



POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA
RESOLUCIÓN PARA CUANTIFICAR TESTOSTERONA E IMPUREZAS EN
SUSPENSIÓN PARENTERAL DE LIBERACIÓN PROLONGADA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTAN:

CARMONA GONZÁLEZ JAVIER IGNACIO

CRESPO HERNÁNDEZ OMAR

DIRECTOR:

QBP JUAN RAMÓN MARTÍNEZ DE LEÓN

ASESOR:

QFB JORGE ANTONIO CARLIN HERNÁNDEZ

MÉXICO. DF

MAYO 2008



UNIDAD EN LA DIVERSIDAD:
ZARAGOZA FRENTE AL SIGLO XXI



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por sus bendiciones y por permitirme seguir en esta vida cumpliendo sueños y metas, como el que ahora estoy realizando.

A la FES ZARAGOZA y al Centro A.F. de Estudios Tecnológicos S.A. por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo, en especial al Q.B.P. Juan Ramón Martínez de León.

A mis padres por ser los pilares más importantes en mi vida, por estar siempre conmigo brindándome su amor y apoyo.

A mis hermanos a los que tanto quiero, ya que con sus consejos me ayudaron a salir adelante.

A mis compañeros y amigos en especial a Sergio por su apoyo brindado.

Omar

DEDICATORIA.

A mis padres.

Quienes han soportado infinidad de contratiempos y que sin reproche alguno me han brindado su apoyo, amor y bendiciones. Este trabajo es para ustedes y por ustedes, quienes a pesar de no comprender muy bien a lo que me dedico me han apoyado y me alientan a ser mejor persona y profesionalista.

Nunca podré compensar todo el amor, desvelos, esfuerzos y amor brindado en todos mis proyectos.

Los amo.

Javier

AGRADECIMIENTOS.

- ❖ *A mi padre por tantos sacrificios hechos para que yo pudiera conseguir mis sueños (nunca te defraudare, gracias por seguir siendo mi héroe), a mi madre por ser mi fuerza y apoyo incondicional (gracias por consentirme tanto), a mi hermana por enseñarme tantas cosas y por abogar por mí en todo momento (te quiero mucho Sandy).*

- ❖ *Al Centro A.F. de Estudios Tecnológicos por darme la oportunidad de desarrollarme como profesionista, en especial a Juan Ramón Martínez por la confianza, paciencia, apoyo y consejos brindados en todo momento; a Myriam Cortes gracias por la oportunidad y por creer en mí.*

- ❖ *A los profesores de la FES Zaragoza por sus sabios consejos en especial a los profesores Idalia, Patricia Demare, Carlín, Magín, Leticia Huerta y Leticia Juárez.*

- ❖ *A mis amigos: Pepe (Pig), Cesar (Lobo), Iliana, Carlos, Loana, Elizabeth (Gorda), Ángeles (Comadre), Oscar Reboollar y a la Familia Juárez López por soportarme y quererme como soy (gracias por su amistad).*

- ❖ *A todos mis compañeros de trabajo en especial a Vidal, Fidel, Eder, Blanca, Víctor, Zulema, Rey y Jasha por hacer genial mis horas de trabajo.*

- ❖ *Al amor de mi vida, Lorena recuerda que la razón principal de mi intento constante por ser mejor día con día es el gran amor que siento por ti. Gracias por estar siempre a mi lado Princesa.*

Javier

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	7
2. Generalidades	9
3. Planteamiento del problema	26
4. Objetivo	27
5. Hipótesis	28
6. Metodología	29
7. Desarrollo experimental	30
8. Validación del Método Analítico de Valoración	50
9. Validación del Método Analítico de Impurezas	57
10. Resultados del Método Analítico de Valoración	63
11. Resultados del Método Analítico de Cuantificación de Impurezas	74
12. Conclusiones	85
.....	
13. Bibliografía.....	87

1. INTRODUCCIÓN.

Hoy en día en el control analítico de los medicamentos se requiere del desarrollo de métodos analíticos apropiados que cumplan con ciertos parámetros establecidos para su aceptación, una de las partes importantes con las que debe cumplir el método desde el punto de vista regulatorio son los requisitos de Validación.

Es por ello que la validación debe considerarse en cualquier procedimiento analítico; siendo su esencia el demostrar que el procedimiento es conveniente para el propósito destinado.

Debido a esto es necesario el desarrollo de metodologías analíticas que sean capaces de lograr una cuantificación confiable del activo como de sus impurezas tal como lo establece la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C., Edición 2002.¹ El papel entonces del desarrollo analítico en este aspecto es clave, encargándose de la implementación de estrategias metodológicas que sirvan a la elaboración, optimización y validación de métodos analíticos que reflejen una mejora y ahorro tanto en recursos como en productividad.

Debido a que por lo regular las impurezas se presentan en cantidades del orden de microgramos por mililitro; es necesaria la utilización de técnicas que permitan alcanzar este grado de sensibilidad y eliminar las interferencias que puedan entorpecer este proceso de cuantificación.

El presente trabajo se encargo de explorar las alternativas que se pueden utilizar para cuantificar Testosterona y sus impurezas (sustancias relacionadas y productos de degradación) tanto en materia prima como en suspensión parenteral de liberación prolongada, y así encontrar aquella que cumpliera de forma rápida y confiable con el objetivo planteado.

Para el desarrollo de este método se utilizó como base un método validado en el Centro A.F. de Estudios Tecnológicos S.A. (CAFET) por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) utilizado para la valoración de Testosterona en una forma farmacéutica de liberación controlada.

El método desarrollado en el presente trabajo consiste en un análisis por CLAR que utiliza un equipo isocrático y es más accesible que los métodos farmacopéicos reportados. Se incluyen dentro de éste trabajo las etapas de desarrollo e implementación del sistema cromatográfico, procesamiento de muestra y validación del método.

La falta de una norma que regule los métodos de cuantificación de impurezas permite basarse en las guías elaboradas por el Comité Internacional de Harmonización (ICH)^{2,3,4,5,6} en la cual se describen estrategias a seguir para el desarrollo de este tipo de métodos.

Los métodos farmacopéicos reportados para impurezas de Testosterona^{7,8} se basan en la cuantificación de impurezas del tipo asociadas al fármaco (sustancias relacionadas); dejando a un lado las posibles impurezas generadas a partir del proceso de fabricación de un medicamento (productos de degradación). Debido a esto sobresale la importancia de encontrar un método capaz de abarcar este tipo de impurezas y cuantificar el activo.

Cabe mencionar que para la valoración de Testosterona como materia prima y producto existen métodos farmacopéicos^{7,8,9} (solo en la referencia 9 reporta un método para suspensión de Testosterona, en las demás son aplicados a valoración de materia prima) que utilizan la determinación por espectrofotometría al UV; para los fines del presente trabajo se tiene la necesidad de un método capaz de cuantificar Testosterona y sus impurezas con mayor exactitud y precisión.

2. GENERALIDADES.

2.1. Cromatografía.

Se define Cromatografía como el proceso de separación de sustancias que se encuentran en una mezcla, por medio de un proceso de migración diferencial. Los componentes son transportados por una fase móvil y retenidos selectivamente por una fase estacionaria.¹⁰

Esta técnica se desarrolló a principios de siglo XX, con lo que se logró la separación de sustancias que se encontraban en una mezcla.¹¹

El nombre cromatografía (*kromos*: color, *graphos*: descripción) se debe a que las primeras separaciones se llevaron a cabo con pigmentos de plantas, los cuales se observaban como bandas coloridas. En general, la cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil (gas o líquido), y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido.¹²

2.1.1. División de la Cromatografía.

La cromatografía puede dividirse en las siguientes áreas generales: cromatografía de adsorción, de exclusión, de reparto y de intercambio iónico. Estas técnicas no deben confundirse con las operaciones de laboratorio; por ejemplo, el reparto puede hacerse sobre papel (cromatografía en papel), en columna (cromatografía de reparto, de fase inversa y cromatografía de gases) o sobre una capa fina (cromatografía en capa fina).¹¹

El fundamento es el mismo, el reparto, pero la forma experimental en que se realiza es diferente. Además debe considerarse el tipo de fases presentes. En todos los procesos cromatográficos hay una fase móvil que pasa sobre una fase estacionaria. El soluto se distribuye entre las dos

fases y la razón particular de esta distribución es la base del sistema cromatográfico.¹³

De igual manera se puede dividir a la cromatografía de acuerdo al estado físico de la fase móvil y la fase estacionaria, y por su mecanismo de retención tal como se describe en las tablas 1 y 2.^{11,12}

Tabla 1. División de la cromatografía de acuerdo al tipo de fase móvil.

Nombre	Fase Móvil	Fase Estacionaria
Cromatografía Gas-Líquido	Gas	Líquido
Cromatografía Gas-Sólido	Gas	Sólido
Cromatografía Líquido-Líquido	Líquido	Líquido
Cromatografía Líquido-Sólido	Líquido	Sólido
Cromatografía Fase Reversa	Líquido	Sólido

Tabla 2. División de la cromatografía de acuerdo al mecanismo de retención.

Nombre	Mecanismo de retención
Cromatografía de Adsorción	Adsorción a un sólido
Cromatografía de Partición	Equilibrios de partición en fluidos
Cromatografía de Intercambio iónico	Intercambio iónico

2.1.2. Proceso de separación.

Durante el desarrollo de un cromatograma (representación física de la separación) la fase móvil arrastra las moléculas de la muestra a través del lecho de la fase estacionaria. Durante el trayecto las distintas moléculas de la muestra son retardadas por la fase estacionaria en función de la interacción entre los componentes de la muestra y las fases estacionaria y móvil. Estas interacciones son selectivas, lo cual significa que para un determinado sistema fase estacionaria-fase móvil serán diferentes para cada componente de la muestra.¹⁴

a) Factores que afectan el proceso de separación:

- Solubilidad.
- pH de la fase móvil.
- Pureza de los disolventes.
- Desgasificación y temperatura.

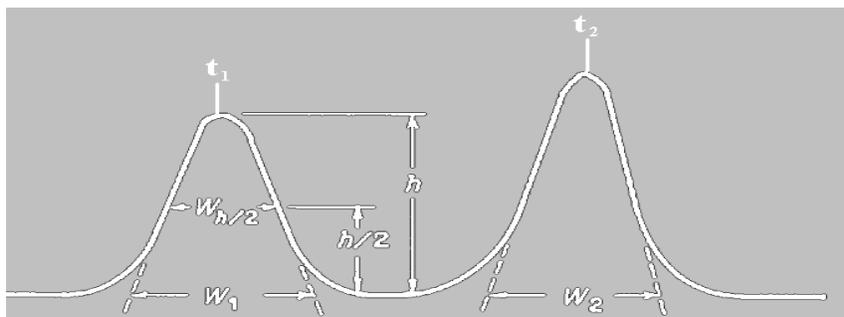
b) Factores que afectan la eficiencia de una columna:

- Longitud de la columna
- Diámetro de la columna
- Tamaño de partículas del relleno
- Naturaleza de las fases
- Cantidad de fase estacionaria
- Temperatura de la columna
- Velocidad del gas portador
- Cantidad de muestra inyectada
- Material del cual fue elaborada la columna
- Empaquetado de la columna

2.2. Parámetros Cromatográficos.^{10,11,12,13,14}

Estos parámetros definen en forma matemática las características del proceso cromatográfico y son obtenidos a través del Cromatograma utilizando: tiempos de retención, ancho de pico y altura de pico; estos factores se representan en la figura 1.

Figura 1: Esquema representativo de un cromatograma. ⁽¹²⁾



Se describen a continuación cada uno de los parámetros cromatográficos:

Tiempo muerto (t_0). Tiempo que tarda en eluir un compuesto que no es retenido en la fase estacionaria, que es el mismo que tarda la fase móvil en salir de la columna. Se puede calcular inyectando un solvente más débil que la fase móvil (o un compuesto que no sea retenido, en fase reversa se usa uracilo) y calculando su tiempo de retención.

Tiempo de retención (t_r). Es el tiempo entre el inicio de la inyección y la absorbancia máxima del pico del compuesto de interés.

$$t_r = t_0(1+k')$$

Donde:

k' = factor de capacidad.

Factor de capacidad (k'). Es la relación entre la cantidad de sustancia que se encuentra entre la fase estacionaria y la fase móvil, de alguna manera este valor indica el tiempo durante el cual puede retenerse cada componente en la columna.

Cuando k' es pequeño (0-1), este factor indica resolución limitante y valores de (2-10) mejoran la resolución.

$$k' = (t_r - t_0) / t_0$$

Resolución (R). Es una medida numérica del grado de separación de dos compuestos, establece la eficiencia del sistema.

$$R = 2(t_2 - t_1) / (w_2 + w_1)$$

Donde:

t_2 y t_1 = tiempos de retención.

w_2 y w_1 = altura de los picos, obtenidos extrapolando los lados de los picos hasta la línea base.

Volumen de retención (V_r). Se le denomina al volumen de fase móvil requerido a eluir una sustancia de la columna.

Retención relativa (α). El factor de separación o retención relativa también llamado selectividad, α describe la posición relativa de dos picos adyacentes. Para su cálculo se utiliza los tiempos de retención corregidos, ya que la separación de los picos depende de la interacción selectiva con la fase estacionaria, es decir el tiempo que permanecen en esta fase, y no el tiempo que emplean en recorrer la columna a la velocidad de la fase móvil.

$$\alpha = (t_2 - t_1) / (t_1 - t_0)$$

Donde:

t_1 y t_2 = tiempos de retención.

Factor de asimetría (T). Es el grado de coqueo o asimetría de los picos, esto se puede observar cuando T es mayor a 1, y también se puede observar el factor de cabeceo cuando T es menor a 1. Se puede ver gráficamente representando en la figura 2.

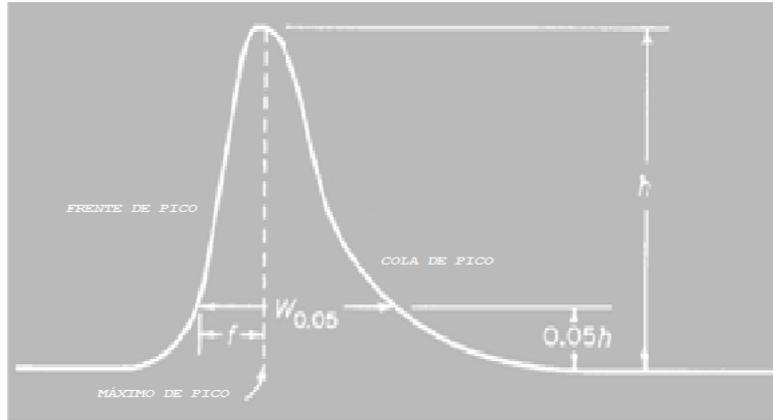
$$T = W_{0.05} / 2f$$

Donde:

$W_{0.05}$ = ancho del pico medida al 5.0% de su altura.

f = ancho del pico medido a partir del inicio del pico hacia la mitad de este a nivel de línea base.

Figura 2. Factor de simetría.⁽¹³⁾



Números de platos. Un plato teórico físicamente es igual a un equilibrio fisicoquímico del analito entre fase móvil y fase estacionaria. Entre mayor número de estos equilibrios hay, el analito se separa más del resto de los componentes de la mezcla. Se puede decir que cuántos más anchos sean los picos menor número de ellos podrán resolverse en el mismo intervalo de tiempo, y por tanto podrán separarse menos componentes de la muestra. En otras palabras, cuanto más puntiagudos sean los picos, mejor es la columna. Establece la separación del compuesto.

$$N = 16 (t_r/W_b)^2$$

El número de platos depende de la longitud de la columna: a mayor longitud de la columna, mayor número de platos.

Altura Equivalente a un Plato Teórico. Es una medida de la eficiencia de la columna que involucra al número de platos teóricos (N) y la longitud de la columna (L)

$$H = L/N$$

2.3. Ecuación de Van Deemter.⁽¹¹⁾

La forma de los picos cromatográficos es influenciada por tres procesos que son representados gráficamente en la figura 3 y son: la difusión de remolino, la difusión longitudinal y la transferencia de masas. Las magnitudes de estos cambios están influenciadas por la velocidad de flujo, el tamaño de partícula del material de empaque, las velocidades de difusión y el grosor de la fase estacionaria.

La ecuación de van Deemter relaciona estos fenómenos con la velocidad lineal de flujo (u) y la altura del plato (H).

$$H = A + (B/u) + Cu$$

Donde:

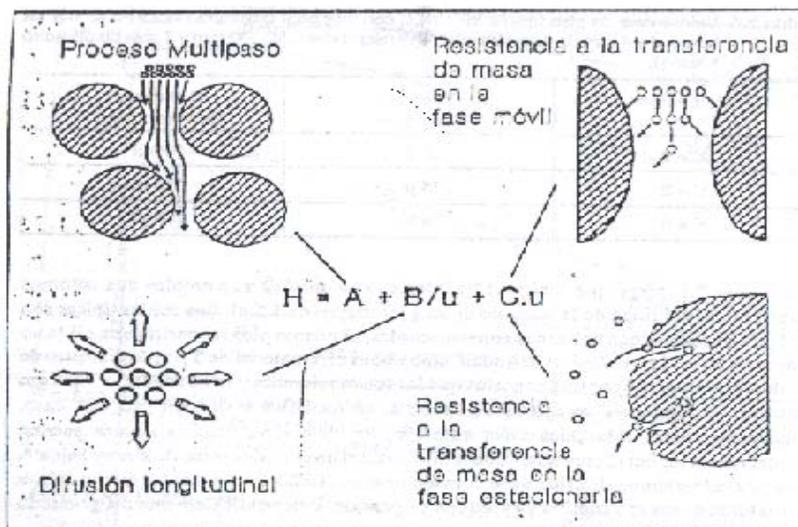
A = Difusión Remolino ó Direcciones de flujo múltiples.

B = Difusión longitudinal.

C = Contribución de masa.

u = Es la velocidad de la fase móvil que pasa por la columna.

Figura 3. Procesos que afectan la forma del pico cromatográfico.



2.4. Equipo utilizado para la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.^{15,16,17,18.}

a) Bombas

El sistema de bombeo impulsa la fase móvil de manera exacta y precisa a través de la columna en la que se separan los componentes de la muestra que han sido introducidos en ella mediante el sistema de inyección.

