UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA DETECTAR TRAZAS DE BENZOCAÍNA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

OSCAR ORTIZ VÁZQUEZ

MEXICO, D.F. 2011

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

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	**Prof.: Buentello Rodríguez María Teresa**
VOCAL:	**Prof.: Alpizar Ramos María del Socorro**
SECRETARIO:	**Prof.: Franco Morales Iván Alejandro**
PRIMER SUPLENTE:	**Prof.: Faustino Vega Abraham**
SEGUNDO SUPLENTE:	**Prof.: Gómez Sánchez María Eugenia Ivette**

SITIO DONDE SE DESARROLLO LA TESIS:

Laboratorio Farmacéutico Bristol Myers-Squibb de México S. de R.L. de C.V.
Planta Tlalpan

ASESOR

_____

Alpizar Ramos María del Socorro

SUPERVISOR TECNICO

_____

Mendiola García Iliana

SUSTENTANTE

_____

Oscar Ortiz Vázquez

Página

OBJETIVO 1

INTRODUCCIÓN 1

CAPÍTULOS

I) GENERALIDADES

1.1.0 Validación de procesos 2
1.2.0 Validación de métodos analíticos 3
1.3.0 Límite de residuo permitido 6
1.3.1 Factor de seguridad 7
1.4.0 Validación del proceso de limpieza 9
1.4.1 Principios de limpieza 9
1.4.2 Técnicas de limpieza 9
1.4.3 Consideraciones en el proceso de limpieza. 10
1.5.0 Benzocaína 10
1.6.0 Cromatografía 12
1.6.1 Tipos de cromatografía 13
1.6.1.1 Cromatografía gas/líquido 14
1.6.1.2 Cromatografía gas/sólido 14
1.6.1.3 Cromatografía de intercambio iónico 14
1.6.1.4 Cromatografía de exclusión 15
1.6.1.5 Cromatografía fase normal 15
1.6.1.6 Cromatografía fase reversa 16
1.6.1.7 Cromatografía en papel 16
1.6.1.8 Cromatografía en capa fina 17

Dado que la metodología de la tesis fue realizada por HPLC se anexa dentro de este capítulo un apartado para hablar con más detalle de esta técnica.

1.6.1.9 Cromatografía de líquidos de alta resolución 17
1.6.1.9.1Columnas 19
1.6.1.9.2Equipo 22
1.6.1.9.3 Problemas con el equipo 23

II) PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

2.1.0 Definición 25
2.2.0 Alcance 25
2.3.0 Frecuencia 25
2.4.0 Lista de equipos e instrumentos 25
2.5.0 Lista de sustancias de referencia, reactivos y otros materiales 26
2.6.0 Preparación de reactivos necesarios para el método analítico 27

2.7.0 Parámetros de operación del método analítico 28
2.8.0 Adecuabilidad y precisión del sistema 28

2.9.0 Especificidad 28
2.10.0 Linealidad del sistema 29
2.11.0 Exactitud y precisión del método 31
2.12.0 Precisión intermedia 33
2.13.0 Sensibilidad 35
2.14.0 Robustez 35
2.14.1 Estabilidad de estándar 35
2.14.2 Estabilidad de la muestra 35
2.14.3 Prueba de hisopos 36
2.15.0 Tolerancia 36

III) INFORME DE LA VALIDACIÓN

3.1.0 Resumen 37
3.2.0 Adecuabilidad del sistema 40
3.3.0 Especificidad 40
3.4.0 Linealidad del sistema 41
3.5.0 Exactitud y precisión del método 42
3.6.0 Linealidad del método 43
3.7.0 Precisión intermedia 44
3.8.0 Sensibilidad del método 46
3.9.0 Robustez 47
3.9.1 Prueba de hisopos 47
3.9.2 Estabilidad del estándar 48
3.9.3 Estabilidad de la muestra 49
3.10.0 Tolerancia 51

CONCLUSIONES 52

GLOSARIO DE TERMINOS 53

IV) ANEXOS

4.1.0 Muestreo por el método del hisopo 54
4.2.0 Factores de corrección de recobros 56
4.3.0 Parámetros del protocolo de validación 57

BIBLIOGRAFÍA

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo dedicado a mis padres **Adelina Vázquez** y **Pablo Ortiz**, los cuales me han mostrado lo que cuesta ganarse las cosas y me han llenado de valores para ser una persona íntegra. Estoy muy agradecido con ellos porque su esfuerzo y sacrificio han logrado que me convierta en lo que soy ahora, porque sin ellos jamás sería lo que soy y eso es algo que nunca podre pagarles.

Muchas gracias porque cuando me vieron desvelado estudiando se tomaron la molestia de llevarme a la cama o hacerme algo de comer. Gracias porque cuando salía tarde de una clase estaban al pendiente de mi hasta que llegara a mi casa. Gracias porque cuando me vieron preocupado se tomaron la molestia de platicar conmigo y de regalarme un consejo que siempre me sirvió. Gracias por tanto apoyo. Gracias porque sé que han preferido comprarme un libro o darme para unas copias antes de comprarse algo para ustedes. Gracias por haber preferido mi bienestar antes que el suyo. Les juró que nunca los voy a decepcionar porque son lo más importante en mi vida, les prometo que esté será uno de muchos logros. Nunca olvidare lo que han hecho por mí. Te AMO Mamá. Te AMO Papá

A mis hermanos **Viridiana**, **Isis** y **Osvaldo** que siempre estuvieron a mi lado y sabia que decirme para obtener fortaleza de realizar cada una de las tareas.

A toda mi familia, tíos, primos, y abuelos que siempre confiaron que cumpliría con todas mis metas e intentaron ayudarme en lo que ellos podían.

A mis profesoras y profesoras que me proporcionaron el conocimiento necesario para afrontar los problemas que debemos resolver. En especial quiero agradecerle a la profesora **Socorro Alpizar** por ser tan paciente y tener siempre tiempo para ayudarme, a la profesora **Perla Castañeda** y **Guadalupe Casterona** que siempre se han preocupado por mi desempeño. Al profesor **Eduardo Rodríguez** por tomarse el tiempo de escucharme y ayudarme a encaminar mi rumbo.

Al jurado revisor que me dio tan buenos consejos para que el proyecto quedara lo mejor posible.

A Bristol Myers Squibb así como a la gente de laboratorio que me dio la oportunidad de realizar este proyecto

A mis amigos **Servando**, **Marco**, **Pao**, **Pau**, **Piby**, **Nata**, **Ivan**, **Ara**, **Mony**, **Adri**, **Cinthya**, **Silvia**, **Oscar Guillermo**, **Oscar Lucio, Angel**, **Isac**, **Anllely**, **Luz**, **Alfredo**, **Erick**, **Mara**, **Abraham**, **Susy** con los que compartimos tantas cosas juntos, como: equipos de clases, materias, trabajos, exposiciones, proyectos, etc. Y con los que ahora comparto su amistad.

A una gran e inteligente mujer **Jocelyn Guevara** por haber estado a mi lado durante tanto tiempo sabiendo que decirme en los momentos difíciles, y estando siempre cuando lo he necesitado, preocupándose porque estuviera bien y encaminara mí rumbo correctamente. Gracias por ayudarme a crecer como persona.

A mis amigos del CCH Oriente: **Rafael**, **Alejandro**, **Oscar Z**., **Tonathiu** y **Rodrigo** con lo que a pesar de tomar rumbos diferentes estuvieron siempre apoyándome. Y mi amigo **Manuel Cabello** que a pesar de ya no estar entre nosotros siempre estuvo al pendiente de lo que yo necesitara.

A mi gran amiga y excelente persona **Leticia Villagrán**, por ayudarme en mis problemas y regalarme tan buenos consejos para poder tomar siempre la mejor opción y por desearme que me vaya bien en lo que haga.

Oscar Ortiz Vázquez

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA DETECTAR TRAZAS DE BENZOCAÍNA

OBJETIVO

Validar un método analítico para determinar trazas de benzocaína como herramienta para evaluar la calidad de la limpieza.

INTRODUCCIÓN

El objetivo principal de los profesionales de la farmacia es desarrollar productos con calidad consistente. La calidad no se produce en forma automática o como evento fortuito sino a través de un proceso paulatino, creativo y libre. En la industria farmacéutica, los estudios de validación se llevan a cabo como parte de una actividad necesaria y fundamental para una eficiente producción y aseguramiento de la calidad de medicamentos.

La Norma Oficial Mexicana de Buenas Prácticas de Fabricación para Productos Farmacéuticos (NOM-059-SSA) establece los requerimientos de validación obligatorios así como los métodos analíticos de prueba.[11]

Dentro de estos estudios de validación que aseguran la calidad del producto se encuentran los estudios de validación de limpieza, que es un proceso que establece evidencia documentada de que el proceso de limpieza va a reducir los residuos de la superficie de un equipo a un nivel determinado aceptable. Estos estudios de validación de limpieza a partir de la década de los 90`s tomaron auge importante con el desarrollo de nuevos métodos analíticos así como de equipos mejorados que permiten ser más precisos al arrojar un valor que influirá en la emisión de un dictamen de calidad. Estos métodos analíticos deben ser validados para que sean confiables para cuantificar trazas de activos que son indicativos del grado de limpieza del equipo y área de fabricación después de su uso.[9, 10]

Un proceso de limpieza debe llevar un residuo a niveles permitidos y, para ello, es necesario determinarlo en la superficie de los equipos, utilizando un método analítico. El elemento crítico en la fabricación de un medicamento es el equipo de la planta farmacéutica y es común que este sea compartido en la fabricación de varios productos, por lo que su superficie puede ser una fuente potencial de contaminación cruzada de residuo cuando un proceso de limpieza es un elemento crítico, así como el o los métodos analíticos que permitan determinar si el nivel de residuo en su superficie es aceptable, es así que este trabajo está realizado con el fin de asegurar que la superficie del equipo está completamente limpia y que de esta manera no existirá contaminación cruzada al usar la misma línea de producción para otro activo.[8, 10]

El emplear un método validado de detección de trazas de activo dentro de un sistema de limpieza, asegura que la existencia de un contaminante no constituya un problema de salud, además evita grandes pérdidas de dinero, tiempo y mano de obra a la compañía.[8]
En este trabajo se toma en cuenta cada uno de los parámetros para validar un método analítico para verificar limpieza tales como son: adecuabilidad, especificidad, linealidad del sistema, exactitud y precisión del método, robustez, sensibilidad y tolerancia.

I) GENERALIDADES

1.1.0 Validación de procesos

En épocas anteriores a la industrial, cuando se necesitaba un producto farmacéutico el boticario se encargaba de elaborarlo (medicamento magistral), esto de acuerdo a lo que el médico requería. Con el advenimiento de la industria farmacéutica la situación cambió y los medicamentos elaborados en boticas fueron parcialmente sustituidos por la fabricación de medicamentos en serie en la industria farmacéutica. Como ya no era el caso de que un operario se dedicara a la elaboración de un producto, fue necesario introducir procedimientos de operación y control que permitieran sustentar la calidad de los productos.[30, 8]
Durante las últimas tres décadas, la necesidad de mantener bajo control los procesos de producción, y como resultado de esto, la calidad de los medicamentos, propició la elaboración de procedimientos de operación específicos, correctamente descritos y documentados, que permitieran realizar mejoras en las diferentes etapas del proceso los cuales han ido evolucionando satisfactoriamente con los avances científicos, tecnológicos y regulatorios, lo que ha permitido asegurar la calidad de los productos. La modernización en los sistemas de producción y control introdujeron mejoras fundamentales en la calidad de cada uno de los procesos, el mejoramiento en la forma de trabajo de los procesos es lo que sustentará la Garantía de Calidad de los productos de una empresa, por lo cual es necesario contar con evidencia documental de la consistencia del proceso, por lo cual es necesaria la validación de estos procesos.

- *VALIDACIÓN EN DESARROLLO:* está efectuada durante las etapas de diseño y escalamiento del producto y de esta forma permite ir documentando los resultados que comprueban que los procedimientos y productos cumplen con las especificaciones.[12]
- *VALIDACIÓN PROSPECTIVA:* está se lleva a cabo en lotes piloto a nivel de producción y es resultado de un análisis de riesgo del proceso de fabricación, donde las pruebas efectuadas son desarrolladas y evaluadas de manera completa en lotes experimentales.[14]
- *VALIDACIÓN CONCURRENTE:* está se realiza durante una fabricación normal, y se utiliza principalmente para productos de bajo volumen de producción, donde la validación prospectiva no puede ser realizada. La validación concurrente es similar a la prospectiva ya que en las dos se estudian lotes a

escala industrial; sin embargo en la validación concurrente los lotes fabricados pueden estar separados por grandes intervalos de tiempo y son liberados de forma individual.[12, 13]

- *VALIDACIÓN RETROSPECTIVA:* ésta involucra la revisión de experiencias pasadas generadas durante la producción siempre y cuando cumplan con la condición de que, la composición, los procedimientos y los equipos hayan permanecido sin cambio.[14]
- *REVALIDACIÓN:* concierne a la repetición de un estudio de validación, esto debido a implementación de cambios en el proceso de fabricación que pudieran afectar la calidad del producto (área de fabricación, aire, agua, etc.)[12]
- *VALIDACIÓN DE LIMPIEZA:* ésta permite demostrar que los resultados de un proceso de limpieza sean consistentes y reproducibles, mediante muestreo de sitios críticos y representativos del equipo o sistema, después de su limpieza, esto es establecido mediante un método analítico el cual demuestra, por estudios de laboratorio que, la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.[13]

La Food and Drug Administration (FDA), en el título 21, fracción 211.110, del Code of Federal Regulation (CFR), considera a la validación como parte integral del aseguramiento de la calidad de un producto farmacéutico y por lo tanto, una actividad obligatoria. Esto es para evitar una contaminación cruzada ya que se pone en riesgo la vida de personas que pueden consumir un medicamento contaminado. [5, 6]

1.2.0 Validación de Métodos Analíticos

Cuando se tiene interés en medir un componente en una muestra, es necesario contar con una metodología de medición (método analítico). Por ello, las empresas de transformación (principalmente farmacéuticas) requieren de este tipo de metodologías, pudiendo utilizar metodologías farmaopeicas o bien, dedicar tiempo para su desarrollo, partiendo del hecho de que deben cumplir el atributo de confiabilidad. El proceso que permite cumplir con este atributo, es la validación.

Desde este enfoque, la validación de métodos analíticos es un sistema involucrado en los procesos de fabricación en el área de calidad de la empresa y bajo la filosofía de esta, las Autoridades Regulatorias verifican que las empresas sustenten estos sistemas como actividades documentadas, esto se indica en la NOM-059-SSA numerales 5.6.3, 9.11.3, 9.11.5 y 9.12.3. [11]

Un método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra.[5, 8]

Un analito se define como un componente específico en una muestra a medir en un análisis; por lo que un método analítico mide un componente específico (analito) en una muestra y como todo proceso de medición, éste debe ser confiable. [14]

La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada; es decir cumple con su propósito. [8, 14] Los métodos analíticos se clasifican bajo los siguientes criterios:

1) En función de su estado regulatorio:

   - Métodos farmacopeicos. Farmacopeas [11, 14] (FEUM, USP, BP).
   - Métodos no farmacopeicos (métodos no compendiados en una farmacopea)

2) En función de su aplicación[11, 14] (NOM 059 SSA1 Y NOM-073-SSA1):

   - Métodos para producto granel.
   - Métodos para producto terminado.
   - Métodos para materia prima.
   - Métodos indicadores de estabilidad.

3) En función de la naturaleza de la respuesta analítica en: [14]

   - Métodos fisicoquímicos. Respuesta de carácter físico (absorción de luz, emisión de luz, voltaje, etc.).
   - Métodos biológicos. Respuesta de carácter biológico (crecimiento de un microorganismo, protección, muerte, etc.).

4) En función de su propósito analítico en:[11, 14]

- Métodos para cuantificar el analito.
- Métodos para establecer la presencia del analito a un límite. Pruebas límite.
- Métodos para identificar al analito.

5) En función de la naturaleza del sistema de medición se clasifican en: [11,14]

- Métodos en los cuales el instrumento de medición de la respuesta analítica, permite medir una señal de ruido: Cromatógrafo de gases, líquidos, espectrofotómetros, etc.
- Métodos en los cuales el instrumento de medición no permite medir una señal de ruido. Buretas, medidor de halos, etc.

Los parámetros a tomar en cuenta para la validación de métodos analíticos son: [1,11, 12,13, 14, 31, 32]

ADECUABILIDAD: Permite asegurar que todos los componentes del sistema funcionan de forma correcta.

ESPECIFICIDAD: Permite determinar si otros residuos potenciales (agentes de limpieza, excipientes, fármacos, intermediarios) o sustancias como solvente de remoción, materiales del elemento de remoción del residuo (hisopo, paño, tela), del contenedor y de la determinación; interfieren o no en la respuesta analítica del residuo.
Inyectar por duplicado cada uno de los elementos involucrados en la limpieza y ver si existe interferencia en el cromatograma observando si existe una respuesta en el tiempo de retención al que sale el analito.

LINEALIDAD: Permite establecer en un intervalo apropiado de concentraciones, si la relación concentración del residuo-respuesta analítica es lineal. Se deben preparar por triplicado cinco niveles de concentración. Para métodos de contenido se sugiere un intervalo mínimo de 50% a 200% y para métodos límite de 50% a 150%, siendo el 100% el límite de aceptación de residuo.
Se establece al determinar un coeficiente de correlación el cual debe ser > a 0.98.

PRECISIÓN INTERMEDIA: Establece la tolerancia del método a corridas analíticas (días de análisis) y analistas. El estudio debe ser aplicado al tratamiento analítico de la muestra y no incluir el método de muestreo.
El coeficiente de variación entre réplicas de analista y día no debe ser mayor a 20% y no debe existir diferencia estadística entre analista, día y la interacción entre ellos.

LÍMITE DE DETECCIÓN PARA MÉTODOS. LÍMITE DE RESIDUO (LOQ): se estima con los resultados de eficiencia del recobro (cantidad adicionada-cantidad recobrada). Es la cantidad cuantificable de un residuo.
El valor del LOQ >al LOD
LíMITE DE DETECCIÓN PARA MÉTODOS. LÍMITE A NIVEL DETECTABLE DE RESIDUO (LOD): se estima con los resultados de la linealidad del sistema cantidad de residuo-respuesta analítica.
Los picos correspondientes a las inyecciones de la solución a la concentración LOD siempre son observados.

ROBUSTEZ: indica que tanto se puede ver afectada la respuesta analítica por modificar el método en parámetros menores como por ejemplo: modificando el tipo de hisopos.
El coeficiente de variación entre diferentes tipos de hisopos debe ser ≤ 3% así mismo no debe existir diferencia estadística entre ellos.

ESTABILIDAD DE MUESTRA Y ESTANDAR: es necesario verificar que tanto el residuo como el estándar se mantengan estables.

