



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN  
MÉTODO DE VALORACIÓN INDICADOR DE  
ESTABILIDAD PARA CÁPSULAS DE  
CLORHIDRATO DE METOCLOPRAMIDA DE  
LIBERACIÓN PROLONGADA**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A :

**ALBERTO CELIS GUÍZAR**



MÉXICO, D. F. EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUÍMICA

2007



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.



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.

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

NOMBRE: Alberto Pelis Guiza

FECHA: 24-agosto 2007

FIRMA: P. A. 

*Martha Patricia Guiza Álvarez*

## **JURADO ASIGNADO:**

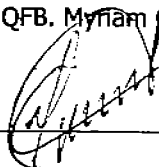
<b>PRESIDENTE:</b>	Prof. Inés Fuentes Noriega
<b>VOCAL:</b>	Prof. Ricardo Rodríguez Saenz
<b>SECRETARIO:</b>	Prof. Myriam Cortés Fuentes
<b>PRIMER SUPLENTE:</b>	Prof. Juan Manuel Rodríguez
<b>SEGUNDO SUPLENTE:</b>	Prof. Liz Jannet Medina Reyes

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Centro A. F. De Estudios Tecnológicos

Departamento de Analítica

**Asesor de Tesis:** QFB. Myriam Cortés Fuentes



---

**Sustentante:**



---

Alberto Celis Guízar

ESTO ES PARA TI, MADRE MIA

PARA QUE TI QUE FUISTE LA ÚNICA QUE SIEMPRE CREYÓ EN MI  
Y DE LA CUAL SIEMPRE RECIBÍ TU APOYO INCONDICIONAL.

ESTE ES UNO DE LOS GRANDES ÉXITOS QUE HEMOS  
CONSEGUIDO Y QUE NOS FALTAN POR CONSEGUIR.

GRACIAS A TODAS Y CADA UNA DE LAS PERSONAS QUE ME  
AYUDARON A DAR ESTE GRAN PASO. Y EN ESPECIAL  
MUCHÍSIMAS GRACIAS A TI, MYRIAM POR TODA TU PACIENCIA  
Y TODOS TUS CONSEJOS

INDICE	1
1. Resumen	5
2. Introducción:	5
2.1. Retrospectiva: <sup>(1-3)</sup>	5
2.2. Objetivos:	7
3. Generalidades	7
3.1. Monografía del Fármaco <sup>(4-10)</sup>	7
3.1.1. Descripción:	7
3.1.2. Nombres Comerciales:	7
3.1.3. Fórmula y peso molecular:	7
3.1.4. Espectro al ultravioleta:	8
3.1.5. Punto de fusión:	8
3.1.6. Solubilidad:	8
3.1.7. pka:	8
3.1.8. Coeficiente de partición:	8
3.1.9. Estabilidad	9
3.2. Farmacología: <sup>(4-10)</sup>	9
3.2.1. Farmacocinética:	9
3.2.2. Farmacodinamia:	9
3.3. Dosis y vía de administración:	10
3.4. Indicaciones terapéuticas:	10
3.5. Interacciones medicamentosas:	11
3.6. Precauciones en relación con efectos de carcinogénesis, mutagénesis, teratogénesis y sobre la fertilidad:	11
4. Fundamentos teóricos:	11
4.1. Eméticos y antieméticos: <sup>(7-24)</sup>	11
4.1.1. Reflejo del vomito:	12
4.1.2. Compuestos eméticos	12
4.1.2.1. Eméticos reflejos o de acción periférica:	13
4.1.2.2. Eméticos de acción central:	13
4.1.3. Antieméticos	13
4.1.3.1. Antieméticos de acción central	13
4.1.3.1.1. Antimuscarínicos:	13
4.1.3.1.2. Fenotiazinas:	14
4.1.3.1.3. Derivados de la butiferrona:	14
4.1.3.1.4. Metoclopramida:	14
4.1.3.1.5. Glucocorticoides:	14
4.1.3.1.6. Antagonistas de la serotonina:	14
4.1.3.2. Antieméticos de acción periférica	15

4.1.3.2.1. Protectores:	15
4.1.3.2.2. Anticolinérgicos:	15
4.1.3.2.3. Procinéticos:	15
4.2. Generalidades sobre cromatografía <sup>(7-24)</sup>	16
4.2.1. Parámetros cromatográficos	17
4.2.1.1. Distribución del analito entre las fases:	17
4.2.1.2. Ancho de pico y eficiencia de la columna	18
4.2.1.3. Resolución	18
4.2.2. Teoría de platos	19
4.2.3. Teoría de la velocidad (teoría cinética)	20
4.2.3.1. Difusión de remolino:	21
4.2.3.2. Difusión Longitudinal:	21
4.2.3.3. Resistencia a la transferencia de masa:	21
4.2.4. Tipos de cromatografía	22
4.2.5. Aplicación	23
4.2.6. Equipo	23
4.3. Métodos reportados para Metoclopramida. <sup>(25-40)</sup>	29
4.3.1. Fase móvil:	29
4.3.2. Preparación del estándar: (SR)	29
4.3.3. Preparación de la muestra: (SM)	30
4.3.4. Procedimiento:	30
4.4. Validación de métodos analíticos: <sup>(44-46)</sup>	30
5. Planteamiento del problema.	32
6. Metodología experimental.	32
6.1. Condiciones cromatográficas	32
6.2. Corrida analítica	32
6.2.1. Blanco de reactivos (BR)	32
6.2.2. Adecuación del sistema	32
6.2.3. Cromatografía	33
6.3. Criterios de aceptación de la corrida analítica	33
6.4. Sustancia de referencia:	33
6.5. Reactivos.	34
6.6. Equipo:	34
6.7. Formulaciones.	34
6.8. Cálculos.	35
7. Desarrollo del método.	35
7.1.1. Establecimiento del sistema.	35
7.1.1.1. Solución acuosa de ácido fosfórico 0.01M	35
7.1.1.2. Solución de acetato de sodio 0.07 M	35
7.1.1.3. Fase móvil	36
7.1.1.4. Blanco de reactivos (BR)	36
7.1.1.5. Punto control (PC).	36
7.1.1.6. Preparación de la referencia (SR)	36



10.4.	Adecuabilidad del sistema.	67
10.5.	Linealidad del método	68
10.6.	Exactitud del método.	68
10.7.	Precisión del método.	69
10.8.	Precisión intermedia.	69
10.9.	Uniformidad de contenido.	69
10.10.	Robustez y tolerancia.	69
10.11.	Estabilidad analítica de la muestra.	70
10.12.	Verificación del Clorhidrato de Metoclopramida SR	70
10.13.	Identificación del Clorhidrato de Metoclopramida	70
11.	Resultados y análisis de resultados (validación del método):	71
11.1.	Especificidad.	71
11.1.1.	Excipientes.	71
11.1.2.	Productos de degradación.	71
11.2.	Linealidad del sistema	72
11.3.	Precisión del sistema.	74
11.4.	Adecuabilidad del sistema.	74
11.5.	Linealidad del método.	74
11.6.	Exactitud del método.	77
11.7.	Precisión del método.	77
11.7.1.	Repetibilidad.	77
11.7.2.	Precisión intermedia.	77
11.8.	Uniformidad de contenido.	78
11.9.	Estabilidad analítica de la muestra.	79
11.10.	Robustez y tolerancia.	79
11.1.	Verificación del clorhidrato de Metoclopramida SR.	79
11.2.	Identificación de Clorhidrato de Metoclopramida.	80
12.	Conclusiones:	81
	Referencias:	82

## 1. Resumen

En el Centro AF de Estudios Tecnológicos S.A. se desarrolló y validó un método analítico para cuantificar **Metoclopramida clorhidrato** en cápsulas de liberación modificada con una dosis de 20mg por cápsula. El método analítico consiste en lo siguiente: la Metoclopramida se extrae de la formulación con metanol, y se inyecta a un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución usando una columna Symmetry® C18 de 15cm de longitud x 4.6 mm de diámetro interno rellena de partículas de 5µm, una precolumna Symmetry® C18 de 2cm de longitud x 3.9mm de diámetro interno rellena de partículas de 5µm y una fase móvil consistente en una mezcla de solución de acetato de sodio y acetonitrilo en proporciones 85:15, respectivamente, a un flujo de 1.5 mL/min y detección UV a 215 nm. La cuantificación de la muestra se lleva a cabo al comparar su respuesta con la de una Solución de Referencia preparada a la misma concentración teórica de la muestra.

## 2. Introducción:

### 2.1. Retrospectiva: <sup>(1-3)</sup>

La Farmacia como la medicina son tan antiguas como la humanidad, el hombre primitivo inició en la práctica de la Farmacia porque conoció y padeció enfermedades y dolor; para él, la enfermedad era concebida de diferentes formas

- Penetración en el cuerpo un objeto extraño
- Pérdida o evasión del alma.
- Consecuencia de la acción de espíritus hostiles.

Los ritos y rituales eran la herramienta para alejar al espíritu causante del dolor, esto era reforzado utilizando plantas y otros objetos para expulsar a los espíritus.

Intentaba responder 3 preguntas: quién, cómo y dónde, utilizando sin duda el método de ensayo, error y acierto.

En la cultura mesopotámica, el sacerdote-mago recitaba interminables letanías, mencionando todo tipo de objetos y/o personas donde podría refugiarse el maleficio. El contra hechizo consistía en arrojar al fuego un muñeco, el cual se habrá apoderado de los maleficios y enfermedades del paciente

Los sumerios fueron los primeros en usar la belladona contra espasmos, identificaron las primeras operaciones farmacéuticas para la preparación de medicamentos como son: desecación, pulverización, molienda, prensado, filtración, decantación, maceración, digestión y ebullición.

Ya en tiempos de la antigua Grecia y del imperio romano, la responsabilidad de controlar los medicamentos y su elaboración estaba en mano de los médicos, aunque en ciertas ocasiones distribuidores les proporcionaban los medicamentos. Hipócrates II eliminó de la práctica médica todo misticismo y con ellos a los hechiceros, amuletos y brujerías; en su ideología; las enfermedades no eran engendradas por los dioses y los síntomas dejaban de ser enemigos misteriosos a quienes se debía destruir, sino armas que tenían los médicos a favor de los enfermos.

Ya durante los siglos VII y VIII los árabes se adueñaron del mundo civilizado absorbiendo la cultura greco-romana. Alrededor de las mezquitas se construyeron academias llamadas

Su historia y propiedades farmacológicas han sido revisadas anteriormente por Pinder y colegas en el año de 1976, así como por McCallum y Albibi en 1983

## 2.2. Objetivos:

- ✱ Establecer las condiciones experimentales que nos permitan cuantificar el Clorhidrato de Metoclopramida por HPLC, de manera específica de manera que el método pueda ser utilizado como indicador de estabilidad.
- ✱ Ajustar el método para que sea útil en determinaciones al producto terminado como uniformidad de contenido.
- ✱ Validar dicho método analítico

## 3. Generalidades

### 3.1. Monografía del Fármaco <sup>(4-10)</sup>

#### 3.1.1. Descripción:

Polvo cristalino blanco o casi blanco, inodoro ó prácticamente inodoro.

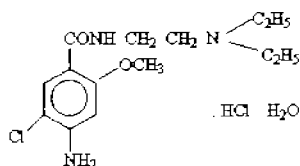
#### 3.1.2. Nombres Comerciales:

Elieten (Nipón Kayaku, Tokio, Japón)  
 Emperla (Neofarma - Helsinki)  
 Maxeran (Delagrangre - París)  
 Plasil (Lepetit - Milán)  
 Peraprim (taiyo, Gifuken - Japón)  
 Primperan (Delagrangre - París)  
 Reglan (Robins, Richmond, USA)

#### 3.1.3. Fórmula y peso molecular:

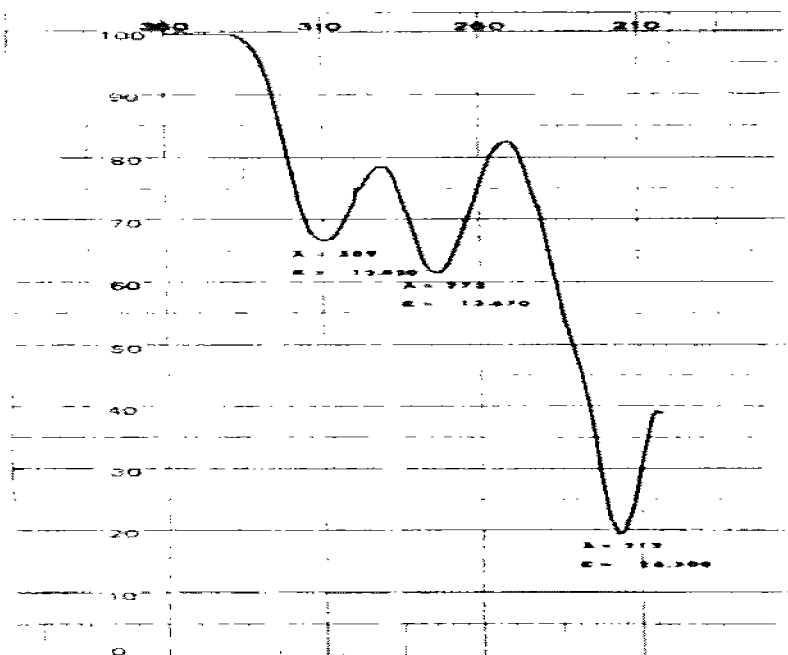
La fórmula condensada del Clorhidrato de Metoclopramida es  $C_{14}H_{22}ClN_3O_2 \cdot HCl \cdot H_2O$ . Su peso molecular es de 354.27%/<sub>m.u.</sub>

Fórmula desarrollada:



### 3.1.4. Espectro al ultravioleta:

El espectro al ultravioleta del Clorhidrato de Metoclopramida en agua fue obtenido con un espectrofotómetro Beckman Mod.24 y es mostrado en la figura 1



**Figura 1** Espectro al ultravioleta del Clorhidrato de Metoclopramida

### 3.1.5. Punto de fusión:

Empleando el método USP, el Clorhidrato de Metoclopramida funde en un intervalo de 182°-185°C y con microscopia térmica empieza a fundir en 181°C y es completa en 183°C.

### 3.1.6. Solubilidad:

A 25°C el Clorhidrato de Metoclopramida es soluble en 0.7g de agua, 3g de etanol (96%) y en 55g de cloroformo, siendo prácticamente insoluble en éter.

### 3.1.7. pka:

El Clorhidrato de Metoclopramida muestra dos constantes de ionización  $pK_1 = 9.71$  y  $pK_2 = 0.42$ . La determinación fue realizada espectrofotométricamente en solución acuosa y los valores son el promedio de las 16 determinaciones con una desviación estándar de 0.03 y 0.02.

### 3.1.8. Coeficiente de partición:

$\text{Log}P = 2.667$

### 3.1.9. Estabilidad

La máxima estabilidad del Clorhidrato de Metoclopramida fue encontrada en un pH= 7,6, mientras que la degradación máxima fue a pH= 2. uno de los productos de degradación es N,N-dimetiletikendiamina

## 3.2. Farmacología: (4-10)

### 3.2.1. Farmacodinámica:

La Metoclopramida se absorbe con rapidez y por completo después de su administración oral, pero el primer paso hepático reduce su biodisponibilidad en alrededor del 75%.

Se distribuye con rapidez en la mayoría de los tejidos y atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica y la placenta, las concentraciones del fármaco en la leche materna pueden exceder a las plasmáticas.

Hasta un 30% se excreta sin cambios por la orina. El resto se elimina por orina y bilis después de su conjugación con sulfato o ácido glucurónico de tal forma que se elimina por orina el 85% del fármaco. La vida media del fármaco en la circulación es de 4 a 6 horas, pero puede prolongarse hasta 24 horas en los pacientes con alteración de la función renal.

Lo anterior se demuestra por estudios de farmacología de  $C^{14}$ -Metoclopramida en ratas perros y humanos

Dosis (v.o.) mg/kg	100		20		10	
	Ratas		Perros		Humanos	
	U	F	U	F	U	F
0-24	71.9	5.7	65.3	—	77.8	20.0
24-48	8.5	4.4	6.9	18.3	8.7	1.0
48-72	1.0	1.7	1.0	0.8	0.8	1.6

U= Excreción urinaria      F Excreción fecal      % de dosis administrada

Tabla 1 Excreción de  $C^{14}$ -Metoclopramida en ratas perros y humanos

La farmacocinética de la Metoclopramida fue estudiada en voluntarios masculinos normales después de una dosis de 10mg por vía intravenosa. La forma de la curva plasmática en estos sujetos se adecua a un modelo de dos compartimentos con una distribución de  $T_{1/2} \alpha = 4.6 \text{ min}$  y una eliminación  $T_{1/2} \beta = 165.7 \text{ min}$ . el aclaramiento plasmático fue de  $10.9 \text{ mL/min/g}$ . G. Berner y colaboradores reportaron una biodisponibilidad de formulaciones comerciales

### 3.2.2. Farmacodinamia:

La Metoclopramida causa la mayoría de los efectos sobre el sistema nervioso central (CNS) que son característicos por un bloqueo dopaminérgico. Aunque no tiene efectos antimicóticos de utilidad, puede causar síntomas extrapiramidales de significancia, especialmente en altas dosis intravenosas; esto síntomas pueden ser usualmente prevenidos o tratados por la administración de difenilhidramina o benzotropina

Puede ocasionar somnolencia, lasitud, estreñimiento, diarrea, urticaria, eritema maculopapular, pueden presentarse episodios breves de agitación psicomotriz, sequedad de boca, edema periorbital y de lengua.

En el tracto gastrointestinal, la Metoclopramida estimula la motilidad del tracto digestivo, particularmente en la parte superior aumentando la motilidad del músculo liso desde el esófago hasta el intestino delgado proximal, acelerando el vaciado gástrico y el tránsito del contenido intestinal desde el duodeno hacia la válvula ileocecal. Estas acciones son importantes en su uso como agente procinético pero puede contribuir en los trastornos intestinales que se observan a veces durante el tratamiento antiemético.

Por su acción colinomimética y aceleradora de la motilidad gástrica, se incrementa el vaciamiento gástrico acelerándose el tránsito y la contracción esofágica así como la gástrica, la que se coordina con el peristaltismo del antro y del duodeno, incrementa la actividad y la presión pilórica.

Su acción antiemética es producto del bloqueo dopaminérgico contribuyendo así a la terapéutica de la gastroparesia.

La secreción de los diferentes compuestos del estómago no se afectan. Sin embargo, la presión sobre el conducto biliar y la vesícula se incrementa, y el esfínter de Oddi se relaja, sin afectarse la secreción pancreática, al parecer es importante que el antro esté intacto para la acción de la Metoclopramida.

Como todos los bloqueadores dopaminérgicos, puede incrementar los niveles de prolactina. (por el bloqueo de la acción de la dopamina como un inhibidor de la secreción de la prolactina)

### **3.3. Dosis y vía de administración:**

Vía de administración: oral.

En el adulto se aconsejan 3 ó 4 tabletas al día de 10 mg unos 30 minutos antes de cada comida y antes de acostarse.

En niños la dosis máxima es de 0.5 mg/kg en dosis divididas 3 ó 4 veces al día, si el niño tiene menos de 6 años no deberá recibir más de 0.1 mg/kg en dosis única.

Para el tratamiento de la gastroparesia diabética puede utilizarse durante 2 a 8 semanas dependiendo de la respuesta, pudiendo administrarse hasta 50 mg al día. Debe recordarse que después de 40 mg pueden aparecer con más facilidad efectos tóxicos.

### **3.4. Indicaciones terapéuticas:**

Antagonistas dopamínicos tales como la Metoclopramida se usan regularmente en el tratamiento de migraña. Su eficacia se atribuye a su acción antiemética y no a algún efecto específico sobre la migraña, pero puede ser debido a sus efectos antagonistas sobre los receptores D2 a los cuales se les atribuye los efectos relacionados con el dolor de cabeza u otros relacionados con la migraña, como son náuseas y vómitos.

Tiene un amplio rango de aplicaciones clínicas en diversos campos. En gastroenterología se usa para el tratamiento de náusea, vómito e incrementa la motilidad gastrointestinal sin estimular secreciones gástricas, pancreáticas o biliares. Esto incrementa el tono y la amplitud de las contracciones gástricas e incrementa la peristalsis del duodeno y yeyuno, resultando en el aceleramiento del vaciado gástrico y el tránsito intestinal. También incrementa el tono del esfínter bajo esofágico; se emplea también en los campos quirúrgico, ginecológico, radiológico y cardiológico. Se usa en forma farmacéutica parenterales para prevenir las náuseas y vómito que pueden ocurrir después del tratamiento con anticancerígenos

Induce la liberación de prolactina desde la pituitaria anterior por el bloqueo de la acción de la dopamina como un inhibidor de la secreción de la prolactina, y causa un incremento trascendental en los niveles de aldosterona circulantes. A esto se debe su utilidad en la inducción de la lactancia.

### **3.5. Interacciones medicamentosas:**

Todos los anticolinérgicos, incluyendo la atropina, disminuyen la motilidad gastrointestinal que ocasiona la Metoclopramida, potencializan los síntomas extrapiramidales y el riesgo de desencadenar crisis convulsivas cuando se administra conjuntamente con tioxantenos, fenotiacinas y butirofenonas.

Se debe evitar el uso de Metoclopramida conjuntamente con antidepresivos tricíclicos adrenomiméticos o inhibidores de monoaminoxidasa, y por lo menos se debe dejar un intervalo de 2 semanas entre un medicamento y otro.

La Metoclopramida antagoniza el efecto vascular de la dopamina y reduce la biodisponibilidad de la cimetidina hasta un 30%.

### **3.6. Precauciones en relación con efectos de carcinogénesis, mutagénesis, teratogénesis y sobre la fertilidad:**

No hay datos de alteraciones en la fertilidad como causa del uso de Metoclopramida, sin embargo, deberá recordarse que causa elevación de niveles de prolactina en sangre que producen incluso galactorrea.

No hay datos de mutagénesis ni carcinogénesis con el empleo de Metoclopramida

## **4. Fundamentos teóricos:**

### **4.1. Eméticos y antieméticos: (7-24)**

Como ya se ha citado en diversas ocasiones en este documento, el Clorhidrato de Metoclopramida se clasifica como un Antiemético y su principal uso es para prevenir y/o contrarrestar las náuseas y el vómito. Para poder comprender mucho mejor lo anterior le daremos un breve repaso a lo que es el reflejo del vómito, así como también señalaremos tanto qué es un compuesto emético como qué es un compuesto antiemético

#### **4.1.1. Reflejo del vomito:**

La émesis es un complejo reflejo de protección que no se halla bien desarrollado en todas las especies aunque sí en los carnívoros. Los fármacos que causan o aminoran los vómitos generalmente lo hacen modificando a los neurotransmisores responsables para la transmisión de la señal desde varios sitios. La penetración de los fármacos en cada sitio varía, complicando la efectividad de un tratamiento emético o antiemético. La émesis es controlada a través del centro del vómito que está localizado en la formación reticular lateral del bulbo raquídeo. En ese sitio, el centro está protegido por la barrera hemato-encefálica. Asimismo aunque varias vías aferentes pueden ser responsables de iniciar la émesis, todas las señales son coordinadas por el centro del vómito. Los impulsos hacia el centro del vómito en el bulbo raquídeo pueden provenir de los centros superiores, como la corteza cerebral y el sistema límbico. El vómito psicogénico y aquel proveniente de estímulos visuales y olfatorios se originan en la corteza cerebral, aunque los traumas craneanos y el aumento de la presión intracraneana inicia el vómito mediante las vías del sistema límbico. La acetilcolina es el neurotransmisor aferente primario que media al vómito desde los centros superiores, aunque la histamina actúa como transmisor secundario por vía de los receptores H<sub>2</sub>.

Los compuestos químicos provenientes de la sangre pueden estimular la zona quimiorreceptora gatillo (ZQG), localizada en el área postrema de las paredes laterales del 4° ventrículo. Esta área no posee una barrera hemato-encefálica completa por lo tanto es más rápidamente accesible que el centro emético a los fármacos o toxinas que circulan por la sangre.

Las manifestaciones iniciales de la respuesta con frecuencia involucran náuseas, donde el tono gástrico es reducido, la peristalsis gástrica está reducida o ausente, y el tono del duodeno y la parte superior del duodeno son incrementados. Por último la porción superior del estómago se relaja mientras el píloro oprime, y las coordinadas contracciones del diafragma y los músculos abdominales permiten la expulsión del contenido gástrico.

Las neuronas de la ZQG son también más sensibles a la presencia de compuestos químicos en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y sangre, debido a que existen terminales nerviosas que directamente contactan con el LCR. Los vómitos causados por mediadores de origen sanguíneo (uremia, piómetra, enfermedad hepática, endotoxemia y aquellas asociadas con enfermedad producida por radiación) y fármacos (digitálicos, apomorfina, analgésicos narcóticos y estrógenos) lo realizan a través de la ZQG. El estímulo de la ZQG es iniciado por los receptores dopaminérgicos (D<sub>2</sub>) que responden a los agonistas como dopamina y apomorfina. La serotonina (5-HT) también parece ser un importante mediador de los vómitos en esta área, particularmente los subtipos 5-HT<sub>3</sub>. La histamina por vía del receptor H<sub>1</sub> actúa como un neurotransmisor secundario en la ZQG. La eficacia clínica de fármacos activos en la ZQG pueden reflejar selectividad hacia tipos de sub-receptores de cada neurotransmisor. Al menos 5 sub-receptores de dopamina, 9 sub-receptores de serotonina y 5 sub-receptores de histamina se han identificado, aunque se desconoce actualmente qué tipo de subreceptor es afectado por cada fármaco en particular.

