UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

"DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA UN MEDICAMENTO CON 2 FÁRMACOS (Loratadina y Pseudoefedrina)"

TRABAJO PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN QUÍMICA INDUSTRIAL

PRESENTA:
JOSÉ FELIPE CABRERA MARTÍNEZ

ASESOR: *DR. ENRIQUE RAMÓN ÁNGELES ANGUIANO*

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO DE MEX. 2006

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

Agradecimientos

A:

El Dr. Enrique R. Ángeles Anguiano *por el apoyo, orientación y paciencia que me otorgó para la elaboración del presente trabajo*

Laboratorios Zerboni S.A. *por la oportunidad de ser miembro de ésta empresa y por la autorización de la metodología que se incluye en el trabajo para mi titulación*

El QFI. Martín Villa de Ávila y Biotecnólogo Rubén Rosas Santos *por la capacitación obtenida en el desempeño de mis labores así como la orientación que recibí para la realización del presente trabajo profesional*

Dedicatorias

A:

Mis padres:

Gloria del Carmen Martínez de la Fuente y José Cabrera León *por la entrega, la educación, el trabajo y la vida dedicada a sus hijos así como las enseñanzas que me han dado la fortaleza de afrontar con ayuda de Dios toda adversidad*

Mis Hermanos:

Araceli, David, Francisco y Gabriel *por el apoyo y su ejemplo de trabajo que me impulsa a seguir adelante*

A el amor de mi vida:

Anabel Moreno Gurrola *por tu infinita paciencia, tus consejos, tu motivación y sobretodo el amor que me brindas que me han hecho más fuerte y una mejor persona*

ÍNDICE

OBJETIVO GENERAL 3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS 3
PRÓLOGO 4
INTRODUCCIÓN 4
DESCRIPCION DEL DESEMPEÑO PROFESIONAL 6
Descripción de la Empresa 6
Descripción del Departamento de Investigación y Desarrollo 6
Organigrama 7
Descripción de Actividades 8
DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO RUTINARIO POR HPLC 9
Método Analítico 9
Técnica de Cromatografía 11
Sistema de HPLC 12
Ajuste del Sistema 13
Validación de Métodos Analíticos 15
Parámetros de Validación 16
- Linealidad 16
- Intervalo 17
- Exactitud 17
- Precisión 17
- Repetibilidad 17
- Reproducibilidad 17
- Límite de Detección 17
- Límite de Cuantificación 18
- Especificidad 18
- Robustez 18
- Estabilidad de la Muestra 18
- Ajuste del Sistema 18
Determinaciones 19

- Linealidad del sistema 19
- Precisión del Sistema 19
- Linealidad del Método 20
- Exactitud y Repetibilidad al 100% 20
- Precisión (Reproducibilidad) 20
- Límite de Detección 21
- Límite de Cuantificación 21
- Estabilidad de la Muestra Analítica 21
- Intervalo 22
- Especificidad para Métodos de Control de Calidad 22
- Especificidad para Métodos Indicadores de Estabilidad 23
Propiedades de Loratadina y Pseudoefedrina 24
- Loratadina 24
- Farmacocinética y Farmacodinamia 24
- Pseudoefedrina 25
- Farmacocinética y Farmacodinamia 25
ANTECEDENTES ANALÍTICOS POR HPLC DE LORATADINA Y PSEUDOEFEDRINA 26
Desarrollo del Método Analítico 26
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN 28
Resultados 29
RECOMENDACIONES 37
CONCLUSIONES 37
BIBLIOGRAFÍA 39

GLOSARIO

ABC	Área bajo la curva
BP	British Pharmacopoeia
CG	Cromatografía de gases
CV	Coeficiente de variación (%RSD)
di	diferencia
EP	European Pharmacopoeia
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FF	Forma farmacéutica
GI's	Genéricos Intercambiables
HPLC.	High Performance Liquid Chromatography
IC	Intervalo de confianza
K'	Factor de capacidad
NF	National Formulary
NOM	Norma Oficial Mexicana
R	Resolución
SSA	Secretaría de Salubridad y Asistencia
T	Factor de coleo
UA	Unidades de Área
USP	United States Pharmacopeia
UV-VIS	Espectrofotometría Ultravioleta-Visible

FIGURAS

Figura 1. Componentes de un HPLC (Sistemas modulares e integrados)

Figura 2. Estructura del fármaco Loratadina

Figura 3. Estructura del fármaco Pseudoefedrina clorohidrato (Bencenometanol,α-[1-(metilamino)etil]-,[S-(R*, R*)]-,hidrocloruro)

Figura 4. Cromatograma de separación entre los fármacos de Loratadina y seudoefedrina. Se grafican las unidades de área en función del tiempo de retención.

TABLAS

Tabla 1a. Linealidad del Sistema de Pseudoefedrina
Tabla 1b. Linealidad del Sistema de Loratadina
Tabla 2a. Precisión del sistema de Pseudoefedrina
Tabla 2b. Precisión del sistema de Loratadina
Tabla 3a. Linealidad del Método de Pseudoefedrina
Tabla 3b. Linealidad del Método de Loratadina
Tabla 4a. Linealidad del Sistema de Pseudoefedrina
Tabla 4b. Linealidad del Sistema de Loratadina
Tabla 5a. Reproducibilidad entre analistas de Pseudoefedrina
Tabla 5b. Reproducibilidad entre analistas de Loratadina
Tabla 6a. Límite de Detección de Pseudoefedrina
Tabla 6b. Límite de Detección de Loratadina
Tabla 7a. Límite de Cuantificación de Pseudoefedrina
Tabla 7b. Límite de Cuantificación de Loratadina
Tabla 8a. Estabilidades. Contenido del analito en % de Pseudoefedrina
Tabla 8b. Estabilidades. Contenido del analito en % de Loratadina
Tabla 9a. Estabilidades protegidas de la luz. Contenido del analito en % de Pseudoefedrina
Tabla 9b. Estabilidades protegidas de la luz. Contenido del analito en % de Loratadina
Tabla 10a. Robustez de Pseudoefedrina
Tabla 10b. Robustez de Loratadina
Tabla 11a. Ajuste del Sistema de Pseudoefedrina
Tabla 11b. Ajuste del Sistema de Loratadina

OBJETIVO GENERAL

- Presentar un reporte del *desarrollo y la validación de un método analítico de rutina para la identificación y valoración de los fármacos Loratadina y Pseudoefedrina por HPLC en un medicamento con FF: tabletas*, como caso particular del ejercicio profesional.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir las actividades de la investigación y el desarrollo de un método analítico de rutina por HPLC.
- Describir las actividades de la validación de un método analítico de rutina por HPLC.
- Presentar el método validado que se utiliza en la cuantificación de los principios activos Loratadina y Pseudoefedrina de forma farmacéutica tabletas.

PRÓLOGO

La información de este trabajo fue autorizada por Laboratorios Zerboni S.A. con giro farmacéutico. Incluye información general del lugar de trabajo empezando por una descripción del laboratorio farmacéutico en el que me encuentro laborando actualmente como analista químico, información específica del departamento de investigación y desarrollo y las actividades que ejecuto dentro del mismo así como un caso particular del desarrollo y validación de un proyecto por HPLC.

INTRODUCCIÓN

Laboratorios Zerboni S.A. es una empresa farmacéutica Mexicana fundada en 1964.

Actualmente y en respuesta a la regulación farmacéutica mexicana, Laboratorios Zerboni se ha enfocado al desarrollo de nuevos medicamentos con fármacos conocidos calidad Genéricos Intercambiables (GI´s), así como a la reingeniería de sus medicamentos genéricos no intercambiables para obtener la modificación de sus registros como GI´s.

En este contexto, un aspecto fundamental para el desarrollo de medicamentos es la investigación y el desarrollo de métodos analíticos así como su validación.

Laboratorios Zerboni S.A. realiza el desarrollo de nuevos productos que tienen que ver con la salud y que requieren métodos analíticos validados es decir, los métodos deben probarse para determinar su efectividad incluyendo la evaluación de precisión, linealidad, exactitud y especificidad, que proporciona una medida del comportamiento de los métodos.

