el área de los componentes auxiliares se considera insignificante y con sólo considerar una inspección visual o por enjuague es más que suficiente.¹⁷

Limpiador y evaluación del ciclo de limpieza

El siguiente paso en la validación de limpieza es la evaluación de los diferentes agentes de limpieza utilizados, esta evaluación debe de incluir las diferencias en:^{12,16}

- Agente de limpieza y solventes
- Concentración de los diferentes agentes de limpieza
- Tipo de ciclo de lavado
- Temperatura y presión requerida para la limpieza del equipo.
- Número de enjuagues o ciclos de lavado
- Establecimiento del área de superficie de contacto del equipo con el producto a ser muestreada
- Tiempo transcurrido desde la última vez que se utilizó el equipo

Todos los agentes de limpieza deben ser evaluados, considerando ciertas características, como su capacidad de enjuague (fácilmente soluble), buen emulsificante de grasas, tener capacidad de destruir microorganismos, así mismo se debe considerar la seguridad del personal al manejar el agente de limpieza (no corrosivo), el impacto ambiental (biodegradable) y su costo. Para los equipos utilizados en la manufactura de un producto, los procedimientos posteriores a la limpieza y almacenamiento del equipo deben de ser analizados para asegurar que éstos no crean condiciones apropiadas para la proliferación microbiana.^{12,16}

Así, la validación de limpieza tiene por objetivo principal reducir la variabilidad del ciclo de limpieza, eliminar residuos de activo, excipientes, detergentes o alguna otra sustancia que contaminan un producto y puedan causar efectos indeseables en los pacientes.^{12,16}

Para una buena evaluación de los procesos de limpieza, no sólo se consideran todos los accesorios, equipos de fabricación y áreas que tienen contacto directo con el producto y/o sus componentes; sino que los químicos encargados de la validación de limpieza deben también de considerar varios puntos, como son:

- Los procesos de fabricación.
- La formulación de la forma farmacéutica.
- Diseño del equipo. En donde se debe de considerar el desarmado, la forma de limpiarlo y el rearmado.
- Los procesos asépticos y no asépticos.
- Las diferentes áreas de fabricación: inyectables, líquidos, semi-sólidos, etc.
- La granulación de un producto.

Es indispensable que lo anterior sea evaluado por los químicos encargados de la validación de limpieza para cumplir con el objetivo principal de establecer y validar los procesos de limpieza y de esta forma asegurar que el siguiente producto fabricado no esté contaminado por cualquier fuente, ya sea microbiológica o química.¹⁰

En un programa de validación, tanto de limpieza como de proceso, los resultados obtenidos deben de registrarse adecuadamente (documentarse) y cada uno evaluarse estadísticamente.

Establecimiento de los Criterios de limpieza.

Como se ha mencionado, antes de demostrar la efectividad de un procedimiento de limpieza, es necesario definir hasta qué valor es posible detectar compuestos químicos a niveles muy bajos. La limpieza del equipo utilizado en la fabricación puede requerir de un gran esfuerzo de grupo y probablemente necesitar del uso de equipo exclusivo para cada producto.

Tomando en cuenta que existen relativamente pocos productos que contienen solo un principio activo y que pueden encontrarse otros residuos tales como el detergente, productos de degradación del principio activo y excipientes, es importante saber qué tipo de compuesto será monitoreado para saber establecer cuál será la efectividad de la limpieza. Para ello se mencionan los siguientes criterios:¹³

- **Todos los productos.** Para este tipo de validación se hace el supuesto de considerar a todos los productos e identificando el peor caso en cada una de las piezas del equipo.
- **El menos soluble.** Es frecuente utilizar el criterio para la selección del peor caso a aquellos productos que contienen ingredientes activos esencialmente solubles.
- **El más potente.** Un factor muy importante en la selección del peor de los casos, es considerar los productos más potentes.

- **El menos soluble y el más potente.** Se refiere a que tienen que escogerse entre los menos solubles y más potentes, algunas empresas han decidido examinar ambos tipos como el producto peor caso como parte de su esfuerzo de validación.
- **El más difícil de limpiar.** Es una selección basada en la experiencia operativa con las diversas formulaciones. Estos productos pueden ser virtud de una formulación o método de manufactura que son más difíciles de limpiar basados sobre algún criterio.
- **Nuevos productos.** La validación de procedimientos de limpieza para nuevos productos parece ser un requerimiento de FDA con respecto al criterio utilizado para la existencia del producto.

Selección de límites

El aspecto más difícil en la validación de limpieza, es la selección del límite. Los razonamientos actuales en esta área han producido el acercamiento entre las industrias y el médico. A continuación se enlistan algunos criterios para seleccionar el límite:¹³

- **Deducción médica.** Los límites pueden ser basados en una evaluación médica del material en cuestión y una estimación de la concentración a la cual puede ocurrir una acción farmacológica o tóxica.
- **Factor de Seguridad Arbitrario.** Este factor puede ser utilizado en conjunto con la opinión médica para lograr una especificación interna.

- **Fuentes analíticas.** Se ve involucrada la habilidad de los químicos para desarrollar los métodos analíticos necesarios para los niveles de contaminación potencial.
- **Limpieza seriada versus no seriada.** Algunas empresas tienen adoptados criterios de aceptación poco estrictos donde la pieza del equipo será utilizada para la producción de uno o más lotes de producto usando el mismo material.

Establecimiento de los límites.

Para demostrar lo difícil que es elegir los límites de limpieza, se pueden considerar los siguientes criterios:^{9,13,18}

1. Criterio de limpieza visual. Los niveles residuales tolerables por medio de una observación visual de limpieza se han detectado cuantitativamente en un análisis posterior, resultando satisfactorio este criterio. Sin embargo, para sustancias extremadamente tóxicas debe tenerse sumo cuidado.
2. Aquel que para establecer los límites asume que los residuos serán diluidos, antes de poder detectarlos, por las subsecuentes manufacturas de productos en el mismo equipo
3. Se considera como un criterio cuantitativo, se establece en colaboración con autoridades médicas y toxicológicas la dosis mas baja a la cual son esperados los efectos terapéuticos y tóxicos por la introducción de material residual, ésto sobre una base crónica o aguda además también hace suposiciones de un factor de seguridad apropiado.

Este criterio es uno de las más importantes, del cual se derivan los siguientes límites:

Porcentaje de la dosis mínima terapéutica. Este método siempre utiliza la opinión médica como un factor de seguridad arbitrario al establecer el límite. El factor de seguridad es generalmente en el rango de 0.01 % de la dosis mínima terapéutica. Los factores de seguridad altos son utilizados para limpiezas consecutivas de diferentes lotes con el mismo ingrediente activo

Porcentaje de la dosis tóxica. Esta aproximación siempre emplea la opinión médica con un factor de seguridad arbitrario al establecer el límite. El factor de seguridad es generalmente mayor al seleccionado por la dosis mínima terapéutica. Este tipo de criterios es utilizado para no activos tales como detergentes, sanitizantes, materiales de degradación, etc. Para ingredientes activos podría ser el primer valor del cual se tenga conocimiento.

Porcentaje de la dosis mínima etiquetada. Esta práctica emplea una decisión de ventas en conjunto con un factor de seguridad arbitrario para el establecimiento del límite. Este factor de seguridad tiene un rango de 0.01 % de la dosis mínima etiquetada.

Cantidad no detectable. Es un límite asociado con el procedimiento analítico específico. Sin correlación con la actividad terapéutica o tóxicológica este tipo de límites puede comenzar a ser problemático.

Para marcar los límites sobre lo que se considera como limpio deben de tomarse en cuenta que:⁹

- Los límites propuestos deben de ser prácticos y factibles para el procedimiento de limpieza del equipo
- Los límites deben de ser considerados seguros y aceptables
- Los criterios deben de ser verificables por la metodología analítica propuesta
- El tamaño del lote, dosificación toxicología y tamaño del equipo

Después de haber establecido la forma de calcular los criterios límites para cada uno de los equipos utilizados para fabricación de las cápsulas polivitamínicas, el siguiente paso es determinar la forma en que se debe realizar el muestreo de los equipos.

Métodos de Muestreo

Existen tres formas diferentes de realizar el muestreo a los equipos de producción, después de que un procedimiento de limpieza se ha efectuado, a continuación se mencionan:^{19,20,21,22}

a) Muestreo con hisopo o por raspado en superficie:

Las muestras son tomadas al azar en una área definida que esté en contacto con el producto. Los hisopos utilizados para este fin deben de tener la característica de estar preparados con materiales inertes que no generen interferencias.

b) Muestreo por enjuague:

Involucra el uso de un volumen conocido de agua para enjuagar el área de contacto del equipo y posterior determinación de la cantidad de residuos en la muestra de agua. Una de las ventajas de este método es que se puede llegar a aquellas partes difíciles de limpiar y de muestrear, ya que si se realiza correctamente, proporciona datos de la superficie total del equipo. La única desventaja es que se debe de estar presente en la última etapa del proceso y que el volumen con el que se realiza el enjuague debe ser siempre el mismo.

c) Arrastre con placebos:

Puede realizarse procesando un lote placebo a través del equipo y analizando el placebo para el contaminante. Este método no es muy aceptado ya que no puede asegurarse que el contaminante esté distribuido uniformemente a través del sistema. Además entre las desventajas que tiene este método, es que el placebo tiende a diluir al contaminante a un punto difícil de detectar.

Métodos analíticos

Un punto clave en la validación de limpieza son los métodos analíticos para detectar y/o identificar los residuos. No existe una metodología única, sin embargo todas buscan establecer mediante estudios de laboratorio que un método proporcione datos confiables de acuerdo al propósito para el que se le emplea, es por eso que existe una estrecha relación entre los límites de residuo aceptados y el método de ensayo empleado para verificar la limpieza de un equipo.

El método de análisis para estas muestras no necesita ser indicador de estabilidad, pero debe de ser capaz de detectar el fármaco, los métodos de mayor uso son:¹²

- **Cromatografía de Líquidos Alta Resolución (HPLC).** Por este método se usan adaptaciones de análisis de producto o métodos más sensitivos a una baja cantidad del material que probablemente este presente después de la limpieza. El utilizar HPLC nos permite detectar pequeñas cantidades, sin embargo este método resulta ser muy costoso.
- **Técnica de Carbono Orgánico Total (TOC).** Es un método relativamente nuevo, y es muy aplicable para un estudio de validación de limpieza, además este método tienen un nivel de detección muy bajo lo que es útil para detectar residuos y otros contaminantes de aguas de enjuague, también es compatible con métodos de hisopeo, es rápido y no es costoso.
- **Espectrofotometría UV.** Es muy recomendado ya que facilita la evaluación de varios tipos de residuos en un sólo ensayo. Estos análisis son caminos razonablemente rápidos para establecer la presencia de diversos materiales orgánicos. Por esta técnica es posible establecer algún grado de cuantificación y correlación a ensayos residuales.
- **Cromatografía en Capa Fina (TLC)** es un método barato, sin embargo la capacidad de detección no es muy buena.
- **Potenciometría, conductividad.** Los análisis de pH y conductividad se emplean para la confirmación de agentes de limpieza. La única desventaja de este método es que sólo se deben usar muestras solubles en agua

Cualquier método analítico seleccionado para análisis de residuos se debe validar antes de proceder al análisis de las muestras, además se tiene que considerar que un buen método de recobro es capaz de recobrar un alto porcentaje de la superficie probada si éste es mayor a un 70% y si se tiene un porcentaje menor, puede ser aceptado siempre y cuando sea reproducible y de no ser así, la técnica debe ser modificada ya sea utilizando un número mayor de hisopos u otro solvente.¹⁷

Parámetros de una validación

La guía general para validar un método analítico involucra los siguientes parámetros:^{9,23}

a) Especificidad.

Es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta exacta y específica de la sustancia de interés y no de otros componentes que pueden estar presentes en el material a analizar, tales como productos de degradación, excipientes u otros productos.

b) Límite de detección.

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

c) Límite de cuantificación.

Mínima concentración de una sustancia en una muestra que puede ser cuantificable con precisión y exactitud, utilizando las mismas condiciones de operación.

d) Precisión del sistema.

Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestras. Capacidad del método analítico para cuantificar la misma cantidad de la sustancia a analizar con la mínima variación posible cuando se analiza varias veces bajo las mismas condiciones normales de operación.

e) Linealidad del Sistema.

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

Cuando las pruebas se refieren a sistema, se analizan soluciones que contienen solamente el analito en un intervalo que dependerá del propósito del método: para el control de calidad o para el seguimiento de la estabilidad de un fármaco en una forma farmacéutica.

f) Exactitud del método.

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

g) Linealidad del método.

Habilidad para asegurar que los resultados analíticos son proporcionales a la concentración de la sustancia, a partir de placebos cargados cuyas concentraciones deben de ser adecuadas para que, utilizando el método propuesto las concentraciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema incluyendo siempre la que corresponde al 100%.

h) Repetibilidad del Método.

Capacidad del método analítico para cuantificar la misma cantidad de la sustancia a analizar con la mínima variación posible cuando se analiza la muestra varias veces, por diferentes analistas y en días diferentes, en el mismo o diferente laboratorio, utilizando el mismo o diferente equipo. (También llamado reproducibilidad).

i) Estabilidad de la muestra.

Propiedad de la 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.

j) Tolerancia.

Grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones controladas de las condiciones normales de operación, tales como diferente temperatura, lotes de reactivos, columnas, sistemas de elución, tipos de empaque, condiciones ambientales, estabilidad de la muestra analítica.

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN. (HPLC)

En la actualidad, la necesidad en los laboratorios de control de calidad de la industria farmacéutica de separar, identificar y cuantificar los diferentes componentes de una formulación es uno de los principales problemas a los cuales se enfrentan.

Una de las técnicas utilizadas para estos fines es conocida como cromatografía, esta definición viene de las dos raíces griegas que significan “registro de color”, aunque en la actualidad no se diferencian en esta técnica, los diferentes compuestos por su color.

La base de la cromatografía es la migración diferencial de las diferentes moléculas, esto es, que al eluir desde el punto de partida, cada componente lo hace con velocidades diferentes.

La muestra que debe analizarse se encuentra en la fase móvil, líquida o gaseosa, la cual se hace pasar a través de una fase estacionaria que puede ser un sólido o un líquido contenido por un sólido, separándose de forma selectiva.