Estas deben estar construidas con un material inerte a la fase móvil, poder trabajar a presiones elevadas y suministrar flujos adecuados al diámetro de la columna empleada y libre de pulsaciones para no disminuir la sensibilidad de la detección.

b) Inyectores

Es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el flujo de solvente a través del sistema.

c) Detector

En la elección del detector hay que tener en cuenta las características que afectan a la respuesta obtenida, (son el ruido, la deriva, la zona lineal, la selectividad y la sensibilidad).

En la industria existen diferentes tipos de detectores tales como el Electroquímico, de masas, absorción ultravioleta, diodos, fluorescencia, e índice de refracción. Los más utilizados son los de absorción ultravioleta y de diodos.

d) Columnas

En cromatografía la elección del tamaño de poro y el área superficial de empaque están determinados por su aplicación, esto se refiere al tamaño de molécula a separar. Además de la columna donde se efectúa la separación cromatográfica, se pueden emplear otros tipos de columnas auxiliares cuya finalidad es hacer la eficiencia de la columna la cual no disminuya con el uso.

e) Reservorio para disolventes

Los reservorios para fases móviles deben ser de una composición tal que no reaccionen con las fases móviles, a menudo se equipan con un sistema para eliminar los gases disueltos en general oxígeno y nitrógeno que interfieren formando burbujas en la columna y en los sistemas de detección. Estas burbujas provocan ensanchamientos de banda y a menudo interfieren en el funcionamiento del detector.

2.5. Tratamiento de muestras.^{15,18,19,20,21}

La preparación de las muestras es una etapa decisiva en todo método de análisis, en especial en la determinación de microcomponentes (trazas) en donde la matriz que rodea al analito es muy compleja, esto depende de varios factores que se mencionan a continuación:

- a) Propiedades físicas y químicas del analito
- b) Concentración de analito en la muestra
- c) Naturaleza de la matriz en la muestra
- d) Forma en la que se presenta el analito en la muestra
- e) Compatibilidad de los medios de solubilización y extracción con el sistema cromatográfico
- f) Tipo de detector
- g) Compatibilidad con el detector

h) Tratamiento Previo

2.6. Validación de Métodos analíticos.^{5,6}

Es importante destacar que la validez de los métodos analíticos en productos farmacéuticos es ampliamente discutible ya que diferencias entre distintas formas farmacéuticas, hacen necesario validar la metodología para cada producto en particular, razón por la cual una validación queda delimitada a la aplicación del método validado.

La validación del método analítico incluye todos los procedimientos requeridos para demostrar que un método en particular, cumple con la finalidad para la que fue desarrollado, por lo tanto, todo nuevo método analítico debe validarse para demostrar su aplicación.

2.6.1. Criterios de Validación.

Especificidad. Es la capacidad de un método analítico para cuantificar exactamente y específicamente al compuesto de interés en presencia de otras sustancias que pudieran estar presentes.

Linealidad. Es la capacidad del método analítico para obtener resultados de prueba traducidos en una respuesta medible, los cuales sean directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra.

Exactitud. La exactitud de un método analítico es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor real. Se evalúa usando un mínimo de 9 determinaciones sobre un mínimo de 3 niveles de concentración, cubriendo el rango específico (3 concentraciones con 3 réplicas).

Precisión. La precisión de un método analítico, expresa la cercanía o concordancia entre una serie de mediciones individuales, cuando es aplicado a diferentes proporciones de la muestra homogénea, bajo la condición del método.

- **Repetibilidad.** Expresa la precisión del método operando bajo las mismas condiciones en un intervalo de tiempo corto. También se le conoce como precisión intraensayo.

- **Precisión intermedia.** Expresa la precisión del método dentro del mismo laboratorio, producto de variaciones normales dentro de éste tal como diferentes días, analistas y equipos.

- **Reproducibilidad.** Expresa la precisión del método en función de variaciones producto de la ejecución del mismo en diferentes laboratorios (estudios colaborativos).

Límite de detección. Se debe a la mínima concentración de un compuesto en una muestra, el cual puede ser detectado pero no necesariamente cuantificado.

Límite de cuantificación. Es la concentración más baja del compuesto que puede ser cuantificada con una adecuada precisión y exactitud.

Estabilidad. Es una medida de la robustez del método que esta expresada en función de la muestra analítica procesada, permite determinar el tiempo en el cual las características a medir de esta permanecen inalteradas.

Rango. Es el intervalo entre la concentración del analito superior e inferior en la muestra por lo cual este es determinado por el método analítico, es conveniente el nivel de precisión, exactitud y linealidad.

Robustez. Es una medida de la capacidad del método analítico de no ver afectado su desempeño por variaciones deliberadas en el método, esta debe ser considerada durante el desarrollo.

Tolerancia. Es una medida de la capacidad del método analítico de no ver afectado su desempeño por variaciones no deliberadas en el método, esta debe ser considerada durante el desarrollo.

2.7. Monografía de la Testosterona ⁽¹²⁾.

2.7.1. Descripción.

2.7.1.1. Nomenclatura.

17 β -hidroxiandrost-4-en-3-ona; Λ^4 -androst-17 β -ol-3-ona; trans-testosterona.

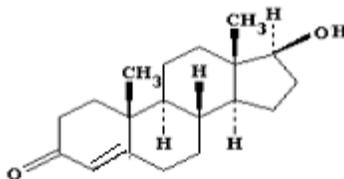
2.7.1.2. Nombres comerciales.

Geno-cristaux Gremy; Malestrone (amps); Orquisteron; Percutacrine Androgenique; Primotest, Primoteston; Sustanton; Mertestate; Testosbase; Virosterona; Virormone; Testril; Testrone; Homosteron; Oreton-F; Teslen.

2.7.1.3. Fórmula condensada.

$C_{19}H_{28}O_2$ P.M. 288.42

2.7.1.4. Fórmula estructural.



2.7.1.5. Punto de fusión

155°C

2.7.1.6. Impurezas especificadas

Impureza A: Androstenediona
Impureza B: Androstenediona ethylenolether)
Impureza C: Epitestosterona
Impureza D: 4-Androstenediol
Impureza E: Testosterona acetato
Impureza F: Androstanolona, Estanolona
Impureza G: Androstadienediona

2.7.1.7. Apariencia.

Cristales blancos o color blanco cremoso ó polvo cristalino.

2.7.1.8. Solubilidad.

Prácticamente insoluble en agua, soluble 1 en 6 de Alcohol deshidratado, 1 en 2 de Cloroformo y 1 en 100 de éter.

2.7.1.9. Descripción.

Principal hormona de los testículos, producida por las células intersticiales.

2.7.1.10. Uso.

Andrógeno, esteroide y anabólico.

2.7.2. Propiedades cristalinas.

2.7.2.1. Síntesis.

Preparado por conversión de otros esteroides tales como el colesterol. El intermediario importante dehidroandrosterona es transformado eficientemente a testosterona por un proceso microbiano.

2.7.2.2. Estabilidad.

La Testosterona es estable como sólido. En solución sufre degradación fotolítica en el anillo principal, y es posible que se degrade cuando se expone a luz ultravioleta o luz fluorescente.

2.7.3. Farmacocinética y farmacodinamia.

La concentración de testosterona se reduce con un periodo de vida media de más de 4 días, alcanzando los valores basales individuales a los cerca de 21 días después de la inyección. En el curso de 20 días se elimina el 90% aproximadamente por vía renal y el resto por las heces. La dosis aplicada se elimina totalmente después de 4 semanas.

2.7.4. Métodos de análisis reportados para testosterona.

2.7.4.1 Análisis elemental.

Porcentaje calculado para cada elemento en la molécula:

	C	H	O
%Calculado	77.95	10.07	11.98

2.7.4.2. Análisis espectrofotométrico.^{7,8,9}

El máximo al Ultravioleta (UV) es aproximadamente de 245 nm que puede ser usado para determinaciones cuantitativas en preparaciones farmacéuticas.

Dentro de este análisis existen métodos farmacopeicos reportados en la British Pharmacopoeia (BP) 2008 y Farmacopea Europea Sexta Edición para valoración de materia prima de Testosterona en los cuales el tratamiento de muestra es muy sencillo al igual que su análisis pero el inconveniente es que este tipo de métodos no proporcionan la exactitud, reproducibilidad y confiabilidad en comparación con una técnica por CLAR.

Existe además un método reportado en la United States Pharmacopoeia 30 para valoración de Testosterona en suspensión que involucra una serie de filtraciones y enjuagues con metanol. Finalmente se lee al UV comparado con una solución de referencia. Este método reportado para suspensión tiene el mismo inconveniente de los anteriores y aunque esta reportado para el producto de interés en este trabajo no sería lo confiable para la cuantificación en un estudio de estabilidad.

2.7.4.4. Análisis cromatográfico por cromatografía en papel.

La determinación cuantitativa y la separación de la testosterona por cromatografía en papel en vehículos aceitosos, donde el papel es impregnado con 30% dietilenglicol monoetil éter (Carbitol) en cloroformo y se desarrolla por 2.5 horas con metilciclohexano saturado con dietilenglicol monoetil éter. Se localizan las manchas de esteroides con luz fluorescente, las manchas son eluidas y reaccionan con ácido hidrazida isonicotínico en metanol conteniendo también ácido clorhídrico. La absorbancia del amarillo de hidrazona es leída a 415 nm.

Un procedimiento similar, usando impregnaciones con propilenglicol, fenilglicol etil éter y metanol (1:1:2) y propilenglicol, fenilglicol

etil éter y heptano (1:1:200) como solvente elutor y 2,4-dinitrofenil hidrazona como reactivo revelador.

2.7.4.5 Análisis cromatográfico por cromatografía en capa fina.

Sistemas cromatográficos para capa fina pueden ser consultados en la tabla 3, en todos los casos se utilizó como sistema de detección luz ultravioleta.

Tabla 3. Sistemas cromatográficos para capa fina. ²³

<i>ABSORBENTE</i>	<i>SISTEMA SOLVENTE</i>	<i>Rf</i>
Sílica gel G impregnada con aceite mineral	50% Ácido acético 50% Etanol	31
Sílica gel	Benceno:acetona (4:1)	26
Sílica gel	Benceno:Metanol (9:1)	-
Sílica gel	Éter de petróleo, benceno, ácido acético, agua (67:33:85:35)	-
Alúmina	Benceno:acetona (4:1)	-
Sílica gel impregnada con aceite de maíz	Metanol: agua (9:1)	-

2.7.4.6. Análisis cromatográfico por cromatografía en columna. ¹⁰

Cromatografía en columna sobre tierra sílice cromatográfica silanizada usando etanol-heptano al 95% como sistema solvente seguido de la reacción con isoniazida, es la base de la valoración en preparaciones oleosas.

2.7.4.7. Análisis cromatográfico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).^{7,8,9}

Existe reportado en la Farmacopea Británica y en la Farmacopea Europea un método por CLAR, para la determinación de sustancias relacionadas de Testosterona. Este método involucra el desarrollo de un sistema por gradiente con un tiempo de análisis de aproximadamente 50 minutos, además el método solo esta reportado para sustancias relacionadas de la materia prima.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se requiere de un método específico para el seguimiento de las impurezas y evaluación de la potencia de un producto de liberación prolongada a base de Testosterona para probar su estabilidad.

La Testosterona hoy en día es utilizada como una alternativa en terapia de reemplazo hormonal debido a esto se debe de asegurar la eficacia (valoración del producto) y seguridad (cuantificando sus impurezas) del producto a comercializar.

Únicamente se cuenta con un método farmacopéico en materia prima para la determinación de sustancias relacionadas de Testosterona, el cual no implica que sea útil para un estudio de estabilidad.

Durante el proceso de fabricación del medicamento se pueden generar una serie de impurezas (productos de degradación) que no necesariamente se pueden presentar en la vida de anaquel del producto; de ahí la importancia de desarrollar un método que sea capaz de discernir entre el activo y sus impurezas.

Por lo que se procedió al desarrollo de un método por HPLC para aplicarse en un estudio de estabilidad.

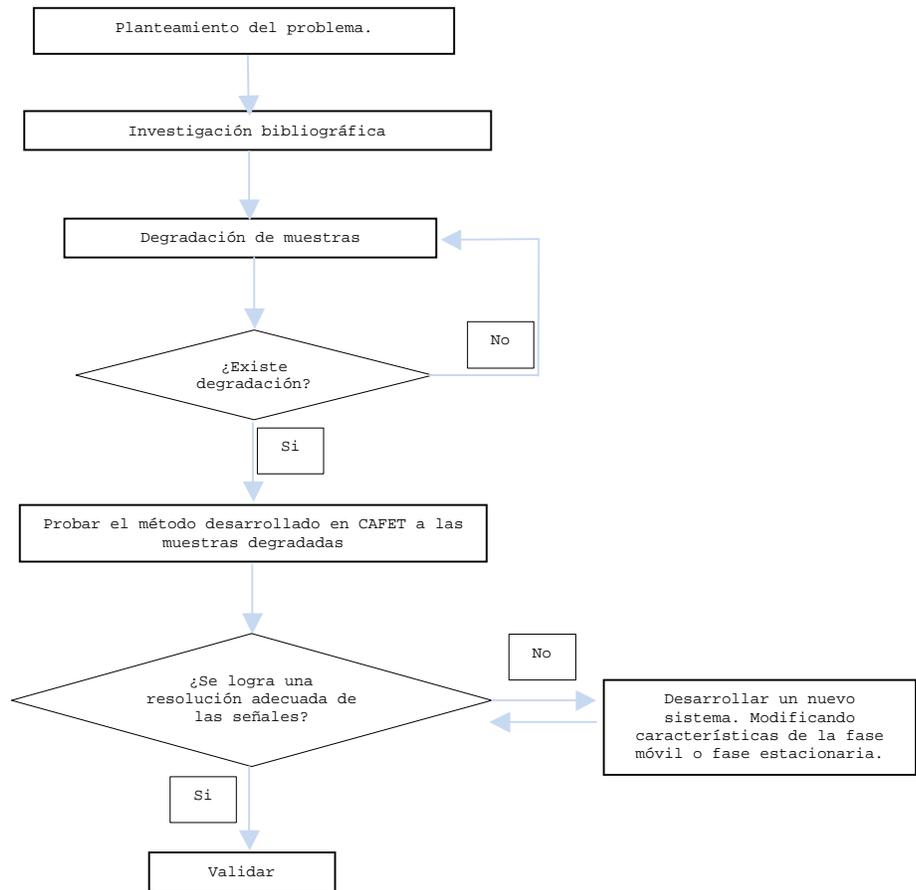
4. OBJETIVO.

Desarrollar un método analítico capaz de cuantificar Testosterona y sus impurezas en una suspensión parenteral de liberación prolongada a base de Testosterona, que pueda ser aplicado para su uso en el control del producto y su evaluación durante el estudio de estabilidad.

5. HIPÓTESIS.

El contar con un método para la cuantificación de Testosterona y sus impurezas por CLAR, permitirá realizar un análisis de control de calidad y podrá aplicarse durante el estudio de estabilidad del producto.

6. METODOLOGÍA. (Estrategia a seguir)



7. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

7.1. Preámbulo del desarrollo.

En esta etapa se definió la secuencia de las actividades, recursos materiales y parámetros necesarios para desarrollar el método de cuantificación de Testosterona, mismo que preferentemente, fuera aplicable también para la determinación de sus impurezas.

Las etapas del diseño del método analítico fueron:

- Definición de requisitos de entrada
 - a) Definir la funcionalidad del método
 - b) Referir tipo de método
 - c) Regulación o Marco legal
 - d) Información derivada de diseños anteriores

- Desarrollo del método
 - a) Establecimiento del Sistema Cromatográfico
 - b) Establecimiento del método de preparación de la muestra
 - c) Establecimiento del método de medición
 - d) Evaluación de la especificidad del método
 - e) Pruebas para evaluar la capacidad del método para cumplir con los requisitos de funcionalidad y desempeño establecidos

- Validación del método
 - Especificidad
 - Linealidad del sistema
 - Adecuabilidad del sistema
 - Precisión del sistema
 - Límite de detección
 - Límite de Cuantificación
 - Linealidad del método
 - Exactitud del método
 - Precisión del método
 - Robustez y Tolerancia
 - Estabilidad Analítica de la muestra.

7.1.1. Definición de requisitos de entrada

a) Definir la funcionalidad del método.

De acuerdo con la necesidad de aplicación se requirió desarrollar y validar un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para la cuantificación de Testosterona y sus impurezas en una suspensión parenteral de liberación prolongada.

b) Referir tipo de método

Debido a las características de la aplicación, el método debía ser útil para valoración y cuantificación de impurezas. Es decir, debía mostrar especificidad para la determinación de compuestos de interés en presencia de los productos de degradación de los componentes de la fórmula.

c) Regulación.

Los criterios regulatorios y legales por cumplir, tanto nacionales como internacionales son:

*Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993.²⁵

*Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005.²⁶

*Guidance for Industry Q3B Impurities in New Drug Products.³

*Guía de Validación de Métodos Analíticos.¹

7.2. Recursos materiales

7.2.1. Reactivos

Tabla 4. Reactivos utilizados.

REACTIVO	GRADO	MARCA	LOTE
Agua purificada	HPLC	Milli Q	AE2006024 AE2006028
Metanol	HPLC	Fermont	605534
Etanol	RA	Fermont	601431
Ácido Perclórico	RA	Fermont	112151
Hidróxido de Sodio	RA	Fermont	442401
Peróxido de Hidrógeno	RA	Fermont	629152
Acetonitrilo	HPLC	Fermont	746231
Isopropanol	HPLC	Fermont	721132
Acido clorhídrico	RA	Fermont	735351
Androstenediona	RA	Sigma	116H0463

7.2.2. Sustancia de Referencia (SR)

Nombre: Testosterona SR Secundaria
Clave: ER118
No. de análisis: ER040013
Pureza: 99.3%
Vigencia: Feb 01, 2007
Condiciones de uso: Secar sobre pentóxido de fósforo durante 4 horas.

7.2.3. Formulación

Suspensión parenteral de Testosterona de liberación prolongada.