El desarrollo del método analítico para un medicamento con dos fármacos, surgió debido a la necesidad de contar con un método capaz de identificar y cuantificar los principios activos en una forma farmacéutica sólida (tableta). Para tal determinación, se eligió desarrollar el método por HPLC.

Gracias a los avances de instrumentación moderna, la técnica por HPLC (High Performance Liquid Chromatography) es capaz de realizar la separación

física de una mezcla de compuestos a través de la interacción selectiva entre los solutos, una fase estacionaria y una fase móvil, haciendo uso de instrumentación automatizada de alta eficiencia. [1,7,9]

Las aplicaciones de ésta técnica han aumentado en gran manera para el desarrollo y optimización de nuevos y diversos tipos de métodos cromatográficos en la caracterización de mezclas complejas lo que en muchas ocasiones resulta difícil por otros medios. Las muestras se desplazan con una fase móvil que se hace pasar a través de una fase estacionaria que es insoluble, y que se fija a una columna, las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente. [1,9]

DESCRIPCIÓN DEL DESEMPEÑO PROFESIONAL

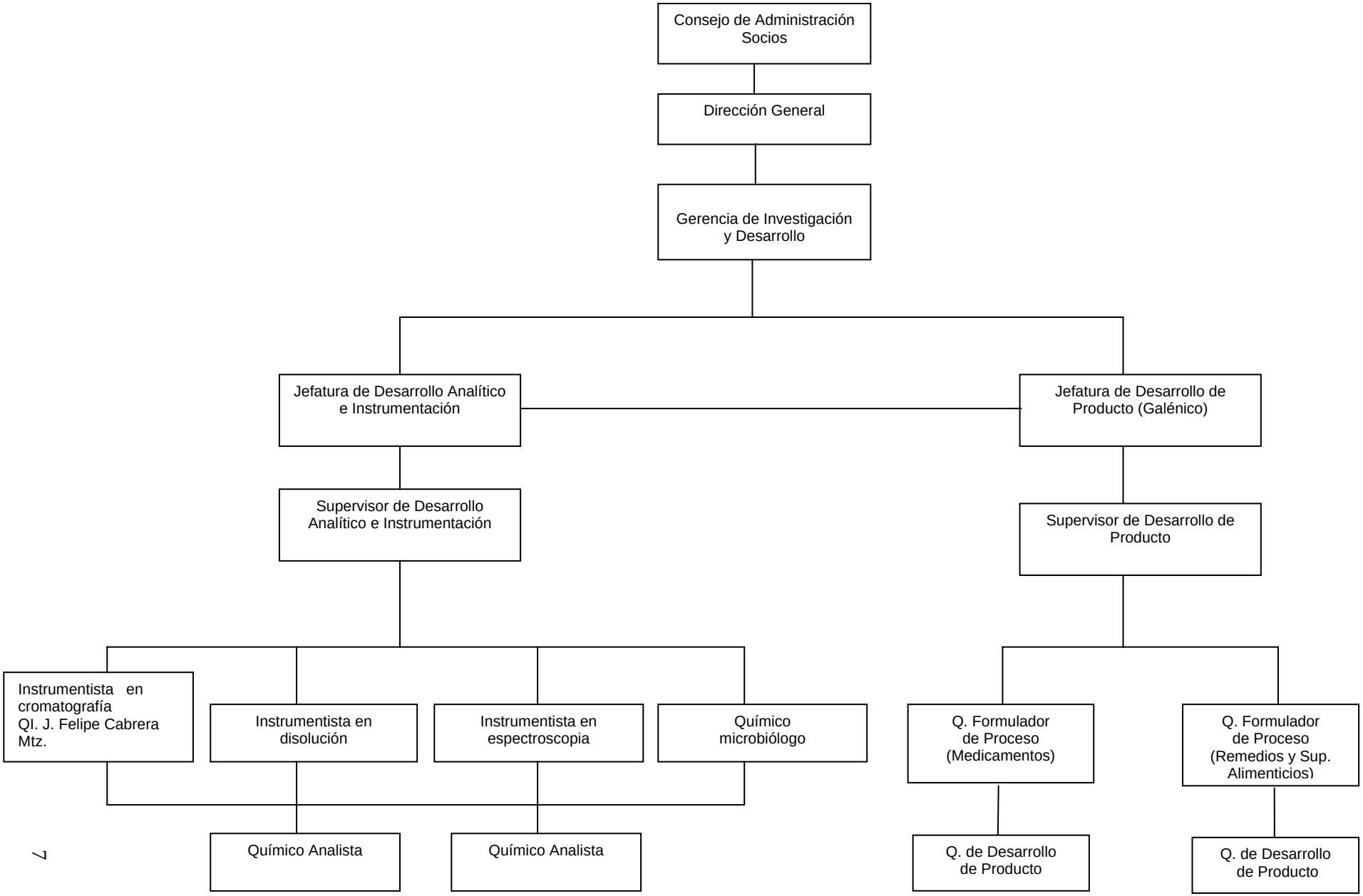
Descripción de la Empresa

Se encuentra hubicada en la calle de Anáhuac No. 147 col. El Mirador ex-Hda. Coapa, Del. Coyoacán. Ésta empresa se dedica a la fabricación de diversos medicamentos cuyo registro se pretende modificar como genérico intercambiable, además de realizar maquilado a otras empresas. Uno de sus objetivos está orientado al desarrollo de genéricos intercambiables para lo cual, actualmente, en el departamento de Investigación y Desarrollo se trabaja en diversos proyectos.

Descripción del Departamento de Investigación y Desarrollo

El departamento de Investigación y Desarrollo tiene la misión de establecer y documentar, con fundamento científico, las fórmulas de los medicamentos, los métodos analíticos usados para evaluar la calidad de los fármacos y excipientes, productos intermedio y terminado de medicamentos, establecer los procesos de producción (incluyendo los controles de calidad de los parámetros críticos de proceso) y garantizar con ello la seguridad farmacéutica de cada uno de los medicamentos elaborados.

Organigrama del Departamento de Investigación y Desarrollo



Descripción de Actividades

Las actividades que he realizado como integrante del Departamento de Investigación y Desarrollo son las siguientes:

- **Análisis fisicoquímicos**. El análisis de materia prima, producto intermedio y producto terminado. Se realiza para verificar la calidad farmacéutica de los principios activos y excipientes de acuerdo a los criterios establecidos en las diversas farmacopeas (USP, FEUM, BP, EP).
- **Investigación y Desarrollo de nuevos método analíticos (fisicoquímicos).** Se realiza la Investigación y el Desarrollo analítico para el análisis fisicoquímico de materia prima, producto intermedio y producto terminado. Con base en farmacopeas, revistas, libros técnicos especializados y normatividad se investigan las condiciones teóricas del análisis, que involucra la caracterización del fármaco y la especificidad del método respecto de los principios activos de interés que forman parte de los componentes de una formulación en las diferentes etapas de un proceso de fabricación. Así también se investiga y desarrollan métodos analíticos indicativos de la estabilidad de un producto. Considerando los antecedentes bibliográficos se desarrollan las metodologías analíticas para cada activo de un producto.
    - **Desarrollo del método de perfiles de disolución.** Haciendo mención especial de este método por su creciente interés en la evaluación de medicamentos por su correlación con la biodisponiblidad del fármaco. Es un método que evalúa la calidad del medicamento respecto de la funcionalidad de las formas farmacéuticas de comprimidos o polvos y polvos en suspensión y que se utiliza como criterio en la evaluación de GI´s**.**
    - **Optimización de métodos.** Optimizar el método en tiempo y cantidad de reactivos es tarea obligada para hacer un método eficiente.
- **Validación de metodologías analíticas**. La validación del método se resume como la evaluación de la confiabilidad en la aplicación del método.
- **Desarrollo galénico o de producto.** Para el desarrollo de formulaciones de medicamentos GI`s, he participado en la realización de pruebas de fórmulas con nuevos excipientes.