Subdivisiones en cromatografía

De acuerdo a la naturaleza de la fase involucrada y a los mecanismos de separación, la cromatografía se puede dividir en.²⁴

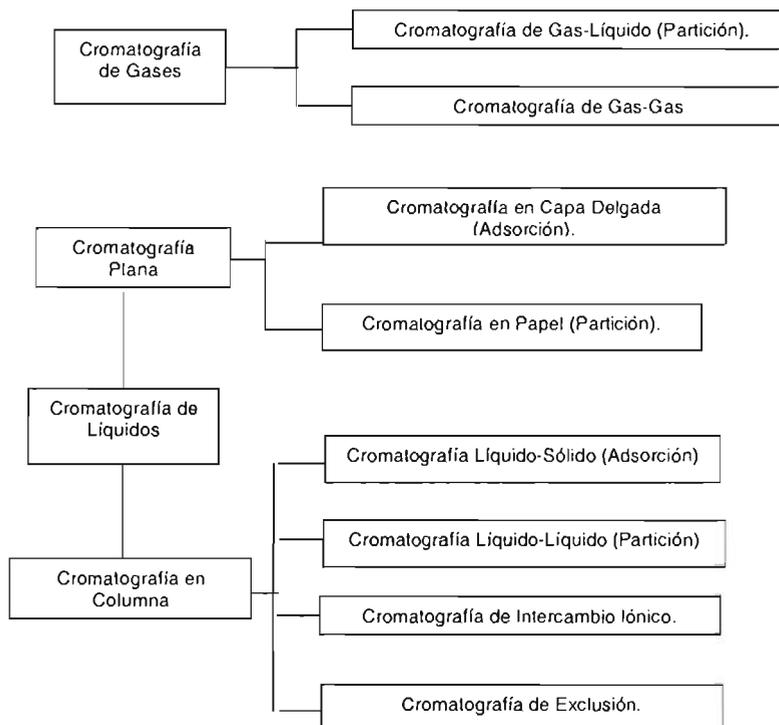


Figura 8. Clasificación de la cromatografía.

Fases estacionarias²⁴

El éxito de la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) consiste en la combinación adecuada de las condiciones de operación (tipo de columna, constitución de la fase, longitud, diámetro de la columna, velocidad de flujo, etc).

La migración diferencial en CLAR es el resultado del equilibrio de distribución de los diferentes constituyentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil. Dichos componentes son conducidos por la fase móvil y se separan en la columna saliendo de ésta en un cierto orden hacia un detector donde se registran sus concentraciones y sus tiempos de retención en la columna.

Un registrador de señales ya sea un registrador o un integrador proporciona el cromatograma resultante donde se muestra cada compuesto que sale de la columna, en forma de picos simétricos con un tiempo de retención característico, por lo que este parámetro puede utilizarse para identificar al compuesto. El tiempo de retención se mide desde el momento de la inyección de la muestra hasta el momento en que aparece el máximo del pico en el cromatograma. Los procesos de separación que dan como resultado la retención de las moléculas de una muestra por parte de la fase estacionaria dan lugar a las diferentes técnicas de cromatografía líquida:

Cromatografía líquido-líquido o de partición: consta de una fase estacionaria líquida de composición diferente a la de la fase móvil e inmisible con ella. Las moléculas de la muestra se distribuyen en ambas fases como si fuera una extracción líquido-líquido.

Cromatografía líquido-sólido o de adsorción: incluye partículas de gran área superficial donde las moléculas son atraídas y por lo tanto retenidas.

Cromatografía de intercambio iónico: donde la fase estacionaria contiene grupos iónicos fijos como SO_3^- , junto con iones de carga opuesta. Estos últimos están presentes en la fase móvil en forma de sales. De esta forma, las moléculas iónicas son retenidas en la columna por el intercambio iónico dado por la siguiente ecuación:



Cromatografía de exclusión molecular: en la cual el empaque es un material poroso con un tamaño de poro bien definido. De esta forma las moléculas que son demasiado grandes para el poro, salen rápidamente mientras que las pequeñas penetran en los poros prolongando su tiempo en la columna.

Existen modificaciones a los tipos de cromatografías mencionadas, como es el caso de la cromatografía de fases enlazadas. Esta variante se puede llevar a cabo en fase normal o en fase inversa (reversa).

Fases Móviles²⁴

La fase normal está constituida por una fase estacionaria polar, generalmente son sílicas, cuyas propiedades son: SiO (silanones libres), no cristalina, porosa, amorfa y con un alto grado de hidratación, facilitando de esta forma que se pueda mojar con la fase móvil, no polar.

La fase inversa involucra una fase estacionaria no polar formada por cadenas de hidrocarburos; en la actualidad existen columnas de 1 carbono hasta 18 carbonos, unidos a los grupos silano del soporte y se utilizan por lo general con fases móviles muy polares para separar componentes poco polares.

Parámetros cromatográficos²⁵

El lenguaje que comúnmente se puede emplear en CLAR, utiliza símbolos y términos característicos de esta técnica instrumental, los más utilizados se presentan a continuación:

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 el punto máximo del pico.

2. Tiempo muerto (T_o)

Representa el espacio vacío de la columna.

3. Tiempo de retención ajustado (T_r')

Mide el tiempo en que el soluto permanece en la fase estacionaria. Se obtiene de la diferencia del tiempo de retención y el tiempo muerto.

$$T_r' = T_r - T_o$$

4. Ancho de la base del pico (W_b)

Es la longitud de la base del pico interceptada por las tangentes al pico.

5. Número de platos teóricos (N)

Es el número que representa el poder de separación de la columna, una buena columna tiene un número alto de platos teóricos.

$$N = 16 \left[\frac{T_r}{W_b} \right]^2$$

Donde:

N = número de platos teóricos

T_r = tiempo de retención del pico

W_b = ancho del pico en la base

16 = constante que depende de a que altura del pico se mide el ancho de la base del mismo.

Existen varios métodos para determinar los platos teóricos, entre los que se encuentran:²⁵

- Métodos manuales:
 - a) Inflexión o 2 sigma.
 - b) Altura a la mitad del pico
 - c) Tangentes
 - d) Relación altura área
 - e) 4 sigma
 - f) 5 sigma

- Métodos computarizados:

- a) Asimétricos
- b) Momentos

6. Altura equivalente a un plato teórico (AEPT)

Indica la longitud requerida para obtener un equilibrio de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. También proporciona el valor de la eficiencia del sistema, cuanto menor sea AEPT, el sistema es más eficiente.

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

Donde:

L = longitud de la columna

N = número de platos teóricos

Nota: Usualmente L y N se expresan en mm

7. Factor de capacidad (K')

Se define como la razón de la cantidad de soluto en la fase estacionaria entre la cantidad en fase móvil al equilibrio.

$$K' = \frac{T_r'}{T_0}$$

Donde:

K' = factor de capacidad

T_r' = tiempo en que tarda en eluir el compuesto de interés

T₀ = tiempo muerto

8. Selectividad (α)

Mide las diferencias relativas entre la interacción de dos solutos con la fase estacionaria. Calculándolas para picos A y B de la siguiente manera:

$$\alpha = \frac{T_{r_2}}{T_{r_1}}$$

Donde :

T_{r_2} = tiempo de retención del segundo pico

T_{r_1} = tiempo de retención del primer pico

Si α igual o menor a 1 los dos pico tienen tiempos de retención iguales, es decir no existe separación entre los picos.

9. Resolución (R)

Es la forma de ver el grado de separación obtenida entre dos compuestos, se obtiene de la siguiente manera:

$$R = \frac{2(T_{r_2} - T_{r_1})}{W_a + W_b}$$

Donde:

T_{r_2} = tiempo de retención del segundo pico

T_{r_1} = tiempo de retención del primer pico

W_a = ancho del pico A

W_b = ancho del pico B

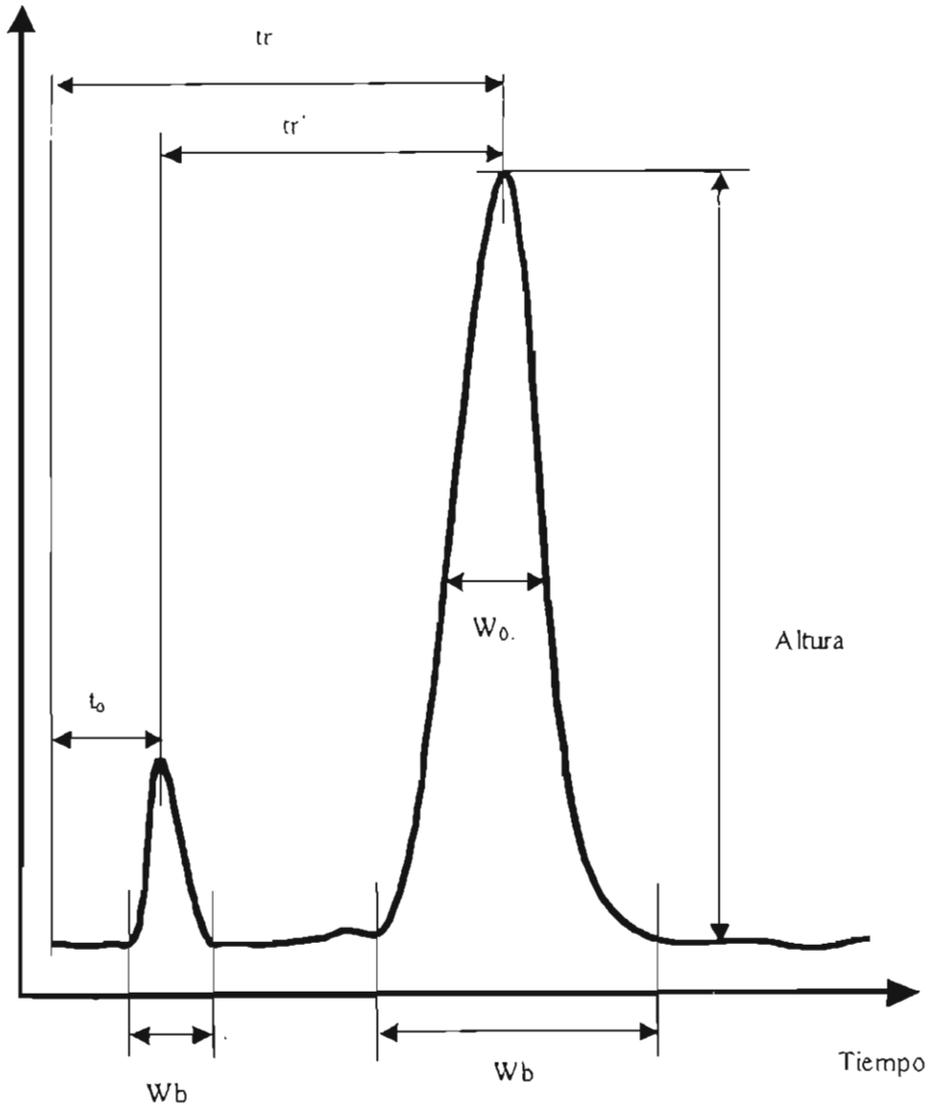


Figura 9. Parámetros cromatográficos.

Instrumentación^{26,27}

Esencialmente un cromatógrafo de líquidos de alta resolución consta de las siguientes partes:

- a) Reservorios
- b) Sistema de bombeo
- c) Sistema de inyección
- d) Columna
- e) Detectores
- f) Registrador de señales

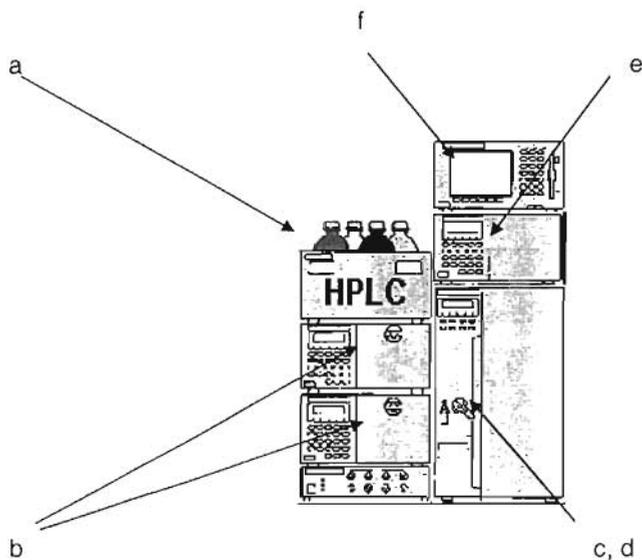


Figura 10. Componentes básicos que conforman un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución.

a) Reservorio:

Lugar donde se almacenan los solventes requeridos para realizar la mezcla de fases móviles.

b) Sistema de bombeo:

Tiene por objeto impulsar la fase móvil a través de la columna. Las características más importantes que debe presentar un sistema de bombeo para CLAR son:

- a) Reproducibilidad
- b) Velocidad de flujo
- c) Presión media adecuada
- d) Componentes resistentes a solventes

Existen básicamente tres sistemas de bombeos:

- Bombeo de flujo constante. Mantiene una velocidad de flujo de la fase móvil constante. Dentro de éstas se encuentran las bombas reciprocantes que funcionan a base de pistones que impulsan el solvente que entra a las cámaras con una capacidad de volumen pequeño. En estas bombas se generan pulsaciones de la fase móvil que provocan perturbaciones en la línea base.
- Bombas de desplazamiento positivo. Pueden tener dos formas, como jeringas o como amplificador hidráulico, la primera es parecida a una jeringa cuyo émbolo actúa mediante un espiral que empuja el solvente y la segunda amplifica la presión del solvente mediante un sistema hidráulico.

- Bombas de presión constante. En este tipo de bombas se necesita mantener la velocidad del flujo del solvente, la temperatura de la columna y la presión constante. La ventaja es que si estos parámetros se mantienen, se controlan totalmente las pulsaciones.

En estas bombas se emplea un gas inerte para presurizar el solvente. El problema es que parte de este gas se disuelve en el solvente y éste forma burbujas en el sistema.

Éstos son normalmente sistemas isocráticos, en los que se mantiene constante la proporción de los solventes en la fase móvil; sin embargo, estos sistemas generalmente no son aplicables a separaciones en mezclas de solutos con valores muy variables de K' , en donde es necesario utilizar sistemas de elución con gradiente, para la cual se requieren dos bombas que son programables para modificar las proporciones iniciales de los solventes que componen la fase móvil.

c) Sistema de inyección:

Uno de los factores importantes para obtener una buena resolución en la separación, es la adecuada introducción de la muestra en sistema. La manera ideal de introducir o inyectar una muestra, es en forma de paquete pequeño, ya que esto ayuda a obtener picos simétricos y angostos.