#### **4.1.2. Compuestos eméticos**

Clínicamente, la émesis es inducida farmacológicamente para vaciar la porción anterior del tracto digestivo. Las indicaciones para provocarla pueden incluir la inducción para anestesia general, si existe alguna posibilidad de presencia de alimento en el estómago o también en el caso de ingestión de venenos.



#### **4.1.2.1. Eméticos reflejos o de acción periférica:**

La distensión de la faringe, esófago, estómago o duodeno con agua tibia, agua oxigenada o solución salina pueden inducir una respuesta emética. Además en el caso de ingestión de toxinas, la administración de agua caliente mediante un tubo estomacal puede ayudar a diluir venenos presentes. Aunque su seguridad y eficacia varían, un número de sustancias inducen la émesis por irritación del epitelio del tracto gastrointestinal. El jarabe de ipecacuana es un emético comúnmente recomendado para inducir el vómito en pediatría humana. Éste contiene el alcaloide emetina, el que aumenta la secreción lagrimal, salivación y secreciones bronquiales; la émesis generalmente ocurre aunque no en forma constante como resultado de la estimulación periférica y central.

#### **4.1.2.2. Eméticos de acción central:**

Aunque un número de fármacos son capaces de estimular la ZQG, ciertos opiáceos, particularmente la apomorfina, son los más comúnmente empleados. El clorhidrato de apomorfina es un derivado sintético de la morfina con sólo actividad depresora marginal. Su actividad emética predomina sobre las acciones tipo morfina y produce la estimulación de los receptores dopaminérgicos en la ZQG. La apomorfina puede ser administrada por cualquier ruta, aunque las dosis orales deben ser mayores para compensar su reducida biodisponibilidad oral. La émesis generalmente ocurre en 2 a 10 minutos después de la administración subcutánea o subconjuntival. Aunque la apomorfina estimula el vómito en la ZQG, ésta también lo deprime en forma directa y las dosis subsiguientes son menos probables que induzcan la émesis aún si ésta no ocurrió después de la primer dosis. Dosis excesivas de apomorfina deprimen el sistema nervioso central, particularmente el centro respiratorio y están contraindicadas en la presencia de depresión central preexistente.

### **4.1.3. Antieméticos**

Los antieméticos controlan la émesis por medio de una acción central o periférica. Ambas acciones dependen de y pueden correlacionarse al bloqueo de la transmisión en los sitios receptores. Los antieméticos de acción central bloquean los impulsos a los centros superiores y al centro emético agrupándose entre ellos los anticolinérgicos muscarínicos, antidopaminérgicos que bloquean los receptores dopaminérgicos en la ZQG y los antihistaminérgicos que bloquean los receptores H1 en el aparato vestibular y secundariamente en la ZQG y en el centro emético. Los agentes antieméticos poseen un amplio o limitado efecto dependiendo de cuál centro se deprime.

#### **4.1.3.1. Antieméticos de acción central**

**Aparato vestibular:** los vómitos causados por mareo o por enfermedad del oído interno son mediados por el aparato vestibular. Aunque la eficacia depende del efecto directo sobre las vías neurales provenientes del aparato vestibular, las acciones pueden ser independientes de las potencias sedantes o antihistamínicas.

##### **4.1.3.1.1. Antimuscarínicos:**

Los alcaloides de la belladona, especialmente hioscina (escopolamina) y compuestos sintéticos así como la dicitolmina clorhidrato y el yoduro de isopropamida son agentes antieméticos efectivos. Su acción es de corta duración (hasta 6 horas) y la xerostomía, sedación y otros efectos colaterales pueden ser anticipados.

#### **4.1.3.1.2. Fenotiazinas:**

Estos antieméticos de amplio espectro controlan la émesis inducida por muchas causas centrales, además de la estimulación laberíntica. Las fenotiazinas bloquean la émesis mediada por la ZQG en dosis bajas debido a sus efectos antidopaminérgicos y antihistamínicos. En altas dosis (quizás no farmacológicas), sus efectos anticolinérgicos pueden también hacerse presentes en otros sitios centrales, incluyendo el centro del vómito. Una variedad de derivados fenotiazínicos (ej: clorpromazina, proclorperazina, triflupromazina, perfenazina, trifluoperazina y mepazina) son empleados como antieméticos. Los efectos adversos primarios asociados con su empleo como antieméticos son la sedación e hipotensión, debido al boqueo-alfa periférico. La selección de una fenotiazina particular puede basarse en evitar sus reacciones adversas. El reemplazo de fluidos deberá ser instituido, si es necesario, antes de administrar una fenotiazina.

#### **4.1.3.1.3. Derivados de la butiferrona:**

El haloperidol y droperidol, que son empleados como tranquilizantes mayores, son también potentes antieméticos debido a su actividad antidopaminérgica. Estos fármacos raramente se usan como antieméticos debido a sus efectos colaterales (similares a aquellos encontrados con el grupo de las fenotiazinas).

#### **4.1.3.1.4. Metoclopramida:**

Ésta bloquea efectivamente la émesis mediada por la ZQG. Debido a su potente acción antagonista de la dopamina se creyó que ésta era la responsable de la inhibición del ZQG; evidencias recientes indican que el antagonismo de los receptores 5-HT<sub>3</sub> es el mecanismo más probable, particularmente cuando se administra en dosis elevadas. La Metoclopramida antagoniza efectivamente la émesis inducida por apomorfina y es 20 veces más potente que la fenotiazina. La Metoclopramida es indicada para el control de la émesis inducida por una amplia variedad de causas periféricas y de origen sanguíneo. Las dosis elevadas de Metoclopramida, particularmente cuando se combinan con dexametasona, han sido usadas para tratar la émesis asociada con la quimioterapia antineoplásica en pacientes humanos.

La Metoclopramida parece antagonizar competitivamente la relajación arterial renal inducida por la dopamina. El efecto es dosis dependiente y ha sido documentado en modelos de perfusión renal en varias especies.

#### **4.1.3.1.5. Glucocorticoides:**

Los glucocorticoides y particularmente la dexametasona, se caracterizan por sus efectos antieméticos, aunque su mecanismo de acción no se entiende. La dexametasona y metilprednisolona han sido empleados en pacientes humanos para controlar los vómitos asociados con la quimioterapia oncológica. Los glucocorticoides parecen actuar en una modalidad aditiva y sinérgica cuando se combinan con otros antieméticos. Aunque los glucocorticoides pueden proveer beneficios para controlar los vómitos, sus efectos colaterales hacen que su empleo se realice en forma cuidadosa.

#### **4.1.3.1.6. Antagonistas de la serotonina:**

Estos fármacos se han reportado útiles por sus efectos antieméticos mediados en la ZQG y particularmente en aquellos casos inducidos por agentes quimioterapéuticos. Como un antagonista de los receptores 5-HT<sub>3</sub>, el ondansetron también puede afectar la motilidad gástrica mediada vagalmente. El efecto parece depender en parte de la fase de motilidad, mientras que el vómito

mediado periféricamente no ha sido documentado. Además de sus efectos antiserotonina, la ciproheptadina es un fármaco antihistamínico y anticolinérgico. Se la ha empleado en humanos para controlar los vómitos y la diarrea (el último asociado con espasticidad). Su uso como estimulante del apetito ha sido bien documentado,

Los sedantes tales como los barbitúricos (fenobarbital) y las benzodiazepinas han sido empleadas para el control de los vómitos psicogénicos y de comportamiento.

#### **4.1.3.2. Antieméticos de acción periférica**

##### **4.1.3.2.1. Protectores:**

Ocasionalmente algunos fármacos pueden ser empleados como antieméticos debido a su acción protectora local del epitelio gastrointestinal a una acción abrasiva aumentada. Los fármacos que modulan la secreción del ácido gástrico pueden también proveer efectos antieméticos. Los antiácidos y protectores como el caolín, pectina y sales de bismuto son de beneficio limitado en el control de la émesis. La distensión o irritación inicial del estómago por estos agentes pueden exacerbar la émesis. Los antiácidos pueden ser efectivos en ciertos casos. Otros antieméticos de acción periférica incluyen a fármacos que afectan la motilidad gástrica, incluyendo los fármacos anticolinérgicos y procinéticos, como la Metoclopramida y la domperidona.

##### **4.1.3.2.2. Anticolinérgicos:**

Estos fármacos bloquean a los receptores muscarínicos del centro emético e inhiben periféricamente la transmisión colinérgica. Los fármacos anticolinérgicos que no cruzan bien la barrera hemato-encefálica y por ello actúan primariamente en forma periférica incluyen, al glicopirrolato, propanetelina, metoscopolamina e isopropamida. La capacidad de los anticolinérgicos de suprimir la émesis está probablemente relacionada con la inhibición del impulso vagal eferente, la mejora de los espasmos del músculo liso G.I. y la inhibición de las secreciones gastroentéricas. La demora del vaciado gástrico causado por estos fármacos puede por sí mismo causar émesis, por lo tanto los anticolinérgicos no deberán ser empleados por más de 3 días en el paciente con vómitos. Debido a sus propiedades anticolinérgicas, estas fármacos no deberán ser empleados en combinación con otros fármacos cuyas acciones sean dependientes de la actividad colinérgica en los ganglios o en los músculos lisos. Entre ellas la Metoclopramida, la cisaprida y los opiáceos.

##### **4.1.3.2.3. Procinéticos:**

Los fármacos procinéticos, específicamente la Metoclopramida actúan como antiemético periférico debido a sus efectos procinéticos sobre el tracto G.I. La Metoclopramida fisiológicamente antagoniza la émesis por virtud de sus acciones sobre el área gastroduodenal superior, aumenta el tono del esfínter esofágico, relaja el píloro duodenal y promueve las contracciones anterógradas del antrum gástrico.

La motilidad intestinal ordenada resulta del balance entre factores hormonales, miogénicos y neurogénicos. Es un evento fisiológico complejo. Ocurren varias formas de movimientos coordinados en el intestino, que sirven para mezclar los contenidos líquidos y propulsarlos en una dirección aboral. Las segmentaciones rítmicas son causadas por contracciones no progresivas simples de los músculos circulares. Ello resulta en movimientos de mezclado que promueven la absorción del contenido intestinal por estrechamiento efectivo de su diámetro y permiten su avance. La contracción de los músculos longitudinales resulta en movimientos peristálticos y movimiento aboral del contenido intestinal. Aunque la actividad peristáltica es principalmente

propulsiva, ésta también asegura un mezclado y una absorción exitosa. Ambos músculos, lisos circulares y longitudinales, están involucrados en los movimientos peristálticos. La actividad en el intestino delgado varía de aquel del intestino grueso. Generalmente se producen continuamente ondas lentas que se propagan aboralmente. En el colon las ondas lentas a veces están ausentes y la propagación puede ser variable. La motilidad intestinal es integrada en varios niveles localmente en los ganglios autónomos y en el SNC ya sea supra o espinalmente. Varios tipos de receptores muscarínicos han sido identificados ( $M_1$ ,  $M_2$  y  $M_3$ ) en el tracto gastrointestinal. Los receptores  $M_1$  que se hallan presentes en el plexo mientérico pueden inhibir la motilidad vía mecanismo gamma aminobutírico. Los receptores  $M_2$  localizados pre y postsinápticamente median la inhibición presináptica de la liberación de acetilcolina. Los receptores  $M_3$  parecen estar localizados sobre las células musculares.

#### 4.2. Generalidades sobre cromatografía (7-24)

La palabra cromatografía (“kromatos”, color y “graphos” escrito) fue utilizada por primera vez por el botánico ruso M. Tswett en 1906 para designar una técnica empleada por él para separar pigmentos vegetales; a una columna de vidrio rellena de carbonato cálcico, le hizo pasar un extracto de hojas verdes en éter de petróleo, adicionando posteriormente el disolvente puro por la parte superior de la columna. Al final obtuvo como resultado una serie de bandas horizontales diversamente coloreadas, debido a la diferencia de adsorciones por el carbonato cálcico de los colorantes de la planta. En la actualidad se sabe que la separación no está condicionada por el color, más se sigue utilizando el nombre de cromatografía. En esta separación, la fase estacionaria estaba compuesta del relleno de carbonato cálcico, el éter de petróleo es la fase móvil y los pigmentos son los componentes a separar que se encuentran inmersos en dos fuerzas contrarias: el disolvente tiende a arrastrar los componentes hacia la salida de la columna y el carbonato cálcico que tiende a retenerlos adsorbiéndolos. Debido a que estos efectos son de diferente intensidad para los distintos pigmentos, esto produce una diferencia en las velocidades de migración por la columna, llegándose a presentar la separación.

La cromatografía se define como un método físico de separación en el cual los componentes se separan por su diferente distribución en dos fases, una de las cuales constituye un lecho estacionario y la otra un fluido que pasa a través o a lo largo del lecho estacionario (fase móvil). En el primer paso, la fase móvil comienza a fluir a través de la columna (fase estacionaria), resultando un movimiento de los componentes de la muestra a lo largo de la columna y una parcial separación de cada uno de ellos. La separación cromatográfica se debe a las diferentes velocidades de migración en que se distribuyen los solutos a lo largo de las moléculas de la columna. La migración diferencial es la base de la separación cromatográfica; si no existieran estas diferencias, la separación no sería posible.

La cromatografía moderna se fundamenta principalmente en dos teorías desarrolladas a mediados del siglo XX cada una de las cuales tienen sus ventajas y limitantes.

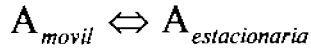
- Teoría de platos
- Teoría de la velocidad (teoría cinética)

Es importante definir primero algunos parámetros importantes para después presentar las distintas teorías que definen al fenómeno cromatográfico.

**4.2.1. Parámetros cromatográficos**

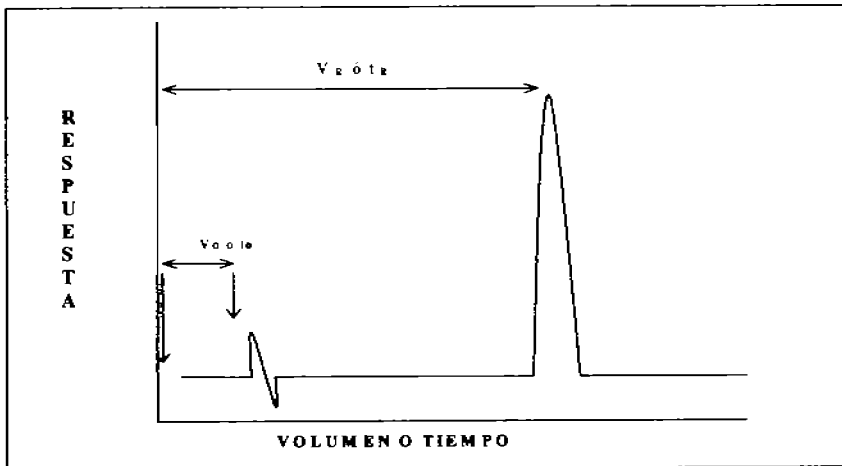
**4.2.1.1. Distribución del analito entre las fases:**

La distribución del analito entre las fases puede ser descrita de una manera muy simple. Un analito está en equilibrio entre las dos fases:



La constante de equilibrio, K, es llamada coeficiente de partición, definido como la concentración molar del analito en la fase estacionaria dividida entre la concentración molar del analito en la fase móvil.

El tiempo que transcurre desde la inyección de la muestra hasta que se obtiene la máxima altura del pico que corresponde al analito cuando es detectado al final de la columna es el denominado Tiempo de Retención ( $t_R$ ) y por consiguiente, el volumen de fase móvil necesario para eluir el centro de esa banda cromatográfica se denomina Volumen de Retención ( $V_R$ ). Idealmente, cada analito en una muestra tendrá un tiempo de retención diferente. El tiempo que se requiere para que la fase móvil pase a través de la columna se denomina Tiempo Muerto ( $t_0$ ). Se determina indirectamente considerando el tiempo que tarda en eluir un compuesto no retenido por el sistema cromatográfico. El volumen que la fase móvil ocupa en la columna se denomina Volumen Muerto ( $V_0$ ) ver Figura 2.



*Figura 2* Tiempo de retención y tiempo muerto.

El término llamado Factor de Retención o Factor de Capacidad (k), es frecuentemente utilizado para describir la relación entre la cantidad de sustancia en la fase estacionaria y la fase móvil. Está relacionado con el coeficiente de partición del soluto y a diferencia del tiempo de

retención, es un parámetro que no se ve influido por cambios en la velocidad de flujo o en el tamaño de la columna. Se calcula de la siguiente manera:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

El  $t_R$  y el  $t_0$  se obtienen fácilmente de un cromatograma. Un valor ideal para  $k'$  se encuentra entre 1 y 20, cuando el factor de capacidad de un analito es menor a uno, significa que su elución es tan rápida que la determinación exacta de este parámetro es muy difícil, en cambio altos factores de capacidad (superiores a 20) implican que la elución toma un tiempo muy largo, y por consecuencia se corre el riesgo de tener picos demasiado anchos en su base y difíciles de detectar, además de tener tiempos de corrida demasiado prolongados.

También se define la Selectividad o Factor de Separación ( $\alpha$ ), la cual describe la separación de dos especies A y B:

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$$

Si el valor de  $\alpha$  es 1, las dos especies no se resuelven, si  $\alpha > 1$  indica que los dos picos están resueltos.

#### 4.2.1.2. Ancho de pico y eficiencia de la columna

Para obtener separaciones óptimas, es fundamental lograr picos cromatográficos agudos y simétricos. Esto significa que el ancho de la banda cromatográfica debe ser lo más angosta posible. De esto se deriva que sea importante medir la eficiencia de la columna. Idealmente, los picos cromatográficos presentan un comportamiento similar a una campana de Gauss, pero en la práctica, la mayoría de los picos presentan alguna desviación a este comportamiento, siendo una de las más comunes lo que se denomina como Coleo (T) Hay que puntualizar que cuando el ancho de la base del pico aumenta, indica que más de un mecanismo de retención se está presentando, lo cual no es deseable. Al igual que otros parámetros cromatográficos, existen diversas maneras de calcular la simetría de un pico y cuando éste es mínimo, las diferencias en los resultados son casi imperceptibles.

#### 4.2.1.3. Resolución

Aunque la selectividad  $\alpha$  describe la separación de los centros de las bandas cromatográficas, no considera el ancho de las mismas. Otra medida de qué tan eficiente ha sido la separación entre las especies es el parámetro que se denomina Resolución ( $R$ ). La resolución de dos especies, A y B está definida por la siguiente expresión, donde las alturas de los picos están definidas como  $W$ :

$$R = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$

Normalmente en la mayoría de las separaciones cromatográficas, una resolución adecuada se da con valores de  $R > 1.5$ .

Los parámetros como la resolución, el número de platos teóricos (N), la selectividad y el factor de capacidad pueden ser relacionados de una manera sencilla mediante la siguiente expresión matemática:

$$R = \frac{\alpha - 1}{\alpha} \sqrt{N} \left( \frac{1 + k'_s}{k'_s} \right)$$

Para obtener alta resolución, los tres parámetros deben ser maximizados. Un incremento en N, el número de platos teóricos, mediante el empleo de una columna de longitud mayor, también provoca un incremento en el tiempo de retención, y por consecuencia la banda se ensancha, lo cual no es deseable. En lugar de incrementar de esta manera el número de platos teóricos, la altura equivalente de un plato teórico (H) puede ser reducido mediante el empleo de columnas cuya fase estacionaria tenga un tamaño de partícula menor.

Es frecuente que controlando el factor de capacidad  $k'$ , las separaciones mejoren notablemente. Este objetivo puede ser alcanzado cambiando la composición ya sea de la fase móvil o estacionaria o ambas.

La selectividad puede ser manipulada para mejorar las separaciones. Cuando su valor se encuentra cercano a la unidad, la optimización de  $k'$  y el incremento de N no es suficiente para proporcionar separaciones adecuadas en un tiempo razonable. En los casos en que  $k'$  es optimizado en primera instancia, la selectividad puede ser incrementada mediante alguno de los siguientes procedimientos:

- ▶ Cambiar la composición de la fase móvil.
- ▶ Cambiar la composición de la fase estacionaria.
- ▶ Cambiar la temperatura de la columna.
- ▶ Implementar reacciones de derivatización (como la incorporación de especies que complejen con el analito)

Los conceptos antes revisados son los más empleados en cromatografía porque describen como es que ocurre el proceso de separación y las condiciones que pueden ser manipuladas para obtener separaciones óptimas y con tiempos de elución mínimos.

#### **4.2.2. Teoría de platos**

Esta teoría fue propuesta por Martín y Synge en 1941. Se fundamenta principalmente en una analogía que hacen de la extracción a contra corriente y la destilación.

En esta teoría la columna se considera como un sistema estático en equilibrio, para la separación se asume que la columna tiene una longitud y flujo constante. A partir de esto se definen varios parámetros acerca del desempeño del sistema de separación.

El modelo del plato teórico supone que la columna cromatográfica, consiste de un número de capas separadas, llamadas platos teóricos. En estos "platos" ocurren equilibrios independientes de la muestra entre la fase estacionaria y la fase móvil. El analito se mueve a través de la columna debido a equilibrios de transferencia entre la fase móvil y el próximo plato Figura 3.

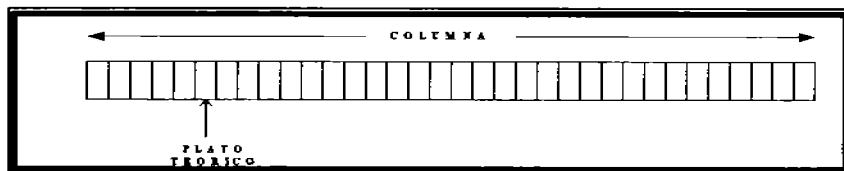


Figura 3 Representación esquemática del plato teórico.

Es importante remarcar que los platos teóricos realmente no existen como un aspecto físico, sólo son una convención humana que ayuda a comprender el proceso mediante el cual una columna realiza su función de separación. También sirven como una medida de la eficiencia de la columna, mediante el conocimiento de la cantidad de platos teóricos que posee. El número de platos teóricos es representado por la letra  $N$ , y evidentemente es deseable un mayor número de platos teóricos para obtener una separación más eficiente.

También se define la *Altura Equivalente del Plato Teórico o HEPT (H)*; a medida que este parámetro es más pequeño, existe un mayor número de platos teóricos en la columna. Si la longitud de la columna es  $L$ , entonces la altura equivalente del plato teórico es:

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

El número de platos teóricos de una columna puede ser calculado mediante diversas expresiones matemáticas, sin embargo la siguiente expresión evita el riesgo asociado al momento de dibujar las tangentes para la determinación del ancho en la base del pico:

$$N = 5.54 \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$

Donde  $W_{1/2}$  es la distancia que se mide entre las líneas del pico a una altura del 50% del máximo.

Como se puede deducir de la explicación anterior, el desempeño de las columnas está directamente relacionado con el número de platos teóricos, es decir entre menor sea la altura del plato teórico, mayor será el número de ellos y por lo tanto la eficiencia será mayor.

#### 4.2.3. Teoría de la velocidad (teoría cinética)

Propuesta por J.J. Van Deemter en 1956 considera la dinámica de la separación.



Una descripción más real del proceso de separación dentro de la columna, considera el tiempo tomado por el analito en los equilibrios que tiene entre la fase estacionaria y la fase móvil. La forma de la banda que resulta de un pico cromatográfico es afectada por la velocidad de elución. También es afectada por las distintas rutas disponibles por las cuales las moléculas de soluto pueden desplazarse dentro y entre las partículas que conforman la fase estacionaria.

Los distintos mecanismos que contribuyen al ensanchamiento de la banda cromatográfica son descritos por la ecuación de Van Deemter. La ecuación de Van Deemter define a la altura del plato teórico (H) como:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

Dónde  $u$  es la velocidad lineal promedio de la fase móvil.  $A$ ,  $B$  y  $C$  son factores que contribuyen al ensanchamiento de la banda.

#### **4.2.3.1. Difusión de remolino:**

La difusión de remolino corresponde al término "A" de la ecuación de Van Deemter. La fase móvil se desplaza a través de la columna, la cual está empacada con la fase estacionaria. Las moléculas de soluto tomarán distintas trayectorias (de manera aleatoria) a través de la fase estacionaria. Esto tiene como consecuencia que la banda se ensanche debido a que las distintas trayectorias son de diferente longitud.

Este parámetro está directamente relacionado con el tamaño de las partículas, la geometría y lo compacto del empaque de la fase estacionaria.

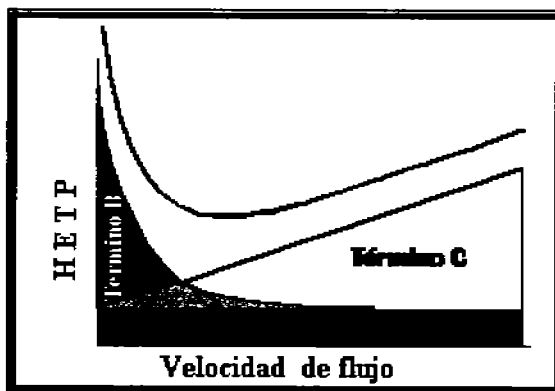
#### **4.2.3.2. Difusión Longitudinal:**

La difusión longitudinal corresponde al término "B" de la ecuación de Van Deemter. La concentración del analito es menor al final de la banda que en el centro y esto se debe a que las moléculas del analito tienden a migrar desde la porción central concentrada de la banda a las regiones más diluidas a ambos lados de ella. Este fenómeno ocurre tanto en la fase móvil como en la estacionaria, y su magnitud aumenta con la velocidad de la fase móvil, es decir, si la velocidad de la fase móvil es alta, los efectos de la difusión longitudinal decrecen.