La diferencia absoluta de la media aritmética de los porcentajes para cada condición con respecto al tiempo inicial no debe ser ≤ 2.0%

TOLERANCIA: este parámetro permite investigar la influencia de factores independientes del método como el cambio de equipo.

Cualquier pico relacionado al pico de interés no debe ser observado.

1.3.0 Límites de residuo permitido[5,6,7]

Estos límites variarán según el producto se pueden considerar los siguientes criterios según la FDA.
El primer criterio de aceptación es en función de la dosis terapéutica mínima diaria de A en la máxima dosis diaria de B.

Máximo residuo permitido de A (mg diarios) / área muestreada con hisopo:

$$\frac{0.001\ d \times U \times S}{D\ s}$$

- ✓ 0.001 es un factor de seguridad y depende exclusivamente de la forma farmacéutica del producto.
- ✓ d es la dosis terapéutica mínima diaria del principio activo de A (primer producto elaborado).

- ✓ D es el máximo número de unidades de dosis de B (producto elaborado en segundo lugar) por día.
- ✓ U es el tamaño del lote de B expresado en número de unidades de dosis
- ✓ s: área estándar muestreada con el hisopo.
- ✓ S: sumatoria de áreas comunes.

El segundo criterio de aceptación indica que no más de 10 ppm de A es permitida en B.

$$\frac{10\ ppm \times T \times s}{S}$$

- ✓ T: tamaño final del lote de B (kg)
- ✓ s: área estándar muestreada con el hisopo.
- ✓ S: sumatoria de áreas comunes.

El tercer criterio de aceptación indica que no debe haber trazas de residuos visibles al muestrear con el hisopo, eluir y evaporar.

1.3.1 Factor de seguridad (FS) [5,6,7,9]

Es una fracción de la dosis terapéutica del producto A presente en el producto subsiguiente, el mismo depende de la vía de administración.

A continuación se enuncian los FS según la vía de administración.

Vía de administración	FS
Intravenosos	1/100.000 a 1/10.000
Oftálmicos	1/10.000 a 1/5.000
Orales	1/1.000 a 1/100
Tópicos	1/100 a 1/10

Hay tres factores a tener en cuenta en la fracción 0.001. El primero indica que los principios activos son considerados sin actividad a 0.1 veces su dosis recetada, el segundo es un factor de seguridad y el tercero es un factor de robustez de la validación.

Factor FE o factor empírico: Cuando se utilizan datos obtenidos con animales experimentales como base para la extrapolación, hay que calcular la dosis para humanos que es equivalente a las dosis utilizadas en los estudios con animales. Para calcular las dosis equivalentes se supone que los organismos son igualmente susceptibles al agente, si absorben la misma cantidad de tóxico por unidad de superficie corporal. La superficie corporal es aproximadamente proporcional al peso corporal elevado a la potencia 2/3.

Por lo tanto $FE = \left(\frac{PH}{PA} \right)^{2/3}$

Donde:

PH = Peso Estándar del Humano adulto

PA = Peso aproximado del animal con el cual se determinó la DL50

Ambas expresadas en unidades de kg.

El factor 10 indica que no más de 10 g de cualquier producto A puede aparecer en un kg de otro producto. La idea de usar un límite máximo de 10 ppm, surge de la industria alimentaria. Estos niveles de sustancias peligrosas, son aceptados en dichas regulaciones

Dosis Letal media (DL50): Se utilizan los valores de DL50 oral rata, o en su defecto ratón o conejo. En caso de no estar disponible el dato se le asigna un valor mínimo igual a 1.

Criterio de selección de Locaciones “peor caso” (que se refiere al activo más difícil de quitar de una superficie).

Considerando los principios activos “peor caso” y los equipos utilizados en planta, establezca las locaciones “peor caso” a desafiar durante los ensayos de validación.

El criterio de selección de las locaciones “peor caso” para equipos está basado en:

- Dificultad de acceso a la locación

- Superficies no lisas
- Material de construcción diferente al acero inoxidable
- Geometría del equipo

1.4.0 Validación del proceso de limpieza

La limpieza es el conjunto de actividades cuyo objetivo es eliminar los residuos de los materiales empleados en la manufactura de medicamentos a fin de prevenir la contaminación cruzada entre un producto y otro, ingredientes, pigmentos y sabores. [7]
La validación del proceso de limpieza tiene por objeto establecer evidencia documentada de que este va a reducir los residuos de la superficie del equipo a un nivel predeterminado aceptable. El residuo se refiere a los excipientes, agentes de limpieza, principios activos, partículas suspendidas que puedan encontrarse en la superficie de cualquier equipo.[7]

1.4.1 Principios de limpieza

Para efectuar la limpieza se requieren de 4 factores:[30]

- Factor térmico: referido a la temperatura a la cual debe estar el agente de limpieza para la remoción de los residuos.
- Factor mecánico: el uso de sistemas de alta presión o sistemas manuales.
- Factor Químico: detergentes usados o solventes que se necesitan cuando este no es capaz de remover el residuo. El detergente debe ser fácilmente soluble, biodegradable, económico y no debe de reaccionar con las superficies del equipo.
- Tiempo: considerar el tiempo que se debe de dejar actuar al agente de limpieza para que logre remover el residuo.

1.4.2 Técnicas de limpieza

Según el sistema empleado son: [30]

- Automatizada: usando vapor, espuma o presión.
- Manual: dependiente de la eficiencia del operador, siendo la más utilizada.

Según el lugar donde se realiza:

- Fuera del sitio: se desarman las piezas del equipo y se limpian.
- En el sitio: se realiza en el equipo sin desarmarlo.

1.4.3 Consideraciones en el proceso de limpieza

Para poder efectuar el proceso de limpieza se debe considerar: [9, 30]

- Contar con los métodos analíticos validados para el intervalo requerido.

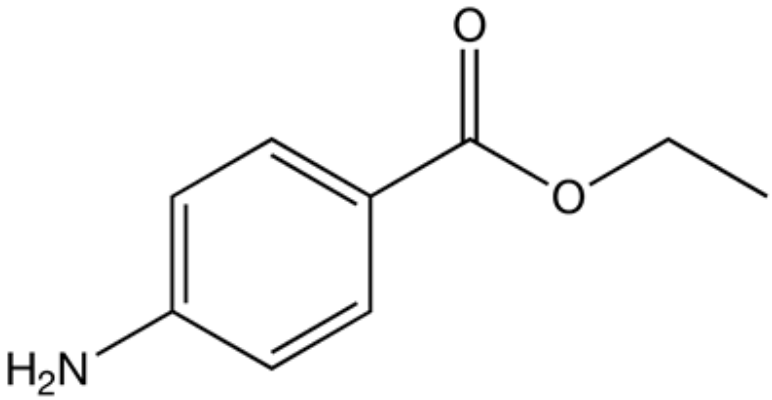
- Establecer criterios de aceptación (visual, toxicidad de los componentes, solubilidad, capacidad de detección analítica).

- Tamaño del lote previo y posterior.

1.5.0 Benzocaína-Principio activo

La benzocaína ($C_9H_{11}NO_2$) o *p*-aminobenzoato de etilo es un éster etílico del ácido p-aminobenzoico (PABA), tiene un Número CAS 94-09-7, una MM de 165.19 g/mol, un pka de 7.9, un metabolismo hepático y una excreción renal. Tiene un intervalo de fusión que va de 88℃ a 92℃, y secada sobre pentóxido de fósforo durante 3 horas no pierde más del 1.0% de su peso. Presenta absortividades máximas a 278 nm. [12, 13]

Está habitualmente indicada para la anestesia local previa de un examen: endoscopía o manipulación con instrumentos u otras exploraciones, así como intervenciones dentales y cirugías orales. [3, 18]



Molécula del activo de Benzocaina

La benzocaína actúa bloqueando los canales de sodio dependientes del voltaje, pueden interactuar de forma inespecífica con los fosfolípidos de la membrana de forma similar a los anestésicos generales, originando alteraciones conformacionales que interfieren en el funcionamiento de canales iónicos, llegando a reducir la permeabilidad del nervio para los iones Na+ y K+ en la fase de reposo. La interacción de la benzocaína con el canal es reversible y termina cuando su concentración cae por debajo de un nivel crítico (concentración bloqueante mínima). La benzocaína es hidrolizada por las colinesterasas plasmáticas y en un grado mucho menor por las colinesterasas hepáticas, a metabolitos que contienen PABA.[3, 18]

Las dosis comúnmente utilizadas para producir anestesia local, no afecta la función cardiovascular, pero tienen la potencialidad de actuar directa e indirectamente a todos los niveles: corazón, vasos y vías nerviosas reguladoras. Cuando se exceden las dosis comúnmente utilizadas, se puede producir taquicardia e incluso, aumento de la resistencia periférica por acción vasoconstrictora en algunos territorios. A dosis altas provoca vasodilatación arterial e hipotensión, tanto por acción directa sobre los vasos como por reducir la conducción adrenérgica vasoconstrictora, y alteraciones de la función cardíaca en forma de depresión de la conducción y de la contractilidad. En general se necesita mayor concentración de anestésico local para producir depresión cardiovascular que para originar actividad convulsiva. [19]

La embarazada es más susceptible a la acción cardiotóxica.

$$DL_{50} = 216 \text{ mg/kg en ratón}^{19}$$

La benzocaína a dosis elevadas provoca náuseas, vómitos, agitación psicomotriz, confusión, verborrea, temblores y convulsiones.

La Benzocaína tiene interacción con las sulfamidas. Los productos de degradación de la benzocaína inhiben su acción. Se reportan interacciones con: [3, 19]

- P- aminobencensulfonamida
- P- anilinsulfonamida
- Sulfaftaliltiazol
- Sulfanilamida mesilato.
- Sulfanilamida sódica.
- Sulfatiazolftalato.

1.6.0 Cromatografía

La cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes a ser separados son distribuidos entre dos fases, una de las cuales es estacionaria mientras la otra se mueve en una dirección definida. Los componentes son separados por sus diferentes tazas de migración (IUPAC). La cromatografía puede ser clasificada por su utilidad y en base al material que se utilice como eluyente para separar los solutos. De acuerdo a su utilidad la cromatografía se clasifica en: analítica, utilizada para determinar los químicos presentes en una mezcla y su concentración; y preparativa, utilizada para purificar grandes cantidades de químicos. [21]

La primera técnica cromatográfica fue ideada por el botánico ruso Mikhail Tswett en 1906, quien utilizó alúmina para separar los pigmentos coloreados de las hojas de las plantas.

Tswett en su experimento original, metió dentro de un tubo de vidrio un fino polvo (sacarosa) para producir una columna de una altura deseada. Posteriormente, extrajo los pigmentos de hojas y los colocó en un solvente (éter de petróleo) y agregó un poco de la solución dentro de la columna. Cuando toda la solución había pasado a través de la columna se formó una estrecha zona inicial bajo la capa del adsorbente. Después agregó más solvente y aplicó presión en la parte de arriba de la columna. Mientras el solvente iba pasando a través de la columna, los pigmentos se iban separando individualmente (Fig. 1). La clave del éxito de la columna de Tswett, fue la aplicación de la mezcla dentro de la columna en una zona inicial estrecha y la posterior aplicación del solvente fresco.[22, 24]

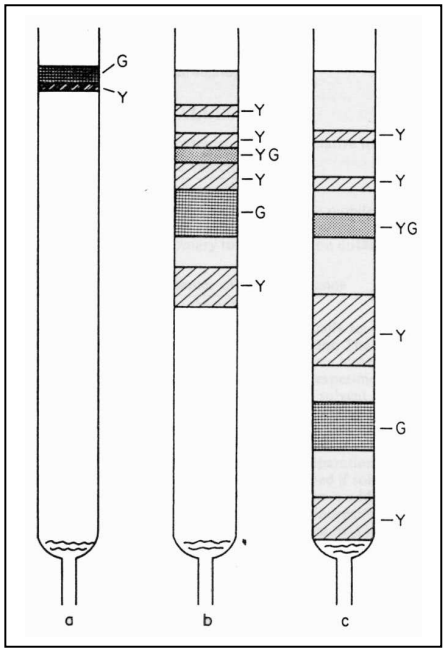
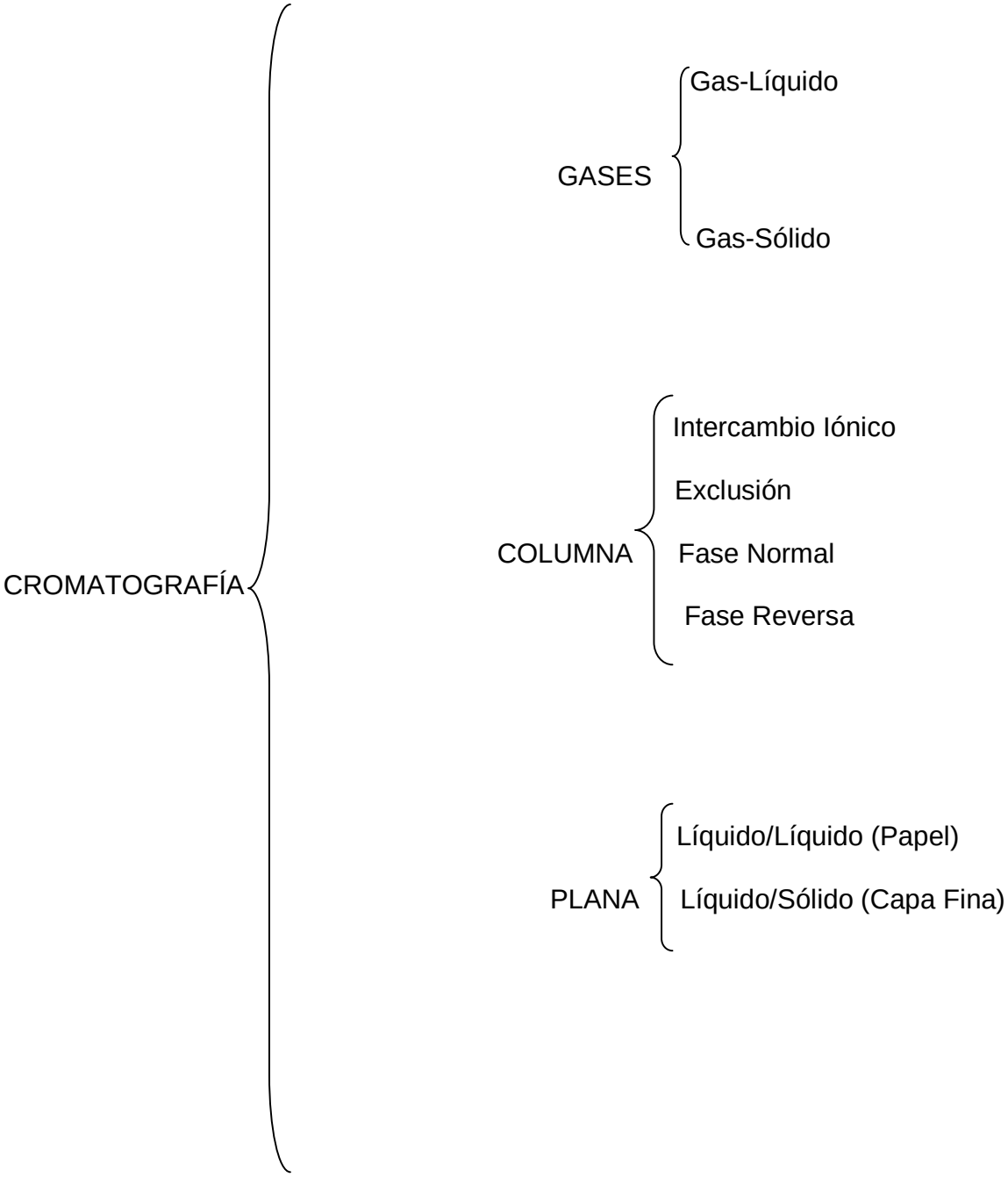


Fig. 1. Columna cromatografíca de Tsweet. Y = amarillo, G = verde.

1.6.1 Tipos de Cromatografía



Cromatografía de gases:

1.6.1.1 Cromatografía Gas/Líquido

Es una técnica que lleva a cabo la separación por medio del reparto de los componentes de una mezcla química, entre una fase gaseosa que fluye (móvil) en donde se usan gases como helio y una fase líquida estacionaria sujeta a un soporte sólido. Esta mezcla sirve para transportar la mezcla de compuestos a separar.[22]

1.6.1.2 Cromatografía Gas/Sólido

Técnica basada en una fase estacionaria sólida en la cual se produce la retención de los analitos como consecuencia de la adsorción física. La cromatografía gas - sólido ha tenido una aplicación limitada debido a la retención semipermanente de las moléculas activas o polares y a la obtención de picos de elución con colas (una consecuencia del carácter no lineal del proceso de adsorción), de modo que esta técnica no ha encontrado una gran aplicación excepto para la separación de ciertas especies gaseosas de bajo peso molecular. [22]

Cromatografía de líquidos

1.6.1.3 Cromatografía de intercambio iónico

Técnica basada en la dependencia de la adsorción reversible de una molécula de soluto cargada a un grupo de intercambiadores iónicos inmovilizados de carga opuesta. La fase estacionaria está compuesta generalmente de resinas catiónicas las cuales están unidas a ácido sulfánico o aminas cuaternarias. La separación de cationes se puede realizar con una resina de ácido débil donde se producirá el siguiente equilibrio: [20, 24]

$$R\text{-}CO_2H + M^+ \rightarrow R\text{-}CO_2M + H^+ \qquad (1)$$

El catión M^+ puede ser eluido de la columna por un ácido fuerte en una concentración capaz de desplazar el equilibrio representado en la ecuación (1).

Esta técnica es ampliamente utilizada en la separación de aminoácidos.

1.6.1.4 Cromatografía de exclusión

Técnica basada en la masa molecular del soluto, y su capacidad separadora reside fundamentalmente en un gel cuya matriz consta de un gran número de esferas porosas microscópicas. Cada gel se caracteriza por un rango de fraccionamiento que depende del tamaño de sus poros. [21, 22]

Las moléculas excluidas se mueven continuamente junto con el eluyente, en tanto que aquellas que por su tamaño pueden ingresar a la fase estacionaria son retardadas en función de sus tamaños. Por lo tanto, las primeras moléculas que eluyen son las excluidas, y luego, en orden de tamaño decreciente, las moléculas no excluidas. La técnica se ha desarrollado principalmente en el análisis para polímeros y materiales biológicos.[24]

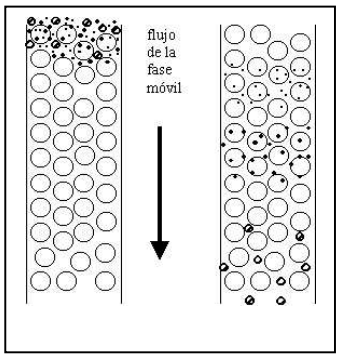


Figura 2. Cromatografía por exclusión molecular

1.6.1.5 Cromatografía Fase Normal

Técnica fundamentada en la partición de un soluto entre dos disolventes inmiscibles.
La fase móvil se encuentra compuesta por solventes no polares mientras la fase estacionaria son columnas polares, es una técnica útil para la separación de compuestos débilmente polares como es en el caso de los isómeros, así su interacción en la columna dependerá de la polaridad de ellos.[21]

Los compuestos no polares no interaccionan, los compuestos débilmente polares interaccionan con la columna y los polares quedarán retenidos.