Para mi participación en las actividades descritas he recibido capacitación dentro del Departamento de Investigación y Desarrollo, llegando a adquirir el conocimiento y la experiencia para el manejo y calibración de instrumentación analítica de HPLC, CG, Disolutores, Espectrofotómetros UV-Vis, Fluorómetro, Espectrofotómetro de Absorción Atómica entre otros. Como consecuencia de mi ejercicio profesional, experiencia y conocimiento actualmente ejerzo el puesto de instrumentista dentro del mismo Departamento.

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO RUTINARIO POR HPLC

La investigación titulada:

“Desarrollo y Validación de un Método Analítico para un Medicamento con dos Fármacos (Loratadina y Pseudoefedrina)”

que sirve como ejemplo del trabajo que realizo dentro de mi desempeño profesional en el Departamento de Investigación y Desarrollo forma parte del proyecto de investigación:

“Desarrollo del medicamento tabletas con Pseudoefedrina & Loratadina”

Este proyecto involucra la investigación para el desarrollo del medicamento que contiene los dos fármacos Loratadina y Pseudoefedrina, y particularmente incluye el apartado de la investigación y el desarrollo de un método analítico para la cuantificación de los dos fármacos.

Método Analítico [1,2,3,4]

Un método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, que se deben cumplir, para llevar a cabo la evaluación cualitativa o cuantitativa del parámetro de interés específico de la muestra (analito). Como todo proceso de medición, éste debe ser confiable para ser utilizado con un propósito definido. La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada; es decir que cada parámetro evaluado cumple con

los criterios estadísticos de validación que se definen en la parte de Validación de Métodos Analíticos de esta memoria. Para la realización de esta actividad deben considerarse los siguientes aspectos:

- Moral y ética
- Aseguramiento de la calidad
- Económico
- Regulatorio

Los métodos analíticos se clasifican bajo los siguientes criterios:

1) En función de su estado regulatorio en:
    a. En métodos farmacopeicos. Todos aquellos métodos que aparecen en cualquier farmacopea (FEUM, USP, BP, EP, etc.)
    b. Métodos no farmacopeicos. Son aquellos no compendiados en una farmacopea.

Los métodos que aparecen en las farmacopeas contienen las técnicas analíticas para la aprobación de los insumos requeridos en la industria farmacéutica y están avalados por las instituciones regulatorias de los países que las emiten.

Los métodos que no aparecen en farmacopeas se validan para demostrar que son confiables para las determinaciones analíticas deseadas.

2) En función de su aplicación (NOM 059 SSA1 y NOM 073 SSA1) en:
    a. Métodos para producto a granel.
    b. Métodos para producto terminado.
    c. Métodos para materia prima.
    d. Métodos indicadores de estabilidad.

3) En función de la naturaleza de la respuesta analítica en:

a. Métodos fisicoquímicos. Cuando la respuesta es de carácter físico (absorción de luz, emisión de luz, voltaje, etc.) o químico (titulaciones).

4) En función de su propósito analítico en:
   a. Métodos para identificar el analito (cuantitativo).
   b. Métodos para cuantificar el analito (contenido o potencia) y para establecer la presencia del analito a un límite (cuantitativo).

5) En función de la naturaleza del sistema de medición se clasifican en:
   a. Métodos en los cuales el instrumento de medición de la respuesta analítica, permite medir una señal (cromatógrafo de líquidos, cromatógrafo de gases, espectrofotómetro, etc.).
   b. Métodos en los cuales el equipo de medición no permite medir una señal (buretas)

Cualquier método analítico puede estar constituido por técnicas de separación, extracción, etc. y por técnicas de medición (espectrofotometría, volumetría, colorimetría, potenciometría, etc.), que permiten medir la respuesta del analito en la muestra. A esta última técnica se le denomina sistema de medición.

Técnica de Cromatografía[8,10]

La cromatografía hoy, se ha convertido en una de las herramientas más poderosas de análisis químico en muy diversos campos de aplicación, y debido a los avances de instrumentación moderna, se ha desarrollado lo que se conoce como HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Esta es una técnica que realiza la separación física de una mezcla de compuestos a través de la interacción selectiva entre los solutos, una fase estacionaria y una fase móvil, haciendo uso de instrumentación automatizada de alta eficiencia.

Algunos términos comunes en HPLC:

- Disolvente o fase móvil. Es la sustancia líquida que tiene la función de ser el acarreador y/o diluente de los analitos que se van a analizar.
- Muestra, soluto o analito. Es el compuesto o mezcla de compuestos que se desean separar y analizar.
- Empaque o fase estacionaria. Es el material que contiene la columna analítica, en donde, gracias a su forma geométrica, grupo funcional, tamaño e interacciones con el analito en la fase móvil se lleva a cabo la separación de los analitos.

Sistema HPLC[7,8,9]

Un sistema HPLC representado en la figura además, incluye los siguientes componentes:

- Bomba. Para un líquido a alta presión.
- Inyector o auto-muestreador. Para introducir la muestra en el sistema presurizado.
- Detector. El cual detecta los componentes.
- Computadora o Registrador. Registra la información Cromatográfica.

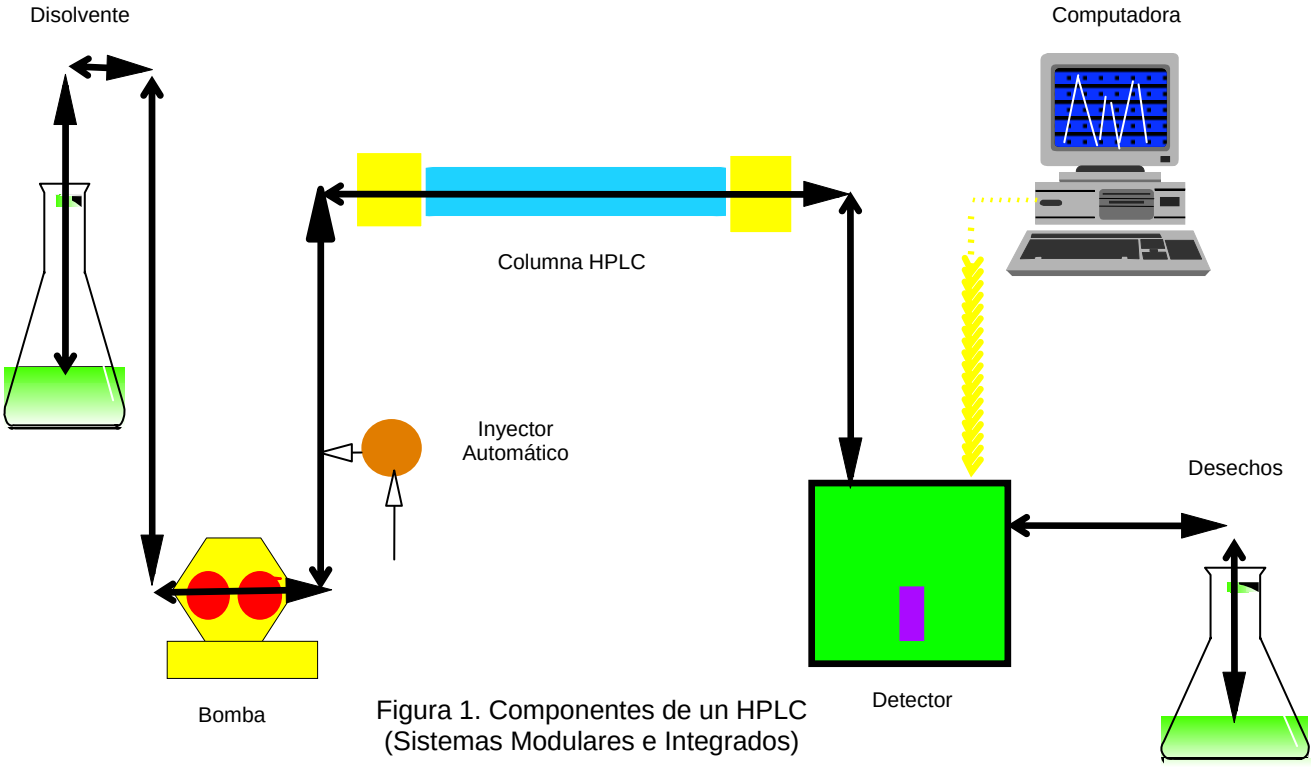


Figura 1. Componentes de un HPLC
(Sistemas Modulares e Integrados)