#### **4.2.3.3. Resistencia a la transferencia de masa:**

La resistencia a la transferencia de masa se conoce también como el término "C" de la ecuación de Van Deemter. Al analito le toma un cierto tiempo alcanzar el equilibrio entre las fases, si la velocidad de la fase móvil es alta no se logran verdaderos estados de equilibrio y el soluto que está relativamente distante de la fase estacionaria, tenderá a desplazarse más rápido, lo que contribuye a que la banda cromatográfica se ensanche, sobre todo cuando la velocidad de la fase móvil es alta.

Con la ecuación de Van Deemter se obtiene una gráfica que relaciona la altura del plato teórico (H) con el promedio de la velocidad lineal de la fase móvil Figura 4.



**Figura 4** Gráfico típico de Van Deemter.

Este gráfico es sumamente útil en la determinación de la velocidad óptima de la fase móvil. Es importante recordar que mientras más pequeño sea el valor de la altura efectiva del plato teórico mejor será la separación.

#### 4.2.4. Tipos de cromatografía

En la cromatografía los componentes de la mezcla son transportados por la fase móvil a través de la fase estacionaria. Cada especie sufre un retardo distinto en su transporte debido a varios tipos de interacciones:

- ▶ Adsorción en la superficie
- ▶ Solubilidad
- ▶ Carga

En la Tabla 2, se presentan los cuatro principios de separación en la técnica de cromatografía de líquidos. Se puede presentar uno u otro de acuerdo con el fenómeno que propicie la retención de las moléculas en la fase estacionaria.

Tipo de Cromatografía	Fase Móvil	Fase Estacionaria	Principio de la separación
Líquido / Líquido	Líquido	Líquido	Cromatografía de partición
Sólido / Líquido	Líquido	Sólido	Cromatografía de adsorción
			Cromatografía de exclusión molecular
			Cromatografía de intercambio iónico

**Tabla 2** Clasificación de los principios de separación cromatográficos.

La cromatografía se puede dividir de acuerdo al tipo de separación.

- ▶ Elución
- ▶ Análisis por desplazamiento
- ▶ Análisis frontal

En la separación por elución el soluto sufre un fenómeno de partición entre las dos fases. La separación se fundamenta en la retención relativa de tal sustancia.

En el análisis por desplazamiento los materiales se mueven a través de la columna al ser desplazados por una sustancia con mayor retención.

En el análisis frontal las muestras se adicionan de manera constante a la columna y los componentes se analizan conforme eluyen, uno de los ejemplos es la filtración a través de carbono. Se utiliza principalmente para evaluar la retención relativa y no para la separación de mezclas.

#### **4.2.5. Aplicación**

En la actualidad las aplicaciones de la cromatografía de líquidos de alta resolución son tan amplias que sería difícil no encontrar una rama de la química y ciencias de la vida en la que no se incluya a la cromatografía ya sea con fines preparativos, de identificación o de cuantificación.

Debido a las cualidades (configuración de detección de acuerdo a necesidades) de esta técnica, se puede emplear en la investigación para la identificación, purificación y cuantificación de sustancias nuevas, análisis de compuestos puros, formas farmacéuticas, análisis de alimentos, industria metalúrgica, análisis de productos biotecnológicos, secuenciación de proteínas y una cantidad innumerable de aplicaciones de carácter cualitativo y cuantitativo en las ciencias forenses.

#### **4.2.6. Equipo**

El equipo requerido para la cromatografía de líquidos de alta resolución está constituido de forma general por un reservorio para la fase móvil, un sistema de bombeo, un sistema de inyección de muestra, un sistema de detección, un sistema de desechos y un registrador.

##### **✘ Reservorio para fase móvil:**

Debe tener las características adecuadas de tal manera que no interactúe químicamente con las fases móviles las cuales son generalmente mezclas de disolventes acuosos y orgánicos.

Si se considera que la separación se realiza utilizando sólo un disolvente constante, esta elución recibe el nombre de isocrática. En cambio, una elución con gradiente utilizan dos (o más) disolventes con una polaridad significativamente distinta.

Cuando se desarrolla un análisis usando el método de gradiente se debe tener presente dos objetivos. Obtener la mejor resolución de los componentes de la muestra en el menor tiempo posible y asegurar alta precisión y exactitud.

Para obtener buenos resultados con el método de gradiente debemos seguir 5 pasos fundamentales:

1. Determinar la composición inicial y final del solvente
2. Ajustar el tiempo del gradiente
3. Determinar la forma de la curva del gradiente (lineal, cóncava o convexa)
4. Ajustar la velocidad del flujo para mejorar la resolución
5. Regresar a las condiciones iniciales la columna para la siguiente inyección

#### ✘ *Bomba:*

El sistema de bombeo constituye una parte fundamental para el cromatógrafo de líquidos y sus características de operación afectan directamente el resultado del análisis. Las bombas deben de estar constituidas de un material no absorbente (que no absorban los compuestos con los que están en contacto), no aditivo (que no desprenda componentes), y no reactivo (que reaccione al estar en contacto con los componentes de la muestra y la fase móvil).

Se utilizan tres tipos de bombas, cada una con sus propias características, estas son: bombas recíprocas, bombas de jeringa o desplazamiento y bombas neumáticas o de presión constante

En las *bombas recíprocas* el disolvente es impelido por el movimiento de vaivén de un pistón accionado por un motor. Dos válvulas con cierre de bola que al abrir y cerrar alternativamente controlan el flujo del disolvente hacia dentro y fuera de un cilindro. Entre sus desventajas podemos mencionar que producen un flujo con pulsaciones, las cuales se manifiestan como un ruido en la línea base en el cromatograma. De las ventajas se pueden citar su pequeño volumen interno (35 a 400  $\mu$ L), sus altas presiones de salida (por encima de los 10,000psi), su sencilla adaptación a la elución por gradiente y sus caudales constantes. Estas bombas son prácticamente independientes de la contrapresión de la columna y de la viscosidad del disolvente

Las *bombas de desplazamiento* consisten en grandes cámaras como una jeringa, equipadas con un embolo que se activa por un mecanismo de tornillo accionado con un motor de pasos. También produce un flujo independiente de la viscosidad y de la contrapresión, además que este flujo está libre de pulsaciones. Sus desventajas son que tiene una capacidad de disolvente limitada (~250mL), y una incomodidad por el cambio de disolventes.

Para las *bombas neumáticas*, la fase móvil se encuentra en un contenedor colocado en un recipiente que puede presurizarse mediante gas comprimido. Estas bombas tienen una limitada capacidad y presión de salida, aunque resultan baratas y no provocan pulsaciones. Su caudal depende de la viscosidad del disolvente y de la contrapresión de la columna. No son adecuadas para elución con gradiente y están limitadas a presiones menores de unos 2000psi

Otro aspecto a considerar son los sistemas de gradiente, para los cuales las bombas se dividen en dos grandes grupos, dependiendo de la forma en que se lleva a cabo la mezcla de los disolventes. El primer grupo se denomina de baja presión, ya que los disolventes se mezclan a una velocidad dada a una baja presión, para luego ser bombeados a la columna con una presión más elevada; el segundo grupo se denomina de alta presión ya que los disolventes son bombeados por separado a altas presiones para luego ser mezclados.

✘ *inyector:*

El sistema de introducción de la muestra debe de ser reproducible y preciso, debe de contribuir lo menos posible al ensanchamiento de las bandas cromatográficas, debe de operar a altas presiones y debe de ser químicamente inerte tanto con la fase móvil como con la muestra.

Hasta hacer poco tiempo, los sistemas de introducción de la muestra se clasificaban en dos grupos: inyectores de jeringa y válvulas muestreadoras, actualmente ya no es posible separar los sistemas de introducción de muestra ya que las válvulas más recientes hacen uso de jeringas para determinar de manera precisa el volumen de muestra a inyectar.

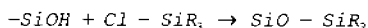
✘ *Columna:*

Es el espacio físico donde se produce la separación, debe de ser físicamente resistente y químicamente estable. Vistas de una manera muy simple, las columnas empleadas en HPLC son tubos de acero inoxidable en los cuales se encuentran empacado un soporte que puede ser de naturaleza inorgánica como en el caso de la sílica o de naturaleza orgánica como es el caso de los empaques poliméricos. Cada tipo de empaque posee sus ventajas y desventajas que deben de ser consideradas al momento de la elección del tipo de empaque.

La calidad de las fases estacionarias en HPLC es determinada por sus propiedades físicas y químicas. Las propiedades físicas como son: la porosidad, el área superficial específica, tamaño de poro, tamaño y forma de partícula son las que inciden directamente en la eficiencia del empaque. Las propiedades químicas, que evidentemente depende de la naturaleza de la fase estacionaria en cuestión también dependen de los grupos unidos químicamente al soporte utilizado y son la base de las propiedades de retención y selectividad.

Los empaques clásicos empleados en HPLC son los basados en soporte de sílica, los materiales de este tipo pueden ser sintetizados a través de distintos procesos. Uno de estos parte de la síntesis de un hidrogel, el cual es obtenido a partir de silicatos inorgánicos o alcoxi silanos. De estos hidrogeles, el más común es el xerogel que es obtenido después de una molienda y posterior tamización de partículas irregulares de sílica. Otro tipo de procesos sintéticos proporcionan formas de partículas esféricas

Para cambiar la polaridad de este tipo de fases estacionarias, es común que se ligen químicamente mediante enlaces covalentes cadenas hidrocarbonadas a grupos silanos de la sílica. El soporte de sílice se hace reaccionar con organoclorosilano, o algún compuesto similar para generar una fase estacionaria de polaridad deseada



Sin embargo, no todos ellos logra reaccionar, por lo que la actividad de los silanoles residuales puede ser importante. Para suprimir este inconveniente se implementa en paso de síntesis secundario que se denomina sello terminal que permite enmascarar a los silanoles residuales. El bloqueo de silanoles residuales (capa de sello terminal o "end capping") se emplea en la cromatografía de fase reversa, particularmente cuando el soporte es sílica. Este bloqueo permite mejorar de manera importante la forma del pico, ya que se impiden equilibrios secundarios entre los silanoles libres y compuestos básicos principalmente. Además que provoca que se amplíe el intervalo de pH en el cual la fase estacionaria es estable, debido a queda protegido el sitio de unión de la cadena hidrocarbonada con el soporte de sílica de sustancias que tienen propiedades ácido-base.

En general estos empaques son mecánicamente fuertes, pueden soportar presiones de hasta 6000psi, además que se pueden diseñar superficies con muy diversos comportamientos químicos entre el analito y la fase estacionaria (punto que favoreció su crecimiento). Estas capas de la superficie de la sílica son muy delgadas casi del orden de capas mono moleculares, lo que permite una rápida transferencia de masa entre la fase estacionaria y el analito. Generalmente, los empaques empleados en HPLC son porosos para maximizar la superficie de contacto con el analito. En los últimos años, ha aumentado el entendimiento de la tecnología empleada para manipular el tamaño y volumen del poro, así como el área superficial.

No obstante los empaques basados en sílica tienen una desventaja muy grande que es la disolución de la sílica en valores de pH alcalinos, la mayoría de las columnas de soporte de sílica soportan un pH de 9. El tiempo que tarde en disolverse la sílica hasta volver inútil la columna dependerá de otros factores de trabajo como son la proporción del modificador orgánico y la temperatura de trabajo, entendiéndose que a menor proporción del modificador orgánico así como a mayor temperatura, el grado de disolución de la sílica será mayor.

Otros óxidos inorgánicos utilizados son los de aluminio, titanio y zirconio, los cuales tienen mejores propiedades de dureza y de transferencia de masa que las sílicas, y también son más estables a pHs extremos, desde 0 hasta 13. Estas características han propiciado que sean seriamente considerados como alternativas para fases estacionarias. Lo anterior, aunado a su alta actividad superficial favorece el establecimiento de equilibrios secundarios que finalmente tienen como consecuencia señales cromatográficas distorsionadas. Otra desventaja es que se carece de procedimientos para ligarlos químicamente con otros grupos y poder cambiar su polaridad.

También existen los empaques llamados polímeros, donde la mayoría están hechas a base de empaques de estireno-divinilbenceno, metacrilato o polivinilalcohol. Estos materiales pueden ser manufacturados en un amplio intervalo de porosidades y tamaños de partícula, los cuales son comparables con los de las fases estacionarias de sílica. Una de las causas que llevaron a la implementación de este tipo de fases estacionarias fue la necesidad de trabajar en intervalos de pH amplios, puesto que estos materiales son resistentes a la hidrólisis ácido-base. Los empaques de divinil-benceno son estables desde pH 0 a 14. adicionalmente estos materiales son susceptibles de ser modificados químicamente y con esto proporcionar fases estacionarias con una amplia variedad de polaridades.

A pesar de las ventajas mencionadas, estos polímeros presentan las siguientes desventajas: presenta baja resistencia a la presión comparada con la de las fases estacionarias de óxidos inorgánicos, lo cual limita su uso por las altas presiones generadas en HPLC. Debido a la estructura

de los poros, la transferencia de masa no es adecuada, es entorpecida. Las partículas de estos materiales son elásticas; es decir, se dilatan y se contraen, el grado de este efecto depende de la composición de la fase móvil. Esta situación es la responsable de una significativa reducción en la eficiencia de estos empaques comparados con los óxidos inorgánicos.

En diversas ocasiones se coloca delante una columna que elimina materia de suspensión y los contaminantes de los disolventes con el objeto de aumentar la vida de la columna analítica. Esta precolumna también funciona para saturar la fase móvil con la fase estacionaria y así minimizar las pérdidas de esta en la columna analítica. La composición del relleno de la precolumna debe de ser semejante al de la columna analítica.

#### ✕ Detectores.

Se dividen básicamente en dos tipos. Los detectores basados en las propiedades de la disolución, los cuales responden a una *propiedad de la fase móvil*, como es el índice de refracción, la constante dieléctrica, o la densidad que se modifica por la presencia de los analitos. Por otro lado, los detectores basados en una *propiedad del soluto* responden a absorbancia UV, fluorescencia o intensidad de difusión que son propias del soluto no de la fase móvil. Hay básicamente tres tipos: de detectores para UV:

1. Detector de Longitud de Onda Fija
2. Detector de Longitud de Onda Variable
3. Detector de Arreglo de Diodos

El *detector de arreglo de diodos (DAD)* puede ser visualizado como una detector multicanal UV/visible, cada canal detecta la luz absorbida de la longitud de onda específica o de un rango de longitudes de onda. Este trabaja bajo los mismos principios de un detector de longitud de onda fija y variable:

1. Las moléculas orgánicas pueden absorber luz UV.
2. La cantidad de luz absorbida por las moléculas es proporcional a su concentración en solución.

DAD tiene una única capacidad de vigilar simultáneamente la transmisión de la luz a través de la solución en diferentes longitudes de onda. Lo que permite la medición de diferentes componentes en solución con diferentes máximos de absorción.

Si todas las mediciones de absorbancia son realizadas en longitudes de onda adyacentes una con otra, un espectro completo puede ser derivado de un pico de elusión.

Esta técnica emplea una óptica reversa. La fuente suministra la luz que pasa a través de la hendidura. Una vez que la luz pasa a través de la muestra esta es dispersada dentro de sus longitudes de onda componentes por medio de una reja difraccionante y enfocada dentro de un arreglo de diodos. Puesto que la luz incidida sobre los diodos esta siendo continuamente medida, la absorción de la luz por la muestra en todas las longitudes de onda puede ser simultáneamente monitoreada.

Un Detector de Arreglo de Diodos está compuesto por las siguientes partes:

a). Policromador: Permite que luz de muchas longitudes de onda pueda pasar a través de la solución muestra. Esto es en contraste a un monocromador convencional, donde solo pasa luz de una sola longitud de onda a través de la muestra.

b). Fuente de luz. La primera meta de una fuente de luz es de proveer de una energía radiante continua en el rango de longitudes de onda requeridas para el análisis. Una alta energía de salida ayuda a reducir el ruido relativo de las señales.

Las lámparas de Deuterio a baja presión son la fuente de luz más comúnmente usada en los detectores DAD. Estas lámparas proveen energía estable de salida en un intervalo de 160 a 400nm.

Las lámparas de Xenón también pueden ser utilizadas como detectores para multilongitud de onda, aunque su espectro más utilizado comienza aproximadamente a 250nm.

La energía radiante de la fuente entra en el policromador a través de la ranura de entrada; esta es una diminuta abertura que limita el tamaño del rayo de luz eventualmente enfocado en el elemento de detección. La ranura de entrada determina el tamaño y la forma del rayo de luz incidido en el arreglo de fotodiodos.

Una ranura estrecha puede mejorar la resolución pero limita la energía de salida; una amplia ranura puede proporcionar el efecto opuesto. Puesto que la meta de la mayoría de los detectores LC es obtener una óptima sensibilidad y no necesariamente proveer un espectro de alta resolución, una ranura amplia es usualmente utilizada.

c). Celda de flujo. Un sistema de lentes y/o ventanas son utilizadas para enfocar la luz sobre la muestra en a celda de flujo. La celda de flujo tiene un fluido interno y uno externo, en medio hay dos ventanas de cuarzo (llamadas ventanas de entrada y salida), estas permiten a la luz pasar a través de la muestra. Todas las celdas de flujo tienen la misma función básica: permitir a la luz una interacción eficiente con las moléculas de la muestra y minimizar la dispersión en los picos, el índice de refracción y otros efectos no específicos

d). Reja de difracción: Una vez que la luz blanca se pasa a través de la muestra ésta se enfoca dentro de una reja de difracción. La reja separa la luz dentro de sus componentes espectrales y los esparce a lo largo de los elementos sensibles del arreglo de fotodiodos. La reja contiene una superficie reflejante con finas líneas, ligeramente separadas entre sí. Estas líneas ayudan a organizar la interferencia diseñada para romper la luz incidente dentro de un espectro. Pueden ser manejadas tanto mecánicamente o colocado a través de un láser (holográfico). La reja manejada mecánicamente tiende a tener una mejor energía de salida, y la reja holográfica tiende a tener menor extravío de luz.

e). Arreglo de diodos. Después de que la luz se corta dentro de sus componentes de las diferentes longitudes de onda esta se enfoca en el arreglo de fotodiodos.

Idealmente hay por lo menos un elemento para cada longitud de onda a ser medida. Dependiendo sobre el numero de elementos en el arreglo y el rango de longitudes de onda del



detector, puede haber desde 0.20 a 4 elementos diodo por longitud de onda interna. Entre mayor sea el número de diodos por longitud de onda, más sencillo será distinguir entre la luz de dos longitudes de onda adyacentes, por lo que el número de diodos es un factor importante en la determinación de la resolución de dicho detector. Los arreglos de detectores usados comercialmente están en el rango de 35 elementos diodo a 512 elementos.

Con cada diodo en serie está un capacitor que está cargado por un circuito en el arreglo. Cuando la luz golpea el diodo, esta conduce corriente y descarga el capacitor. La cantidad de electricidad descargada es proporcional a la cantidad de luz incidida sobre el diodo y a la eficiencia del diodo. La magnitud de la descarga es medida cuando el circuito intenta recargar el capacitor. Cada descarga eléctrica sobre cada elemento de mide separadamente. La porción examinada está determinada por el promedio de energía de la luz golpeando los elementos y el tamaño físico de los elementos. A cada tiempo una revisión o medición es realizada, se introduce una oportunidad para generar ruido; este es llamado "ruido de cambio".

### **4.3. Métodos reportados para Metoclopramida. (25-40)**

Varias técnicas analíticas han sido desarrolladas para la determinación de este activo en fluidos biológicos, incluyendo espectrofotometría y cromatografía de capa fina, colorimetría, cromatografía de gases, espectrofotometría de masas, HPLC. Sin embargo, muy pocos métodos han sido desarrollados para su determinación en formas farmacéuticas dosificadas.

En los métodos farmacopeicos actuales no se reporta una monografía para cápsulas de Metoclopramida HCl de liberación modificada, únicamente aparecen tabletas de liberación inmediata.

En el caso de la BP 2002, la valoración se realiza por medio de una titulación potenciométrica. Para USP 27 y FEUM 7<sup>a</sup> Ed, se recomienda un método por HPLC.

En este trabajo se desarrollará un método de valoración indicador de estabilidad por HPLC para cápsulas de Metoclopramida de liberación modificada, en una dosis de 20mg por cápsula, utilizando como base el método presentado por USP 27, para la valoración de tabletas.

A continuación se plantea a grandes rasgos como está compuesto el método para la valoración de tabletas de clorhidrato de Metoclopramida de liberación inmediata planteado por la USP 27.

#### **4.3.1. Fase móvil:**

Disolver 2.7g de acetato de sodio en 500mL de agua, agregar 500mL de acetonitrilo, 2mL de hidróxido de tetrametilamonio en metanol al 25%, mezclar y ajustar con ácido acético glacial a pH de 6.5, filtrar y desgasificar.

#### **4.3.2. Preparación del estándar: (SR)**

Disolver una cantidad exactamente pesada de clorhidrato de Metoclopramida USP, en  $H_3PO_4$  0.01M para obtener una solución stock cuya concentración sea de 0.9mg por mililitro. Diluir

esta solución cuantitativamente con  $H_3PO_4$  0.01M, para obtener una solución estándar cuya concentración sea de  $45\mu g$  por mililitro.

#### **4.3.3. Preparación de la muestra: (SM)**

Pesar y finamente pulverizar no menos de 20 tabletas. Transferir una porción exactamente pesada, equivalente a 45mg de clorhidrato de Metoclopramida, a un matraz volumétrico de 100mL, añadir 70mL de  $H_3PO_4$  0.01M y sonicar por 15 minutos. Enfriar a temperatura ambiente, diluir con  $H_3PO_4$  0.01M a volumen y mezclar. Filtrar la solución a través de un filtro de  $0.45\mu m$ , desechando la primera porción del filtrado. Transferir 10.0mL de esta solución a un matraz volumétrico de 100mL y diluir con  $H_3PO_4$  0.01M hasta llevar a volumen y mezclar

#### **4.3.4. Procedimiento:**

Separadamente inyectar volúmenes iguales (20 $\mu$ L) de estándar y de muestra. Registrar los cromatogramas y medir la respuesta del pico mayor. El cromatógrafo de líquidos debe de estar equipado con un detector de 215nm y una columna de 4.6 x 25cm empacada con L1\*. El rango de flujo es de 1.5 mL/min.

#### **4.4. Validación de métodos analíticos: (44-46)**

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 de métodos de análisis apropiados.

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir, el método debe probarse para determinar su efectividad.

La validación de un método analítico puede definirse como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa en éste caso, en términos de parámetros analíticos.

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

Los criterios de validación que generalmente se consideran en la validación para cuantificar fármacos son los siguientes:

- *Selectividad.* Es la capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.

\* L1= Octadecil silano químicamente unido a sílica porosa o micro partículas de cerámica, de 3 a 10 $\mu m$  de diámetro

- *Linealidad.* Es la capacidad del método analítico (dentro de un rango dado) para obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra.
- *Precisión.* Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.
- *Repetibilidad.* Es la precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.
- *Reproducibilidad.* Es la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, días, equipos, etc.).
- *Exactitud.* Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.
- *Rango.* Se refiere al intervalo de un método analítico definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles superior e inferior del compuesto, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.
- *Robustez:* Capacidad del método para mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas y deliberadas en los parámetros normales dentro del método
- *Tolerancia:* Reproducibilidad de los resultados obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones de operación. Se refiere a factores externos del método (equipo, columna, etc.).
- *Estabilidad.* Se refiere a la capacidad del compuesto por analizar, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis.
- *Especificidad:* Capacidad del método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra
- *Límite de cuantificación.* Es la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método.
- *Límite de detección.* Es la mínima concentración de un compuesto en una muestra, el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo condiciones de operación establecidas.

De acuerdo a la guía de validación de Métodos Analíticos emitida por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C, edición 2002, se validarán los siguientes parámetros de desempeño del método analítico:

- ▶ Especificidad
- ▶ Excipientes
- ▶ Productos de degradación
- ▶ Linealidad del Sistema

- ▶ Precisión del Sistema
- ▶ Linealidad del Método
- ▶ Exactitud del Método
- ▶ Precisión del Método
- ▶ Repetibilidad
- ▶ Precisión Intermedia
- ▶ Estabilidad analítica de la Muestra
- ▶ Robustez y tolerancia
- ▶ Verificación de Metoclopramida Clorhidrato SR Secundario

## **5. Planteamiento del problema.**

Se estudiara el procedimiento reportado por USP para tabletas de liberación inmediata por HPLC (ver párrafo 4.3. página 29), con el objetivo de evaluar si dicho método es adecuado para realizar el análisis de nuestro producto. De ser necesario deberán realizarse los ajustes pertinentes a dicho método de manera que este se ajuste lo mayor posible a nuestras necesidades

## **6. Metodología experimental.**

### **6.1. Condiciones Cromatográficas**

- Velocidad de flujo                    1.5 mL/min
- Volumen de Inyección            20 µL
- Detección                            UV a 215 nm
- Modo de Integración            Áreas
- Respuesta:                            Áreas

### **6.2. Corrida analítica**

#### **6.2.1. Blanco de reactivos (BR)**

Inyectar la solución Blanco de Reactivos (BR) al sistema cromatográfico y verificar que no presente señales que interfieran con la señal del Clorhidrato de Metoclopramida.