- * Conservador
- * Surfactante
- * Diluyente
- * Estabilizante
- * Testosterona

7.2.4. Material

- Equipo de filtración Millipore Modelo: 40/35
- Membrana de filtración Millipore hidrofílica de 0.45 μm de tamaño de poro
- Combitips para repipeteadora de 10 y 25 mL
- Matraces volumétricos de 5, 10 y 25-mL
- Vasos de precipitados de 50 y 100 mL

7.2.5. Equipos

Equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución equipado con lo siguiente:

Tabla 5. Equipo Cromatográfico No. 1

EQUIPO	MARCA	MODELO
Bomba	Waters	60F
Automuestreador	Waters	717 P
Detector Ultravioleta	Waters	2487
Controlador de sistema	Waters	600
Computadora	Dell	E772P
Columna Analítica	Symmetry	C ₁₈ , 3.9X150mm Partículas de 5 μm
Programa para procesamiento de datos Empower Pro versión 5.00.00.00		

Tabla 6. Equipo Cromatográfico No.2

EQUIPO	MARCA	MODELO
Bomba	Waters	60F
Automuestreador	Waters	717 P
Detector de Fotodiodos	Waters	996
Controlador de sistema	Waters	600
Computadora	Dell	E772P
Columna Analítica	Symmetry	C ₁₈ , 3.9X150mm Partículas de 5 μm
Programa para procesamiento de datos Empower Pro versión 5.00.00.00		

Tabla 7. Equipo Adicional

EQUIPO	MARCA	MODELO
Balanza analítica	Mettler	AM100 AE260
Horno de Convección	Fisher Scientific	838F
Horno de vacío	Precision	19
Horno de ignición	Lindberg	S/M
Sonicador	Cole Parmer	S/M
Pipeta automática	Eppendorf	Multipette Plus
Repipeteadora automática	Finnpipett	S/M

7.3. Desarrollo del método de valoración e impurezas

a) Desarrollo del sistema cromatográfico

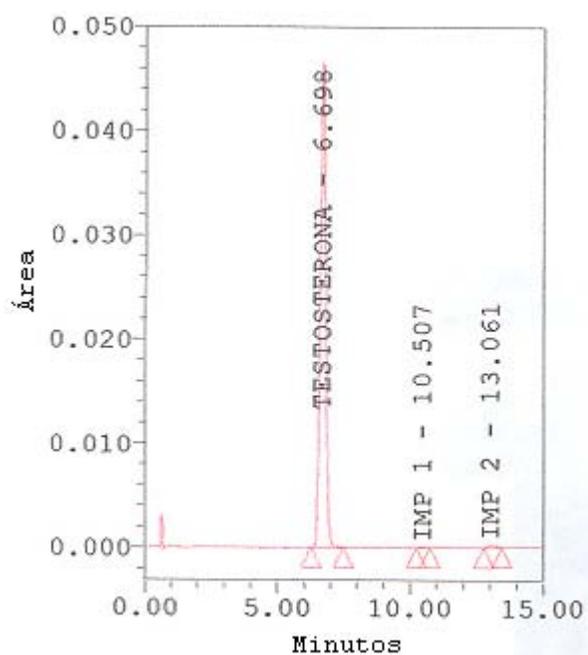
El método reportado en la British Pharmacopoeia 2008 para la determinación de sustancias relacionadas de Testosterona, materia prima, consistió en un sistema por gradiente que resultó muy complicado reproducir, además sólo toma en cuenta las impurezas provenientes del principio activo (siendo tanto impurezas de síntesis como posibles subproductos) y no impurezas provenientes de la formulación o proceso de fabricación (productos de degradación).

Se probaron condiciones cromatográficas en donde la intención principal fue que un solo sistema se utilizara para cuantificar tanto Testosterona como sus impurezas. Para esto se tomó como base un método desarrollado en CAFET para valoración de Estradiol en una forma farmacéutica de liberación prolongada que consistía de una fase ternaria. El objetivo, aparte de obtener un solo sistema para estas cuantificaciones era simplificar el método existente tanto en la empresa como en el reportado en la British Pharmacopoeia (BP) y validarlo.

Se menciona a continuación las características del método inicial para valoración de Estardiol (No Farmacopeico):

- Fase móvil [mezcla acetonitrilo: isopropanol (35:15)]: agua (35:65)
- Mezcla metanol: agua (70:30) (disolvente de muestras)
- Columna Symmetry C₁₈ 5μ de 15cm x 3.9cm
- Flujo 2 mL/min a 244 nm
- Volumen de inyección 10μL

Figura 4. Cromatograma representativo del método inicial



En la figura 4 se observa que el tiempo de retención de la Testosterona es de aproximadamente 6.6 minutos, que es apropiado para un análisis de control de calidad. Por lo anterior se decide someter materia prima de testosterona a condiciones de degradación y de esta manera encontrar a los principales productos de degradación.

Las condiciones iniciales de degradación fueron las siguientes:

Tabla 8. Diferentes condiciones de degradación.

Condición	Tiempo de almacenamiento	Degradación
HCl 0.1N	72 horas temperatura ambiente	No
NaOH 0.1N	72 horas temperatura ambiente	No
H ₂ O ₂ 30%	72 horas temperatura ambiente	No
Cámara de luz UV	72 horas	No
Cámara de luz UV	3 semanas	No
HCl 0.1N	3 horas 50°C	No
NaOH 0.1N	3 horas 60°C	No
NaOH 0.5N	105°C 3 y 4 horas	No
HClO ₄ 0.5N	105°C 3 y 4 horas	No
Térmica	200°C 30 minutos	No
NaOH 0.5N	100°C 30 minutos	No
HClO ₄ 0.5N	100°C 30 minutos	No

Para evaluar el nivel de degradación se evaluó la respuesta obtenida en muestra degradada contra la respuesta de muestra sin degradar.

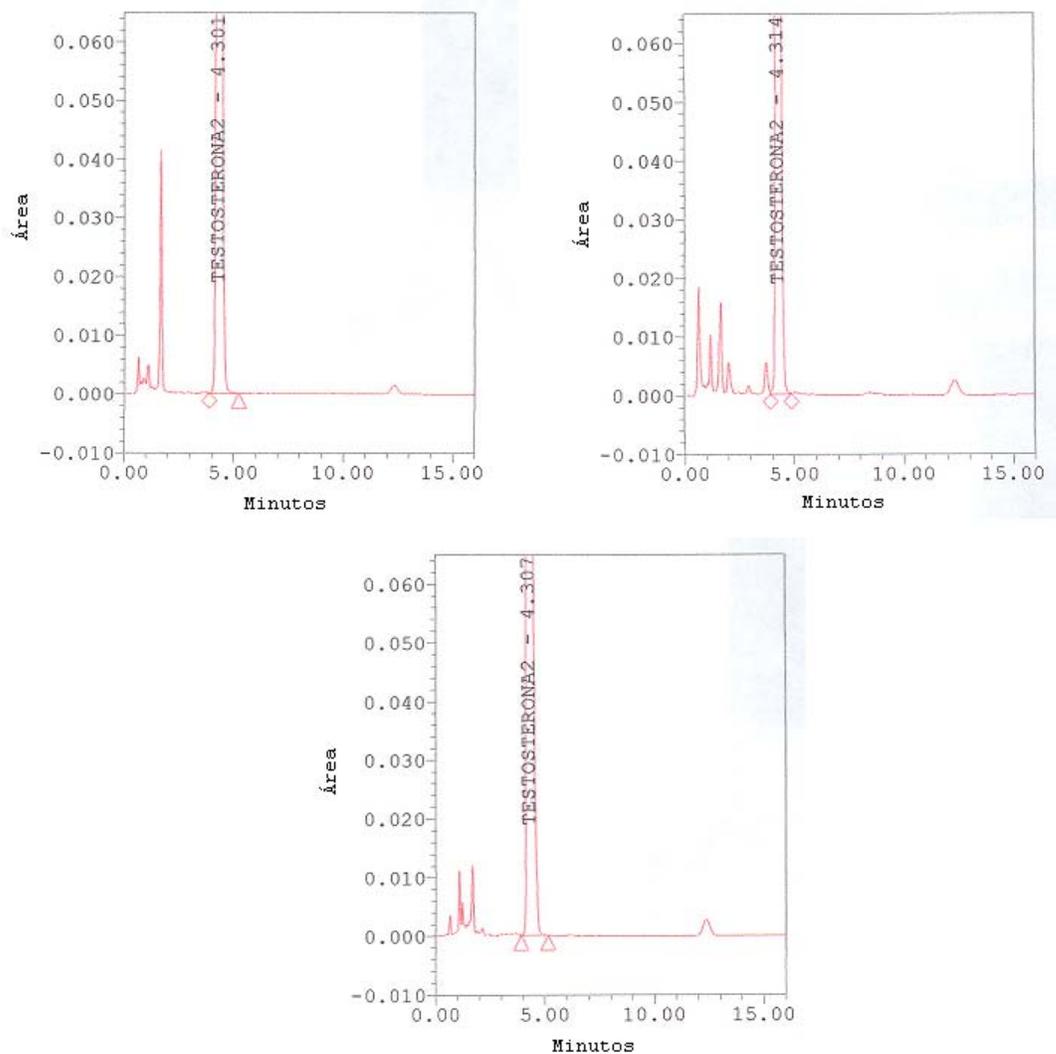
De todas las condiciones de degradación probadas, en tiempos de almacenamientos diferentes, se percibe que ninguna sufre degradación por lo consiguiente se deciden modificarlas, evaluando las siguientes condiciones.

Tabla 9. Modificaciones a las condiciones de degradación.

Condición	Tiempo de almacenamiento	Degradación
NaOH 0.5N	105°C 3 horas	0%
NaOH 0.5N	105°C 6 horas	3.0%
NaOH 0.5N	105°C 21 horas	5.0%
HClO ₄ 0.5N	105°C 3 horas	0%
HClO ₄ 0.5N	105°C 6 horas	3.0%
HClO ₄ 0.5N	105°C 21 horas	25.0%
Térmica	100°C 1 hora	5.0%

De estas pruebas, las condiciones de degradación ácida, básica (a las 6 y 21 horas) y térmicas tuvieron degradación significativa, para verificar los resultados y observar la resolución entre las señales fueron inyectadas al sistema cromatográfico a mayor concentración.

Figura 5. Cromatogramas de Testosterona obtenidos de las condiciones de degradación (ácida, básica y térmica)



Debido al alto nivel de degradación obtenido, y en función de que para fines predictivos al estudio de estabilidad, esta condición fue extrema, se decidió modificar la degradación de las muestras.

Tabla 10. Condiciones de degradación finales.

Condición	Tiempo de almacenamiento	Degradación
NaOH 0.5N	80°C 18 horas	Si
HClO ₄ 0.5N	80°C 18 horas	Si
Térmica	100°C 6 horas	Si

Aún cuando se logra un nivel apropiado de degradación, para el objetivo final del método, se requiere evaluar que las señales obtenidas son puras por lo que se decidió evaluar pureza de pico mediante un análisis con arreglo de fotodiodos y someter tanto a excipientes de la formulación como al producto a las mismas condiciones de degradación.

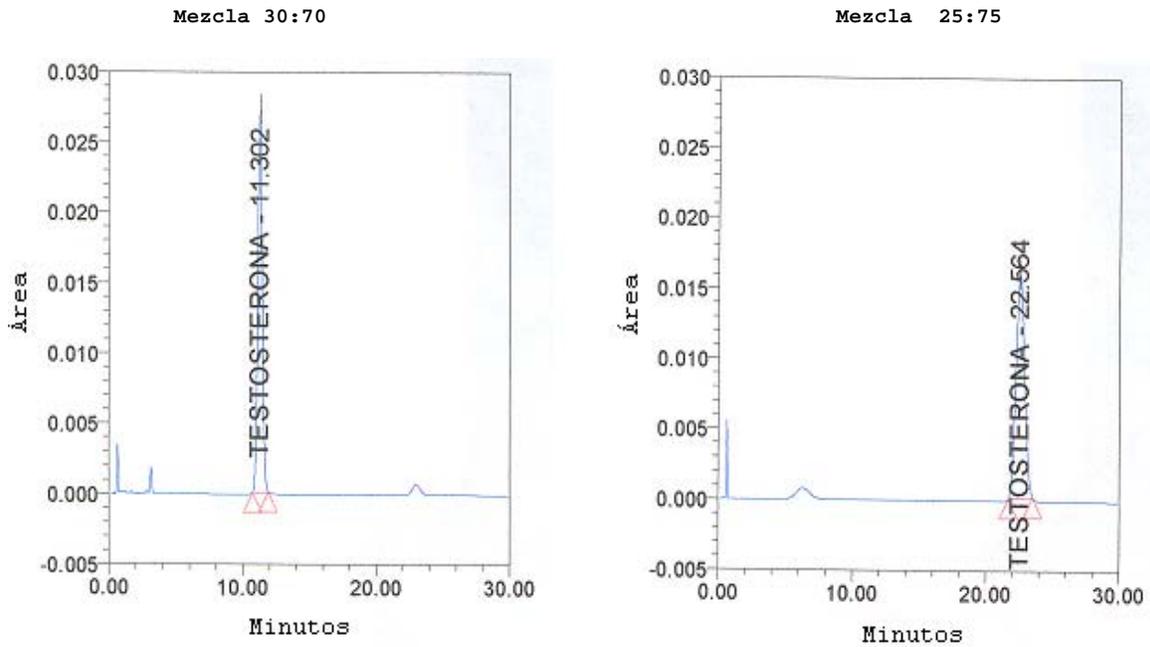
Los resultados obtenidos mostraron que para el caso de algunas señales de impurezas la señal no era pura, debido tal vez a alguna coelución, por lo que fue necesario realizar cambios en la composición de fase móvil con la intención de modificar la selectividad del método.

*** Modificación de fase móvil**

Se decidió variar las proporciones de la fase móvil de manera que se logre cambiar la polaridad de la misma. Las proporciones de fase móvil ensayadas fueron {mezcla acetonitrilo: isopropanol (35:15)}: Agua (30:70) y {mezcla acetonitrilo: isopropanol (35:15)}: Agua (25:75).

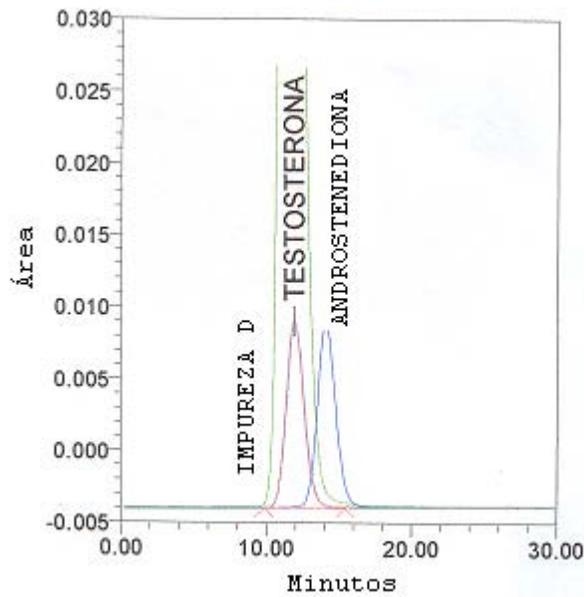
En la primera modificación no se obtuvo una buena separación de las impurezas con un tiempo de retención de aproximadamente 12 minutos, en la segunda proporción se observó que el tiempo de retención aumenta a 24 minutos, por lo tanto, es más factible la utilización de la primera opción, en función de que el tiempo de corrida con 24 minutos como retención es largo.

Figura 6. Cromatogramas representativos de los cambios de fase móvil utilizados.



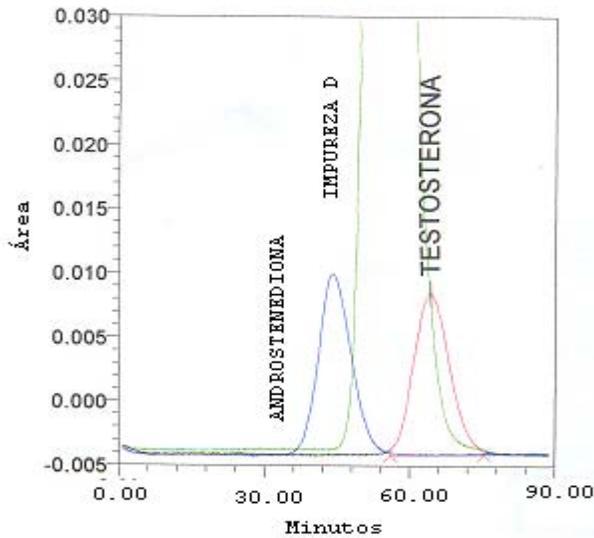
Una vez seleccionado el sistema se prepararon muestras de impurezas conocidas de Testosterona, de Androstenediona e Impureza D (Androstenediol) y muestras de Testosterona concentradas con la finalidad de evaluar la resolución de picos, respecto a estas impurezas conocidas.

Figura 7. Cromatograma característico de impurezas conocidas de Testosterona



Respecto a estas condiciones se decidió modificar la composición de fase móvil ya que el sistema no era específico para las impurezas y existía una coelución de señales de Testosterona con la impureza D. Se probó entonces {mezcla acetonitrilo: isopropanol (35:15)}: Agua (20:80).

Figura 8. Cromatograma característico que representa tiempos de retención muy largos.



Como conclusión de estos sistemas el más adecuado resultó ser {mezcla acetonitrilo: isopropanol (35:15)}: Agua (20:80)), pero con tiempos de corrida poco práctico para un análisis de control de calidad, el cual es muy extenso (30 minutos).

Debido al alto costo que representa el uso de disolventes grado HPLC, se modificaron los componentes de la fase, junto con la fuerza de elución. El Metanol HPLC es un reactivo muy utilizado en esta técnica cromatográfica y al aplicarlo en el sistema se disminuyo el costo del método. Debido a esto se decidió probar los siguientes sistemas.

Esto fundamentado en usar una fase móvil más simple (mezcla binaria) y con un disolvente comparativamente más barato que el Acetonitrilo y el Isopropanol.

Tabla 11. Cambio de disolventes y proporción de fase móvil.

Fase Móvil	Condición
Metanol:agua (30:70)	2.0 mL/min
Metanol:agua (50:50)	2.0 mL/min
Metanol:agua (60:40)	2.0 mL/min
Metanol:agua (40:60)	2.0 mL/min

En lo que respecta al primer sistema debido a la alta polaridad de la fase y a la velocidad de flujo que se maneja, se presurizó el sistema demasiado, las siguientes proporciones mencionadas en la tabla 11 logran separar la Androstenediona pero no se logró la resolución entre la impureza D y la Testosterona, además todas las condiciones probadas presentan tiempos de corridas muy largos por lo que se intentó probar cambiando la selectividad del sistema al cambiar las características de la fase estacionaria. Se decidió conservar la fase móvil Metanol: Agua (40:60).