Ajuste del Sistema [1,7,8,9]

Las pruebas para el ajuste del sistema, son una parte integral para los métodos cromatográficos. Estos son utilizados para verificar parámetros cromatográficos como la resolución y su reproducibilidad, y sean los adecuados para el análisis a realizar. Las pruebas están basadas sobre los conceptos de que los equipos, partes electrónicas, operaciones analíticas, y muestras a ser analizadas constituyen un sistema integral que puede ser evaluado como tal. [7]

El buen funcionamiento de un sistema cromatográfico se verá reflejado en la calidad del análisis. Por esta razón, se consideran los componentes del sistema principalmente la columna, la fase móvil y el flujo de la misma, y temperatura para obtener resultados óptimos. [8]

Es conveniente preparar una curva de calibración a concentraciones adecuadas, a las condiciones especificadas del fármaco en análisis, así como inyectar blancos para poder detectar alguna posible interferencia. Las variaciones normales en el equipo y en los materiales pueden requerir ajustes de las condiciones experimentales para obtener una operación aceptable.

Para asegurar la efectividad del sistema, es necesario someterlo a una prueba antes de utilizarse. Se pueden obtener datos específicos de inyecciones repetidas (no menos de 6) de una preparación de muestra, estándar de referencia o estándar interno.

Estos datos pueden ser comparados con valores máximos y mínimos especificados tales como eficiencia, precisión, resolución, tiempo de retención, naturaleza de la curva de calibración, respuesta y recobros entre otros parámetros.

El parámetro más útil es la reproducibilidad de inyecciones repetidas de la solución analítica mezclada con solución de estándar interno, preparadas a partir

de la referencia. La reproducibilidad de las inyecciones repetidas se expresa como el coeficiente de variación de acuerdo con la siguiente formula:

$$CV = \frac{X}{SD} x100$$

Donde:

CV = Coeficiente de variación en %

X = Promedio de una serie de n determinaciones

SD = Desviación estándar de una serie de n determinaciones

La *resolución R*, es la separación entre dos picos, depende tanto de la *selectividad* como de la *eficiencia* cromatográfica.

La selectividad es una función de la retención que la molécula tiene a lo largo del proceso de separación, y se le conoce como *factor de capacidad (k').*

$$\mathrm{k'} = \left(\frac{\mathrm{t}}{\mathrm{t_o}}\right) - 1 \qquad ó \qquad \mathrm{k'} = (t - t_o) - t_o$$

donde

t_o = tiempo de retención inicial

t = tiempo de retención del analito

La *selectividad* de una columna también referida como retención relativa o separación entre picos (α), es la relación entre los *factores de capacidad (k')* de dos picos adyacentes.

$$\alpha = \frac{K_2^{'}}{K_1^{'}} \qquad ó \qquad \alpha = \frac{(t_2 - t_0)}{(t_1 - t_0)}$$

donde..

k'_2 = factor de capacidad del analito 2

k'_1= factor de capacidad del analito 1

t_2 = *tiempo de retención del analito 2*

t_1 = *tiempo de retención del analito1*

t_0 = tiempo inicial

Por su parte, la *eficiencia* es un indicador del ensanchamiento de un pico durante su separación, y esta reflejada por el número de platos teóricos (N) de la columna en donde se realiza el proceso cromatográfico:

$$N = 16\ (t / W)^2$$

Por lo anterior, la *Resolución (R)* puede expresarse en términos de *selectividad* y *eficiencia* de la siguiente manera.

$$R = N / 4\ (\alpha - 1)(k / 1-k)$$

En donde k es el promedio de k'_1 y k'_2

Esta ecuación permite controlar la Resolución (R) variando el factor de selectividad (α), la eficiencia de la columna (N), o bien, el factor de capacidad (k').

El *factor de separación* se varía modificando la composición de la fase móvil (pH y proporción orgánica/acuosa) y/o la estacionaria (longitud de cadena alifática o grupos sustituyentes). La *eficiencia* se varía con cambios en la longitud de la columna, en la velocidad del flujo del disolvente y tamaño de partícula, y el *factor de capacidad* se modifica con cambios en la fuerza elutrópica del disolvente.

El uso de integradores evita los errores en la medición de las áreas. Estos integradores registran las señales e imprimen el área de los picos en forma numérica.

Validación de Métodos Analíticos [1,3,4,5,6]

La industria farmacéutica está especialmente interesada en la validación de métodos analíticos debido al gran incremento de nuevos productos que tienen que ver con la salud y que requieren métodos de análisis apropiados.

El método analítico debe probarse para determinar su efectividad. La validación generalmente incluye una evaluación en la precisión, linealidad, exactitud y especificidad, y proporciona una medida del comportamiento del método.

La validación es el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que el alcance del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa en términos de parámetros analíticos.

El proceso de validación de un método en particular esta basado en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos prácticos de medición.

En la aplicación de los criterios de evaluación de un método analítico prevalece ante todo la experiencia y el criterio de la persona que lleve a cabo la validación.

Es parte fundamental del desarrollo de una nueva formulación y de la técnica de análisis de control de calidad la secuencia de pruebas y análisis, en donde el químico se da cuenta de si el estudio, el cual esta siendo evaluado sistemáticamente, cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado.

El factor más importante durante la validación de cualquier método analítico, es el criterio del analista, que se aplica después de relacionar factores como:

- principios activos
- concentraciones
- forma farmacéutica
- tipo de muestra
- método de análisis
- propósito de técnica analítica
- instrumentación
- sustancias relacionadas

Parámetros de Validación [1,10,11]

Linealidad. La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que sus resultados analíticos, los cuales se obtienen directamente o

por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

Intervalo. El intervalo de un método analítico esta definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles de concentración superior e inferior de la sustancia (incluyendo estos niveles), en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

Exactitud. La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

Precisión. La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de Desviación Estándar o del Coeficiente de Variación.

a) *Repetibilidad*. Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.).
b) *Reproducibilidad*. Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc.).

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

Límite de cuantificación. Es la menor concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.

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

Robustez. Es la fortaleza del método analítico es decir, el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, sistemas de elución, tipos de empaque (soporte, fase estacionaria, etc.), condiciones ambientales, etc.

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

Ajuste del Sistema.[7,8,9,11,12] Si las mediciones son susceptibles a variaciones en las condiciones de análisis, podrían ser adecuadamente controladas, o podrían incluirse medidas preventivas en el método. El resultado de la evaluación de la tolerancia y robustez del método es establecer una serie de parámetros para la adecuabilidad del sistema para asegurar que la validez del método analítico es mantenida siempre que se utilice. Las variaciones típicas son las estabilidades de las soluciones analíticas, los equipos y los analistas. En cromatografía de líquidos, las más comunes son el pH de la fase móvil, la composición de la fase móvil, diferentes lotes o proveedores de columnas, la temperatura, y el flujo.

La adecuabilidad del sistema se basa en el concepto de que en los equipos, la electrónica, las operaciones analíticas, y las muestras a ser analizadas constituyen un sistema integral que puede ser evaluado como tal. Los parámetros para la adecuabilidad del sistema a ser establecidos para un método particular, dependen del tipo de método a ser evaluado. Estos son especialmente importantes en métodos cromatográficos, y estos se definen en la sección de la página 13.

Determinaciones [1,3,4,5,6]

Linealidad del Sistema

Se determina desarrollando una curva de calibración (concentración vs respuesta medida) utilizando cuando menos 5 concentraciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo análisis cuando menos por duplicado por cada concentración.

El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método; para control de calidad y de seguimiento de estabilidad de un fármaco en una forma farmacéutica, se incluye la concentración seleccionada como 100%.
Nota. Se considera el 100% como la concentración de la muestra en la solución final a analizar, que proporciona una respuesta adecuada dependiendo del método de cuantificación.

Criterio.