#### **6.2.2. Adecuación del sistema**

El sistema Cromatográfico se considera adecuado si: al hacer cinco inyecciones sucesivas de SR, el coeficiente de variación de la respuesta es menor o igual a 2.0%

### **6.2.3. Cromatografía**

Verificar que el sistema cumple con Adecuación del sistema y proceder a inyectar volúmenes iguales de SR y de la SM. Inyectar mínimo un punto control, antes y después de inyectar las muestras

### **6.3. Criterios de aceptación de la corrida analítica**

La corrida analítica se acepta si:

- La solución BR no presenta señales que interfieran con la cuantificación del Clorhidrato de Metoclopramida
- Se cumple con los criterios de Adecuación del Sistema.
- Todos los Puntos Control (PC) cuantifican entre 98.0 y 102.0 % de la concentración adicionada durante toda la corrida analítica.

### **6.4. Sustancia de referencia:**

Metoclopramida Clorhidrato SR Secundario (certificado con Metoclopramida Clorhidrato USP Lote: G)

Clave: ER018

No. Análisis: ER03001-2

Pureza: 100.0 %

Vigencia de la certificación: ago 14, 2004

Determinar contenido de agua por Karl Fisher

Almacenar en envases herméticos. Proteger de la luz.

**6.5. Reactivos.**

REACTIVO	GRADO	MARCA
Agua	HPLC	----
Metanol	HPLC	Fermont
Acetonitrilo	HPLC	Fermont
Ácido fosfórico	RA ACS	Fermont
Acetato de sodio trihidratado	RA ACS	Fermont
Peróxido de hidrógeno	RA	Fermont
Solución metanólica de Hidróxido de tetrametilamonio	RA ACS	Aldrich
Ácido clorhídrico	RA	Fermont
Hidróxido de sodio	RA	Fermont

**6.6. Equipo:**

NOMBRE	MARCA	MODELO
Controlador de Sistema	Waters	600E
Bomba	Waters	600
inyector	Waters	717 plus
Detector	Waters	2487

COLUMNA	MARCA	TIPO	No. DE SERIE
Symmetry® C18	Waters	4.6 x 150 mm, 5 µm	T32511501

PRECOLUMNA	MARCA	TIPO	No. DE SERIE
Symmetry® C18	Waters	3.9 x 20 mm, 5 µm	W33101

NOMBRE	MARCA	MODELO	No. DE SERIE
Balanza Analítica	Mettler	AE 260	H97800
Potenciómetro	Beckman	660	2233
Horno programable	Fisher	838F	40400060
Cámara de luz UV	---	---	---

**6.7. Formulaciones.**

FORMULACIÓN DE METOCLOPRAMIDA CLORHIDRATO PRODUCTO TERMINADO

Cápsulas de Metoclopramida con 20mg por cápsula. No. Lote: 309002

Fecha de caducidad: sep, 2006.

Hecho en México por:

**Micrometrix, S.A. de C.V.**

San Lorenzo N°97

Parajes de San Juan

C.P. 09830 México DF

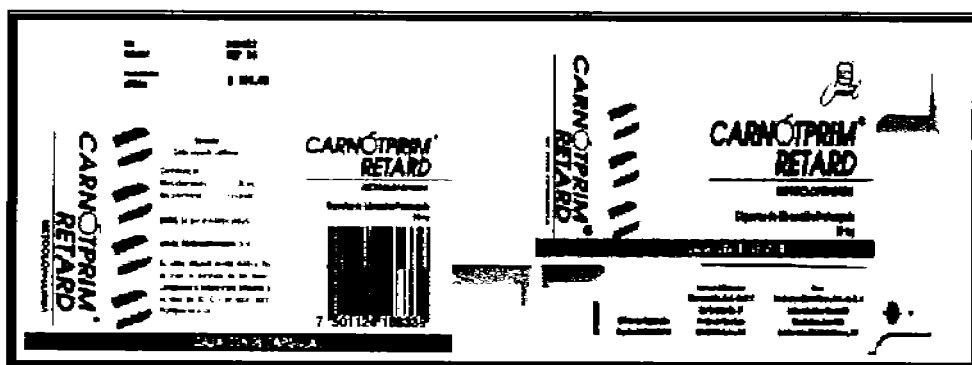
Para:

**Productos científicos, S.A. de C.V.**

**Laboratorios Carnot®**

Nicolás San Juan 1046

Col. Del Valle C.P. 03100 México DF



**Figura 5** Presentación del producto farmacéutico.

#### FORMULACIÓN PLACEBO DE METOCLOPRAMIDA CLORHIDRATO

Micro esferas placebo. No. Lote: D2004 176. Fecha de fabricación: Abr02, 2004

#### 6.8. Cálculos.

$$\% \text{Metoclopramida}_{\text{HCl}} = \frac{R_m * C * P_p * F_D * 100}{R_s * P_m * C_t}$$

Donde:

$R_m$  =Respuesta de Clorhidrato de Metoclopramida en la SM

$R_s$  =Respuesta promedio de Clorhidrato de Metoclopramida en las cinco inyecciones de SR

$C$  =Concentración del Clorhidrato de Metoclopramida en la SR (mg/mL)

$P_p$  =Contenido promedio de las cápsulas (peso cápsulas llenas menos peso de cápsulas vacías y limpias)

$C_t$  =Contenido teórico de Clorhidrato de Metoclopramida por cápsula (20mg)

$F_D$  =Factor de dilución de la SM (1000)

### 7. Desarrollo del método.

#### 7.1.1. Establecimiento del sistema.

El primer paso en el desarrollo de nuestro método es la evaluación del sistema realizándole algunos cambios desde un inicio al método planteado en los fundamentos teóricos. El sistema se evaluará bajo el siguiente método:

##### 7.1.1.1. Solución acuosa de ácido fosfórico 0.01M

Transferir 0.7mL de ácido fosfórico concentrado a un matraz volumétrico de 1000mL, llevar a volumen con agua

##### 7.1.1.2. Solución de acetato de sodio 0.07 M

Disolver 5.4g de acetato de sodio anhidro en un litro de agua HPLC.

**7.1.1.3. Fase móvil**

Mezclar 800mL de Solución de acetato de sodio con 200mL de acetonitrilo, adicionar 2mL de solución de hidróxido de tetrametil amonio en metanol al 25%. Ajustar el pH de la fase móvil a 6.5 con ácido fosfórico concentrado. Filtrar a través de membrana millipore tipo HVLP de 0.45µm de tamaño de poro o equivalente, desgasificar al mismo tiempo con agitación y vacío.

**7.1.1.4. Blanco de reactivos (BR)**

Utilizar la Solución acuosa de ácido fosfórico 0.01M como blanco de reactivos.

**7.1.1.5. Punto control (PC).**

Preparar igual que la Sustancia de Referencia (SR) a partir de una pesada independiente

**7.1.1.6. Preparación de la referencia (SR)**

Transferir alrededor de 45mg de Clorhidrato de Metoclopramida SR base anhidra, pesados con exactitud a un matraz volumétrico de 100mL, adicionar 70mL de ácido fosfórico 0.01M y agitar en ultrasonido durante 5 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con ácido fosfórico 0.01M y mezclar. De esta solución transferir 5.0mL a un matraz volumétrico de 50mL, llevar a volumen con ácido fosfórico 0.01M y mezclar. Concentración aproximada de 0.045mg/mL de Clorhidrato de Metoclopramida

**7.1.1.7. Preparación de la muestra (SM)**

Pesar no menor de 20 cápsulas individualmente. Vaciar el contenido de las cápsulas limpiarlas y pesarlas. Calcular el contenido promedio de las cápsulas y triturar con mortero y pistilo hasta polvo fino y homogéneo. Transferir el equivalente a 45mg de Clorhidrato de Metoclopramida pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100mL, adicionar 70 mL de ácido fosfórico 0.01M y agitar con ultrasonido durante 10 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con ácido fosfórico 0.01M. Filtrar a través de filtro Whatman GF/F de 0.7µm o su equivalente desechando los primeros 10mL del filtrado. Transferir 5.0mL del filtrado a un matraz volumétrico de 50mL, llevar a volumen con ácido fosfórico 0.01M y mezclar.

Los resultados obtenidos en este punto del desarrollo se exponen en el párrafo 8.1

**7.2. Método de extracción de muestra. (41-43)**

Después de los resultados para el anterior bloque, donde en promedio nuestras muestras cuantificaron un 95%, nos podríamos formular la siguiente pregunta: ¿el tratamiento de nuestra muestra es lo suficientemente capaz de extraer el 100% de la misma o se pierde un porcentaje en dicho método?

Para resolver la anterior cuestión, se iban a evaluar diferentes formas de extracción de la Metoclopramida, de manera de encontrar los parámetros mediante los cuales estemos seguros que se extrae la totalidad de la muestra analizada.

Esto se efectuará a través un diseño de experimentos 2<sup>n</sup> donde los factores controlables podrían ser los siguientes:

- |                |                              |
|----------------|------------------------------|
| -pH            | -Tiempo de sonicado          |
| -Fuerza iónica | -Agitación con <u>vórtex</u> |
| -Temperatura   | -Polaridad                   |



de los cuales se manejará solamente los arriba subrayados, teniendo al porcentaje de Metoclopramida como factor respuesta. Los niveles quedarán de la siguiente manera

Factor	Nombre	Nivel Alto +	Nivel Bajo -
A	Disolvente	Metanol (5*)	Agua (9.2*)
B	Tiempo de sonicado	25 minutos	10 minutos
C	Agitación con vórtex	5 minutos	0 minutos

\* Coeficiente de polaridad

Las muestras se prepararán de la siguiente manera

Muestra	A (S)	B (T)	C (U)
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Ademas a partir de este momento se empezaron a preparar la solución estándar y la muestra pesando lo equivalente a 40mg de clorhidrato de Metoclopramida. Esto es para que el peso sea lo equivalente al contenido de 2 cápsulas, de manera que posteriormente se pueda adaptar dicho método para realizar determinaciones de uniformidad de contenido.

Los resultados obtenidos en este punto del desarrollo de exponen en el párrafo 8.2

### **7.3. Uniformidad de contenido.**

El método al cual hasta ahora se ha llegado es el siguiente: Tanto la fase móvil, la solución de acetato de sodio, la solución acuosa de ácido fosfórico 0.01M no sufren cambio alguno.

#### **7.3.1.1. Preparación de la referencia (SR)**

Transferir alrededor de 40mg de Clorhidrato de Metoclopramida SR base anhidra, pesados con exactitud a un matraz volumétrico de 100mL, adicionar 70mL de ácido fosfórico 0.01M y agitar en ultrasonido durante 5 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con ácido fosfórico 0.01M y mezclar. De esta solución transferir 5.0mL a un matraz volumétrico de 50mL, llevar a volumen con ácido fosfórico 0.01M y mezclar. Concentración aproximada de 0.040mg/mL de Clorhidrato de Metoclopramida

#### **7.3.1.2. Preparación de la muestra (SM)**

Pesar no menos de 20 cápsulas individualmente. Vaciar el contenido de las cápsulas limpiarlas y pesarlas. Calcular el contenido promedio de las cápsulas y triturar con mortero y pistilo hasta polvo fino y homogéneo. Transferir el equivalente a 40mg de Clorhidrato de Metoclopramida pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100mL, adicionar 70 mL de metanol HPLC y agitar con ultrasonido durante 10 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con metanol HPLC. Filtrar a través de filtro Whatman GF/F de 0.7µm o su equivalente desechando los primeros 10mL del filtrado. Transferir 5.0mL del filtrado a un matraz volumétrico de 50mL, llevar a volumen con ácido fosfórico 0.01M y mezclar.

Como anteriormente se comentó, este método tiene también como fin, servir de herramienta para poder evaluar la uniformidad de contenido de las cápsulas de Metoclopramida; entonces toca ahora evaluarlo en este rubro.

Para ello se analizaron 6 replicas del contenido de las cápsulas previamente pulverizadas, mediante el procedimiento arriba citado (identificados como serie E). Por otro lado, se analizaron 6 replicas donde se colocó el contenido de la cápsula tal cual, sin pulverizar (identificados como serie F), se ajusta el esquema de dilución de manera que al final se obtenga la misma concentración en el caso de las muestras pulverizadas y las sin pulverizar, que lo manejado en las anteriores muestras. Los resultados obtenidos en este punto del desarrollo de exponen en el párrafo 8.3.

#### **7.4. Evaluación de la precisión. (pruebas previas de validación.)**

Puesto que el coeficiente de variación de los experimentos anteriormente realizados no nos dejan del todo satisfechos en cuanto a la precisión del método, se procederá a valorar la precisión del método, realizando 6 replicas de la muestra pulverizada (tratada bajo lo estipulado en el punto 7.3.1.2). También se filtrara una porción del estándar para estar completamente seguros que no se retiene ninguna porción de la Metoclopramida en el filtro. Los resultados obtenidos en este punto del desarrollo de exponen en el párrafo 8.4.

#### **7.5. Especificidad (primer bloque)**

Ahora el objetivo será evaluar la especificidad del método tanto para los excipientes como para los productos de degradación. Se manejaran 3 tipos de muestras (blanco, placebo, y placebo adicionado), las cuales se degradaran, a través de acidez, basicidad, oxidación por UV y oxidación por  $H_2O_2$ , por duplicado, lo anterior es con el objetivo de analizar bajo que condiciones nuestro activo es más estable y en cuales se degrada con mayor facilidad, de antemano ya en generalidades se planteo que su máxima estabilidad es a un pH=7.6, y la degradación máxima es a un pH=2.

El porcentaje de degradación que se persigue es de entre el 10 y el 20%, esto es con el objetivo de generar la suficiente degradación del activo para poder analizar si ninguna de las señales para los productos de degradación generados no interfieren con la señal de la Metoclopramida.

Ademas de las anteriores muestras, se analizara una muestra sin degradar por duplicado.

Las variables que se manejaran serán el volumen del agente degradante, la concentración del mismo y tiempo de degradación, con el objetivo de obtener el porcentaje de degradación deseado.

<b>Primer experimento</b>				
Condición	Volumen (mL)	Concentración	Temperatura (°C)	Tiempo (hrs.)
Acidez	1.0	Concentrado	45	40
Alcalinidad	1.0	3N	45	65
Peróxido	1.0	Concentrado	45	24
UV	Someter en cámara de luz ultravioleta durante una semana			
<b>Segundo experimento</b>				
Condición	Volumen (mL)	Concentración	Temperatura (°C)	Tiempo (hrs.)
Acidez	1.0	Concentrado	45	39
Alcalinidad	3.0	6N	45	66
Peróxido	5.0	Concentrado	45	24

<b>Tercer experimento</b>				
Condición	Volumen (mL)	Concentración	Temperatura (°C)	Tiempo (hrs.)
Acidez	1.0	Concentrado	45	41
Alcalinidad	4.0	9N	45	65
Peróxido	10.0	Concentrado	45	22
UV	Someter en cámara de luz ultravioleta durante 12 días			

Los resultados obtenidos en este punto del desarrollo de exponen en el párrafo 8.5

### **7.6. Modificación al sistema.**

Con el objeto de poder separar el pico del producto de degradación obtenido en condiciones ácidas, del pico para el clorhidrato de Metoclopramida se disminuirá el poder acarreador del acetonitrilo, reduciendo su porcentaje en un 5% quedando la fase móvil de la siguiente manera: acetato de sodio: acetonitrilo (85:15). Los resultados obtenidos en este punto del desarrollo de exponen en el párrafo 8.6

### **7.7. Especificidad (segundo bloque)**

Con la intención de obtener un porcentaje de degradación entre el 10-20% se someterán las muestras a condiciones de degradación más fuertes. Estas se plantean a continuación.

Las variables que se manejarán serán el volumen del agente degradante, la concentración del mismo y tiempo de degradación, con el objetivo de obtener el porcentaje de degradación deseado.

<b>Cuarto experimento</b>				
Condición	Volumen (mL)	Concentración	Temperatura (°C)	Tiempo (hrs.)
Acidez	3.0	Concentrado	42	43
Alcalinidad	4.0	6N	46	237
Peroxido	10.0	Concentrado	46	66

Los resultados obtenidos en este punto del desarrollo de exponen en el párrafo 8.7

### **7.8. Linealidad y exactitud del método. (pruebas previas de validación)**

Se realizará una prueba para evaluar la linealidad y exactitud del método en el intervalo del 70-130% de Metoclopramida por lo que se pesará lo correspondiente de 70%, 100% y 130% de la sustancia de referencia.

Además en cada matraz se pesará lo correspondiente al placebo más un exceso del 30%, por si llegara a haber cambios en la formulación. Entonces se le adicionará a cada matraz una cantidad de 0.5463g de placebo. (peso del contenido de la cápsula más un 30% de exceso)

En la determinación de agua realizada a nuestra sustancia de referencia se obtuvo un porcentaje de agua igual a 5.0812% por lo que habrá que corregir nuestras cantidades a pesar por contenido de agua.

Nivel (%)	Leyenda	Cantidad de Metoclopramida (mg)	Cantidad corregida por contenido de agua
70	A	28	29.5
100	B	40	42.1
130	C	52	54.8

Los resultados obtenidos en este punto del desarrollo de exponen en el párrafo 8.8.

### **7.9. Modificación al método.**

Después de los problemas presentados en el experimento anterior, se procedió a modificar el método, realizando la extracción más exhaustiva aumentando el tiempo de sonicado hasta los 40 minutos, de manera de solucionar cualquier problema de liberación que pudiera presentarse.

Esta modificación se probara, realizando un estudio con 6 replicas en las condiciones como se preparó las muestras al nivel del 130%. Los resultados obtenidos en este punto del desarrollo de exponen en el párrafo 8.9.

### **7.10. Linealidad y exactitud del método. (2º experimento)**

Se repetirá el experimento planteado para la linealidad y exactitud del método ahora con la modificación del tiempo de sonicado (cambio de 10 minutos a 40 minutos). Los resultados obtenidos en este punto del desarrollo de exponen en el párrafo 8.10.

### **7.11. Segunda modificación al método.**

Por un problema en el abastecimiento de los filtros Whatman GF/F de 0.7µm, se evaluará otra manera de eliminar los excipientes. Esto se realizara mediante el centrifugado de las muestras a 3000rpm por 5 minutos. El resto del método se conserva sin variación. Este cambio primeramente se valorara revisando la precisión de 5 replicas de muestra. Los resultados obtenidos en este punto del desarrollo de exponen en el párrafo 8.11.

### **7.12. Precisión y exactitud controlando temperatura**

Para verificar la conclusión a la que se llevo en el experimento anterior (ver párrafo 8.11.), se repetirá el estudio ahora con placebos adicionados, controlando la temperatura a cada momento utilizando un baño de agua. Ademas la centrifugación se llegara al igual que anteriormente (3000rpm por 5 minutos), pero teniendo en cuenta que la temperatura sea prácticamente la ambiental (20-25°C). Los resultados obtenidos en este punto del desarrollo de exponen en el párrafo 8.12.

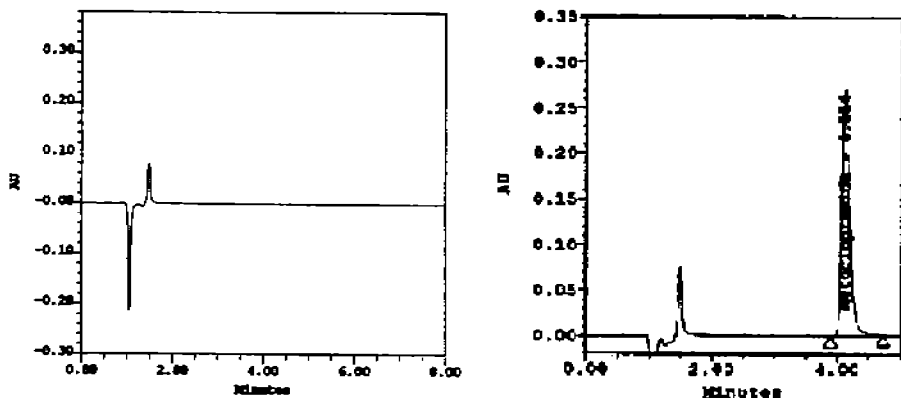
## 8. Resultados y análisis de resultados (desarrollo del método):

### 8.1. Establecimiento del sistema.

estándar	Peso (g)	Respuesta			Cantidad Metoclopramida
Adecuación 1	0.0477	2704221.0	Promedio	2695066.6	0.045103355
Adecuación 2	0.0477	2692225.0	Des. Est.	10913.72	
Adecuación 3	0.0477	2708655.0	C.V.	0.40	
Adecuación 4	0.0477	2684145.0	Porcentaje de agua	5.4437	
Adecuación 5	0.0477	2686087.0			
<b>Puntos controles</b>					
	Peso (g)	Respuesta	%		
PC 1	0.0477	2704683.0	100.4		
PC 2	0.0477	2713859.0	100.7		

Muestras	Peso (g)	Respuesta	% Metoclopramida		
M 1	0.5203	2619628.0	97.41	Promedio	95.67
M 2	0.5203	2534133.0	94.23		
M 3	0.5201	2514875.3	93.55	Des. Est.	2.08
M 4	0.5201	2621347.3	97.51	C.V.	2.17

Ya establecido el sistema, el tiempo para el clorhidrato de Metoclopramida quedo de alrededor de los 4 minutos. A continuación se presenta un cromatograma característico para la Metoclopramida y para el blanco (donde se muestra que efectivamente no hay señal que interfiera en la zona de elusión de la Metoclopramida



**Figura 6** Cromatogramas característicos para el blanco y para la Metoclopramida

Dado que cumple con los criterios de aceptación para la corrida analítica (definidos en la página 32), podemos concluir que el sistema evaluado es adecuado para cuantificar clorhidrato de Metoclopramida en nuestra forma farmacéutica.

**8.2. Método de extracción de muestra.**

**Primer Bloque**

Mar17, 2004

estándar

	Peso (g)	Respuesta			Cantidad de Metoclopramida
Adecuación 1	0.0422	2196767	Promedio	2201244.6	0.040024632
Adecuación 2	0.0422	2205860	Des. Est.	3723.87	
Adecuación 3	0.0422	2202330	C.V.	0.17	
Adecuación 4	0.0422	2198164	Porcentaje de agua	5.1549	
Adecuación 5	0.0422	2203102			

**Puntos controles**

	Peso (g)	Respuesta	%
PC 1	0.0422	2088493.5	94.9
PC 2	0.0422	2076180	94.3
PC 3	0.0422	2079245	94.5

**Muestras**

	Peso (g)	Respuesta	% Metoclopramida		
S 3	0.4624	2363381.0	101.47	Promedio	98.88
T 3	0.4624	2223435.0	97.95	Des. Est.	2.27
U 3	0.4624	2206783.5	97.22	C.V.	2.30
S 5	0.4624	2156558.5	95.01	Promedio	99.32
T 5	0.4624	2333696.0	102.81	Des. Est.	3.97
U 5	0.4624	2273252.0	100.15	C.V.	3.99

**Segundo Bloque**

Mar18, 2004

estándar

	Peso (g)	Respuesta			Cantidad de Metoclopramida
Adecuación 1	0.0422	2241680	Promedio	2236877.8	0.040024632
Adecuación 2	0.0422	2232745	Des. Est.	3550.37	
Adecuación 3	0.0422	2234522	C.V.	0.16	
Adecuación 4	0.0422	2239007	Porcentaje de agua	5.1549	
Adecuación 5	0.0422	2236435			

**Puntos controles**

	Peso (g)	Respuesta	%
PC 1	0.0422	2266964.0	101.3
PC 2	0.0422	2276950.5	101.8
PC 3	0.0422	2278681.5	101.9
PC 4	0.0422	2268401.0	101.4

**Muestras**

	Peso (g)	Respuesta	% Metoclopramida		
S 1	0.4624	2147076.0	96.04	Promedio	96.21
T 1	0.4624	2145616.5	95.98	Des. Est.	0.34
U 1	0.4623	2158857.0	96.59	C.V.	0.35
S 2	0.4624	2408816.5	107.8	Promedio	105.37
T 2	0.4623	2314685.5	103.6	Des. Est.	2.15
U 2	0.4624	2342708.5	104.8	C.V.	2.04
S 8	0.4624	2233105.0	99.9	Promedio	102.27
T 8	0.4624	2288823.0	102.4	Des. Est.	2.32
U 8	0.4624	2336701.0	104.5	C.V.	2.27

**RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS**

estándar		TERCERA RÉPLICA			Mar 19, 2004
	Peso (g)	Respuesta			Cantidad de Metoclopramida
Adecuación 1	0.0422	2274990.0	Promedio	2271324.3	0.040024632
Adecuación 2	0.0422	2270946.5	Des. Est.	2331.10	
Adecuación 3	0.0422	2271959.0	C.V.	0.10	
Adecuación 4	0.0422	2269190.0	Porcentaje de agua	5.1549	
Adecuación 5	0.0422	2269536.0			

Puntos controles			
	Peso (g)	Respuesta	%
PC 1	0.0422	2248223	99.0
PC 2	0.0422	2246773	98.9
PC 3	0.0422	2247382	98.9
PC 4	0.0422	2248455	99.0

Muestras					
	Peso (g)	Respuesta	% Metoclopramida		
S 4	0.4624	2259672.0	99.55	Promedio	99.26
T 4	0.4624	2253013.0	99.25	Des. Est.	0.28
U 4	0.4624	2246822.0	98.98	C.V.	0.29
S 6	0.4624	2304046.0	101.50	Promedio	100.09
T 6	0.4624	2271595.0	100.07	Des. Est.	1.41
U 6	0.4624	2240057.0	98.68	C.V.	1.41
S 7	0.4624	1945919.0	85.73	Promedio	92.24
T 7	0.4624	2214425.0	97.55	Des. Est.	6.01
U 7	0.4624	2121143.0	93.45	C.V.	6.51

**Análisis estadístico.**

	A	B	AB	C	BC	ABC	K 1 (S)	K 2 (T)	K 3 (U)	K T	k prom	Contraste	Efecto	Coef.
1	-	-	+	-	+	+	96.04	95.98	96.59	288.62	96.21			
2	+	-	-	-	-	+	107.75	103.56	104.80	316.11	105.37	61.02	5.08	2.54
3	-	+	-	-	+	-	101.47	97.95	97.22	296.64	98.88	-24.99	-2.08	-1.04
4	+	+	+	-	-	-	99.55	99.25	98.98	297.79	99.26	1.42	0.12	0.06
5	-	-	+	+	-	+	95.01	102.81	100.15	297.96	99.32	-17.40	-1.45	-0.73
6	+	-	-	+	+	-	101.50	100.07	98.68	300.26	100.09	3.74	0.31	0.16
7	-	+	-	+	-	+	85.73	97.55	93.45	276.73	92.24	-4.39	-0.37	-0.18
8	+	+	+	+	+	+	99.89	102.39	104.53	306.80	102.27	54.13	4.51	2.26
							Promedio	99.20						
							Des. Est.	4.45112						

**ANOVA**

Contraste	SC	gl	SCM	Fexp	F teórica
a	61.02	155.1234	1 155	37.9499*	4.49
b	-24.99	26.02234	1 26	3.00963	
ab	1.42	0.08445	1 0.08	0.00977	
c	-17.40	12.62188	1 12.6	1.45979	
ac	3.74	0.582661	1 0.58	0.06739	
bc	-4.39	0.803313	1 0.8	0.09291	
abc	54.13	122.1078	1 122	14.1224*	
residual		138.3418	16	8.65	
total		455.6876	23		

K (REPLICAS)=	3
n (Factores)=	3
l (niveles)=	2
N =	24

\* SIGNIFICATIVO

Como podemos apreciar en la tabla del análisis estadístico, en promedio el nivel menor de cuantificación de Metoclopramida fue el nivel base (descartando el nivel 7, del cual se sospecha pérdida de polvo adherido a las paredes del matraz).