Los disolventes más usados para este tipo de cromatografía son: hexano, cloroformo y el cloruro de metileno.

1.6.1.6 Cromatografía Fase Reversa

La cromatografía en fase reversa permite separar moléculas en base a su polaridad. La fase estacionaria es de partículas de sílica químicamente modificadas con hidrocarburos saturados, insaturados o aromáticos de diferentes tipos entre los que la más comúnmente utilizada es octadecil sílica $R=(CH_2)_{17}CH_3$. Esto convierte a la fase estacionaria en una matriz apolar. Por lo tanto, para este tipo de cromatografías se emplean mezclas de solventes polares, tales como agua, acetonitrilo, acetato de etilo, acetona y alcoholes alifáticos. [2]

Las moléculas se retienen en la columna en virtud de las interacciones hidrofóbicas que establecen con la sílica modificada. Aunque, las interacciones hidrofóbicas son en general bastante débiles, son también a menudo muy numerosas y para eluir las moléculas es casi siempre necesario disminuir la polaridad del disolvente; para ello se puede substituir el agua de la fase móvil con un solvente orgánico cuya concentración se va aumentando gradualmente.[2,22]

A diferencia de la fase normal los compuestos polares no interaccionan con la columna los débilmente interaccionan con la columna y los no polares se retienen en la columna.[2, 22]

Figura 3. Orden de elución en la Fase Reversa.

1.6.1.7 Cromatografía en Papel

La cromatografía en papel es la técnica de separación e identificación de sustancias químicas en la cual la fase estacionaria es el agua absorbida y adsorbida que hay en el papel (papel filtro hecho de celulosa) y el soporte es el mismo papel. [25]

La fase móvil es una solución que consiste en un disolvente o de una mezcla de varios líquidos que contienen agua.

La movilidad de los componentes de la mezcla a separar depende de la afinidad química o propiedades similares entre estos componentes y cada una de las fases del sistema cromatográfico. Si uno de los componentes de la mezcla presenta propiedades químicas muy similares a la fase móvil tendrá gran movilidad, es decir, el efecto de retención que provocaría la fase estacionaria sería nulo. Lo contrario sucedería con un componente de la mezcla que tenga una gran afinidad con la fase estacionaria.[25]

Por lo tanto, la técnica se basa en la velocidad de desplazamiento diferencial de los solutos al ser arrastrados por una fase móvil sobre una estacionaria. Ésta diferencia será la que permita identificar cuantos componentes tiene una disolución y cómo separarlos. [25]

1.6.1.8 Cromatografía en Capa Fina

Basada en la adsorción de los compuestos. En esta técnica la fase estacionaria es un soporte de sílica gel sobre, vidrio, papel o aluminio. En tanto la fase móvil está dada por un solvente o una mezcla de solventes con los que se satura una cámara cromatográfica antes de introducir la muestra en ésta. Su uso más común está dado para pruebas de identidad colocando a la par en placa cromatográfica un estándar de referencia con una muestra, calculando el Rf de los compuestos.[25]

1.6.1.9 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC ó CLAR)

La cromatografía de líquidos es una técnica que permite separar físicamente los distintos componentes de una solución por la absorción selectiva de los constituyentes de una mezcla.[2, 4]

Existe un contacto entre dos fases, una fija que se llama estacionaria y una fase móvil que fluye permanentemente durante el análisis, y que en este caso es un líquido o mezcla de varios líquidos.
La fase estacionaria por su parte puede ser alúmina, sílice o resinas de intercambio iónico que se encuentran disponibles en el mercado. Los intercambiadores iónicos son matrices sólidas que contienen sitios activos con carga electrostática (positiva o negativa). De esta forma, la muestra queda

retenida sobre el soporte sólido por afinidad electrostática. Dependiendo de la relación carga/tamaño unos constituyentes de la mezcla serán retenidos con mayor fuerza sobre el soporte sólido que otros, lo que provocará su separación.

Las sustancias que permanecen más tiempos libres en la fase móvil, avanzan más rápidamente con el fluir de la misma y las que quedan más unidas a la fase estacionaria o retenidas avanzan menos y por tanto tardarán más en salir o fluir. Éste es el principio fundamental de la cromatografía. Un ejemplo notable es la cromatografía de intercambio iónico. Las columnas más utilizadas son las de sílice.[23]

Para la técnica de HPLC se deben considerar parámetros importantes tales como lo son: El equipo, los gradientes utilizados, la columna a utilizarse y la fase móvil.

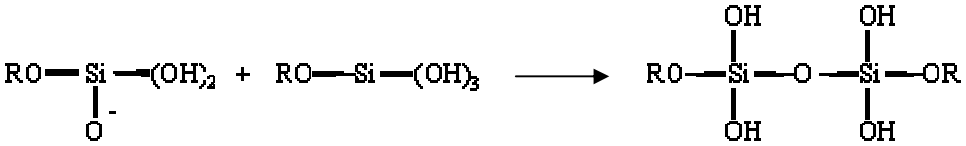
La Fase móvil influirá en la separación de los componentes de la muestra por ello es importante tomar en cuenta: [26]

- Usar solventes grado HPLC.
- Usar agua Milli Q, ya que si no se usa agua de alta pureza se pueden originar problemas durante el análisis como picos de impurezas, o se puede tapar el equipo.
- En caso de no usar agua Milli Q filtrarla a través de membranas de 0.45µm para solventes acuosos.
- Se recomiendan recipientes de vidrio.
- Degasificar la fase móvil y todo solvente que vaya a tener contacto con el equipo con un sonicador o con gas inerte como Helio. Este proceso se recomienda por un periodo de 5 a 10 minutos.
- Si se requiere un ajuste de pH, se debe hacer con la mayor precisión posible ya que esto afectará la retención del analito.
- No almacenar la fase móvil, solo usarla durante el análisis.
- Si el pH de la fase móvil es menor a 2.5 tener cuidado de que la columna sea la adecuada ya que a esos valores de pH el relleno de las columnas se disuelve y se “sangran” (la sílica se desprende de la columna).

1.6.1.9.1 Columnas

Las columnas de HPLC son tubos de acero que vienen empacados con relleno de sílica el cuál se modifica químicamente con diversos grupos según el tipo de separación que se requiere, como: [23, 26]

- Alquil silanos (C2, C12, C16, C18, etc.)
- Grupos hidroxilo
- Grupos R (18, 12, 16, 18, etc.)



Sin embargo la separación no será dependiente únicamente de las partículas de las que la columna esté rellena sino que dependerá del tamaño de éstas así como la longitud. El pH afectará en gran medida la forma de las partículas, ya sean esféricas (pH´s bajos) o irregulares (pH´s altos) es importante decir que el pH que se maneje debe estar dentro de las recomendaciones de los proveedores porque si no se usan dentro de los intervalos óptimos, las columnas se "desangran" y pueden provocar daños importantes en los equipos de HPLC además de que la columna ya no servirá para otro análisis.

Es muy importante que se use una columna por cada metodología analítica que se tenga o por cada producto que se analice, esto es importante para no modificar las condiciones de trabajo de la columna, tales como el pH o el flujo y de esta manera pueda durar más tiempo, además de que así se asegura que no haya interferencia de otros activos que hayan quedado durante un análisis en la columna.
Se debe considerar que antes de usar la columna se deben tener en cuenta los periodos de acondicionamiento, esto dependerá del tipo de columna y de la técnica analítica a efectuar por lo que el tiempo es variable. Es recomendable en primer plano pasar flujo de 100% de agua de alta pureza para lavar la columna, después se hace pasar flujo con la fase orgánica con la está almacenada y el agua de alta pureza a las proporciones a las que se efectuará el análisis. Por último se hace pasar la fase acuosa (sales, ácidos, bases, etc.) junto con la fase orgánica en las proporciones a las que se efectuará el análisis, esta última etapa aunque es variable se recomienda hacer por unos 45 minutos en lo que la línea base se estabiliza al flujo de trabajo.

Una vez terminado el análisis es importante lavar las columnas, además de documentar las inyecciones, esto ayudará a determinar el tiempo de vida de la columna y en caso de alguna falla determinar si la columna es la causa raíz del problema.
Las columnas deben almacenarse con los tapones puestos en cada uno de los lados y no con papel parafilm ya que si no se tapan la sílica con la que están rellenas se seca y se quiebra, provocando que la columna se dañe.

Para determinar que la columna funcione de manera óptima se le determinan parámetros como:

La resolución, que es un parámetro importante, cuando se tienen impurezas o se quiere detectar más de un principio activo, ayuda a asegurarse que durante el análisis los picos de los compuestos no se junten. Se calcula de la siguiente manera: [23, 26]

$$R = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{w_2 + w_1}$$

Donde:
t_r = Tiempo de retención de los picos.
w = Ancho de los picos en área.

La USP define como un valor óptimo de resolución 1.5, sin embargo este valor puede ser mayor dependiendo de la metodología analítica y de lo que se esté analizando. Este valor indicado es el óptimo para que los picos puedan ser cuantificados. Por ello también está dado el factor de asimetría el cual esta calculado por la siguiente ecuación:[13]

$$t = \frac{W_{0.005}}{2f}$$

Donde:
$W_{0.005}$ = Anchura al 5% de altura.
f = Anchura del pico.
t = Factor de asimetría

El factor de asimetría no debe ser mayor al 2.5, ya que cuando al cuantificar el área del pico esta puede ser inexacta y arrojar valores incorrectos.[13]

La eficiencia de la columna está dada según los platos teóricos que tenga, estos se calculan de la siguiente manera.

$$N = 16\left(\frac{t_r}{w}\right)^2$$

Donde:

t_r = Tiempo de retención.
W= Ancho del pico
N= Platos teóricos de la columna

De forma resumida la columna funciona de la siguiente manera:[21]

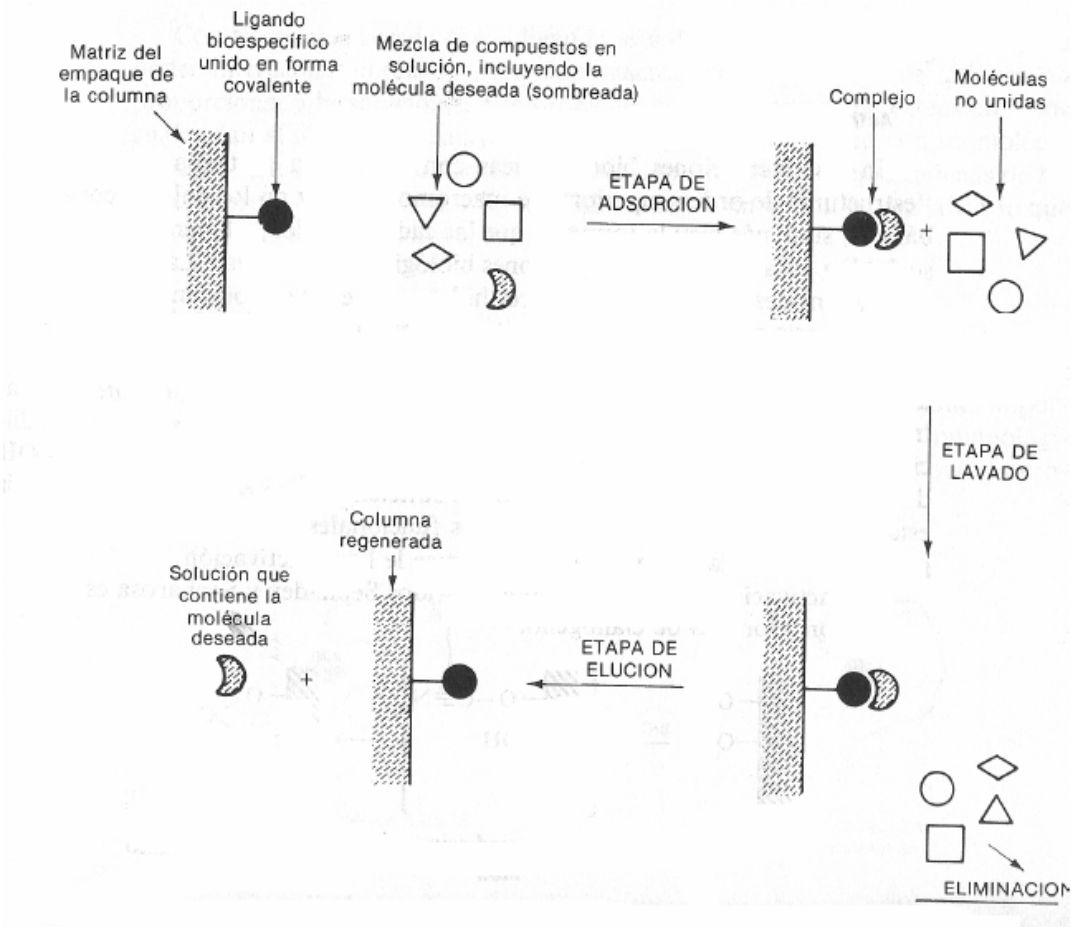


Figura 4. Interacción del analito en la columna.

1.6.1.9.2 Equipo

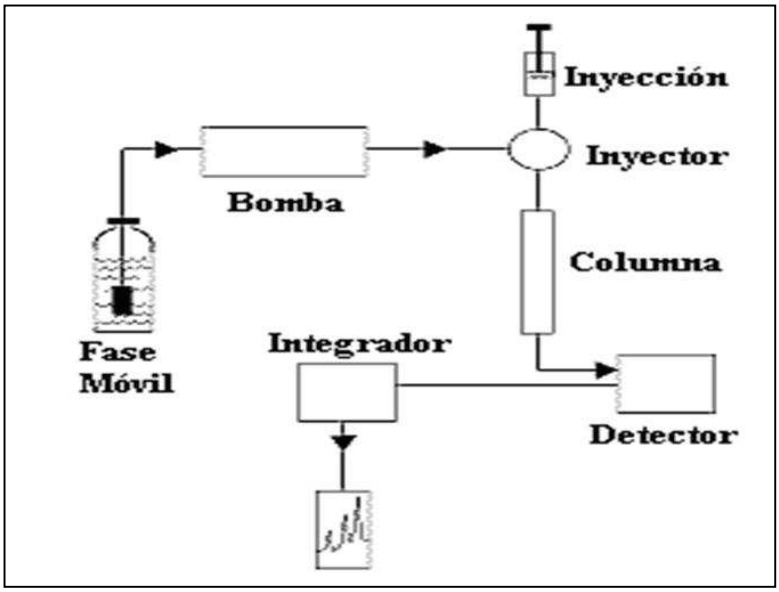


Figura 5. Componentes principales de HPLC.

- *Fase móvil:* servirá para eluir el analito en cuestión.
- *Bomba:* se encarga de efectuar la presión para que la fase móvil pueda fluir a un flujo determinado durante el tiempo de análisis.
- *Inyector:* encargado de tomar la muestra e introducirla en el equipo para efectuar el análisis de la misma.
- *Columna:* ayudará a la separación del analito.
- *Detector:* cuantificará la cantidad de analito que eluye de la columna a través de la fase móvil.
- *Integrador:* es la computadora que se encargará de recibir la señal que el detector mande.

Sin embargo es importante decir que la evolución de los equipos de HPLC ha sido muy importante y que ahora cuentan en su mayoría con nuevos componentes como:

- *Bombas múltiples:* en la actualidad la mayoría de equipos tiene dos de estas bombas y con ellas se pueden trabajar gradientes de elución.

- *Mezcladores:* es un sistema que ayuda a formar la fase móvil dentro del equipo. Esto a través de los compuestos de los que está hecha la fase móvil.

- *Degasificador:* a pesar de que la fase móvil tiene que ser degasificada antes de su uso, los equipos tienen integrados degasificadores ya que algunos solventes utilizados para la cromatografía disuelven oxígeno.

- *Horno:* ayuda a modificar o mantener constante la temperatura lo cual influirá en los tiempos de retención de la columna.

- *Automuestreador:* ayuda a que el equipo pueda tomar la muestra y de esta forma se optimice el proceso.

De forma general el equipo funciona:

Haciendo circular fase móvil previamente degasificada con ayuda de las bombas. Se coloca la muestra en viales en el automuestreador, el inyector introduce la muestra al sistema cromatográfico y ésta es arrastrada por la fase móvil, al llegar a la columna los componentes de la muestra serán retenidos o saldrán más rápido de la columna. El detector captará la señal de la muestra y la enviará a la computadora, la cual mostrará la señal. [26]

1.6.1.9.3 Problemas con el equipo

- *Fase móvil:* cuando existen problemas con la fase móvil se pueden ver modificaciones en el tiempo de retención a pesar de que el equipo esté funcionando de manera correcta. Esto puede ocurrir porque los volúmenes de los componentes de la fase móvil no fueron medidos adecuadamente, o si es una solución amortiguadora y el pH de esta no fue ajustado correctamente por lo cual los tiempos de retención se pueden ver modificados.

- *Bombas:* se observan tiempos de retención que no coinciden con los reportados o cantidades de analito menores o mayores. En este caso se puede ver alterada la presión del equipo y se denotan picos partidos y no bien definidos. En este caso la bomba puede estar dañada o tener una fuga lo cual se puede apreciar porque gotea o se llena de sales.

- *Inyectores:* se observan inyecciones consecutivas no reproducibles, es decir con picos altos o anchos. Este problema puede detectarse cuando se evalúa el problema de adecuabilidad. Esto puede deberse a desgaste en los sellos, o a que la jeringa está tapada y no toma la muestra que se le indica, o que algún sistema del inyector está dañado porque no se le da mantenimiento preventivo.

- *Detector:* al existir problemas con el detector se observa la línea base con mucho ruido, y en ocasiones no se observa evidencia de analito. Este problema se presenta en la celda y puede ser porque está contaminada o tiene fuga.

- *Horno:* cuando existe un problema con el horno y el método es dependiente de la temperatura se observan picos en tiempos de retención variados. Durante varias inyecciones los tiempos se van moviendo esto indica que hay problemas con la temperatura. Los equipos pueden detectar estas variaciones de temperatura e indican que no se está llegando a la temperatura de trabajo. Esto puede deberse a que la puerta del horno está abierta o a que el horno está dañado.

- *Columna:* cuando hay problemas en la columna se observan afectados diversos factores como el coleo o los platos teóricos, los cuales indicarán si la columna se encuentra desgastada y se tiene que cambiar o puede ser reactivada. Si el pH es menor a 2.5 puede ocurrir “sangrado” y no solo se daña la columna, también se daña la celda del detector y se tapa el equipo. Observar que la columna sea la adecuada si se usan valores de pH tan bajos. Verificar siempre que la columna esté bien conectada y que los conectores sean adecuados para la columna y la tubería del equipo.[24]

- *Automuestreador:* en este caso hay problemas para la toma de muestra, y esto se puede deber a que las septas en los viales están apretadas con mucha fuerza y ello impide que la muestra sea tomada o puede existir alguna falla mecánica en el carrusel de los viales.