Hay dos métodos para introducir la muestra en la columna:

- a) Válvulas de inyección
- b) Métodos de selección de flujo

Las válvulas de inyección utilizan un loop, para introducir la muestra se requiere primero cambiar la válvula a la posición de carga, en esta posición, la fase móvil pasa directamente a la columna y en ese momento se introduce la muestra al loop de la válvula. Después, se regresa la válvula con la muestra a la posición de inyectar, y es entonces cuando la fase móvil viaja por el loop y lleva a la muestra hacia la entrada de la columna.

Los métodos de detención de flujo requieren que el flujo de la fase móvil hacia la columna se detenga o desvíe mientras la muestra es introducida en la columna, después de esto se reinicia el flujo y el proceso de separación comienza.

En la actualidad la inyección de la muestra se puede hacer en forma automática. Primordialmente, los inyectores automáticos consisten de una válvula de inyección automática, un sistema de llenado de la válvula y un control electrónico que sirve para controlar funciones tales como: tiempos de inyección, tiempos de corrida, velocidades de llenado, número de inyecciones por muestra, volumen de inyección, identificación de la muestra, lavado de la válvula y jeringa. Inicio de inyección para el registro, así como la operación de programadores de gradientes o controladores de sistema.

Existen principalmente 3 métodos por medio de los cuales los inyectores automáticos llenan la válvula de inyección:

- **Desplazamiento positivo.** Este sistema se basa en la utilización de una aguja doble que pasa a través del sello y el aire penetra por uno de los conductos de la aguja. Este aire presuriza el vial obligando a la muestra a salir por el segundo conducto de la aguja hacia la válvula.

- **Succión.** Ésta se utiliza ya sea en un sistema de vacío o una jeringa de mayor volumen y los viales que contienen la muestra normalmente no están sellados
- **Con jeringa.** En este caso, se utiliza una jeringa automática que generalmente se ajusta para dar varios volúmenes, sin cambiar la jeringa. Este tipo de inyectores eliminan algunos de los errores que se presentan durante el análisis ocasionados por el manejo manual de la técnica de inyección.

d) Columnas:

Se considera a la columna como parte fundamental en la cromatografía, ya que es en donde se lleva a cabo la separación; las dimensiones y el material de empaque dependerá del tipo de separación que se quiera realizar. La longitud de la columna puede variar desde 10 cm hasta 1 m, hay que recordar que al aumentar el tamaño de la columna también aumenta el número de platos teóricos, y por ende se tiene una mejor resolución; claro que ésto no se lograría si no se considerara el tipo de material de empaque así como el tamaño de partícula que presenta.

La eficiencia de las columnas ha evolucionado en los últimos años, ya que se han desarrollado técnicas de empaque que mejoran el paso del soluto de la fase móvil por la fase estacionaria. Un ejemplo de ésto, es el sistema de compresión radial de una columna hecha de un material flexible, con la cual se disminuyen los espacios vacíos que quedan entre la pared de la columna y las partículas.

La eficiencia y la resolución de la columna también se ha logrado mejorar en la actualidad con el uso de hornos, que mantienen la temperatura constante a lo largo de la columna.

A continuación se presenta una lista de los empaques empleados en CLAR:

- Octadecil-silano: enlazado únicamente a sílice porosa o a micropartículas de cerámica de 5 a 10 μm de diámetro.
- Octadecil-silano, enlazado químicamente a gel de sílice con una superficie de porosidad controlada y que a su vez está unida a un núcleo esférico de 30 a 50 μm de diámetro.
- Partículas de sílica porosa de 5 a 10 μm de diámetro.
- Gel de sílica con una superficie de porosidad controlada unida a un núcleo sólido esférico de 30 a 50 μm de diámetro.
- Empaque de intercambio catiónico fuerte; es un polímero de fluorocarbono sulfonado cubriendo un núcleo sólido esférico de 30 a 50 μm de diámetro.
- Alúmina con una superficie de porosidad controlada unida a un núcleo sólido esférico de 30 a 50 μm de diámetro.
- Octilsilano está enlazado químicamente a partículas de sílica totalmente porosa de 5 a 10 μm de diámetro.
- Capas monomoleculares de aminopropilsilano enlazadas químicamente a un soporte de gel de sílice de 10 μm de diámetro.
- Gel de sílica totalmente porosa e irregular de 10 μm de diámetro con una cubierta enlazada químicamente a un intercambiador catiónico fuertemente ácido.
- Grupos fenilo químicamente enlazados a partículas de sílica porosa de 5 a 10 μm de diámetro.
- Empaque de intercambio-aniónico formado por una amina cuaternaria enlazada químicamente a un núcleo esférico de sílica de 30 a 50 μm de diámetro.
- Trimetilsilano enlazado químicamente a partículas de sílica porosa, de 5 a 10 μm de diámetro.
- Gel de sílice de 10 μm de diámetro con un intercambiador aniónico de amonio cuaternario fuertemente básico.

- Hexilsilano químicamente enlazado a sílica totalmente porosa de 3 a 10 μm de diámetro.

e) **Detectores**^{27,28}

La finalidad de utilizar detectores en CLAR es el de monitorear la composición del líquido que eluye de una columna de cromatografía y por tanto hacer posible un registro de cómo la composición varía con el tiempo.

Existen diferentes tipos de detectores, los cuales se seleccionan según su uso. Se presenta a continuación una lista de algunos de los detectores más usado en los equipo de CLAR:

- Detector espectrofotométrico (UV/VIS)
- Detector de índice de refracción
- Detector de fluorescencia
- Detector electroquímico
- Detector infrarrojo
- Detector de conductividad
- Detector de radioactividad
- Detector de espectroscopía de masas

A continuación se definen términos necesarios para describir y comparar los detectores.

1. Ruido. Se refiere a la inestabilidad de la línea basal y normalmente se mide en desviaciones porcentuales de una escala establecida, el ruido también se puede medir en unidades absolutas, considerando las oscilaciones del registro de un pico a otro. El ruido se puede ocasionar por causas múltiples como impurezas en la fase móvil, solventes inmiscibles, etc.
2. Deriva. Se describe como el movimiento lento hacia abajo de la línea basal en un período de tiempo considerable, estos cambios se asocian con variaciones en la temperatura o de la fase móvil

Finalmente se dice que un detector es lineal si la respuesta eléctrica producida es directamente proporcional a la concentración de los componentes que pasan por el detector.

La linealidad se expresa como una desviación porcentual y se define para un intervalo establecido de detección.

Los detectores se clasifican en dos grupos principales:

- Detectores universales. Los cuales funcionan midiendo alguna propiedad física general del eluyente de la columna, por lo que son conocidos como detectores universales de propiedades generales.
- Detectores selectivos. Éstos son detectores que funcionan midiendo una propiedad específica del soluto como la absorción ultravioleta.

Las características que debe de cumplir un detector son las siguientes:

- a) Tener un diseño ideal, que los componentes de la muestra no se mezclen al pasar por el detector.
- b) Tener una señal de ruido y de deriva baja, de tal manera que los componentes que eluyan en pequeña cantidad, puedan distinguirse.
- c) Tener un tiempo de respuesta rápido, para no distorsionar los picos que eluyan rápido.
- d) Tener un rango dinámico lineal amplio, para que el análisis cuantitativo se pueda llevar a cabo.
- e) Ser relativamente insensible a cambios por la velocidad o composición de la fase móvil o temperatura
- f) Ser fácil de manejar y confiable.

A continuación se menciona los detectores más utilizados:

1. Detector de absorción UV/VIS

Estos detectores son los más usados en CLAR y responden a sustancias que absorben a la luz visible o ultravioleta. Una gran cantidad de compuestos caen en esta categoría, incluyendo sustancias que tienen electrones sin compartir como las oleofinas, todos los compuestos aromáticos y compuestos que tienen enlaces del tipo $>C=O$, $>C=S$, $-N=N-$.

Al salir de la columna el haz de luz es enfocado a través de la celda de flujo hacia el sistema de foto-detección. Cuando los solutos que absorben se encuentran en la fase móvil, la intensidad de la luz que llega a la fotocelda se reduce produciendo un cambio en la señal eléctrica, la cual puede ser introducida a un registrador de datos.

La relación entre la absorción de luz en la celda y la concentración del soluto está dada por la ley de Lambert y Beer

$$A = \epsilon lc$$

Donde

A = Absorbancia

ϵ = Coeficiente de extinción molar del soluto a una longitud de onda dada

l = Longitud de la celda de flujo

c = Concentración del soluto en la celda

La sensibilidad del detector es directamente proporcional al valor del coeficiente de extinción molar y al paso de la luz de la celda

Existe una gran variedad de detectores de este tipo:

- a) Detectores de longitud de onda fija. En este tipo se utilizan filtros para fijar la longitud de onda.
- b) Detectores de longitud de onda seleccionable. Estos intercambian filtros, lo cual permite seleccionar diferentes longitudes de onda.
- c) Detectores de selección dual. Similares a los anteriores pero tienen un sistema doble de detección que permite monitorear la celda de flujo a dos longitudes de onda, con lo cual se puede conocer la relación entre ambas longitudes. Estos detectores son útiles para identificar si un pico es puro o no.
- d) Detectores de longitud de onda variable. Permiten una gran flexibilidad para optimizar las longitudes de onda, utilizan un monocromador para seleccionar la longitud de onda.

- e) Detectores de barrido. La característica principal de este tipo de detectores es que pueden barrer rápidamente por varias longitudes de onda.

2. Detector de índice de refracción.

Se basa en el hecho de que la mayoría de los líquidos tienen diferentes índices de refracción. El detector mide la diferencia entre la fase móvil pura y la que tiene disuelto al soluto que eluye de la columna. Este detector es casi universal pero es muy poco usado en cromatografía.

3. Detector de fluorescencia.

El detector de fluorescencia es probablemente el más sensible entre los existentes en los equipos de HPLC modernos. Estos detectores son muy específicos, se basan en la absorción de energía por compuestos que tienen en su estructura molecular grupos funcionales específicos, que son excitados por ondas de energía corta, con la cual ocupan un estado de energía excitado; esta energía debe de disiparse antes de que la molécula regrese a su nivel de energía basal; la luz emitida de una molécula cuando cae a su estado basal, generalmente es de energía mayor a la que irradió la molécula.

Las ventajas más grandes de la fluorescencia son la selectividad y la sensibilidad. Esta técnica es muy poderosa cuando se realizan análisis de sustancias que se encuentran en pequeña cantidad (trazas)

4. Detector de arreglo de diodos.

Este tipo de detectores adquieren datos de absorbancia en el rango de UV-Visible; en ellos continuamente pasa radiación a través de la celda de la muestra. esta radiación es separada en sus longitudes de onda constituyentes, las cuales son detectadas por un arreglo de fotodiodos, que se proporciona al analista múltiples cromatogramas, pudiendo ver selectivamente diversos cromatogramas a diferentes longitudes de onda y espectros del pico eluído.

Los detectores de arreglo de diodos generalmente tienen mayor señal de ruido en comparación con los detectores de longitud de onda variable, por lo tanto son menos adecuados para análisis de compuestos presentes a bajas concentraciones.²⁶

f) Registrador de señales

Al emerger un compuesto ya separado de la columna y pasar por el detector, la señal que provoca debe registrarse por un graficador o un integrador.

En el caso de que se use un graficador, es necesario calcular manualmente el área obtenida en cada pico. El método más sencillo de medición es mediante la altura de los picos desde la línea base hasta el máximo del pico, aunque es necesario tener una línea base estable.

Otro método es el de cálculo del área bajo la curva, dicha área puede calcularse mediante el método del área por triangulación, prolongando los lados del pico hasta la línea base y midiendo el ancho y la altura del pico.

Instrumentos alternativos al registrador en papel pueden ser desde un simple integrador de canales múltiples, sistema de manejo de datos, hasta computadoras de alta capacidad con software específico.

CARBONO ORGÁNICO TOTAL. (TOC)

La técnica de determinación de Carbono Orgánico Total (TOC), es un nuevo método usado para la validación de limpieza, que también ha sido utilizada para medir la calidad del agua grado farmacéutico y agua de ultra alta pureza en plantas de energía nuclear, TOC ha demostrado tener buenos niveles de detección, tiempos de análisis rápidos y su costo es muy bajo comparado con otros métodos de análisis.

La definición de la técnica de TOC, "es la medición indirecta de moléculas orgánicas presentes en agua, medidas como carbono."²⁹

Fundamento de la determinación³⁰

La técnica se basa en la oxidación completa de las moléculas orgánicas disueltas en una muestra de agua, hasta producir CO_2 y H_2O , midiendo los niveles resultantes de CO_2 y expresando la respuesta en concentración de carbono.

El agua es eliminada por medio de un deshumidificador y el CO₂ es llevado por un gas acarreador a un detector NDIR que mide la concentración de carbono basándose en estándares externos como biftalato de potasio, sacarosa o 1,4-benzoquinona.

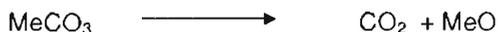
Esta oxidación puede ser inducida por algunos métodos comunes, incluyendo la oxidación fotocatalítica, oxidación química, (peroxidisulfato u oxígeno) y combustión a alta temperatura.

La reacción de combustión tiene lugar a altas temperatura (680° C), llevándose a cabo de la forma siguiente:

- Oxidación del compuesto orgánico



- Descomposición del carbonato



- Descomposición del bicarbonato



Definiciones²²

TC: Carbono Total, es la suma del carbono orgánico y el carbono inorgánico

TOC: Carbono Orgánico Total, todas las formas de carbono orgánico disuelto en el agua

IC: Carbono Inorgánico, es el carbono proveniente de la disolución de CO_2 , HCO_3^- y CO_3^{2-} ambiental

POC: Carbono Orgánico Purgable, componente del carbono orgánico total (TOC) que se libera al purgar la muestra con aire comprimido

NPOC: Carbono Orgánico No Purgable, es el componente del carbono orgánico total (TOC) que no se libera al purgar la muestra con aire comprimido.

Fundamento de la Técnica³⁰

Medición de TC (Carbono Total)³⁰

El tubo de combustión se llena con catalizador y se calienta a 680 °C, en tanto que el gas de transporte (el aire comprimido) se suministra dentro del tubo después de que el flujo se ajusta a 150 mL/min por los controladores de presión y de flujo.

Cuando se introduce la muestra dentro del tubo de combustión TC, el componente TC en la muestra (que comprende TOC y IC) se oxida por combustión hasta CO_2 . el gas acarreador transporta el producto de combustión (CO_2) hasta el vaso de reacción IC donde se enfría y seca por un deshumidificador, enseguida pasa por el Scrubber de hidrógeno hacia la celda de muestra del detector de infrarrojo no dispersable (NDIR), donde el CO_2 se detecta. El NDIR produce una señal analógica que genera un pico: el área del cual se calcula procesador de datos.