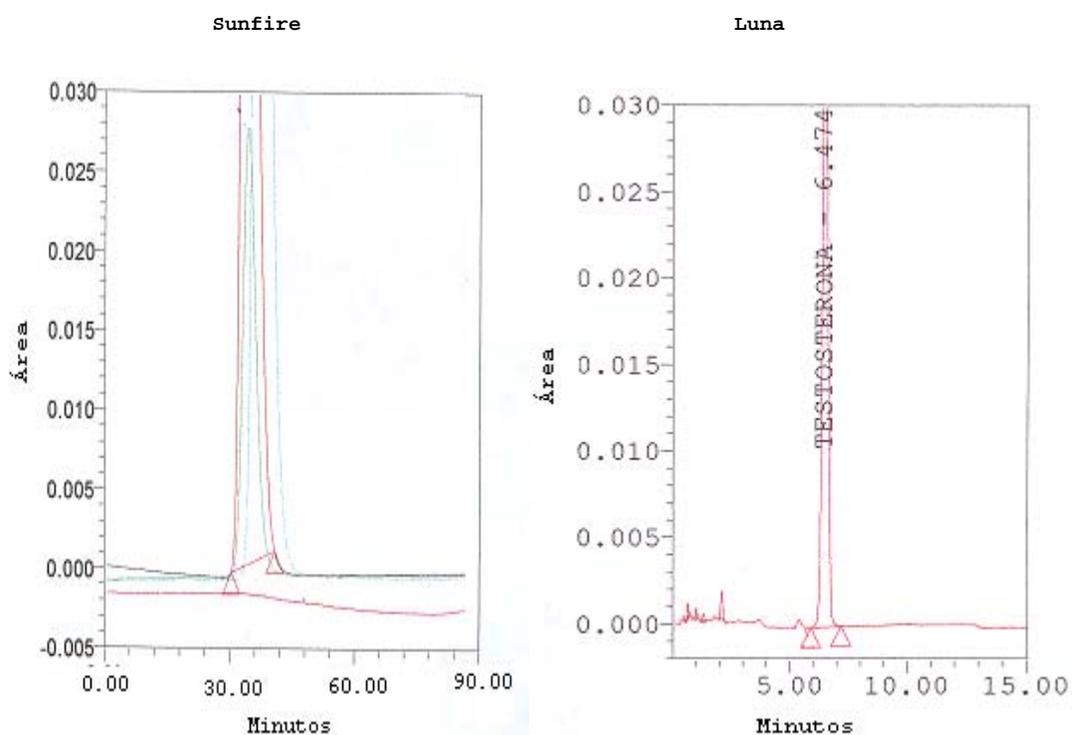
CAMBIO DE COLUMNA.

Debido a que no existía una buena separación de las impurezas se decidió cambiar de columna Symmetry C₁₈ 3.9x15mm de 5µm a las siguientes:

* Sunfire C₁₈ 2.1x50mm de 5µm con fase móvil Metanol: agua (40:60) y flujo de 2.0 mL/min.

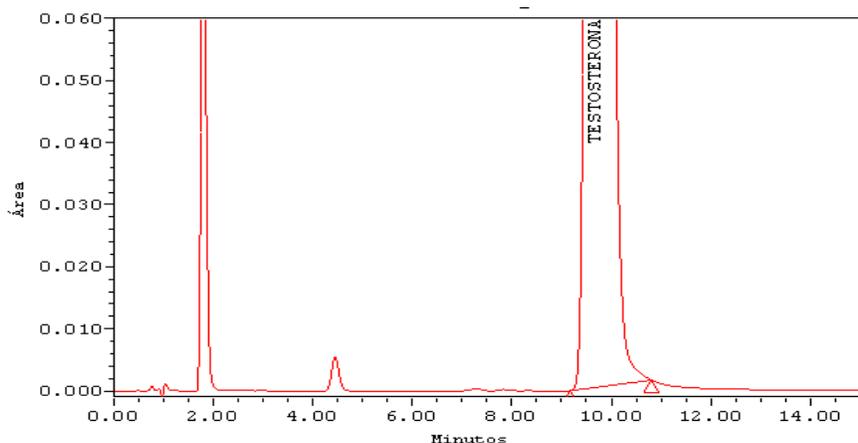
* Luna Phenyl-Hexyl 50x4.6mm 3µm flujo 2.0 mL/min

Figura 9. Cromatogramas representativos del cambio de columna.



Los tiempos de retención al probar estos sistemas cromatográficos son de aproximadamente 8.5 minutos pero debido a la poca resolución se conservó la columna Symmetry C₁₈ 3.9x15mm de 5µm y se cambió la composición de la fase móvil a Metanol: Agua (55:45) con una velocidad de flujo de 1.0 mL/min.

Figura 10. Cromatograma de Testosterona utilizando la columna Symmetry C₁₈



Los intentos no permitieron resolver la coelución de la impureza D (Androstenediol), sin embargo al revisar la estructura de la impureza D se observa que es un producto de reducción de la Testosterona, se sabe que debido a la naturaleza del proceso de manufactura de la formulación, no es posible que se lleve a cabo dicha reducción, el producto más viable como degradación sería un producto de oxidación (Androstenediona).

Por lo discutido anteriormente se decidió retomar la fase móvil 60:40 (Metanol: Agua), columna Symmetry C₁₈ 5 μ 3.9 x 150mm con velocidad de flujo de 2.0 mL/min que lograba una resolución aceptable de muestras degradadas y de la Androstenediona.

Se degradaron muestras de Testosterona y vehículo en condiciones ácidas y básicas bajo las siguientes condiciones:

Tabla 12. Condiciones de degradación de vehículo.

Condición	Tiempo de almacenamiento
NaOH 0.5N	80°C por 18 horas
HClO ₄ 0.5N	80°C por 18 horas
Térmica	100°C por 6 horas

Al probar el sistema se comprobó que existían unas señales que podrían afectar el pico de interés ya que eluían muy cercano a éste, es por ello que se hizo una última modificación a la fase 55:45 Metanol: Agua con una velocidad de flujo de 1.5mL/min y temperatura de 30°C.

Por cuestión de disponibilidad y optimización en costos, se cambió el disolvente de Metanol a Etanol, previas pruebas de solubilidad para el procesamiento de muestras.

A continuación se representan cromatogramas característicos de las condiciones de degradación.

Figura 11. Hidrólisis ácida de la Testosterona.

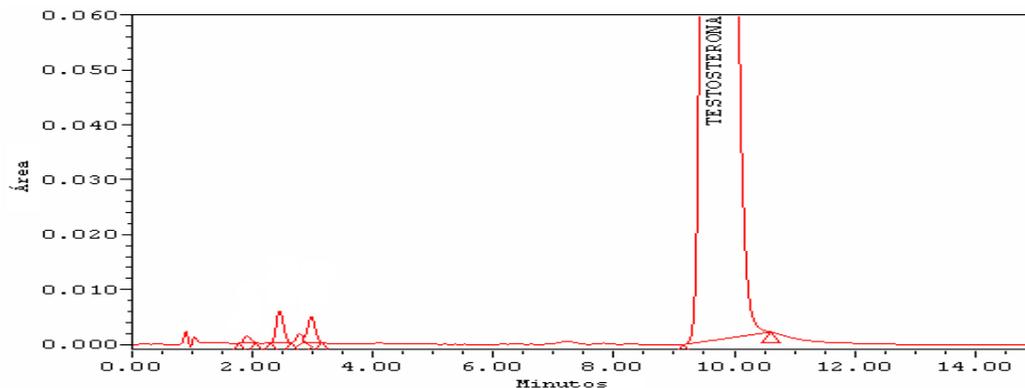


Figura 12. Hidrólisis básica de la Testosterona.

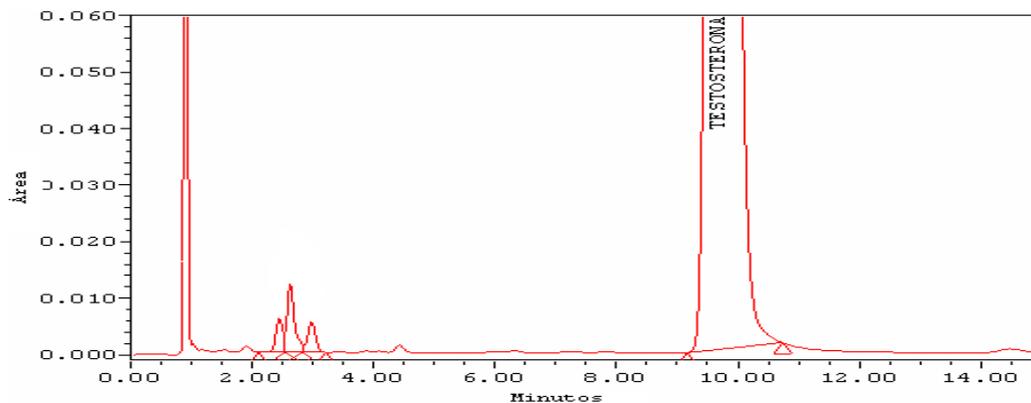
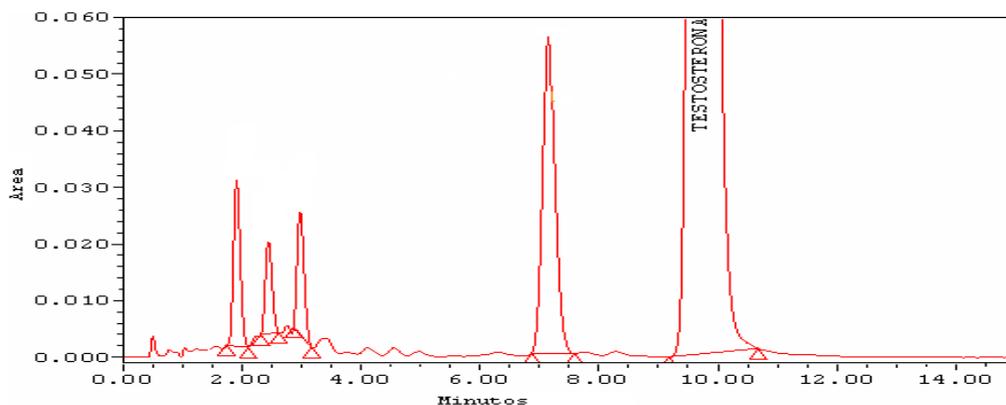


Figura 13. Hidrólisis térmica de la Testosterona.



ETIQUETADO DE IMPUREZAS.

Una vez obtenidas las muestras degradadas se procedió a recolectar las impurezas a los tiempos 1.91, 3.05 y 7.53 minutos.

Una vez realizada la recolección de las muestras se evaporó en un baño de agua aplicando aire hasta llegar a sequedad, estas se reconstituyeron con 1 mL de mezcla Etanol: Agua (70:30) y se sometieron a ultrasonido durante 5 minutos, finalmente se inyectaron las muestras al sistema farmacopeico reportado para sustancias relacionadas (British Pharmacopoeia 2005 Vol. II p.1922-1924) en el cual se tienen identificados por el tiempo de retención relativo. De esta manera se logró identificar estas impurezas. Identificándolas con el nombre según corresponda el tiempo de retención en el sistema farmacopeico.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 13 a continuación.

Tabla 13. Identificación de impurezas.

IDENTIFICACIÓN	TIEMPOS DE RETENCIÓN	TIEMPO DE RETENCIÓN RELATIVO
Testosterona	22.051	-
Impureza C	29.892	1.35
Impureza I	20.183	0.92
Impureza 1	24.508	1.11
Impureza 2	31.860	1.45
Impureza 3	30.250	1.37

De esta manera se puede nombrar a las impurezas 1, 2 y 3 como Androstenediona, Acetato de Testosterona y Metilenoléter Androstenediona respectivamente.

7.4. Cálculo de los intervalos de trabajo para valoración e impurezas.

a) Intervalo de trabajo para Valoración.

Con base a la dosis de la formulación de aproximadamente 170 mg de Testosterona se deposita en un matraz volumétrico de 50-mL llevando a volumen con mezcla de disolventes, finalmente de esta solución se toma una alícuota de 1.5 mL y se lleva a un matraz de 50-mL. Concentración aproximada de 0.1 mg/mL equivalente al 100.0% entonces el intervalo queda de la siguiente manera.

Tabla 14. Intervalo de trabajo para Valoración.

Intervalo de Valoración
80.00 µg/mL
90.00 µg/mL
100.00 µg/mL
110.00 µg/mL
120.00 µg/mL

b) Intervalo de trabajo para Impurezas.

Basándose en los límites de impurezas calculados de acuerdo a lo que indica el Anexo 1 de la Guía ICH Q3A "Impurities in New Drug Substances" y la Guía ICH Q3B (R) "Impurities in New Drug Products" se calcula el intervalo de trabajo adecuado para cuantificar impurezas tomando en cuenta que la dosis es de aproximadamente 170 mg queda de la siguiente manera:

*Límites para activo:

1) Límite de Reporte 0.05%

$$170\text{mg} \rightarrow 0.085\text{mg}$$

2) Límite de Identificación 0.10%

$$170\text{mg} \rightarrow 0.017\text{mg}$$

3) Límite de Calificación 0.15%

$$170\text{mg} \rightarrow 0.255\text{mg}$$

*Límites para producto:

1) Límite de Reporte 0.10%

$$170\text{mg} \rightarrow 0.170\text{mg}$$

2) Límite de Identificación 0.20%

170mg → 0.340mg

3) Límite de Calificación 0.20%

170mg → 0.340mg

Una vez calculados estos límites basándonos en la Guía ICH Q2B "Validation of Analytical Procedures: Methodology" en el punto IV establece que el rango de trabajo para determinación de impurezas es a partir del límite de reporte al 120% de la especificación.

Como necesitamos que abarque tanto al activo como al producto tomamos el límite más alto y mas bajo:

Tabla 15. Límites calculados para impurezas

TIPO DE LIMITE	ACTIVO (mg)	PRODUCTO (mg)
Reporte	0.085	0.17
Identificación	0.17	0.34
Calificación	0.255	0.34

-Cálculo del Intervalo de trabajo para abarcar activo y producto:

*Límite Superior (120% del límite de Calificación):

$$LIM_{SUP} = 0.340mg \times 1.2$$

$$LIM_{SUP} = 0.408mg$$

$$LIM_{SUP} = 0.4mg$$

*Límite Inferior (Límite de Reporte):

El límite de reporte es de 0.085 por lo tanto:

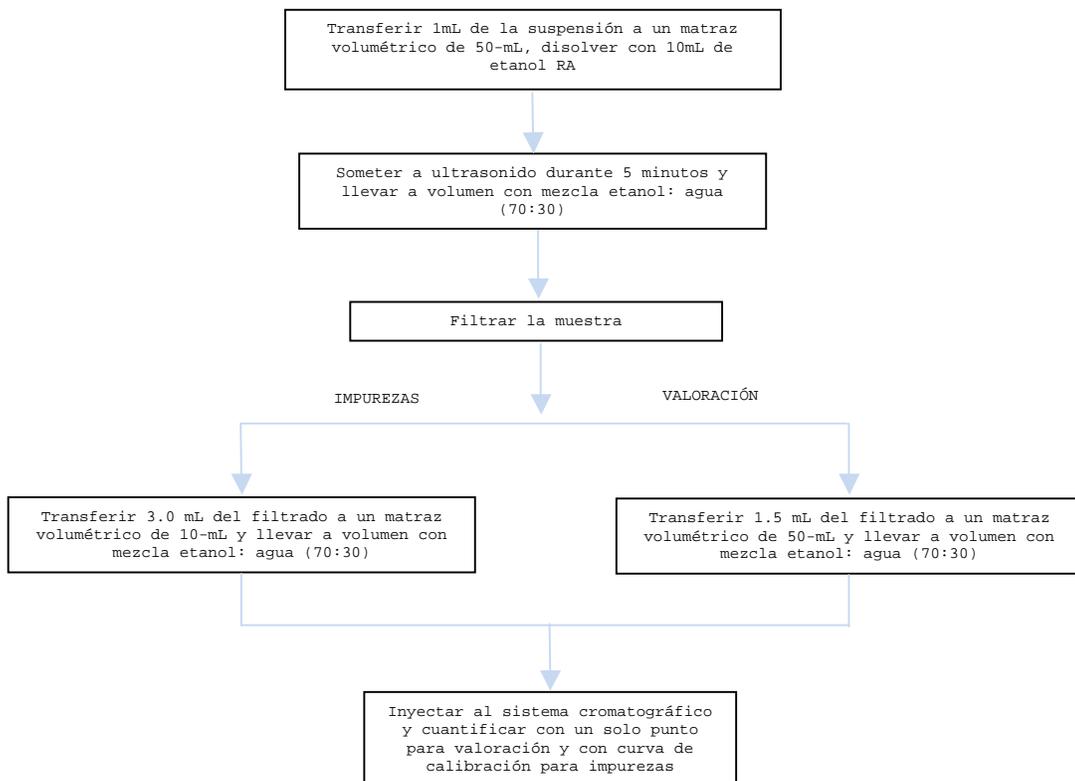
$$LIM_{INF} = 0.085mg$$

Tomando en cuenta el procesamiento de muestra obtenemos el siguiente intervalo:

0.51µg/mL - 2.4µg/mL

Para fines prácticos se manejará el intervalo de trabajo de 0.50µg/mL a 5µg/mL.

7.5. Establecimiento del método de preparación de la muestra



8. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DE VALORACIÓN.

8.1. Especificidad.

La especificidad a productos de degradación se evaluó de la siguiente forma:

a) Placebo.

Se evaluó preparando por duplicado muestras de Colesterol más vehículo sometidas a degradación de acuerdo a la tabla 16.

b) Formulación completa.

Se evaluó preparando por duplicado muestras de Testosterona sustancia de referencia a la dosis del 100% del producto, Colesterol y vehículo sometidas a degradación de acuerdo a la tabla 16.

c) Producto a granel.