Para los niveles extraídos con agua se aprecia que al ser la liberación de Metoclopramida no tan adecuada, el porcentaje de liberación incrementa al aumentar el tiempo de sonicado y/o la agitación con vórtex.

Respecto a la extracción de Metoclopramida con metanol, es casi total con los 10 minutos de sonicado, que casi no influye el agitado con vórtex o el aumento en el tiempo de sonicado.

Mediante el análisis de la anova, se puede constatar que en efecto, el único factor que en realidad afecta nuestra extracción es la polaridad, ya que solo el factor identificado como "a" tiene una F experimental mayor que la F teórica. El hecho de que también la combinación de los 3 factores produzca una F experimental mayor que la teórica pudiera ser el resultado del mismo factor de polaridad. Esto se puede apreciar desde el resultado obtenido para el efecto de a y abc, donde los valores obtenidos son los únicos de magnitudes importantes.

Por lo que se concluye que el mejor disolvente para la liberación de Metoclopramida HCL en cápsulas de liberación modificada, es el metanol. Dado que la liberación es máxima, y se ve modificada muy poco por agentes mecánicos como sería el mayor tiempo de sonicado o la agitación por vórtex, estas condiciones adicionales se pueden descartar de nuestro método.

### 8.3. Uniformidad de contenido.

#### Estándar

	Peso (g)	Respuesta			Cantidad de Metoclopramida
Adecuación 1	0.0422	2077145.5	Promedio	2056244.1	0.040024632
Adecuación 2	0.0422	2067967.5	Des. Est.	17956.07	
Adecuación 3	0.0422	2052253.0	C.V.	0.87	
Adecuación 4	0.0422	2029896.0	Porcentaje de agua	5.1549	
Adecuación 5	0.0422	2053958.5			

#### Pruebas de control

	Peso (g)	Respuesta	%
PC 1	0.0422	2034444.0	98.9
PC 2	0.0422	2042409.0	99.3
PC 3	0.0422	2040995.5	99.3
PC 4	0.0422	2042317.0	99.3
PC 5	0.0422	2042078.0	99.3

#### Muestra pulverizada

Muestras	Peso (g)	Respuesta	% Metoclopramida		
E 1	0.4624	1989912.6	96.83	Promedio	97.60
E 2	0.4624	2070454.0	100.75	Des. Est.	2.82
E 3	0.4624	2038135.0	99.18	C.V.	2.89
E 4	0.4624	2006532.0	97.59		
E 5	0.4624	1901869.6	92.55		
E 6	0.4624	2028433.0	98.71		



**RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS**

Muestras	Muestra sin pulverizar				
	Peso (g)	Respuesta	% Metoclopramida		
F 1	0.2312	2009428.0	97.78	Promedio	103.33
F 2	0.2312	2385976.0	116.11	Des. Est.	6.83
F 3	0.2312	2078827.0	101.16	C.V.	6.61
F 4	0.2312	2037609.0	99.15		
F 5	0.2312	2055291.0	100.02		
F 6	0.2312	2173525.0	105.77		

Los niveles marcados son los que se difieren de los demás; para corroborar los resultados se volvió a tomar una alícuota desde el matraz donde se realiza la extracción obteniéndose los siguientes resultados

**Estándar**

	Peso (g)	Respuesta			Cantidad de Metoclopramida
Adecuación 1	0.0422	1998462.0	Promedio	1998476.7	0.040024632
Adecuación 2	0.0422	1998310.0	Des. Est.	462.98	
Adecuación 3	0.0422	1998906.0	C.V.	0.02	
Adecuación 4	0.0422	1997798.5	Porcentaje de agua	5.1549	
Adecuación 5	0.0422	1998907.0			
<b>Puntos controles</b>					
	Peso (g)	Respuesta	%		
PC 1	0.0422	1998408.0	100.0		
PC 2	0.0422	2007060.0	100.4		
PC 3	0.0422	2004509.0	100.3		
<b>Muestras</b>					
	Peso (g)	Respuesta	% Metoclopramida		
E 1	0.4624	1957255.0	95.24		
E 5	0.4624	2070719.0	100.77		
F 1	0.2312	1964639.0	95.60		
F 2	0.2312	2329473.5	113.36		
F 6	0.2312	2130416.0	103.67		

Al comparar los nuevos resultados con los obtenidos anteriormente para estas muestras vemos que efectivamente son similares excepto la muestra E 5 donde la segunda vez cuantificó alrededor del 100%, y compararlo con el primer día (92%), nos damos cuenta que esa réplica se debe descartar ya que se cometió un error en el manejo de la muestra. Para las demás muestras aunque no se obtuvieron los mismos resultados, los valores generados son similares a los obtenidos el día anterior por lo que se corroboran los resultados obtenidos. Las diferencias existentes pudiera deberse a que la cantidad de Metoclopramida que tienen las cápsulas no es uniforme.

Si eliminamos a la réplica E 5 de nuestro manejo de resultados el coeficiente de variación disminuye al 1.5%, que ya es un valor aceptable. Por todo lo anterior se piensa que nuestro método es adecuado para llevar a cabo la prueba de uniformidad de contenido a este producto terminado, y que el coeficiente de variación de las cápsulas sin triturar se debe a errores en la elaboración de las mismas.

#### 8.4. Evaluación de la precisión.

Estándar	Peso (g)	Respuesta		Cantidad de Metoclopramida
Adecuación 1	0.0422	2032544.0	Promedio	2031680
Adecuación 2	0.0422	2031170.0	Des. Est.	762.62
Adecuación 3	0.0422	2032485.0	C.V.	0.04
Adecuación 4	0.0422	2031093.0	Porcentaje de agua	5.12365
Adecuación 5	0.0422	2031108.0		
<b>Puntos controles</b>				
	Peso (g)	Respuesta	%	
PC 1	0.0422	2023662.5	99.6	
PC 2	0.0422	2049271.0	100.9	
PC 3	0.0422	2045651.0	100.7	
Std F	0.0422	2020700.0	99.5	
<b>Muestras</b>				
	Peso (g)	Respuesta	% Metoclopramida	
K 1	0.4624	2021670.0	99.60	Promedio 100.79
K 2	0.4624	2018382.0	99.44	Des. Est. 0.96
K 3	0.4624	2063643.0	101.67	C.V. 0.95
K 4	0.4624	2040239.0	100.52	
K 5	0.4624	2040249.0	100.52	
K 6	0.4624	2062979.0	101.64	

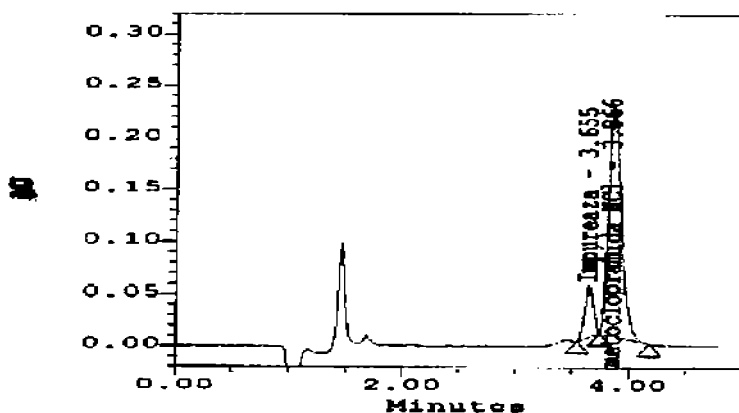
Con un coeficiente de variación menor del 1%, podemos afirmar que nuestro método no tiene problemas de precisión como se llegó a sospechar anteriormente, por lo que se podrá pasar a la siguiente etapa que será la evaluación de la especificidad del mismo tanto a excipientes como a productos de degradación.

Por otro lado al comparar el estándar filtrado con los valores obtenidos para los puntos control, sabemos que no se pierde muestra al pasarla por el filtro.

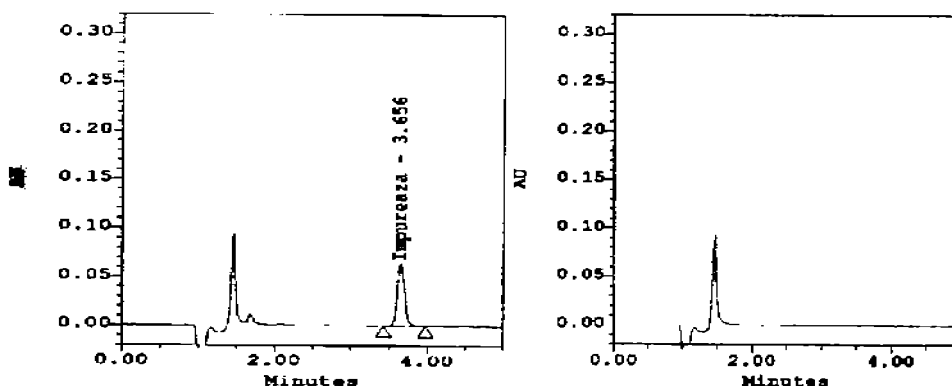
#### 8.5. Especificidad (primer bloque)

A través de los 3 primeros experimentos de especificidad, se vinieron dando, los siguientes resultados:

Para las degradaciones por medio de acidez, se observó la presencia de un pico alrededor de los 3.8 minutos, que por su cercanía con el tiempo de elusión de la Metoclopramida, alteraba la cuantificación de la misma. En ciertos momentos llegaba a coeleuir con ella. En un principio se pensó que este se debía a alguna contaminación del material de vidrio utilizado, al volverse a presentar se especuló podría deberse a alguna contaminación del reactivo HCl utilizado, así que se hizo cambio de reactivo para el siguiente experimento. Al volverse a presentar entonces se descartó por completo la probabilidad de alguna contaminación, y se concluyó que se trataba de un producto de degradación.



**Figura 7** Cromatograma de un placebo adicionado sometido a condiciones ácidas.



**Figura 8** Cromatogramas correspondientes al placebo y al blanco de reactivos para condiciones ácidas

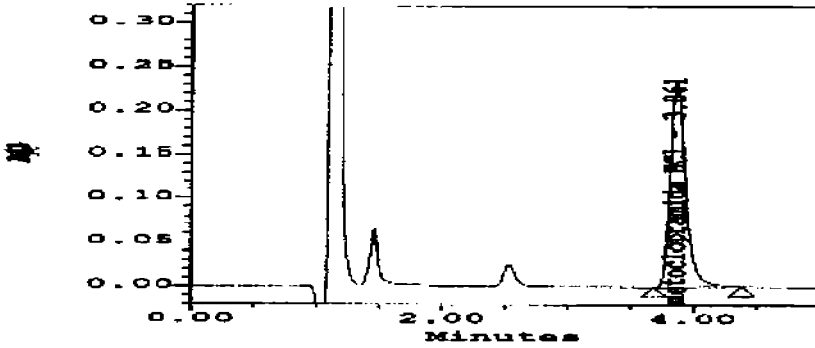
En cuanto al resto de las condiciones de degradación se obtuvieron los siguientes resultados

Condición	Experimento 1	Experimentos 2	Experimento 3
Alcalinidad	98.31%	95.22%	98.54%
Oxidación $H_2O_2$	96.36%	92.46%	90.91%
Oxidación UV	90.67%	*	91.80%

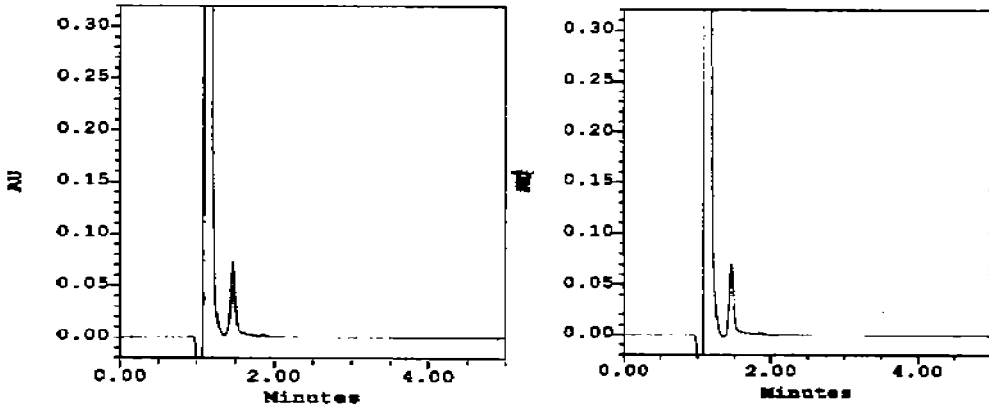
Aquí podemos observar que las muestras alcalinas casi no sufren degradación aunque las condiciones cada vez se volvían más drásticas. Esto demuestra que es mucho más estable en condiciones alcalinas que ácidas. También pudo haber influido que al ser metanol el disolvente, este no facilitara del todo la hidrólisis, como podría llevarse a cabo en agua.

\* Esta serie de muestras no se pudieron analizar, puesto que al concluir el tiempo de degradación se encontró la cámara apagada, y no se obtuvo información del momento en que se apagó, por lo que no se tenía con certeza el tiempo que duró la degradación perdiéndose por completo las muestras.

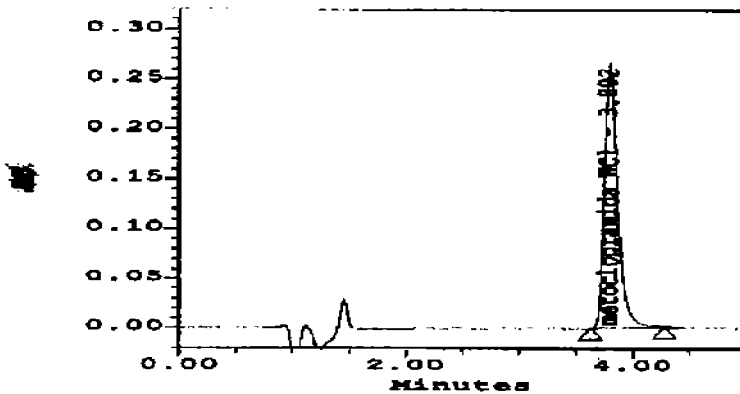
A continuación se presentan unos cromatogramas característicos para cada una de las condiciones de degradación.



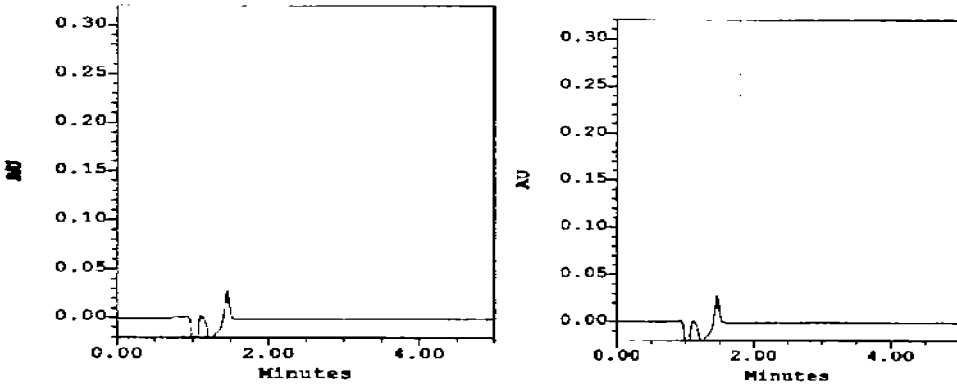
**Figura 9** Cromatograma de un placebo adicionado sometido a oxidación por  $H_2O_2$ .



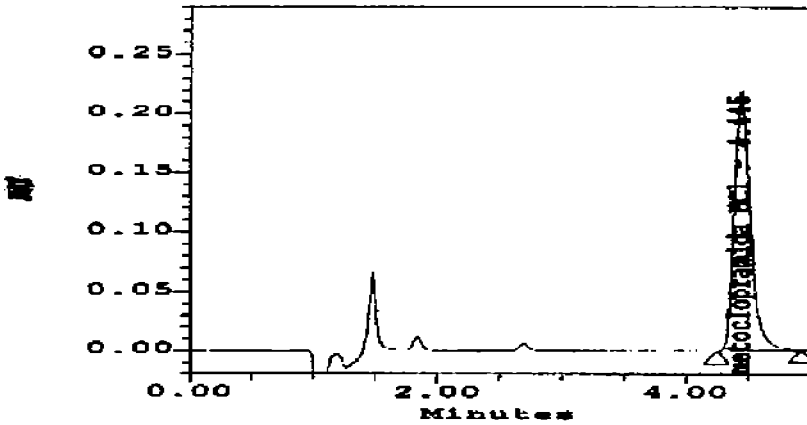
**Figura 10** Cromatogramas correspondiente al placebo y al blanco de reactivos para oxidación por  $H_2O_2$ .



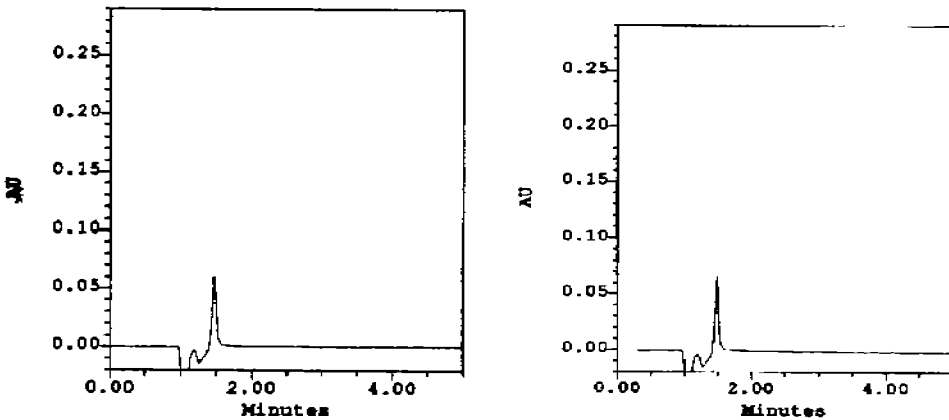
**Figura 11** Cromatograma correspondiente a un placebo adicionado para condiciones alcalinas



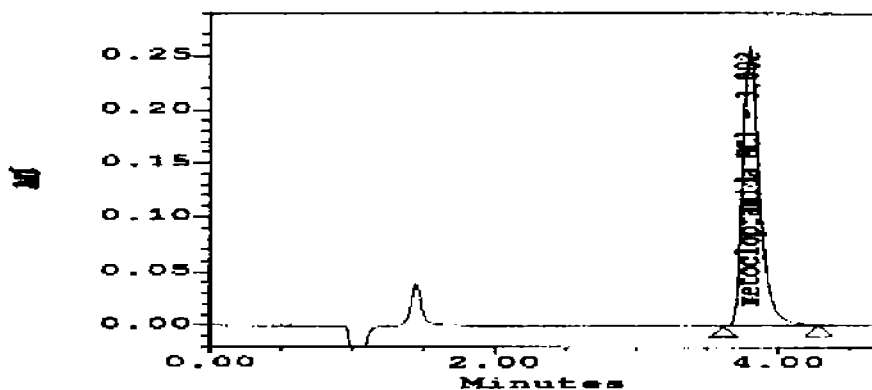
**Figura 12** Cromatogramas correspondientes al placebo y al blanco de reactivos para condiciones alcalinas



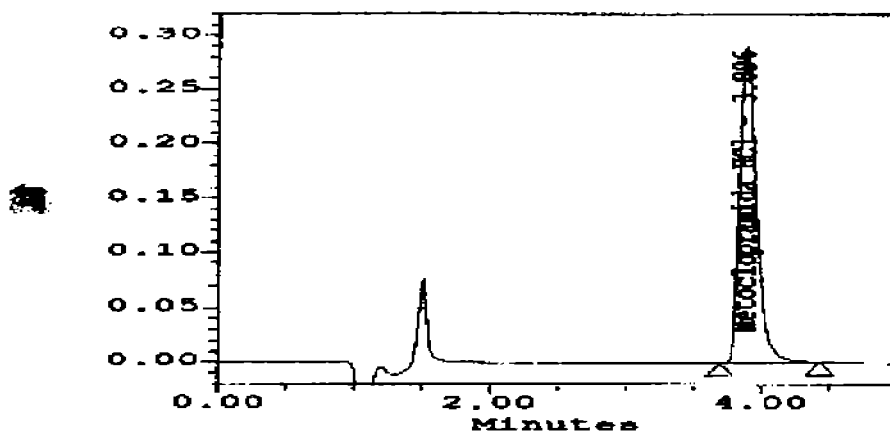
**Figura 13** Cromatograma correspondiente a un placebo adicionado para oxidación por UV



**Figura 14** Cromatogramas correspondientes al placebo y al blanco de reactivos para oxidación por UV



**Figura 15** Cromatograma correspondiente a la sustancia de referencia



**Figura 16** Cromatograma correspondiente a una muestra sin degradar.

Como se puede apreciar claramente en cada uno de los anteriores cromatogramas, exceptuando las degradaciones ácidas, en ningunas de todas las restantes hay algún pico que interfiera en la zona de elusión del clorhidrato de Metoclopramida, ya sea tanto para el blanco de reactivos, como para el placebo, como para el placebo adicionado, por lo que en estas condiciones (oxidación por UV, por peróxido y alcalinidad), nuestro método es específico para excipientes y para productos de degradación.

**8.6. Modificación al sistema.**

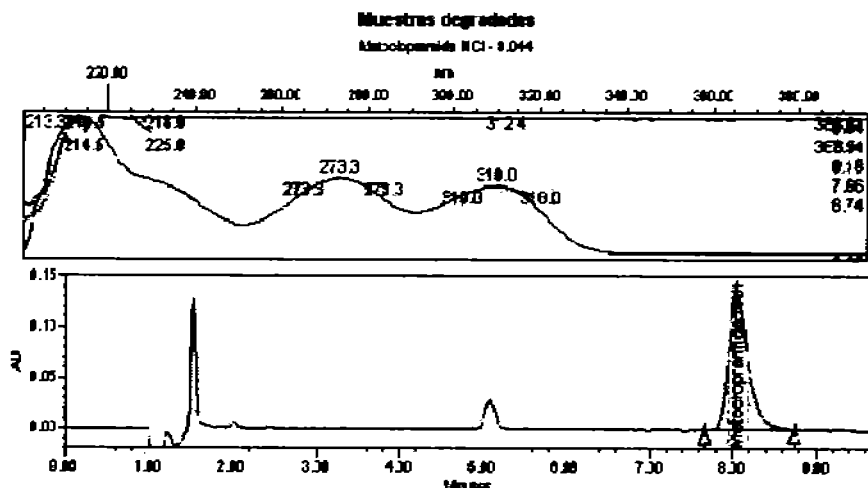
Se consiguió separar el pico del producto de degradación del pico correspondiente a la Metoclopramida. Quedando el tiempo de elusión en 5 y 8 respectivamente.

Por medio del análisis de pureza realizado a nuestro pico de interés a través de un detector de arreglo de fotodiodos (ver detectores en el punto 4.2.6), confirmamos que se trata efectivamente de clorhidrato de Metoclopramida, y que el pico es totalmente puro.