El pico es proporcional a la concentración de TC en la muestra. Si se genera una curva de calibración que relacione el área del pico y la concentración de TC a partir de una solución estándar de TC, la concentración de la muestra podrá ser determinada con la siguiente ecuación:

$$TC = TOC + IC$$

En donde:

TC = Carbono total, orgánico e inorgánico disuelto en una muestra

TOC = Carbono orgánico total

IC = Carbono proveniente de fuentes inorgánicas

Medición de IC (Carbono Inorgánico)³⁰

El carbono en forma de carbonatos y bicarbonatos pueden ser medido como IC de la siguiente manera:

La muestra se introduce vía inyector de muestras dentro del vaso de reacción IC (que contiene ácido fosfórico), a través del cual el gas acarreador fluye en forma de diminutas burbujas. Sólo el componente IC en la muestra se descompone a la forma de CO₂ el cual se detecta al alcanzar el NDIR. La concentración de IC se determina en la misma forma que el TC, con una excepción, pues se usa una curva de calibración de IC para determinar la concentración de la muestra.

Medición de TOC (Carbono Orgánico Total)³⁰

La concentración de TOC se puede determinar por sustracción de la concentración de IC, obtenida como se describió antes en medición de IC de la concentración de TC obtenida como se describe en la medición de TC, esta sustracción se realiza por el equipo y se reporta como valor de TOC.

$$\text{TOC} = \text{TC} - \text{IC}$$

En donde:

TC = Carbono total, orgánico e inorgánico disuelto en una muestra

TOC = Carbono orgánico total

IC = Carbono proveniente de fuentes inorgánicas

Medición de NPOC (Carbono Orgánico No Purgable)³⁰

La concentración de TOC puede ser determinada directamente, usando otro procedimiento. En este caso, la muestra se acidifica previamente y se burbujea automáticamente por gas purificado para remover el IC que contiene. La muestra se analiza para obtener la concentración de TC como se describe en la sección medición de TC, este método también es referido como el método NPOC.

NPOC es el total de carbono orgánico no volátil, debido a que éste no es eliminado por evaporación durante el proceso de burbujeo. Compuestos orgánico volátiles tales como solventes orgánicos, los cuales no son realmente solubles en agua, se eliminan de la muestra a temperatura ambiente via burbujeo. El carbono orgánico que se evapora durante el burbujeo se llama POC. Es importante notar que el burbujeo incrementa el tiempo de análisis en 2 minutos o más por muestra.

Para la determinación de concentración del carbono orgánico total en la muestra, podrá ser determinada con la siguiente ecuación:

$$\text{TOC} = \text{NPOC} + \text{POC}$$

En donde:

NPOC = Carbono orgánico no purgable.(carbono orgánico remanente después de purgar la muestra)

POC = Carbono orgánico purgable.(se libera después de acidificar y purgar la muestra con aire de alta pureza)

Instrumentación^{21,31}

A continuación se muestra una fotografía de un equipo TOC, el cual consta de las siguientes partes:

- a) Módulo de combustión a alta temperatura
- b) Automuestreador
- c) Registrador de señales

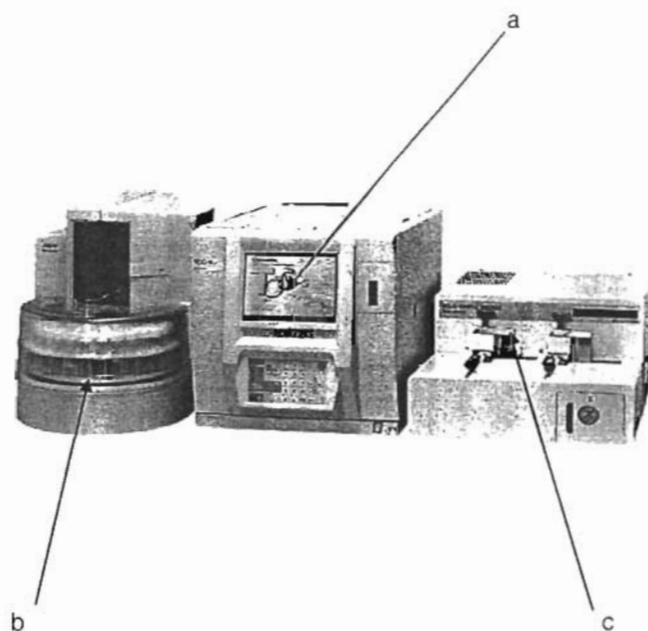


Figura 11. Componentes básicos que conforman un equipo de Carbono Orgánico Total. (TOC.)

Ecuaciones para determinar los Criterios de limpieza^{20,32}

Para establecer los criterios aceptables para la presencia de residuos de fármacos, se deben garantizar la seguridad y la ausencia de contaminantes que puedan ocasionar una contaminación cruzada para los lotes subsecuentes fabricados en el equipo.

A continuación se presenta un método para calcular los límites de carbono para la validación de limpieza en tres pasos:

- El primero está basado en la estimación de los límites del primer producto subsecuente fabricado,
- El segundo en la superficie del equipo y
- El tercero en la muestra analizada

Determinación del límite en el producto subsecuente:

$$L_1 = 0.001 \times \frac{\text{dosis } (\mu\text{g})}{\text{CM} \times \text{UD}(\text{ff})} = \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}$$

En donde:

0.001 = Factor de seguridad

Dosis = Dosis mínima diaria (en μg) del principio activo con la DL_{50} más pequeña del grupo de productos fabricados en el equipo

CM = Cantidad máxima diaria de la unidad de dosis más grande del grupo de productos. (en mg o mL según la forma farmacéutica)

UD = Número de unidades de dosis, máxima por día, del grupo de productos (tabletas, cápsulas, cucharadas, etc).

El valor de 0.001 es un factor de seguridad calculado en base a la relación de dosis y establece que no más de 0.001 de la dosis de cualquier producto debe aparecer en la dosis diaria máxima de otro producto; para utilizar el valor de 0.001 se consideran tres factores:

- Los productos farmacéuticos no son activos a 0.1 de la dosis usual
- Factor de seguridad (0.1)
- Factor de tolerancia para el programa de validación.

Límite por área superficial:

Una vez que se determinó el límite de residuo en el producto subsecuente, el siguiente paso es determinarlo en términos de nivel de contaminación del ingrediente activo por área superficial del equipo. En este punto se considera la superficie en contacto con el producto.

$$L_2 = L_1 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mg}} \right) \times \frac{\text{TL (mg)}}{\text{AS (cm}^2\text{)}} = \frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^2}$$

En donde:

L_1 = Límite del residuo en el producto subsecuente

TL = Tamaño del lote más pequeño del grupo de productos fabricados en el equipo. (mg).

AS = Área superficial de contacto del equipo (cm²)

Límite para el área muestreada:

El límite en el área analizada permite evaluar el residuo en solución como resultado del muestreo con el hisopo. Se considera que se muestrea una determinada área superficial del equipo y se disuelve en una cantidad determinada de disolvente. La ecuación que permite calcular este límite es:

$$L_3 = L_2 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^2} \right) \times \frac{\text{ASL (cm}^2\text{)}}{\text{VD (mL)}} = \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

En donde:

L_2 = Límite por área superficial

ASL = Área superficial muestreada (50 cm²)

VD = Volumen final (30 mL)

Por último es necesario determinar el criterio de cantidad de carbono. Este cálculo se obtiene a partir del valor L_3 multiplicado por la cantidad de carbono en el producto:

$$\text{CC} = L_3 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) \times \text{PC}$$

En donde:

CC = contenido de carbono

L_3 = Límite en el área muestreada

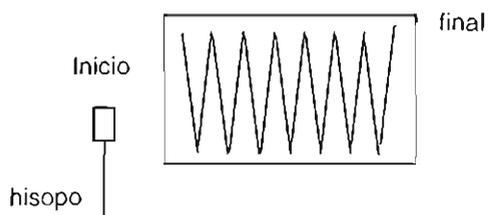
PC = porcentaje de carbono en el producto evaluado.

Técnica de Muestreo en placa de acero inoxidable¹⁷

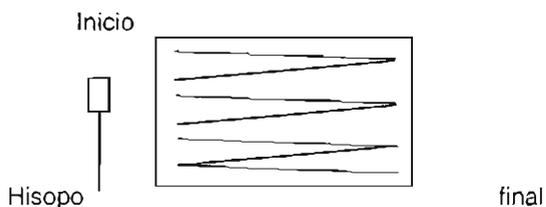
Para el desarrollo del presente trabajo se realizó el muestreo con hisopo o por raspado en superficie, por lo que la forma de tomar la muestra se describe a continuación²³

a) Tomar un hisopo y cargarlo con 0.15 mL del disolvente.

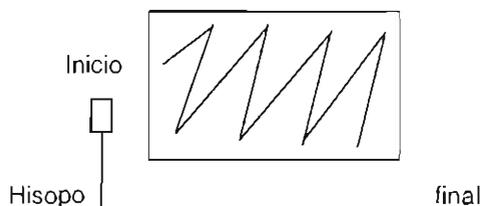
b) Frotar la superficie de la placa con el hisopo como se indica en la figura:



c) Dar un tercio de vuelta al hisopo y frotar la superficie de la placa con el hisopo como se indica en la figura:



d) Dar un tercio de vuelta al hisopo y frotar la placa de la siguiente forma



CAPÍTULO 3

PROTOCOLO DE DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO POR HPLC

Objetivo:

Desarrollar y validar un método analítico para evaluar la limpieza de los equipos utilizados en la fabricación de cápsulas polivitamínicas por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Material y Equipo utilizado:

Balanza analítica Sartorius BP301.

Vortex Maxi Mix II Thermoline.

Baño de ultrasonido Branson 2210.

Cronómetro.

Micropipetas de 40 – 200 μL .

Jeringa de vidrio de 250 μL .

Cromatógrafo de líquidos Watters.

Monitor DELL Optiplex GX110 modelo MMP.

Impresora HP laser Jet 4000N.

Hisopos (large Alpha Swab) TX714 Texwipe.

Material de vidrio de alta sensibilidad.

Guantes de látex.

Columna Symetry C₁₈ 5 μm 3.9 x 150 mm.

Acrodisco Whatman de 0.45 μm.

Placas de acero inoxidable.(316 de 50 cm²)

Reactivos:

Agua grado HPLC.

Metanol grado HPLC.

Ácido fosfórico RA.

Estándar de niacinamida, lote: NDAUS000006202.

Hexansulfonato de sodio lote XC1920

Preparación de soluciones.

Fase móvil.

Pesar aproximadamente y con exactitud 1.65 g de hexansulfonato de sodio y colocarlos en un matraz volumétrico de 1000 mL, adicionar 200 mL de agua grado HPLC, y 280 mL de metanol grado HPLC. Llevar a volumen con agua grado HPLC, mezclar y filtrar por membrana de 0.45 μm y sonicar por 10 minutos.

**ESTA TESIS NO SALI
DE LA BIBLIOTECA**

DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

Determinación del tiempo óptimo de burbujeo:

Pesar aproximadamente y con exactitud una cantidad de producto terminado equivalente a 31.5 mg de niacinamida y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 50 mL de agua grado HPLC, sonicar 10 minutos para disolver la niacinamida y llevar a volumen con agua grado HPLC.

Tomar 150 μ L de la solución y cargar un hisopo, trozar la cabeza del hisopo dentro de un vial de alta sensibilidad, adicionar 15 mL de agua grado HPLC. Esta operación se repite por sextuplicado

Agitar 3 muestras por 30 segundos y 3 muestras por 2 minutos, filtrar la muestra por acrodiscos Whatman de 0.45 μ m.

Determinación del número de hisopos a utilizar:

Pesar aproximadamente y con exactitud una cantidad de producto terminado equivalente a 31.5 mg de niacinamida y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 50 mL de agua grado HPLC, sonicar 10 minutos para disolver la niacinamida y llevar a volumen con agua grado HPLC.

Cargar 6 placas de acero inoxidable con 150 μ L de la solución, dejar secar y recobrar el producto de 3 placas con un hisopo previamente humedecido con 150 μ L de agua grado HPLC y colocar el hisopo en un vial. recobrar las otras 3 placas con dos hisopo previamente humedecido con 150 μ L de agua grado HPLC y colocar los hisopos en un vial, trozar la cabeza de los hisopos dentro de un vial de alta sensibilidad, adicionar 15 mL de agua grado HPLC, agitar la muestra por el tiempo establecido en el punto anterior y filtrar la muestra por acrodiscos Whatman de 0.45 μ m.

Preparación de la solución de referencia de niacinamida para la curva de calibración. (Stock)

Pesar aproximadamente y con exactitud 100 mg de estándar de niacinamida y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 50 mL de agua grado HPLC, sonicar por 10 minutos y llevar a volumen con agua grado HPLC. Concentración: 1 mg de niacinamida por mL

Preparación de la curva de calibración.

Preparar la curva de calibración a partir de la solución stock de niacinamida como se describe a continuación, llevando a volumen con agua grado HPLC.

Nivel %	Alícuota (mL)	Volumen (mL)	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
20	1.5	25	60
40	3.0	25	120
67	2.0	10	200
100	3.0	10	300
167	5.0	10	500
333	---	---	1000

Humedecer un hisopo con 150 μL de la solución de cada nivel, trozar la cabeza del hisopo dentro de un vial de alta sensibilidad, adicionar una cabeza de hisopo dentro del vial y 15 mL de agua grado HPLC, agitar la muestra por 30 segundos y filtrar por acrodisco Whatman de 0.45 μm .

Las concentraciones finales de las soluciones para la curva de calibración son las siguientes:

Nivel %	Alícuota (mL)	Volumen de dilución (mL)	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
20	0.150	15	0.60
40	0.150	15	1.20
67	0.150	15	2.00
100	0.150	15	3.00
167	0.150	15	5.00
333	0.150	15	10.00

Preparación de las muestras para linealidad, repetibilidad y exactitud del método.

Pesar aproximadamente y con exactitud el equivalente a 100 mg de niacinamida sustancia de referencia y una cantidad de placebo equivalente a 100 mg de niacinamida, transferirlos a un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 50 mL de agua grado HPLC, sonicar 10 minutos y llevar a volumen con agua grado HPLC.