1. Hidrólisis ácida y básica: Se evaluó preparando por duplicado muestras de Testosterona sustancia de referencia a la dosis del 100% del producto y Colesterol, sometidas a degradación de acuerdo a la tabla 16.

2. Degradación Térmica: Se evaluó preparando por duplicado muestras de Testosterona sustancia de referencia a la dosis del 100% del producto y Colesterol, sometidos a degradación de acuerdo a la tabla 16.

Tabla 16. Condiciones de degradación para Placebo, Formulación completa y producto a granel.

MUESTRAS	HClO ₄ 0.5N	NaOH 0.5N	VEHICULO	CONDICIÓN
P	-	-	3.0mL	-
P.A	3.0mL	-	3.0mL	80°C por 18 horas
P.B	-	3.0mL	3.0mL	80°C por 18 horas
F	-	-	-	-
F.A	3.0mL	-	3.0mL	80°C por 18 horas
F.B	-	3.0mL	3.0mL	80°C por 18 horas
M	-	-	-	-
M.A	3.0mL	-	-	80°C por 18 horas
M.B	-	3.0mL	-	80°C por 18 horas
M.T	-	-	-	100°C por 6 horas

Donde:

P= Placebo

M= producto a granel

F= Formulación completa

A= Condición ácida

B= Condición básica

T= Condición Térmica

El criterio de aceptación consistió en demostrar, mediante un análisis espectral, que las señales de los compuestos de interés son puras, no habiendo productos de degradación que interfirieran con la cuantificación de la Testosterona.

8.2. Linealidad del sistema.

Se evaluó preparando por triplicado a partir de pesadas independientes de Testosterona sustancia de referencia, la curva descrita en la tabla 17 obteniendo las siguientes concentraciones:

Tabla 17. Linealidad del Sistema

Identificación	Nivel	Alícuota (mL)	Concentración (mg/mL)
C ₁	80%	2.00	0.08
C ₂	90%	2.25	0.09
C ₃	100%	2.50	0.10
C ₄	110%	2.75	0.11
C ₅	120%	3.00	0.12

A partir de los datos obtenidos se obtuvo la ecuación de la recta por mínimos cuadrados considerando a la concentración como variable independiente (x) y a la respuesta como variable dependiente (y) obteniendo el coeficiente de determinación, ordenada al origen y pendiente. Se calculó además el intervalo de confianza al 95% para la pendiente, así como el coeficiente de variación del factor respuesta.

Los criterios de aceptación fueron los siguientes:

El coeficiente de determinación debería ser mayor o igual a 0.98

El intervalo de confianza al 95% de la pendiente no debía incluir al cero.

El coeficiente de variación del factor respuesta no debía ser mayor a 1.5%.

8.3. Adecuabilidad del sistema.

Se evaluó inyectando por quintuplicado, la solución SR equivalente a 0.10 mg/mL de Testosterona.

El criterio de aceptación consistió en que el coeficiente de variación de la respuesta de las 5 inyecciones no debía ser mayor al 2.0%.

8.4. Precisión del sistema.

Se evaluó preparando por sextuplicado la concentración correspondiente al 100% de la prueba de linealidad del sistema de alícuotas independientes.

El criterio de aceptación consistió en que el coeficiente de variación de las respuestas de Testosterona de las seis réplicas no debía ser mayor al 1.5%.

8.5. Linealidad del método.

Se evaluó preparando por triplicado las soluciones indicadas en la tabla 18.

Preparando cada nivel por triplicado, a partir de pesadas independientes salvo el nivel del 100% que se preparó por sextuplicado, a cada nivel se le adicionó 1.5 mL de vehículo.

Tabla 18. Linealidad del método

Muestra	Nivel	Cantidad de Testosterona	Cantidad de Colesterol	Concentración final después del procesamiento
M ₁	80%	136mg	185mg	0.08mg/mL
M ₂	100%	170mg	232mg	0.10mg/mL
M ₃	120%	204mg	280mg	0.12mg/mL

Los resultados se expresaron en mg recuperados de Testosterona para cada nivel con los que se calculó la ecuación de la recta por mínimos cuadrados, considerando como variable independiente (x) a los miligramos adicionados y como variable dependiente (y) a los miligramos recuperados, calculando: coeficiente de determinación, ordenada al origen, pendiente y coeficiente de variación de la regresión. Además se

calculó el intervalo de confianza al 95% de la pendiente, y la ordenada al origen.

Los mg recuperados fueron también expresados como porcentaje recuperado, con lo que se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación por nivel y global. Así mismo, se calculó el intervalo de confianza al 95% del porcentaje recuperado y global.

Los criterios de aceptación fueron los siguientes:

- El Coeficiente de determinación de la recta para mg adicionados contra mg recuperados debía ser mayor o igual a 0.98.

- El intervalo de confianza al 95% de la pendiente debía incluir al uno, en caso contrario el valor de la pendiente relativa debía estar entre 1.02 y 0.98.

- El intervalo de confianza al 95% de la ordenada al origen debía incluir al cero, en caso contrario la ordenada relativa debía estar entre 0.02 y -0.02

- El coeficiente de variación de la regresión debía ser menor a 2.0%

- El intervalo de confianza al 95% del porcentaje recuperado global debía estar contenido entre 98.0 y 102.0%

- El coeficiente de variación del porcentaje recuperado debía ser no mayor al 2.0%.

8.6. Exactitud del método.

Se evaluó inyectando las seis réplicas de las muestras preparadas al nivel del 100% de la Linealidad del Método.

Los resultados se expresaron como porcentaje recuperado calculando: promedio, desviación estándar y coeficiente de variación, así como el intervalo de confianza al 95% del porcentaje recuperado.

El criterio de aceptación consistió en que el intervalo de confianza al 95% del porcentaje recuperado debía estar dentro del 98.0 y 102.0%.

8.7. Precisión del método.

8.7.1. Repetibilidad.

A partir de los resultados obtenidos de las seis réplicas de la prueba de exactitud, se calculó el coeficiente de variación del porcentaje recuperado.

El criterio de aceptación consistió en que el coeficiente de variación del porcentaje recuperado no debía ser mayor al 2.0%.

8.7.2. Precisión intermedia.

Se evaluó analizando por triplicado muestras de la formulación correspondiente al nivel del 100%, en dos días diferente, por dos analistas diferentes, empleando el mismo equipo.

Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje cuantificado calculando el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación por analista, por día y global.

El criterio de aceptación consistió en que el coeficiente de variación del porcentaje cuantificado por día, por analista y global no debía ser mayor al 2.0%.

8.8. Estabilidad Analítica de la muestra.

Se determinó analizando con las muestras al 100% de la dosis y almacenándolas en el inyector para su posterior reinyección a las 24 horas y 48 horas. Se cuantificó en cada tiempo con respecto a una solución de referencia recién preparada. Para cada tiempo de análisis los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje cuantificado y se compararon con respecto al resultado inicial

El criterio de aceptación estableció en que se considerara estable a la muestra en el tiempo de almacenamiento en el inyector, en el que el

por ciento cuantificado no difiriera en más del 2.0% respecto al tiempo inicial.

8.9. Tolerancia.

Se evaluó ocupando tres muestras de precisión intermedia al 100% con la columna de condición basal y posteriormente se hizo con la columna de prueba.

Los resultados se expresaron como por ciento cuantificado para cada columna.

El criterio de aceptación consistió en que el coeficiente de variación del por ciento cuantificado no fuera mayor al 2.0% y la diferencia del promedio del por ciento cuantificado respecto a la condición basal no debía ser mayor al 2.0%.

9. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DE IMPUREZAS.

9.1. Especificidad A:

Excipientes.

Se evaluó preparando por duplicado el placebo de la formulación (PB). El criterio de aceptación fue que los cromatogramas del PB no presentaran ninguna señal al tiempo de elución de la Testosterona.

Productos de degradación.

La especificidad a productos de degradación se llevó a cabo analizando por duplicado muestras de placebo, de la formulación completa y de Producto a granel, degradadas bajo las condiciones descritas en la tabla 16.

Cabe mencionar que la degradación térmica solo incluyó las muestras de Producto a granel y se prepararon muestras sin degradar por duplicado.

El criterio de aceptación consistió en demostrar, mediante un análisis espectral, que la señal de Testosterona fuera pura, no habiendo productos de degradación que interfirieran con la cuantificación de esta.

9.2. Linealidad del sistema.

Se evaluó preparando una curva de calibración por triplicado a partir de pesadas independientes; transfiriendo a matraces volumétricos de 10-mL la alícuota indicada en la tabla 19 de la solución de Referencia SCC preparada como a continuación se describe:

Preparación de la solución de referencia.

Transferir aproximadamente 25mg de Testosterona Sustancia de Referencia, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 25-mL, disolver con aproximadamente 5mL de Etanol RA, llevar a volumen con

mezcla Etanol: agua (70:30) y homogeneizar. Concentración aproximada de 1000 µg/mL de Testosterona (SCA).

Transferir 2.5mL de la solución SCA a un matraz volumétrico de 25-mL, homogeneizar y llevar a volumen con mezcla Etanol: agua (70:30). Concentración aproximada de 100µg/mL de Testosterona (SCB)

Transferir 2.5mL de la solución SCB a un matraz volumétrico de 25-mL, homogeneizar y llevar a volumen con mezcla Etanol: agua (70:30).

Concentración aproximada de 10µg/mL de Testosterona (SCC)

Tabla 19. Curva de calibración de Testosterona

PUNTO DE LA CURVA	ALÍCUOTA DE SCB (µL)	CONCENTRACIÓN FINAL (µg/mL)
SC1	500	0.5
SC2	1000	1.0
SC3	2000	2.0
SC4	3500	3.5
SC5	5000	5.0

Con los datos obtenidos se calculó la ecuación de la recta por mínimos cuadrados, utilizando como variable independiente (x) la concentración y como variable dependiente (y) a la respuesta. Se calculó el coeficiente de determinación, pendiente, ordenada al origen; así como el intervalo de confianza al 95% de la pendiente y el coeficiente de variación de la respuesta para Testosterona.

Los criterios de aceptación fueron los siguientes:

El coeficiente de determinación de la recta obtenida por la relación entre la concentración y la respuesta analítica debía ser mayor a 0.98.

El factor respuesta debía tener un coeficiente de variación menor igual a 5.0%.

El intervalo de confianza al 95% de significancia para la pendiente de la recta obtenida no debía contener al cero.

9.3. Adecuabilidad del sistema.

Se evaluó inyectando 5 veces la solución SA y reportando la respuesta de Testosterona y el C.V. de la respuesta; el criterio de aceptación fue que el C.V de la respuesta obtenida no fuera mayor al 5%.

9.4. Precisión del sistema.

Se determinó inyectando 6 réplicas a la concentración del punto SC3 de la linealidad del sistema, preparadas de manera independiente.

El criterio de aceptación consistió en que el coeficiente de variación de la respuesta de Testosterona no debía ser mayor al 5%.

9.5. Límite de detección.

Para evaluar este parámetro se prepararon diluciones por debajo del punto SC1 de la linealidad del sistema mediante diluciones (1:2), determinándose la máxima dilución de testosterona que generó una respuesta con respecto a la línea base en una proporción 3:1, y se prepararon por quintuplicado.

El criterio de aceptación utilizado fue que la concentración correspondiente al límite de detección debía generar una respuesta con respecto a la línea base en proporción 3:1.

9.6. Límite de cuantificación.

Se obtuvo utilizando los datos correspondientes a SC1 de Linealidad del método, tomando como criterio de aceptación que el C.V del Porcentaje recuperado no fuera mayor al 5% y el promedio del Porcentaje recuperado estuviera dentro del 95% y 105%.

9.7. Linealidad del método.

Se evaluaron 3 niveles de concentración (placebos adicionados de Testosterona) por triplicado, preparados de manera independiente transfiriendo a matraces volumétricos de 50-mL, 35mg de Colesterol materia prima, 1.5mL del Vehículo para suspensión inyectable y la alícuota de la Solución de Referencia de Testosterona indicada en la tabla 20, preparadas de acuerdo a lo descrito en el punto 9.2. Filtrar a través de papel filtro Whatman No.2 ó equivalente por gravedad.

Transferir una alícuota de 3 mL del filtrado a un matraz volumétrico de 10-mL y llevar a volumen con mezcla Etanol: agua (70:30) y homogeneizar.

Tabla 20. Curva estándar de Testosterona

PUNTO DE LA CURVA	ALÍCUOTA DE SCB (µL)	ALÍCUOTA DE SCC (µL)	CONCENTRACIÓN FINAL (µg/mL)
MC1	-	800	0.5
MC2	300	-	2.0
MC3	800	-	5.0

El nivel MC2 se preparó por sextuplicado para evaluar precisión y exactitud del método.

Los resultados obtenidos se expresaron como mcg recuperados, con lo cual se calculó la ecuación de la recta por mínimos cuadrados de la relación entre mcg adicionados (x) y mcg recuperados (y). Se calculo además el coeficiente de determinación, ordenada al origen y pendiente; así como el intervalo de confianza al 95% de la pendiente y la ordenada al origen. Los resultados de mcg recuperados se expresaron como porciento recuperado y se calculo el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación; así como el intervalo de confianza al 95% del porciento recuperado.

Los criterios de aceptación fueron los siguientes:

El intervalo de confianza al 95% para la ordenada al origen debía contener al cero, o en su defecto la ordenada relativa debía estar entre -0.05 y 0.05.

El intervalo de confianza al 95% de la pendiente debía contener al uno, o en su defecto la pendiente relativa debería estar entre 1.05 y 0.95.

El coeficiente de variación de la regresión no debería ser mayor a 5.0%.

El intervalo de confianza del Porcentaje recuperado global debía estar entre 95.0 y 105.0 % y el coeficiente de variación del Porcentaje recuperado no debía ser mayor a 5.0%.

9.8. Exactitud del método.

Se calculó a partir de los datos de las seis réplicas del nivel MC2 de Linealidad del método expresados como porcentaje recuperado calculando por nivel y global el promedio, desviación estándar el coeficiente de variación; se calculó además el intervalo de confianza al 95% para el porcentaje recuperado global.

El criterio de aceptación consistió en que intervalo de confianza al 95% para el porcentaje recuperado se incluyera dentro del intervalo 95%-105%.

9.9. Precisión del método.

9.9.1. Repetibilidad.

Se evaluó con las mismas muestras empleadas para la prueba de exactitud del método (6 réplicas).

El criterio de aceptación consistió en que los coeficientes de variación de los porcentajes recuperados no debían ser mayores a 5.0%.

9.10. Estabilidad Analítica de la muestra.

Se evaluó almacenando en el inyector a temperatura ambiente, las muestras del nivel MC2, preparadas para la linealidad del método e inyectando al sistema cromatográfico a las 24 y 48 horas. Se cuantificó en cada tiempo con respecto a una curva de calibración recién preparada.

El criterio de aceptación consistió en que la diferencia absoluta de los promedios del porcentaje cuantificado de Testosterona a las 24 y 48 horas, respecto al tiempo cero (inicial) no fuera mayor al 5.0% para considerar la muestra estable.

9.11. Tolerancia.

Se evaluó analizando tres réplicas del punto MC2 de linealidad del método, en dos días diferentes, cambiando en el segundo día la columna por una de iguales características (Identificada como CA9802 con un mayor tiempo de uso) a la utilizada el primer día (Identificada como CA2003061 con un tiempo de uso menor).

Como criterio de aceptación se tomó que el porcentaje cuantificado promedio obtenido con la columna alterna no difiriera en más del 5.0% respecto al porcentaje cuantificado promedio de la columna inicial.

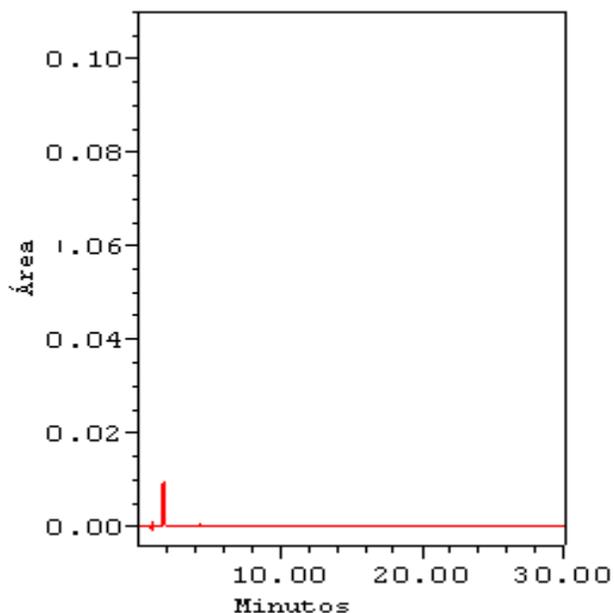
10. RESULTADOS DEL MÉTODO ANALÍTICO DE VALORACIÓN

10.1. Especificidad A:

Excipientes

En la figura 14 se muestra el cromatograma del placebo. Puede observarse que en el cromatograma no aparece ninguna señal que interfiera con la de Testosterona, razón por la cual el método es específico para la cuantificación de testosterona en presencia de los excipientes de la formulación.

Figura 14. Especificidad a Excipientes



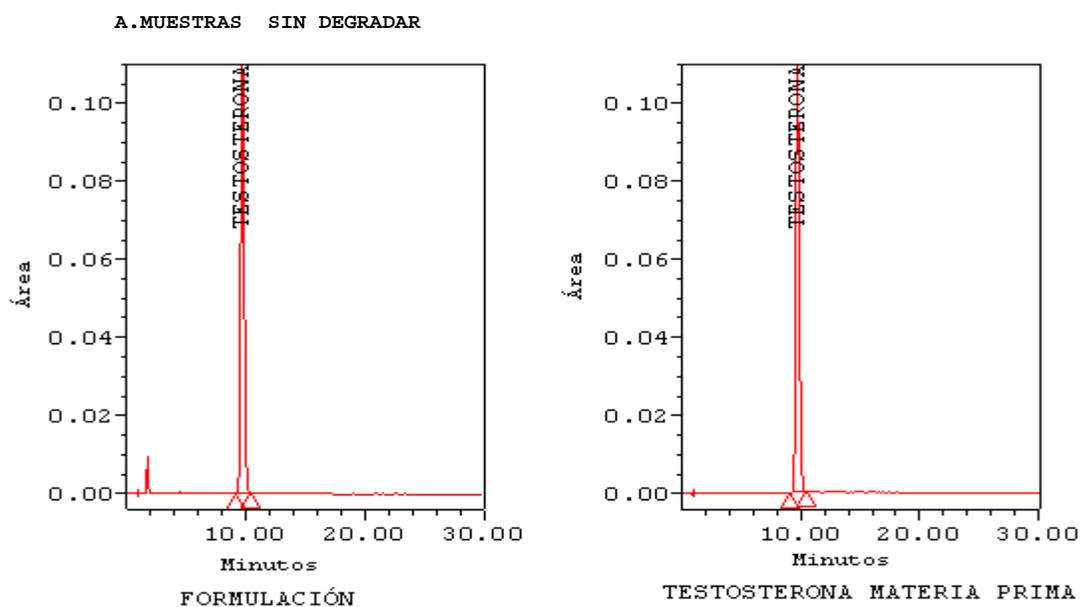
Productos de degradación.