Ya en los porcentajes cuantificados se obtuvo un promedio del 94% por lo que hay que someterlo a condiciones de degradación más drásticas



**Figura 17** Cromatograma correspondiente al placebo para condiciones ácidas



**Figura 18** Cromatograma que demuestra la separación de nuestro pico de interés con el producto de degradación.

En la figura 18 se comprueba que efectivamente al disminuir el poder acarreador del acetonitrilo, se logra separar nuestro pico de interés del producto de degradación, además que mediante los diversos barridos que se realiza al pico alrededor del tiempo de elusión, se aprecia que en todas las zonas se trata solamente del mismo analito pues todos los espectros muestran los mismos máximos y mínimos, que al compararse con el espectro de referencia (almacenado en la librería, representado en color negro), podemos constatar que se trata efectivamente de Metoclopramida pues nuestra muestra presenta los mismos máximos y mínimos

### 8.7. Especificidad (segundo bloque)

Condición	Experimento 4
Alcalinidad	99.59%
Oxidación H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	84.37%
Acidez	89.15%

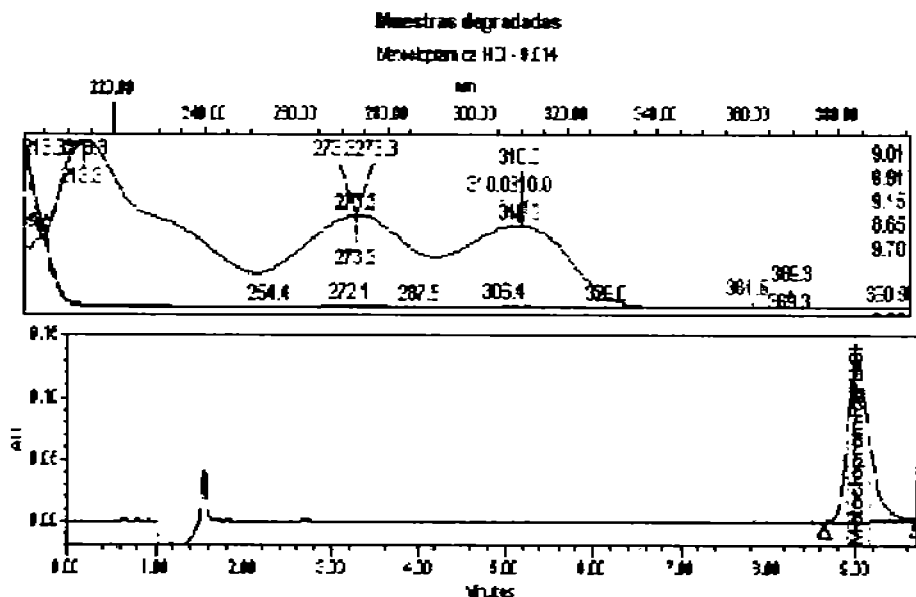
Tanto el porcentaje de degradación para las condiciones ácidas como por oxidación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> caen dentro del intervalo deseado puesto que para el primero se cuantifico en promedio un 89% y para el segundo un 84%.

Para el caso de condiciones alcalinas aun con el enorme tiempo que se expusieron las muestras, la degradación es prácticamente despreciable, por lo que se concluye que el clorhidrato de Metoclopramida sufre degradaciones despreciables bajo esas condiciones.

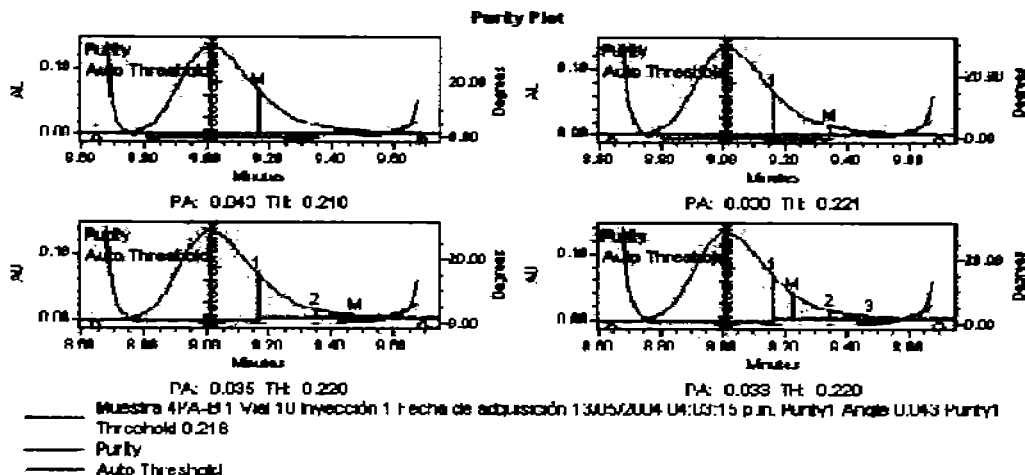
Las condiciones de degradación al UV se mantienen según lo estipulado en el tercer experimento del primer bloque.



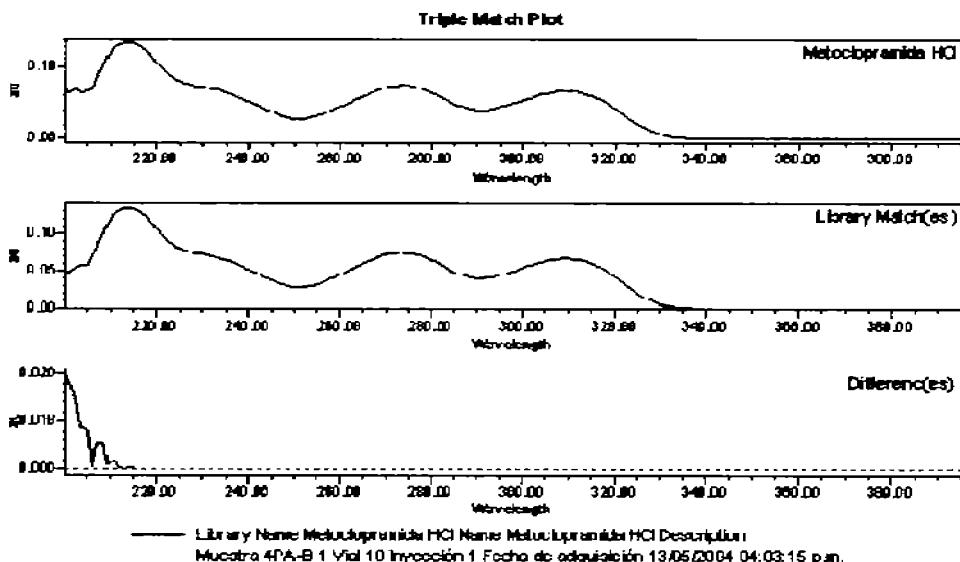
**Análisis de pureza para el pico de Metoclopramida en muestras sometidas a degradación alcalina.**



**Figura 19** Cromatograma con pases de pureza a lo largo de la muestra degradada alcalinamente.

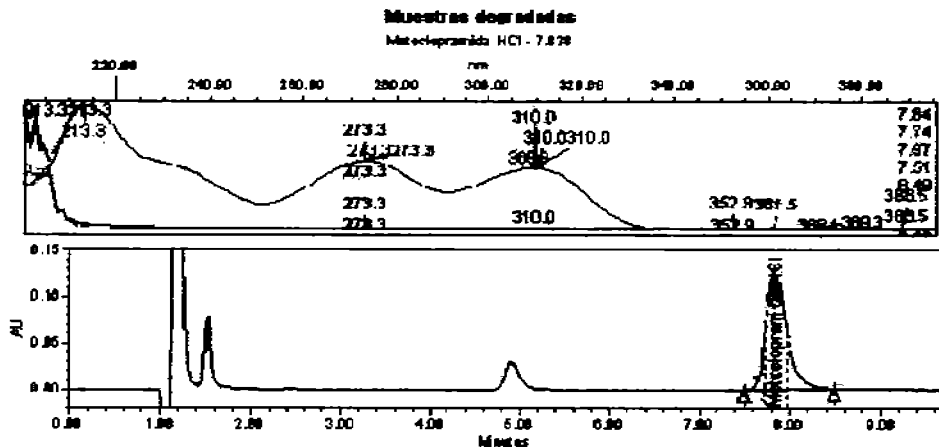


**Figura 20** Análisis de pureza para el pico de Metoclopramida en muestras sometidas a degradación alcalina.

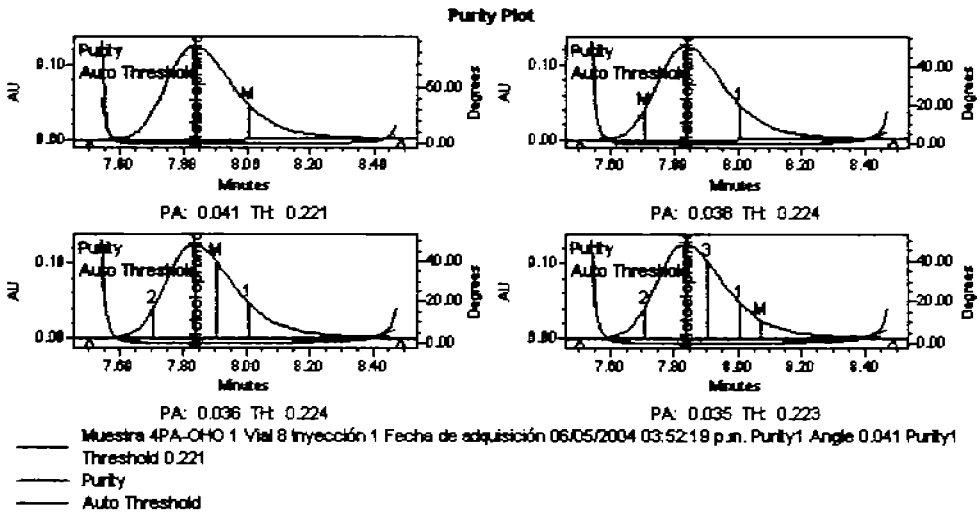


**Figura 21** Comparación del espectro obtenido para la muestra degradada bajo condiciones alcalinas con el del estándar secundario.

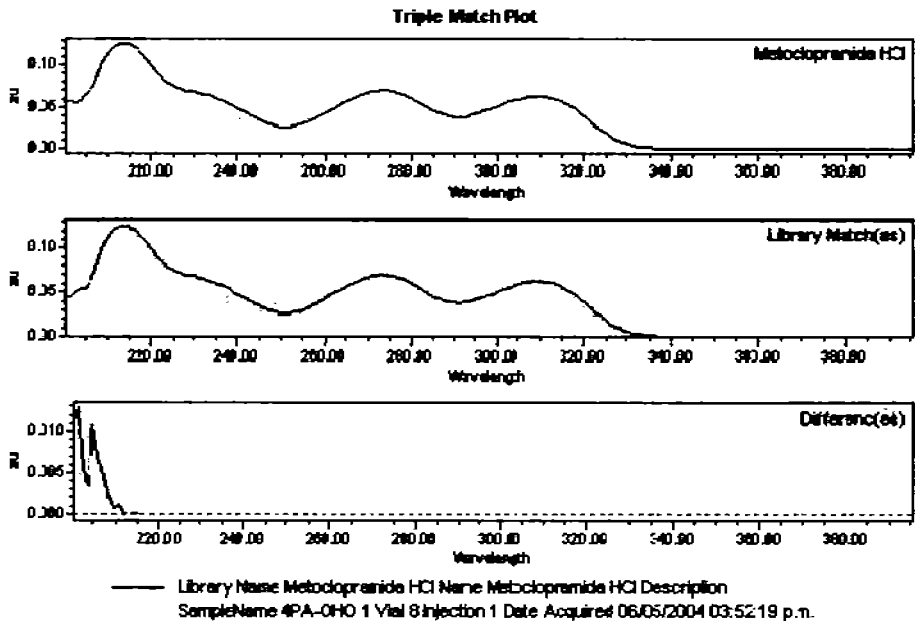
**Análisis de pureza para el pico de Metoclopramida en muestras sometidas a degradación oxidativa con peróxido.**



**Figura 22** Cromatograma con pases de pureza a lo largo de la muestra degradada por oxidación con peróxido.

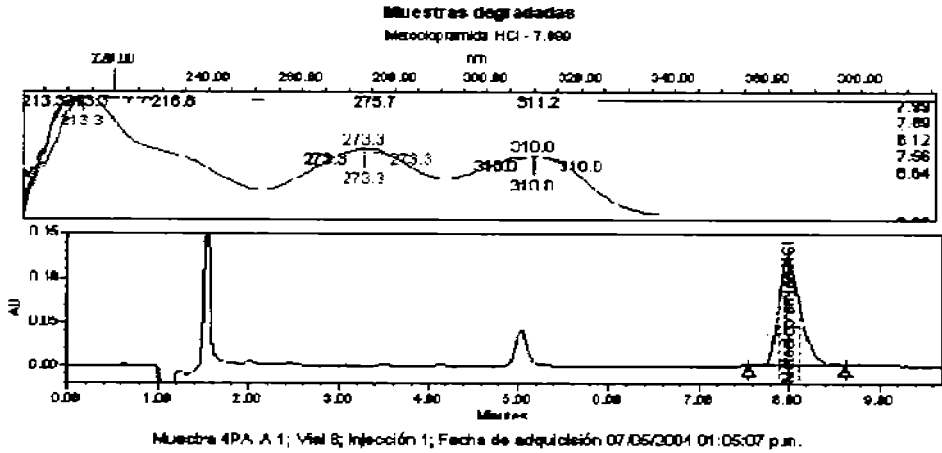


**Figura 23** Análisis de pureza para el pico de Metoclopramida en muestras sometidas a oxidación con peróxido.

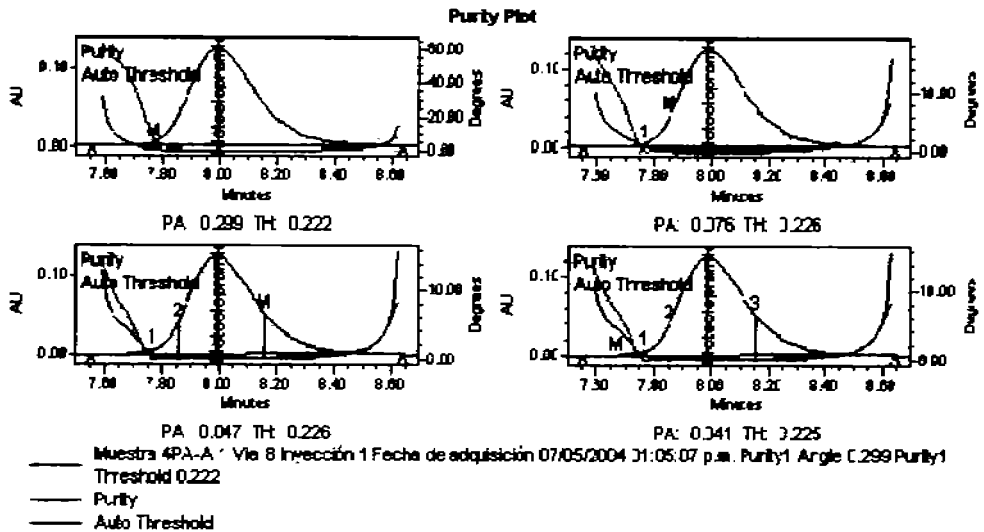


**Figura 24** Comparación del espectro obtenido para la muestra degradada por oxidación con peróxido con el del estándar secundario.

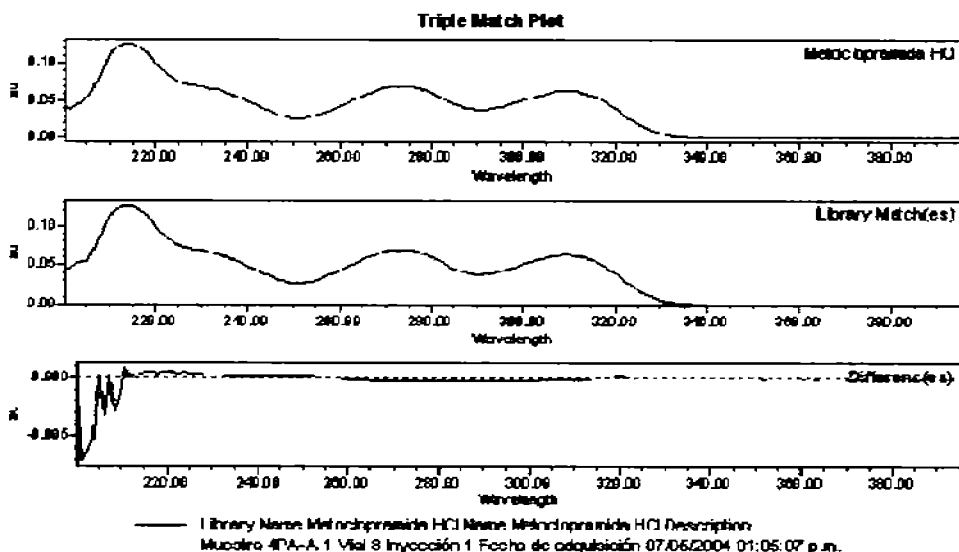
**Análisis de pureza para el pico de Metoclopramida en muestras sometidas a degradación ácida.**



**Figura 25** Cromatograma con pases de pureza a lo largo de la muestra degradada con ácido.

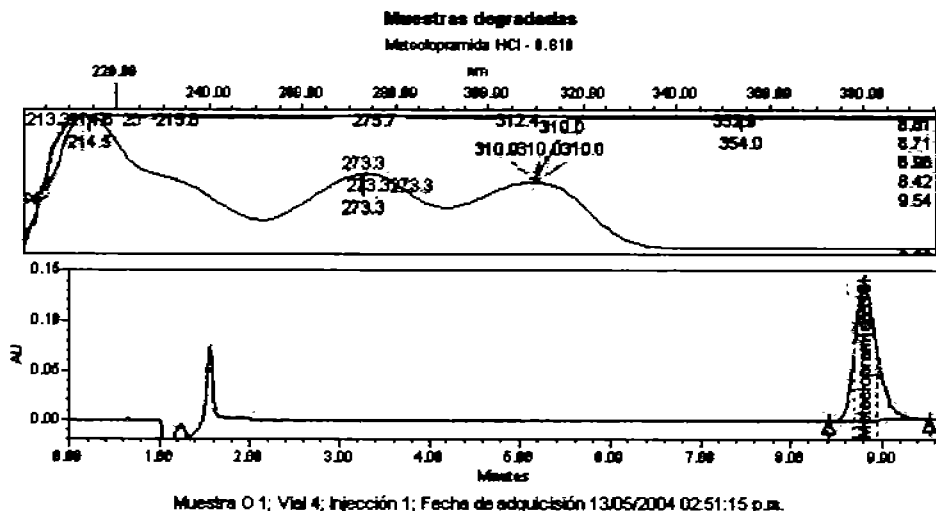


**Figura 26** Análisis de pureza para el pico de Metoclopramida en muestras sometidas a oxidación con ácido.

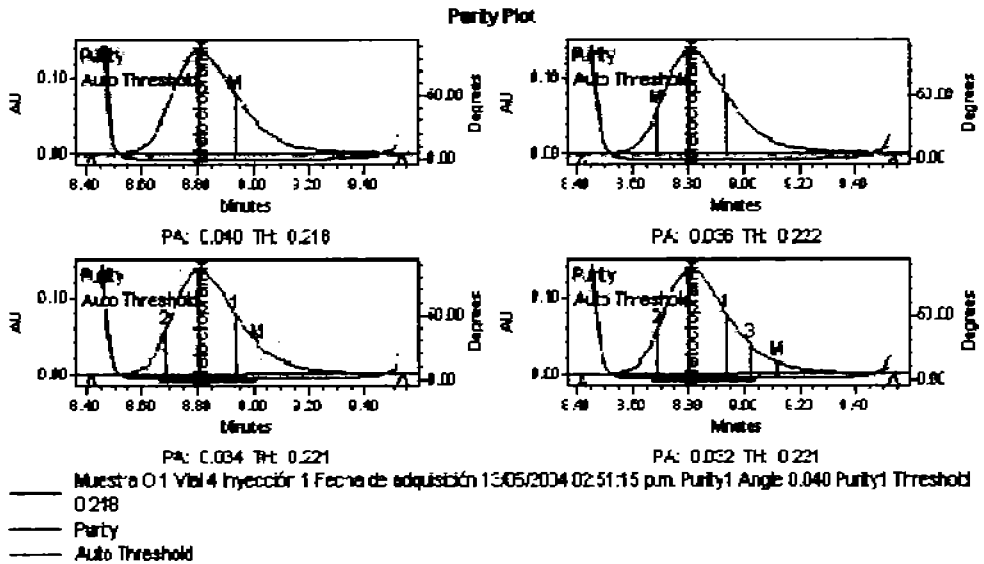


**Figura 27** Comparación del espectro obtenido para la muestra degradada con ácido con el del estándar secundario.

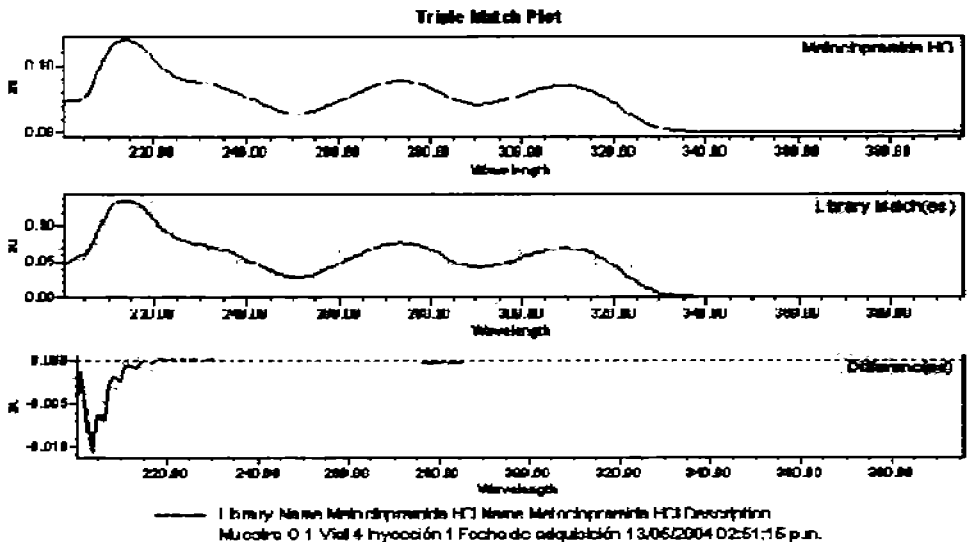
**Análisis de pureza para el pico de Metoclopramide en muestras analizadas sin degradación.**



**Figura 28** Cromatograma con pases de pureza a lo largo de la muestra sin degradar



**Figura 29** Análisis de pureza para el pico de Metoclopramida en muestras sin degradar.



**Figura 30** Comparación del espectro obtenido para las muestra sin degradar con el del estándar secundario.

En todos los cromatogramas obtenidos para las condiciones de degradación como de las muestras sin degradar, podemos ver que nuestro método es específico tanto para excipientes como para productos de degradación, puesto que no hay ninguna señal que interfiera con la cuantificación del clorhidrato de Metoclopramida. Mediante los diversos barridos que se realiza al pico alrededor del tiempo de elusión, se aprecia que en todas las zonas se trata solamente del mismo analito pues todos los espectros muestran los mismos máximos y mínimos, que al compararse con el espectro de referencia (almacenado en la librería, representado en color negro), podemos constatar que se trata efectivamente de Metoclopramida.

En los esquemas pertenecientes a "Purity Plot" se comprueba la pureza del pico pues se aprecia que al momento de eluir nuestra muestra no hay ningún compuesto que coeluya con la misma, por lo que se concluye que nuestro pico es totalmente puro.

Respecto a los "Triple Mach Plot" se constata que el analito que eluye a ese tiempo de retención es precisamente el clorhidrato de Metoclopramida pues al comparar el espectro con el de la sustancia de referencia las diferencias son despreciables.

### 8.8. Linealidad y exactitud del método.

Estándar	Peso (g)	Respuesta			Cantidad de Metoclopramida
Adecuación 1	0.0421	2341777.0	Promedio	2324961.2	0.039960815
Adecuación 2	0.0421	2313529.0	Des. Est.	16308.69	
Adecuación 3	0.0421	2303193.0	C.V.	0.70	
Adecuación 4	0.0421	2328015.0	Porcentaje de agua	5.0812	
Adecuación 5	0.0421	2338292.0			
<b>Puntos controles</b>					
	Peso (g)	Respuesta	%		
PC 1	0.0421	2311184.0	99.4		
PC 2	0.0421	2280959.0	98.1		
<b>Muestras</b>					
		Respuesta	% Metoclopramida		
A 1	1548924.0	95.08	Cantidad teo (mg)	28	
A 2	1555965.0	95.51	Promedio	95.68	
A 3	1571391.0	96.46	Des. Est.	0.71	
			C.V.	0.74	
B 1	2298531.0	98.77	Cantidad teo (mg)	40	
B 2	2296337.0	98.67	Promedio	98.43	
B 3	2277564.0	97.87	Des. Est.	0.50	
			C.V.	0.50	
C 1	2989850.0	98.82	Cantidad teo (mg)	52	
C 2	2666703.0	98.14	Promedio	93.94	
C 3	2869842.0	94.86	Des. Est.	5.40	
			C.V.	5.75	

Al parecer con la cantidad de placebo adicionado a cada muestra, la Metoclopramida presenta serios problemas de liberación dado que en el nivel menor, donde se supondría sería más factible un 100% de recobro, nos quedamos a un 4% en promedio por debajo de la cantidad de Metoclopramida adicionada.