- *Integrador:* se dan problemas de conexión entre el cromatografo de líquidos y la computadora. Esto es porque la computadora no reconoce al instrumento y no se puede llevar a cabo ninguna instrucción hacia el instrumento. Esto se da porque hay daños en la tarjeta de reconocimiento de la computadora hacia al cromatógrafo porque algún disolvente la dañó o por alguna falla eléctrica.

II) PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

2.1.0 Definición

En el protocolo se deben establecer las pruebas que sean necesarias para validar un método analítico así como los criterios de aceptación. La validación de los métodos analíticos indica que el método es adecuado para las determinaciones analíticas que se necesiten. [1, 6]

2.2.0 Alcance

Validación del método analítico para la detección de trazas de benzocaína.
Laboratorio de control Químico.

2.3.0 Frecuencia

Cuando se modifique cualquier condición de operación del método analítico que pudiese afectar directamente alguno de los parámetros evaluados en la validación. Cuando se modifique el ARL, tren del equipo, o algún método de limpieza.

2.4.0 Lista de equipos e instrumentos

Equipo / Instrumento	Marca	Modelo No.
Balanza Analítica	Sartorius	ME235S
Balanza Analítica	Sartoruis	AC120S
Detector HPLC Ultravioleta	Waters	2487
Cromatógrafo Alliance	Waters	2695
Horno	Waters	2695
Hisopos	Clean Tips	TX714A

Hisopos	Clean Tips	TX761
Potenciómetro	Beckmann	Φ 690
Sonicador	Cole-Parmer	8894
Vortex	IKA®	MS3 Basic
Cromatógrafo Alliance	Waters	2695
Detector HPLC Arreglo de diodos	Waters	2996

2.5.0 Lista de sustancias de referencia, reactivos y otros materiales

Reactivo / Estándar	**Marca / Proveedor**
Agua Milli-Q	N/A
Metanol	J.T. Baker
Sustancia de referencia de Benzocaina	USP
Materia prima de Benzocaina	Mega Farma
Fosfato de potasio monobásico RA	Mallinckrodt
Ácido Fosfórico RA	J.T. Baker
Zorbax SB-C8 4.6 X 250mm X 5µm	Agilent
Hisopos TX714A	Tex Wipe
Hisopos TX761	Tex Wipe
Acetonitrilo grado HPLC	Merck
Material de vidrio de laboratorio	Brand

2.6.0 Preparación de reactivos necesarios para el método analítico

Reactivo	Preparación
SA de fosfato monobásico de potasio 1M	Colocar 6.8g de fosfato monobásico de potasio en un matraz de 50mL y llevar a volumen con agua milli Q. Ajustar el pH a 3 ± 0.05 con acido fosfórico RA
Diluente	Agua milli-Q : Acetonitrilo grado HPLC (50:50)
Fase Acuosa	Mezclar 700 ml de agua milli-Q + 50 ml de SA de fosfato monobásico de potasio 1 M
Fase Móvil	Mezclar Fase acuosa: Acetonitrilo (75:25)
Solución Estándar Madre (SEM)	Pesar aproximadamente 30.0 mg de sustancia de referencia de Benzocaina transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y llevar a volumen con diluente.
Solución Estándar de Trabajo (SET)	Tomar una alícuota de 5.0 mL de la Solución Estándar Madre de Benzocaina y transferirla a un matraz aforado de 50 mL, llevar a volumen con diluente.
Solución Estándar de Trabajo para linealidad (SETL)	Pesar el aproximado a 60 mg de sustancia de referencia de benzocaína transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y llevar a volumen con fase móvil.
Solución Madre para Exactitud y Precisión del Método (SEMEPM)	Pesar el aproximado a 25 mg de sustancia de referencia de benzocaína transferir a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver y llevar a volumen con diluente.
Preparación Blanco Placa	Adicionar a una placa de 65cm^2 aproximadamente con micropipeta 0.600 mL de diluente, realizar el recobro con Hisopo 714A. Colocar el Hisopo en un tubo que contenga aproximadamente 10mL de diluente. Sonicar por 5 minutos y agitar por 30 segundos en vortex.
Preparación Blanco Hisopo	Colocar un Hisopo 714A en un tubo de ensaye que contenga 10 mL de diluente. Sonicar por 5 minutos y agitar por 30 segundos en vortex.
Preparación Blanco Detergente Bactium	Pesar aproximadamente 1g de Bactium (Detergente) en un matraz de 50 mL, disolver con agua. De esta solución tomar 0.250 mL con micropipeta y adicionar a un matraz de 50mL, llevar a volumen con agua milli Q.
Preparación Blanco Detergente Dex-Lite	Transferir 65 mg de detergente a un matraz volumétrico de 100 mL disolver y llevar a volumen con agua. De la esta solución tomar una alícuota de 10 mL, adicionar a un matraz de 100 mL y llevar a volumen con agua (0.065mg/mL). De la Solución anterior de Detergente tomar una alícuota de 4 mL y adicionar a un matraz volumétrico de 25 mL, llevar a volumen con agua.
Preparación de la Muestra	Muestreo con Hisopo: Adicionar a un tubo de ensaye 10 mL del diluente, realizar el muestreo, sonicar durante 5 min y agitar en vortex por 30 segundos.

2.7.0 Parámetros de operación del método analítico

Parámetro	Descripción
Parámetros Cromatográficos	Columna Cromatografíca: Zorbax SB-C8 4.6 X 250mm X 5µm Flujo: 1.5 mL/min. Long. de onda 280 nm Temperatura de la Columna: 25 ℃ Tiempo de equilibrio de columna Hasta que la línea base sea estable. Volumen de Inyección: 20 µL Tiempo de corrida: Aproximadamente 17 min.

2.8.0 Adecuabilidad y precisión del sistema

La adecuabilidad permite verificar que el sistema de medición funciona apropiadamente, independientemente de las condiciones ambientales.[14]

La precisión del sistema permite determinar la variación asignable principalmente a un instrumento analítico a una concentración baja de una solución de referencia y si esta es apropiada para el propósito deseado.

La Solución Estándar de Trabajo (SET) se inyecta por sextuplicado.

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación del promedio de 6 áreas correspondientes a la Benzocaína debe ser $\leq$ a 5.0%.

2.9.0 Especificidad

Se inyecta por duplicado la SET, fase acuosa, metanol, fase móvil, blanco de hisopo, blanco de placa y blanco detergente (Bactium y Dex-Lite).

En caso de presentar cualquier respuesta en el pico de interés, calcular el porcentaje de interferencia de la siguiente manera:

%Interferencia= Área Promedio de la muestra x 100 / Absorbancia Promedio SET

Criterio de aceptación: Si existe inferencia esta no debe de ser mayor a 1.0%.

2.10.0 Linealidad del sistema

Preparar una curva de concentraciones conocidas como se describe en la siguiente tabla a partir de Solución Estándar de Trabajo para linealidad (SETL)

Nivel %	Diluciones	Concentración Final mg/mL
3.3	4/100 x 4/100	0-001
10	10/100 x 5/100	0.003
20	10/100 x 10/100	0.006
40	2/100	0.012
60	3/100	0.018
80	4/100	0.024
100	5/100	0.030
120	6/100	0.036
140	7/100	0.042
160	8/100	0.048
180	9/100	0.054
200	10/100	0.060

En esta tabla se muestran niveles en porcentaje con respecto al ARL siendo este el 100%. De acuerdo a la ICH, se deben establecer al menos 5 puntos alrededor del ARL para determinar que existe una relación adecuada; residuo (trazas de benzocaína)-respuesta. Y se debe determinar un coeficiente de correlación mayor a 0.98.

Cálculos:

Tabular el valor de “x” y el valor de “y”, siendo “x” el valor de las concentraciones del activo y el valor de “y” la respuesta analítica. Esta relación lineal se puede expresar como: [14,15,16]

$$y = mx + b$$

Pendiente

$$m = \frac{(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n(\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

n= número de determinaciones.

Ordenada al origen

$$b = \frac{(\sum y) - m(\sum x)}{n}$$

n= número de determinaciones.

Calcular el coeficiente de correlación:

$$r^2 = \frac{[n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[n(\sum x^2) - (\sum x)^2][n(\sum y^2) - (\sum y)^2}$$

Calcular el coeficiente de variación:

$$CV = \frac{DE}{\bar{x}} x\ 100$$

Desviación estándar:

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

n= número de mediciones

Intervalo de Confianza:

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{n-2,\ 0,975} s_{b1}$$

$$S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{Y/X} = \sqrt{\frac{\sum Y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$$

n= numero de mediciones.
b= pendiente.
b_0= ordenada al origen.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN: El coeficiente de correlación debe ser $\geq$ 0.995.

2.11.0 Exactitud y precisión del método

Colocar en placas de acero inoxidable de 65 cm^2 (SEMEPM) en un intervalo de concentración del 50% al 150% considerando que el nivel del 100% tiene una concentración de 0.3 mg/mL, desarrollar una curva de Respuesta vs Concentración, partiendo de una Solución Madre para Exactitud y Precisión del Método (SEMEPM) de Benzocaina con una concentración de 0.5 mg/mL

- Para el nivel de 150% tomar 900µL (SEMEPM) y aplicar de manera homogénea en toda el área de superficie de una placa de acero inoxidable de 65 cm^2.
- Para el nivel de 100% tomar 600µL (SEMEPM) y aplicar de manera homogénea en toda el área de superficie de una placa de acero inoxidable de 65 cm^2.
- Para el nivel de 50% tomar 600µL (SEMEPM) y aplicar de manera homogénea en toda el área de superficie de una placa de acero inoxidable de 65 cm^2.

Dejar secar y extraer con ayuda de un hisopo el activo de acuerdo al método del hisopo (Anexo 4.1.0), colocar el hisopo en el tubo con 10 mL de diluente y agitar en el vortex por 15 segundos. Repetir el proceso por tres ocasiones, en cada enjuague presionar el hisopo en las paredes del tubo.
Determinar la cantidad recuperada de cada nivel respecto a un estándar de referencia al 100%.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN: El porcentaje de Recobro para cada nivel debe ser ≥ a *50.0% y* ≤ *a 125.0%*.

CÁLCULOS: [14, 15, 16, 17]

Graficar el promedio de las tres repeticiones para cada una de las concentraciones, siendo "x" mg Adicionados así como "y" mg Recuperados

$$y = mx + b$$

Pendiente

$$m = \frac{(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n(\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

n= número de determinaciones.

Ordenada al origen

$$b = \frac{(\sum y) - m(\sum x)}{n}$$

n= número de determinaciones.

Calcular el coeficiente de correlación:

$$r^2 = \frac{[n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[n(\sum x^2) - (\sum x)^2][n(\sum y^2) - (\sum y)^2]}$$

Calcular el coeficiente de variación:

$$CV = \frac{DE}{\bar{x}} x\ 100$$

Desviación estándar:

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

n= número de mediciones

Intervalo de Confianza:

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{n-2,\ 0,975} s_{b1}$$

$$S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{Y/X} = \sqrt{\frac{\sum Y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$$

n= numero de mediciones.
b= pendiente.
b_0= ordenada al origen

2.12.0 Precisión intermedia

Dos analistas diferentes realizarán por triplicado en dos días diferentes empleando soluciones de referencia al 100% (SEMEPM, haciendo la dilución necesaria) y realizando recobros al nivel de 100%.
Determinar la cantidad recuperada de cada día respecto a un estándar de referencia al 100%

Registrar los valores obtenidos por cada día y determinar si existe diferencia significativa mediante un análisis de varianza.

Criterio de Aceptación: El coeficiente de variación entre réplicas y días debe ser: ≤ 25.0%. Así mismo no debe existir diferencia estadísticamente significativa entre los factores analista, día y la interacción entre ellos.

CÁLCULOS: [14, 15, 16, 17]
A partir de los resultados obtenidos calcular el valor promedio, la desviación estándar y el % CV.

Calcular el coeficiente de variación:

$$CV = \frac{DE}{\bar{x}} x\ 100$$

Desviación estándar:

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

n= número de mediciones

DOS CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN CON REPLICAS[16]

Fuente	**Gl (Grados del libertad)**	**SC (Suma de cuadrados)**	**CM (Cuadrados mínimos)**	**Fe (F experimental)**	**Ft (F teórica)**
A	a-1	$\frac{\sum_{i=1}^{a} A_i^2}{br} - CM$	$\frac{SCA}{a-1}$	$\frac{\frac{SCA}{a-1}}{\frac{SCE}{ab(r-1)}} = \frac{CMA}{CME}$	$F_t = F_{1-\alpha}[(a-1), ab(r-1)]$
B	b-1	$\frac{\sum_{j=1}^{b} B_j^2}{ar} - CM$	$\frac{SCB}{b-1}$	$\frac{\frac{SCB}{b-1}}{\frac{SCE}{ab(r-1)}} = \frac{CMB}{CME}$	$F_t = F_{1-\alpha}[(b-1), ab(r-1)]$
AB inter	(a-1)(b-1)	$\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} \frac{(AB)_{ij}^2}{r} - SCA - SCB - CM$	$\frac{SCI}{(a-1)(b-1)}$	$\frac{\frac{SCI}{(a-1)(b-1)}}{\frac{SCE}{ab(r-1)}} = \frac{CMI}{CME}$	$F_t = F_{1-\alpha}[(a-1)(b-1), ab(r-1)]$
Error	ab(r-1)	SC Total - SCA – SCB – SCI	$\frac{SCE}{ab(r-1)}$		
Total	abr-1	$SCTotal = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}\sum_{k=1}^{r} X_{ijk}^2 - CM$	$CM = \frac{T^2}{n}$ $T = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}\sum_{k=1}^{r} X_{ijk}$		

2.13.0 Sensibilidad

En base a los datos de linealidad del sistema calcular la concentración del Límite de Detección (LOD), y del Límite de Cuantificación (LOQ) en ppm.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN: El LOD >LOD. El coeficiente de variación para 10 lecturas de la solución de LOQ debe ser ≤ a 15%. Los picos respuesta correspondientes a lecturas de la solución a la concentración del LOD siempre son observadas.

CÁLCULOS:

Concentración (µg/ml) del LOD y LOQ[16]

$$LOD = \left[\frac{3.3 \times Sx/y}{Pendiente}\right] \qquad LOQ = \left[\frac{10 \times Sx/y}{Pendiente}\right]$$

2.14.0 Robustez

2.14.1 Estabilidad del estándar

Someter tres preparaciones de la solución estándar de trabajo por al menos 24 horas a diferentes condiciones de almacenamiento (Temperatura ambiente, Temperatura ambiente protegido de la luz y refrigeración) con objeto de estimar la estabilidad en cada tiempo con una SET fresca.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN: El estándar se considera estable si, la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición con respecto a la inicial se encuentra dentro del ± 2.0%.

2.14.2 Estabilidad de la muestra

Someter tres preparaciones de las muestras utilizadas en la prueba de precisión intermedia (100%) por al menos 24 horas a diferentes condiciones de almacenamiento (Temperatura ambiente, Temperatura ambiente protegido de la luz y refrigeración) con objeto de estimar la estabilidad en cada tiempo con una SET fresca.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN: La muestra se considera estable si la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición con respecto a la inicial se encuentra dentro del ± 2.0%.

2.14.3 Prueba de hisopos

Determinar la robustez al uso de un hispo alterno, cargando placas de acero inoxidable por triplicado a la concentración que representa el 100% y empleando una solución de referencia para determinar la cantidad recuperada con cada hisopo.

Control	Large Alpha® Swab, Texwipe TX® 714A
Parámetro Alterno	Alpha ® Swab with Long Handle, Texwipe TX® 761

CRITERIO DE ACEPTACIÓN: El coeficiente de variación entre hisopo control e hisopo alterno debe ser ≤ 3.0%.

Calcular el coeficiente de variación: [14, 15, 16, 17]

$$CV = \frac{DE}{\bar{x}} x\ 100$$

Desviación estándar:

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

n= número de mediciones

2.15.0 Tolerancia

Determinar la tolerancia al cambio del siguiente factor:

- Uso de equipo diferente (Cromatógrafo de Líquidos con detector de Arreglo de diodos es decir de longitud de onda variable)

Inyectar por sextuplicado la SET y por duplicado Fase Acuosa, Metanol, Fase Móvil, Muestra, Blanco de hisopo, Blanco de placa, Blanco detergente Dex-Lite, Blanco detergente bactium, LOD y LOQ.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN: la contribución de cualquier pico relacionado al diluente, fase móvil, etc., deberá ser ≤ 1.0% de la concentración de la muestra de trabajo.

El coeficiente de variación para 10 lecturas de la solución de LOQ debe ser ≤ 15.0%. Los picos respuesta correspondientes a lecturas de la solución a la concentración del LOD siempre son observados.

Calcular el coeficiente de variación: [14, 15, 16, 17]

$$CV = \frac{DE}{\bar{x}} x\ 100$$

Desviación estándar:

$$s = \sqrt{\frac{n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{n(n-1)}}$$

n= número de mediciones

III) INFORME DE LA VALIDACIÓN

3.1.0 Resumen

El reporte que a continuación se detalla describe los resultados obtenidos durante la Validación del Método para la detección de trazas de Benzocaina por HPLC.