$CV \leq 1.5\%$

$r \geq 0.99$, $r^2 \geq 0.98$

Precisión del Sistema

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

Criterio

$CV \leq 1.5\%$

Linealidad del Método

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

Las concentraciones de los placebos cargados deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linearidad del sistema, incluyendo siempre el correspondiente al 100%.

La amplitud del estudio depende del uso y aplicaciones del método, (control de calidad, estudios de estabilidad, etc.) y se realiza por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

Criterio

Cantidad adicionada vs cantidad recuperada: $m = 1$, $b = 0$, $r^2 = 0.98$

% recuperados 98 – 102%

CV en cada nivel y los globales de todo el intervalo de linearidad $\leq$2%

Exactitud y Repetibilidad al 100%

Se determina de, cuando menos 6 placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100%, utilizando el método propuesto. Haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

Criterio

El % recuperado 98 – 102%

CV $\leq$ 2%

Precisión (Reproducibilidad)

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

Criterio

CV total ≤ 2%. Dependiendo de la naturaleza de la muestra, el CV puede incrementarse.

Límite de Detección.

Integrar todos los picos registrados en cromatograma. Seleccionar el pico con mayor área y multiplicar este valor de área por el factor 3. Por otra parte realizar mediante regresión lineal la interpolación del área obtenida para calcular la concentración mínima detectable con la curva de linealidad del sistema.

Verificación experimental de datos. Preparar a partir del placebo cargado al 100% y por dilución una solución con la concentración obtenida por interpolación. Calcular la relación entre el área (ABC) de la señal del analito y el área de la señal del ruido.

Criterio de aceptación. El valor de límite de detección se acepta si el área bajo la curva del analito es ≥ a 3 veces la señal del ruido obtenida experimentalmente.

Límite de Cuantificación

Integrar todos los picos registrados en cromatograma. Seleccionar el pico con mayor área y multiplicar este valor de área por el factor 10. Por otra parte realizar mediante regresión lineal la interpolación de el área obtenida para calcular la concentración mínima detectable con la curva de linealidad del sistema.

Verificación experimental de datos. Preparar a partir del placebo cargado al 100% y por dilución una solución con la concentración obtenida por interpolación.

Criterio de aceptación. El valor de límite de cuantificación se acepta si el área bajo la curva del analito es ≥ a 10 veces la señal del ruido obtenida experimentalmente.

Estabilidad de la Muestra Analítica

Se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de 3 muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones.

Almacenar las muestras utilizadas bajo distintas condiciones (por ejemplo: temperatura ambiente, refrigeración, protegidas de la luz, etc.), durante un tiempo preestablecido por el analista dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia. Reanalizarlas bajo las mismas condiciones de operación, utilizando una solución de referencia recientemente preparada, para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido en el método analítico. La determinación debe ser efectuada por un mismo analista.

Criterio

La muestra es estable si el IC (intervalo de confianza) para la diferencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto no exceda de ± 2.0%

Intervalo

El intervalo del método se definirá una vez que los resultados de la validación de los parámetros: precisión, exactitud y linealidad cumplan los criterios de aceptación y será limitado por los valores inferior y superior obtenidos de la curva de linealidad del sistema.

Especificidad para Métodos de Control de Calidad

Con el método propuesto:

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

Criterio

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

Especificidad para Métodos Indicadores de Estabilidad

En caso de contar con los posibles productos de degradación, se preparan muestras con placebo "añadido" de estos y la sustancia de interés y analizar con el método propuesto.

Si no se cuenta con los productos de degradación, es necesario degradar la muestra bajo diferentes condiciones.

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

Se sugieren los siguientes métodos para degradar la sustancia escogiendo aquel que, de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas del compuesto, sea el mas adecuado:

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

   Criterio

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

   Se ajustan las condiciones de operación para obtener la máxima resolución.

Propiedades de la Loratadina y Pseudoefedrina[13,14]

Loratadina.

La Loratadina tiene una fórmula molecular $C_{22}H_{23}ClN_2O_2$, con un peso molecular de 382.89 g/ mol y una composición porcentual de C-69.01%, H-6.06 %, Cl-9.26%, N-7.32% y O-8.36%. El compuesto es un polvo blanco con un punto de fusión de 134-136°C. El compuesto es muy soluble en acetona, cloroformo, metanol, tolueno e insoluble en agua. pKa = 5.0.

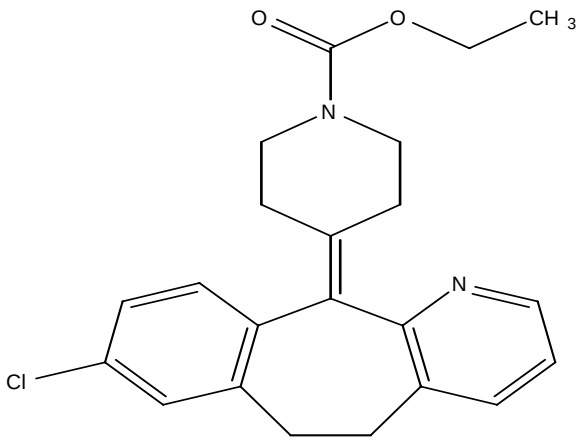


Figura 2. Estructura del fármaco Loratadina

Farmacocinética y farmacodinamia

La Loratadina es un antihistamínico tricíclico potente, de acción prolongada, con actividad como antagonista selectivo de receptores H_1 periféricos. Es absorbida por completo después de su administración por vía oral; la vida media de eliminación del plasma es de 9 horas, sin embargo su efecto antihistamínico persiste durante 24 horas. El inicio de acción es muy rápido, estimándose en 30 minutos aproximadamente. Posteriormente se metaboliza extensamente en el hígado y es excretada a través de orina en un 40.0 % y en heces en un 41.0 % en un periodo máximo de 10 días. Aproximadamente el 27.0 % de la dosis se elimina por orina en las primeras 24 horas. La Loratadina se une a proteínas plasmáticas en un alto porcentaje (97.0 % - 99.0 %). La Loratadina esta indicada como

antihistamínico y en el tratamiento de rinitis alérgica incluyendo la congestión nasal, rinorrea, prurito y lagrimeo.

Pseudoefedrina.

La Pseudoefedrina ($C_{10}H_{15}NO$) es un agonista α-adrenérgico cuyo peso molecular es de 165.23 g/mol y una composición porcentual de C- 72.69 %, H- 9.15%, N-8.48% y O-9.68%. En su forma de sal Clorhidrato ($C_{10}H_{15}NO,HCl,$) de peso molecular 201.70 g/mol, es un polvo blanco cristalino con un punto de fusión entre 182-186°C, es muy soluble en agua, libremente soluble en alcohol y ligeramente soluble en cloroformo. En su forma de sal Sulfato $(C_{10}H_{15}NO)_2,H_2SO_4$, su peso molecular es 428.5 g/mol con punto de fusión entre 174-179°C. pKa $_{base}$ = 9.8.

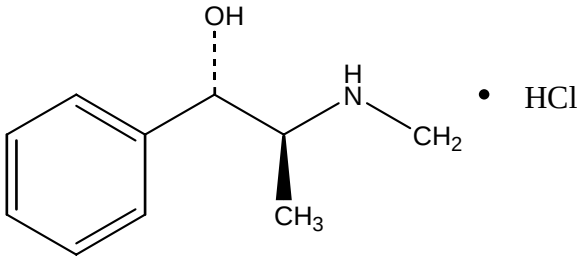


Figura 3. Estructura del fármaco Pseudoefedrina clorohidrato
Bencenometanol,α-[1-(metilamino)etil]-,[S-(R*, R*)]-,hidrocloruro

Farmacocinética y farmacodinamia

La Pseudoefedrina es uno de los alcaloides naturales de la efedra que se presenta comercialmente en forma de sal estable (Clorhidrato o Sulfato), La molécula con acción antidescongestionante nasal de efecto simpaticomimético, se absorbe completamente en el tracto gastrointestinal después de su administración vía oral, alcanzando concentraciones pico en plasma entre 1 y 3 horas después de su administración. La Pseudoefedrina se excreta principalmente sin cambios en la orina en un 55.0 % a 90.0 % en 24 horas, sin embargo una pequeña proporción se

metaboliza en el hígado por N-desmetilación (menos del 1.0%). Su vida media plasmática se ha determinado aproximadamente en 6 horas y es indicada como descongestivo nasal y en los síntomas asociados con la rinitis alérgica.