También a lo anterior podríamos atribuirle el elevado coeficiente de variación que tuvieron nuestras muestras del nivel del 130%.

Para el nivel del 100% la cantidad obtenida cayó dentro del intervalo del 98.0-102.0% de recobro y el coeficiente de variación fue menor del 2.0%, por lo que en este nivel no se presentó ningún problema.

**8.9. Modificación al método.**

Estándar	Peso (g)	Respuesta			Cantidad de Metoclopramida
Adecuación 1	0.0421	2387306.0	Promedio	2360170.6	0.039960815
Adecuación 2	0.0421	2375192.0	Des. Est.	22570.73	
Adecuación 3	0.0421	2362327.0	C.V.	0.96	
Adecuación 4	0.0421	2344696.0	Porcentaje de agua	5.0812	
Adecuación 5	0.0421	2331332.0			
<b>Puntos controles</b>					
	Peso (g)	Respuesta	%		
PC 1	0.0421	2347132.0	99.4		
PC 2	0.0421	2354624.0	99.8		
<b>Muestras</b>					
	Respuesta	% Metoclopramida			
D 1	3105738.0	101.12	cantidad teo (mg)	52	
D 2	3105943.0	101.13	Promedio	101.27	
D 3	3120536.0	101.61	Des. Est.	0.20	
D 4	3105453.5	101.11	C.V.	0.20	
D 5	3108875.0	101.23			
D 6	3114069.0	101.39			

El promedio de las 6 muestras fue de 101.26% que entra en el rango del 98.0-102.0% de recobro deseado, además que el coeficiente de variación fue del 0.2% que es menor del 2.0%. por lo que se concluye que si había problemas de liberación, estos se resolvieron al aumentar el tiempo de sonicado.

Por lo anteriormente planteado, el método desarrollado se le modificara el tiempo de sonicado quedando en 40 minutos.



**8.10. Linealidad y exactitud del método. (2° experimento).**

Estándar	Peso (g)	Respuesta			Cantidad Metoclopramida
Adecuación 1	0.0421	2320095.0	Promedio	2346187.4	0.039960815
Adecuación 2	0.0421	2332051.5	Des. Est.	19296.32	
Adecuación 3	0.0421	2352819.0	C.V.	0.82	
Adecuación 4	0.0421	2363437.5	Porcentaje de agua	5.0812	
Adecuación 5	0.0421	2362534.0			
<b>Puntos controles</b>					
	Peso (g)	Respuesta	%		
PC 1	0.0421	2352882.0	100.3		
PC 2	0.0421	2338130.5	99.7		
<b>Muestras</b>					
		Respuesta	% Metoclopramida		
E 1	1648484.0	100.28	cantidad teo (mg)	28	
E 2	1630913.5	99.21	Promedio	100.06	
E 3	1655545.0	100.71	Des. Est.	0.77	
			C.V.	0.77	
F 1	2399145.0	102.16	cantidad teo (mg)	40	
F 2	2414631.0	102.82	Promedio	101.91	
F 3	2366060.5	100.75	Des. Est.	1.06	
			C.V.	1.04	
G 1	3108125.0	101.80	cantidad teo (mg)	52	
G 2	3103302.0	101.65	Promedio	101.76	
G 3	3108505.0	101.82	Des. Est.	0.10	
			C.V.	0.09	

**REGRESIÓN LINEAL POR MÍNIMOS CUADRADOS**

Pendiente (B) =	1.0373	suma x =	360.0000
Ordenada (A) =	-0.9278	suma Y =	365.0810
Pend. Rel. (Bo) =	1.0229	n =	9
Ord. Rel. (Ao) =	-0.0229	suma x <sup>2</sup> =	15264.0000
Coef. Corr. (r) =	0.9997	suma y <sup>2</sup> =	15739.6542
Coef. Det. (r <sup>2</sup> ) =	0.9993	suma xy =	15499.4753
Sy/x =	3.01E-01	promedio x =	40.0000
Sy/x rel =	0.0074	promedio y =	40.5646
C.V. =	0.7		
Error Estándar de la Pendiente =		1.02E-02	
Coef. de Variación de la Pendiente =		1.0	

**A. mg RECUPERADOS EN CADA NIVEL**

NIVEL %	mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS
70	28.000	28.077
	28.000	27.778
	28.000	28.198
100.0	40.000	40.863
	40.000	41.127
	40.000	40.299

130	52.000	52.938
	52.000	52.856
	52.000	52.945

**B. ECUACIÓN DE LA RECTA**

y = 1.0373 x + -0.9278  
 r2 = 0.9993  
 C.V. = 0.7

**C. INTERVALO DE CONFIANZA AL 95 % gl = 7 PARA LA ORDENADA AL ORIGEN Y LA PENDIENTE**

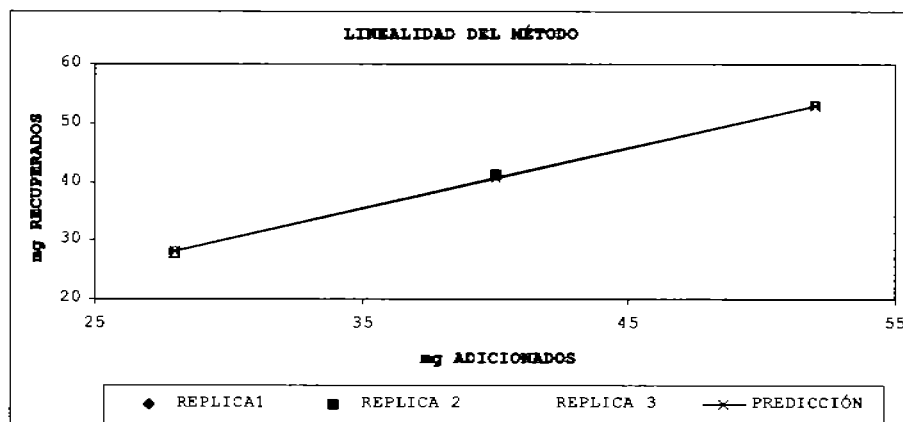
ORDENADA AL ORIGEN		PENDIENTE
Límite Superior =	0.0682	1.0615
Límite Inferior =	-1.9237	1.0131

**D. POR CIENTO RECUPERADO EN CADA NIVEL**

NIVEL %	70.0	100.0	130.0
RÉPLICA	POR CIENTO RECUPERADO		
1	100.276	102.157	101.804
2	99.206	102.816	101.646
3	100.706	100.748	101.817
n =	3	3	3
PROMEDIO =	100.1	101.9	101.8
D. E. =	7.72E-01	1.06E+00	9.50E-02
C.V. =	0.8	1.0	0.1
n =	9		
PROMEDIO =	101.2		
D. E. =	1.10E+00		
C.V. =	1.1		

**E. INTERVALO DE CONFIANZA AL 95% gl = 8 PARA EL POR CIENTO RECUPERADO**

Límite Superior = 102.1  
 Límite Inferior = 100.4



Los resultados obtenidos resultan adecuados en los siguientes aspectos:

- El coeficiente de determinación es mayor a 0.98.
- El I.C. al 95% para la pendiente debe incluir al uno.
- El C.V. de la regresión es menor ó igual al 2.0%
- El promedio del por ciento recuperado por nivel se encuentra entre 98.0 y 102.0 %.
- El promedio del por ciento recuperado global se encuentra entre 98.0 y 102.0% y el coeficiente de variación es menor o igual al 2.0%.

**8.11. Segunda modificación al método.**

Estándar	Peso (g)	Respuesta			Cantidad de Metoclopramida
Adecuación 1	0.0422	2400710.0	Promedio	2370127.1	0.040033705
Adecuación 2	0.0422	2363855.0	Des. Est.	17122.87	
Adecuación 3	0.0422	2362870.5	C.V.	0.72	
Adecuación 4	0.0422	2361464.0	Porcentaje de agua	5.1334	
Adecuación 5	0.0422	2361736.0			

Puntos controles			
	Peso (g)	Respuesta	%
PC 1	0.0422	2352792.0	99.3
PC 2	0.0422	2364691.0	99.8

Muestras					
	Respuesta	% Metoclopramidacant recuperada			
E-1	2367239	99.96	39.9849	cantidad teo (mg)	40
E-2	2346992	99.11	39.6429	Promedio	98.62
E-3	2280934	96.32	38.5271	Des. Est.	1.37
E-4	2341255	98.97	39.5460	C.V.	1.38
E-5	2341379	98.97	39.5481		

Los resultados parecen ser adecuado. La variación pudiera deberse a que la una probable diferencia en la temperatura de cada muestra al momento de realizar las diluciones y el porcentaje bajo obtenido en la determinación E-3 puede deberse a la variación existente en el contenido de la muestra.

**8.12. Precisión y exactitud controlando temperatura.**

Estándar	Peso (g)	Respuesta			Cantidad de Metoclopramida
Adecuación 1	0.0422	2292987.0	Promedie	2288085	0.040033705
Adecuación 2	0.0422	2291291.0	Des. Est.	6555.83	
Adecuación 3	0.0422	2286870.5	C.V.	0.29	
Adecuación 4	0.0422	2277142.5	Porcentaje de agua	5.1334	
Adecuación 5	0.0422	2292134.0			

Puntos controles			
	Peso (g)	Respuesta	%
PC 1	0.0422	2266879.5	99.1
PC 2	0.0422	2285516.0	99.9

Mostras					
	Respuesta	% Metoclopramidacant recuperada			
E-1	2286753.5	100.03	40.0104	cantidad teo (ng)	40
E-2	2291957.5	100.25	40.1010	Promedio	39.75
E-3	2285415.0	99.97	39.9870	Des. Est.	0.54
E-4	2257302.0	98.74	39.4951	C.V.	0.54
E-5	2283890.0	99.90	39.9603		
E-6	2277081.5	99.60	39.8412		

Los resultados son exactos puesto que el porcentaje de recobro en cada determinación cae dentro del intervalo del 98.0 % al 102.0% y son precisión porque el coeficiente de variación para las 6 determinaciones es menor del 2.0%. por lo adecuado de estos resultados se concluye que el método esta listo para ser validado

## **9. Características finales del método desarrollado**

### **9.1. Soluciones**

#### **9.1.1.1. Solución acuosa de ácido fosfórico 0.01M**

Transferir 0.7mL de ácido fosfórico concentrado a un matraz volumétrico de 1000mL, llevar a volumen con agua

#### **9.1.1.2. Solución de acetato de sodio dihidratado**

Disolver 5.4g de acetato de sodio en un litro de agua HPLC.

#### **9.1.1.3. Fase móvil**

Mezclar 850mL de Solución de acetato de sodio con 150mL de acetonitrilo, adicionar 2mL de solución de hidróxido de tetrametil amonio en metanol al 25%. Ajustar el pH de la fase móvil a 6.5 con ácido fosfórico concentrado. Filtrar a través de membrana millipore tipo HVLP de 0.45µm de tamaño de poro o equivalente, desgasificar al mismo tiempo con agitación y vacío.

### **9.2. Equipo.**

HPLC equipado con una columna Symmetry® C18 de 15cm de longitud por 4.6mm de diámetro interno rellena de partículas de 5µm y precolumna Symmetry® C18 de 2cm de longitud por 3.9mm de diámetro interno rellena de partículas de 5µm

### **9.3. Método:**

#### **9.3.1. Preparación de la referencia**

Transferir alrededor de 40mg de Clorhidrato de Metoclopramida SR base anhidra, pesados con exactitud a un matraz volumétrico de 100mL, adicionar 70mL de ácido fosfórico 0.01M y agitar en ultrasonido durante 5 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con ácido fosfórico 0.01M y mezclar. De esta solución transferir 5.0mL a un matraz volumétrico de 50mL, llevar a volumen con ácido fosfórico 0.01M y mezclar. Concentración aproximada de 0.040mg/mL de Clorhidrato de Metoclopramida

#### **9.3.2. Preparación de la muestra**

##### **Valoración**

Pesar no menor de 20 cápsulas individualmente. Vaciar el contenido de las cápsulas limpiarlas y pesarlas. Calcular el contenido promedio de las cápsulas y triturar con mortero y pistilo hasta polvo fino y homogéneo. Transferir el equivalente a 40mg de Clorhidrato de Metoclopramida, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100mL, adicionar 70 mL de Metanol HPLC y agitar con ultrasonido durante 40 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con metanol HPLC. Centrifugar a 3000rpm por 5 minutos a temperatura ambiente (20-25°C), y decantar. Del sobrenadante transferir 5.0mL a un matraz volumétrico de 50mL, mezclar y llevar a volumen con ácido fosfórico 0.01M.

#### **Uniformidad de contenido**

Seleccionar no menos de 30 cápsulas y analizar 10 como sigue: Transferir el contenido de una cápsula a un matraz volumétrico de 50mL, añadir 35mL de metanol HPLC , agitar con ultrasonido durante 40 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con metanol HPLC. Centrifugar a 3000rpm por 5 minutos a temperatura ambiente (20-25°C), y decantar. Del sobrenadante transferir 5.0mL a un matraz volumétrico de 50mL, mezclar y llevar a volumen con ácido fosfórico 0.01M.

#### **9.4. Condiciones cromatográficas**

Velocidad de flujo	1.5 mL/min
Volumen de Inyección	20 µL
Detección	UV a 215 nm
Modo de Integración	Áreas
Respuesta:	Áreas

### **10. Validación del método desarrollado**

Se validaron los siguientes parámetros de desempeño del método considerándose los criterios de aceptación que a continuación se señalan:

#### **10.1. Especificidad.**

##### **10.1.1. Excipientes**

Se evaluó al procesar por duplicado muestras de placebo (preparadas al 130%) y fueron analizadas con el método propuesto.

Los criterios de aceptación fueron que ninguno de los excipientes de la formulación debe presentar señales al tiempo de retención del Clorhidrato de Metoclopramida.

##### **10.1.2. Productos de degradación**

Se evaluó al procesarse por duplicado 40mg de Clorhidrato de Metoclopramida y 0.5463g de placebo exactamente pesados transferidos a un matraz volumétrico de 100mL y adicionando 40mL de metanol HPLC, después se agregó el volumen de agente degradante tal como se apuntó en el desarrollo.

Los criterios de aceptación fueron que: La señal de Clorhidrato de Metoclopramida debe ser pura. No debe haber productos de degradación que interfieran con la cuantificación del compuesto de interés.

Los resultados obtenidos en este punto se desarrollan a detalle en el párrafo 11.1

### **10.2. Linealidad del sistema**

Se evaluó la linealidad del sistema al determinar la relación que existe entre los mg/mL de Clorhidrato de Metoclopramida (x) y la respuesta (Área) (y), al preparar muestras a 5 niveles, 3 réplicas por nivel a partir de pesadas independientes y en el intervalo del 70% a 130% de lo establecido por el método analítico.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados obteniéndose:

- Ordenada al origen (A),
- Pendiente (B)
- Coeficiente de determinación ( $r^2$ )
- Coeficiente de variación de la regresión
- Ecuación de la recta
- Gráfica
- Con los datos del factor respuesta (Respuesta/concentración de Diclofenaco dietilamonio) se calculó el número de datos (n), promedio, desviación estándar (D.E.), y el coeficiente de variación (C.V.)
- Intervalo de confianza al 95% para la ordenada al origen o la ordenada al origen relativa
- Intervalo de confianza al 95% para la pendiente.

Los criterios de aceptación fueron que: el coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.98, el intervalo de confianza al 95% para la ordenada al origen debe incluir al cero o la ordenada al origen relativa debe encontrarse entre -0.02 y 0.02 y el intervalo de confianza al 95% para la pendiente no debe incluir al cero. El coeficiente de variación del factor respuesta debe ser menor a 1.5%.

Los resultados obtenidos en este punto se desarrollan a detalle en el párrafo 11.2

### **10.3. Precisión del sistema**

Se evaluó al preparar por sextuplicado la solución al 100%, preparada como se indica en la linealidad del sistema. Con los datos obtenidos de las seis respuestas se calculó el número de datos (n), promedio, desviación estándar (D.E.), y el coeficiente de variación (C.V.).

Los criterios de aceptación fueron que: coeficiente de variación debe ser menor o igual a 1.5%. Los resultados obtenidos en este punto se desarrollan a detalle en el párrafo 11.3

### **10.4. Adecuabilidad del sistema.**

Se evaluó al inyectar por quintuplicado al sistema cromatográfico la primera réplica del nivel al 100% preparado para la precisión del sistema. Se calculó el promedio, desviación estándar (D.E.), coeficiente de variación (C.V.) de la respuesta y los parámetros cromatográficos de las cinco inyecciones

Los criterios de aceptación fueron que: el coeficiente de variación de las cinco inyecciones debe de ser menor o igual a 2.0%.

Los resultados obtenidos en este punto se desarrollan a detalle en el párrafo 11.4

### 10.5. Linealidad del método

Se evaluó la linealidad al determinar la relación que existe entre los mg adicionados (x) y los mg recuperados (y), al preparar muestras a 3 niveles, 3 réplicas por nivel, a partir de pesadas independientes y en el intervalo de 70% a 130% de Clorhidrato de Metoclopramida de lo establecido por el método analítico.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados obteniéndose:

- Ordenada al origen (A),
- Pendiente (B)
- Coeficiente de determinación ( $r^2$ )
- Ecuación de la recta
- Gráfica
- Con los datos de mg recuperados se calculó el por ciento recuperado, número de datos (n), promedio, desviación estándar (D.E.), y el coeficiente de variación (C.V) por nivel y global
- Intervalo de confianza al 95% para la ordenada al origen o la ordenada al origen relativa y el Intervalo de confianza al 95% para la pendiente o la pendiente relativa.
- Intervalo de confianza al 95% para el promedio del por ciento recuperado.

Los criterios de aceptación fueron que:

El coeficiente de determinación debe de ser mayor a 0.98, el intervalo de confianza (I.C.) al 95% para la ordenada al origen debe incluir al cero ó la ordenada al origen relativa debe encontrarse entre -0.02 y 0.02 y el I.C. al 95% para la pendiente debe incluir al uno ó la pendiente relativa debe encontrarse entre 0.98 y 1.02.

El C.V. de la regresión debe ser menor ó igual al 2.0%

El promedio del porcentaje recuperado por nivel debe encontrarse entre 98.0 y 102.0 %.

El promedio del porcentaje recuperado global debe encontrarse entre 98.0 y 102.0% y el coeficiente de variación debe de ser menor o igual al 2.0%.

El I.C. al 95% para el promedio del porcentaje recuperado global debe encontrarse entre 98.0 y 102.0%. Los resultados obtenidos en este punto se desarrollan a detalle en el párrafo 11.5

### 10.6. Exactitud del método.

Se evaluó al preparar por sextuplicado, a partir de pesadas independientes, placebos adicionados al 100% y analizarlos como se indica en el método analítico.

El criterio de aceptación fue que el promedio del porcentaje recuperado y su intervalo de confianza al 95% deben encontrarse entre 98.0 y 102.0 %.

Los resultados obtenidos en este punto se desarrollan a detalle en el párrafo 11.6



### **10.7. Precisión del método.**

Se evaluó con las mismas muestras de la exactitud, calculando el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación del promedio del porcentaje recuperado.

El criterio de aceptación fue que el coeficiente de variación del porcentaje recuperado debe de ser menor o igual a 2.0%.

Los resultados obtenidos en este punto se desarrollan a detalle en el párrafo 11.7

### **10.8. Precisión intermedia.**

Se evaluó al analizar por triplicado durante dos días, por dos analistas, una muestra homogénea del producto, como indica el método analítico. Para cada día y para cada analista se realizaron moliendas independientes.

Con los datos individuales y globales se calculó el porcentaje cuantificado, el promedio, desviación estándar (D.E.) y coeficiente de variación (C.V.).

Los criterios de aceptación fueron que: coeficiente de variación del por ciento cuantificado para cada uno de los análisis individuales y el global debe de ser menor o igual a 2.0%

Los resultados obtenidos en este punto se desarrollan a detalle en el párrafo 11.7.2

### **10.9. Uniformidad de contenido.**

Se transfirió el contenido de una cápsula a matraz volumétrico de 50mL, y se analizó como se indica en el punto 5.3 para Uniformidad de Contenido.

De los resultados obtenidos se calculó el porcentaje cuantificado, número de datos (n), promedio, desviación estándar (D.E.), el coeficiente de variación (C.V.) y la diferencia absoluta respecto al promedio global del por ciento cuantificado obtenido en la precisión intermedia.

El Criterio de aceptación fue que la diferencia absoluta entre el promedio del porcentaje cuantificado en la Uniformidad de Contenido respecto al promedio global del por ciento cuantificado obtenido en la precisión intermedia debe ser menor ó igual al 2.0%.

Los resultados obtenidos en este punto se desarrollan a detalle en el párrafo 11.8

### **10.10. Robustez y tolerancia.**

Se evaluó al analizar las muestras preparadas para la precisión intermedia (analista 1, día 2), bajo las condiciones indicadas en la Tabla 2 ( Ver Anexo 1).

Se calculó el porcentaje cuantificado promedio en cada una de las condiciones probadas y se comparó con respecto al promedio del por ciento cuantificado en la condición original, obteniéndose la diferencia absoluta.

El criterio de aceptación fue que: la diferencia absoluta del promedio del porcentaje cuantificado obtenido del promedio de las tres muestras analizadas en las condiciones probadas,

respecto al promedio del porcentaje cuantificado de las tres muestras analizadas en la condición original, no debe ser mayor al 2.0

Los resultados obtenidos en este punto se desarrollan a detalle en el párrafo 11.10.

#### **10.11. Estabilidad analítica de la muestra.**

Las muestras preparadas para la precisión intermedia analista 1, día 1 (tiempo cero) se almacenaron a temperatura ambiente a ciclos normales de luz y oscuridad y se analizaron a las 24 y 48 horas.

Se calculó el porcentaje cuantificado promedio a las 24 y 48 horas y se comparó con respecto al promedio del porcentaje cuantificado al tiempo inicial, obteniéndose la diferencia absoluta.

Los criterios de aceptación fueron: la diferencia absoluta del promedio del porcentaje cuantificado a las 24 y 48 horas, respecto al tiempo cero (inicial) debe de ser menor o igual al 2.0%.

Los resultados obtenidos en este punto se desarrollan a detalle en el párrafo 11.9.

#### **10.12. Verificación del Clorhidrato de Metoclopramida SR**

Se prepararon por duplicado el SR como se indica en el punto 5.3 y el SR con el estándar USP (estándar primario) como se indica en el mismo punto. Se calculó el por ciento cuantificado de Clorhidrato de Metoclopramida en cada SR.

El criterio de aceptación fue que el por ciento cuantificado de Metoclopramida clorhidrato en los dos SR preparados debe encontrarse entre 98.0 y 102.0 %.

Los resultados obtenidos en este punto se desarrollan a detalle en el párrafo 11.10.1

#### **10.13. Identificación del Clorhidrato de Metoclopramida**

A partir de la SR y SMC1, preparadas en la precisión intermedia Analista 1 Día 1, se preparo una mezcla 1:1 de la SR y la SMC1.

Se calculo la relación de los tiempos de retención Rr de cada SMC1 respecto a la inyección inmediata anterior de SR. Además se calculó el ancho de los picos medido a la mitad de la altura de cada SR-SMC1 y comparar con el ancho del pico medido a la mitad de la altura de la inyección inmediata anterior de SR.

Los criterios de aceptación fueron:

- a) el tiempo de retención relativo debe de encontrarse entre 0.98 y 1.02
- b) el ancho de los picos de Clorhidrato de Metoclopramida en la SM con respecto al de la SR, no difiere en más del 10%.

Los resultados obtenidos en este punto se desarrollan a detalle en el párrafo 11.10.2

## 11. Resultados y análisis de resultados (validación del método):

### 11.1. Especificidad.

#### 11.1.1. Excipientes.

Los excipientes presentes en la formulación, no interfieren en la cuantificación de Clorhidrato de Metoclopramida. El método es específico a los excipientes presentes en la formulación.

#### 11.1.2. Productos de degradación.

En las muestras sometidas a condiciones de degradación se observa que los productos de degradación de la formulación no interfieren en la cuantificación del compuesto de interés. El análisis espectral y de pureza muestran que todos los picos de Clorhidrato de Metoclopramida son puros. Al comparar el espectro del pico obtenido de la muestra con el obtenido en el pico del estándar se comprueba que el pico de la muestra es efectivamente Metoclopramida puesto que la diferencia entre ambos es despreciable. La degradación obtenida en todos los casos caen en el intervalo del 10 al 20%.

El método es específico para la valoración de Metoclopramida clorhidrato, en presencia de productos de degradación, por lo que este método puede ser utilizado como indicador de estabilidad.

### CONDICIONES DE DEGRADACIÓN

Identificación	Condiciones
1	3.0mL de HCl concentrado por 45hrs a 45°C
2	10.0mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> concentrado por 65hrs a 45°C
3	Someter a cámara de luz ultravioleta durante una hora.

### POR CIENTO CUANTIFICADO

DEGRADACIÓN	POR CIENTO DE Metoclopramida CLORHIDRATO CUANTIFICADO
ÁCIDA (1)	88.39
	87.93
OXIDATIVA (2)	81.08
	79.30
ULTRAVIOLETA (3)	87.46
	88.67

### 11.2. Linealidad del sistema

En la siguiente tabla se muestran los datos con los que se realizó el análisis de regresión lineal para las sustancias relacionadas y la valoración, se obtuvieron los siguientes resultados:

- El coeficiente de determinación ( $r^2$ ) es mayor a 0.98.
- La ordenada relativa se encuentra entre -0.02 y 0.02
- El intervalo de confianza al 95% de la pendiente no incluye al cero.
- El coeficiente de variación del factor respuesta no es mayor a 1.5 %.