La siguiente tabla, describe brevemente los resultados obtenidos en la validación:

Parámetro	Criterio de Aceptación	Resultado
Especificidad	* El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 1.0 %	El Agua, Acetonitrilo, Diluente, Fase Acuosa, Fase Móvil, Diluente + Hisopo, Diluente + hisopo + placa, Detergente Bactium, Detergente Dex-Lite no presentan interferencia alguna
Adecuabilidad y Precisión del Sistema	* El coeficiente de variación de 6 inyecciones consecutivas de la SET debe ser ≤ 5.0 %	Cumple %CV= 0.1
Linealidad del Sistema	* R^2 ≥ 0.995	R^2 = 0.998
	* Valor de la Pendiente (m). (Informativo)	m = 81809802
	* Valor del intercepto (b). (Informativo)	b = -14444.49
	* Intervalo de confianza	[80635014.7-82984589.7]
Exactitud y Precisión del Método	* El porcentaje de Recobro para cada nivel debe ser ≥ 50.0 % y ≤ 125.0%	NIVEL 50% NIVEL 100% *X*= 104.9% *X*= 99.1% %CV= 0.9 %CV= 1.0
Linealidad del Método	* R^2 ≥ 0.995	R2 = 0.998
	* Valor de la Pendiente (m).	m = 0.9594
	* Valor del intercepto (b).	b = 0.0112
Precisión Intermedia:	El coeficiente de variación entre réplicas y días debe ser: ≤ 25.0 %. * Así mismo no debe existir diferencia estadísticamente significativa entre los factores analista, día y la interacción entre ellos en el análisis de varianza	ANALISTA 1 DÍA1 DÍA2 p analis= 0.41 CV%=1.0 CV%= 2.5 p día = 0.31 X = 99.1% X= 96.8% p inter = 0.25 ANALISTA 2 DIA1 DIA2 CV%= 2.2 CV%=1.7 X= 96.6% X= 97.0% No hay diferencia estadística ya el valor de p es mayor a 0.05% P = determina si existe diferencia estadística si esta es menor a 0.05%

Parámetro	Criterio de Aceptación	Resultado
Sensibilidad del método	* El pico correspondiente al analito siempre es observado en 10 inyecciones consecutivas a la concentración del límite de detección.	Cumple LOD = 0.0275 mg/hisopo LOD = 2.75ppm %CV = 0.2
	* El coeficiente de variación para 10 inyecciones consecutivas a la concentración del LOQ debe ser menor o igual a 15.0 * LOQ>LOD	Cumple LOQ= 0.0834 mg/hisopo LOQ = 8.34ppm %CV= 0.1
Robustez: Prueba de hisopos	* El coeficiente de variación entre el hisopo control e hisopo alterno debe ser menor o igual a 3%	El método es robusto al uso del hisopo TX761 %CV = 2.6
Robustez: Estabilidad del Estándar	* La diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición con respecto al tiempo inicial, debe encontrarse entre el ±2.0%.	La Solución Estándar de Trabajo debe prepararse al momento del análisis.
Robustez: Estabilidad de la Muestra de Trabajo	* La diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición con respecto al tiempo inicial, debe encontrarse entre el ± 2.0%.	La solución muestra de Trabajo es estable a Temperatura Ambiente resguardada en viales para HPLC por 48 horas
Tolerancia	* La contribución de cualquier pico relacionado al diluente, fase móvil, etc. , no resuelto del pico de interés deberá de ser menor a 1.0% de la concentración de la muestra de trabajo * El pico correspondiente al analito siempre es observado en 10 inyecciones consecutivas a la concentración del LOD. * El coeficiente de variación para 10 inyecciones consecutivas a la concentración del LOQ debe ser menor o igual a 15.0 * LOQ>LOD	El Agua, Acetonitrilo, Diluente, Fase Acuosa, Fase Móvil, Diluente + Hisopo, Diluente + hisopo + placa, Detergente Bactium, Detergente Dex-Lite no presentan interferencia alguna. El pico correspondiente al analito siempre fue observado en 10 inyecciones consecutivas a la concentración del LOD con un CV%= 0.3 10 inyecciones consecutivas a la concentración del LOQ tuvieron un %CV= 0.2 LOQ>LOD

3.2.0 Adecuabilidad del sistema

La solución estándar de trabajo fue inyectada por sextuplicado.

Criterio de Aceptación: El coeficiente de variación del promedio de las 6 áreas correspondientes a la Benzocaina debe ser $\leq$ 5.0%.

Adecuabilidad y Precisión (SET)	
Promedio (Área)	**% CV**
4879238	0.1

Conclusión: El sistema para la detección de Benzocaina cumple con los parámetros de adecuabilidad.

3.3.0 Especificidad

Se realizó inyectando por duplicado el Agua, Acetonitrilo, Diluente, Fase Acuosa, Fase Móvil, Diluente+Hisopo, Diluente+hisopo+placa, Detergente Bactium, Detergente Dex-Lite.

Criterio de Aceptación: El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 1.0%

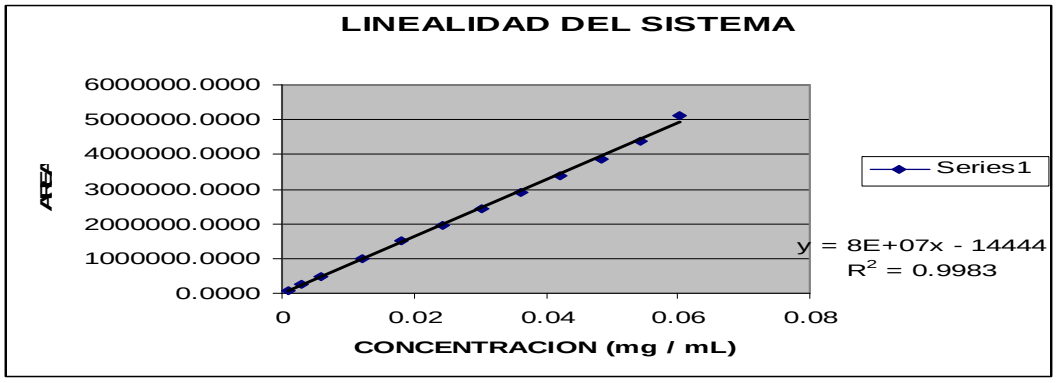
Conclusión: El método es específico para la determinación de trazas de Benzocaina ya que no se observa interferencia analítica del Agua, Acetonitrilo, Diluente, Fase Acuosa, Fase Móvil, Diluente+Hisopo, Diluente+hisopo+placa, Detergente Bactium, Detergente Dex-Lite.

3.4.0 Linealidad del Sistema

Se realizo a partir del promedio de tres Respuestas de Área vs Concentraciones partiendo de una misma solución estándar madre la cual tenía una concentración inicial de 0.6 mg/mL, de esta solución se tomaron alícuotas para obtener concentraciones con un rango de concentración del 3.3% al 200%.

Criterio de Aceptación: $R^2 = 0.995$; Reportar pendiente e intercepto en "y"

Nivel %	Concentración mg/ml
3.3	0.001
10	0.003
20	0.006
40	0.012
60	0.018
80	0.024
100	0.030
120	0.036
140	0.042
160	0.048
180	0.054
200	0.060



Coeficiente de Correlación = 0.998

Pendiente = 81809802

Ordenada al Origen = -14444

Intervalo de Confianza = [80635014.7-82984589.7]

Conclusión: El sistema para la detección de Benzocaína es Lineal, en el intervalo de prueba.

3.5.0 Exactitud y Precisión del Método

Se realizó la exactitud y precisión del método partiendo de una solución madre de Benzocaina con una concentración de 0.5 mg/ml, inoculando a tres niveles de concentración (50-150%) placas de acero inoxidable por triplicado.

Criterio de Aceptación: El Porcentaje de Recobro para cada nivel debe ser ≥ 50 % y ≤ 125.0 %

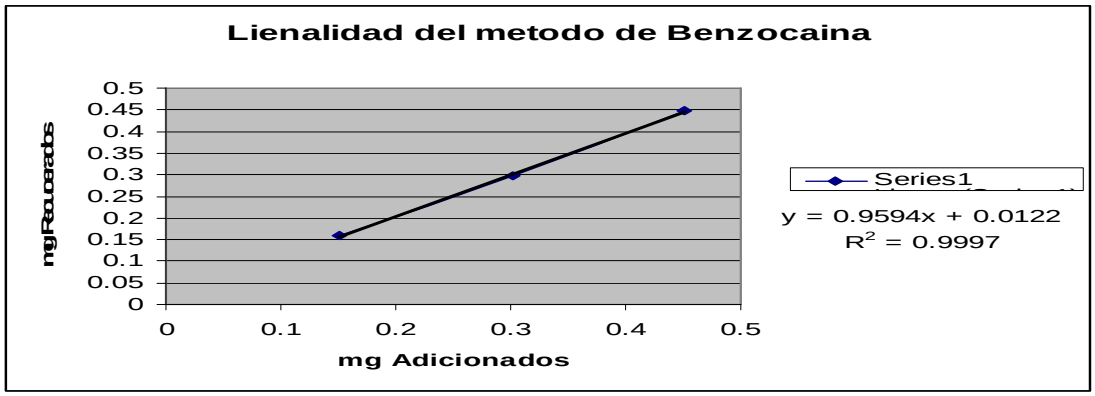
Nivel %	mg Adicionados	mg Recuperados	% Recuperado	Promedio	% C.V.
50%	0.15066	0.1567	104.0	104.9	0.8
	0.15066	0.1593	105.7		
	0.15066	0.1583	105.1		
100%	0.3012	0.2953	98.0	99.1	1.0
	0.3012	0.2991	99.3		
	0.3012	0.3012	100.0		
150%	0.4518	0.4512	99.9	99.0	0.9
	0.4518	0.4463	98.8		
	0.4518	0.4436	98.2		

Conclusión: El Método para la detección de Benzocaina es preciso y exacto, en el intervalo de prueba cumpliendo con % de recobro para cada nivel.

3.6.0 Linealidad del Método

Tomando los datos de Exactitud y Precisión del Método graficar los miligramos adicionados vs miligramos recuperados de los tres niveles.

Criterio de Aceptación: $R^2 = 0.99$; Reportar pendiente e intercepto en “y”



Coeficiente de Correlación =0.999

Pendiente = 0.9594

Ordenada al Origen = 0.0122

Intervalo de confianza = [0.763438-1.155274]

Conclusión: Los resultados obtenidos cumplen con los criterios de aceptación, por lo cual se concluye que el Método para la detección de trazas Benzocaína es Lineal dentro del intervalo de prueba.

3.7.0 Precisión Intermedia

Esta prueba fue realizada por dos analistas. Cada analista realizó recobros en placa al 100% por triplicado en dos días diferentes y a los resultados obtenidos se les realizó un análisis de estadístico de ANOVA para determinar si existía diferencia significativa entre días y analistas

Criterio de Aceptación: El coeficiente de variación entre réplicas y días debe ser: ≤ 25.0 %. Así mismo no debe existir diferencia estadísticamente significativa entre los factores analista, día y la interacción entre ellos, El valor de P debe ser mayor a 0.05, lo que significa que la “F” experimental de análisis de varianza debe ser menor que la “F” teórica a un nivel de confianza del 95%.

	A1 (%)	A2 (%)
D1	98	98.4
D1	99.3	94.2
D1	100	97.1
X	99.1	96.6
%CV	1.0	2.2
D2	98.9	96.5
D2	94.1	98.8
D2	97.4	95.6
X	96.8	97.0
%CV	2.5	1.7

ANOVA Precisión Intermedia de Benzocaína						
Fuente de Variación	**Suma de Cuadrados**	**Grados de Libertad**	**Suma de C Medios**	**F exp**	**F-valor**	**p-valor**
Analista	2.7075	1	2.7075	0.7517	5.3176	0.41117
Día	4.200833	1	4.200833	1.1663	5.3176	0.31163
Residual	5.4675	1	5.4675	1.5180	5.3176	0.25289
Interacción	28.81333	8	3.601667			
Total	41.18917	11				

Conclusión: El estudio fue llevado a cabo de manera precisa y exacta, cumpliendo con los criterios de aceptación establecidos para el coeficiente de variación total y el valor de "P", indicando que no existe diferencia significativa al analizar en diferentes días y analistas, comprobando la Reproducibilidad en el desarrollo de la prueba.

3.8.0 Sensibilidad del Método

Tomando los valores de la Linealidad del Sistema para Detergente se calculó la concentración para el Límite de Detección y Cuantificación, inyectando diez veces cada una de las soluciones a la concentración resultante.

Critério de Aceptación: El coeficiente de variacion de 10 inyecciones de la solucion a la concentracion de LOQ debe tener um coeficiente de variacion menor a 15 %. Los picos correspondientes a lecturas de la solución a la concentracion de LOD siempre son observadas

Concentración (µg/mL) del LOD y LOQ

$$LOD = \left[\frac{3.3 \times Sx/y}{Pendiente}\right] \qquad LOQ = \left[\frac{10 \times Sx/y}{Pendiente}\right]$$

Para el cálculo del LOD y LOQ en mg/hisopo:

$$\text{LOD (mg/hisopo)} = \left[\frac{(LOD(\mu g) \times 10mL)}{(1ml) \times 1hisopo} \times \left(\frac{1mg}{1000\mu g}\right)\right]$$

$$\text{LOQ (mg/hisopo)} = \left[\frac{(LOQ(\mu g) \times 10mL)}{(1ml) \times 1hisopo} \times \left(\frac{1mg}{1000\mu g}\right)\right]$$

BENZOCAÍNA				
Concentración	mg/ml	µg/ml (ppm)	mg/hisopo	% C.V.
LOD =	0.002751217	2.751	0.0275	0.17
LOQ =	0.0083370	8.337	0.0834	0.08

Conclusión: El valor del LOQ es > al LOD, el coeficiente de variación para 10 inyecciones de las solución a la concentración del LOQ es ≤ al 15 %; los picos respuesta correspondientes a las inyecciones de la solución a la concentración LOD siempre son observadas.

3.9.0 Robustez

3.9.1 Prueba de Hisopos

Se determinó la robustez del método al uso de un hisopo alterno, preparando muestras cargadas al 100% por triplicado y empleando una solución de referencia al 100% para la cuantificación.

Control. Large Alpha® Swab, Texwipe TX® 714A
Parámetro Alterno. Alpha ® Swab with Long Handle, Texwipe TX® 761

Criterio de Aceptación: El coeficiente de variación entre hisopo control e hisopo alterno debe ser ≤3 %. Así mismo no debe existir diferencia estadísticamente significativa entre ellos.

Hisopo	% Recobro	Promedio	% CV
Control (TX714A)	103.4	100.6	2.6
	98.0		
	100.5		
Alterno(TX761)	98.5	97.4	
	98.2		
	95.6		

Conclusión: El método es robusto al uso del hisopo TX761 para el desarrollo de la prueba.

3.9.2 Estabilidad del Estándar

Se evalúo la estabilidad de la solución estándar partiendo de tres pesadas diferentes y sometiendo estas muestras a diferentes condiciones

Criterio de Aceptación: La diferencia absoluta de la media aritmética para cada condición con respecto al tiempo inicial, debe ser ≤ 2.0%

Condición	**Tiempo**	
Temperatura ambiente	**Inicio**	**24 h**
	98.2	102.2
	98.7	101.9
	98.7	102.1
Promedio =	98.5	102.0
% Diferencia Absoluta =		**3.6**

Condición	**Tiempo**	
Protegido de la luz	**Inicio**	**24 h**
	98.7	102.0
	98.5	102.9
	98.4	102.2
Promedio =	98.5	102.4
% Diferencia Absoluta =		**3.9**

Condición	Tiempo	
Refrigeración	**Inicio**	**24 h**
	98.7	101.9
	98.3	101.9
	98.7	102.2
Promedio =	98.6	102.0
% Diferencia Absoluta =		**3.5**

Conclusión: La Solución Estándar de Trabajo debe prepararse al momento del análisis.

3.9.3 Estabilidad de la Muestra

Se evalúo la estabilidad de la muestra de trabajo en viales de HPLC por 48 horas a temperatura ambiente y refrigeración, sometiendo tres preparaciones y verificando el contenido de impurezas; cuantificando con una SET fresca.

Criterio de Aceptación: La diferencia absoluta de la media aritmética para cada condición con respecto al tiempo inicial, debe ser ≤2.0%.

Condición	Tiempo		
Temperatura Ambiente	**Inicio**	**24 h**	**48 h**
	104.4	103.7	106.2
	95.8	95.7	97.6
	90.6	90.1	92.3
Promedio =	96.9	96.5	98.7
% Diferencia Absoluta =		**0.4**	**1.8**

Condición	Tiempo		
	Inicio	**24 h**	**48 h**
Protegido de la luz	104.1	104.0	106.1
	96.0	95.6	98.0
	90.5	90.3	92.4
Promedio =	96.9	96.6	98.8
% Diferencia Absoluta =		**0.3**	**1.9**

Condición	Tiempo		
	Inicio	**24 h**	**48 h**
Refrigeración	104.1	103.5	105.7
	95.8	90.0	97.6
	90.6	95.2	91.9
Promedio =	96.8	96.2	98.4
% Diferencia Absoluta =		**0.6**	**1.6**

CONCLUSIÓN: La solución Muestra de Trabajo es estable por 48 horas a temperatura ambiente, protegida de la luz y en Refrigeración.

3.10.0 Tolerancia. Cambio de Equipo

Uso de Equipo diferente:

- Cromatógrafo de Líquidos con Detector Arreglo de Diodos (Longitud de Onda Variable)

Inyectar por sextuplicado la SET y por duplicado Fase Acuosa, metanol, fase móvil, muestra, diluente + hisopo, diluente + hisopo + placa, detergente Dex-Lite, detergente bactium, LOD y LOQ

Criterios de Aceptación: La contribución de cualquier pico relacionado al diluente, fase móvil, etc. no resuelto del pico de interés deberá ser ≤ 1.0% de la concentración de la muestra de trabajo. El coeficiente de variacion de 10 inyecciones de la solucion a la concentracion de LOQ debe tener um coeficiente de variacion menor a 15 %. Los picos correspondientes a lecturas de la solucion a la concentracion de LOD siempre son observadas.

Conclusión: El método tolera el cambio de equipo dado que no se muestra interferencia mayor al 1.0% con respecto al pico de interés. El coeficiente de variación de 10 inyecciones de la solución a la concentración de LOQ fue de 0.2%. Los picos correspondientes a lecturas de la solución a la concentración de LOD siempre son observadas y su coeficiente de variación para 10 inyecciones tuvo un valor de 0.3%

CONCLUSIONES

La Validación del Método para la detección trazas de Benzocaina cumplió satisfactoriamente con los parámetros evaluados bajo las condiciones de operación establecidas anteriormente descritas.

Los resultados obtenidos aseguran que el método es llevado a cabo de manera precisa, reproducible, consistente y exacta. Cualquier modificación al método, requerirá la revalidación analítica.

Los resultados obtenidos muestran que el método es capaz de detectar trazas del activo en cantidades menores a las del ARL (Límite de residuo permitido). Por lo tanto es un método confiable.

El método es capaz de cuantificar trazas de Benzocaína y de esta manera se evitará que ocurra una contaminación cruzada. Esto asegurará que al fabricar algún otro medicamento sobre la misma línea de producción no se pondrán vidas en peligro.

El asegurar que no existe activo en cantidades tóxicas para humanos ayudará a evitar que la compañía pierda dinero y conservará los certificados de Buenas Prácticas, los cuales son muy importantes para la venta de medicamentos no solo aquí sino en otros países.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Analito: Componente específico de una muestra a medir en un análisis.

ARL: Límite de Residuo Permitido. Límite de residuo en un equipo después de limpiarlo.

Criterio de Aceptación: Límites numéricos, rangos u otras mediciones para la aceptación de los resultados de un método analítico.

Sustancia de referencia: Sustancia de pureza conocida destinada a utilizarse en comprobaciones analíticas físicas, químicas o microbiológicas en el transcurso de las cuales sus propiedades se comparan con la sustancia de evaluación.

LOD: Límite de detección. Respuesta mínima detectable.

LOQ: Límite de cuantificación. Respuesta mínima cuantificable.

Método Analítico: Descripción de la secuencia de actividades recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar acabo el análisis de un componente específico de la muestra.

Muestra: Proporción representativa del material a evaluar.

N/A: No Aplica.

N/D: No disponible

Protocolo de Validación: Descripción de pruebas específicas para demostrar que un proceso da resultados que cumplen con los criterios preestablecidos de manera consistente.