ANTECEDENTES ANALÍTICOS POR HPLC DE LORATADINA Y PSEUDOEFEDRINA.

Desarrollo del Método Analítico

Como parte del Desarrollo del medicamento se fabrican pruebas piloto del producto farmacéutico para las cuales es de suma importancia la valoración de los activos en las diferentes etapas del proceso de fabricación. Al no contar con una metodología de análisis específica en la literatura, se procede a desarrollarla, es por eso, que con mi formación profesional cuento con conocimientos científicos y técnicos para realizar el análisis y la solución de los problemas que surjan dentro de estas actividades, donde participo para que la organización y los recursos de la empresa sean adecuadamente utilizados dándome a la tarea de desarrollar, implementar, optimizar y validar metodologías analíticas.

El desarrollo del método analítico para el medicamento que combina los fármacos Loratadina y Pseudoefedrina surgió debido a la necesidad de contar con un método capaz de identificar y cuantificar los dos principios activos en la forma farmacéutica (tabletas) del medicamento en desarrollo. La investigación bibliográfica reveló que medicamentos con esta combinación utilizan la técnica de HPLC en consecuencia para tal determinación, se eligió desarrollar el método por HPLC porque se cuenta con la instrumentación analítica y porque la mayoría de los métodos compendiados para la cuantificación de fármacos esta sustentada en esta técnica. En el desarrollo del método se consideraron las técnicas analíticas que se encuentran en USP 28, NF23 2005 para los principios activos de pseudoefedrina clorhidrato y loratadina. Para establecer una separación óptima entre los picos de interés, bajo las condiciones de ajuste del sistema para el

método, se utilizó una fase móvil con proporciones de buffer ajustado a pH ácido y acetonitrilo, una columna de acero inoxidable con empaque C_{18} (octadecilsilano), además de un gradiente adecuado para la separación. Los instrumentos utilizados para el desarrollo del método fueron: un módulo de separación Waters y un detector de arreglo de diodos ajustados a una longitud de onda de 260nm. El análisis cuantitativo se realizó por el método de estándar externo que consiste en correr un estándar (con grado de pureza USP) sometido a las mismas condiciones del procesamiento de muestra en el cromatógrafo y registrando los valores de área para su posterior comparación.

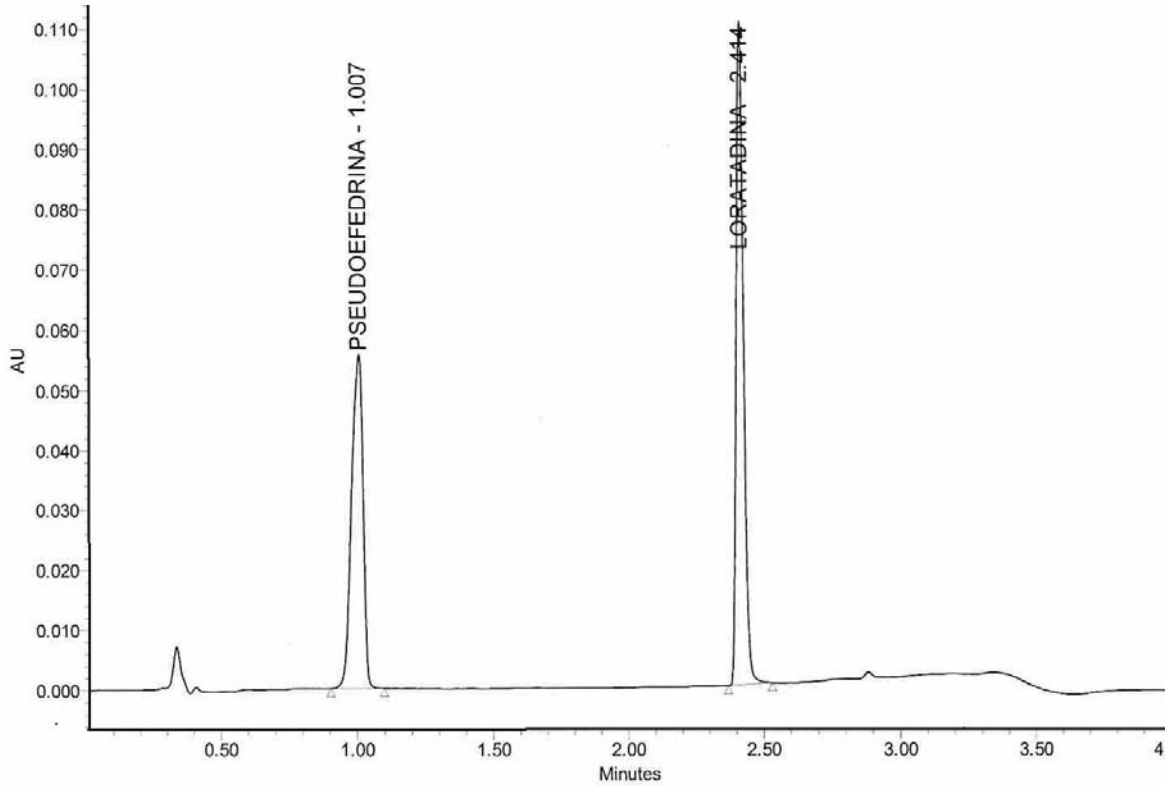
Para estas condiciones, se toman en cuenta las propiedades químicas de los analitos, en este caso, el pKa = 9.8 de Pseudoefedrina clorhidrato (soluble en agua), debido a las condiciones iniciales de la fase móvil de acidez (polares), se mantuvo la especie protonada del analito, lo cual evitó que la molécula de pseudoeferina se fijara menos a la columna y saliera primero como se muestra en el cromatograma en el apartado de análisis y discusión. La Loratadina (pKa = 5.0, insoluble en agua) en estas condiciones y, debido a su naturaleza no polar se retiene más en la columna. La aplicación de un gradiente es para modificar la polaridad de la fase móvil hacia una menos polar con la que la Loratadina eluye fácilmente de la columna.

El método desarrollado se incluye en el anexo correspondiente y continuando con el proyecto el paso subsecuente es la validación del método desarrollado.

ANALISIS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la validación de la metodología analítica desarrollada para la valoración de un medicamento con 2 fármacos (Loratadina y Pseudoefedrina) que se incluyen, cumplen con los criterios de validación y muestran que las condiciones de análisis fueron óptimas para separar, identificar y cuantificar los 2 activos.

Se obtiene el presente cromatograma bajo las condiciones del método establecidas donde se observan los picos separados de la pseudoefedrina y loratadina.



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	PSEUDOEFEDRINA	1.007	162298	44.22	55529
2	LORATADINA	2.414	204735	55.78	110112

Figura 4. Cromatograma de separación entre los fármacos de Loratadina y Pseudoefedrina. Se grafican las unidades de área en función del tiempo de retención.

Resultados de la Validación del Método Analítico para un Medicamento con 2 Fármacos (Loratadina y Pseudoefedrina).