También se muestran las gráficas correspondientes, en donde se observa que existe una relación lineal entre los mg/mL de Clorhidrato de Metoclopramida y la respuesta (Área). También se presenta la gráfica de residuales donde se demuestra que no hay ninguna tendencia.

El sistema es lineal en el intervalo del 70 a 130% de la concentración establecida de Clorhidrato de Metoclopramida.

#### A. RESPUESTA EN CADA NIVEL Y PRECISIÓN DEL FACTOR RESPUESTA

NIVEL %	CONCENTRACIÓN mg/mL	RESPUESTA AREA	FACTOR RESPUESTA
68.0	0.0272	1545515	56820404
	0.0272	1547969	56910625
	0.0272	1549893	56981360
84.0	0.0336	1940855	57763542
	0.0336	1922929	57230030
	0.0336	1943055	57829018
100.0	0.0400	2326721	58168025
	0.0400	2308074	57701838
	0.0400	2316210	57905250
112.0	0.0448	2622327	58534074
	0.0448	2580009	57589487
	0.0448	2597826	57987188
128.0	0.0512	2951430	57645117
	0.0512	2937283	57368809
	0.0512	2972457	58055801
		n =	15
		PROMEDIO =	57632704.39
		D. E. =	4.91E+05
		C.V. =	0.9

#### B. ECUACIÓN DE LA RECTA

$y =$  58733180.4240  
 $r^2 =$  0.9991  
 $-40901.1815$

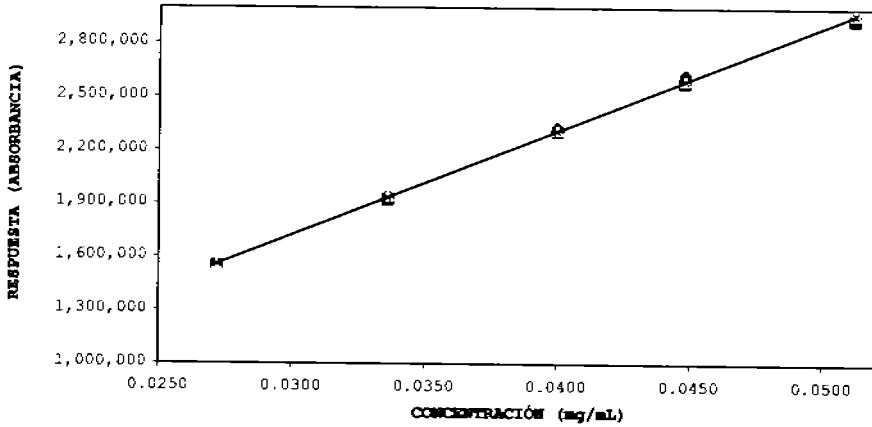
#### C. INTERVALO DE CONFIANZA AL 95 % $gI = 13$ PARA LA ORDENADA AL ORIGEN Y LA PENDIENTE

ORDENADA AL ORIGEN

PENDIENTE

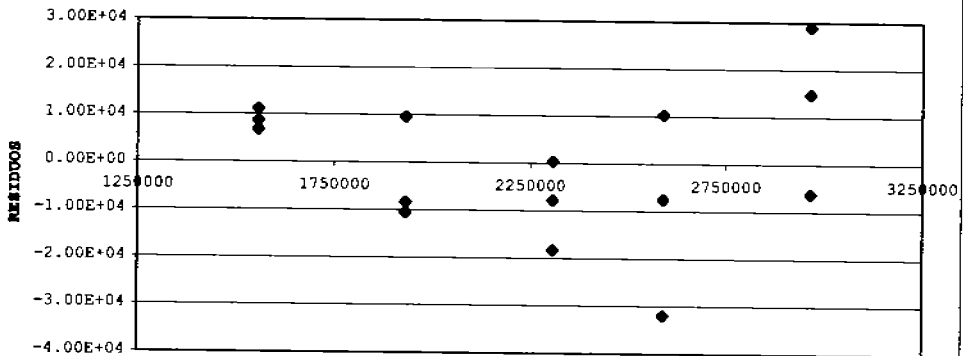
Límite Superior = 1072.9188 59776210  
 Límite Inferior = -82875.2817 57690150

LINEALIDAD DEL SISTEMA



◆ REPLICA 1    ■ REPLICA 2    ● REPLICA 3    —\*— PREDICCIÓN

GRÁFICA DE RESIDUALES



PROMOSTICO PARA Y

**11.3. Precisión del sistema.**

A continuación se muestran las respuestas obtenidas en las seis soluciones. El coeficiente de variación es menor a 1.5%. El sistema es preciso para la valoración de Clorhidrato de Metoclopramida.

MUESTRA	RESPUESTA (AREA)
1	2325948.0
2	2315007.5
3	2307827.5
4	2307696.5
5	2303378.0
6	2294921.5
n =	6
PROMEDIO =	2309129.83
D.E. =	10546.17
C.V. =	0.46

**11.4. Adecuabilidad del sistema.**

En seguida se muestran las respuestas obtenidas en las cinco inyecciones. El coeficiente de variación es menor a 1.5%. El sistema es adecuado para la valoración de Clorhidrato de Metoclopramida.

MUESTRA	RESPUESTA (AREA)
1	2271342.0
2	2281532.0
3	2294537.0
4	2290342.0
5	2283976.0
n =	5
PROMEDIO =	2284345.80
D.E. =	8901.80
C.V. =	0.39

**11.5. Linealidad del método.**

Ahora se muestran los datos con los que se realizó el análisis de regresión lineal, se obtuvieron los siguientes resultados:

- El coeficiente de determinación ( $r^2$ ) es mayor a 0.98.
- El coeficiente de variación para la regresión es menor del 2.0%
- El intervalo de confianza al 95% del porcentaje recuperado global cae dentro del 98.0 y 102.0%.
- El coeficiente de variación es menor del 2.0%

- El intervalo de confianza al 95% para la pendiente incluye al uno.
- El promedio del por ciento recuperado por nivel se encuentra entre 98.0 y 102.0%
- El promedio del por ciento recuperado global se encuentra entre 98.0 y 102.0%
- La pendiente relativa esta en el intervalo  $1 \pm 0.2\%$ .
- La ordenada al origen relativa se encuentra en el intervalo de  $-0.2$  a  $0.2$ .

Además se muestran las gráficas correspondientes, en donde se observa que existe una relación lineal entre los mg adicionados de Clorhidrato de Metoclopramida y los mg recuperados. También se presenta la gráfica de residuales donde se demuestra que no hay ninguna tendencia.

El método es lineal en el intervalo del 70 a 130% de la cantidad establecida de Clorhidrato de Metoclopramida.

**A. mg RECUPERADOS EN CADA NIVEL**

NIVEL %	mg ADICIONADOS	mg RECUPERADOS
70.0	28.000	28.365
	28.000	28.087
	28.000	28.118
100.0	40.000	40.085
	40.000	40.310
	40.000	40.159
130.0	52.000	52.515
	52.000	52.343
	52.000	52.663

**B. ECUACION DE LA RECTA.**

$$y = 1.0369x + -1.2934$$

$$r^2 = 0.9998$$

$$C. V. = 0.4$$

**C. ORDENADA AL ORIGEN RELATIVA (A0) Y PENDIENTE RELATIVA (Br)**

**ORDENADA AL ORIGEN RELATIVA**

-0.0058

**PENDIENTE RELATIVA**

1.006

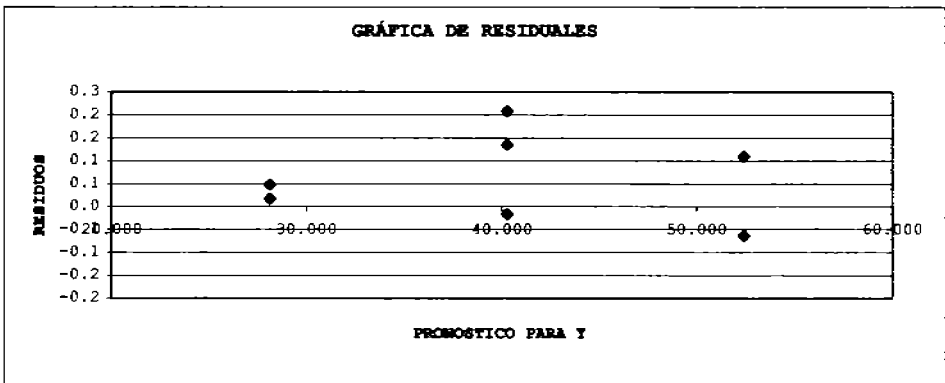
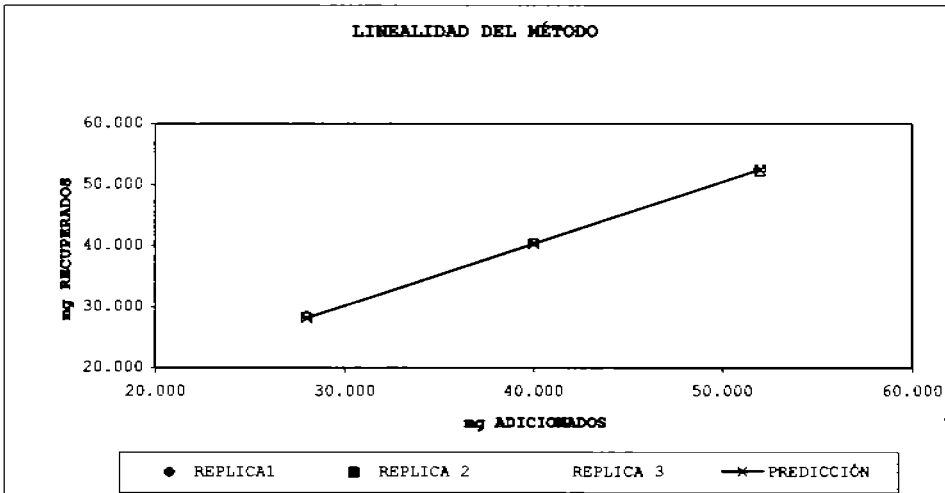
**D. PORCENTAJE RECUPERADO EN CADA NIVEL**

NIVEL %	70.0	100.0	130.0
<b>RÉPLICA</b>	<b>PORCENTAJE RECUPERADO</b>		
1	101.304	100.213	100.990
2	100.311	100.775	100.660
3	100.421	100.398	101.275
n =	3	3	3
PROMEDIO =	100.7	100.5	101.0
D. E. =	5.44E-01	2.87E-01	3.08E-01
C. V. =	0.5	0.3	0.3

n =	9
PROMEDIO =	100.7
D. E. =	4.10E-01
C. V. =	0.4

E. INTERVALO DE CONFIANZA AL 95%,  $g=8$  PARA EL PORCENTAJE RECUPERADO

Límite Superior = 101.0%  
 Límite Inferior = 100.4%





### 11.6. Exactitud del método.

Se muestran los porcentajes recuperados en las seis réplicas al 100%, los cuales se encuentran entre 98.0 y 102.0 %. El método es exacto.

#### 1. ENTRADA DE DATOS

IDENTIFICACIÓN	mg/mL	mg/mL
MUESTRA	ADICIONADOS	RECUPERADOS
E1	40.000	40.0809
E2	40.000	40.1688
E3	40.000	40.1568
E4	40.000	40.0344
E5	40.000	40.3032
E6	40.000	40.1040

#### 2. EXACTITUD DEL MÉTODO

$t_{0.975, n-1} =$	2.571
--------------------	-------

#### A. POR CIENTO RECUPERADO AL NIVEL DE 100 %

MUESTRA	mg/mL	mg/mL	POR CIENTO
	ADICIONADOS	RECUPERADOS	RECUPERADO
1	40.000	40.081	100.202
2	40.000	40.169	100.422
3	40.000	40.157	100.392
4	40.000	40.034	100.086
5	40.000	40.303	100.758
6	40.000	40.104	100.260
		n =	6
		PROMEDIO =	100.4
		D.E. =	2.34E-01
		C.V. =	0.2

#### B. INTERVALO DE CONFIANZA AL 95%, $gI = 5$ PARA EL POR CIENTO RECUPERADO AL 100 %

LÍMITE SUPERIOR =	100.6	%
LÍMITE INFERIOR =	100.1	%

### 11.7. Precisión del método.

#### 11.7.1. Repetibilidad.

En los resultados del punto 11.6 se muestran los promedios del porcentaje recuperado en las muestras. El coeficiente de variación del por ciento recuperado es menor al 2.0%. El método es repetible.

#### 11.7.2. Precisión intermedia.

Se muestran los porcentajes cuantificados y el coeficiente de variación de los análisis individuales y el global. El coeficiente de variación del porcentaje cuantificado para los análisis individuales y global es menor o igual al 2.0%

	CANTIDAD RECOBRADA (mcg/mL)			
	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 1	DÍA 2
	39.3090	40.1324	41.2495	40.2022
	39.6547	39.2756	41.1087	39.3863
	39.9483	39.2358	40.6352	39.5865
n =	3	3	3	3
PROMEDIO =	39.64	39.55	41.00	39.73
D.E. =	0.32	0.51	0.32	0.43
C.V. =	0.81	1.28	0.78	1.07
			n =	12
			PROMEDIO =	39.98
			D.E. =	0.71
			C.V. =	1.77

### 11.8. Uniformidad de contenido.

Se muestran los porcentajes cuantificados para cada una de las 10 cápsulas analizadas, el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de las mismas. La diferencia absoluta entre el promedio del porcentaje cuantificado en la Uniformidad de Contenido respecto al promedio global del porcentaje cuantificado obtenido en la precisión intermedia es menor al 2.0%.

	RESPUESTA	CANTIDAD	%
SA1 1	628469.5	32.40	81.00
SA1 2	840005.0	43.31	108.27
SA1 3	760396.0	39.20	98.01
SA1 4	730193.0	37.65	94.12
SA1 5	769086.5	39.65	99.13
SA1 6	824477.0	42.51	106.27
SA1 7	820845.5	42.32	105.80
SA1 8	788786.0	40.67	101.67
SA1 9	780298.5	40.23	100.57
SA1 10	770606.5	39.73	99.32
n		10.00	10.00
Promedio		39.77	99.42
D.E.		3.10	7.76
C.V.		7.80	7.80

**DIFERENCIA ABSOLUTA RESPECTO AL PROMEDIO GLOBAL EN PRECISIÓN INTERMEDIA**

Promedio Uniformidad de contenido	39.766
Promedio Precisión intermedia	39.977
Diferencia absoluta	0.211

**11.9. Estabilidad analítica de la muestra.**

Se presentan los promedios del porcentaje cuantificado a las 24 y 48 horas y se observa que su diferencia absoluta respecto al por ciento cuantificado en el análisis inicial no es mayor al 2.0%. Las muestras son estables al menos 48 horas después de haber sido preparadas y almacenadas a temperatura ambiente a ciclos normales de luz y oscuridad.

CONDICIÓN	TIEMPO	PROMEDIO DEL POR CIENTO CUANTIFICADO	DIFERENCIA ABSOLUTA RESPECTO A INICIAL
INICIAL	INICIAL	99.093	—
TEMPERATURA AMBIENTE	24 HORAS	97.097	2
TEMPERATURA AMBIENTE	48 HORAS	99.844	0.8

**11.10. Robustez y tolerancia.**

Se indican los promedios de los por cientos cuantificados en cada una de las condiciones, en ella se observa que la diferencia absoluta del promedio de las condiciones probadas, respecto a la condición original, no es mayor al 2.0% para la condición 2, 3 y 4. El sistema es tolerante a cambios de pH entre 6.4 y 6.6 en la fase móvil. El sistema es tolerante a un aumento y un descenso (3%) en la proporción de acetonitrilo en la fase móvil.

CONDICIÓN	PROMEDIO DEL POR CIENTO CUANTIFICADO	DIFERENCIA ABSOLUTA RESPECTO A ORIGINAL
1*	98.900	—
2	99.300	0.4
3	99.900	1.0
4	100.000	1.1

**11.1. Verificación del clorhidrato de Metoclopramida SR.**

Se exhiben los por cientos cuantificados en las SR donde se observa que se encuentran entre 98.0 y 102.0%. Con lo anterior se concluye que es apropiado el uso del estándar secundario para cuantificar el principio activo en este sistema cromatográfico.

MUESTRA	POR CIENTO CUANTIFICADO
1	98.886
2	100.584
n =	2
PROMEDIO =	99.74

### 11.2. Identificación de Clorhidrato de Metoclopramida.

Se presenta el tiempo de retención relativo (Rr) obtenido y la comparación del ancho de los anchos de los picos del Clorhidrato de Metoclopramida, observándose que el Rr se encuentra entre 0.98 y 1.02% y la diferencia de los anchos de pico del SR y SM no es mayor a 10.0%. De acuerdo a lo anterior se concluye que el método es apropiado para identificar Clorhidrato de Metoclopramida en el producto.

MUESTRA	Tr (min)	W (mm)
SR	7.997	3
SM	7.993	3
Tiempo de retención relativo (Rr) = 1.000458716 Diferencia relativa entre W de SR y W de SM = 0%		

Donde:

Tr= tiempo de retención

W = ancho de pico a la mitad de la altura

## 12. Conclusiones:

- ✦ Se establecieron las condiciones experimentales necesarias para la liberación y cuantificación del clorhidrato de Metoclopramida en cápsulas de liberación modificada, donde resultó fundamental la molienda del contenido de las cápsulas, así como también el cambio de polaridad efectuada al modificar la solución de ácido fosfórico 0.01M, por metanol como disolvente de extracción y el tiempo de sonicado. No es necesaria la agitación con vórtex.
- ✦ El tratamiento de la muestra es sencillo en términos de manipulación y tiempo de ejecución.
- ✦ El método es aplicable para hacer estudios de uniformidad de dosis por uniformidad de contenido.
- ✦ El método es específico para excipientes como para productos de degradación producidos al someter la muestra a degradación por oxidación con peróxido, por oxidación por UV y por acidez; se comprobó que la muestra es mucho más estable en condiciones alcalinas, que ácidas, pues que en estas primeras condiciones las degradaciones conseguidas fueron despreciables.
- ✦ Nuestro pico de elusión es totalmente puro, y no hay ninguna sustancia que coeluya con el compuesto de interés.
- ✦ El pico de interés es efectivamente clorhidrato de Metoclopramida pues al comparar su espectro al UV con el de un estándar, presenta los mismos máximos y mínimos.
- ✦ El sistema montado es adecuado pues cumple con los parámetros señalados como criterios de aceptación de una corrida analítica. (Ver punto 6.2.2)
- ✦ El sistema es lineal en un intervalo del 70 al 130% de la concentración de Clorhidrato de Metoclopramida.
- ✦ El sistema es preciso y adecuado para la valoración de Clorhidrato de Metoclopramida.
- ✦ El método para la valoración es lineal en un intervalo del 70 al 130% de la cantidad de Clorhidrato de Metoclopramida.
- ✦ El método es exacto y repetible al 100% para la valoración.
- ✦ El método es preciso para la valoración.
- ✦ Las muestras son estables al menos 48 horas después de haber sido preparadas y almacenadas a temperatura ambiente en condiciones normales de luz y oscuridad.
- ✦ El sistema es tolerante a cambios de pH entre 6.4 y 6.6 de la Solución Reguladora y al aumento y disminución (3%) en la proporción de acetonitrilo en la fase móvil. El sistema es robusto a un cambio de la columna, por otra de las mismas características pero de mayor longitud.
- ✦ El método es adecuado para llevar a cabo identificación y valoración de Clorhidrato de Metoclopramida como pruebas de producto terminado y para realizar estudios de estabilidad.

**Referencias:**

- 1) Valentín Islas, Juan F. Sánchez 1992. *Breve historia de la farmacia en México y en el mundo*. Asociación Farmacéutica Mexicana. A.C.
- 2) Albibi R and McCallum RW (1983) *Metoclopramide: pharmacology and clinical application*. *Ann Intern Med* 98: 86-95
- 3) Pinder RM, Brogden RN, Sawyer PR, Speight TM, Avery GS. *Metoclopramide: a review of its pharmacological properties and clinical use*. *Drugs* 1976;12:81-131.
- 4) Florey Klaus, Davide Pitre and Riccardo Stradi. 1987 *Analytical Profiles of Drugs Substances*. Academic Press Inc., USA, Vol.16
- 5) *The Merck index* 11<sup>th</sup> edition. 1989 USA.
- 6) <http://www.facmed.unam.mx/bmnd/plm/mex/productos/7968.htm>
- 7) *Physicians Desk Reference* 56<sup>th</sup> Ed. Medical economics, New York, 2002.
- 8) Goodman and Gilman. 1996. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, 9<sup>o</sup> ed., McGraw Hill Interamericana, México DF.
- 9) Bertram . Katzung, 2001. *Basic and clinical Pharmacology* 8<sup>th</sup> ed. Lange Medical Books, McGraw Hill USA.
- 10) Mary J. Mycek, Richard A. Harvey, Pamela C. Champe, 2000. *Pharmacology* 2<sup>o</sup> ed. Lippincott Williams and Wilkins
- 11) Burriel Martí, F. Lucena Conde, F. Arribas Jimeno, S. Hernández Méndez J. 1998. *Química Analítica Cuantitativa*, 16<sup>a</sup> ed Paraninfo, Madrid, España
- 12) Douglas A. Skoog, James J. Leary, 1999. *Análisis Instrumental* 4<sup>a</sup> ed. McGraw Hill Interamericana México.
- 13) A. Pryde, M.T. Gilbert, 1979. *Applications of High Performance Liquid Chromatography*. John Wiley and sons, New York.
- 14) Wickham Dave, 1993. *A practical Guide to HPLC Detection*. Academic Press.
- 15) Gadwim W. Fong, Stanley K. Lam, 1991. *HPLC in the Pharmaceutical Industry*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- 16) Thomas M. Vickrey, 1983. *Liquid Chromatography Detectors*. Marcel Dekker, New York
- 17) Kiyoshi Tsuji, Walter Morozowich, 1978. *GLC and HPLC Determination of therapeutics Agents Part 1*. Marcel Dekker Inc. New York
- 18) Jonsson Jan Ake. 1987 *Chromatography Theory and Basic Principles*. Marcel Dekker, New York.
- 19) Snyder Lloyd R. 1988. *Practical HPLC Method Development*. John Wiley and Sons, USA.
- 20) Harvey M.C. and Stearns D., 1984. *Liquid Chromatography in environmental Analysis*. Humana Press, New Jersey.
- 21) Revindranath B., 1989. *Principles and practice of chromatography*. John Wiley and Sons.
- 22) Engelhardt, H. 1986. *Practice of High Performance Liquid Chromatography*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- 23) Martin, M., Kraak, J.C. and Guiochon, G. 1978. *Instrumentation for high performance liquid chromatography*, J.F.K. Huber ed, Elsevier, Amsterdam.
- 24) Henk A. Claessens. 1999. *Characterization of stationary phases for reversed phase liquid chromatography: column testing, classification and chemical stability*. Eindhoven: Technische Universiteit Eindhoven.
- 25) *British Pharmacopoeia*, Her Majesty's Stationery Office, London, 2002
- 26) *The United States Pharmacopoeia XXVII Revision*, the Nation Formulary XXII, Rockville USP convention.
- 27) *FEUM 7<sup>o</sup> ed*, México 2000, Secretaría de salud.
- 28) *Real Farmacopea Española* 2<sup>a</sup> ed. 2002. Publicada por el Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid.
- 29) Kasim Et al. *Journal of Pharmaceutics and Biofarmaceutics*. 55 (2003) 339-344.

- 30) M.S. Suleiman, N.M. Najib, Y.M. Sayed, A. Badwan, *Analyst* 114 (1989) 365-368.
- 31) Mahasen A. Radwan. *Anal Lett.* 31 (1998) 2397-2410.
- 32) N. H. Foda, *Anal Lett.* 27 (1994) 549.
- 33) H. D. Revanasiddappa, B. Manjo. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 631-637.
- 34) A. El-Gindy. *J. Pharm. Biomed Anal.* 32 (2003) 277-286.
- 35) Alaa S. Amin and Gamal H. Ragab. *Analytical Sciences* 19 (2003) 744-751.
- 36) F.M. Abdel Gawad, N.M. El-Guindi. *Anal Lett.* 29 (1995) 1437.
- 37) M. R. Herrero, A. M. Romoro, J.M. Calatayud. *Talanta* 47 (1998) 223.
- 38) B.A. Moussa. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000)1045-1055.
- 39) M. Buna, J.J. Aaron, P. Prognon, G. Mahuzier. *Analyst* 121 (1996) 1551.
- 40) G.A.E. Mostafa. *J. Pharm. Biomed Anal.* 31 (2003) 515-521.
- 41) Douglas C. Montgomery, 1991. Design and analysis of experiments 3<sup>a</sup> ed. John Wiley and Sons.
- 42) Robert O. Kuehl, 2001. Diseño de experimentos 2<sup>a</sup> ed. International Thomson Editores México.
- 43) Roger G. Petersen. Design and analysis of experiments Marcel Dekker, Inc. New York.
- 44) Weed, D. H. Una aproximación Estadísticamente integrada a la Validación del Método Analítico. *Pharmaceutical Technology*, 4(1): 10-19.
- 45) ICH. November, 1996. Guidance for Industry Validation of Analytical Procedures.
- 46) Guía de validación de Métodos Analíticos, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C, edición 2002