Preparar las siguientes diluciones:

Nivel %	Alícuota (mL)	Volumen de dilución (mL)	Concentración (µg/mL)
27	2.0	25	80
40	3.0	25	120
67	2.0	10	200
100	3.0	10	300
200	6.0	10	600
267	8.0	10	800

Para cada nivel tomar 150 μL y cargar una placa de acero inoxidable, dejar secar y recobrar el producto de la placa con dos hisopos humedecido con 150 μL de agua grado HPLC, trozar la cabeza de los hisopos dentro de un vial de alta sensibilidad, adicionar 15 mL de agua grado HPLC, agitar la muestra por 30 segundos y filtrar la muestra por acrodiscos Whatman de 0.45 μm .

Las concentraciones finales de las soluciones preparadas quedan de la siguiente manera:

Nivel %	Alícuota (mL)	Volumen de dilución (mL)	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
27	0.150	15	0.80
40	0.150	15	1.20
67	0.150	15	2.00
100	0.150	15	3.00
200	0.150	15	6.00
267	0.150	15	8.00

Preparación de las muestras para la reproducibilidad, tolerancia del método y estabilidad de la muestra.

Pesar aproximadamente y con exactitud una cantidad de producto terminado equivalente a 31.5 mg de niacinamida y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 50 mL de agua grado HPLC, sonicar 10 minutos para disolver la niacinamida y llevar a volumen con agua grado HPLC.

Tomar 150 μ L de la solución y cargar una placa de acero inoxidable, dejar secar y recobrar el producto de la placa con dos hisopos humedecido con 150 μ L de agua grado HPLC, trozar la cabeza de los hisopos dentro de un vial de alta sensibilidad adicionar 15 mL de agua grado HPLC, agitar la muestra por 30 segundos y filtrar la muestra por acrodiscos Whatman de 0.45 μ m.

Preparación de las muestras para la especificidad del método.

Para esta etapa de la validación, se prepararon soluciones conteniendo:

- ❖ Estándar de niacinamida con una concentración de 0.315 mg/mL
- ❖ Producto terminado a una concentración equivalente a 0.315 mg de niacinamida /mL
- ❖ Placebo con una concentración equivalente a 0.315 mg de niacinamida /mL
- ❖ Muestra de agua utilizada para la preparación de las soluciones
- ❖ Fase móvil

Tomar 150 μ L de cada solución y cargar una placa de acero inoxidable. dejar secar y recobrar el producto de la placa con dos hisopos previamente humedecidos con 150 μ L de agua grado HPLC, trozar la cabeza de los hisopos dentro de un vial de alta sensibilidad, adicionar 15 mL de agua grado HPLC, agitar por 30 segundos y filtrar la muestra por acrodiscos Whatman de 0.45 μ m.

Procedimiento:

- ❖ Verificar que la calibración del equipo cromatográfico esté vigente.
- ❖ Condiciones cromatográficas.

Columna	Symetry C ₁₈ 5 μ m 3.9 x 150 mm.
Fase móvil	Solución de hexansulfonato de sodio al 0.23% :MeOH en una proporción (72:28)
Velocidad de Flujo	1 mL / min.
Volumen de inyección	20 μ L.
Longitud de onda	260 nm.
Temperatura	Ambiente.
Tiempo de análisis	Para la curva de calibración 3.0 minutos. Para las muestras con producto terminado y placebo 15 minutos.

Acondicionar el sistema cromatográfico con la fase móvil durante 90 minutos o hasta obtener una línea base estable.

Injectar cinco veces una muestra de la solución de referencia, el blanco (diluyente), y evaluar los parámetros de adecuabilidad

El tiempo de retención de la niacinamida es aproximadamente de 1.89

Factor de coleo igual a 1.2

Eficiencia de la columna: 2283

Parámetros de adecuabilidad del sistema

	Tiempo de retención	Factor de coleo	Eficiencia	Resolución
Niacinamida	1.89	1.2	2283	---

REPORTE DE VALIDACIÓN DEL METODO POR CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN PARA NIACINAMIDA POR HPLC

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Señal (altura)	Ruido (altura)	Relación (Señal/Ruido)	Promedio
0.0010	12.00	5.50	2.18	2.08
	12.30	5.70	2.16	
	12.00	6.30	1.90	
0.0008	12.80	4.40	2.91	3.03
	12.10	4.00	3.03	
	13.20	4.20	3.14	
0.0005	11.90	5.70	2.09	2.28
	12.05	5.30	2.27	
	12.20	4.90	2.49	

Conclusión:

El límite de detección se establece con la relación que existe entre la señal que proporcionan las muestras analizadas y el ruido del equipo, esta relación tiene que ser tres veces el ruido, por lo tanto, se puede concluir que el límite de detección para niacinamida es de 0.0008 $\mu\text{g/mL}$.

DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN PARA NIACINAMIDA POR HPLC

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Señal (altura)	Ruido (altura)	Relación (Señal/Ruido)	Promedio
0.04	13.00	0.80	16.25	27.42
	13.80	0.30	46.00	
	14.00	0.70	20.00	
0.03	13.50	0.60	22.50	15.92
	13.00	1.00	13.00	
	13.50	1.10	12.27	
0.02	12.70	1.00	12.70	12.18
	13.00	1.00	13.00	
	13.00	1.20	10.83	
0.01	12.80	1.60	8.00	7.74
	13.30	1.60	8.31	
	13.80	2.00	6.90	

Conclusión:

El límite de cuantificación se considera como 10 veces el nivel de ruido, por lo tanto con los resultados obtenidos, la concentración mínima cuantificable para niacinamida es de 0.02 $\mu\text{g/mL}$.

DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN DEL HISOPO PARA NIACINAMIDA POR HPLC

MUESTRAS AGITADAS POR 30 SEGUNDOS

Muestra	Cantidad Adicionada ($\mu\text{g}/50\text{cm}^2$)	Respuesta	Cantidad Recuperada ($\mu\text{g}/50\text{cm}^2$)	Porcentaje recuperado	Promedio y C.V.
1	58.74	153458	58.85	100.19	99.37 % 0.82%
2	58.74	150983	57.90	98.57	
3	58.74	152165	58.35	99.34	

MUESTRAS AGITADAS POR 2 MINUTOS

Muestra	Cantidad Adicionada ($\mu\text{g}/50\text{cm}^2$)	Respuesta	Cantidad Recuperada ($\mu\text{g}/50\text{cm}^2$)	Porcentaje recuperado	Promedio y C.V.
1	58.74	151474	58.58	99.73	98.17 % 1.41%
2	58.74	147508	57.04	97.11	
3	58.74	148360	57.37	97.67	

Conclusión:

En base a los resultados obtenidos se tomará un tiempo de agitación para los hisopos de 30 segundos para la validación por HPLC

DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE HISOPOS A UTILIZAR PARA EL RECOBRO EN PLACA PARA NIACINAMIDA POR HPLC

MUESTRAS CON UN HISOPO

Muestra	Cantidad Adicionada ($\mu\text{g}/50\text{cm}^2$)	Respuesta	Cantidad Recuperada ($\mu\text{g}/50\text{cm}^2$)	Porcentaje recuperado	Promedio y C.V.
1	58.74	151913	59.13	100.66	101.25 % 0.51%
2	58.74	153191	59.63	101.52	
3	58.74	153266	59.66	101.57	

MUESTRAS CON DOS HISOPOS

Muestra	Cantidad Adicionada ($\mu\text{g}/50\text{cm}^2$)	Respuesta	Cantidad Recuperada ($\mu\text{g}/50\text{cm}^2$)	Porcentaje recuperado	Promedio y C.V.
1	58.74	152615	59.48	101.26	101.33 % 0.07%
2	58.74	152823	59.56	101.40	
3	58.74	152762	59.53	101.34	

Conclusión:

En base a los resultados obtenidos, se utilizarán dos hisopos para realizar el recobro en placa para la validación por HPLC

LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA NIACINAMIDA POR HPLC

NIVEL %	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	RESPUESTA (UA)	FACTOR (CONC./AREA) (10^{-5})
25	0.50	21497	2.33
		21912	2.28
		22382	2.23
50	1.00	41257	2.42
		40737	2.45
		40816	2.45
100	2.00	79561	2.51
		80069	2.50
		79405	2.52
150	3.01	118534	2.54
		118179	2.55
		118204	2.55
250	5.01	194873	2.57
		195702	2.56
		194425	2.58
350	7.02	274170	2.56
		273990	2.56
		273497	2.57

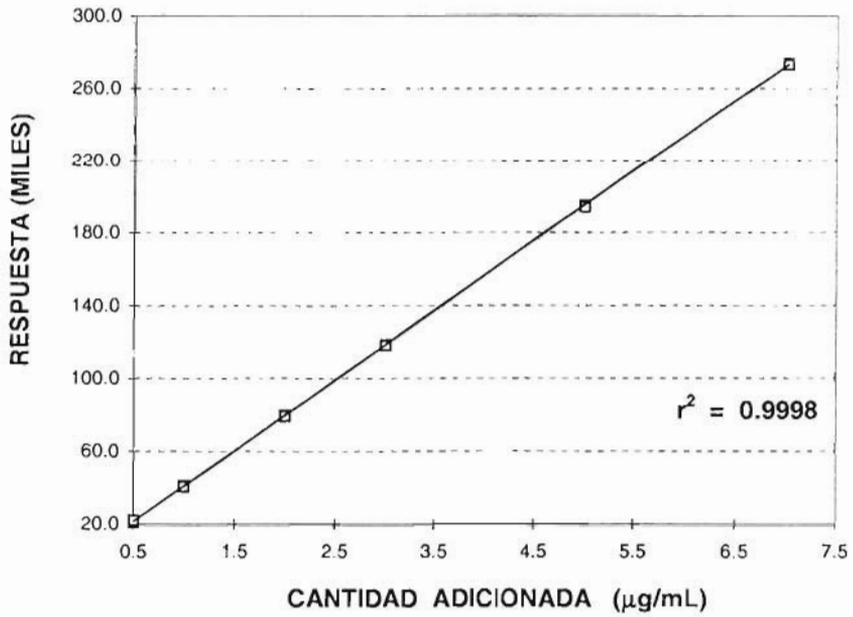
Resultados:

	Obtenido	Criterio de aceptación
Coefficiente de Variación	4.27 %	$\leq 6.0 \%$
r^2	0.9998	≥ 0.98

Conclusión:

El sistema es lineal con una r^2 de 0.9998 y un coeficiente de variación de 4.27 %.

LINEALIDAD DEL SISTEMA NIACINAMIDA



PRECISIÓN DE SISTEMA

CONCENTRACIÓN: 2.0 µg/mL

Respuesta
79561
80069
79405
79483
79760
79449

Resultados:

	Obtenido	Criterio de aceptación
Media	79621	C.V. ≤ 1.5 %
Coefficiente de Variación	0.32 %	

Conclusión:

El sistema es preciso a un nivel de 2.0 µg/mL con un coeficiente de variación de 0.32 %.

LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA NIACINAMIDA POR HPLC

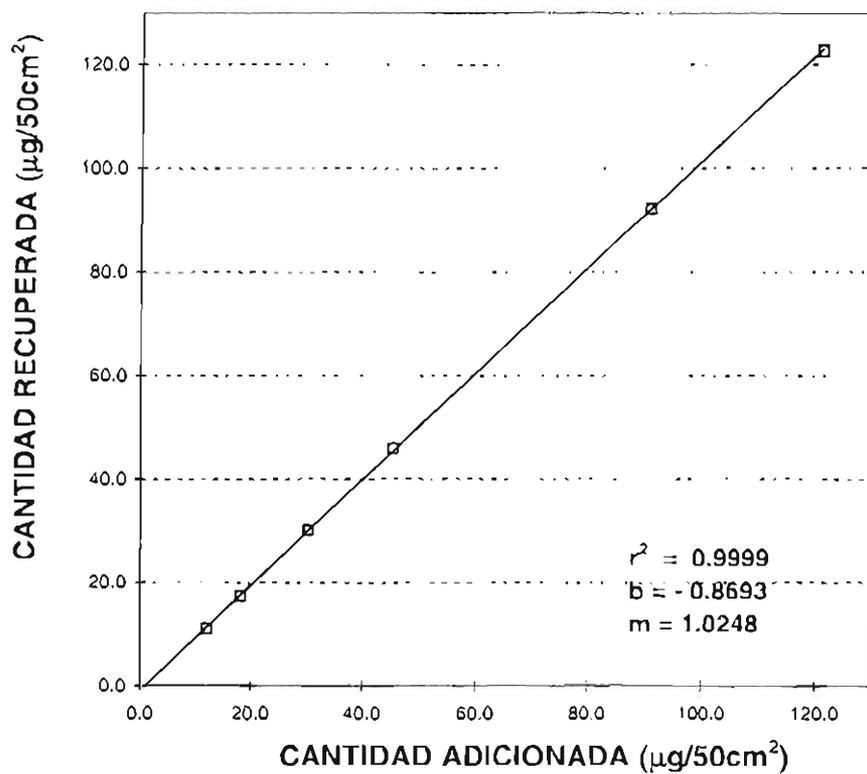
Nivel	Cantidad adicionada ($\mu\text{g}/50\text{cm}^2$)	Respuesta	Cantidad recuperada ($\mu\text{g}/50\text{cm}^2$)	% recuperado	Promedio y C.V.
27-1	12.10	31369	11.24	92.89	X = 93.00 % C.V. = 0.96 %
27-2	12.10	31128	11.15	92.16	
27-3	12.10	31692	11.37	93.97	
40-1	18.16	47052	17.54	96.64	X = 96.47% C.V. = 0.15 %
40-2	18.16	46921	17.49	96.36	
40-3	18.16	46937	17.50	96.42	
67-1	30.25	78524	30.18	99.77	X = 99.94 % C.V. = 0.27 %
67-2	30.25	78882	30.33	100.26	
67-3	30.25	78547	30.19	99.80	
100-1	45.37	118185	46.11	101.63	X = 101.69 % C.V. = 0.12 %
100-2	45.37	118148	46.10	101.61	
100-3	45.37	118407	46.20	101.83	
200-1	90.74	233033	92.24	101.65	X = 101.73 % C.V. = 0.19 %
200-2	90.74	233702	92.51	101.95	
200-3	90.74	232852	92.17	101.58	
267-1	120.99	308353	122.50	101.25	X = 101.53 % C.V. = 0.25 %
267-2	120.99	309897	123.12	101.76	
267-3	120.99	309337	122.89	101.57	

Conclusión:

- El método es lineal con las siguientes características:

	Obtenido	Criterio de aceptación
Media	99.08 %	90.0- 110 %
C. V. Total	3.42 %	≤ 6.0 %
r^2 mayor o igual a 0.98	0.9999	≥ 0.98
pendiente	1.0248	aprox. 1.00
Ordenada al origen	-0.8693	aprox. a 0
Porcentaje de recobro del 100 %	101.69 %	---
C.V. del nivel del 100 %	0.12 %	≤ 6.0 %