Tabla1a. Linealidad del Sistema de Pseudoefedrina

% Nivel	Alícuota	Concentración (m/v)	Área (UA)	Factor Conc./Respuesta
		1	97597	2.90727E-06
		1	97279	2.91677E-06
80	4	2	129909	2.9122E-06
		2	129901	2.91238E-06
100	5	3	162249	2.91466E-06
		3	161984	2.91943E-06
120	6	4	195021	2.90985E-06
		4	193041	2.93969E-06
140	7	5	226084	2.92839E-06
		5	226057	2.92874E-06

Criterios de aceptación		Resultado
$R^2 \geq$	0.98	0.99989
CV ≤	2.00%	0.40%
IC(m), no incluye el 0		337001.4774,342614.3982

Tabla 1b. Linealidad del Sistema de Loratadina

% Nivel	Alícuota	Concentración (m/v)	Área (UA)	Factor Conc./Respuesta
60	3	1	124037	9.58E-08
		1	129663	9.164E-08
80	4	2	163913	9.666E-08
		2	164156	9.651E-08
100	5	3	205056	9.658E-08
		3	204389	9.689E-08
120	6	4	244970	9.701E-08
		4	243911	9.743E-08
140	7	5	28680	9.739E-08
		5	284978	9.729E-08

Criterios de aceptación		Resultado
$r^2 \geq$	0.98	0.9993
CV ≤	2.00%	1.80%
IC(m), no incluye el 0		9791221.07,10223119.466

Precisión del sistema

Concentración 1

Tabla 2a. Pseudoefedrina

	ÁREA
	167403
	166365
	166967
	168729
	167390
	166535
Promedio	167232

Criterio de aceptación	Resultado
CV ≤ 1.5%	0.50%

Concentración 2

Tabla 2b. Loratadina

	ÁREA
	227250
	226743
	226328
	228480
	226119
	225474
Promedio	167232

Criterio de aceptación	Resultado
CV ≤ 1.5%	0.50%

Tabla 3a. Linealidad del Método de Pseudoefedrina

Al 80%

Muestra	Cantidad Adicionada (UA)	Cantidad Recuperada (UA)	% de Recobro
1	162073.7	125102	79.19
2	162073.7	128453	79.26
3	162073.7	129602	79.97

CV ≤ 2.0% 0.54%

Al 100%

Muestra	Cantidad Adicionada (UA)	Cantidad Recuperada (UA)	% de Recobro
1	162073.7	160552	99.06
2	162073.7	162137	100.04
3	162073.7	160704	99.16

CV ≤ 2.0% 0.50%

Al 120%

Muestra	Cantidad Adicionada(UA)	Cantidad Recuperada(UA)	% de Recobro
1	162073.7	192592	118.8
2	162073.7	192672	118.88
3	162073.7	193423	119.34

CV ≤ 2.0% 0.20%

Tabla 3b. Linealidad del Método de Loratadina

Al 80%

Muestra	Cantidad Adicionada(UA)	Cantidad Recuperada(UA)	% de Recobro
1	223394	174695	78.2
2	223394	180322	80.72
3	223394	181190	81.11

CV ≤ 2.0% 1.97%

Al 100%

Muestra	Cantidad Adicionada(UA)	Cantidad Recuperada(UA)	% de Recobro
1	223394	224586	100.53
2	223394	226484	101.38
3	223394	224930	100.68

CV ≤ 2.0% 0.40%

Al 120%

Muestra	Cantidad Adicionada(UA)	Cantidad Recuperada(UA)	% de Recobro
1	223394	271259	121.43
2	223394	271382	121.48
3	223394	272705	122.00

CV ≤ 2.0% 0.30%

LINEALIDAD DEL METODO

Tabla 4a. Linealidad del Sistema de Pseusoefedrina

% Nivel	Alícuota	Concentración (m/v)	(UA)	Factor Conc./Respuesta
60	3	1	99681	2.8453E-06
		1	98072	2.89198E-06
80	4	2	132962	2.84414E-06
		2	131392	2.87813E-06
100	5	3	165116	2.86284E-06
		3	164107	2.88046E-06
120	6	4	196326	2.8893E-06
		4	198549	2.85695E-06
140	7	5	230970	2.86524E-06
		5	229849	2.87922E-06

	Criterios de aceptación	Resultado
r^2 ≥	0.98	0.9997
CV ≤	2.00%	0.60%
IC(m), no incluye el 0		342566.4115,352004.5911

LINEALIDAD DEL METODO

Tabla4b. Linealidad del Sistema Loratadina

% Nivel	Alícuota	Concentración (m/v)	(UA)	Factor Conc./Respuesta
60	3	1	133454	8.904E-08
		1	135799	8.75E-08
80	4	2	179115	8.845E-08
		2	180764	8.765E-08
100	5	3	224463	8.823E-08
		3	223699	8.853E-08
120	6	4	267568	8.882E-08
		4	269827	8.807E-08
140	7	5	313159	8.854E-08
		5	312124	8.883E-08

Criterios de aceptación		Resultado
$r^2 \geq$	0.98	0.9998
CV ≤	2.00%	0.60%
IC(m), no incluye el 0		11100155.64,11359347.494

Reproducibilidad entre analistas

Tabla 5a. Pseudoefedrina

análisis	Analista	
	1	2
1	155033	155293
	158367	156607
	158982	155849
2	155830	153237
	156834	151901
	157811	153175

CV ≤ 2.0% 1.00% 1.50%

Tabla 5b. Loratadina

análisis	Analista	
	1	2
1	208700	205583
	208884	205783
	203867	203574
2	207653	208572
	210398	207240
	207302	203912

CV ≤ 2.0% 1.10% 0.90%

Tabla 6a. Límite de Detección de Pseudoefedrina

	Muestra	Señal	3 x Ruido	Respuesta
	Concentración(m/v)	mV	mV	UA
1	Blanco	0.066	0.198	198
2	1	-	-	1606.8
3	2	-	-	2972.4
4	3	-	-	4785.1
5	4	-	-	5959
6	5	-	-	7945.7

Nota. El valor de la señal está dado en valor absoluto, debido a señales negativas dadas por la deriva.

El límite de detección se estima en 1 mg/mL, que es la cantidad del analito inmediatamente posterior a 3 veces el nivel de ruido.

Tabla 6b. Límite de Detección de Loratadina

	Muestra	Señal	3 x Ruido	Respuesta
	Concentración (m/v)	MV	mV	UA
1	Blanco	0.066	0.198	198
2	1	-	-	4924.6
3	2	-	-	6836
4	3	-	-	9361.3
5	4	-	-	11036.8
6	5	-	-	13818

Nota. El valor de la señal está dado en valor absoluto, debido a señales negativas dadas por la deriva.

El límite de detección se estima en 1 mg/mL, que es la cantidad del analito inmediatamente posterior a 3 veces el nivel de ruido.

Tabla 7a. Límite de Cuantificación de Pseudoefedrina

	Muestra	Señal	3 x Ruido	Respuesta
	Concentración (m/v)	mV	mV	AU
1	Blanco	0.066	0.66	660
2	1	-	-	1606.8
3	2	-	-	2972.4
4	3	-	-	4785.1
5	4	-	-	5959
6	5	-	-	7945.7

Nota. El valor de la señal está dado en valor absoluto, debido a señales negativas dadas por la deriva.

El límite de detección se estima en 2 mg/mL, que es la cantidad del analito inmediatamente posterior a 10 veces el nivel de ruido.

Tabla 7b. Límite de Cuantificación de Loratadina

	Muestra	Señal	3 x Ruido	Respuesta
	Concentración (m/v)	mV	mV	UA
1	Blanco	0.066	0.66	660
2	1	-	-	4924.6
3	2	-	-	6836
4	3	-	-	9361.3
5	4	-	-	11036.8
6	5	-	-	13818

Nota. El valor de la señal está dado en valor absoluto, debido a señales negativas dadas por la deriva.

El límite de detección se estima en 2 mg/mL, que es la cantidad del analito inmediatamente posterior a 10 veces el nivel de ruido.