Robustez: Capacidad del método analítico de mantener su desempeño cuando al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método.

SET: Solución Estándar de Trabajo.

SEL: Subject Exposure Limits (mg/ subject/ day). Limite de fármaco que puede ser administrado a humanos sin causar efectos farmacológicos tóxicos

S/D: Sin Dato.

Benzocaina: Es un anestésico local, empleado como calmante del dolor. Actúa bloqueando la conducción de los impulsos nerviosos al disminuir la permeabilidad de la membrana neuronal a los iones sodio.

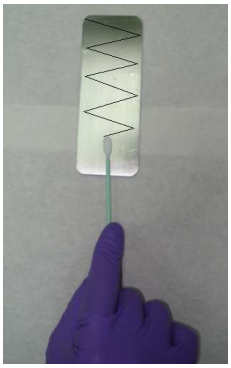
IV) ANEXOS

4.1.0 Muestreo por el método de hisopo

En un tubo con el diluente indicado por el método analítico, se sumerge un hisopo y se presiona sobre las paredes secas del tubo para eliminar el exceso del diluente.

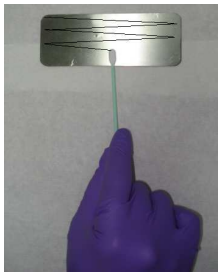
Recobro Vertical:

Colocar una las caras planas del hisopo de forma firme sobre la superficie a muestrear y llevar acabo movimientos en “zig-zag” abarcando una superficie de 65 cm^2 (13 cm. x 5 cm).



Recobro Horizontal:

El hisopo se gira 180° para colocar su segunda cara plana sobre la superficie a muestrear y se llevan acabo movimientos firmes en zig-zag de arriba abajo abarcando una superficie de 65 cm^2 (13 cm. x 5 cm.).



Recobro Transverso Derecho:

El hisopo se gira 90° para colocar su borde derecho sobre la superficie a muestrear y se llevan acabo movimientos en zig-zag en forma inclinada en dirección de arriba – derecha, hacia abajo-izquierda abarcando una superficie de 65 cm^2 (13 cm. x 5 cm.) siguiendo el mismo cuadro imaginario abarcado por los dos muestreos previos.

Recobro Transverso Izquierdo.

El hisopo se gira 180° para colocar su borde izquierdo sobre la superficie a muestrear y se llevan a cabo movimientos en zig-zag en forma inclinada en dirección de arriba – izquierda, hacia abajo-derecha abarcando una superficie de 65 cm^2 (13 cm. x 5 cm.) siguiendo el mismo cuadro imaginario abarcado por los dos muestreos previos.

4.2.0 Factor de corrección de recobros

Resultados de las pruebas analíticas para cada superficie que se está validando, será de acuerdo a las siguientes directrices que figuran en el siguiente cuadro.

	Recobro individual	Promedio de Recobros	Factor de Corrección de recobros (CF)
A	Todos ≥ 75%	≥ 85 %	Ninguno (CF = 1)
B	Todos ≥ 75%	< 85 %	Valor de recobro promedio
C	Uno o más < 75% Y el resto ≥ 50%	N/A	Valor mas bajo de recobro individual
D	Uno o más	N/A	El método no puede utilizarse. Optimizar el procedimiento de recobros y revalidar el método
E	Uno o más > 100% y ≤125%	≤ 100 %	
F	Uno o más > 100% y ≤125%	> 100 % y ≤ 125 %	Recobros Individuales o Promedios >100% no pueden dar lugar a una corrección (CF = 1)
G	Uno o más > 125%	N/A	El método no puede utilizarse. Optimizar el procedimiento de recobros y revalidar el método
Resultado Corregido = valor analítico medido / CF Donde CF = factor de corrección			

4.3.0 Parámetros del protocolo de validación

ANEXO A

ADECUABILIDAD

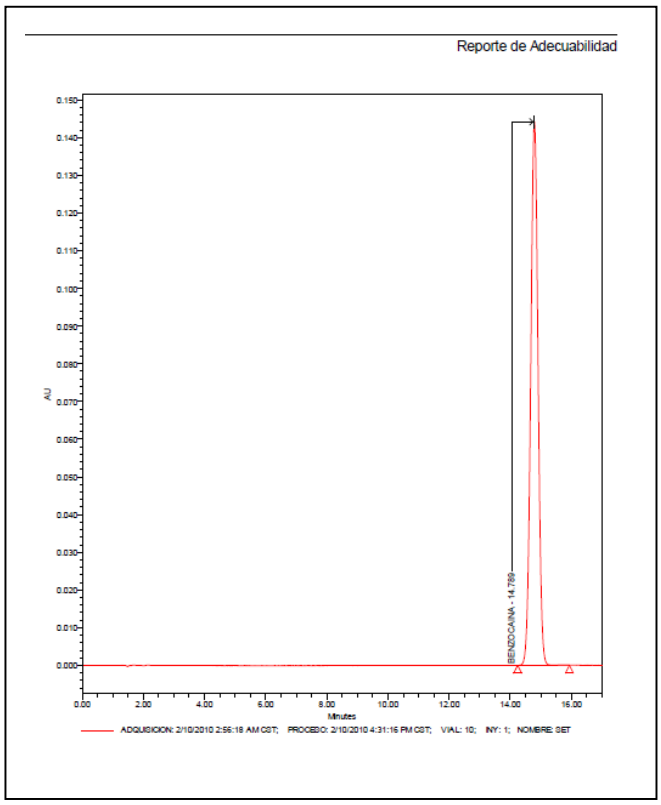


Tabla 1

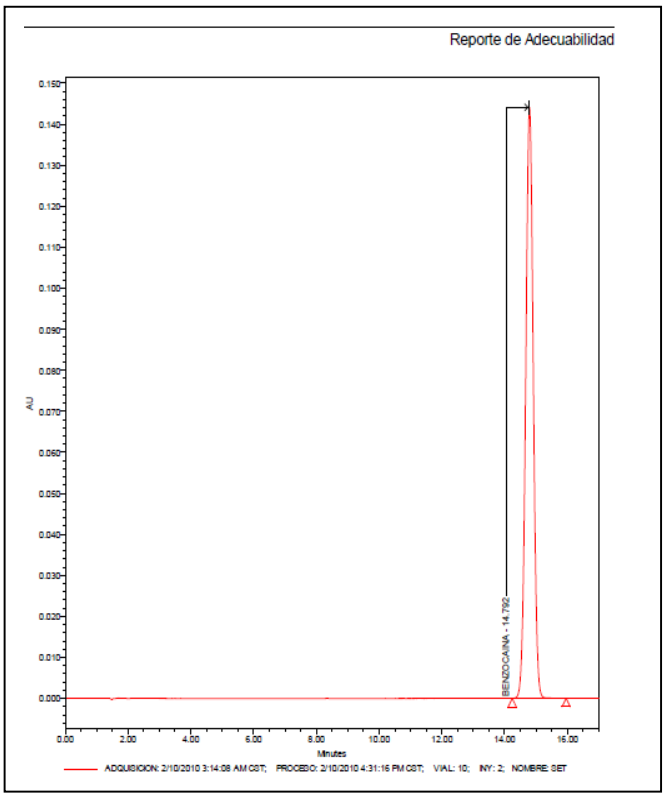


Tabla 2

Tabla 1 y Tabla 2. Muestran cromatogramas tipo de las inyecciones de adecuabilidad

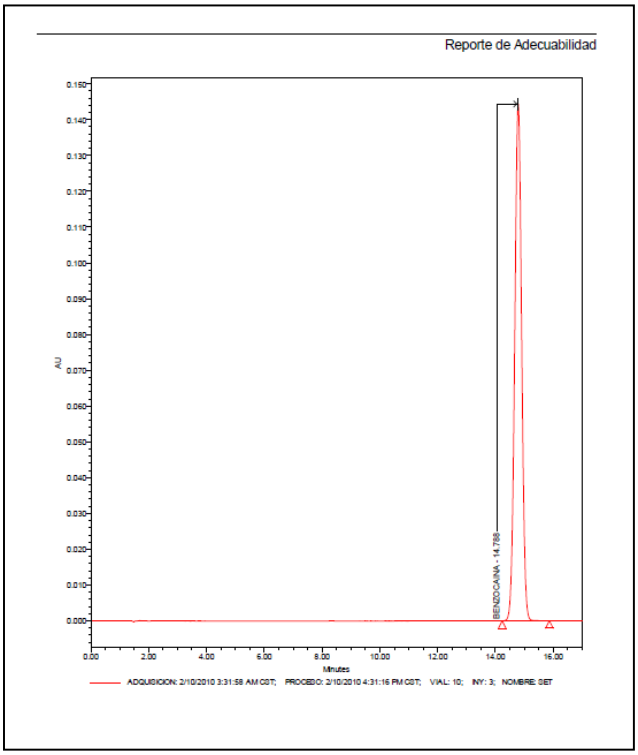


Tabla 3

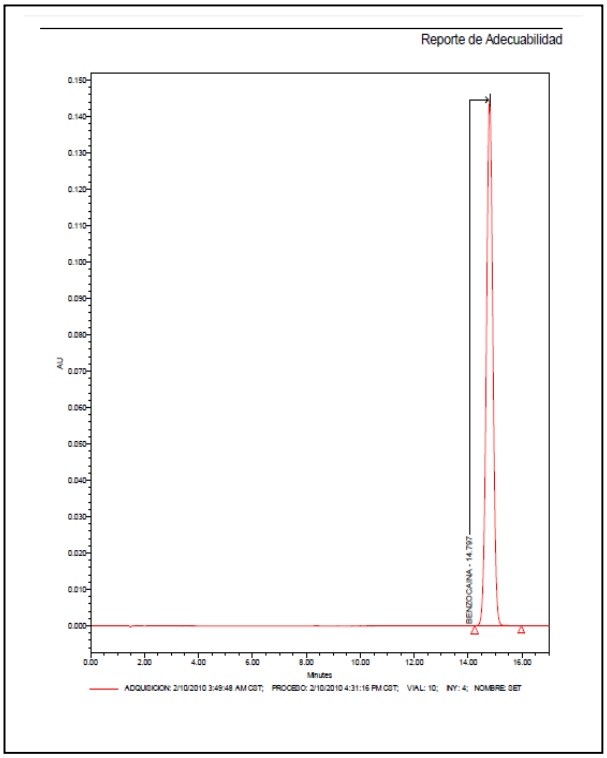


Tabla 4

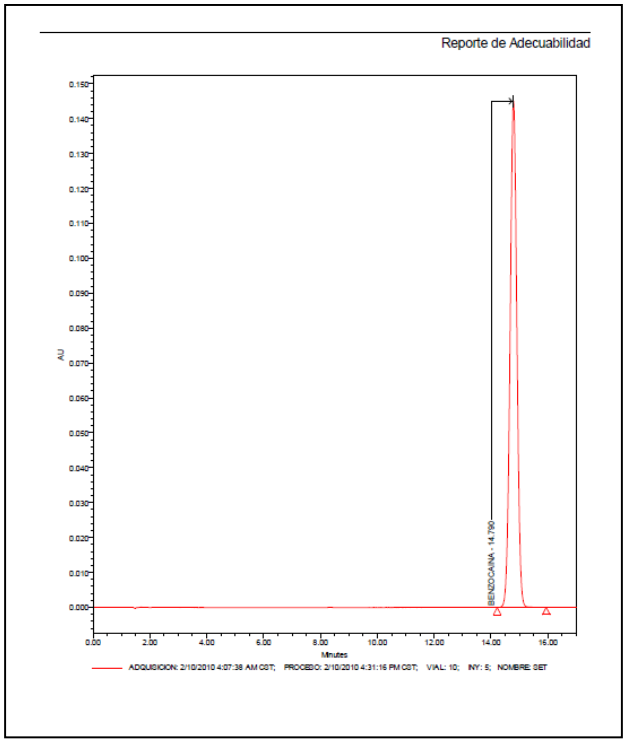


Tabla 5

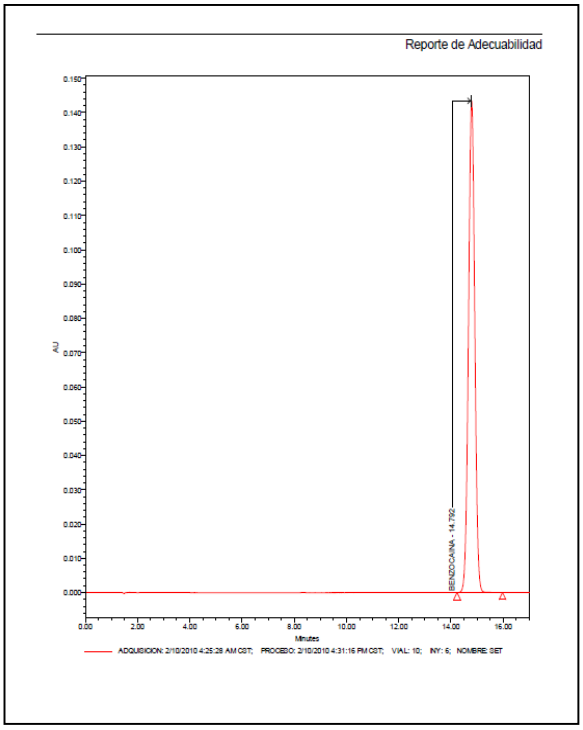


Tabla 6

Tabla 3, Tabla 4, Tabla 5 y Tabla 6. Muestran cromatogramas tipo de las inyecciones de adecuabilidad.

ANEXO B

ESPECIFICIDAD
BCO AGUA

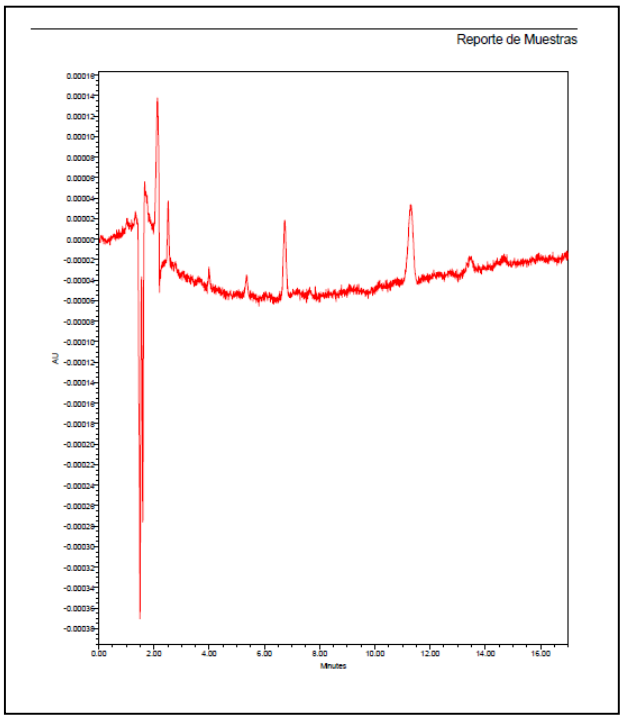


Tabla 1

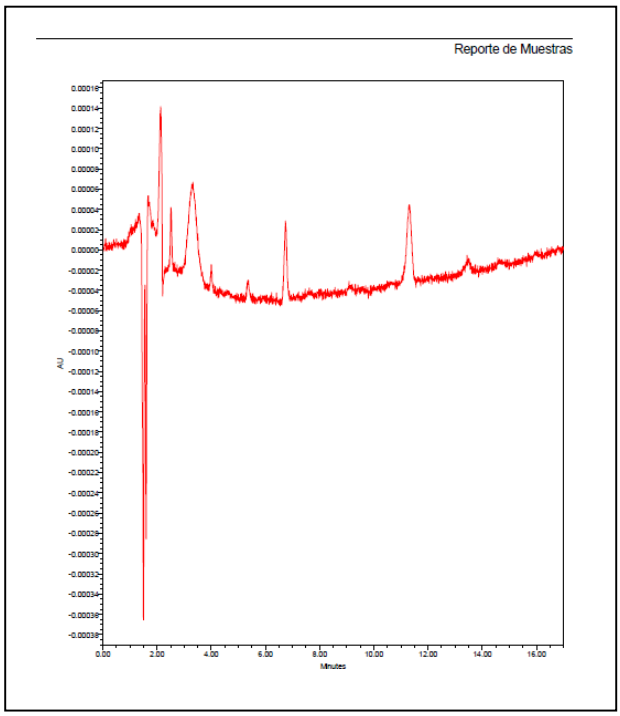


Tabla 2

Tabla 1 y Tabla 2. Muestran cromatogramas tipo de las inyecciones del blanco agua por duplicado