En la figura 15 se aprecian cromatogramas representativos de la formulación puesta a degradar bajo las condiciones de acidez, basicidad y degradación térmica.

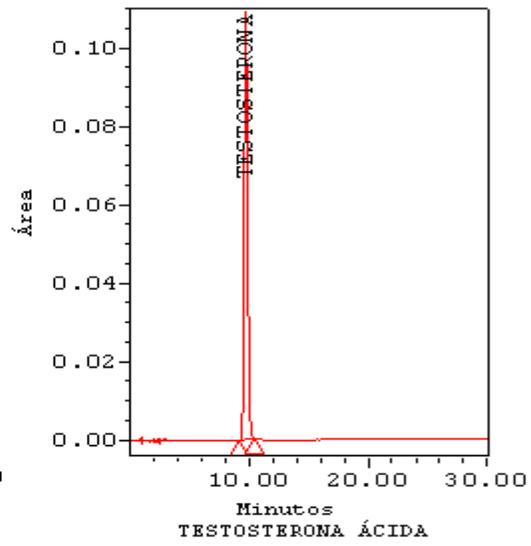
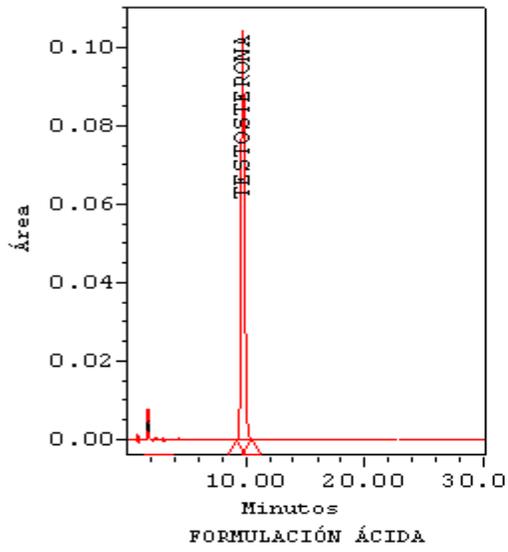
Se confirma la pureza de las señales del compuesto de interés, al observarse que los valores de ángulo de pureza son menores a los de pureza umbral, lo que significa ausencia de coelución.

Con base a los resultados obtenidos, el método es específico en la cuantificación de Testosterona, en presencia de productos de degradación.

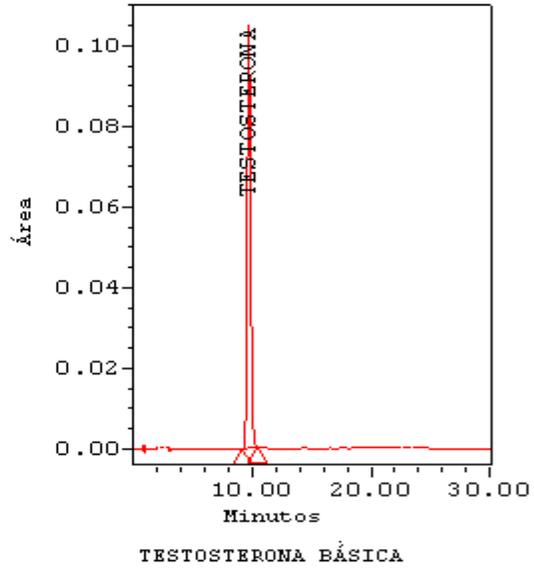
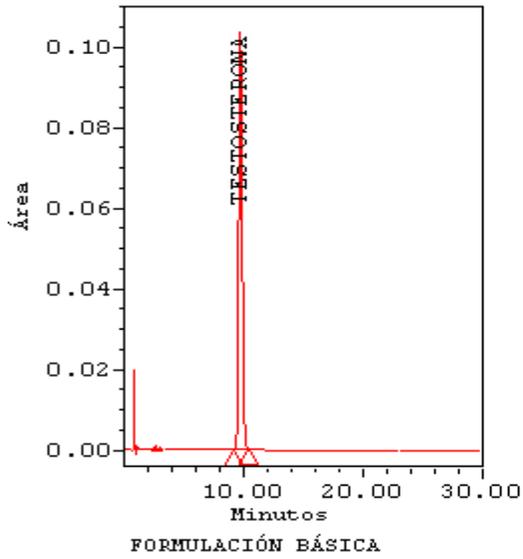
Figura 15. Especificidad a Productos de Degradación.



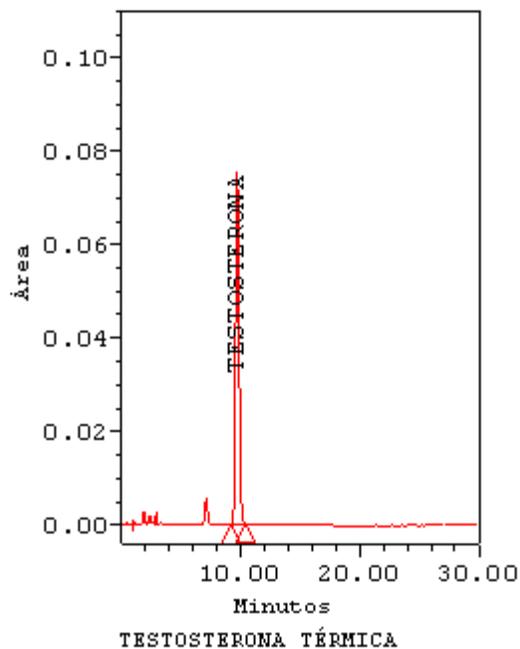
B. DEGRADACIÓN ÁCIDA



C. DEGRADACIÓN BÁSICA



D.DEGRADACIÓN TÉRMICA



10.2. Linealidad del sistema.

En la figura 16 se muestra la gráfica de la recta obtenida para la linealidad del sistema. En la tabla 21 se observa que el coeficiente de determinación (r^2) de la recta obtenida es mayor a 0.98, el intervalo de confianza de la pendiente no incluye al cero, el coeficiente de variación del factor respuesta no es mayor a 1.5%. Razones por lo cual se concluye que el sistema es lineal para testosterona.

Figura 16. Linealidad del Sistema.

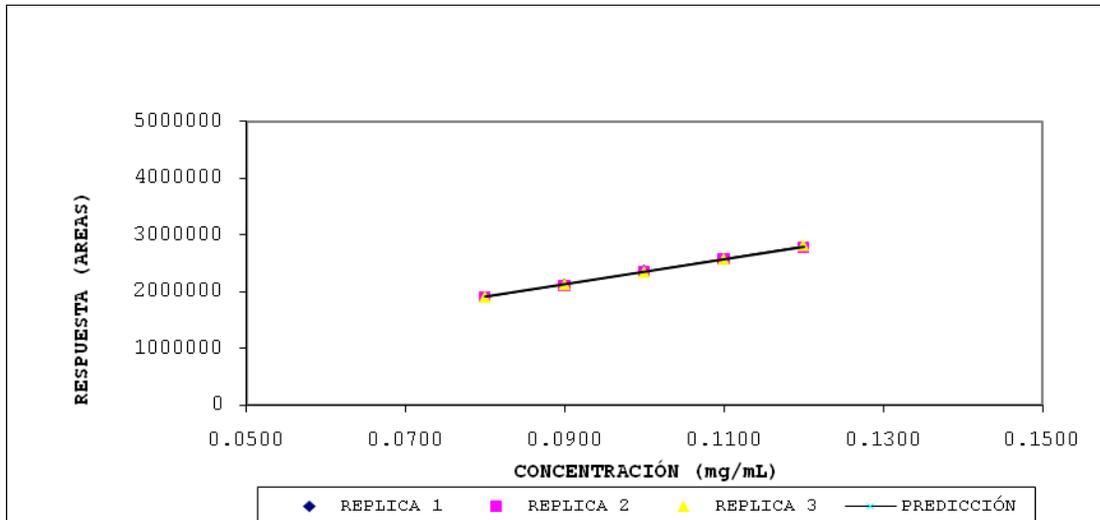


Tabla 21. Linealidad del Sistema

A. RESPUESTA EN CADA NIVEL Y PRECISIÓN DEL FACTOR RESPUESTA

NIVEL %	CONCENTRACIÓN mg/mL	RESPUESTA AREAS	FACTOR RESPUESTA
80.0	0.0800	1906354	23829425.0
	0.0800	1910951	23886887.5
	0.0800	1916442	23955525.0
90.0	0.0900	2137152	23746133.3
	0.0900	2106892	23409911.1
	0.0900	2136862	23742911.1
100.0	0.1000	2383455	23834550.0
	0.1000	2346240	23462400.0
	0.1000	2356243	23562430.0
110.0	0.1100	2586126	23510236.4
	0.1100	2572945	23390409.1
	0.1100	2582347	23475881.8
120.0	0.1200	2811769	23431408.3
	0.1200	2770732	23089433.3
	0.1200	2824333	23536108.3
		n =	15
		PROMEDIO =	23590910.02
		D. E. =	2.35E+05
		C.V. =	1.0%

B. ECUACIÓN DE LA RECTA

$$y = 22355620.0000 \ x + 121027.5333$$

$$r^2 = 0.9978$$

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

	ORDENADA AL ORIGEN	PENDIENTE
Límite Superior =	184239.8	22981514.5
Límite Inferior =	57815.3	21729725.5

10.3. Adecuabilidad del sistema.

Como puede observarse en la tabla 22, el coeficiente de variación para la respuesta de Testosterona no es mayor al 2.0%, con lo cual se concluye que el sistema es adecuado.

Tabla 22. Adecuabilidad del Sistema

DETERMINACIÓN	CONCENTRACIÓN (mg/mL)	RESPUESTA
1	0.100	2489802
2	0.100	2441260
3	0.100	2456651
4	0.100	2401155
5	0.100	2428761
6	0.100	2400452
n =		6
PROMEDIO =		2436347
D.E. =		34287.9
C.V. =		1.4%

10.4. Precisión del sistema.

El coeficiente de variación (C.V.), para la respuesta de Testosterona no es mayor a 1.5%, con lo cual se concluye que el sistema es preciso.

10.5. Linealidad del método.

En la figura 17 se observa la gráfica de la recta para la linealidad del método, correspondiente a Testosterona, mientras que en la tabla 23 se reportan los resultados obtenidos en donde se puede observar que:

- El Coeficiente de determinación de la recta para mg adicionados contra mg recuperados es mayor a 0.98.
- El intervalo de confianza al 95% de la pendiente incluye al uno.

- El intervalo de confianza al 95% de la ordenada al origen incluye al cero.

- El coeficiente de variación de la regresión es menor a 2%

- El intervalo de confianza al 95% del porcentaje recuperado global está contenido entre 98.0 y 102.0%

- El coeficiente de variación del porcentaje recuperado no es mayor al 2.0%.

Por lo que se concluye que el método es lineal en el intervalo de 80.0 a 120.0% de la dosis nominal de 170 mg.

Figura 17. Linealidad del Método

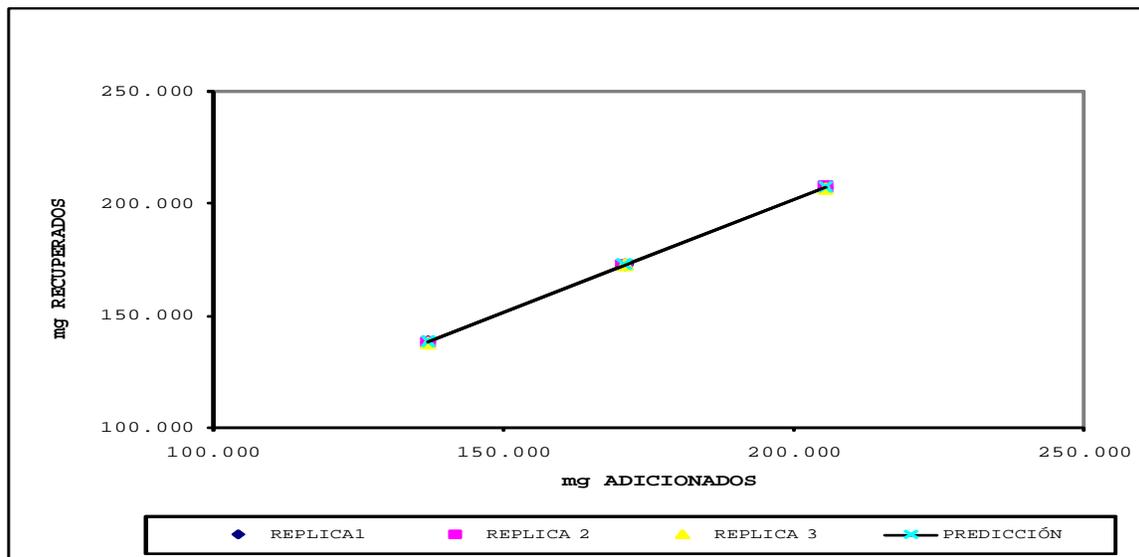


Tabla 23. Linealidad del Método

A. mg RECUPERADOS EN CADA NIVEL

NIVEL %	CANTIDAD	
	ADICIONADA (mg)	RECUPERADA (mg)
80	137.000	137.899
	137.000	138.124
	137.000	137.353
100.0	171.100	172.394
	171.100	172.608
	171.100	172.442
120	205.400	206.601
	205.400	206.770
	205.400	206.012

B. ECUACIÓN DE LA RECTA

$$y = 1.0039 x + 0.4072$$

$$r^2 = 0.9998$$

$$C.V. = 0.2\%$$

C. INTERVALO DE CONFIANZA AL 95 % $g_1 = 7$ PARA LA ORDENADA AL ORIGEN Y LA PENDIENTE

	ORDENADA AL ORIGEN	PENDIENTE
Límite Superior =	2.3221	1.0150
Límite Inferior =	-1.5077	0.9929

D. POR CIENTO RECUPERADO EN CADA NIVEL

NIVEL %	80.0	100.0	120.0
RÉPLICA	POR CIENTO RECUPERADO		
1	100.656	100.756	100.585
2	100.820	100.881	100.667
3	100.258	100.784	100.298
n =	3	3	3
PROMEDIO =	100.6	100.8	100.5
D. E. =	2.89E-01	6.56E-02	1.94E-01
C.V. =	0.3%	0.1%	0.2%
n =	9		
PROMEDIO =	100.6		
D. E. =	2.21E-01		
C.V. =	0.2%		

E. INTERVALO DE CONFIANZA AL 95%, $g_1 = 8$ PARA EL POR CIENTO RECUPERADO

$$\text{Límite Superior} = 100.8\%$$

$$\text{Límite Inferior} = 100.5\%$$

10.6. Exactitud del método.

En la tabla 24 se muestran los datos de exactitud del método en donde puede observarse que el valor promedio del porcentaje recuperado de Testosterona y su intervalo de confianza al 95% se encuentra entre 98.0-102.0%, por lo cual se concluye que el método es exacto.

Tabla 24. Exactitud y Repetibilidad del Método

A. POR CIENTO RECUPERADO AL NIVEL DE 100 %

MUESTRA	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	POR CIENTO RECUPERADO
1	171.200	171.796	100.348
2	171.100	172.634	100.897
3	171.200	173.326	101.242
4	171.200	172.442	100.725
5	171.200	172.608	100.822
6	171.200	172.394	100.697
			n = 6
			PROMEDIO = 100.8
			D.E. = 2.91E-01
			C.V. = 0.3%

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

LÍMITE SUPERIOR = 101.1%
LÍMITE INFERIOR = 100.5%

10.7. Precisión del método.

10.7.1. Repetibilidad.

En la tabla 24 puede observarse que el C.V. del porcentaje recuperado de Testosterona no es mayor al 2.0%.

10.7.2. Precisión intermedia.

En la tabla 25 se muestra el coeficiente de variación del porcentaje recuperado por día, por analista y global. Como puede observarse el C.V no es mayor al 2.0%.

Tabla 25. Precisión intermedia.

DIA 1	POR CIENTO CUANTIFICADO	
	ANALISTA 1	ANALISTA 2
	99.250	99.960
	99.450	99.990
	99.220	99.500
n =	3	3
PROMEDIO =	99.307	99.817
D.E. =	1.25E-01	2.75E-01
C.V. =	0.1%	0.3%
	n =	6
	PROMEDIO =	99.6
	D.E. =	3.38E-01
	C.V. =	0.3%
DIA 2	POR CIENTO CUANTIFICADO	
	ANALISTA 1	ANALISTA 2
	100.883	100.776
	100.962	100.842
	101.578	100.729
n =	3	3
PROMEDIO =	101.141	100.782
D.E. =	3.81E-01	5.68E-02
C.V. =	0.4%	0.1%
	n =	6
	PROMEDIO =	101.0
	D.E. =	3.13E-01
	C.V. =	0.3%
ESTADÍSTICOS GLOBALES	n =	12
	PROMEDIO =	100.3
	D.E. =	7.94E-01
	C.V. =	0.8%

10.8. Estabilidad de la muestra.

En la tabla 26 se presentan los datos de porcentos cuantificados (promedios) de Testosterona para cada tiempo (24 y 48 horas) y la diferencia que hay entre éstos con respecto al tiempo cero. Como puede notarse, en ningún caso la diferencia es mayor al 2.0%, razón por la cual se consideró que la estabilidad de las muestras de Testosterona es de al menos 48 horas.

Tabla 26. Estabilidad de la muestra.