Estabilidad analítica de la solución estándar

Tabla 8a. Estabilidades. Contenido del analito en % de Pseudoefedrina

		Tiempo de almacenamiento		
inyeccion	Inicial	3hrs	6hrs	9hrs
1	100	99.36	99.80	100.20
2	100	99.4	99.91	100.12
3	100	99.43	99.85	100.10
Promedio	100	99.39	99.85	100.14

di = Y1 - Y0 = 99.39 - 100 0.61
di = Y1 - Y0 = 99.85 - 100 0.15
di = Y1 - Y0 = 100.14 - 100 0.14

El valor no debe exceder el 2%

Tabla 8b. Estabilidades. Contenido del analito en % de Loratadina

		Tiempo de almacenamiento		
Muestra	Inicial	3hrs	6hrs	9hrs
1	100	99.5	99.5	100
2	100	99.5	100	100
3	100	99.5	100	100.5
Promedio	100	99.5	99.84	100.15

di = Y1 - Y0 = 99.5 - 100 0.5
di = Y1 - Y0 = 99.84 - 100 0.16
di = Y1 - Y0 = 100.5 - 100 0.15

El valor no debe exceder el 2%

Estabilidad en Muestra Analítica

Tabla 9a. Estabilidades protegidas de la luz. Contenido del analito en % de Pseudoefedrina

		Tipo de almacenamiento		
Muestra	Inicial	ambiente	Protegido	Refrigeración
1	100	99.95	100.3	99.42
2	100	100.5	100.3	99.98
3	100	100.5	99.9	100.4
Promedio	100	100.31	100.16	99.93

di = Y1 - Y0 =	100.31 - 100	0.31
di = Y1 - Y0 =	100.16 - 100	0.16
di = Y1 - Y0 =	99.93 - 100	0.07

El valor no debe exceder el 2%

Tabla 9b. Estabilidades protegidas de la luz. Contenido del analito en % de Loratadina

		Tipo de almacenamiento		
Muestra	Inicial	ambiente	Protegido	Refrigeración
1	100	100	100	100
2	100	100.5	100.5	100
3	100	100	100.5	100
Promedio	100	100.2	100.33	100

di = Y1 - Y0 =	100.2 - 100	0.2
di = Y1 - Y0 =	100.33 - 100	0.33
di = Y1 - Y0 =	100 - 100	0

El valor no debe exceder el 2%

Intervalo

Los parámetros de validación precisión, exactitud y linealidad evaluados con anterioridad, cumplieron con los criterios de aceptación establecidos, de tal manera que el intervalo para el método analítico de pseudoefedrina y loratadina queda comprendido entre concentraciones adecuadas para el análisis.

Especificidad

De acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba de especificidad, no existen interferencias entre las señales obtenidas del blanco con relación a los

picos de interés tanto en estándares como en la muestra así como no presentan productos e degradación.

El resultado de la prueba es satisfactorio

Tabla 10a. Robustez de Pseudoefedrina

		Cond. Normal	
Fase móvil	FM 25:75	* FM 20:80	FM 20:80
Λ	260 nm	260 nm	260 nm
Muestra	30°C	30°C	35°C
1	97.07%	96.85%	96.29%
2	98.02%	96.75%	96.26%
3	96.82%	97.21%	96.37%
CV =	0.65%	0.24%	0.05%
Criterio	CV ≤ 2.0%		

Tabla 10b. Robustez de Loratadina

		Cond. Normal	
Fase móvil	FM 25:75	* FM 20:80	FM 20:80
λ	260 nm	260 nm	260 nm
Muestra	30°C	30°C	35°C
1	96.78%	94.18%	94.27%
2	96.49%	94.14%	94.83%
3	97.51%	94.23%	94.23%
CV =	0.54%	0.04%	0.35%
Criterio	CV ≤ 2.0%		

Ajuste del Sistema

Pseudoefedrina
Concentración 1 (m/v)

Tabla 11a

UA
162120
162486
162401
162298
162391

Criterio de aceptación	Resultado
CV ≤ 2.0%	0.10%
k' ≥ 2.0	2.4
R ≥ 1.5	no aplica
T ≤ 2.0	0.8

Loratadina
Concentración 2 (m/v)

Tabla 11b

UA
204608
204757
204303
204735
204577

Criterio de aceptación	Resultado
CV ≤ 2.0%	0.10%
k' ≥ 2.0	7
R ≥ 1.5	22.4
T ≤ 2.0	1.2

RECOMENDACIONES

Actualmente el desarrollo de un método de análisis es comúnmente basado en información previa o literatura existente usando la misma o similar instrumentación. Aprovechando las propiedades fisicoquímicas de los activos, se pueden seleccionar las características de la columna a utilizar que sean compatibles con la fase móvil que como resultado dé una óptima separación e identificación de los analitos de interés en una muestra.

Además de las consideraciones anteriores, es recomendable hacer uso de las buenas prácticas de laboratorio que nos lleven a realizar una experimentación donde se obtengan resultados confiables.

CONCLUSIONES

Respecto del Desempeño Profesional.

- ✓ El campo de trabajo para el químico industrial en los diferentes sectores productivos del país es muy amplio, dada la diversidad de las ramas de la industria. Entre las más importantes está la industria farmacéutica, donde actualmente participo tanto en el mejoramiento y crecimiento de la empresa como en el análisis y elaboración de productos destinados al consumo humano.
- ✓ El desarrollo y validación del método presentado como ejemplo de las actividades en las cuales participo dentro del departamento donde trabajo cumplió con los parámetros establecidos de validación y es utilizado para el análisis de este medicamento. El departamento de validación de Laboratorios Zerboni verificó el método y determinó que cumple con los parámetros de validación.

Respecto del Estudio de Validación del Método Analítico

- ✓ Los resultados obtenidos de los parámetros de validación confirman que el método desarrollado es lineal, exacto, preciso y reproducible para los dos analitos en el intervalo determinado para el método analítico.

- ✓ Se determinó también, como se muestra en el cromatograma ubicado en el apartado de análisis y discusión (Figura 4), que el método es específico y no existen interferencias en los picos de pesudoefedrina y loratadina.
- ✓ Así también no se obtuvieron productos de degradación a las condiciones luz, y temperatura a las que fue sometida la muestra y que están especificadas en las tablas de resultados para la estabilidad analítica de pseudoefedrina y loratadina.
- ✓ De igual manera, los analitos sometidos a las diferentes condiciones de proporción de fase móvil y temperatura establecidos en las tablas 10a y 10b, no presentan variaciones significativas comparadas con las condiciones normales del método de tal forma que los analitos cumplen con los criterios establecidos para estabilidad de la muestra analítica y robustez.
- ✓ Los resultados para pseudoefedrina y loratadina que se muestran en las tablas 6a, 6b, 7a y 7b cumplen con los criterios de aceptación, y el límite de detección para pseudoefedrina y loratadina se estima en 1 mg/mL, que es la cantidad del analito inmediatamente posterior a 3 veces el nivel de ruido. El límite de cuantificación para pseudoefedrina y loratadina se estima en 2 mg/mL, que es la cantidad del analito inmediatamente posterior a 10 veces el nivel de ruido.
- ✓ Los criterios de aceptación para el ajuste del sistema definido para las condiciones de corrida de la pseudoefedrina y loratadina se muestran en la tabla 11a y 11b así como las condiciones experimentales en las que se llevó a cabo la validación. Estas condiciones cumplieron con los criterios de aceptación para coeficiente de variación (CV), factor de capacidad (k`), Resolución (R) y factor de coleo (T) establecidos.

BIBLIOGRAFÍA

1. CIPAM. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México A.C.
2. Montgomery, Douglas C. Design and Analysis of Experiments. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc. New York, 1984
3. Taylor, John K. Validation of Analytical Methods. *Analytical Chemistry*. Vol. **55**, 1983
4. Vanderwielen, Adrianus J. Guidelines for Assay Validation. Pharm Tech. March 1982
5. Guideline for Submission of Supportive Analytical Data for Methods Validations in New Drug Applications. Dept. of Health and Human Services. F. D. A. April 1984
6. Inman, Eugene L. et al. General Method Validation Guidelines for Pharmaceutical Samples. *J. of Chrom. Sci.* Vol. **25**, June (1987)
7. USP 28. NF 23. 2005. <621> Chromatography, <1255> Validation of Compendial Methods
8. FEUM. Octava Edición. Vol. I. 2004
9. Skoog, Douglas A. et al. Principios de Análisis Instrumental. McGraw Hill 5ª Edición 2001.
10. Quanyun A. Xu, Lawrence A.Trissel. Stability-Indicating HPLC methods for drug analysis. Washington, D.C., American Chemical Society. 2003.
11. Swadesh Joel K., HPLC Practical and Industrial Aplications. Boca Raton, Florida. CRC. 2ª Ed. 2001.
12. Lunn, George. HPLC methods for pharmaceutical analysis.
13. Software PLM 2005.
14. Anderson, John T. Remington`s pharmaceutical Sciences 15th Edition. Mack Publishing Co. 1975.