BCO ACETONITRILO

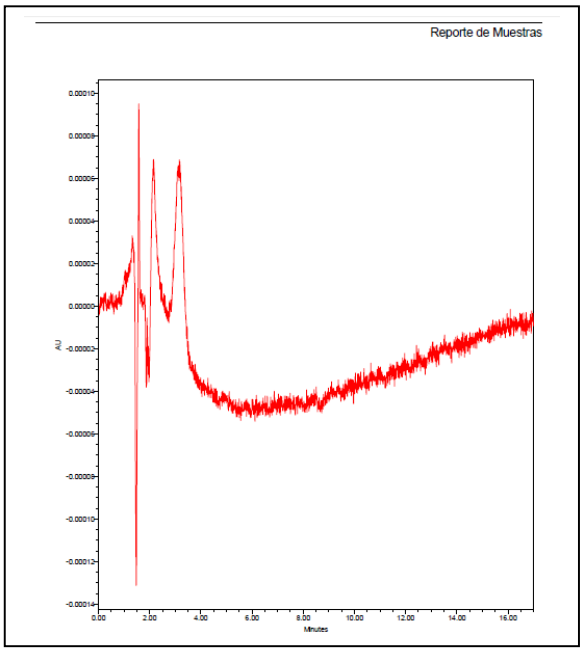


Tabla 3

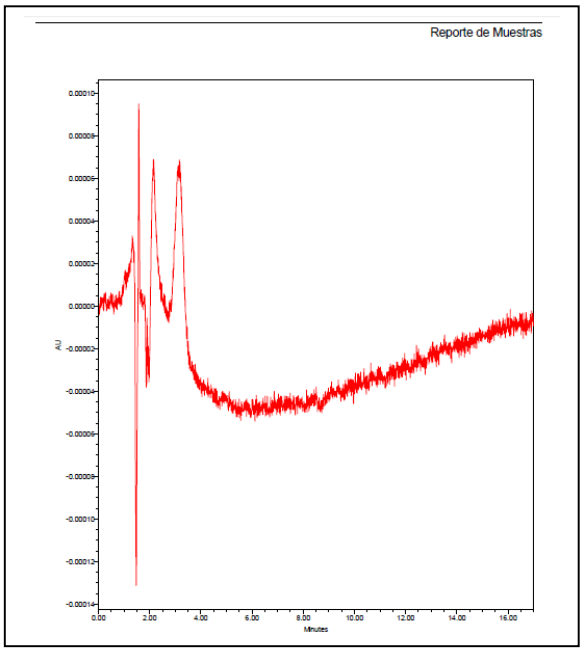


Tabla 4

BCO DILUENTE

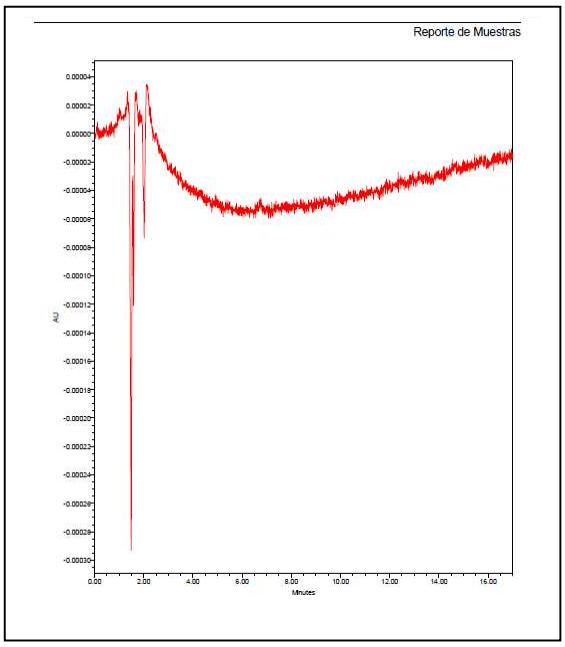


Tabla 5

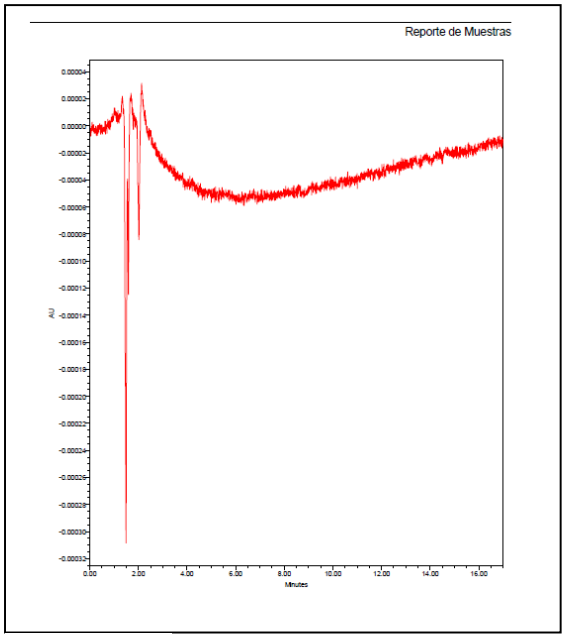


Tabla 6

Tabla 3 y Tabla 4. Muestran cromatogramas tipo de las inyecciones del blanco acetonitrilo por duplicado

Tabla 5 y Tabla 6. Muestran cromatogramas tipo de las inyecciones del blanco diluente por duplicado

BCO FASE ACUOSA

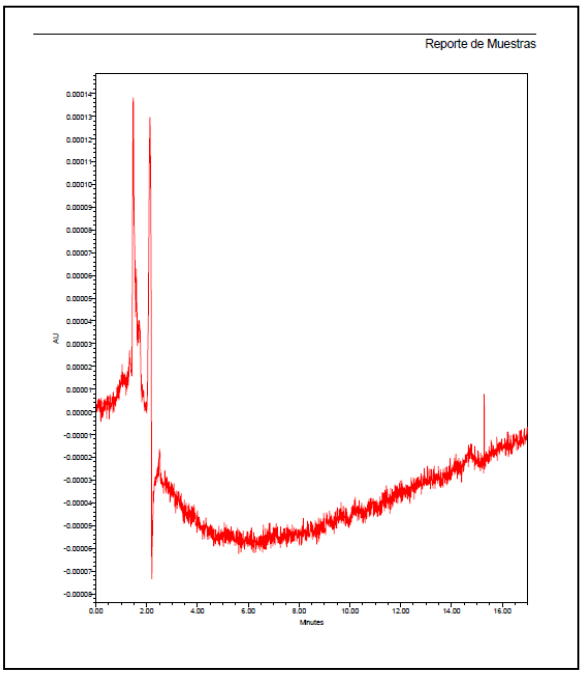


Tabla 7

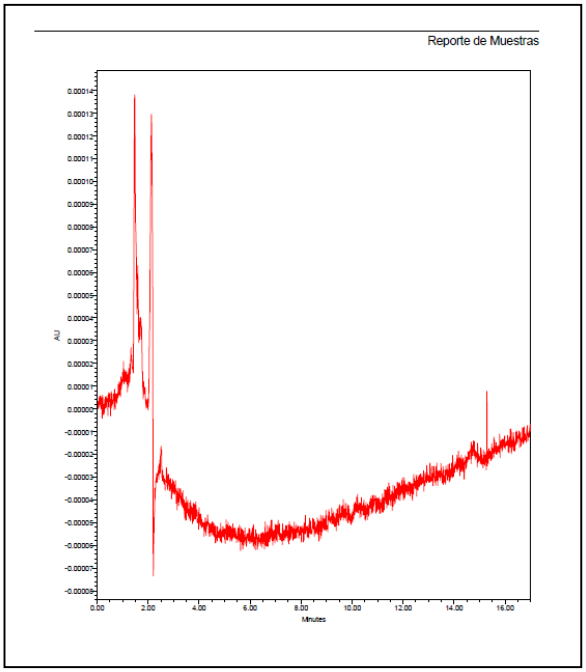


Tabla 8

BCO FASE MOVIL

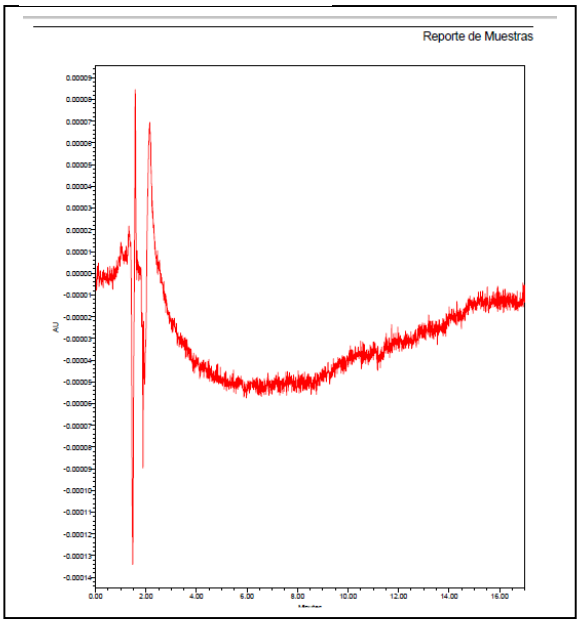


Tabla 9

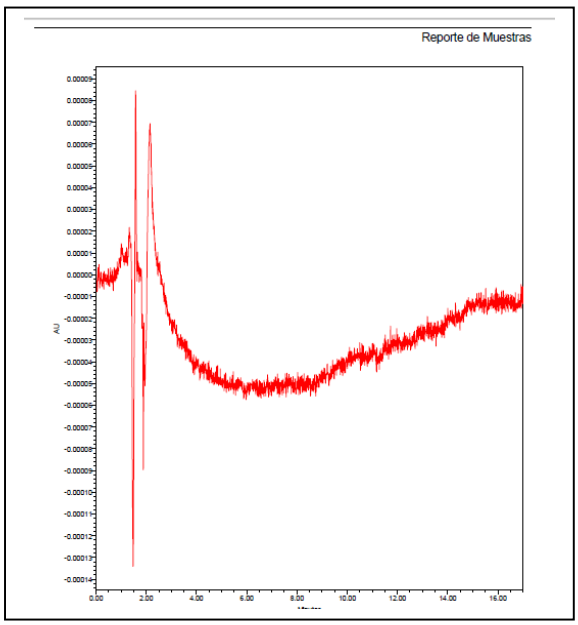


Tabla 10

Tabla 7 y Tabla 8. Muestran cromatogramas tipo de las inyecciones del blanco fase acuosa por duplicado

Tabla 9 y Tabla 10. Muestran cromatogramas tipo de las inyecciones del blanco fase movil por duplicado

BCO HISOPO

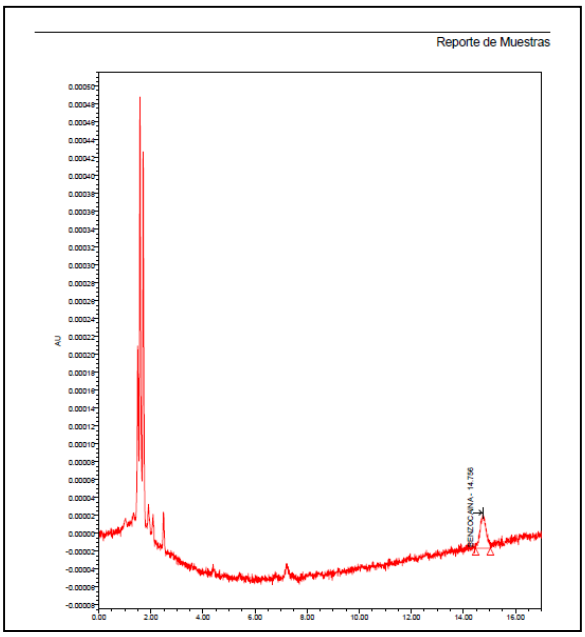


Tabla 11

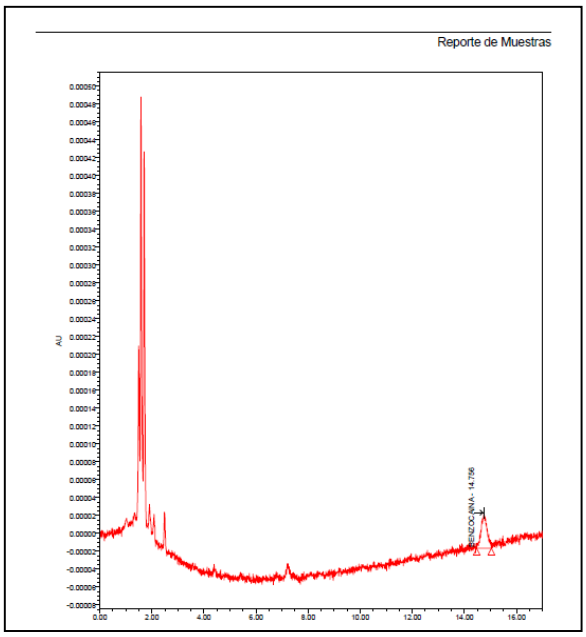


Tabla 12

BCO HISOPO ± PLACA

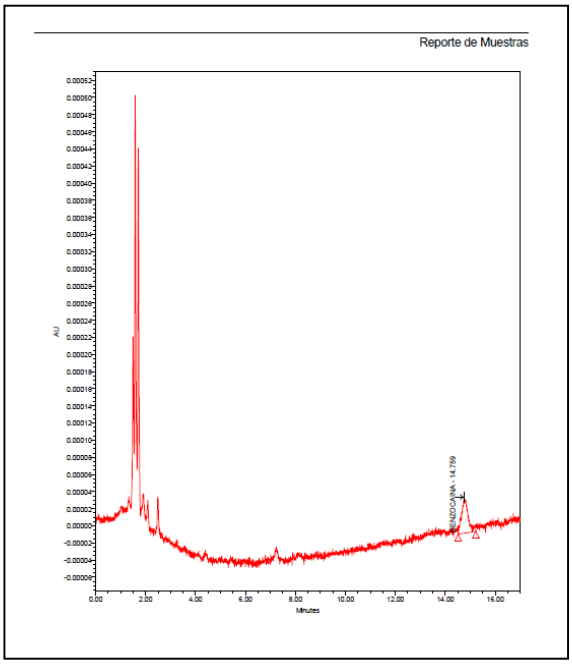


Tabla 13

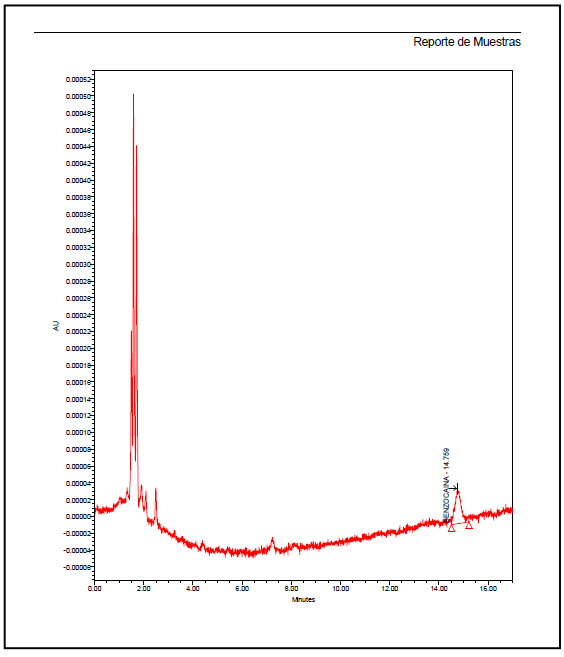


Tabla 14

Tabla 11 y Tabla 12. Muestran cromatogramas tipo de las inyecciones del blanco hisopo por duplicado

Tabla 13 y Tabla 14. Muestran cromatogramas tipo de las inyecciones del blanco hisopo-placa por duplicado

DETERGENTE DEX-LITE

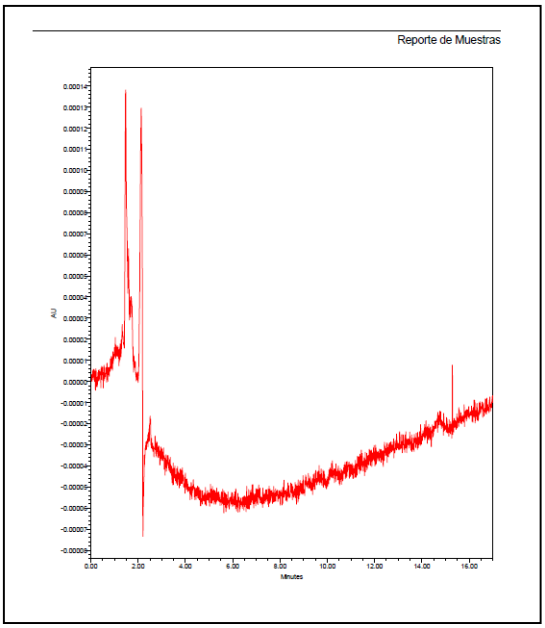


Tabla 15

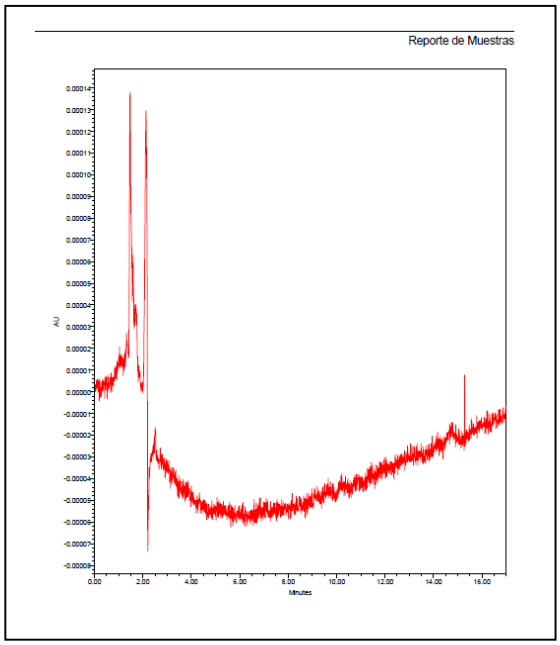


Tabla 16

BLANCO DETERGENTE BACTIUM

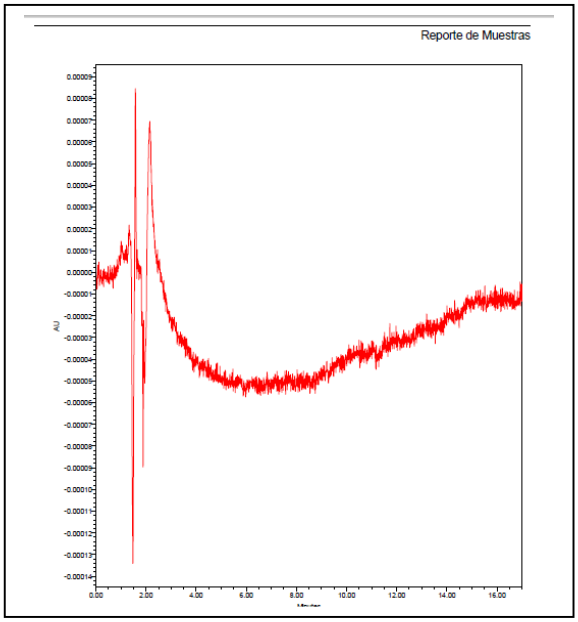


Tabla 17

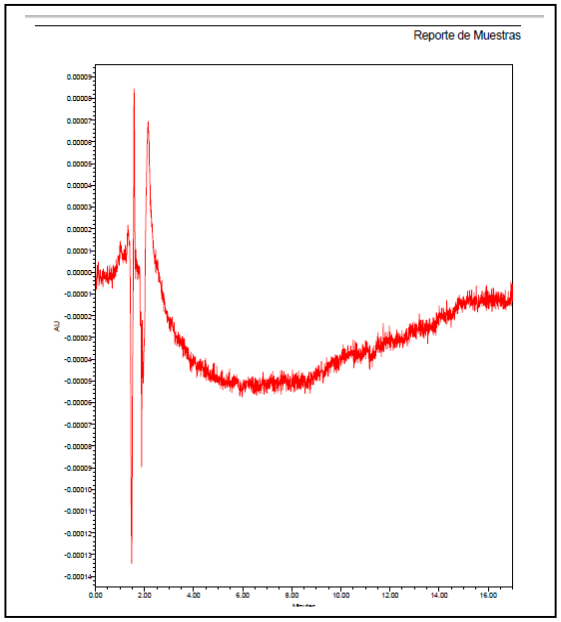


Tabla 18

Tabla 15 y Tabla 16. Muestran cromatogramas tipo de las inyecciones del blanco dexlite por duplicado

Tabla 17 y Tabla 18. Muestran cromatogramas tipo de las inyecciones del bactium por duplicado