LINEALIDAD DE MÉTODO CÁPSULAS MULTIVITAMÍNICAS



EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO POR HPLC

Nivel	Cantidad adicionada ($\mu\text{g}/50\text{cm}^2$)	Respuesta	Cantidad recuperada ($\mu\text{g}/50\text{cm}^2$)	% recuperado	Promedio y C.V.
100-1	47.42	121874	47.60	100.38	X = 99.49 % C.V. = 0.44 %
100-2	47.42	120571	47.07	99.26	
100-3	47.42	120568	47.07	99.26	
100-4	47.42	120669	47.11	99.35	
100-5	47.42	120609	47.09	99.30	
100-6	47.42	120749	47.14	99.41	

Criterio de aceptación:

	Obtenido	Criterio de aceptación
Media	99.5 %	90.0 – 110.0 %
Coficiente de Variación	0.44 %	≤ 6.0 %

Conclusión:

El método es exacto y repetible con un porcentaje de recobro de 99.49 % y un coeficiente de variación de 0.44 %, a un nivel de $47.42 \mu\text{g}/50\text{cm}^2$

REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO PARA NIACINAMIDA

	Analista 1	Analista 2
Día 1	100.32	99.37
	99.37	99.05
	99.69	99.68
Día 2	105.06	108.25
	104.75	107.62
	105.60	107.62
Promedio de los analistas	102.38	103.60
C.V.	2.78	4.48
Promedio global	102.99	
C.V. global	3.62	

Criterio de aceptación:

	Obtenido	Criterio de aceptación
Media	103.0 %	90.0 – 110.0 %
Coeficiente de Variación	3.62 %	≤ 6.0 %

Conclusión:

El método es reproducible por dos analistas en días diferentes con los siguientes resultados

ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO PARA NIACINAMIDA

Muestra	Ángulo de pureza	Ángulo de ruido
Agua	---	---
Fase	---	---
Bco-hisopo	---	---
Bco-placa	---	---
Std hisopo	0.126	0.341
Std placa	0.134	0.709
Placebo hisopo	---	---
Placebo placa	---	---
P.T. hisopo	0.778	3.976
P.T. placa	0.229	5.361

Nota: P.T. es Producto terminado

Criterio de aceptación:

- El placebo no presenta respuesta en el tiempo de retención del principio activo
- Ángulo de pureza menor al ángulo de ruido

Conclusión:

El método es específico para niacinamida

TOLERANCIA DEL MÉTODO PARA NIACINAMIDA POR HPLC

Condición	Muestra	Cantidad adicionada ($\mu\text{g}/50\text{cm}^2$)	Respuesta	Cantidad recuperada ($\mu\text{g}/50\text{cm}^2$)	% Recuperado	Promedio y C.V.
Pic B6: MeOH (72:28)	M1	47.28	126818	49.87	105.48	X = 105.33 % C.V.=0.55%
	M2	47.28	127235	50.03	105.82	
	M3	47.28	125887	49.50	104.70	
Pic B6: MeOH (70:30)	M1	47.28	124856	49.90	105.54	X = 105.58 % C.V.=0.67%
	M2	47.28	125737	50.26	106.30	
	M3	47.28	124071	49.59	104.89	
Pic B6: MeOH (74:26)	M1	47.28	126395	49.74	105.20	X = 105.67 % C.V.=0.60%
	M2	47.28	127817	50.30	106.39	
	M3	47.28	126640	49.84	105.41	

Muestra	Proporción de la fase	Eficiencia	Tiempo de retención	Factor de coeleo
M1	72:28	2975	1.90	1.2
M2		2767	1.89	1.2
M3		2759	1.89	1.2
X =	---	2834	1.89	1.2
M1	70:30	2289	1.83	1.2
M2		2276	1.83	1.2
M3		2284	1.84	1.2
X =	---	2283	1.89	1.2
M1	74:26	2451	1.80	1.1
M2		2501	1.80	1.1
M3		2445	1.80	1.1
X =	---	2446	1.80	1.1

Criterio de aceptación:

La diferencia entre el porcentaje de recobro de la condición normal y de la condición modificada debe de ser menor o igual al 2.0 %.

Conclusión:

El método es tolerable a cambios de más/menos 2% en la composición de la fase móvil ya que se cumple con los criterios de aceptación.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN SOLUCIÓN

Tiempo (horas)	Muestra	Cantidad adicionada ($\mu\text{g}/50\text{cm}^2$)	Respuesta	Cantidad Recuperada ($\mu\text{g}/50\text{cm}^2$)	% Recuperado	Promedio y C.V.
0	M1	47.28	125887	49.50	104.70	X = 105.33 C.V.= 0.55%
	M2	47.28	127235	50.03	105.82	
	M3	47.28	126818	49.87	105.48	
24	M1	47.28	127947	52.14	110.28	X = 109.56 C.V.= 0.58%
	M2	47.28	126802	51.69	109.33	
	M3	47.28	126508	51.57	109.37	

Criterios de aceptación:

Criterio de aceptación	
Media	90.0 – 110.0 %
Coefficiente de Variación	≤ 6.0 %

Conclusión:

La muestra en solución es estable por los menos 24 horas, a temperatura ambiente

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN EL HISOPO

Tiempo (horas)	Muestra	Cantidad adicionada ($\mu\text{g}/50\text{cm}^2$)	Respuesta	Cantidad Recuperada ($\mu\text{g}/50\text{cm}^2$)	% Recuperado	Promedio y C.V.
0	M1	47.28	127197	50.02	105.80	X = 105.02 C.V. = 0.65%
	M2	47.28	125880	49.50	104.70	
	M3	47.28	125704	49.43	104.55	
24	M1	47.28	127072	51.79	109.54	X = 109.80 C.V. = 0.55%
	M2	47.28	128217	52.24	110.49	
	M3	47.28	126854	51.70	109.37	

Criterios de aceptación:

Criterio de aceptación	
Media	90.0 – 110.0 %
Coefficiente de Variación	$\leq 6.0 \%$

Conclusión:

La muestra en el hisopo es estable cuando menos por 24 horas a temperatura ambiente.

Conclusiones Generales:

1. El sistema es lineal en un intervalo de concentración de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ a 7.02 $\mu\text{g/mL}$ con una r^2 de 0.9998 y un CV en todo el intervalo de 4.27 % y preciso en una concentración de 2.0 $\mu\text{g/mL}$ con un C.V. 0.32 %.
2. El método es lineal en un intervalo aproximado de 12.10 $\mu\text{g}/50\text{cm}^2$ a 120.99 $\mu\text{g}/50\text{cm}^2$ con un C.V. total de 3.42 % y una r^2 de 0.9999, los C.V. para cada uno de los niveles son menores al límite del criterio de aceptación.
3. El método es repetible y exacto para una cantidad aproximada de 3.16 $\mu\text{g/mL}$, correspondiente al 100 % con una media del por ciento recuperado de 99.49 % y un C.V. de 0.44 %.
4. El método resultó reproducible, el C.V._{total} de doce análisis de dos analistas en dos días diferentes fue de 3.62 %.
5. El método es específico ya que no se tiene ninguna interferencia en el tiempo de retención de la niacinamida, además de que el ángulo de pureza es menor al ángulo de ruido.
6. El método es tolerable, ya que tolera a cambios de más/menos 2% en la composición de la fase móvil.

7. Las soluciones muestra listas para su análisis son estables cuando menos por un periodo de 24 horas a temperatura ambiente.
8. La cantidad mínima detectable de niacinamida es de 0.0008 $\mu\text{g/mL}$ con un valor promedio de la relación señal/ruido de 3.03.
9. La cantidad mínima cuantificable de niacinamida es de 0.02 $\mu\text{g/mL}$ con un valor promedio de la relación señal/ruido de 12.18.
10. En base a los resultados obtenidos las condiciones en que se llevará a cabo el tratamiento de las muestras es: Utilizar 2 hisopos para el raspado de las placas con un tiempo de agitación de 30 segundos.

**PROTOCOLO DE DESARROLLO Y
VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR
CARBONO ORGÁNICO TOTAL**

PROTOCOLO DE DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR CARBONO ORGÁNICO TOTAL

OBJETIVO:

1. Desarrollar y validar un método analítico para la determinación de limpieza por Carbono Orgánico Total en el equipo utilizado en la fabricación de cápsulas polivitamínicas.

MÉTODO:

Equipos y/o instrumentos :

Analizador -TOC 5000A Shimadzu
Balanza analítica Sartorius BP301
Baño de ultrasonido Branson 2210
Hisopos (Large Alpha Swab) TX714 A Texwipe
Material de vidrio perfectamente limpio
Guantes de látex
Procesador DELL Optiplex 6X1
Monitor SPECTRUM 4Vn
Generador de gas TOC
Impresora Hewlett Packard Deskjet 670C
Vortex maxi mix II Thermolyne

Micropipetas 200 y 1000 μ L

Papel parafilm

Papel aluminio

Papel indicador de pH

Reactivos:

Agua con bajo contenido de carbono

Ácido clorhídrico RA J.T. BAKER

Antecedentes:

Los criterios de aceptación se calcularon por equipo, tomando en cuenta los productos que se fabrican en él, eligiendo "el peor de los casos". La elección del peor de los casos, de acuerdo a la política de limpieza de Nysco de México es la combinación de los datos de la dosis mínima diaria del producto que tenga la DL_{50} más pequeña del grupo de productos, la dosis máxima diaria más grande en unidades de dosis y el tamaño de lote más pequeño del grupo de productos. Para determinar cuál sería el criterio de aceptación se realizaron los cálculos correspondientes, en base a la fórmula de límite de producto subsecuente de Validated Cleaning Technologies for Pharmaceutical Manufacturing por Destin A. LeBlanc.

Para los equipos en donde no se puede muestrear por raspado en superficie se determinará por agua de enjuague tomando 10.00 ppm como criterio de aceptación, sin realizar cálculos debido a que no hay fórmulas para dicho cálculo.

Los criterios de aceptación para los equipos utilizados en la fabricación de cápsulas polivitamínicas, obtenidos utilizando las fórmulas vistas anteriormente son:

Equipo	Criterio de aceptación (ppm de carbono)
Molino Fitzmill.	1.42
Tamizador oscilante.	3.32
Mezclador de pantalón.	2.08
Encapsuladora BOSCH.	5.60
Pulidora de cápsulas.	7.37

Preparación de soluciones:

Solución 2N de ácido clorhídrico: Transferir 17 mL de ácido clorhídrico R.A. a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con agua con bajo contenido de carbono y mezclar.

Preparación de la solución patrón:

Peso de la muestra: 296 mg

Volumen de dilución: 0.05 L

Cantidad de carbono en la formulación: 0.4238 mg de carbono/ mg de producto

$$\frac{296 \text{ mg de producto} \times 0.4238 \text{ mg de carbono / mg de producto}}{0.05 \text{ L}} = 2508.90 \text{ ppm de carbono}$$

Cálculos para la preparación de las soluciones para la linealidad del método:

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN A (2007.12 ppm de carbono)

Alícuota de la solución patrón: 20 mL

Volumen de dilución: 25 mL

$$\frac{2508.90 \text{ ppm de carbono} \times 20 \text{ mL}}{25 \text{ mL}} = 2007.12 \text{ ppm de carbono}$$

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN B (1003.56 ppm de carbono)

Alícuota de la solución patrón: 10 mL

Volumen de dilución: 25 mL

$$\frac{2508.90 \text{ ppm de carbono} \times 10 \text{ mL}}{25 \text{ mL}} = 1003.56 \text{ ppm de carbono}$$

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN C (501.78 ppm de carbono)

Alícuota de la solución patrón: 5 mL

Volumen de dilución: 25 mL

$$\frac{2508.90 \text{ ppm de carbono} \times 5 \text{ mL}}{25 \text{ mL}} = 501.78 \text{ ppm de carbono}$$

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN D (200.71 ppm de carbono)

Alicuota de la solución patrón: 2 mL

Volumen de dilución: 25 mL

$$\frac{2508.90 \text{ ppm de carbono} \times 2 \text{ mL}}{25 \text{ mL}} = 200.71 \text{ ppm de carbono}$$

A continuación se resume en la siguiente tabla la preparación de las soluciones que se utilizaran para cargar las placas de los diferentes niveles de la linealidad del método:

Nivel	Alicuota de la solución patrón (mL)	Dilución	Concentración teórica de carbono (ppm)	Solución
200	20	25	2007.12	A
100	10	25	1003.56	B
50	5	25	501.78	C
20	2	25	200.71	D

DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

Determinación del tiempo óptimo de burbujeo:

Cargar 12 hisopos con 0.150 mL de la solución B, colocarlos en un vial de alta sensibilidad, adicionar 30 mL de agua y realizar la extracción agitando seis muestra por 30 segundos y seis por 2 minutos; al termino de la agitación, adicionar 0.100 mL de ácido clorhídrico 2 N y leer en el equipo burbujeando tres muestras de 30 segundos de agitación y tres muestras de 2 minutos de agitación por 2 minutos de burbujeo, repetir la misma operación pero con 4 minutos de burbujeo.

Determinación del tiempo de extracción y del número de hisopos a utilizar:

Cargar 6 placas con 0.150 mL de la solución B. Realizar el muestreo de tres placas, con un hisopo y las otras tres placas con dos hisopos, colocando los hisopos en un vial de alta sensibilidad, adicionar 30 mL de agua y realizar la extracción agitando tres muestra por 30 segundos y tres por 2 minutos, al termino de la agitación adicionar 0.100 mL de ácido clorhídrico 2 N y leer en el equipo.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Linealidad de sistema:

Para evaluar la linealidad del sistema preparar una curva de calibración con cinco puntos que cubra el intervalo de 500 a 20000 ppb carbono, utilizando una solución estándar de sacarosa de 25000 ppb de carbono. (Solución stock)

Solución de referencia de sacarosa de 500 ppb de carbono:

Transferir una alícuota de 2 mL de la solución stock de sacarosa, a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con agua con bajo contenido de carbono y agitar. Transferir 30 mL de esta solución a un vial, adicionar 0.100 mL de ácido clorhídrico 2 N y leer en el equipo.

Solución de referencia de sacarosa de 1000 ppb de carbono:

Transferir una alícuota de 4 mL de la solución stock de sacarosa, a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con agua con bajo contenido de carbono y agitar. Transferir 30 mL de esta solución a un vial, adicionar 0.100 mL de ácido clorhídrico 2 N y leer en el equipo.

Solución de referencia de sacarosa de 5000 ppb de carbono:

Transferir una alícuota de 20 mL de la solución stock de sacarosa, a un matraz volumétrico de 100 mL. llevar a volumen con agua con bajo contenido de carbono y agitar. Transferir 30 mL de esta solución colocándola en un vial y adicionar 0.100 mL de ácido clorhídrico 2 N y leer en el equipo

Solución de referencia de sacarosa de 10000 ppb de carbono:

Transferir una alícuota de 20 mL de la solución stock de sacarosa, a un matraz volumétrico de 50 mL, llevar a volumen con agua con bajo contenido de carbono y agitar. Transferir 30 mL de esta solución a un vial, adicionar 0.100 mL de ácido clorhídrico 2 N y leer en el equipo.

Solución de referencia de sacarosa de 20000 ppb de carbono:

Transferir una alícuota de 20 mL de la solución stock de sacarosa, a un matraz volumétrico de 25 mL, llevar a volumen con agua con bajo contenido de carbono y agitar. Transferir 30 mL de esta solución a un vial, adicionar 0.100 mL de ácido clorhídrico 2 N y leer en el equipo

Precisión del sistema:

Evaluarla con una concentración de 5000 ppb de carbono:

Transferir una alícuota de 20 mL de la solución stock de sacarosa, a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con agua con bajo contenido de carbono y agitar. Transferir 30 mL de esta solución a un vial, adicionar 0.100 mL de ácido clorhídrico 2 N y leer en el equipo. Preparar la muestra por sextuplicado.

Linealidad del Método:

Cargar tres placas con 0.150 mL de la solución stock (2508.9 ppm de carbono), tres placas con 0.150 mL de la solución A (2007.12 ppm de carbono), tres placas con 0.150 mL de solución B (1003.56 ppm de carbono), tres placas con 0.150 mL de solución C (501.78 ppm de carbono) y tres placas con 0.150 mL de solución D (200.71 ppm de carbono) equivalente a 250 %, 200 % , 100 %, 50%, y 20% respectivamente. Realizar el muestreo de las placas, cada una con dos hisopos, agregar el volumen indicado de agua con bajo contenido de carbono y agitar de acuerdo al tiempo establecido.

Repetibilidad y Exactitud del Método:

Cargar 6 placas con 0.150 mL de solución B. Realizar el muestreo de las seis placas, cada una con dos hisopos, agregar el volumen indicado de agua con bajo contenido de carbono y agitar de acuerdo al tiempo establecido.

Reproducibilidad:

Cargar 3 placas con 0.150 mL de solución B. Realizar el muestreo de las placas, cada una con dos hisopos. agregar el volumen indicado de agua con bajo contenido de carbono y agitar de acuerdo al tiempo establecido. Analizar 3 muestras al nivel del 100% por dos analistas en dos corridas diferentes.

Estabilidad de la muestra en solución (preparar la muestra por triplicado):

Colocar en un vial un hisopo cargado previamente con 0.150 mL de la solución B, adicionar otro hisopo al vial, agregar 30 mL de agua con bajo contenido de carbono. Prepara y transferir muestras a tres viales identificadas con "Tiempo 0 horas", preparar tres muestras e identificar como "Tiempo 24 horas", preparar tres muestras e identificar como "Tiempo 48 horas", preparar las muestras a analizar y leer las muestras de acuerdo al método desarrollado. La agitación de las muestras de los tiempos diferentes se realiza el día en que se efectúa la determinación.

Tratamiento de las muestras

De las muestras preparadas llevar acabo los siguientes pasos:

- a) Tapar el vial con papel aluminio
- b) Agitar la muestra en vortex por 30 segundos.
- c) Destapar el vial y sacar las cabeza de los hisopos
- d) Agregar 0.100 mL de solución de HCl 2 N utilizando una micropipeta.
- e) Leer en el equipo.

PROCEDIMIENTO:

Verificar que la calibración y la adecuabilidad del equipo estén vigentes.

Condiciones de análisis.

Tipo de análisis: NPOC (Carbono Orgánico No Purgable)

Rango: 1

No. máximo de inyecciones: 5

S.D. máx: 200

C.V. Max: 2

Tiempo de burbujeo: 2 minutos

No. de enjuagues: 2 %

Adición de ácido: 0.100 mL

Curva de calibración: La curva vigente al momento del análisis

Inyectar las muestras

CÁLCULOS

Calcular el contenido de carbono en la muestra de acuerdo a la siguientes fórmulas:

C_r = Lecturas de la muestra en ppm de carbono - Lecturas del blanco en ppm de carbono.

$$C_a = \frac{C_r}{F_r}$$

donde:

C_r = Cantidad recuperada (ppm de carbono)

C_a = Cantidad ajustada (ppm de carbono)

F_r = Factor de recobro de las cápsulas polivitamínicas (promedio del porcentaje de recobro del nivel del 100 % de la linealidad del método)

**REPORTE DE VALIDACIÓN DEL
MÉTODO POR CARBONO ORGÁNICO
TOTAL**

DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE BURBUJEO Y EXTRACCIÓN

Muestra	Cantidad teórica adicionada (ppm carbono)	Lectura de carbono (ppm carbono)	Cantidad recuperada (ppm carbono)	Porcentaje de recobro	Promedio
Extracción en el hisopo con 30 segundos de agitación y 4 minutos de burbujeo					
1	5.02	5.69	4.99	99.40	94.82 %
2	5.02	5.36	4.66	92.83	
3	5.02	5.33	4.63	92.23	
Blanco hisopo	0.70		Coeficiente de variación		4.20 %
Extracción en el hisopo con 2 minutos de agitación y 4 minutos de burbujeo					
1	5.02	5.22	4.48	89.24	93.29 %
2	5.02	5.46	4.72	94.02	
3	5.02	5.59	4.85	96.61	
Blanco hisopo	0.74		Coeficiente de variación		4.01 %
Extracción en el hisopo con 30 segundos de agitación y 2 minutos de burbujeo					
1	5.02	5.60	4.92	98.01	96.35 %
2	5.02	5.49	4.81	95.82	
3	5.02	4.46	4.78	95.22	
Blanco hisopo	0.68		Coeficiente de variación		1.52 %
Extracción en el hisopo con 2 minutos de agitación y 2 minutos de burbujeo					
1	5.02	5.32	4.53	90.24	90.11 %
2	5.02	5.29	4.50	89.64	
3	5.02	5.33	4.54	90.44	
Blanco hisopo	0.79		Coeficiente de variación		0.46 %

Conclusión:

- La muestra se agitará por 30 segundos con 2 minutos de burbujeo.

DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE HISOPOS A UTILIZAR PARA EL RECOBRO EN PLACA

Muestra	Cantidad teórica adicionada (ppm carbono)	Lectura de carbono (ppm carbono)	Cantidad recuperada (ppm carbono)	Porcentaje de recobro	Promedio
Muestreo por raspado utilizando un hisopo					
1	5.02	5.57	4.59	91.43	96.08 %
2	5.02	5.48	4.50	89.64	
3	5.02	6.36	5.38	107.17	
Blanco hisopo	0.98		Coefficiente de variación	10.04 %	
Muestreo por raspado utilizando dos hisopos					
1	5.02	6.29	5.15	102.59	106.44 %
2	5.02	6.20	5.06	100.80	
3	5.02	6.96	5.82	115.94	
Blanco hisopo	1.14		Coefficiente de variación	7.77 %	

Conclusión:

- Se utilizarán 2 hisopos para realizar el recobro en placa.

PRECISIÓN DEL SISTEMA POR TOC

Concentración 5.02 ppb de carbono

Respuesta.
7477
7426
7399
7494
7564
7496

	Obtenido	Criterio de aceptación
Media	7476	
Coefficiente de variación	0.78 %	$\leq 10 \%$

Conclusión:

- El sistema es preciso con un C.V. del 0.78% para la concentración del 100 %.

LINEALIDAD DEL SISTEMA POR TOC

Nivel	Alícuota	Volumen de dilución (mL)	Concentración de carbono (ppb)	Respuesta (área)
1	0	0	0	514
2	2	100	500	1169
3	4	100	1000	1843
4	20	100	5001	7557
5	20	50	10003	13979
6	20	25	20006	27397

Criterio de aceptación y resultados:

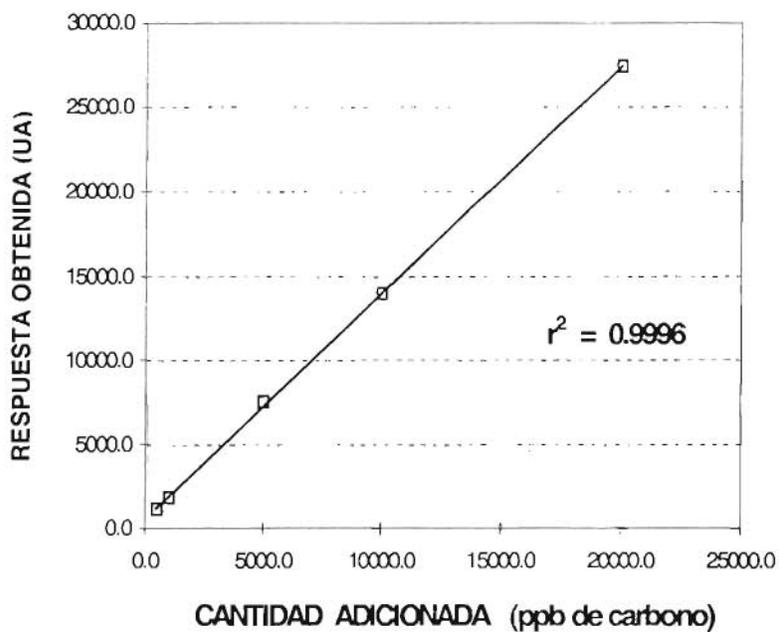
	Obtenido	Criterio de aceptación
Coefficiente de correlación (r^2).	0.9996	≥ 0.98

Conclusión:

- El sistema es lineal en el intervalo de concentraciones de 0 a 20006 ppb de carbono.

LINEALIDAD DEL SISTEMA

Sacarosa



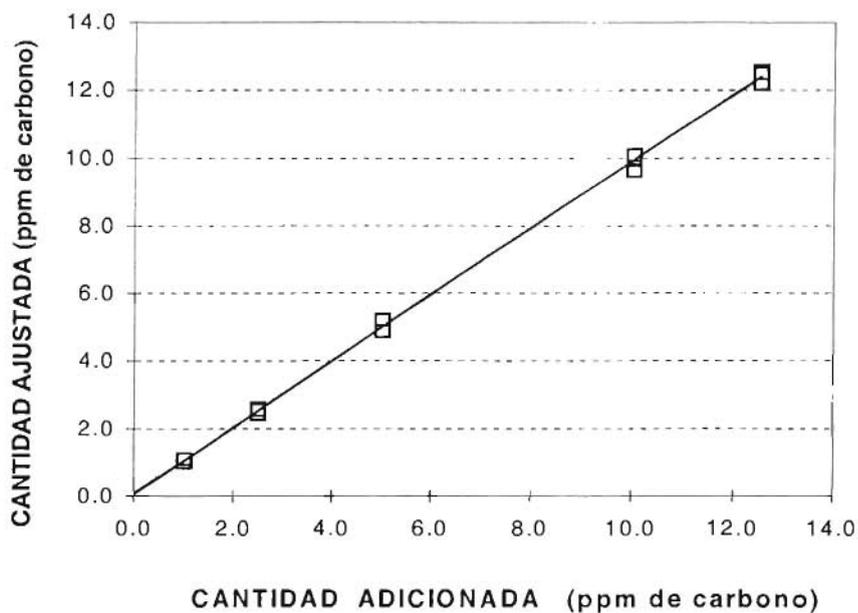
LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA CÁPSULAS POLIVITAMÍNICAS POR TOC

Nivel %	Cantidad adicionada (ppm carbono)	Cantidad recuperada (ppm carbono)	Porcentaje de recobro	Promedio %	Cantidad ajustada (ppm carbono)	C.V.
20	1.00	1.00	100.00	103.33	1.02	5.48 %
	1.00	1.00	100.00		1.02	
	1.00	1.10	110.00		1.12	
50	2.51	2.58	102.79	99.74	2.63	3.64 %
	2.51	2.40	95.62		2.45	
	2.51	2.53	100.80		2.58	
100	5.02	4.84	96.41	98.14	4.93	3.82 %
	5.02	5.14	102.39		5.24	
	5.02	4.80	95.62		4.89	
200	10.04	9.45	94.12	96.85	9.63	2.50 %
	10.04	9.81	97.71		10.00	
	10.04	9.81	98.71		10.10	
250	12.54	11.96	95.37	97.29	12.19	1.70 %
	12.54	12.36	98.56		12.59	
	12.54	12.28	97.37		12.51	

Criterio de aceptación y resultados:

	Obtenido	Criterio de aceptación
Media	99.07 %	---
Coefficiente de variación total	4.02 %	≤ 10 %
Coefficiente de correlación (r^2)	0.9989	≥ 0.98
Pendiente	0.9831	aprox. 1.00
Ordenada al origen	0.0761	aprox. a 0
Porcentaje de recobro del 100 %	98.14 %	---
Coefficiente de variación para el nivel del 100 %	3.82 %	≤ 10 %

LINEALIDAD DEL MÉTODO CÁPSULAS POLIVITAMÍNICAS



REPETIBILIDAD Y EXACTITUD DEL MÉTODO PARA CÁPSULAS POLIVITAMÍNICAS POR TOC

Nivel %	Cantidad adicionada (ppm carbono)	Cantidad recuperada (ppm carbono)	Porcentaje de recobro	Promedio y C.V.	Cantidad ajustada (ppm carbono)	Promedio y C.V.
100	5.02	4.84	96.41	X = 95.39 % C.V. = 4.57%	4.93	X = 4.88 C.V. = 4.55 %
	5.02	5.14	102.39		5.24	
	5.02	4.80	95.62		4.89	
	5.02	4.83	96.22		4.92	
	5.02	4.62	92.03		4.71	
	5.02	4.50	89.64		4.59	

Criterio de aceptación y Resultados:

	Obtenido	Criterio de aceptación
Media	4.88	---
Coefficiente de variación	4.55 %	≤ 10 %

REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO PARA CÁPSULAS POLIVITAMÍNICAS POR TOC

Analista Día	Cantidad adicionada (ppm carbono)	Cantidad ajustada recuperada (ppm carbono)	Promedio individual	
A1 D1	5.02	4.84	5.03	
	5.02	5.14		
	5.02	4.80		
A1 D2	5.02	5.28		
	5.02	5.05		
	5.02	5.08		
A2D1	5.02	5.05		5.26
	5.02	5.14		
	5.02	5.98		
A2 D2	5.02	5.09		
	5.02	5.17		
	5.02	5.12		
Promedio global		5.15		
Desviación estándar global		0.29		
C.V.τ		5.72 %		

Criterio de aceptación y resultados:

	Obtenido	Criterio de aceptación
Media	5.15	---
Coefficiente de variación	5.72 %	≤ 10 %

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN EL HISOPO PARA CÁPSULAS POLIVITAMÍNICAS POR TOC

Muestra	Cantidad adicionada (ppm carbono)	Cantidad ajustada recuperada (ppm carbono)	Porcentaje recuperado	Promedio y C.V.
0 horas	5.02	5.19	103.39	X = 104.58 % C.V.= 1.38 %
	5.02	5.33	106.18	
	5.02	5.23	104.18	
24 horas	5.02	5.22	103.98	X = 104.38 % C.V.= 1.19 %
	5.02	5.31	105.78	
	5.02	5.19	103.39	
48 horas	5.02	5.36	106.77	X = 107.04 % C.V.= 0.78 %
	5.02	5.42	107.97	
	5.02	5.42	106.37	

Criterio de aceptación y resultados:

	Obtenido	Criterio de aceptación
Media	5.29	---
Coefficiente de variación total	1.56 %	≤ 10 %

Conclusiones Generales:

1. El sistema es lineal en un intervalo de concentración de 0 ppb a 20006 ppb una r^2 de 0.9996 y una precisión a una concentración de 5.02 $\mu\text{g/mL}$ con un C.V. 0.78 %.
2. El método es lineal en un intervalo aproximado de 1.00 a 12.54 $\mu\text{g/mL}$ con un C.V. total de 4.02 % y una r^2 de 0.9989, los C.V. para cada uno de los niveles son menores al límite del criterio de aceptación.
3. El método es exacto y repetible para una cantidad aproximada de 5.02 $\mu\text{g/mL}$, correspondiente al 100 % con una media de la cantidad recuperada ajustada de 4.88 $\mu\text{g/mL}$ y un CV de 4.55%
4. El método resultó reproducible, el CV, de doce análisis de dos analistas en dos días diferentes fue de 5.72 %.
5. Las soluciones muestra lista para su análisis son estables cuando menos por un período de 48 horas a temperatura ambiente.
6. En base a los resultados obtenidos las condiciones en que se llevará a cabo el tratamiento de las muestras es: Utilizar 2 hisopos para el raspado de las placas con un tiempo de agitación de 2 minutos y un tiempo de burbujeo de 30 segundos.

CAPÍTULO 4

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Con base en los resultados obtenidos por ambos métodos analíticos se demostró que la limpieza de los equipos utilizados en la fabricación de las cápsulas polivitamínicas puede ser evaluada por cualquiera de los métodos propuestos en este trabajo, ya que cada método cumple con los criterios establecidos en cada una de las pruebas realizadas durante la validación.

Con resultados obtenidos en la linealidad del método para ambas técnicas analíticas, se realizó la comparación mediante el método estadístico de distribución de F de Fisher como se muestra a continuación.

Tabla 1. Resultados obtenidos en la linealidad del método para las cápsulas polivitamínicas, (A) método por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), (2) Método por carbono orgánico total

Método por HPLC (A)			Método por TOC (B)		
Cantidad adicionada ($\mu\text{g}^*/50\text{cm}^2$)	Cantidad recuperada ($\mu\text{g}^*/50\text{cm}^2$)	Porcentaje de recobro (%)	Cantidad adicionada (ppm carbono)	Cantidad ajustada recuperada (ppm carbono)	Porcentaje de recobro (%)
18.16	17.54	96.59	1.00	1.02	100.00
18.16	17.49	96.31	1.00	1.02	100.00
18.16	17.50	96.37	1.00	1.12	110.00
30.25	30.18	99.77	2.51	2.63	102.79
30.25	30.33	100.26	2.51	2.45	95.62
30.25	30.19	99.80	2.51	2.58	100.80
45.37	46.11	101.63	5.02	4.93	96.41
45.37	46.10	101.61	5.02	5.24	102.39
45.37	46.20	101.83	5.02	4.89	95.52
90.74	92.24	101.65	10.04	9.62	94.12
90.74	92.51	101.95	10.04	10.00	97.71
90.74	92.17	101.58	10.04	10.10	97.71
120.99	122.50	101.25	12.54	12.19	95.37
120.99	123.12	101.76	12.54	12.59	98.56
120.99	122.89	101.57	12.54	12.51	97.93

* μg = microgramos de niacinamida

Para realizar la comparación de los dos métodos analíticos, primeramente se propondrán las hipótesis

H_0 = los métodos son iguales

H_1 = los métodos son diferentes

1. Cálculo de Σx y Σx^2 para cada método analítico

Método por HPLC (A)		Método por TOC (B)	
Porcentaje de recobro (%)		Porcentaje de recobro (%)	
ΣX	1503.9248	ΣX	1485.0334
ΣX^2	150848.3352	ΣX^2	147244.8484
n_A	15	n_B	15

2. Cálculo de varianza de cada método

Para el método A

$$\sigma_A^2 = \frac{15 \times 150848.3352 - 1503.9248^2}{15(15-1)} = 4.4537$$

Para el método B

$$\sigma_B^2 = \frac{15 \times 147244.8484 - 1485.0334^2}{15(15-1)} = 15.9459$$

3. Determinación de la varianza mayor:

$$\sigma_A^2 = 4.4537$$

$$\sigma_B^2 = 15.9459$$

La varianza mayor es la σ^2_2

El cociente de la varianza de los dos métodos es

$$F_{\text{exp}} = \frac{\sigma_B^2}{\sigma_A^2} = \frac{15.9459}{4.4537} = 3.58$$

4. Determinación de F teórico de tablas ($F_{14,14}$) con un $\alpha = 0.975$ y $\alpha = 0.025$

$$F_{0.025} = 0.34$$

$$F_{0.975} = 2.98$$

5. Cálculo del intervalo de confianza para la razón de la varianza

$$\frac{15.9459}{4.4537} \times 0.34 \leq \frac{\sigma_B^2}{\sigma_A^2} \leq \frac{15.949}{4.4537} \times 2.98$$

intervalo de confianza para la razón de la varianza

$$1.2173 \leq \frac{\sigma_B^2}{\sigma_A^2} \leq 10.669$$

El valor del cociente de la varianza de los métodos analíticos (σ_B^2/σ_A^2) es de 3.58, este valor cae dentro del intervalo de confianza para la razón de la varianza, por lo que los métodos analíticos son significativamente diferentes demostrándose así que los métodos evaluados en este trabajo para determinar la limpieza de los equipos de fabricación son totalmente diferentes, aceptándose H_1 , ésto se debe principalmente a que cada uno presenta diferentes características propias de cada método, a continuación se comentarán algunas de las características.

La especificidad es una característica importante en cada uno de los métodos, mientras que para un método se cumple esta característica específica como es el caso de HPLC, para el otro se pierde esta especificidad, además ésto se ve claramente por el tamaño del valor de la desviación poblacional del método, es decir el valor de la desviación poblacional por la técnica de HPLC es menor en comparación con la desviación poblacional por la técnica analítica desarrollada por TOC

Otra característica importante es la sensibilidad que presenta cada una de las técnicas analíticas para detectar al analito de interés, como se pudo ver el método analítico desarrollado por TOC es un método muy sensible, por él se logra determinar cualquier contaminación debida a cualquier fuente orgánica, de esta forma se pudo determinar fácilmente mínimas cantidades de carbono orgánico, en donde este carbono puede provenir no solamente de la muestra sino este carbono puede provenir de alguna contaminación orgánica como pueden ser microorganismos, detergentes utilizados en el lavado del equipo, polvo, excipientes de la formulación, etc. Mientras que por HPLC la respuesta obtenida se debió únicamente a la presencia de niacinamida, además de que la cantidad mínima de niacinamida detectable es mayor o igual al límite de detección (LD) siendo esta concentración de 0.0008 μg de niacinamida / mL, lo que hizo más difícil la cuantificación de trazas de niacinamida en los equipos de fabricación.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

Se puede concluir el presente trabajo diciendo que la técnica de carbono orgánico total (TOC) es mucho más sensible para realizar la evaluación de limpieza de los equipos utilizados en la fabricación de cápsulas polivitamínicas y que es una técnica muy barata en comparación con la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), pues los costos por TOC son muy reducidos puesto que no se necesita una gran variedad de reactivos para poder ser utilizada, además de tener la sensibilidad para determinar contaminaciones no sólo debidas a materias primas de los productos de fabricación sino también a cualquier contaminante que se encuentre constituido por carbono orgánico, haciendo de este un método mucho mas útil en la industria farmacéutica porque además de ser muy sensible, es muy rápido, lo que actualmente le interesa demasiado a la industria farmacéutica.

CAPÍTULO 6

BIBLIOGRAFÍA

1. Ruey-Ching, H.; Kowalski, Donna.; Diseño de Procesos y Análisis de Datos para la Validación de Limpieza, *Pharmaceutical Technology*, Abril-Junio, 1997, pp 31-34.
2. LeBlanc, Destin A.; Establecimiento de los Criterios de Aceptación Científicamente Justificados para la Validación de Limpieza en Productos Farmacéuticos Terminados, *Pharmaceutical Technology*, Enero-Febrero, 1999, pp 33-39.
3. Jenkins, K.M.; Vanderwieken, A.J.; Amstromng, J.A.; Application of Total Organic Analysis to Cleaning Validation, *Technology/Applications, J. Pharm. Sci. & Tech.*, Noviembre de 1994, 50(1), pp 6-15

4. Flores T.F.; Garzón, S.A.; Domínguez S.I.; Victoria A.P.; Comparación de Dos Métodos Analíticos Aplicables en Validación de Procedimientos de Limpieza, Nysco de México, S.A. de C.V., 1998.
5. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, PLM, 2001
6. The Merk Index. 10^a Edición, 1996; pp 350, 681, 1125, 1595.
7. Wade, A., Jweller p.; Handbook of Pharmaceutical Excipients, 1994, 2^a Edition, American Pharmaceutical Association,
8. Osborne,; Análisis de los Nutrientes de los Alimentos, 1996, Editorial Acribia, Zaragoza España, pp 976-980
9. Guía para la Inspección de la Validación de Procesos de Limpieza, Material Recopilado por la Asociación Farmacéutica Mexicana AMF. Julio, 1993, pp 6-7.
10. Frederick, J. Carleton,; Validation of Aseptic Pharmaceutical Proceses, Capitulo 1, Marcel Dekker, Inc, pp 1-16
11. Frederick, J. Carleton,; Validation of Aseptic Pharmaceutical Proceses, Capitulo 2, Marcel Dekker, Inc, pp 17 – 27
12. LeBlanc, Destin A.; Danforth D. Douglas,; Cleaning Technology for Pharmaceutical Manufacturing, *Pharmaceutical Technology*, 17 (10), 1993, pp 118-124

13. Agalloco, James,; Points to Consider in the Validation of Equipment Cleaning Procedures, *Journal of Parenteral Science and Technology*, Vol 46, No. 5, 1992, pp 163 – 168
14. Procesos de Limpieza y su Validación en Áreas de Fabricación, Guía de Buenas Practicas de Fabricación (CIPAM), 1ª Edición, Monografía Técnica, No. 16. 1999
15. Jenkins, A.J. Vanderwielen,; Cleaning Validation: An Overall Perspective, *Pharmaceutical Technology*, 18(4), 1994, pp 60 – 73
16. Ruey-Ching Hwang,; Process Design and Data Analysis for Cleaning Validation, *Pharmaceutical Technology*, 21 (1), 1997, pp 62 – 68
17. Toma de Muestra por Raspado de Superficie para la Validación de Limpieza, Nysco de México S.A. de C.V.
18. Fourman, G.L.; Mullen M.V.; Determining Cleaning Validation Acceptance Limits for Pharmaceutical Manufacturing Operations, *Pharmaceutical Technology*, Vol 17, No. 4, 1993, pp 54 – 60.
19. Richard J. Forsyth y Dorothy V. Haynes,; Validación de Limpieza en una Instalación de Investigación Farmacéutica., *Pharmaceutical Technology*, Noviembre-diciembre, 1998.

20. Cálculo de los Criterios de Aceptación para la Validación de los Procedimientos de Limpieza Utilizando Muestreo por Raspado de Superficie. Nysco de México S.A. de C.V.
21. Validación de Limpieza de Equipos de Producción en la Industria Farmacéutica, Versión Electrónica del Boletín Informativo de Jenck S.A. Octubre, 2000 Dirección: http://www.Innovación_Oct_2000_validacion_de_limpieza.htm
22. Advanced Instruments de México S.A. de C.V. Manejo del Software del analizador de Carbono Orgánico Total Shimadzu, PNO A 046, Nysco de México SA de CV.
23. Procedimientos para la Validación de Métodos Analíticos por HPLC, Nysco de México S.A. de C.V., 1999, p 5
24. Introducción a la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana (UAM)
25. Manual de Analítica Instrumental II, Facultad de Química (UNAM), 1997. pp 22 - 25
26. Trejo L., Martha A.; Desarrollo y Validación de un Método Analítico para la Determinación Cuantitativa del Palmitato de Vitamina A por HPLC en un Inyectable, 13 de Enero de 1994

27. Fundamentos de Cromatografía de Líquidos de Alta Presión, Waters S.A. de C.V., 2000, México
28. Operator's Guide Waters 996 PDA Detector. Waters, 1997: pp 5-4 – 5-8.
29. Quinto Suplemento USP-NF 24 <643> Total Carbonic Total / Physical Test. pp 3464 – 3465
30. Jenkins, K.M.; Vanderwielen, A.; Application of total Organic Carbon Analysis to Cleaning Validation, J. Pharm. Sci.& Tech, 50(1), 1996, pp 6 – 15
31. W Plugge and Van der Viles, Aplicación de Análisis del Carbono Orgánico Total en la Validación de Métodos de limpieza, *Advanced Instruments de México SA de CV*, Farma News, 1997, pp 22-23.
32. Desarrollo de Métodos Analíticos por Determinación de TOC, PNO A 042 Nysco de México S. A. de C.V.
33. TOC y la Validación de Procedimientos de Limpieza, Advanced Instruments de México S.A. de C.V. Mayo, 2001.
34. Cotton, R.R.; Métodos Estadísticos. CECSA, España, 1997; pp 138 – 142.