CONDICIÓN	TIEMPO (Hrs)	PROMEDIO DEL POR CIENTO CUANTIFICADO	DIFERENCIA ABSOLUTA RESPECTO A INICIAL
INICIAL	0	100.800	---
TEMPERATURA AMBIENTE	24	99.900	0.9
TEMPERATURA AMBIENTE	48	101.100	0.3

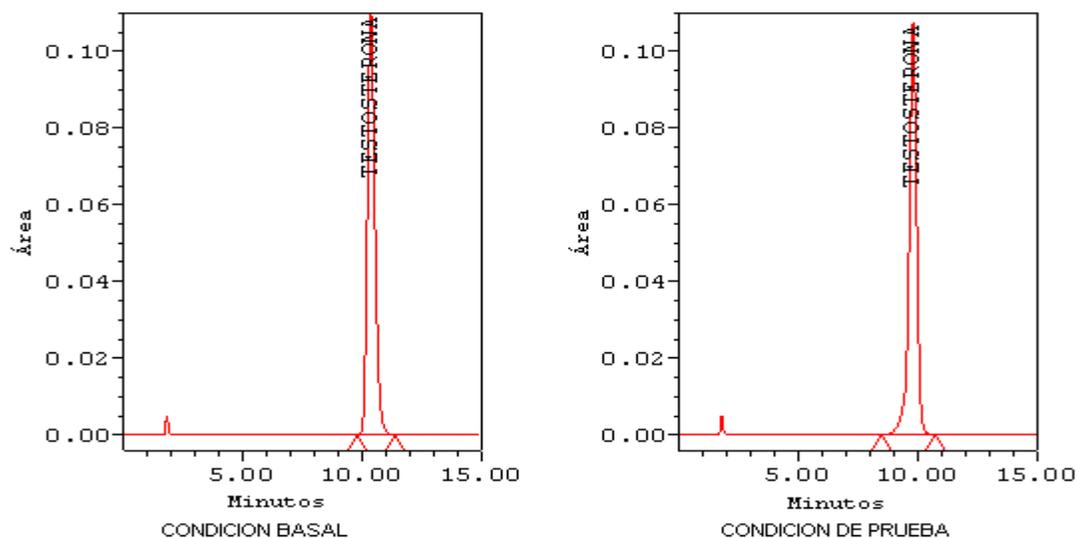
10.9. Tolerancia.

En la figura 18 se muestran los cromatogramas obtenidos en las diferentes columnas y en la tabla 27 se presenta el coeficiente de variación del porcentaje recuperado no es mayor al 2.0% y la diferencia del promedio del porcentaje recuperado respecto a la condición basal no debe ser mayor al 2.0%, por lo cual se cumple con el criterio.

Tabla 27. Condiciones para evaluar Tolerancia.

CONDICIÓN	PROMEDIO DEL POR CIENTO CUANTIFICADO	DIFERENCIA ABSOLUTA RESPECTO A ORIGINAL
1	101.100	---
2	101.200	0.1

Figura 18. Tolerancia



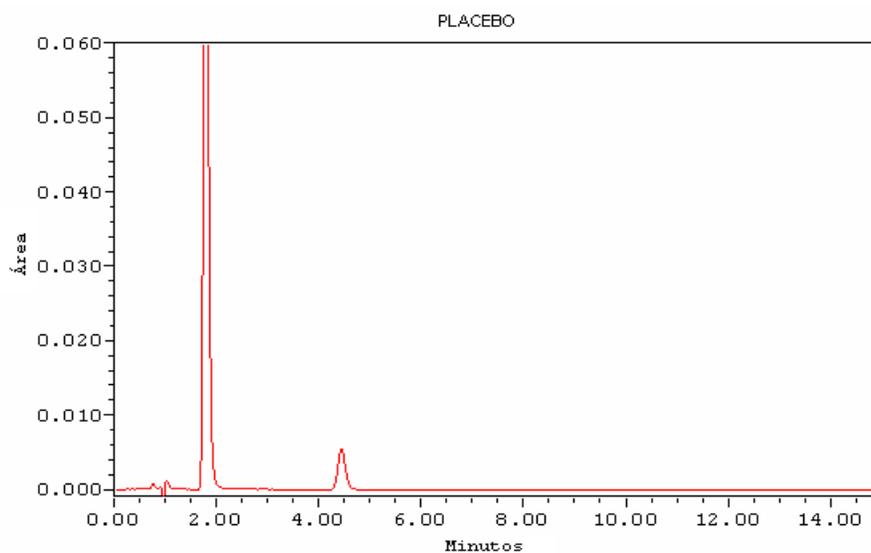
11. RESULTADOS DEL MÉTODO ANALÍTICO DE CUANTIFICACIÓN DE IMPUREZAS

11.1. Especificidad A:

Excipientes.

La figura 19 muestra los resultados de la prueba de especificidad a excipientes. Los cromatogramas del placebo no presentan señal alguna al tiempo de elución de la Testosterona, razón por la cual el método es específico para la cuantificación de Testosterona en presencia de los excipientes de la formulación.

Figura 19. Especificidad a excipientes

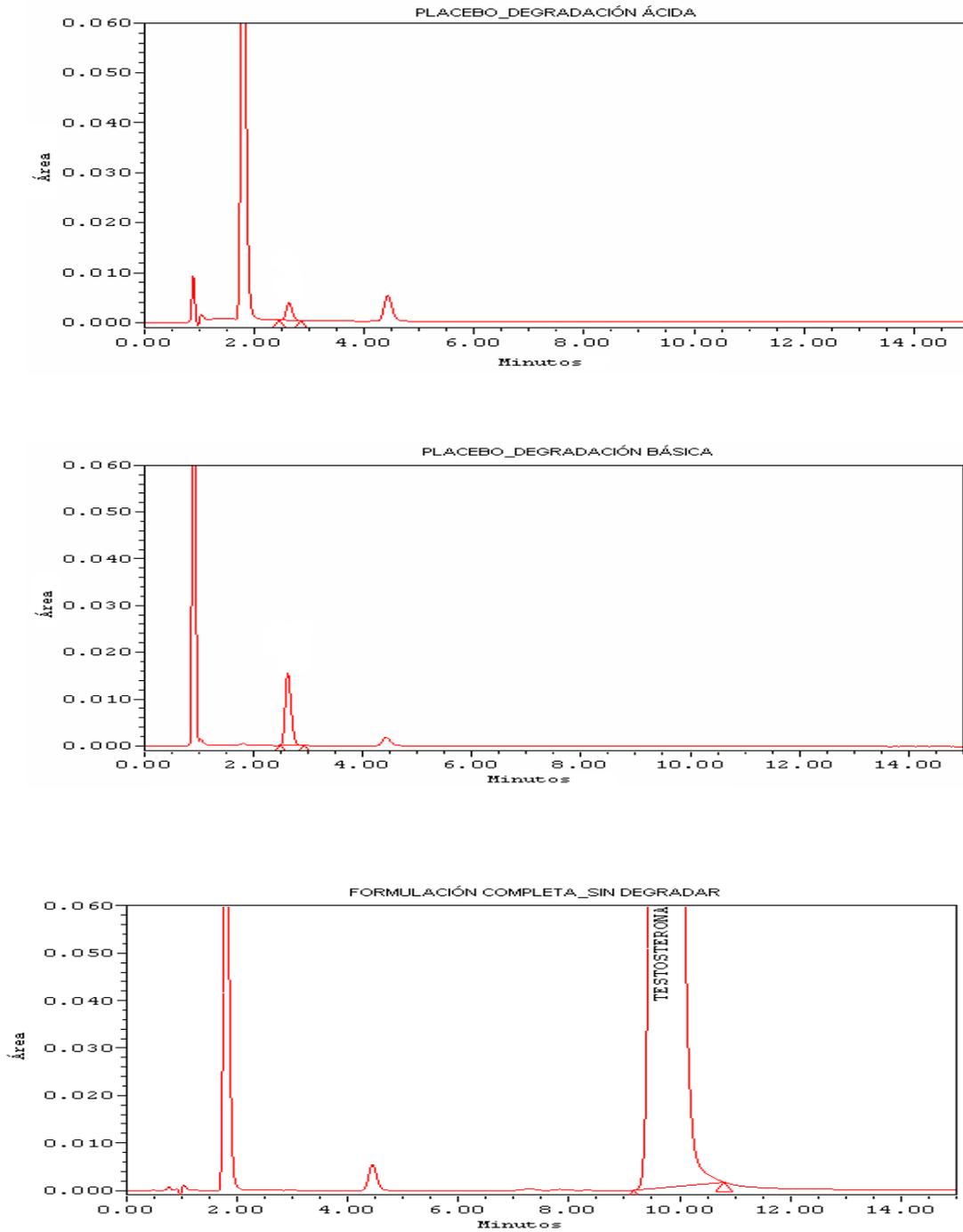


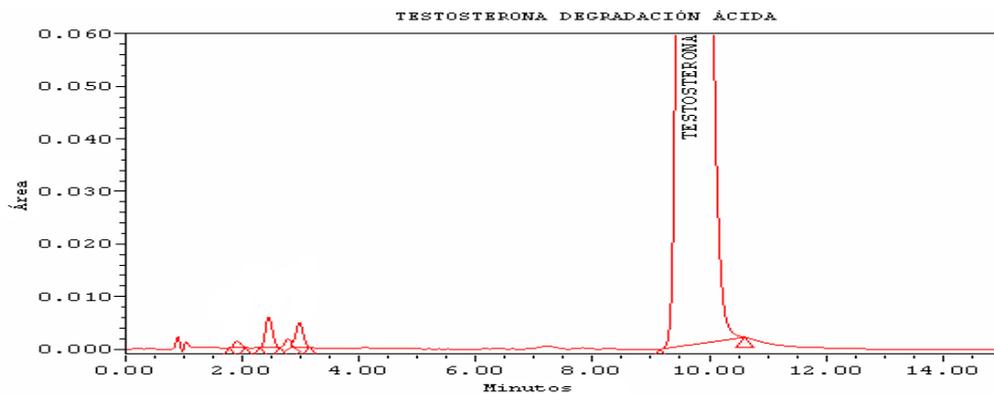
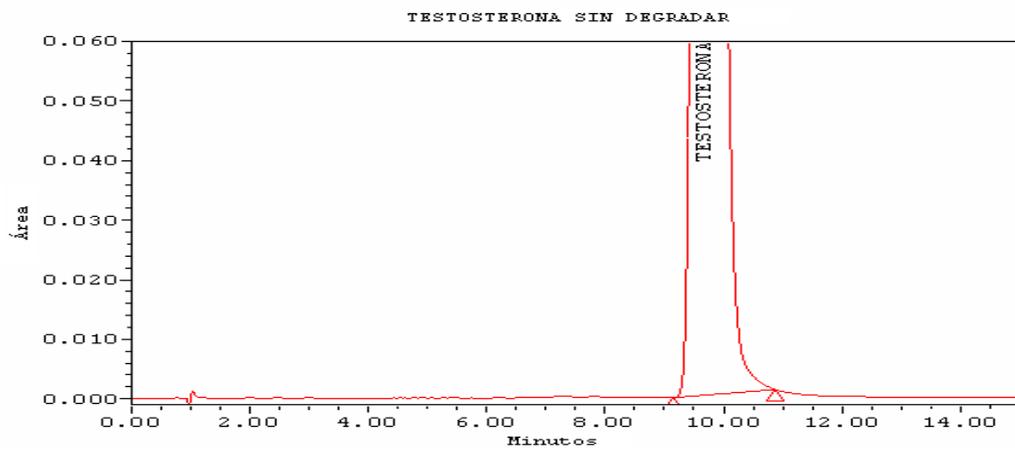
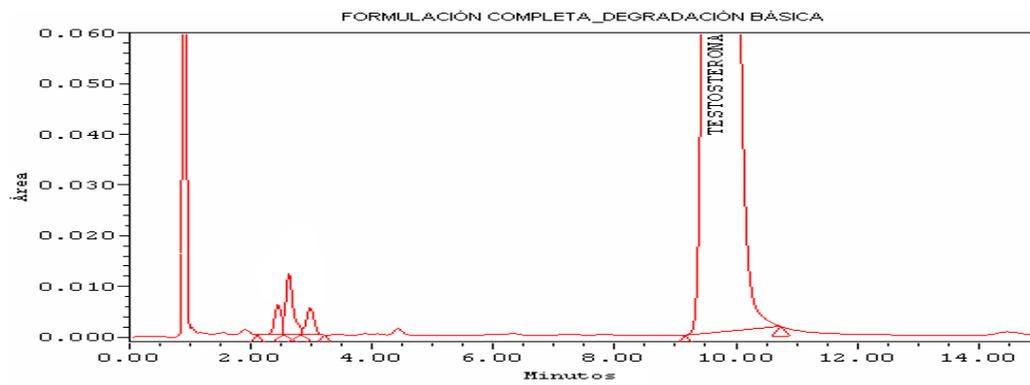
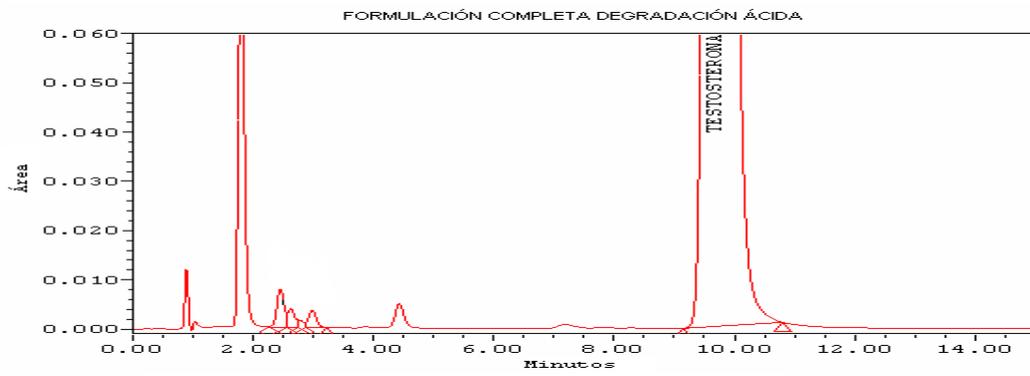
Productos de degradación.

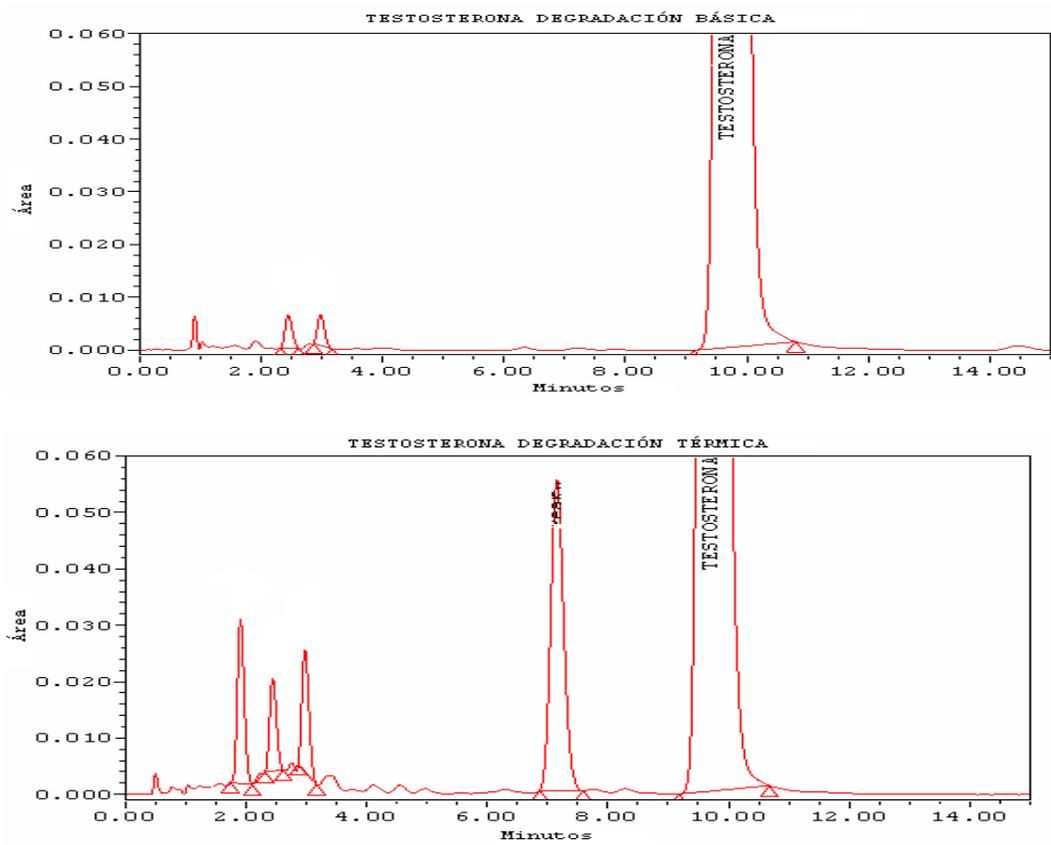
En la figura 20 se puede apreciar que los cromatogramas de los productos de degradación no presentan señal alguna que interfiera con la señal de Testosterona.

Se confirma la pureza de la señal de Testosterona al observarse que los valores de ángulo de pureza (PA) son menores a los de pureza umbral (TH), lo que significa ausencia de coelución.

Figura 20. Especificidad a Productos de Degradación







11.2. Linealidad del sistema.

En la figura 21 se muestra la gráfica de la linealidad del sistema. En la tabla 28 se observa que el coeficiente de determinación (r^2) de la recta obtenida para la relación entre la concentración y la respuesta analítica es superior a 0.98, que el intervalo de confianza al 95% para la pendiente no contiene al cero, además de que el coeficiente de variación del factor respuesta es menor al 5.0%.

Figura 21. Linealidad del Sistema

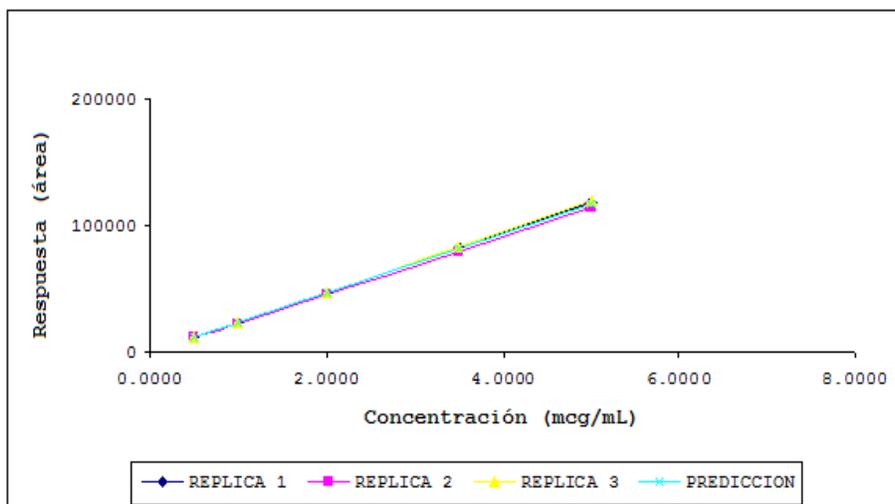


Tabla 28. Linealidad del Sistema

A. RESPUESTA EN CADA NIVEL Y PRECISIÓN DEL FACTOR RESPUESTA

IDENTIFICACIÓN MUESTRA	CONCENTRACIÓN (mcg/mL)	RESPUESTA AREAS	FACTOR RESPUESTA
S1	0.5000	11723	23446.00
	0.5000	11468	22936.00
	0.5000	11414	22828.00
S2	1.0000	23475	23475.00
	1.0000	22709	22709.00
	1.0000	23193	23193.00
S3	2.0000	46926	23463.00
	2.0000	45561	22780.50
	2.0000	47376	23688.00
S4	3.5000	82662	23617.71
	3.5000	79732	22780.57
	3.5000	83182	23766.29
S5	5.0000	117877	23575.40
	5.0000	114591	22918.20
	5.0000	119815	23963.00
n =			15
PROMEDIO =			23276.0
D. E. =			4.19E+02
C.V. =			1.8%

B. ECUACIÓN DE LA RECTA

$$y = 23533.9878 x - 367.9708$$

$$r^2 = 0.9990$$

C. INTERVALO DE CONFIANZA AL 95 % $g_1 = 13$ PARA LA ORDENADA AL ORIGEN Y LA PENDIENTE

	ORDENADA AL ORIGEN	PENDIENTE
Límite Superior =	944.1531	23984.0426
Límite Inferior =	-1680.0947	23083.9330

11.3. Adecuabilidad del sistema.

El coeficiente de variación de la respuesta de Testosterona durante la validación y considerando el cambio de columna fue menor al 5.0% en las 5 inyecciones de SA.

11.4. Precisión del sistema.

Tal como puede notarse en la tabla 29, el coeficiente de variación (C.V.) para la respuesta de Testosterona, es menor al 5.0% con lo cual se cumple con el criterio de aceptación implicado.

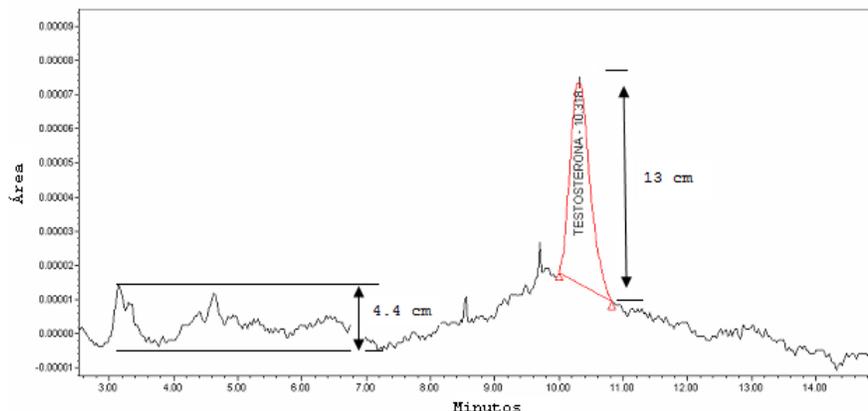
Tabla 29. Precisión del Sistema

INYECCIÓN No.	CONCENTRACIÓN mcg/mL	RESPUESTA AREA
1	2.000	47493
2	2.000	47286
3	2.000	47236
4	2.000	47554
5	2.000	47355
6	2.000	47148
n =		6
PROMEDIO =		47345.3
D.E. =		1.55E+02
C.V. =		0.3%

11.5. Límite de detección.

En la figura 22 se observa el cromatograma de la concentración que cumplió con la proporción 3:1 con respecto a la línea base fue la de 0.025 µg/mL en las cinco replicas.

Figura 22. Límite de Detección (Concentración de Testosterona 0.025 µg/mL)



11.6. Límite de cuantificación.

Se observa en la tabla 30 al utilizar los datos correspondientes al nivel L1 de linealidad del método que el C.V del porciento recuperado no es mayor al 5.0% y el promedio del porciento recuperado está dentro del intervalo 95% a 105%, por lo que el límite de cuantificación queda establecido en 0.5 µg/mL, correspondiente a un contenido de impurezas de 0.05%.

11.7. Linealidad del método.

En la figura 23 se observa la gráfica de la recta para la linealidad del método, mientras que en la tabla 30 se reportan los valores de: r^2 (mayor a 0.98) para la relación entre los µg recuperados y los µg adicionados de Testosterona, el C.V. del Porciento recuperado por cada nivel, así como el global (los cuales son menores a 5.0%), el Porciento recuperado promedio para los niveles individuales y el global, así como el intervalo de confianza al 95% (los cuales se encuentran en el intervalo 95.0 y 105.0%), el intervalo de confianza al 95% para la pendiente (el cual incluye al uno) y el intervalo de confianza al 95% para la ordenada al origen (que incluye al cero).

Tabla 30. Linealidad del Método

A. mcg RECUPERADOS EN CADA NIVEL

MUESTRA	CANTIDAD	
	ADICIONADA (mcg)	RECUPERADA (mcg)
L1	12.500	12.832
	12.500	12.588
	12.500	12.726
L2	50.000	51.041
	50.000	50.515
	50.000	49.992
L3	125.000	124.728
	125.000	126.161
	125.000	125.847

B. ECUACIÓN DE LA RECTA

$$y = 1.0029 x + 0.2562$$

$$r^2 = 0.9999$$

$$C.V. = 0.8\%$$

C. INTERVALO DE CONFIANZA AL 95 % $g_1 = 7$ PARA LA ORDENADA AL ORIGEN Y LA PENDIENTE

	ORDENADA AL ORIGEN	PENDIENTE
Límite Superior =	0.9191	1.0114
Límite Inferior =	-0.4068	0.9944

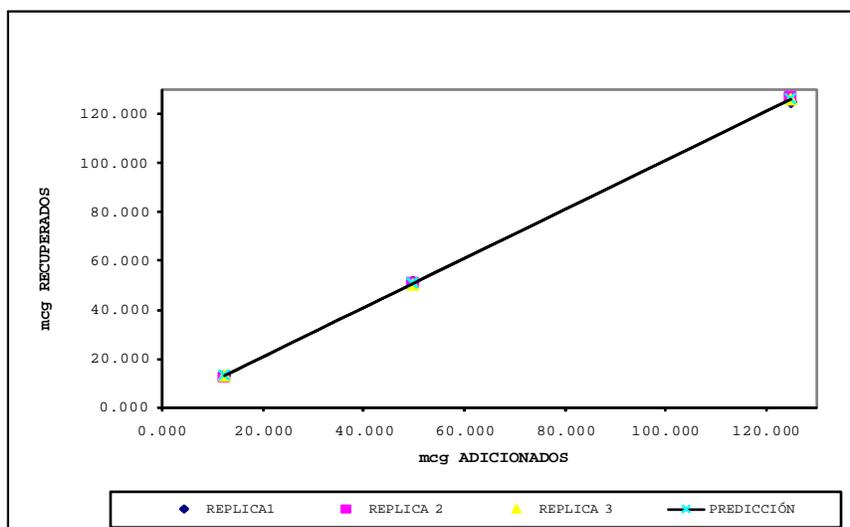
D. POR CIENTO RECUPERADO EN CADA NIVEL

NIVEL %	L1	L2	L3
RÉPLICA	POR CIENTO RECUPERADO		
1	102.656	102.082	99.782
2	100.704	101.030	100.929
3	101.808	99.984	100.678
n =	3	3	3
PROMEDIO =	101.7	101.0	100.5
D. E. =	9.79E-01	1.05E+00	6.03E-01
C.V. =	1.0%	1.0%	0.6%
n =	9		
PROMEDIO =	101.1		
D. E. =	9.51E-01		
C.V. =	0.9%		

E. INTERVALO DE CONFIANZA AL 95%, $g_1 = 8$ PARA EL POR CIENTO RECUPERADO

Límite Superior =	101.8%
Límite Inferior =	100.3%

Figura 23. Linealidad del Método.



11.8. Exactitud del método.

En la tabla 31 puede notarse que el valor promedio del porcentaje recuperado de Testosterona y su intervalo de confianza al 95% se encuentra entre 95.0-105.0%.

Tabla 31. Exactitud y Repetibilidad del Método

A. POR CIENTO RECUPERADO AL NIVEL DE 100 %

MUESTRA	CANTIDAD ADICIONADA (mcg)	CANTIDAD RECUPERADA (mcg)	POR CIENTO RECUPERADO
1	50.000	50.323	100.646
2	50.000	50.974	101.948
3	50.000	50.321	100.642
4	50.000	50.396	100.792
5	50.000	51.210	102.420
6	50.000	50.024	100.048
n =			6
PROMEDIO =			101.1
D.E. =			9.03E-01
C.V. =			0.9%

B. INTERVALO DE CONFIANZA AL 95%, g1 = 5 PARA EL POR CIENTO RECUPERADO AL 100 %

LÍMITE SUPERIOR = 102.0%
 LÍMITE INFERIOR = 100.1%

11.9. Precisión del método.

11.9.1. Repetibilidad.

En la tabla 31 puede verse que el C.V. del Porciento recuperado de Testosterona no es mayor al 5.0%, con lo cual se cumple con el criterio de aceptación.

11.10. Estabilidad analítica de la muestra.

En la tabla 32 se presentan los datos del Porciento cuantificado (promedio) Testosterona para cada tiempo (24 y 48 horas) y la diferencia que hay entre éstos con respecto al tiempo cero.

Se consideró que la estabilidad de las muestras es de al menos 48 horas, ya que la diferencia de la cuantificación a este tiempo no difiere en más del 5.0% respecto al porciento cuantificado en la condición inicial.

Tabla 32. Estabilidad de la Muestra

CONDICIÓN	TIEMPO (Hrs)	PROMEDIO DEL POR CIENTO CUANTIFICADO	DIFERENCIA ABSOLUTA RESPECTO A INICIAL
INICIAL	0	101.000	---
TEMPERATURA AMBIENTE	24	103.100	2.1
TEMPERATURA AMBIENTE	48	102.270	1.3

11.11. Tolerancia.

En la figura 24 se muestran los cromatogramas de la solución SA obtenidos por la condición evaluada (Cambio de columna por CA 98-02) y en la tabla 33 se muestran los porcentajes recuperados de Testosterona de la muestra preparada por triplicado. Puede apreciarse que la diferencia del Porciento recuperado de este esteroide con el cambio de columna no es mayor al 5.0% respecto al promedio del Porciento recuperado con la condición original, razón por la cual cumple con el criterio.

Figura 24. Tolerancia

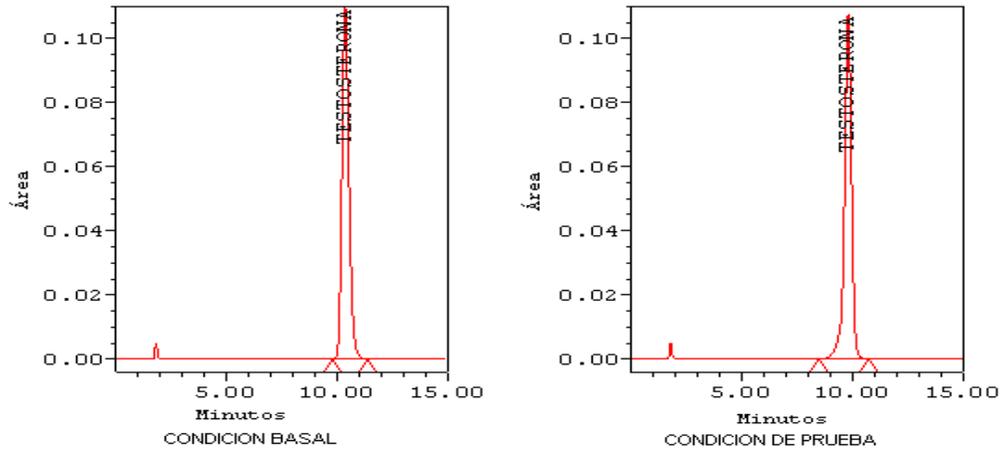


Tabla 33. Tolerancia

CONDICIÓN	PROMEDIO DEL POR CIENTO CUANTIFICADO	DIFERENCIA ABSOLUTA RESPECTO A ORIGINAL
1	103.200	---
2	102.000	1.2

12. CONCLUSIONES GENERALES.

12.1. Método de valoración.

- El método es específico a excipientes.
- El método es específico a los productos de degradación.
- El sistema es lineal en el intervalo de 0.8-0.12 mg/mL de Testosterona.
- El sistema cumple con los parámetros de adecuación.
- El sistema es preciso para Testosterona
- El método es lineal en el intervalo de 80-120% de la dosis de 170 mg de Testosterona.
- El método es exacto y preciso para Testosterona.
- El método es reproducible.
- El método es tolerante a cambios de columna de las mismas características.
- Las muestras son estables transcurridas 48 horas después de su preparación.

12.2. Método de cuantificación de impurezas.

- El método es específico a excipientes.
- El método es específico a los productos de degradación ácida, básica y térmica.
- El sistema es lineal en el intervalo de 0.5-5.0 µg/mL de Testosterona.
- El sistema es preciso para Testosterona.
- El límite de detección es de 0.025 µg/mL.
- El límite de cuantificación es de 0.5 µg/mL.
- El método es lineal en el intervalo de 0.5-5.0 µg/mL equivalente a 0.05%-0.5% de contenido de impurezas de la concentración de Testosterona en la formulación.

- El método es exacto y preciso para Testosterona.
- El método es reproducible para Testosterona.
- El método es tolerante frente a cambios de columna de características iguales.
- Las muestras de Testosterona son estables transcurridas 48 horas después de su preparación, almacenadas a temperatura ambiente en el inyector.

12.3. Análisis de resultados y Conclusión general.

Con base a los resultados podemos apreciar que el método obtenido nos permite cuantificar la Testosterona (valoración) y determinar la degradación de ésta, cuantificando tanto a sustancias relacionadas (materia prima) como a productos de degradación (producto a granel y terminado).

El método obtenido tiene amplias ventajas comparado con los métodos farmacopeicos reportados, ya que el sistema es isocrático, con un tiempo de corrida menor y permite la evaluación del proceso de fabricación.

El método analítico para la cuantificación de Testosterona y sus impurezas en suspensión parenteral de Testosterona, es confiable para su aplicación en estudio de estabilidad del producto ya mencionado.

13. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. Guía de Validación. México: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. 2002.
- 2.- International Conference Harmonisation. Impurities in New Drug Substances. U.S.A: ICH; 2003 (Guidance for Industry; Q3A)
- 3.- International Conference Harmonisation. Impurities in New Drug Products. U.S.A: ICH; 2006 (Guidance for Industry; Q3B)
- 4.- International Conference Harmonisation. Text on Validation of Analytical Procedures. U.S.A: ICH; 1995 (Text on Validation of Analytical Procedures; Q2A)
- 5.- International Conference Harmonisation. Validation of Analytical Procedures Methodology. U.S.A: ICH; 1996 (Guidance for Industry; Q2B)
- 6.- Federal drug Administration. Analytical Procedures and Methods Validation: Chemistry, Manufacturing, and Controls documentation. U.S.A.: F.D.A; 2000 (Guidance for Industry)
- 7.- British Pharmacopoeia Commission. Testosterone. En British Pharmacopoeia. Great Britain: British Pharmacopoeia Commission; 2005. p. 1886-1887.
- 8.- Convention on the elaboration of a European Pharmacopoeia. Testosterone. En European Pharmacopoeia. Europe: Convention on the elaboration of a European Pharmacopoeia; 2008. p. 3030-3031.
- 9.- The United States Pharmacopoeial Convention. Testosterone. En United States Pharmacopoeia. Washington U.S.A. : The United States Pharmacopoeial Convention; 2007. p. 2087.
- 10.- Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. México: Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos; 2004.
- 11.- Snyder Lloyd R., Kirkland Joseph. United States of America. Wiley and Sons, Inc. 1979.
- 12.- Florey Klaus. Testosterone Enanthate. En Klaus Florey Analytical Profiles of Drug Substances Vol.4. London: Academic Press; 1975. P. 452-465.
- 13.- Yost R. W., Ettore L.S. and Conlon R.D. United States of America. Perkin-Elmer. 1981
- 14.- Ravindranath B., United States of America. John Wiley and Sons. 1989.
- 15.- Pietrzyk Donald J. and Clyde W. 2a. ed. México, D.F. Interamericana. 1983.

- 16.- Martínez Ricardo. Curso en Principios Básicos de la Cromatografía. En Centro A.F. de Estudios Tecnológicos. México. 2007.
- 17.- Martínez Ricardo. Curso en HPLC (High Performance Liquid Chromatography) Básico para Nuevos Usuarios. En Centro A.F. de Estudios Tecnológicos. México. 2007.
- 18.- Martínez Ricardo. Curso en Uso y Cuidado de Columnas Cromatograficas. En Centro A.F. de Estudios Tecnológicos. México. 2007.
- 19.- Skoog Douglas; Holler James and Nieman Timothy. 5a. ed. España. McGraw Hill/ Interamericana. 2001.
- 20.- Pryde Andrew and Gilbert Mary. Chapman and Hall. New York, 1979.
- 21.- Norma Oficial Mexicana NOM-073. Estabilidad de Fármacos y Medicamentos. (Diario Oficial de la Federación 04 de enero del 2006)
- 22.- Norma Oficial Mexicana NOM-059. Buenas Prácticas de Fabricación para Establecimientos de la Industria Químico Farmaceutica dedicados a la fabricación de Medicamentos. (Diario Oficial de la Federación 31 de julio del 1998)