ANEXO C

LINEALIDAD BENZOCAÍNA

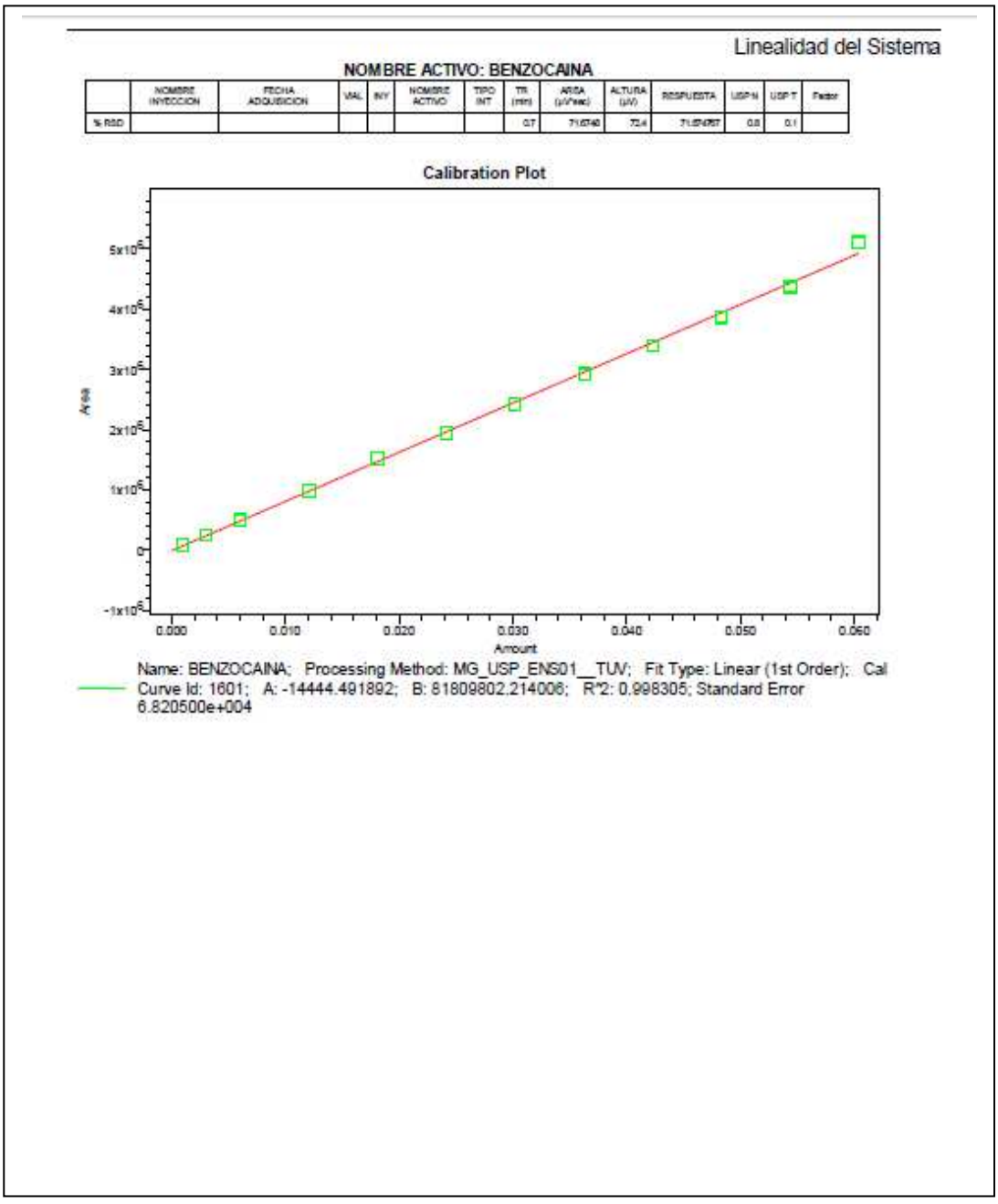


Tabla 1. Muestra la linealidad del sistema

ANEXO D

EXACTITUD Y PRECISIÓN DEL MÉTODO

RECOBROS 50%

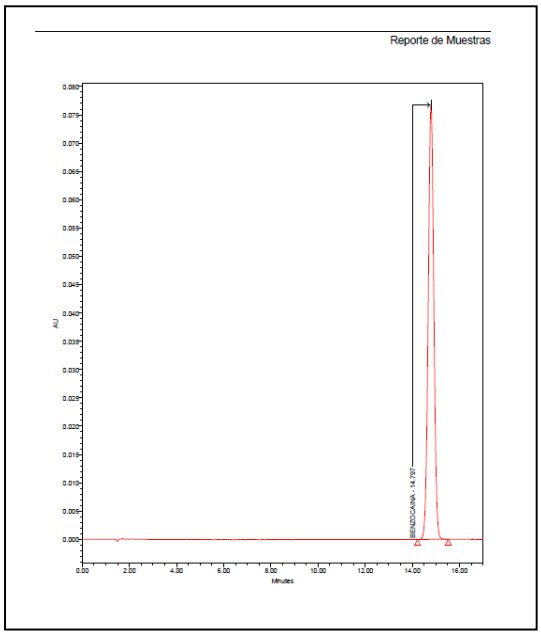


Tabla 1

RECOBROS 100%

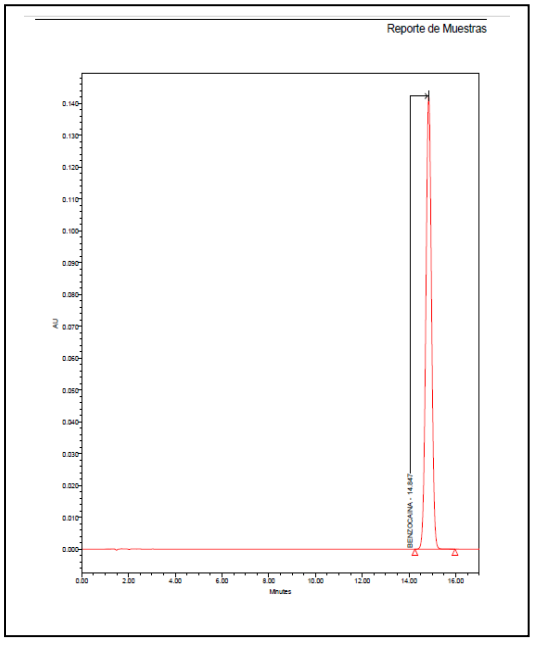


Tabla 2

Tabla 1 y Tabla 2. Muestra cromatogramas tipo de recobros al 50% y 100% respectivamente.

RECOBROS 150%

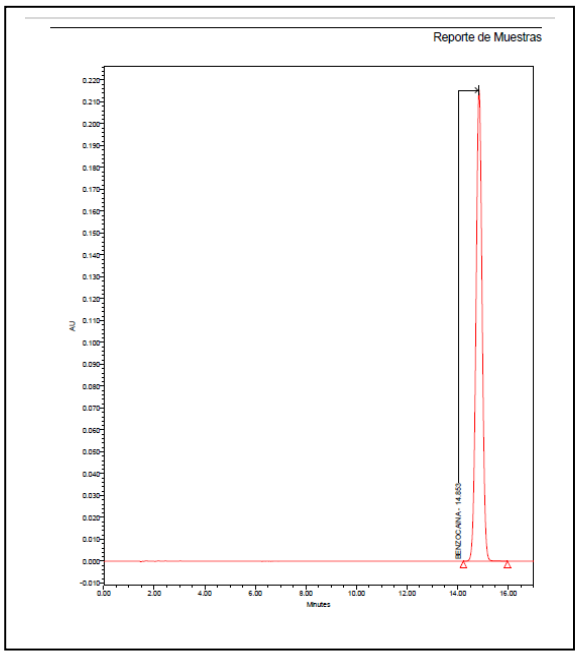


Tabla 3. Cromatograma tipo de recobros al 150%

ANEXO E

LINEALIDAD DEL MÉTODO ANALISTA 1 DÍA 1

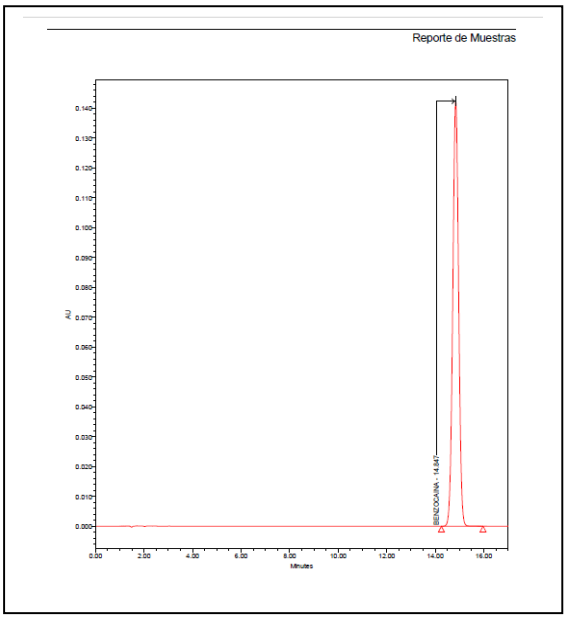


Tabla 1. Cromatograma tipo de recobros del analista 1 día 1

ANALISTA 1 DIA 2

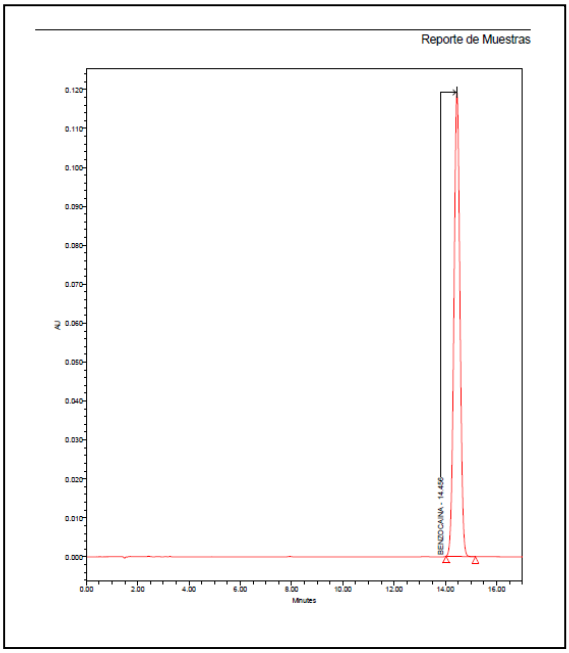


Tabla 2. Cromatograma tipo de recobros de analista 1 día 2

ANALISTA 2 DÍA 1

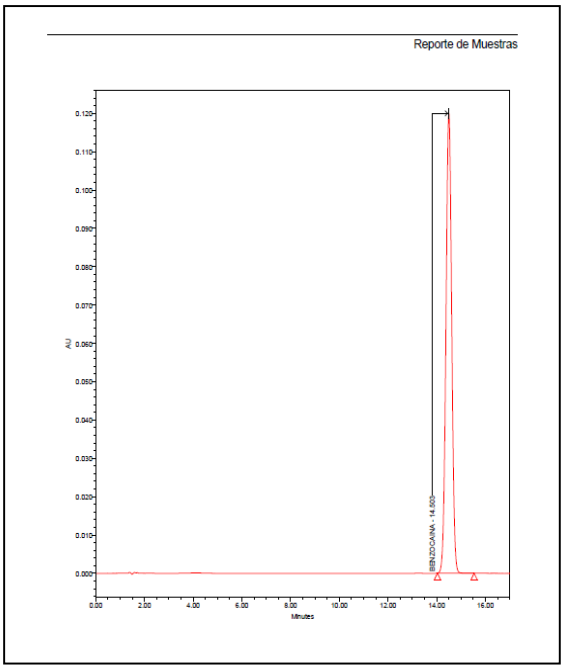


Tabla 3. Cromatograma tipo de recobros de analista 2 día 1

ANALISTA 2 DÍA 2

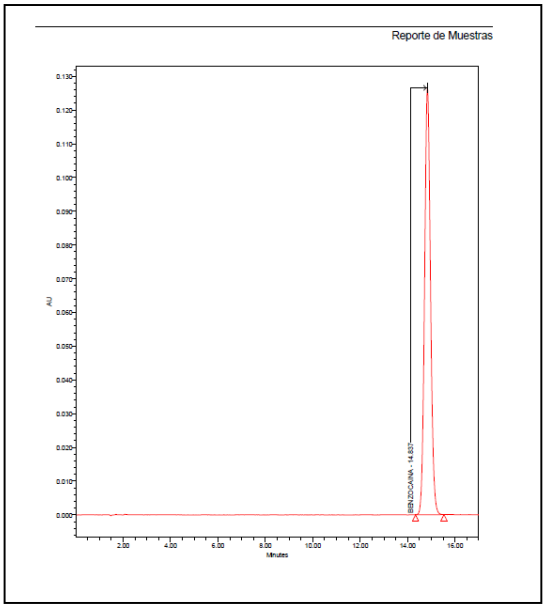


Tabla 4. Cromatograma tipo de recobros de analista 1 día 2

ANEXO F

SENSIBILIDAD

LOD

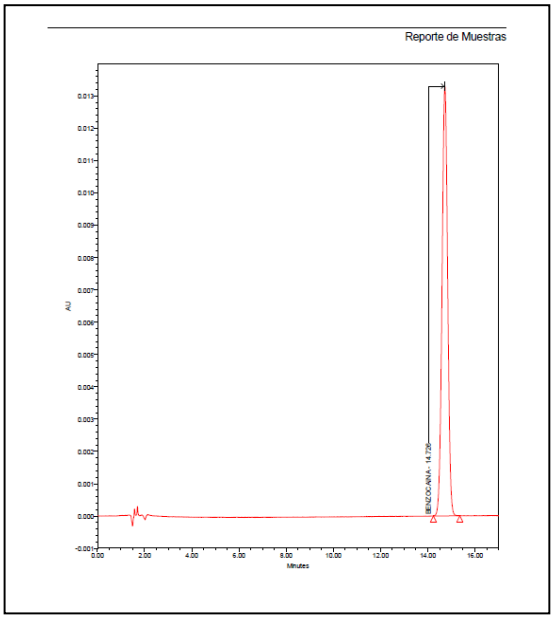


Tabla 1. Cromatograma tipo de LOD

LOQ

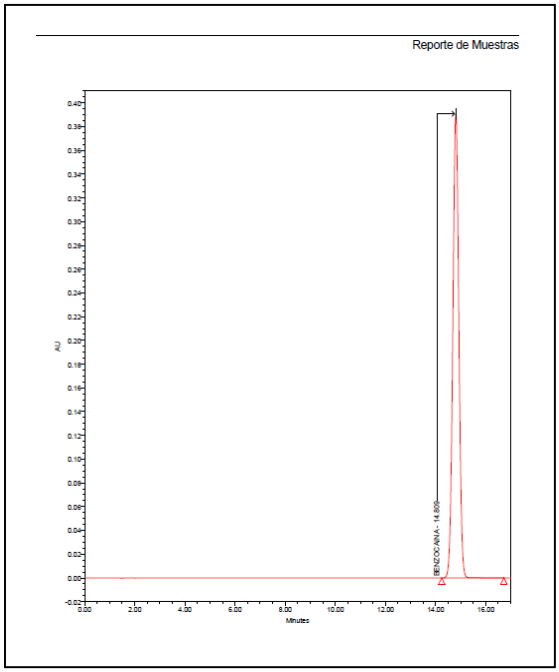


Tabla 2. Cromatograma tipo de LOQ

BIBLIOGRAFÍA

1. M. Gil-Alegre. Protocolos de validación de métodos de análisis, materias primas y productos terminados. Madrid: Universidad Complutense, 1995:26-32.
2. Reed. GH, Evaluation of electrochemical detection in reversed phase HPLC. J High Resolut Chromat Common 1988:11(9):675-7.
3. Gigante B, Barros AM, Teixeira A, Marcelo-Curto MJ. Separation and simultaneous high performamce liquid chromatographic determination of benzocaine and benzol benzoatina pharmaceutical preparation. J Chrom 1991;549(2):217-20.
4. Caraballo L, Fernández A, Holgado MA, Vela M, Rabasco AM. Rapid HPLC method for the quantification of tyothricin, menthol and benzocaine in pharmaceutical formulation. J Pharm Sci 1994;83(8):1174-9.
5. Food and Drug Administration, “Guide to inspections of validation of cleaning processes”, July 1993.
6. Food and Drug Administration. 30 de enero de 2011. Reviewer guidance, validation of chromatographic methods. http://www.fda.gov
7. Food and Drug Administration. 30 de enero de 2011. Guide for inspections validation of cleaning processes. http://www.fda.gov
8. Clining Validation Technologies. 15 de enero de 2011. Revisiting “Cleaning Verification”. http://www.cleaningvalidation.com
9. Clining Validation Technologies. 15 de enero de 2011. “Understanding the Cleaning Process in 2010 (and Beyond)”. http://www.cleaningvalidation.com
10. Clining Validation Technologies. 15 de enero de 2011. “Spiking Amounts for Sampling Recovery Studies”. http://www.cleaningvalidation.com
11. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.

12. SSA, Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, 9ª Edición 2008

13. United States Pharmacopeia, 33ed 2010

14. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. Métodos analíticos, guía de validación. México, 2002

15. Montgomery D. Diseño y análisis de experimentos. México, Editorial Iberoamérica, 2004.

16. Montgomery D. Control estadístico de la calidad, 3ªEd. México, Editorial Limusa Wiley, 2009.

17. Gutiérrez H. Análisis y diseño de experimentos, 2ª Ed. México, Editorial McGraw Hill, 2003

18. Caterall WA. Common modes of drug action on Na+ channels: local anesthetics, antiarrhythmics and anticonvulsants. *Trends Pharmacol Sci* 1987; 8: 57-65.

19. Rang H. Farmacología, 6a Ed. España, Editorial Elsevier, 2008

20. Isaa Katime. Cromatografía líquida: teoría y aplicaciones, México, Editorial Universidad de Gudalajara, 1998

21. Abbot D. y Andrews R.S. Introducción a la Cromatografía. 3a. Ed. Alhambra, Madrid, 1970.

22. Miguel Valcárce. Técnicas analíticas de separación, 4ªEd. Editorial Revete, 1994 Pág. 302-335

23. Quattrocchi O. Introducción a la HPLC, 2ªEd. Editorial Artes Gráficas, Argentina, 1992. Pág. 106-120

24. Bauer K., Thin L. Chromatography, 2ªEd. Editorial Huthing Verlag, Germany, 1991

25. Domínguez X., Cromatografía en papel y en capa delgada, Editorial Serie Química, Organización de los estados Americanos No. 16 E.U.A., 1975.

26. Zlatkis, A. and Kaiser, R.E. HPLC. High Performance Thin-Layer Chromatography. Vol. 9. Journal of Chromatography Library. Elsevier,1977.

27. Rubinson Kenneth A., Rubinson Judith, Análisis Instrumental, 3ªEd. Editorial Prentice Hall, España, 2009.

28. S.E. Katz, R. Eksteen, P. Schoenmakers, N.Miller; Chromatographic Science Series Vol. 78, 2nd Edition, Marcel Dekker, 1998

29. Horwitz W. The variability of AOAC methods of analysis as used in analytical pharmaceutical chemistry. 1977

30. Miguel Ylla, "Validación de procesos en la industria farmacéutica" Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, Pág. 5-23, 1990

31. Andreas O. "Cleaning Validation and residue limits" Pharm Techn, 60-75, 1993

32. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. "Validation of analytical procedures". 15 de enero de 2011. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf.