



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS  
DE ALTA RESOLUCIÓN EN FASE REVERSA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE UN  
FÁRMACO EN TABLETAS.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN FARMACIA**

**PRESENTA:**

**MARYLU GÓMEZ CERVANTES**

**ASESOR: DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2013.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.

ASUNTO: **VOTO APROBATORIO**

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**



**ATN: L.A. ARACELI HERNÁNDEZ BERNÁNDEZ**  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

**Validación del Método Analítico por Cromatografía de líquidos de Alta Resolución en Fase Reversa para la Cuantificación de un Fármaco en tabletas.**

Que presenta la pasante: **Marylu Gómez Cervantes**

Con número de cuenta: **409015973** para obtener el Título de: **Licenciada en Farmacia**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de agosto de 2013.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dra. Guadalupe Pérez Caballero	
<b>VOCAL</b>	Dra. Raquel López Arellano	
<b>SECRETARIO</b>	QBP. Martha Elena García Corrales	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Dr. José Juan Escobar Chávez	
<b>2do. SUPLENTE</b>	M. en C. Miriam Aidé Castillo Rodríguez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

## **AGRADECIMIENTOS**

Todas las personas que han formado parte de mi vida que me han llevado a ser la persona que soy, les agradezco su apoyo para culminar esta etapa de mi vida, en especial:

### **A Dios**

Por haberme la fuerza en momentos de desesperación, alegrías en esos días tristes y sobre todo darme vida para llevar a cabo todos mis sueños.

### **A mi Familia**

Agradezco a mis padres por un principio por que ustedes mejor que nadie conocen los sacrificios que fueron capaces de hacer por darme la mejor educación, por apoyarme en cada etapa de mi vida y sobre todo por hacer de mí la persona que soy. Los Amo.

A mis hermanos Jessica por mostrarme nuevas cosas y ser un gran ejemplo, Lourdes por ser una personita única que me hacerme sonreír y ser la mejor compañía y finalmente Hugo gracias por el apoyo y los mejores deseos. Los Adoro.

A mi Tío Miguel Aureliano por ser como un padre más para mí, fue un gran apoyo en gran parte de mi vida, siempre ha estado cuando más lo necesita en todo momento desde los momentos de enfermedad hasta los momentos de alegría, gracias por todo.

A toda la Familia Gómez son una buena influencia en mí, los quiero por las grandes personas que son y por el apoyo incondicional que me dan.

A toda la Familia Cervantes, en especial a mi Tía María Elena, mi Tío Bernardo y mi Abuelita Altagracia por cuidarnos y estar al pendiente de mí y mis hermanos. Los quiero.

### **A mis amigos**

A Rosita por ser mi gran amiga, tu sabes bien todo por lo que tuvimos que pasar para terminar esta carrera, gracias por el apoyo cuando teníamos los interminables reporte y sobre todo por convertirte en mi mejor amiga con la me puedo contar en todo momento.

A Ara por ser una gran persona, gracias por todo el apoyo que me brindaste todas esas veces que me impulsabas para decir lo que sentía y pensaba, por ser esa gran persona que eres y que todos quieren y sobre todo por volver mi mejor amiga.

A surtido rico, ha crecido mucho pero les doy las gracias a cada uno de ustedes por darme dado un pequeño espacio en el grupo y en sus vidas, con ustedes pase momentos muy especiales, con alegrías y tristezas, de todo son cada uno, una gran persona tiene grandes valores y sobre todo saben estar ahí cuando uno lo necesita. Los quiero mucho a Todos.

A mis amigos Erika, Carmen, Leslie, Ashley, Angélica, Helena y Migue por ser mis grades amigos con ustedes compartí gran parte de mí vida son una de las miles de razones por las que llegue hasta aquí gracias por su amistad por esos muchos momentos de alegría.

## **A LEDEFAR**

A Marianita y a Víctor Hugo (Chalan) gracias por su apoyo en este proyecto interminable no sólo han sido mis compañeros sino que también han sido mis amigos con quienes río y platico puro chisme. Los quiero y gracias por todo.

A todos los chicos LEDEFAR con quienes he compartido muchas comidas juntos, ese momento de relajación después de tanto estrés de trabajar o de tener un mal día, de puro chisme gracias por ser parte de mi vida.

A la Dra. Raquel no solo por ser mi asesora sino también por haber creído en mí y brindarme todo el apoyo durante la realización de mi tesis.

Al Profe Juan José por darme el apoyo durante la tesis y permitirme ser parte de este grupo de Trabajo.

## **A mis ángeles**

A mi abuelita Micaela que me cuida y protege desde el cielo, quien en su momento cuidó mí. Y a Doña Tere que fue como una abuelita adoptiva para mí y quien me dio su cariño. Las llevo en mi corazón.

## **A Christian**

Tú que llegaste sin darme cuenta y que te has convertido en el amor de mi vida, gracias por darme tu apoyo en esos momentos de desesperación y frustración, por cada momento de felicidad y alegría, por simplemente ser la persona que eres y sobre todo por ser parte de mi vida. Te amo.

*El presente trabajo fue apoyado por CONACYT-COMECYT por el Proyecto EDOMEX-2011-C02-178190 "Establecimiento de un centro para Estudios de Intercambiabilidad de medicamentos de uso veterinario"*

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	3
ÍNDICE DE TABLAS .....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. OBJETIVOS .....	10
3. MARCO TEÓRICO.....	11
3.1. Validación de Métodos Analíticos.....	11
3.1.1. Protocolo de validación.....	14
3.2. Cromatografía .....	17
3.2.1. Importancia de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en la Industria Farmacéutica .....	19
3.2.2. Tipos de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	20
3.2.3. Fase Estacionaria.....	24
3.2.4. Fase móvil .....	25
3.2.5. Parámetros Cromatográficos.....	26
3.2.6. Conformación del Cromatógrafo de líquidos.....	29
4. HIPÓTESIS .....	31
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	32
5.1. Reactivos, material y equipo. ....	32
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	38
Adecuabilidad del sistema .....	38
Rango.....	38
Linealidad del sistema.....	40
Linealidad del método.....	42
Exactitud .....	45
Error aleatorio. ....	45
Error Sistemático.....	46
Precisión .....	47
Repetibilidad.....	47



# Validación del Método Analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en Fase Reversa para la Cuantificación de un Fármaco en Tabletas



Precisión intermedia .....	48
Especificidad .....	50
Robustez.....	52
Mezcla de la fase móvil manual y automatizada.....	53
Diferente sistema cromatográfico.....	53
7. CONCLUSIÓN.....	54
8. REFERENCIAS .....	55
8. ANEXOS.....	57
8.1. Datos y cromatogramas .....	57
8.2. Recomendaciones en el uso de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. ....	65

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Comparación de los parámetros analíticos necesarios para Validación de un Método de Contenido Químico.....	14
<b>Tabla 2</b> Condiciones Cromatográficas.....	33
<b>Tabla 3</b> Resultados de la Verificación del sistema para la cuantificación del Fármaco A, sustancia de referencia .....	38
<b>Tabla 4</b> Concentración del Fármaco y las áreas correspondientes que comprenden la curva de calibración para la prueba de Rango.....	39
<b>Tabla 5</b> Análisis de variancia con un factor realizado para determinar la relación lineal entre la concentración real del Fármaco y su respuesta analítica con un nivel de significancia del 5% ....	40
<b>Tabla 6</b> Concentraciones del Fármaco con el resultado analítico de linealidad del sistema .....	40
<b>Tabla 7</b> Determinación de intervalo de confianza de la ordenada al origen y la pendiente .....	41
<b>Tabla 8</b> Análisis de variancia con un factor realizado para determinar la relación lineal entre la concentración real de El Fármaco y su respuesta analítica con un nivel de significancia del 95%. .....	42
<b>Tabla 9</b> Concentración del Fármaco adicionada y la concentración experimental del .....	42
<b>Tabla 10</b> Análisis de variancia con un factor realizado para determinar la relación lineal entre la concentración adicionada promedio del Fármaco y la concentración experimental promedio del Fármaco con un nivel de significancia del 95% de Linealidad del método.....	44
<b>Tabla 11</b> Determinación de intervalo de confianza de la ordenada al origen y la pendiente .....	44
<b>Tabla 12</b> Criterios de aceptación para la prueba de Error Aleatorio .....	45
<b>Tabla 13</b> datos obtenidos durante la curva de calibración para determinar el error sistemático	46
<b>Tabla 14</b> Análisis de variancia con un factor realizado para determinar la relación lineal entre la concentración adicionada promedio del Fármaco y la concentración experimental promedio del Fármaco con un nivel de significancia del 95%.....	47
<b>Tabla 15</b> Evaluación de porcentaje del Fármaco en tabletas .....	48
<b>Tabla 16</b> Porcentajes de recuperación del Fármaco obtenidos en dos días y por dos analistas diferentes.....	48
<b>Tabla 17</b> Evaluación de porcentaje de recobro de El Fármaco en tabletas de 850mg empleando la mezcla automatizada y manual de la fase móvil.....	53
<b>Tabla 18</b> Evaluación de porcentaje de recobro de El Fármaco en tabletas de 850mg empleando la mezcla automatizada y manual de la fase móvil.....	53



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Esquema la Validación Modular dentro de un Procedimiento analítico .....	13
<b>Figura 2</b> Modalidades de la Cromatografía.....	18
<b>Figura 3</b> Tipos de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución .....	20
<b>Figura 4</b> Representación de tiempo de retención cuando llega a su máximo.....	27
<b>Figura 5</b> Representación de la presencia de coleo en el cromatograma.....	28
<b>Figura 6</b> Componentes de un cromatograma, determinación de la resolución entre dos picos. .	29
<b>Figura 7</b> Esquema de un cromatógrafo de líquidos .....	30
<b>Figura 8</b> Metodología para la cuantificación del Fármaco en Tabletas .....	35
<b>Figura 9</b> Cromatogramas de las muestras que contenían el Fármaco A en diferentes soluciones .....	51
<b>Figura 10</b> Cromatogramas de las soluciones que contiene los diferentes compuestos de la matriz. ....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Definición
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{v}*\text{sec}$	Microvolt por segundo
ACN	Acetonitrilo
$A_s$	Coleo o Asimetría
C.V.	Coefficiente de variación
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
cm	Centímetro
$D_i$	Diferencia absoluta
d	Distancia
FDA	Food and Drugs Administrator
FEUM	Farmacopea de Los Estados Unidos Mexicanos
g	gramos
$H_0$	Hipótesis nula
$H_2O$	Agua
$H_2O_2$	Peróxido de Hidrogeno
$H_a$	Hipótesis alterna
HCl	Ácido Clorhídrico
ICH	International Conference on Harmonisation (Conferencia Internacional en Harmonización)
$K'$	Factor capacidad
LDC	Límite de cuantificación



# Validación del Método Analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en Fase Reversa para la Cuantificación de un Fármaco en Tabletas



UNAM  
CUAUTITLÁN

<b>LDD</b>	Límite de detección
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>mg</b>	Miligramo
<b>min</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mL/min</b>	Mililitro por minuto
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mtras</b>	Muestras
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>NOM</b>	Norma Oficial Mexicana
<b>NPT</b>	Número de Platos Teóricos
<b>PDA</b>	Photodiodes Array (Arreglo de Foto Diodos)
<b>pH</b>	Potencial de Hidrogeno
<b>r</b>	Coefficientes de correlación
<b>r<sup>2</sup></b>	Coefficiente de determinación
<b>R<sub>s</sub></b>	Resolución
<b>t<sub>R</sub></b>	Tiempo de retención
<b>USP</b>	United States Pharmacopeia (Farmacopea de los Estados Unidos)
<b>V<sub>R</sub></b>	Volumen de retención
<b>W<sub>0.05</sub></b>	Ancho de pico al 5% de la altura
<b>W<sub>H</sub></b>	Ancho de pico a altura media
<b>α</b>	Nivel de confianza
<b>μm</b>	Micrómetro

# 1. INTRODUCCIÓN

La calidad de los productos farmacéuticos es un factor de suma importancia para asegurar el bienestar y la calidad de vida de los usuarios. A fin de garantizar la eficacia y seguridad de un medicamento se llevan a cabo evaluaciones con las cuales se verifica el cumplimiento de las especificaciones establecidas para el producto final.

Para garantizar la calidad de un medicamento se le realizan diversos análisis: fisicoquímicos (identidad, contenido, disolución, uniformidad de dosificación, etc.), microbiológicos (potencia antibiótica, límite antimicrobiano, esterilidad, etc.), biológicos (toxicidad, pirógenos, inocuidad, ensayos de sensibilidad, etc.) entre otros.

Cada análisis implica un proceso analítico el cual comprende de 3 etapas: la primera comprende las operaciones previas, como lo son el muestreo, acondicionamiento, disolución, separaciones, reacciones analíticas entre otras; como segunda etapa se encuentra la medición y traducción de la señal analítica mediante el uso de instrumentos y; finalmente la toma y tratamiento de datos.

Para establecer la calidad de un método analítico y autorizar su uso en el laboratorio es necesario realizar un estudio de validación, el cual confirma que el método es apto para el propósito determinado mediante la entrega de la documentación que demuestra el desempeño del método analítico.

Uno de los principales métodos utilizados en la industria farmacéutica es la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, en especial la modalidad de fase reversa debido a que presenta una excelente retención de los compuestos polares y además permite trabajar con eluyentes acuosos sin ninguna limitación.

En el presente trabajo se desarrolla la validación de un Método Analítico para cuantificar un fármaco en tabletas por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa tomando como referencia las pruebas que se establecen en la guía de validación de métodos analíticos ICH Q2 y la guía Eurachem para establecer pruebas específicas para este tipo de método analítico.

Cabe mencionar que en el presente trabajo no se menciona el principio activo por cuestiones de confidencialidad ya que lo que se pretende es presentar la estrategia que se puede seguir para validar un método analítico que tiene como objetivo la cuantificación de un fármaco en **T**abletas.



## **Validación del Método Analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en Fase Reversa para la Cuantificación de un Fármaco en Tabletas**



Este trabajo está constituido por los objetivos en donde se tiene el qué y para qué del método analítico posteriormente se presenta un marco teórico donde los puntos que se desarrollan son conceptos de validación y criterios de validación definidos por la FEUM, USP, ICH y FDA.

Posteriormente en otro apartado se presenta los conceptos de cromatografía de líquidos, los tipos de cromatografía de líquidos, su importancia, parámetros cromatográficos y los criterios a considerar para seleccionar fase estacionaria y fase móvil.

Además se describe todo el desarrollo experimental del trabajo donde se tienen materiales, condiciones de trabajo, procedimiento para validar un método analítico, resultados y conclusiones.

Y finalmente en el trabajo se integraron dos anexos, uno sobre los datos cromatográficos obtenidos experimentalmente y el otro comprende las recomendaciones para el uso del Cromatógrafo de Líquidos de Alta resolución

## 2.OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Proponer una estrategia para validar un método analítico para determinar el contenido de fármaco en tabletas por Cromatografía de líquidos de Alta Resolución en fase reversa considerando como referencia, las características de desempeño especificadas por la Conferencia Internacional sobre la Armonización (ICH) para validar un método analítico para evaluar el contenido de fármaco en tabletas.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Hacer una investigación documental para proponer una estrategia de validación de un método analítico para contenido químico en tabletas que cumpla con la regulación vigente para el control de medicamentos de acuerdo a la Guía de Validación ICH Q2B y la guía Eurachem.
- Definir como analizar los resultados obtenidos en una validación de métodos analíticos para demostrar su confiabilidad.
- Proporcionar una serie de recomendaciones en relación del buen uso y mantenimiento de un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Automatizado.

## 3. MARCO TEÓRICO

### 3.1. Validación de Métodos Analíticos

En la actualidad existe un creciente control en la industria Farmacéutica, debido al paulatino interés por garantizar que los productos destinados a la salud **son** de calidad, seguros y eficaces. Esta es la razón por la cual la industria se torna exigente con diversos aspectos que involucran la fabricación de un medicamento, de acuerdo a los lineamientos establecidos por diferentes agencias reguladoras.

En la industria farmacéutica se han implementado las Buenas Prácticas de Manufactura, que regula la producción de medicamentos y las Buenas Prácticas de Laboratorio, que implica el control de calidad de la producción industrial, las cuales permiten asegurar que los productos son fabricados en forma uniforme y controlada, de acuerdo con las normas de calidad adecuadas al uso que se pretende dar a los productos, y conforme a las condiciones exigidas para su comercialización (1).

En el desarrollo de un método analítico se considera las siguientes actividades:

1. Definir que analito se quiere determinar, en que matriz se encuentra y para qué se quiere determinar, para establecer que información se tiene que considerar en una investigación documental para el estudio en cuestión.
2. Establecer una serie de preguntas relacionados a la caracterización del analito y de la matriz a fin de especificar los datos necesarios para plantear una técnica experimental que permita lograr el objetivo planteado inicialmente.
3. Realizar una investigación documental en bases de datos, libros, proveedores de sustancias químicas, entre otros para definir una hipótesis de trabajo y la estrategia experimental que permite determinar el analito de interés.
4. Elaborar el protocolo para hacer el desarrollo del método analítico.
5. Poner en práctica todo lo especificado en el protocolo para generar resultados que permitan definir las condiciones de operación óptimas para lograr el objetivo previamente especificado.

Una vez definidas las condiciones óptimas para determinar un analito en una matriz con un fin específico se debe proceder a la validación del método analítico (2).

La Validación es una parte esencial de las buenas prácticas de manufactura. Como se marca en la sección de “Control de la Fabricación” en el numeral 9.11 establecido en la Norma Oficial Mexicana **NOM-059-SSA1-2013** Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de

medicamentos, donde se establece que se deben validar tanto los procesos de producción así como los métodos analíticos (3). Esto se logra mediante, el establecimiento de la evidencia documentada que da un alto grado de seguridad, y garantiza que un producto o proceso cumple con las características y especificaciones de calidad predeterminadas.

Este proceso se define como la confirmación que se da por la recopilación y el análisis de la evidencia objetiva, de que se cumplen con los requisitos particulares de un producto o proceso para el uso específico propuesto (4).

La validación de un método analítico es un proceso necesario para determinar la aptitud de una metodología para proporcionar datos analíticos útiles. A continuación se presentan las definiciones de validación de un método analítico reportadas por los principales organismos nacionales e internacionales que regulan la industria farmacéutica:

- **USP:** La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas (5).
- **FDA:** La validación de métodos, es el proceso por el cual se demuestra que los procedimientos analíticos son aptos para el uso indicado (6).
- **FEUM:** La validación de un método es el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio; que las características de desempeño del método, satisfacen los requisitos para su aplicación analítica (7).
- **Eurachem:** La validación de un método se define como el proceso de definir una necesidad analítica y confirmar que el método en cuestión tiene capacidades de desempeño consistentes con las que requiere la aplicación (8).

La validación del método es necesaria para demostrar la aptitud del método de análisis para su aplicación específica, es decir, se establece un protocolo del método analítico adaptable a un sistema analítico, para evidenciar que el método es apto para un propósito previsto.

El sistema analítico comprende el propósito y el tipo de método, el intervalo de concentración de analito que se está midiendo, los tipos de material o las matrices para las que se aplica el método, y un protocolo de método. La base de un buen análisis se fundamenta en una especificación clara de las necesidades de análisis. Esto último refleja los diferentes criterios de rendimiento que el método debe cumplir con el fin de resolver un problema particular.

Un variable a considerar en la confiabilidad de los resultados cualitativos y / o cuantitativos es el nivel de incertidumbre que conlleva la medición de la señal analítica, por lo que, la "validación" se reduce a la determinación de la "incertidumbre de medida". La incertidumbre de medición cubre todo el procedimiento analítico, a partir de la toma de muestra (9). La evaluación de la incertidumbre de la medición se lleva a cabo con el denominado "enfoque de validación modular". La Validación modular se divide en varias etapas sucesivas necesarias, que comprenden el procedimiento analítico para analizar la muestra, como se muestra en la Figura 1. Estos pueden ser la preparación de muestras, la extracción de analito y la determinación del analito. Cada paso en el procedimiento puede ser visto como un sistema analítico y por lo tanto puede ser validada por separado y combinarse posteriormente con otros módulos de una manera flexible. Validación modular es una validación por etapas de un procedimiento conjunto, teniendo en cuenta todas las posibles dificultades o factores de incertidumbre implicados en el procedimiento analítico (10).

En la práctica, la validación del método se realiza mediante la evaluación de una serie de características de funcionamiento de los métodos, tales como la precisión, la veracidad, la selectividad / especificidad, linealidad, rango de funcionamiento, recobro, límite de detección (LDD), límite de cuantificación (LDC), sensibilidad, robustez/tolerancia y aplicabilidad.

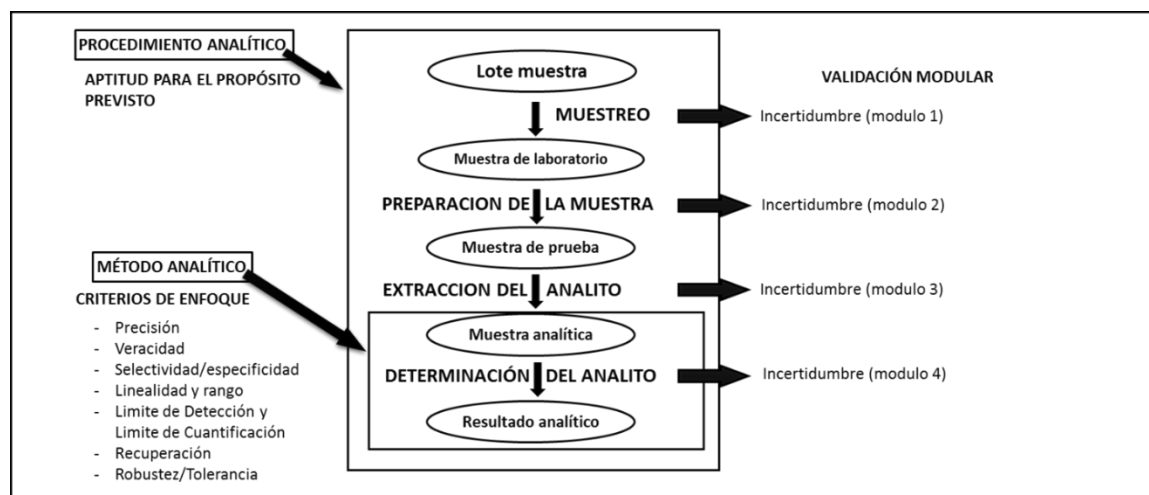


Figura 1 Esquema la Validación Modular dentro de un Procedimiento analítico (10).

En el proceso de validación del método está implícito que los estudios para determinar los parámetros de desempeño se realizan usando equipos dentro de especificaciones, que están trabajando correctamente y que están calibrados adecuadamente. Asimismo, el analista que realiza los estudios debe ser técnicamente competente en el campo de trabajo bajo estudio y debe poseer suficiente conocimiento sobre el trabajo a realizar con el fin de que sea capaz de tomar decisiones apropiadas a partir de las observaciones hechas mientras avanza el estudio.



### 3.1.1. Protocolo de validación

Los métodos que han de ser utilizados como rutina en la industria farmacéutica para lanzar sus productos deben estar validados para su uso previsto.

Se considera que los métodos analíticos deben ser validados, verificados o revalidados en los siguientes casos:

- Antes de utilizarlos por primera vez en las pruebas de rutina
- Cuando se transfiere a otro laboratorio
- Siempre que hay algún cambio en condiciones de operación y/o en la matriz en la que se encuentra el analito de interés.

El Protocolo de Validación debe definir claramente las funciones y responsabilidades de cada departamento implicado en la validación de métodos analíticos. El alcance del método y sus criterios de validación deben ser definidos al principio del proceso.

El plan de validación se determina con base a especificaciones regulatorias y al propósito para el cual va a ser utilizado el método.

En la Tabla 1 se enuncia los lineamientos generales para cada característica de desempeño de acuerdo a las principales regulaciones vigentes para la prueba de Contenido Químico (11).

Tabla 1 Comparación de los parámetros analíticos necesarios para Validación de un Método de Contenido Químico

Características de desempeño	de	FEUM	USP	FDA	ICH
Rango		NO	NO	SI	SI
Verificación del sistema		SI	SI	SI	SI
Estabilidad de la muestra en solución		NO	NO	SI	NO
Linealidad del sistema		SI	SI	SI	SI
Especificidad		SI	SI	SI	SI
Exactitud del método		SI	SI	SI	SI
Linealidad del método		SI	SI	SI	SI
Precisión del método					
Repetibilidad		SI	NO	SI	SI
Precisión intermedia		SI	NO	SI	SI
Reproducibilidad		NO	NO	SI	NO
Límite de detección		NO	NO	NO	NO
Límite de cuantificación		NO	NO	NO	NO
Tolerancia		SI	SI	NO	NO
Robustez		SI	SI	SI	SI

Cuando el método ha sido validado previamente de acuerdo con un protocolo que está conforme a criterios establecidos por organismos internacionales como la ICH, el laboratorio no necesita llevar a cabo un extenso estudio de validación, solo se debe

verificar que el método analítico puede lograr resultados con las mismas características reportadas en su validación. (8).

### 3.1.1.1. Características de la validación de un método analítico

El protocolo desarrollado presenta un análisis de las características para su consideración durante la validación de los procedimientos analíticos incluidos dentro de la guía ICH y complementando con los parámetros de exactitud de la guía Eurachem. Las características finales que se consideraron están enunciados en la Tabla 2.

**Tabla 2** Definiciones, determinación y criterios de aceptación de los parámetros establecidos en el protocolo de validación.

Parámetro	Definición	Determinación	Criterio de aceptación
<b>Verificación del sistema (adecuabilidad)</b>	La prueba de Adecuabilidad tiene como finalidad verificar que el sistema que se utiliza para la validación funciona correctamente, con respecto a criterios previamente determinados. Este parámetro permite establecer la confiabilidad del sistema antes de procesar las muestras durante el uso rutinario del método	Inyección del estándar por quintuplicado de la solución al 100%	Coleo < 2.00 C.V. (áreas) ≤ 2.00%
<b>Rango</b>	Intervalo entre la concentración superior e inferior (cantidades) de analito en la muestra (incluyendo estas concentraciones) para los que se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad.	Se realiza a través del análisis de muestras por duplicado con al menos 5 niveles de concentración de estándar.	$r \geq 0.998$ . $r^2 \geq 0.995$ .
<b>Linealidad del sistema</b>	Determina la relación lineal entre la concentración y la respuesta, ayuda a verificar que la respuesta analítica del método se ajusta al modelo matemático, en un intervalo de concentraciones pertinentes a la aplicación analítica del método.	Preparar un mínimo de 5 concentraciones o niveles de concentración, cada nivel de concentración debe prepararse por triplicado.	Homocedasticidad Intercepto pasa por cero (prueba de t con un $\alpha$ 0.05, ) $r \geq 0.998$ $r^2 \geq 0.995$ .
<b>Linealidad del sistema</b>	Es la capacidad del método analítico para dar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo dado, el cual se establece en base a los límites de especificación de la aplicación del método.	Preparar un mínimo de 5 concentraciones o niveles de concentración de placebo adicionados, cada nivel de concentración debe prepararse por triplicado.	Homocedasticidad Intercepto pasa por cero (prueba de t con un $\alpha$ 0.05, ) $r \geq 0.998$ $r^2 \geq 0.995$

<b>Exactitud</b>	Se define como la concordancia de absoluta entre el resultado obtenido del método y la cantidad verdadera del analito presente en la muestra, a una cantidad fija. Teniendo en cuenta la nota que indica que el término exactitud, cuando se aplica a un conjunto de resultados de ensayo, implica una combinación de componentes aleatorios y un error sistemático común o componente de sesgo.	Error aleatorio: Se preparan nueve placebo adicionados a la concentración del 100%. Error sistemático: Se evalúan 3 niveles de concentraciones (baja, media y alta) con tres muestras por cada nivel	Porcentaje de recuperación IC(μ): 98.00% - 102.00%. Error relativo: ± 2.00%. r ≥ 1.00 Pendiente (IC b1) incluir 1.00 (α 0.05.)
<b>Repetibilidad</b>	Es el grado de concordancia relativa entre los resultados obtenidos al aplicar el método analítico, bajo mismas condiciones analíticas (repetibilidad) o bajo diferentes condiciones analíticas (reproducibilidad o precisión intermedia), utilizando una muestra homogénea. Este parámetro se expresa de forma general como la desviación estándar o como el coeficiente de variación.	Realizar un mínimo de 6 determinaciones a la concentración al 100%	C.V. ≤ 2.00%
<b>Precisión intermedia</b>	Es el grado de concordancia relativa entre los resultados obtenidos al aplicar el método analítico, bajo mismas condiciones analíticas (repetibilidad) o bajo diferentes condiciones analíticas (reproducibilidad o precisión intermedia), utilizando una muestra homogénea. Este parámetro se expresa de forma general como la desviación estándar o como el coeficiente de variación.	Cada analista debe preparar seis soluciones muestra en dos días diferentes en diferentes equipos	C.V. ≤ 2.00% de las 24 determinacion
<b>Especificidad</b>	Establece la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra que puedan estar presentes.	Identificación, se evaluaron soluciones blanco en los que se encuentre ausente el analito de interés y muestras en las que sí se encuentre el analito de forma deliberada.	Identificar la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes.
<b>Robustez.</b>	Se determina la capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse pequeñas variaciones deliberadas, en las características normales de operación.	Mezcla de la fase móvil manual y automatizada: Se evaluó el porcentaje de recuperación del fármaco A analizada con fase móvil mezclada forma manual y automatizada Diferente sistema cromatográfico: evaluaron el porcentaje de recuperación del fármaco A analizado con diferentes sistemas cromatográficos.	Factor I : 98.00 – 102.00 % Diferencia absoluta  di  ≤ 2.00%.

## Reporte de validación

Una vez obtenidos los resultados analíticos de la validación, éstos son empleados para demostrar la calidad de un proceso o producto mediante un informe.

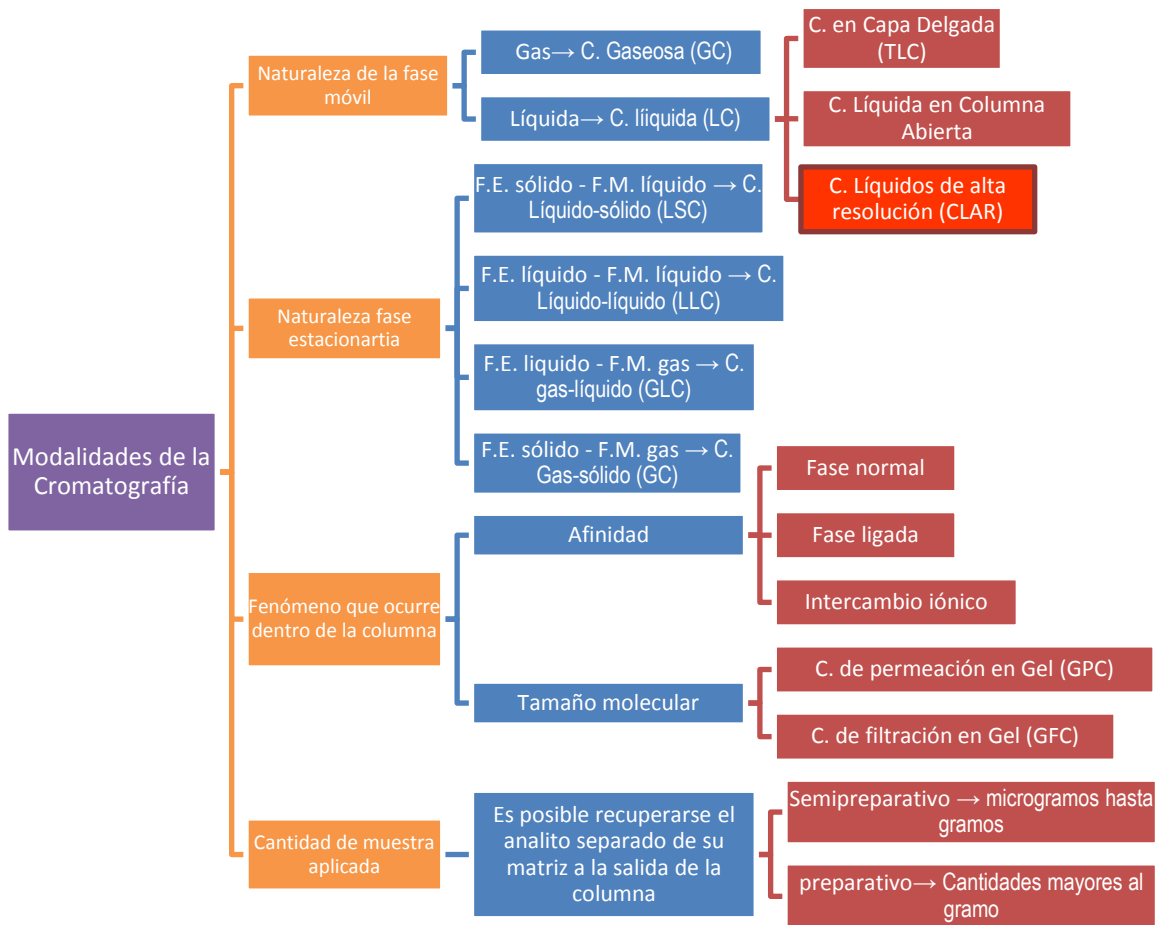
Es importante documentar los procedimientos para que el método pueda ser implementado claramente y sin ambigüedades.

En la industria farmacéutica se considera, el aseguramiento de calidad que se refiere a todas las medidas tomadas por el laboratorio para asegurar y regular la calidad, y por otro lado, el control de calidad que describe las medidas individuales que se relacionan con el seguimiento y control de operaciones analíticas particulares (12).

Cuando se hace uso de un Método Validado, este debió haber sido sometido a pruebas extensivas bajo todas las condiciones de operación extremas, entonces un nuevo analista competente probablemente operará satisfactoriamente dentro del nivel de desempeño existente, aunque realmente es más importante verificar el desempeño del analista contra lo que la especificación analítica requiere más que contra la validación existente. Sin embargo, esto deberá de todos modos verificarse siempre. Es decir, es más importante el nivel de desempeño que el analista puede alcanzar con el método que lo que otros analistas hayan alcanzado en el pasado.

### 3.2. Cromatografía

La cromatografía es un método físico-químico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. En la Figura 2 se resume los diferentes tipos de cromatografía clasificada por diferentes características.



**Figura 2 Modalidades de la Cromatografía**

En la cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de la columna que contiene a la fase fija. Esta técnica se basa en la velocidad de desplazamiento diferencial de los mismos que se establece al ser arrastrados por una fase móvil a través de un lecho cromatográfico que contiene la fase estacionaria.

La separación cromatográfica líquido-sólido se basa en un transporte forzado del líquido llevando el analito en la mezcla a través de un medio poroso y las diferentes interacciones del analito con la superficie de este medio poroso resultan en diferentes tiempos de migración para los componentes de una mezcla.

La cromatografía líquida consta de dos fases una que proporciona transporte al analito se refiere a la fase móvil y otra fase inmóvil, que en el concepto anterior se presenta como un medio poroso, denominada fase estacionaria.

En este tipo de cromatografía, El número de interacciones entre la fase móvil, la fase estacionaria y el analito o analitos es esencial para obtener la separación de los componentes de una mezcla, y el indicador de este tipo de interacciones es el Número de Platos Teóricos.

Las moléculas del analito se someten a transición de fase múltiple entre la fase móvil y la superficie adsorbente. El tiempo medio de residencia de la molécula en la superficie de la fase estacionaria depende de la energía de interacción. Para diferentes moléculas con diferencia muy pequeña de energía de interacción, la presencia de superficie significativa, es crítico ya que a mayor número de transiciones se someten a moléculas de analito con la fase, mientras se mueve a través de la columna cromatográfica, mayor es la diferencia en su retención.

### **3.2.1. Importancia de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en la Industria Farmacéutica**

La importancia de la CLAR en el campo de farmacéutico recae en reglas rigurosas establecidas por instituciones regulatorias. La cromatografía líquida de alta resolución tiene un significado especial en la industria debido a que permite obtener análisis cualitativos y cuantitativos.

Un beneficio para la empresa farmacéutica en el uso de la cromatografía líquida de alta resolución es la seguridad en la calidad que brinda este análisis. Otro es que los métodos CLAR son relativamente estándar en la industria. Esto significa que las nuevas contrataciones de personal con experiencia en el campo farmacéutico requieren de un entrenamiento mínimo antes de que comiencen a desarrollar un análisis en los laboratorios.

La CLAR se usa para analizar materias primas y productos terminados para asegurarse que la calidad de los niveles previamente establecidos se cumpla.

Cuando una empresa farmacéutica usa la CLAR, el método de validación se debe desarrollar para asegurar una adecuada detección del material

Con el uso de CLAR, una empresa tiene el potencial de descubrir fallas en los productos que no cumplen con una especificación. Esto permite al fabricante evitar problemas más graves. Debido a que el lote completo de un producto no se puede analizar en una cantidad razonable de tiempo, la toma de muestras representativas de un lote se hace a través de métodos de muestreo dependiendo de la normatividad adoptada por un laboratorio.

### 3.2.2. Tipos de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

Los cuatro principales tipos de técnicas de CLAR son Fase Normal, Fase Reversa, Intercambio Iónico y Exclusión Molecular. La principal característica que define la identidad de cada técnica es el tipo dominante de interacciones moleculares empleadas.

Como se muestra en la Figura 3, en la CLAR hay tres tipos básicos que dependen de las propiedades físico químicas del analito, fase móvil y fase estacionaria y por otra parte encontramos un tipo que depende de las propiedades físicas del analito, fase móvil y la fase estacionaria:

Fuerzas Polares	• Fase Normal
Fuerzas dispersivas	• Fase Reversa
Fuerzas iónicas	• Intercambio Iónico
Tamaño molecular	• Exclusión molecular

Figura 3 Tipos de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

#### 3.2.2.1. Fase Normal

La separación de fases normal es un proceso competitivo. Moléculas de analito compiten con las moléculas de la fase móvil para el sitio de adsorción en la superficie de la fase estacionaria.

La fase móvil en este tipo de cromatografía se basa en disolventes no polares (tales como hexano, heptano, etc.) con la pequeña adición de modificador polar (ej. metanol, etanol). La variación de la concentración de modificador polar en la fase móvil permite el control de la retención de analito.

Aditivos polares típicos son alcoholes (metanol, etanol o isopropanol) que se añaden a la fase móvil en cantidades relativamente pequeñas. Dado que las fuerzas polares son el tipo dominante de las interacciones empleados y estas fuerzas son relativamente fuertes, incluso sólo 1% de variación del modificador polar en la fase móvil por lo general resulta en un cambio significativo en la retención de analito.

Los materiales utilizados tradicionalmente en la fase estacionaria para fase normal son generalmente óxidos porosos tales como sílice ( $\text{SiO}_2$ ) o alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). La superficie de estas fases estacionarias se cubre con la densa población de grupos OH, lo que hace que estas superficies sean altamente polares. La retención de analito en estas superficies es muy sensible a las variaciones de la composición de fase móvil. Fases estacionarias químicamente modificadas también se pueden utilizar en la CLAR en fase normal. Sílice modificada con silanos trimetoxi glicidoxipropil (nombre común: diol-fase)

es el material de embalaje típica con disminución de la polaridad de la superficie. El uso de fase estacionaria de tipo diol y la baja polaridad de eluyentes modificadores [ésteres (acetato de etilo) en lugar de alcoholes] permiten el aumento de robustez separación y la reproducibilidad, en comparación con sílice pura.

Selección de la utilización de fase normal como el método cromatográfico de elección suele estar relacionada con la solubilidad de la muestra en la fase móvil específica.

Dado que fase normal utiliza principalmente disolventes no polares, este método es el adecuado para los compuestos altamente hidrofóbicos, que son insolubles en disolventes polares o acuosos.

### 3.2.2.2. *Fase reversa*

A diferencia de fase normal, la cromatografía de fase inversa emplea principalmente fuerzas de dispersión (hidrófobas o interacciones de van der Waals). Las polaridades de las fases móviles y estacionarias están invertidos, de tal manera que la superficie de la fase estacionaria es hidrófoba y la fase móvil es polar, donde se emplean principalmente soluciones a base de agua.

Este tipo de cromatografía es el modo más popular de la cromatografía. Casi el 90% de todos los análisis de las muestras de bajo peso molecular se llevó a cabo utilizando cromatografía de fase inversa.

Este tipo de cromatografía tiene la capacidad de discriminar compuestos muy estrechamente relacionados y la facilidad de la variación de la retención y la selectividad. Esto debido a las fuerzas dispersivas empleadas en este modo de separación son más débiles fuerzas intermoleculares, con lo que el fondo general de energía de interacción en el sistema cromatográfico muy bajo en comparación con otras técnicas de separación.

Esta baja energía de fondo permite distinguir diferencias muy pequeñas en las interacciones moleculares de analitos estrechamente relacionados. En Fase reversa, la sensibilidad a las diferencias energéticas menores en las interacciones analito de la superficie es muy alta atribuirse a la baja energía de interacción fondo.

Adsorbentes empleados en este modo de cromatografía son materiales rígidos porosos con superficies hidrófobas. En todos los modos de CLAR con la superficie positivo analito interacciones cuanto mayor sea el área de superficie adsorbente, la más larga sea la retención de analito en la mayoría de los casos la mejor separación. La mayoría de los materiales de embalaje utilizados en fase inversa se modifican químicamente sílice porosa. Las propiedades de la sílice se han estudiado durante muchos años, y la tecnología de fabricación de partículas esféricas porosas de tamaño controlado y la porosidad es bien desarrolladas.



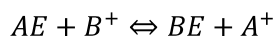
Superficie hidrófoba de estas fases estacionarias se fabrican, típicamente mediante enlace covalente de silanos orgánicos en la superficie de la sílice. Esta modificación implica la reacción de alquildimetilclorosilanos monofuncionales con los grupos silanol superficiales. Octadecilsilano (C18) fue la primero disponible comercialmente fase ligada a base de sílice y sigue siendo el más utilizado. Además, los ligandos de tipo alquilo de distinto número de átomos de carbono (C1, C4, C8, C12) se utilizan a menudo tal como fases estacionarias de tipo fenilo, así también fases estacionarias denominadas *end-capped*, debido a que los ligandos tiene un revestimiento final que mejora las características de la fase estacionaria, ya que son capaces de modificar la selectividad cromatográfica, y algunas de estas fases ofrecen una mejora de la retención de los analitos polares. Estas fases se pueden utilizar con altas proporciones acuosas en las fases móviles, incluso 100% acuosas, sin pérdida de la retención de analito que a veces podría ser observado para las fases más hidrófobas.

La modificación química de la superficie de la sílice también se estudió intensamente en los últimos 30 años, principalmente como resultado directo de la creciente popularidad de fase inversa. A pesar de la investigación intensiva y el enorme crecimiento de material de embalaje disponibles comercialmente y la columna, todavía no hay consenso en que las propiedades de la fase estacionaria óptima RP deben tener para el análisis selectivo de los diversos conjuntos de compuestos tales como compuestos farmacéuticos que tienen una gran cantidad de diversos ionizable funcionalidades, que varían hidrofobicidades, y los diferentes componentes estructurales (cadenas lineales de alquilo, anillos aromáticos, heterociclos, etc)

### 3.2.2.3. Intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico como lo indica su nombre, se basa en las diferentes afinidades de los analitos por los centros iónicos de carga opuesta en la resina o contra iones adsorbidos en la fase estacionaria hidrofóbica.

Al considerar el intercambio de dos iones  $A^+$  y  $B^+$  entre la solución y la resina de intercambio E:



El equilibrio, constante para este proceso se muestra en la ecuación 1:

$$K = \frac{A^+ BE}{AE B^+}$$

que determina esencialmente la afinidad relativa de los dos cationes de los centros de intercambio en la superficie. Si la constante es igual a 1 no se espera ninguna capacidad discriminatoria para este sistema. Cuanto mayor sea la constante de

equilibrio (siempre que sea mayor que 1), mayor será la capacidad de catión B para sustituir A en la superficie de la resina.

Dependiendo de la carga de los centros de intercambio en la superficie, la resina podría ser intercambiador de aniones (centros iónicos positivos sobre la superficie) o intercambiador de cationes (centros negativos sobre la superficie).

El entrecruzado de estireno-divinilbenceno es el material base típico para la resina de intercambio iónico. Tipo de grupos están unidos a los anillos de fenilo en la estructura y el grado de entrecruzamiento es de entre 5% y 20%. Cuanto mayor sea el entrecruzamiento, más duro es el material y el menos susceptible al hinchamiento, pero el material por lo general muestra la capacidad de intercambio iónico inferior.

Hay cuatro tipos principales de centros de intercambio iónico se emplean generalmente:

1.  $\text{SO}_3^-$  - Fuerte intercambiador de cationes
2.  $\text{CO}_2^-$  - débil intercambiador de cationes
3. Amina cuaternaria - fuerte intercambiador de aniones
4. Amina terciaria-débil intercambiador aniónico

La retención del analito y la selectividad en la cromatografía de intercambio iónico son fuertemente dependientes del pH y la fuerza iónica de la fase móvil (13).

#### **3.2.2.4. Exclusión molecular**

Cromatografía de exclusión por tamaño es el método para la separación dinámica de las moléculas en función de su tamaño como su propio nombre indica, la separación se basa en la exclusión de las moléculas desde el espacio poroso de material debido a su impedimento embalaje. Radio hidrodinámico de las moléculas de analito es el principal factor determinante de su retención. En general, cuanto mayor sea el radio hidrodinámico, más corta será la retención. Históricamente, dos nombres diferentes se utilizan para este método. En 1959 se aplicó el principio de tamizado molecular para la separación de polímeros bioquímicos sobre geles de dextrano, y su se llama cromatografía de filtración en gel (utiliza eluyentes de base acuosa con sales). En 1961 se aplicó el mismo principio para la determinación del peso molecular de los polímeros sintéticos, y la cromatografía de permeación en gel nombre (utiliza disolventes Primariamente orgánicos tales como THF) entró en uso popular entre los químicos de polímeros.

Este es el único método de separación cromatográfica donde se debe evitar cualquier interacción positiva del analito con la fase estacionaria. En la cromatografía de exclusión de tamaño, mayor es el peso molecular de la molécula, mayor es su radio hidrodinámico, que dan como resultado la elución más rápida. En la misma, el tiempo, si

una molécula de analito interacciona (no deseada) con la fase estacionaria, aumentando así la retención de moléculas más grandes, que pueden confundir la separación de moléculas basadas únicamente en su radio hidrodinámico. Obviamente, estos dos procesos producen efectos opuestos, y el análisis del peso molecular del polímero y la distribución de peso molecular serían imposible. Esto trae requerimientos específicos para la selección del material de relleno de la columna y la fase móvil, en donde las moléculas de la fase móvil deben interactuar con la superficie de la fase estacionaria más fuerte que el polímero, evitando de este modo su interacción con la superficie.

La determinación del peso molecular del polímero se basa en la relación del radio hidrodinámico molecular con el peso molecular. El radio es más o menos proporcional a la raíz cúbica del peso molecular debe ser proporcional al volumen de retención de analito. Esto sólo se observó en las regiones de exclusión total y el total de la permeación molecular del polímero en el espacio poroso adsorbente. Una región prácticamente útil para la determinación del peso molecular es donde se observa la penetración parcial de las moléculas de analito en el espacio poroso adsorbente. En esta región, la distribución de tamaño de poro adsorbente desempeña el papel dominante en la capacidad adsorbente para discriminar moléculas en función de su peso molecular. Se encontró que el logaritmo del peso molecular del analito tiene una relación lineal con el volumen de retención en esta región.

Radio hidrodinámico del polímero también es dependiente de la interacción del analito con el disolvente. Polímero conformación y grado de la solvatación varía con la variación de las propiedades del disolvente (13).

### 3.2.3. Fase Estacionaria

Materiales de relleno de la columna es el lugar donde se produce la separación, y las propiedades la fase móvil son de vital importancia para las separaciones exitosas. Varios miles de diferentes columnas están disponibles comercialmente, y cuando se selecciona una columna para una separación particular, el analista deben ser capaces de decidir si se necesita una columna de relleno, capilar, o monolítica y qué fase de las características deseadas del material de base, y es necesaria densidad de unión de la columna seleccionada. Columnas comerciales del mismo tipo general (por ejemplo, C18) pueden diferir mucho en su poder de separación entre los diferentes proveedores. La información básica con respecto a la columna específica proporcionada por el fabricante, por lo general no permite la predicción de la separación o de la selección adecuada de las columnas con patrones de separación similares. Gran variedad de diferentes columnas están disponibles actualmente en el mercado.

Cuatro características distintas se podrían utilizar para la clasificación de la columna:

1. Tipo (monolítica; porosa; no porosa)
2. Geometría (superficie, volumen de poros, diámetro de poro, tamaño de partícula y forma, etc)
3. La química de superficie (tipo de ligandos unidos)
4. Tipo de material de base (sílice; polimérico; zirconia, etc)

Todas estas características están relacionadas entre sí. Las variaciones de porosidad que incluyen diámetro de poro pueden afectar tanto a la superficie adsorbente y la densidad de unión. El tipo de material de base afecta a la química de superficie adsorbente. Por lo tanto, en nuestro análisis combinamos estas características en dos clases principales: la geometría y la química de superficie.

La mayoría de las propiedades relacionadas con la geometría de los materiales de empaque están relacionadas con la eficiencia de la columna y resistencia de flujo: tamaño de partícula, forma de partícula, distribución de tamaño de partícula, la densidad de empaquetamiento, y la uniformidad de embalaje. Propiedades de superficie química relacionadas son los principales responsables de la retención del analito y la selectividad de la separación. Área de superficie adsorbente, volumen de poros, diámetro de poro y las propiedades son de importancia significativa.

Estabilidad de la columna a largo plazo (pH y temperatura) y la reproducibilidad de lote a lote son probablemente las características de calidad más importantes que deben ser considerados en la selección de la columna en la industria farmacéutica. Sin embargo, estos criterios deben ser evaluados con cuidado al seleccionar los parámetros de evaluación de columna. La estabilidad a largo plazo de las características de retención y la eficiencia son generalmente diferentes, dependiendo de las condiciones de prueba (fase móvil, la temperatura, y las propiedades del analito) (14).

#### **3.2.4. Fase móvil**

La fase móvil en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución cumple una función muy importante, ya que puede modificar la selectividad de las separaciones en fase normal y es, a la vez el “motor” de las separaciones en fase reversa (13).

Es importante mencionar que en el desarrollo de un método de CLAR es indispensable trabajar con los solventes adecuados, ya que la condiciones de estado líquido no es suficiente para emplearse como fase móvil. Un solvente apropiado debe cumplir requisitos, entre los cuales se encuentran:

1. Alto poder solubilizante de las muestras (Es conveniente utilizar la fase móvil para solubilizar las muestras)
2. Baja reactividad (No reaccionar con la muestra ni con la fase estacionaria o con algún componente del cromatógrafo)

3. Compatibilidad con el detector utilizado (solvente debe ser “transparente” a la longitud de onda a utilizar)
4. Adecuado punto de ebullición (Debido a la volatilidad del solvente)
5. Baja viscosidad (este factor está relacionado con la presión del sistema y altera la separación de la muestra)
6. Seguridad (se recomienda no usar solventes de alto grado de toxicidad).
7. Alto grado de pureza (presencia de impurezas podrían modificar la selectividad de la fase móvil)
8. Propiedades químicas (son las que establecen el tipo y la fuerza de interacción entre el solvente y la muestra, como consecuencia, determina la separación)

### 3.2.5. Parámetros Cromatográficos.

Todo tipo de cromatografía tiene en común las definiciones y cálculos de parámetros y requerimientos generales para comprobar la aptitud del sistema (14).

Estos parámetros se determinan con respecto al cromatograma, el cual es un gráfico o representación de la respuesta del detector en función del tiempo. Este gráfico es útil tanto para el análisis cualitativo como cuantitativo, ya que la posición de los picos en el eje del tiempo puede ayudar para identificar los componentes de la muestra; las áreas bajo los picos proporcionan una medida cuantitativa de la cantidad de cada componente.

Mediciones de retención en cromatografía se pueden presentar como el tiempo de retención ( $t_R$ ) se define por la posición del máximo del pico en el cromatograma. A partir de éste, se puede calcular el volumen de retención ( $V_R$ ) que se define como el volumen de fase móvil necesario para transportar la banda de soluto desde el punto de inyección a través de la columna, hasta el detector (en el máximo del pico del soluto).

$$V_R = v \times t_R$$

$t_R$  = tiempo de retención

$v$  = velocidad de flujo de la fase móvil.

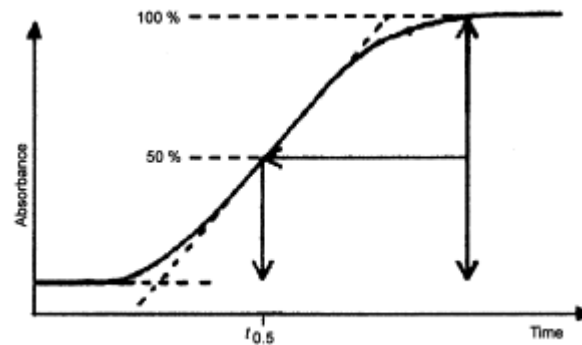


Figura 4 Representación de tiempo de retención cuando llega a su máximo

El factor de retención o factor de capacidad es un parámetro importante que con frecuencia se utiliza para describir las velocidades de migración de los solutos en las columnas, que se expresa:

$$K' = \frac{\text{cantidad de sustancia en fase estacionaria}}{\text{cantidad de sustancia en fase móvil}} = \frac{t_R}{t_M} - 1$$

El factor de Coleo o Asimetría es una medida de la simetría del pico, para un pico perfectamente simétrico este valor corresponde a 1 y su valor aumenta a medida que la simetría es más pronunciada. Éste parámetro se expresa:

$$A_s = \frac{\omega_{0.05}}{2d}$$

Donde

$\omega_{0.05}$  = anchura del pico a una vigésima parte de la altura del pico,

$d$  = distancia entre la perpendicular trazada desde el pico máximo y el borde delantero del pico a una vigésima parte de la altura del pico.

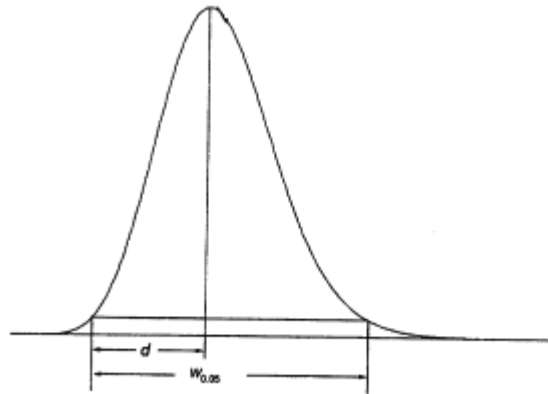


Figura 5 Representación de la presencia de coleo en el cromatograma

El rendimiento de la columna (eficiencia aparente) se puede calcular a partir de datos obtenidos bajo ciertas condiciones, dependiendo de la técnica, como el aparente número de platos teóricos (N) a partir de la siguiente expresión, donde los valores de  $t_R$  y  $w_H$ , tienen que se expresa en las mismas unidades (tiempo, volumen o distancia).

$$N = 5.54 \frac{t_R^2}{w_H}$$

O

$$N = \frac{w_{0.05}}{2d}$$

$t_R$  = tiempo de retención o la distancia a lo largo de la línea de base desde el punto de inyección a la perpendicular al suelo en el máximo del pico correspondiente al componente,

$w_H$  = anchura del pico a media altura.

$w_{0.05}$  = Ancho del pico al 5% de la altura.

$d$  = distancia entre el máximo del pico y el borde inicial del pico, al 5% de la altura del pico desde la línea base.

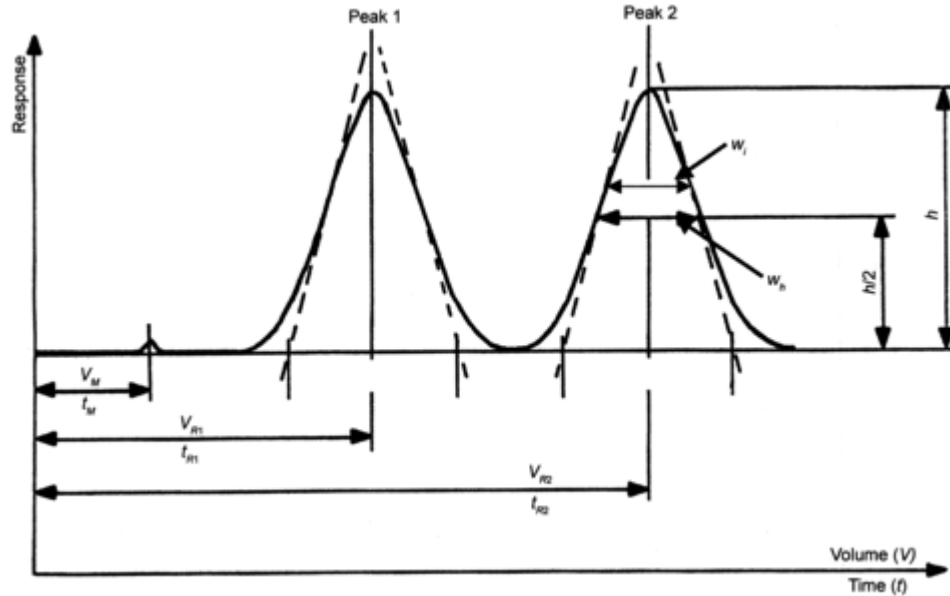


Figura 6 Componentes de un cromatograma, determinación de la resolución entre dos picos.

El número aparente de platos teóricos varía con el componente, así como con la columna y el tiempo de retención.

La resolución  $R$ , de una columna constituye una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos analitos.

$$R_s = \frac{1.18(t_{R2} - t_{R1})}{\omega_{h1} + \omega_{h2}}$$

$t_{R1}$  y  $t_{R2}$  = tiempos de retención o las distancias a lo largo de la línea de base desde el punto de inyección a las perpendiculares cayeron de los máximos de 2 picos adyacentes,

$W_{H1}$  y  $W_{H2}$  = anchura de los picos a media altura.

### 3.2.6. Conformación del Cromatógrafo de líquidos

La cromatografía líquida es en esencia, como todos los métodos cromatográficos, un método separativo. Así el lugar donde se produce la separación, la columna, a la cual se monta un equipo de mayor o menor complejidad.



En el caso más simple, el cromatógrafo de líquidos como se muestra en la Figura 7, está constituido por:

- Un reservorio de solvente que alimenta al sistema con la fase móvil.
- Un sistema que permite la introducción de la muestra: el inyector.
- Un sistema para forzar el pasaje de las muestras y la fase móvil a través de la columna: la bomba.
- Un sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna: el detector.
- Un sistema de registro de los datos provenientes del detector. La señal del detector es siempre análoga y puede ser utilizada tal cual por un registrador gráfico o por un integrador, o digitalizada, que puede ser interpretada y procesada por una computadora.

Como resultado del análisis cromatográfico se obtiene:

- Un gráfico, es decir, el cromatograma, que relaciona la concentración de soluto en función del tiempo de elución.
- Un eluido o eluato (residuos), el fluido proveniente de la columna que, de recolectarse en forma secuencial o escalonada, contiene la fase móvil y los componentes de la muestra separados.

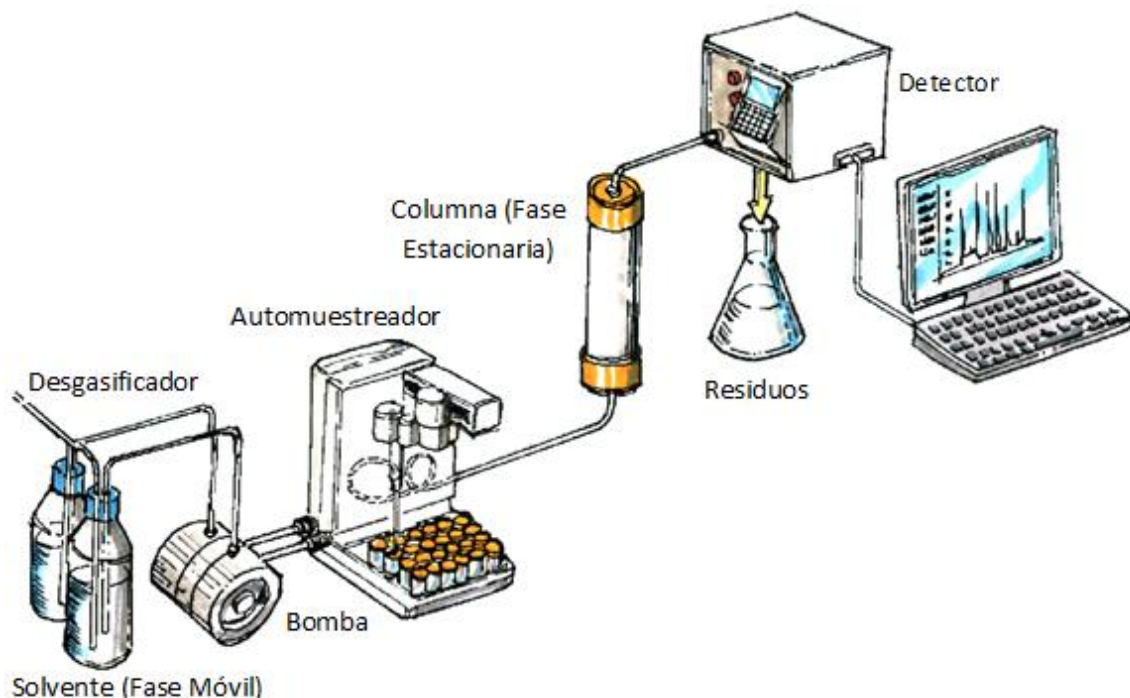


Figura 7 Esquema de un cromatógrafo de líquidos

## 4. HIPÓTESIS

Si se analizan todos los criterios de validación de métodos analíticos reportados por las diferentes organizaciones a nivel internacional se podrá definir qué características deben ser evaluadas, cómo demostrar que un método analítico destinado a la cuantificación de fármaco en tabletas es confiable.

## 5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 5.1. Reactivos, material y equipo.

#### Reactivos.

- Sustancia de referencia del Fármaco.
- Fármaco B. (sustancia de referencia).
- Fármaco C. (sustancia de referencia).
- Sustancia relacionada D. (sustancia de referencia).
- Sustancia relacionada E. (sustancia de referencia).
- Fosfato de potasio monobásico.
- Hexansulfonato de sodio.
- Solución saturada de hidróxido de sodio.
- Metanol grado cromatográfico.
- Agua purificada.

#### Materiales.

- Sistema de microfiltración para disolventes: Membrana Millipore, tipo HVLP de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.
- Columna de acero inoxidable de 15 cm de longitud por 4.6 mm de diámetro interno, empacada con partículas de sílica de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro recubiertas con grupos octadecilsilano (C18). Tipo Luna, marca Phenomenex.
- Parrilla de agitación mecánica.
- Barras magnéticas.
- Matraces volumétricos de 25, 50, 100 y 1000 mL.
- Probeta de 1000 mL.
- Vaso de precipitado de 1000 mL.
- Pipetas volumétricas de 3, 5, 6, 7, 8 y 9 mL.
- Mortero con pistilo.
- Filtros Millex – HV Durapore PVDF 0.45  $\mu\text{m}$ .

## Equipos.

- Cromatógrafos de líquidos de alta resolución, equipado con:
  - Equipo 1:
    - Bomba: Waters TM 600 controller
    - Inyector automático: Waters TM 717plus Autosampler
    - Detector: Waters TM 996 PDA
    - Software: Empowers 1.0
  - Equipo 2:
    - Modulo: Alliance Waters e2695
    - Detector: Waters TM 2996 PDA
    - Software: Empowers 2.0
- Potenciómetro pH-metro Mettler Toledo, Seven Multi.
- Balanza analítica Ohaus Modelo AP250D.
- Purificador de agua Millipore (Milli Q)
- Baño de ultrasonido Elma Transsonic 570/H

En la Tabla 3 se mencionan las condiciones establecidas, en el desarrollo del método, para la separación en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución

Tabla 3 Condiciones Cromatográficas

<b>Columna</b>	Luna 5 $\mu$ C18, 4.6 x 150 mm
<b>Fase móvil</b>	Metanol: Solución amortiguadora (30:70)
<b>Flujo</b>	1 mL/min
<b>Volumen de inyección</b>	5 $\mu$ L
<b>Longitud de onda</b>	233nm

## Preparación de soluciones.

### 5.1.1. Solución diluyente. Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.80.

Pesar 6.80 g de fosfato de potasio monobásico y 0.90 g de hidróxido de sodio. Transferirlos a un matraz volumétrico de 1000 mL. Disolver y llevar a volumen con agua purificada. Ajustar el pH a  $6.80 \pm 0.05$  con solución saturada de hidróxido de sodio.

### 5.1.2. Solución Amortiguadora.

Pesar 2.60 g de fosfato de potasio monobásico y 1.31 g de hexansulfonato de sodio, Transferirlos a un matraz volumétrico de 1000 mL. Agitar mecánicamente hasta disolver completamente y llevar a volumen con agua purificada, homogenizar.

### 5.1.3. Fase móvil

Transferir a un vaso de precipitado de 1000 mL, 700 mL de la solución amortiguadora y 300 mL de metanol grado cromatográfico, medidos de forma independiente. Mezclar mecánicamente por 10 minutos. Filtrar la solución a través de membrana Millipore tipo HVLP de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y desgasificarla en ultrasonido.

### 5.1.4. Soluciones de referencia.

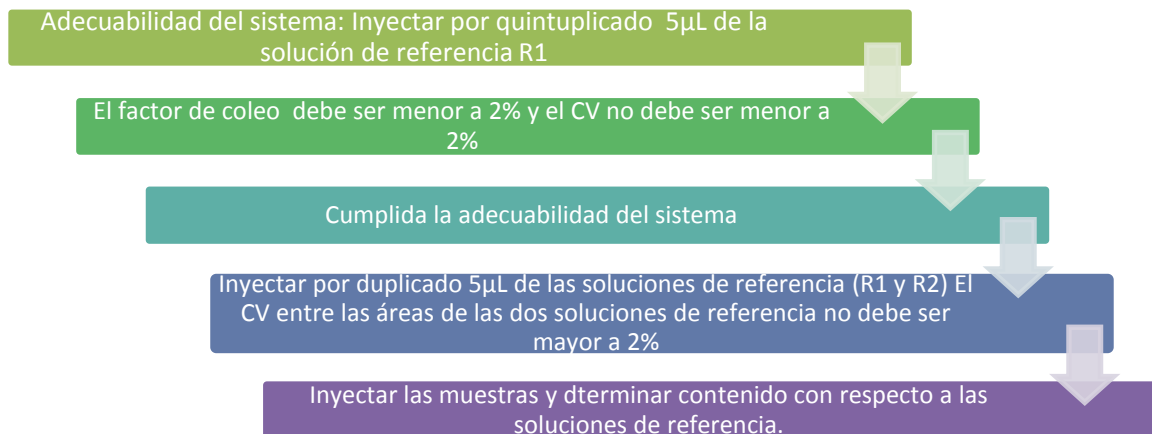
Pesar por duplicado, aproximadamente 12.5 mg del fármaco A, sustancia de referencia y registrar peso exacto. Transferir a matraces volumétricos de 50 mL. Adicionar aproximadamente 30 mL de solución diluyente y disolver. Etiquetar como solución A. Llevar a volumen con solución diluyente y homogenizar. Tomar 3mL de la solución A y transferirla a un matraz de 25 mL. Llevar a volumen de aforo con agua purificada y homogenizar.

### 5.1.5. Preparación de la muestra

Obtener el peso promedio de 20 tabletas y pulverizar. Pesar por duplicado, el peso equivalente a 100 mg de fármaco A. Transferir a matraces volumétricos de 100 mL. Agitar en ultrasonido durante 15 minutos, posteriormente agitar mecánicamente por 30 minutos. Dejar enfriar hasta temperatura ambiente y llevar a volumen con solución diluyente, mezclar. Dejar sedimentar las soluciones durante 10 minutos. Transferir una alícuota de 3 mL de cada una de las soluciones a matraces volumétricos de 100 mL. Llevar a volumen con agua purificada y mezclar. Filtrar las soluciones de referencia y muestras a través de acrodiscos Millex-HV Durapore PVDF 0.45  $\mu\text{m}$ , eliminar los primeros mililitros y recibir el filtrado en viales.

## Procedimiento Analítico

La metodología que se evaluó para determinar el contenido de fármaco A en tabletas es la que se expresa en la Figura 8:



**Figura 8 Metodología para la cuantificación del Fármaco en Tabletas**

### Fórmula para determinar el Fármaco en tabletas

$$\frac{A_m}{A_r} \times \frac{P_r}{P_m} \times 8 \times P \times PP = \frac{\text{mg de Fármaco por tableta}}{850} \times 100 = \% \text{ Fármaco por tableta}$$

Dónde:

$A_m$  = Área del pico de El Fármaco, obtenida en la solución muestra.

$A_r$  = Área promedio del pico del Fármaco, obtenida en las soluciones de referencia

$P_r$  = Peso del Fármaco, sustancia de referencia en mg.

$P_m$  = Peso de la muestra en mg.

8 = Factor de dilución.

P = Pureza de la sustancia de referencia del Fármaco / 100.

PP = Peso promedio de las tabletas, en mg.

850 = Contenido teórico del Fármaco por tableta.

100 = Factor de conversión a porcentaje.

## Protocolo de validación del método analítico.

El protocolo de validación se desarrolló de acuerdo a los criterios establecidos en la Guía EURACHEM donde se establecen como parámetros: rango, verificación del sistema, linealidad del sistema, especificidad, exactitud del método, linealidad del método, precisión del método y robustez.

### Verificación del sistema

Se determinó realizando por sextuplicado la inyección del estándar del fármaco A, a una concentración correspondiente al 100%.

### Rango

Se evaluó mediante la preparación de forma independiente dos soluciones patrón del Fármaco A, sustancia de referencia a una concentración aproximada de 150µg/mL, partir de la cual se realizaron 6 niveles de concentración de 40% a 140%, realizando sus respectivas diluciones y considerando la concentración de 30µg/mL como el 100%.

### Linealidad del sistema

Se prepararon por triplicado y de forma independiente soluciones patrón del Fármaco A, sustancia de referencia a una concentración de 300 µg/mL, mediante la cual se establecieron 6 niveles de concentración de 70% a 120%, realizando sus correspondientes diluciones y considerando la concentración del 30 µg/mL como el 100%.

### Linealidad del método

Se elaboraron tres curvas de calibración de forma independiente, por pesadas individuales y con seis niveles de concentración que comprendieron de 70% al 120%, considerando que el 100% contiene 100mg del Fármaco A, sustancia de referencia y 46mg del placebo adicionado con Fármaco B y Fármaco C.

### Exactitud.

Este parámetro se determinó evaluando los componentes aleatorios y sistemáticos del error.

**Error aleatorio:** se evaluaron a través de nueve soluciones por pesadas individuales de la concentración al 100% considerando que contiene 100mg de Fármaco A, sustancia de referencia y 46mg del placebo adicionado con Fármaco B y Fármaco C.

**Error sistemático:** se determinó a través de 3 repeticiones de los niveles de concentración a 80, 100 y 120%, considerando que el 100% contiene 100mg del Fármaco A, sustancia de referencia y 46mg del placebo adicionado con Fármaco B y Fármaco C.

### **Repetibilidad**

Se determinó el peso promedio de 20 tabletas del Producto con Fármaco A, y pulverizó. Se pesó por sextuplicado, la cantidad de polvo equivalente a 100mg del Fármaco A el cual se somete como se indica en la preparación de la muestra.

### **Precisión Intermedia**

Se realizó la evaluación por dos analistas, en dos días diferentes y en equipos independientes.

Cada analista obtuvo el peso promedio de 20 tabletas del Producto con Fármaco A, y pulverizó. Se pesó por sextuplicado, la cantidad de polvo equivalente a 100mg del Fármaco A el cual se somete como se indica en la preparación de la muestra.

### **Especificidad**

Para esta prueba se evaluaron diferentes soluciones en las cuales se encuentra ausente el analito de interés y muestras en las que se encuentran el analito de forma deliberada.

Se utilizaron referencias de los fármaco presentes en el Producto a evaluar y placebos así como las sustancias relacionadas con el Fármaco A.

### **Robustez**

Se evaluaron dos variables que fueron mezcla de la fase móvil y sistema cromatográfico en las cuales en ambas pruebas se prepararon 3 muestras, que se obtiene sacando el peso promedio de 20 tabletas, pesando el polvo equivalente 100mg del Fármaco A y a las cuales se trataron como se indica en la preparación de la muestra.



## 6.RESULTADOS Y ANÁLISIS

### Adecuabilidad del sistema

Esta evaluación permite verificar que el sistema cromatográfico es apto para realizar el análisis mediante la determinación de la reproducibilidad del equipo cromatográfico. En la Tabla 4 se reporta el resultado promedio de todas las evaluaciones que se realizaron antes de cada prueba.

Los criterios de aceptación para considerar que el sistema era adecuado fueron el factor de coleo, que debía ser menor a 2.0, el coeficiente de variación del Tiempo de retención menor al 2% y el coeficiente de variación de las Áreas menor al 2%.

En la Tabla 4 también se establece como parámetro el Número de Platos Teóricos que indicó la eficiencia de la columna para lograr una buena separación. En estas pruebas los Platos Teóricos fue de 4900

Tabla 4 Resultados de la Verificación del sistema para la cuantificación del Fármaco A, sustancia de referencia

<i>Parámetros de Adecuabilidad</i>	<i>Resultados</i>
<i>Factor de Coleo</i>	1.18
<i>Número de Platos Teóricos</i>	4900
<i>% C.V. Tiempo de retención</i>	0.55
<i>% C.V. Áreas</i>	0.21

Cada una de las pruebas realizadas de Adecuabilidad antes de cada parámetro cumplió con los criterios de aceptación previamente establecidos.

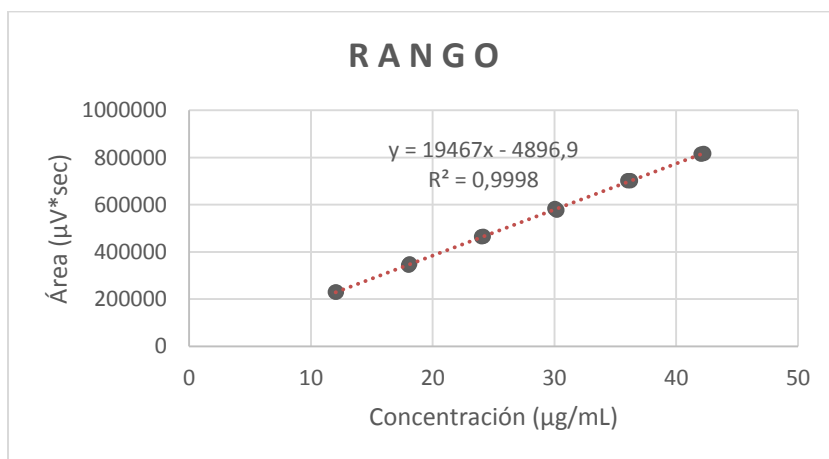
### Rango

El rango se determinó de un 40 a 140% de acuerdo a las recomendaciones de la Guía ICH, que indican que se debe encontrar por encima del 120% y por debajo del 80%, en las cuales se determinó que el rango que comprende el análisis para contenido químico sea lineal como se observa en la Gráfica 1 en la cual se observa el comportamiento de

la respuesta. Para esta prueba se tomó como criterios de aceptación que el intercepto pasara por cero y que el coeficiente de determinación fuera mayor a 0.995. Como se observa en la Tabla 5 se observa que el coeficiente de determinación es mayor al establecido y en la Tabla 6 se observa que el intervalo de confianza de la ordenada al origen se encuentra el cero dentro del intervalo.

**Tabla 5 Concentración del Fármaco y las áreas correspondientes que comprenden la curva de calibración para la prueba de Rango**

Concentración del Fármaco (µg/mL)	Area (µV*sec)
12.016	229316
18.024	344136
24.032	464863
30.04	583470
36.048	701389
42.056	813154
12.08	229715
18.12	348857
24.16	464941
30.2	576896
36.24	701095
42.28	815927
Ecuación	$y = 19467x - 4896.9$
R	0.9999
R <sup>2</sup>	0.9998



**Gráfica 1 Curva de calibración para la prueba de Rango**

**Tabla 6** Análisis de variancia con un factor realizado para determinar la relación lineal entre la concentración real del Fármaco y su respuesta analítica con un nivel de significancia del 5%

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
<b>Intercepción</b>	-4896.94769	2374.85327	-2.0620001	0.066165	-10188.4505	394.555151
<b>Variable X 1</b>	19466.9543	81.906527	237.672808	4.2752E-20	19284.455	19649.4534

## Linealidad del sistema.

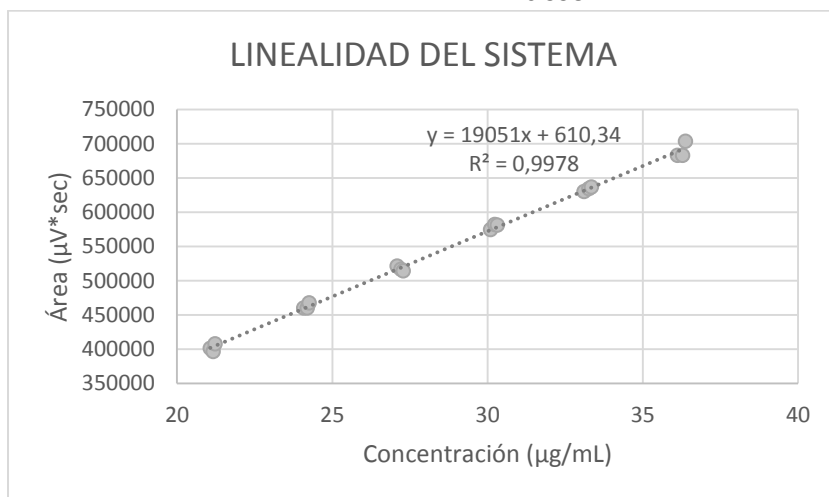
La linealidad del sistema demuestra la relación concentración en función de la respuesta dada por el sistema cromatográfico mediante una curva de calibración que comprende 5 concentraciones por triplicado que comprende de un 70% a 120%.

Para esta prueba se establece como parámetros que el coeficiente de determinación sea mayor a 0.998 y el coeficiente de correlación mayor 0.995, los cuales se cumplen como se observa en la Tabla 7, en la Gráfica 2 se establece que la respuesta del Fármaco A sigue un modelo matemático lineal que se expresa:  $y = 19051x + 610.34$ . Y en la Tabla 8 se observa que el modelo tiene como ordenada al origen al 0.

**Tabla 7** Concentraciones del Fármaco con el resultado analítico de linealidad del sistema

Concentración del Fármaco ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área ( $\mu\text{v} \cdot \text{sec}$ )
21.07	401208
21.168	396875
21.224	407952
24.08	460381
24.192	460290
24.256	467575
27.09	521175
27.216	516711
27.288	514305
30.1	574851
30.24	582069
30.32	581149
33.11	630225
33.264	634301
33.352	636989
36.12	683150
36.288	683163
36.384	703367
<b>Ecuación</b>	$y = 19051x + 610.34$
<b>R</b>	0.999

Concentración del Fármaco (µg/mL)      Área (µV\*sec)  
 $R^2$       0.998



Gráfica 2 Curva de calibración para la prueba de Linealidad del Sistema

Tabla 8 Determinación de intervalo de confianza de la ordenada al origen y la pendiente

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
<b>Intercepción</b>	610.340994	6569.151933	0.09291	0.927128	-13315.64	14536.32
<b>Variable X 1</b>	19050.83938	225.207372	84.592432	1.20622E-22	18573.42	19528.26

En la Tabla 8 se observa los resultados de la determinación del intervalo de confianza para precisar que la ordenada al origen comprende el 0.

En la Tabla 9 se muestra en análisis de variancia en la cual se evalúa la linealidad mediante la comparación de los valores de  $F_{cal}$  contra el Valor crítico de F, lo cual determina que hipótesis estadística se cumple.

Para este parámetro de establecieron las siguientes hipótesis:

$H_0$ : No existe una relación lineal de entre la concentración y el área obtenida.

$H_a$ : Existe una relación lineal d entre la concentración y el área obtenida.

En esta característica se estableció como criterio de aceptación que si la  $F_{cal}$  es mayor que la  $F_{critica}$  se rechaza  $H_0$ .

En la Tabla 9 se presenta una  $F_{cal}$  de 7155.87 que es mayor a la  $F_{critica}$  de  $1.2e^{-22}$ , por lo cual se puede decir que existe una relación lineal entre la concentración y el área obtenida, ya que se rechazó la hipótesis  $H_0$

Tabla 9 Análisis de variancia con un factor realizado para determinar la relación lineal entre la concentración real de El Fármaco y su respuesta analítica con un nivel de significancia del 95%.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	1.74061E+11	1.74061E+11	7155.879635	1.20622E-22
Residuos	16	389187574.4	24324223.4		
Total	17	1.7445E+11			

## Linealidad del método

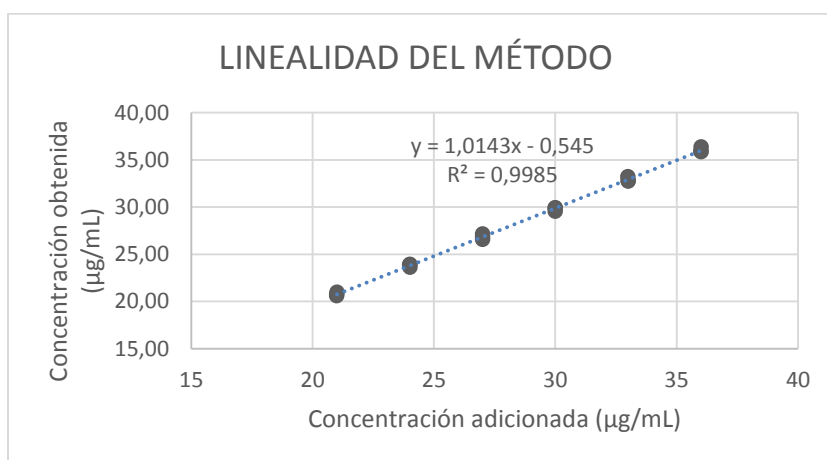
En la linealidad del método se demuestra la capacidad del método para determinar concentraciones proporcionales a la concentración del analito. Para este parámetro se establecieron como criterio de aceptación los coeficientes de correlación y determinación sean 0.995 y 0.997 respectivamente como se observa en la Tabla 10 se cumplieron en primera instancia el comportamiento lineal. Como segundo parámetro se estableció que la ordenada al origen comprenda el cero; y la pendiente la unidad, que como se nota en la Tabla 11 el intervalo del intercepto (-1.1392 – 0.0492) contiene el 0, así como en intervalo de la pendiente (0.9937-1.0348) se encuentra la unidad.

Tabla 10 Concentración del Fármaco adicionada y la concentración experimental del Fármaco para linealidad del método

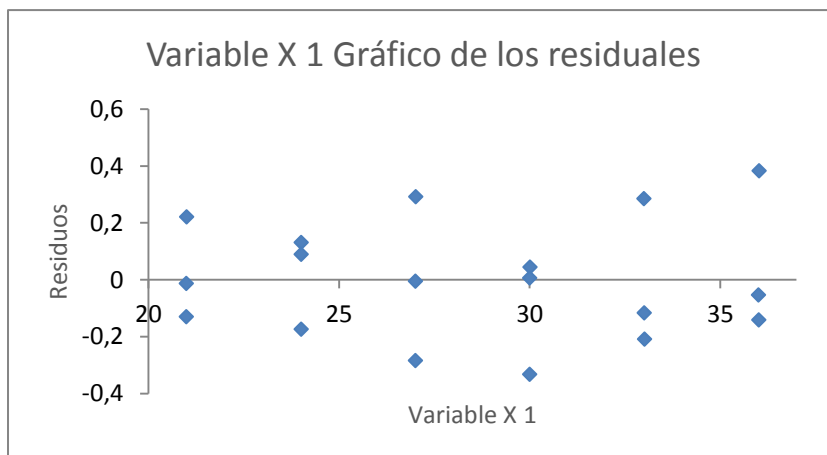
Concentración adicionada del Fármaco (µg/mL)	Concentración experimental del Fármaco (µg/mL)	Fármaco Recuperado (%)
21.00	20.98	99.88
21.00	20.62	98.21
21.00	20.74	98.77
24.01	23.64	98.43
24.01	23.94	99.70
24.01	23.89	99.53
27.00	26.56	98.36
27.01	27.14	100.49
27.00	26.84	99.39
30.01	29.93	99.76
30.00	29.55	98.50
30.00	29.89	99.63

33.01	32.82	99.42
33.01	32.73	99.14
33.00	33.21	100.64
36.00	35.92	99.76
36.01	35.84	99.52
36.02	36.37	100.98
Ecuación	$y = 1.0143x - 0.545$	
R	0.999	
R <sup>2</sup>	0.998	

También para demostrar dicha capacidad de para determinar la concentración del analito debe tener un comportamiento sin tendencia entre los residuos, como se observa en la Gráfica 4, donde se observa la homocedasticidad de los datos obtenidos que es una condición necesaria para que dichas estimaciones sean eficiente ya que demuestra que el error de las mediciones es aleatorio.



Gráfica 3 Concentración adicionada promedio del Fármaco en función de su concentración experimental del Fármaco de linealidad del método



Gráfica 4 Gráfico de residuales de la relación de la concentración adicionada del Fármaco A en función de su concentración experimental del Fármaco A obtenida

Tabla 11 Análisis de variancia con un factor realizado para determinar la relación lineal entre la concentración adicionada promedio del Fármaco y la concentración experimental promedio del Fármaco con un nivel de significancia del 95% de Linealidad del método.

	Grados libertad	deSuma cuadrados	dePromedio de los cuadrados	$F$	Valor crítico de F
<b>Regresión</b>	1	486.467956	486.467956	10983.3745	3.9391E-24
<b>Residuos</b>	16	0.708661	0.044291		
<b>Total</b>	17	487.176617			

Tabla 12 Determinación de intervalo de confianza de la ordenada al origen y la pendiente

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
<b>Intercepción</b>	-0.545016	0.280300	-1.944400	0.069644	-1.139226	0.049194
<b>Variable X 1</b>	1.014257	0.009678	104.801596	3.93909E-24	0.993741	1.034774

En la Tabla 12 se observan los resultados de la determinación del intervalo de confianza para precisar que la ordenada al origen comprende el 0 y la pendiente comprende la unidad, demostrando que el método es lineal.

En la Tabla 11 se expone en análisis de variancia en la cual se evalúa la linealidad mediante la comparación de los valores de  $F_{cal}$  contra el Valor crítico de F, lo cual determina que hipótesis estadística se cumple.

Para este parámetro de establecieron las siguientes hipótesis:

H<sub>0</sub>: No existe una relación lineal de entre la concentración y el área obtenida.

H<sub>a</sub>: Existe una relación lineal de entre la concentración y el área obtenida.

En esta característica se estableció como criterio de aceptación que si la  $F_{cal}$  es mayor que la  $F_{critica}$  se rechaza  $H_0$ .

En la Tabla 11 se presenta una  $F_{cal}$  de 10983.37 que es mayor a la  $F_{critica}$  de  $3.9e-24$ , por lo cual se puede decir que existe una relación lineal entre la concentración y el área obtenida, ya que se rechazó la hipótesis  $H_0$

## Exactitud

La exactitud implica la combinación de componentes aleatorios y componentes sistemáticos.

Los componentes aleatorios comprueban la precisión del método, es decir, nos muestra dispersión de los resultados por lo cual para su determinación se realizó una repetición nueve veces con la que se demostró la precisión del sistema. Esta dispersión de datos se ve reflejada en el coeficiente de variación, que como criterio de aceptación se estableció que debe ser menor al 2%. Y para demostrar la concordancia de valor real con el obtenido se obtuvieron el error relativo que como criterio de aceptación su valor absoluto debe ser menor al 2%.

Como se nota en la Tabla 13 el valor del coeficiente de variación es de 0.80 y el error relativo de las muestras presentó porcentajes absolutos menores al 2% lo cual demuestra que el método es preciso al momento de predecir el valor real de las muestras.

### Error aleatorio.

**Tabla 13 Criterios de aceptación para la prueba de Error Aleatorio**

Parámetros de desempeño		Resultado
Error Aleatorio	Porcentaje de recuperación	Promedio 99.63
	IC( $\mu$ )	Desviación Estándar 0.80
		C.V. (%) 0.80
	Error relativo	Inferiores a 2.0%

Por otro lado el error sistemático muestra la veracidad del método, es decir, exhibe la proximidad con el valor de referencia aceptado. El valor de referencia aceptado se estima realizando una curva de calibración compuesta por 3 niveles de concentración



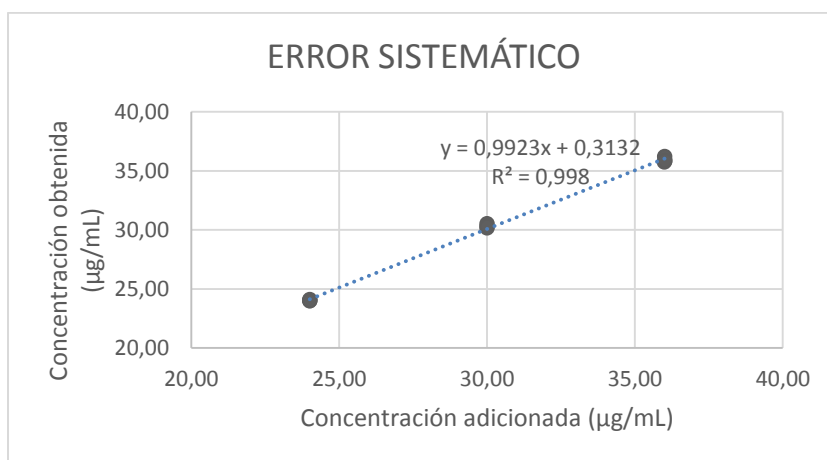
por triplicado, con lo cual se establece como criterio de aceptación que la pendiente comprenda en su intervalo de confianza la unidad y la ordenada al origen comprenda el cero, también como criterio de aceptación se establece que el coeficiente de correlación sea mayor a 0.995 y que los porcentajes absolutos de error relativo fueran menores al 2%

**Error Sistemático.**

**Tabla 14 datos obtenidos durante la curva de calibración para determinar el error sistemático**

Concentración experimental del Fármaco (µg/mL)	Concentración adicionada de Fármaco (µg/mL)
30.12	29.99
29.39	30.00
29.72	30.01
29.91	30.01
29.89	30.00
30.23	30.00
29.91	30.00
29.96	30.00
29.88	30.00
Ecuación	$y = 0.9923x + 0.3132$
R	0.999
R <sup>2</sup>	0.998
Error relativo	Menores al 2%

Como se muestra en la Tabla 14 se observa que el coeficiente de correlación es de 0.999 demostrando que el comportamiento de los datos es lineal. También se observa que el error relativo de la muestras se encuentran dentro de los límites de aceptación presentando todos porcentajes absolutos inferiores al 2%. Por otra parte, en la Tabla 15, se observa que la ordenada al origen se encuentra que estadísticamente contiene el valor de 0, y que la pendiente comprende en su intervalo de confianza con un  $\alpha$  5% el valor de 1.



Gráfica 5 Curva de calibración de placebos adicionados en tres niveles de concentración de 80%, 100% y 120%, para determinar el error sistemático del método

Tabla 15 Análisis de variancia con un factor realizado para determinar la relación lineal entre la concentración adicionada promedio del Fármaco y la concentración experimental promedio del Fármaco con un nivel de significancia del 95%

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
<b>Intercepción</b>	0.313250	0.508051	0.616572	0.557029	-0.888100	1.514599
<b>Variable X 1</b>	0.992274	0.016709	59.383840	1.0079E-10	0.952762	1.031785

Es importante mencionar que para algunas instituciones reguladoras la veracidad se denomina como exactitud, por lo cual algunas organizaciones reguladoras demuestran la exactitud con solo esta prueba, como se referencia en la Guía EURACHEM, omitiendo que la exactitud está compuesta por ambos conceptos.

### **Precisión**

La precisión determina el grado de concordancia y como ya se ha mencionado anteriormente está determinado por el coeficiente de variación que determina la relación entre el promedio de las mediciones y la desviación estándar que hay entre ellas.

### **Repetibilidad**

Para la validación la precisión se determina por la medición por sextuplicado del método analítico a evaluar.

En la prueba de repetibilidad se observa en la Tabla 16 que el coeficiente de variación se encuentra por debajo del 2%, lo cual demuestra la concordancia que tuvo un analista entre sus mediciones.

**Tabla 16 Evaluación de porcentaje del Fármaco en tabletas**  
**% Fármaco por tableta**

94.87
95.92
98.39
95.61
96.46
96.6
<b>Promedio</b> 96.31
<b>Desviación Estándar</b> 1.20
<b>C.V. (%)</b> 1.24

### Precisión intermedia

Complementario a la repetibilidad la precisión intermedia demuestra que el método es preciso aun cuando se realiza en dos condiciones diferentes que fueron el analista y el día. Para esta prueba se tomó como criterio que el coeficiente de variación global de las mediciones fuera menor al 2%.

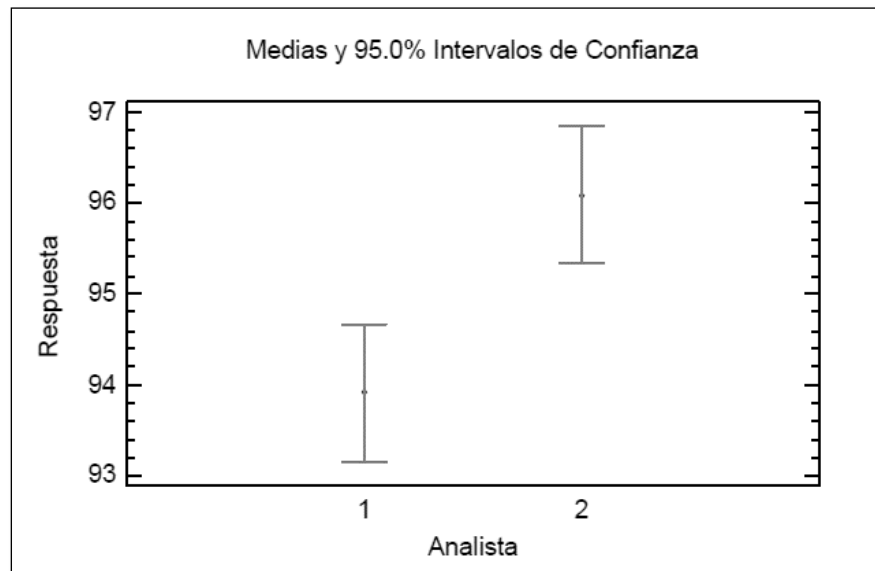
Con los datos de la Tabla 17 se analizaron los porcentajes de recobro mediante una análisis de las 24 muestras totales entre ambos analistas y ambos días, determinando un coeficiente de variación global igual al 1.76%.

**Tabla 17 Porcentajes de recuperación del Fármaco obtenidos en dos días y por dos analistas diferentes.**

DÍA	ANALISTA	
	A1	A2
D1	93.49	94.951
	94.90	95.623
	94.10	96.474
	95.39	94.433
	95.23	96.388
	97.15	95.77

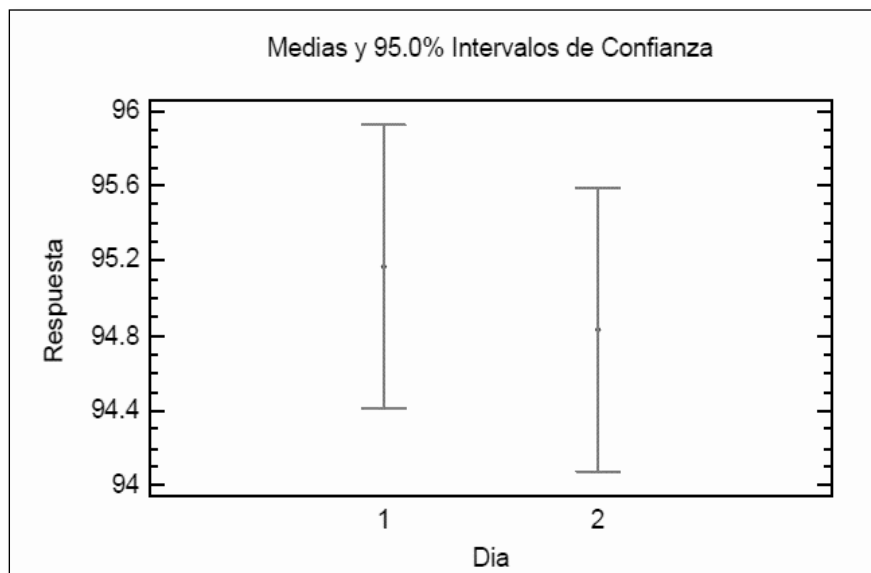
DÍA	ANALISTA	
D2	93.25	97.47
	91.56	96.63
	94.28	97.888
	93.33	96.04
	91.61	96.47
	94.36	95.80
<b>Promedio</b>	94.05	96.16
<b>Desviación estándar</b>	1.58	0.96
<b>C.V (%)</b>	1.67	1.00
<b>Promedio de 24mtras.</b>	95.11	
<b>Desviación estándar de 24 mtras.</b>	1.67	
<b>C.V (%) de 24 mtras.</b>	1.76	

Adicionalmente se realizó un análisis estadístico a través de Modelo generalizados Lineales, la influencia de los factores establecidos como se observa en la Gráfica 6, donde se realizó el análisis de los analistas y se encontró que hay diferencia significativa entre los recobro de un analista y otro.



**Gráfica 6 Comparación de la variabilidad del porcentaje de recobro del Fármaco entre analistas con intervalo de confianza del 95%**

En el análisis realizado para determinar la influencia del día encontramos que no hay diferencia significativa entre las mediciones entre del día 1 y 2.



**Gráfica 7 Comparación de la variabilidad del porcentaje de recobro del Fármaco entre días con intervalo de confianza del 95%**

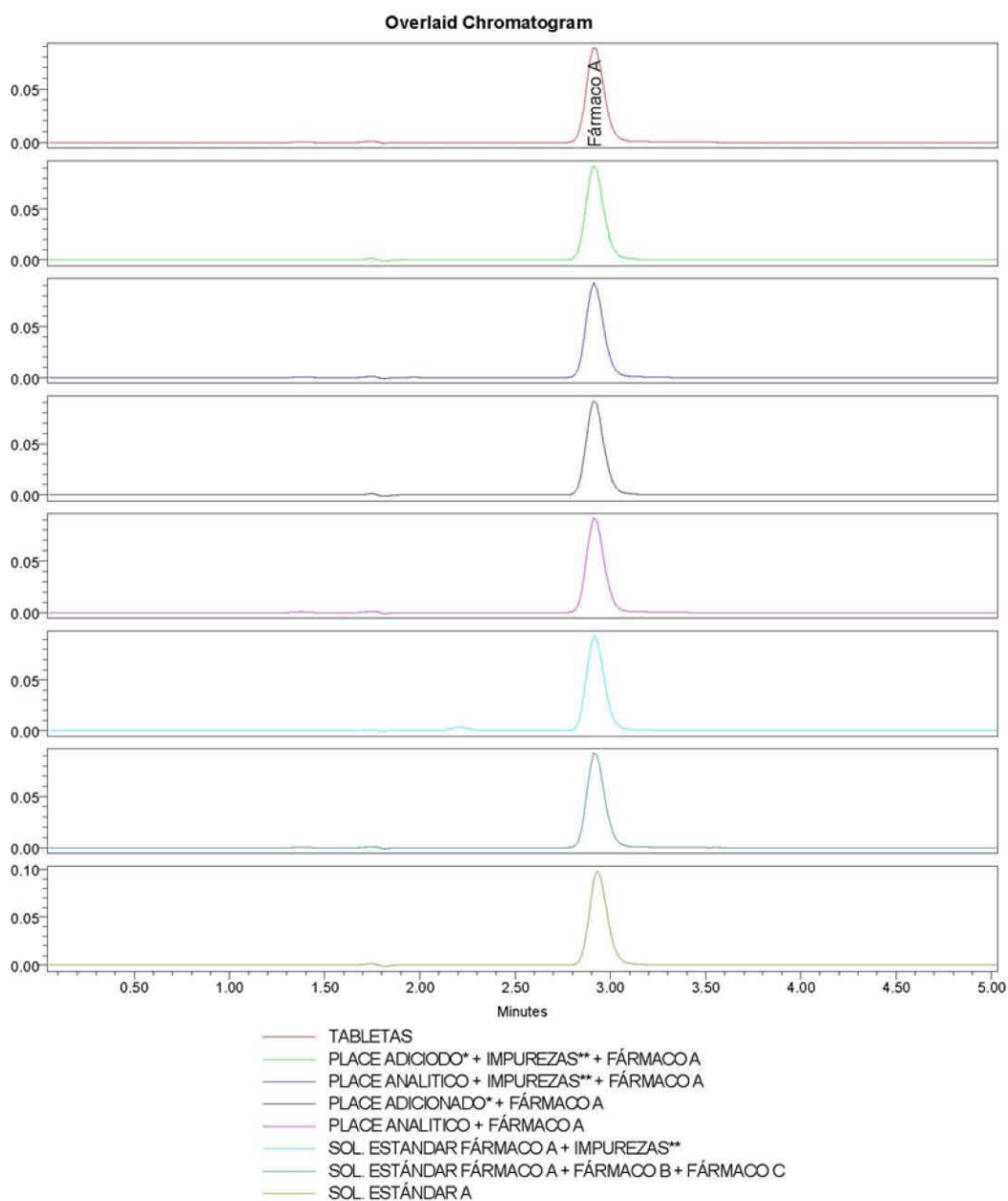
### Especificidad

La prueba de especificidad determina que el método sea capaz de identificar solo al analito a determinar para esto realizo un conjunto de soluciones cargadas con Fármaco A al 100% y soluciones con los posibles componentes de la matriz sin activo para determinar que la señal es debida al analito. En la Figura 9 se muestran las soluciones con activo en donde se observa que el pico detectado es debido únicamente por el Fármaco A.

Mientras que en el la Figura 10 se muestra que la sustancia relacionada E con el Fármaco A es capaz de dar señal analítica a la longitud de onda elegida.

El método se considera específico ya la sustancia relacionada E con el Fármaco A presenta un tiempo de retención diferente al Fármaco A, demostrando que se está llevando a cabo una separación adecuada.

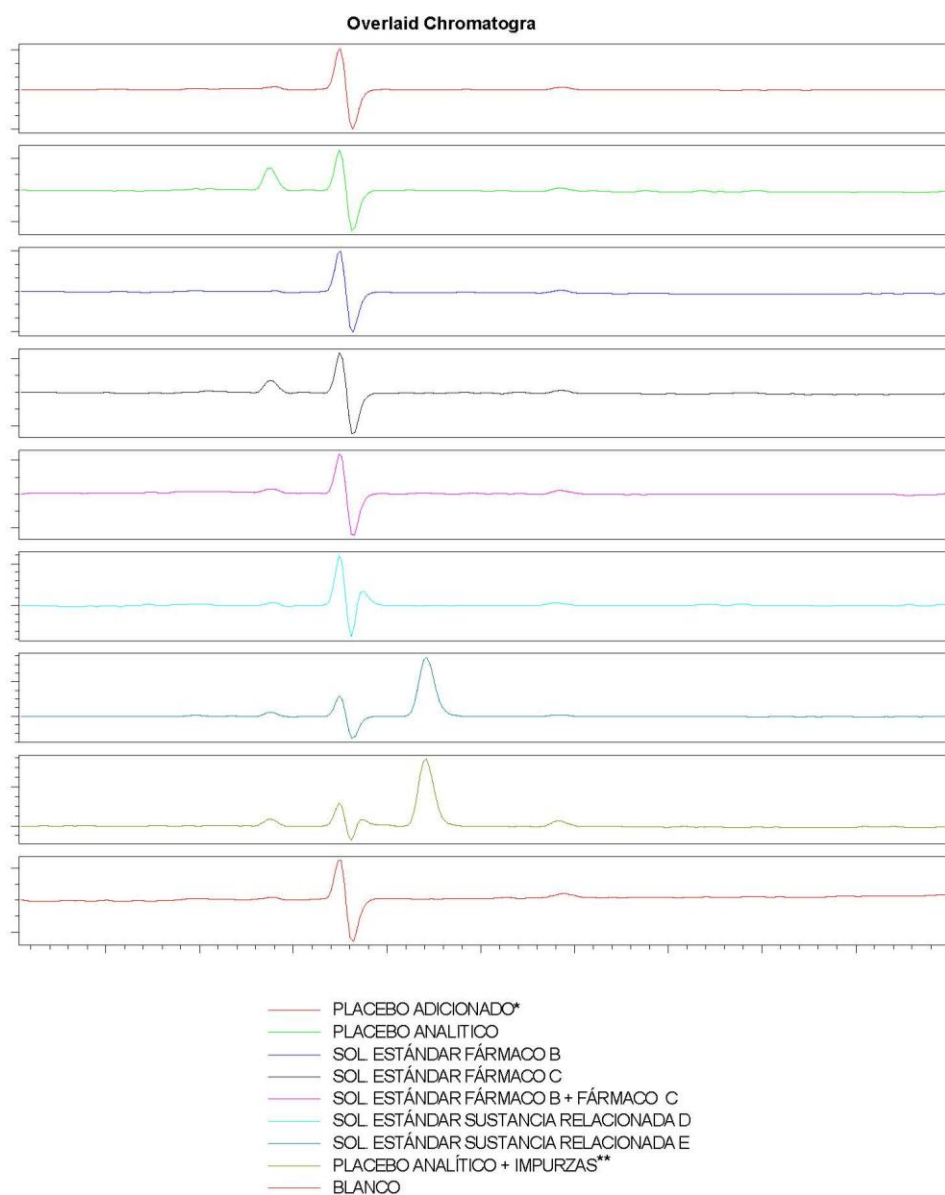
La falta de la señal de la sustancia relacionada E con el Fármaco A en la solución del placebo cargado con las impurezas y el Fármaco A al 100% confirma que las condiciones a las que se estableció el método analito en estudio, son condiciones óptimas para llevar a cabo la separación y la cuantificación del Fármaco A.



\*PLACEBO ADICIONADO: PLACEBO ANALÍTICO + FÁRMACO A + FÁRMACO B

\*\*IMPUREZAS: SOL. EST. SUSTANCIA RELACIONADA C + SOL. EST. SUSTANCIA RELACIONADA D

Figura 9 Cromatogramas de las muestras que contenían el Fármaco A en diferentes soluciones



\*PLACEBO ADICIONADO: PLACEBO ANALÍTICO + FÁRMACO A + FÁRMACO B

\*\*IMPUREZAS: SOL. EST. SUSTANCIA RELACIONADA C + SOL. EST. SUSTANCIA RELACIONADA D

Figura 10 Cromatogramas de las soluciones que contiene los diferentes compuestos de la matriz.

### Robustez.

En la prueba de robustez el ensayo se establecieron dos variables y se realizó un análisis univariante demostrando la influencia de la preparación de la fase móvil, así como la influencia de cambio de sistema cromatográfico.

**Mezcla de la fase móvil manual y automatizada.**

Tabla 18 Evaluación de porcentaje de recobro de El Fármaco en tabletas de 850mg empleando la mezcla automatizada y manual de la fase móvil.

	% Fármaco/tab	Promedio	Desviación Estándar	C.V	Factor I	Di
<b>Manual</b>	97.28	<b>97.09</b>	<b>0.53</b>	<b>0.54</b>	<b>99.84</b>	<b>-0.07</b>
	96.5					
	97.5					
<b>Automatizada</b>	96.58	<b>96.94</b>	<b>0.46</b>	<b>0.47</b>	<b>99.84</b>	<b>-0.07</b>
	96.78					
	97.45					

En la Tabla 18 se muestran los porcentajes de recobro que se obtuvieron al realizar el ensayo por triplicado en ambas condiciones obteniendo recobro con un factor de 99.84 que se encuentra dentro del intervalo establecido como criterio de aceptación de 98-102%. También se estableció que la diferencia absoluta entre ambas condiciones sea menor al 2, para demostrar que este cambio de condiciones no afecta significativamente los recobros obtenidos durante el análisis.

**Diferente sistema cromatográfico.**

Tabla 19 Evaluación de porcentaje de recobro de El Fármaco en tabletas de 850mg empleando la mezcla automatizada y manual de la fase móvil.

	% Fármaco/tab	Promedio	Desviación Estándar	C.V	Factor I	Di
<b>Equipo 1</b>	97.09	<b>96.99</b>	<b>0.11</b>	<b>0.11</b>	<b>99.78</b>	<b>0.21</b>
	96.88					
	96.99					
<b>Equipo 2</b>	96.882	<b>96.78</b>	<b>0.32</b>	<b>0.33</b>	<b>99.78</b>	<b>0.21</b>
	96.42					
	97.032					

En el caso de diferentes sistemas cromatográficos se observa en la Tabla 19 que el Factor I entra dentro del rango del 98-102% y la diferencia absoluta entre los dos equipos es menor a 2, lo cual comprueba que no hay diferencia importante entre realizar el análisis en un equipo diferente al utilizado.



## 7. CONCLUSIÓN

Se estableció una estrategia para validar un método analítico para determinar el contenido de fármaco en tabletas considerando las características de desempeño establecidas por la Conferencia Internacional sobre la Armonización, tomando las modificaciones de error aleatorio y error sistemático para evaluar la exactitud con base a criterios establecidos en la guía de validación Eurachem y teniendo en cuenta que el instrumento de análisis es la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

Para establecer los criterios que comprendió el protocolo de validación se realizó una investigación documental en las guías de validación emitidas por la ICH y Eurachem.

Los resultados se analizaron mediante procesos estadísticos que demostraron la confiabilidad del método analítico al cumplir con los criterios establecidos.

Se cumplió con los criterios de aceptación establecidos para cada una de las características de desempeño que establecen las organizaciones regulatorias, que permitió determinar la validez del método analítico para la cuantificación de El Fármaco en tabletas por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

Como resultado de la experimentación se pudo establecer también una serie de recomendaciones sobre el buen uso y mantenimiento de un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución, ya que esto fue parte importante en la validación, dado que un mal uso y falta de mantenimiento repercuten en los resultados emitido por el equipo.

## 8. REFERENCIAS

1. UNIMED. *Normas de Buenas Prácticas de Manufactura: medicamentos seguros, eficaces y de calidad*. Bolivia : s.n., 1997.
2. *Validation of Analytical Methods*. Taylor, J. K. 6, Washington : American Chemical Society, 1983, Vol. 55.
3. *Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos*. México : Diario Oficial de la Federación, 22 de julio de 2013.
4. Reglamento de Validación de Métodos Analíticos Requeridos para el Registro Sanitario de Medicamentos ante el Ministerio de Salud. [En línea] Costa Rica, 2001. [Citado el: 15 de Abril de 2013.]  
[http://www.pgr.go.cr/scij/scripts/TextoCompleto.dll?Texto&nNorma=47566&nVersion=50471&nTamanoLetra=10&strWebNormativa=http://www.pgr.go.cr/scij/&strODBC=DSN=SCIJ\\_NRM;UID=sa;PWD=scij;DATABASE=SCIJ\\_NRM;&strServidor=\\pgr04&strUnidad=D:&strJavaScript=NO](http://www.pgr.go.cr/scij/scripts/TextoCompleto.dll?Texto&nNorma=47566&nVersion=50471&nTamanoLetra=10&strWebNormativa=http://www.pgr.go.cr/scij/&strODBC=DSN=SCIJ_NRM;UID=sa;PWD=scij;DATABASE=SCIJ_NRM;&strServidor=\\pgr04&strUnidad=D:&strJavaScript=NO).
5. USP. Validación de Metodos farmacopeicos. *USP 30 - NF 25*. EUA : U.S. Pharmacopeia. The Standar of Quality., 2007.
6. Food and Drug Administration. *Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation*. s.l. : FDA, 2000.
7. FEUM. Anexo: Validación de Métodos Analíticos. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. México : s.n., 2008.
8. EURACHEM. *Métodos Analíticos Adecuados a su Propósito: Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados*. Querétaro, México : Centro Nacional de Metrología, 2005.
9. Duffau, B., et al. *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medicion: "Aspectos generales sobre la validacion de métodos"*. Santiago : Instituto de Salud Pública Chile, 2010.
10. *Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance*. Taverniers, I., De Loose, M. y Van Bockstaele, E. 8, Bélgica : Trends in Analytical Chemistry, 2004, Vol. 23.
11. *Validation of Analytical Procedures: a comparision of ICH vs Pharmacopeia (USP) vs FDA*. Sharma, A. y Sharma, R. 6, s.l. : International Research Journal of Pharmacy, 2012, Vol. 3.

12. ISO. *ISO 8420. Aseguramiento y control de calidad*. 1994.
13. Quatrocchi, O., Abelaira, S. y Laba, R. *Introducción a la CLAR: Aplicación y Práctica*. Buenos Aires : Artes gráficas Farro, 1992.
14. EP. *Chromatographic separation techniques. European Pharmacopeia 5.0*. 2005.
15. Wells, Margaret y Dantus , Mauricio. *Validation of Chromatographic Methods*. [aut. libro] Jack Cazes. *Analytical Instrumentation Handbook*. New York : Marcel Dekker, 2005, pág. 1033.
16. Miller, Jonh H. McB.; Ermer, Joachim;. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis*. Weinheim : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005.
17. Junker, Beth. *Process Validation for Biopharmaceuticals*. [aut. libro] Shayne Cox Gad. *Handbook of Pharmaceutical Biotechnology*. USA : John Wiley & Sons. Inc., 2007.
18. ISO. *ISO 3534-1 Statistics - Vocabulary and symbols. Part 1: Probability and general statistical terms*. ISO, Ginebra, 1993. Ginebra : ISO, 1993.
19. Valcárcel, M. y Gómez, A. *Técnicas analíticas de separación*. Barcelona : Reverte, 1988.
20. Kazakevich, Y. y Lobrutto, R. *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. USA : John Wiley and Sons, 2007.
21. ICH. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. s.l. : ICH, 2005.

## 8. ANEXOS

### 8.1. Datos y cromatogramas

#### Rango

	Nombre de la muestra	Nombre	Vial	Inj	T	Área	Altura (µV)	K'	COLEO	NPT
1	40% C1	Fármaco A	3	1	2.91	229316	37584	0.77	1.12	5145
2	60% C1	Fármaco A	4	1	2.91	344136	56299	0.78	1.11	5135
3	80% C1	Fármaco A	5	1	2.91	464863	75578	0.78	1.12	5096
4	100% C1	Fármaco A	6	1	2.91	583470	94395	0.77	1.13	5043
5	120% C1	Fármaco A	7	1	2.91	701389	113265	0.78	1.12	5033
6	140% C1	Fármaco A	8	1	2.91	813154	130988	0.77	1.13	5012
7	40% C2	Fármaco A	9	1	2.91	229715	37725	0.78	1.11	5158
8	60% C2	Fármaco A	10	1	2.91	348857	56766	0.78	1.12	5104
9	80% C2	Fármaco A	11	1	2.91	464941	75402	0.78	1.12	5065
10	100% C2	Fármaco A	12	1	2.93	576896	92882	0.79	1.13	5064
11	120% C2	Fármaco A	13	1	2.94	701095	111986	0.79	1.13	4987
12	140% C2	Fármaco A	14	1	2.94	815927	129909	0.79	1.13	4968
Mean					2.918	522813.171			1.122	
Std. Dev.					0.010	209204.600			0.005	
% SD					0.3	40.0			0.5	

#### Linealidad del sistema

	Nombre de la muestra	Nombre	Vial	Inj	TR	Área	COLEO	NPT	K Prime	Altura (µV)
1	70 C1	Fármaco A	3	1	3.057	407999	1.31	1719	0.86	35347
2	80 C1	Fármaco A	4	1	3.056	467704	1.3	1740	0.86	40758
3	90 C1	Fármaco A	5	1	3.054	513496	1.31	1740	0.86	44696
4	100 C1	Fármaco A	6	1	3.054	580122	1.32	1785	0.86	51038
5	110 C1	Fármaco A	7	1	3.051	633428	1.32	1808	0.86	55922
6	120 C1	Fármaco A	8	1	3.05	699631	1.33	1780	0.86	61540
7	70 C2	Fármaco A	9	1	3.049	397760	1.31	1826	0.86	35404
8	80 C2	Fármaco A	10	1	3.049	460522	1.31	1822	0.86	41041
9	90 C2	Fármaco A	11	1	3.048	515932	1.33	1792	0.86	45438
10	100 C2	Fármaco A	12	1	3.047	579783	1.32	1788	0.86	51405
11	110 C2	Fármaco A	13	1	3.045	633295	1.32	1788	0.86	56048
12	120 C2	Fármaco A	14	1	3.044	679821	1.32	1807	0.86	60394
13	70 C3	Fármaco A	15	1	3.009	405527	1.34	1287	0.83	29844

	Nombre de la muestra	Nombre	Vial	Inj.	TR	Área	COLEO	NPT	K Prime	Altura (µV)
14	80 C3	Fármaco A	16	1	3.026	463336	1.3	1873	0.85	41953
15	90 C3	Fármaco A	17	1	3.018	521451	1.32	1874	0.84	47280
16	100 C3	Fármaco A	18	1	3.016	576039	1.34	1843	0.84	51604
17	110 C3	Fármaco A	19	1	3.016	631486	1.34	1848	0.84	56736
18	120 C3	Fármaco A	20	1	3.015	682060	1.35	1805	0.84	60627
Mean					3.039		1.322			
Std. Dev.					0.017		0.014			
% RSD					0.6		1.1			

### Linealidad del método

	Nombre de la muestra	Nombre	Vial	Inj.	TR	Área	Recobro	Unidad	COLEO	NPT	K'	Altura (µV)
1	70 C1	Fármaco A	5	1	2.903	408008	69.919	%	0.91	3415	0.77	49979
2	70 C2	Fármaco A	6	1	2.904	401071	68.75	%	0.9	3426	0.77	49078
3	70 C3	Fármaco A	7	1	2.905	403345	69.14	%	0.9	3415	0.77	49420
4	80 C1	Fármaco A	8	1	2.903	459681	78.746	%	0.91	3418	0.77	56341
5	80 C2	Fármaco A	9	1	2.906	465616	79.763	%	0.91	3424	0.77	57033
6	80 C3	Fármaco A	10	1	2.907	464692	79.625	%	0.91	3432	0.77	56820
7	90 C1	Fármaco A	11	1	2.907	516532	88.52	%	0.9	3417	0.77	63206
8	90 C2	Fármaco A	12	1	2.906	527928	90.442	%	0.91	3408	0.77	64619
9	90 C3	Fármaco A	13	1	2.905	521962	89.45	%	0.91	3427	0.77	63877
10	100 C1	Fármaco A	14	1	2.905	582155	99.757	%	0.91	3425	0.77	71193
11	100 C2	Fármaco A	15	1	2.906	574722	98.503	%	0.91	3421	0.77	70145
12	100 C3	Fármaco A	16	1	2.906	581351	99.629	%	0.91	3429	0.77	71092
13	110 C1	Fármaco A	17	1	2.91	638272	109.365	%	0.91	3432	0.77	77820
14	110 C2	Fármaco A	18	1	2.911	636529	109.056	%	0.9	3427	0.78	77470
15	110 C3	Fármaco A	19	1	2.91	645915	110.705	%	0.9	3432	0.77	78939
16	120 C1	Fármaco A	20	1	2.912	698545	119.715	%	0.91	3433	0.78	85206
17	120 C2	Fármaco A	21	1	2.913	697023	119.424	%	0.9	3413	0.78	85169
18	120 C3	Fármaco A	22	1	2.908	707284	121.172	%	0.91	3417	0.77	86472
Mean					2.907				0.91			
Std. Dev.					0.003				0.00			
% RSD					0.103				0.54			

**Exactitud, Error Aleatorio**

	Nombre de la muestra	Nombre	Vial	Inj	TR	Recobro	Unidad	COLEO	Área	NPT	K'	Altura (µV)
1	Muestra 1	Fármaco A	5	1	2.890	100.77	%	1.15	618765	4577.24	0.76	96022
2	Muestra 2	Fármaco A	6	1	2.885	98.29	%	1.16	603726	4606.17	0.76	94335
3	Muestra 3	Fármaco A	7	1	2.880	99.39	%	1.15	610529	4737.71	0.76	95475
4	Muestra 4	Fármaco A	8	1	2.879	100.01	%	1.14	614404	4681.15	0.76	95754
5	Muestra 5	Fármaco A	9	1	2.878	99.96	%	1.14	614010	4731.00	0.76	96089
6	Muestra 6	Fármaco A	10	1	2.879	101.10	%	1.14	620928	4688.07	0.76	96893
7	Muestra 7	Fármaco A	11	1	2.879	100.05	%	1.14	614526	4699.59	0.76	95944
8	Muestra 8	Fármaco A	12	1	2.885	100.23	%	1.16	615537	4618.85	0.76	96263
9	Muestra 9	Fármaco A	13	1	2.895	99.93	%	1.14	613712	4739.61	0.77	95680
	Mean				2.883	100.0		1.15	614015.2			
	Std. Dev.				0.006	0.8		0.01	4888.67			
	% RSD				0.2	0.8		0.6	0.8			

Concentración experimental del Fármaco (µg/mL)	Concentración adicionada del Fármaco(µg/mL)	% E del Fármaco	% Error relativo
30.12	29.99	100.42	0.42
29.39	30.00	97.95	-2.05
29.72	30.01	99.05	-0.95
29.91	30.01	99.67	-0.33
29.89	30.00	99.62	-0.38
30.23	30.00	100.75	0.75
29.91	30.00	99.71	-0.29
29.96	30.00	99.89	-0.11
29.88	30.00	99.58	-0.42
	<b>Promedio</b>	99.63	
	<b>Desviación Estándar</b>	0.80	
	<b>C.V (%)</b>	0.80	

**Exactitud, Error Sistemático**

	Nombre de la muestra	Nombre	Vial	Inj	TR	Recobro	Unidad	COLEO	Área	NPT	K'	Altura (µV)
1	80 C1	Fármaco A	29	1	2.92	80.0	%	0.95	471798	3336	0.78	56638
2	80 C2	Fármaco A	30	1	2.88	80.2	%	0.99	473097	3315	0.76	57440
3	80 C3	Fármaco A	31	1	2.91	79.9	%	0.96	471259	3308	0.78	56571
4	100 C1	Fármaco A	32	1	2.91	100.5	%	0.96	592744	3299	0.78	71163
5	100 C2	Fármaco A	33	1	2.91	101.7	%	0.96	599326	3288	0.77	71949
6	100 C3	Fármaco A	34	1	2.91	101.0	%	0.96	595255	3340	0.77	71478
7	120 C1	Fármaco A	35	1	2.91	119.1	%	0.96	702462	3334	0.77	84309
8	120 C2	Fármaco A	36	1	2.91	120.6	%	0.96	711461	3356	0.77	85263
9	120 C3	Fármaco A	37	1	2.91	119.4	%	0.96	704230	3354	0.77	84340
	Mean				2.907			0.962				
	Std. Dev.				0.010			0.011				
	% RSD				0.4			1.1				

	Concentración experimental del Fármaco (µg/mL)	Concentración adicionada del Fármaco (µg/mL)	% E del Fármaco	% Error relativo
<b>C1</b>	24.01	24.01	99.98	-0.02
	24.07	24.01	100.26	0.26
	23.98	24.01	99.90	-0.10
<b>C2</b>	30.16	30.01	100.52	0.52
	30.50	30.00	101.66	1.66
	30.29	30.00	100.96	0.96
<b>C3</b>	35.75	36.00	99.29	-0.71
	36.20	36.01	100.53	0.53
	35.84	36.02	99.50	-0.50
		<b>Promedio</b>	100.29	
		<b>Desviación Estándar</b>	0.73	
		<b>C.V (%)</b>	0.73	

### Repetibilidad

	Nombre de la muestra	Nombre	Vial	Inj	RT	Recobro	Unidad	COLEO	Área	NPT	K'	Altura (µV)
1	Muestra 1	Fármaco A	5	1	2.945	94.87	%	1.14	549227	5170.63	0.47	88156
2	Muestra 2	Fármaco A	6	1	2.939	95.92	%	1.15	555303	5162.04	0.47	89249
3	Muestra 3	Fármaco A	7	1	2.936	98.39	%	1.14	569657	5120.87	0.47	91322
4	Muestra 4	Fármaco A	8	1	2.948	95.61	%	1.14	553530	5197.61	0.47	89026
5	Muestra 5	Fármaco A	9	1	2.944	96.46	%	1.14	558464	5140.46	0.47	89636
6	Muestra 6	Fármaco A	10	1	2.950	96.60	%	1.14	559252	5179.80	0.48	89678
	Mean				2.944	96.3		1.14	557572.2			
	Std. Dev.				0.005	1.2		0.00	6939.55			
	% RSD				0.2	1.2		0.2	1.2			

### Precisión Intermedia

#### Día 1 Analista 1

	Nombre de la muestra	Nombre	Vial	Inj	TR	Recobro	Unidad	COLEO	Área	NPT	K'	Altura (µV)
1	D1A1 Muestra1	Fármaco A	5	1	2.91	93	%	1.17	555516	4942.18	0.78	87509
2	D1A1 Muestra2	Fármaco A	6	1	2.92	95	%	1.16	564088	4878.26	0.78	88400
3	D1A1 Muestra3	Fármaco A	7	1	2.92	94	%	1.16	559350	4943.92	0.78	87734
4	D1A1 Muestra4	Fármaco A	8	1	2.93	95	%	1.16	567022	4876.79	0.78	88625
5	D1A1 Muestra5	Fármaco A	9	1	2.93	95	%	1.16	566047	4905.09	0.79	88336
6	D1A1 Muestra6	Fármaco A	10	1	2.93	97	%	1.16	577380	4891.49	0.79	90052
	Mean				2.92	95		1.16	564900.60			
	Std. Dev.				0.01	1		0.00	7497.64			
	% RSD				0.30	1		0.20	1.30			

#### Día 1 Analista 2

	Nombre de la muestra	Nombre	Vial	Inj	TR	Recobro	Unidad	COLEO	Área	NPT	K'	Altura (µV)
1	D1A2 Muestra1	Fármaco A	5	1	2.90	95	%	1.13	601698	5363.92	0.77	98681
2	D1A2 Muestra2	Fármaco A	6	1	2.90	96	%	1.13	605959	5232.13	0.77	98821
3	D1A2 Muestra3	Fármaco A	7	1	2.89	96	%	1.14	611428	5188.79	0.76	99244
4	D1A2 Muestra4	Fármaco A	8	1	2.89	94	%	1.14	598457	5165.30	0.76	96948
5	D1A2 Muestra5	Fármaco A	9	1	2.89	96	%	1.15	610843	5171.20	0.76	99426
6	D1A2 Muestra6	Fármaco A	10	1	2.89	96	%	1.15	606913	5203.68	0.76	99183
	Mean				2.89	96		1.14	605882.97		0.76	
	Std. Dev.				0.00	1		0.01	5080.73		0.00	
	% RSD				0.10	1		0.80	0.80		0.30	



### Día 2 Analista 1

	Nombre de la muestra	Nombre	Vial	Inj	TR	Recobro	Unidad	COLEO	Área	NPT	K'	Altura (µV)
1	D2A1 Muestra1	Fármaco A	5	1	2.95	93	%	1.16	562500	5071.63	0.80	88558
2	D2A1 Muestra2	Fármaco A	6	1	2.94	92	%	1.16	552267	5002.25	0.79	86927
3	D2A1 Muestra3	Fármaco A	7	1	2.94	94	%	1.16	568678	4990.68	0.79	89455
4	D2A1 Muestra4	Fármaco A	8	1	2.94	93	%	1.15	562940	5031.43	0.79	88865
5	D2A1 Muestra5	Fármaco A	9	1	2.93	92	%	1.16	552614	5021.75	0.79	87387
6	D2A1 Muestra6	Fármaco A	10	1	2.93	94	%	1.15	569187	5000.12	0.79	89804
Mean					2.94	93		1.16	561364.20			
Std. Dev.					0.01	1		0.00	7453.73			
% RSD					0.20	1		0.20	1.30			

### Día 2 Analista 2

	Nombre de la muestra	Nombre	Vial	Inj	TR	Recobro	Unidad	COLEO	Área	NPT	K'	Altura (µV)
1	D2A2 Muestra1	Fármaco A	5	1	2.91	97	%	1.14	625692	5278.32	0.78	101417
2	D2A2 Muestra2	Fármaco A	6	1	2.92	97	%	1.15	620277	5357.71	0.78	100880
3	D2A2 Muestra3	Fármaco A	7	1	2.91	98	%	1.14	628290	5271.40	0.77	101511
4	D2A2 Muestra4	Fármaco A	8	1	2.90	96	%	1.15	616470	5303.89	0.77	100567
5	D2A2 Muestra5	Fármaco A	9	1	2.90	96	%	1.14	619291	5331.47	0.77	100960
6	D2A2 Muestra6	Fármaco A	10	1	2.91	96	%	1.14	614957	5281.70	0.78	99636
Mean					2.91	97		1.14	620829.57		0.77	
Std. Dev.					0.01	1		0.00	5205.06		0.00	
% RSD					0.20	1		0.40	0.80		0.50	

### Robustez, Diferentes Equipos

#### Equipo 1

	Nombre de la muestra	Nombre	Vial	Inj	TR	Recobro	Unidad	COLEO	Área	NPT	K'	Altura (µV)
1	Eq 1 Muestra 1	Fármaco A	15	1	2.922	97.09	%	1.16	586355	5019.8	0.8	92980
2	Eq 1 Muestra 2	Fármaco A	16	1	2.922	96.88	%	1.16	585036	5062.8	0.8	93006
3	Eq 1 Muestra 3	Fármaco A	17	1	2.921	96.99	%	1.17	585681	5027.9	0.8	93082
Mean					2.922	97		1.17	585691			
Std. Dev.					0.001	0.1		0	659.65			
% RSD					0	0.1		0.3	0.1			

### Equipo 2

	Nombre de la muestra	Nombre	Vial	Inj	TR	Recobro	Unidad	COLEO	Área	NPT	K'	Altura (µV)
1	Eq 2 Muestra 1	Fármaco A	5	1	2.851	96.882	%	1.15	617329	5250.1	0.7	101625
2	Eq 2 Muestra 2	Fármaco A	6	1	2.851	96.42	%	1.14	614384	5248.1	0.7	101154
3	Eq 2 Muestra 3	Fármaco A	7	1	2.848	97.032	%	1.14	618284	5267.2	0.7	102229
Mean					2.85	96.8		1.141	616666		0.7	
Std. Dev.					0.002	0.3		0.005	2032.68		0	
% RSD					0.1	0.3		0.4	0.3		0.1	

### Robustez, Mezcla

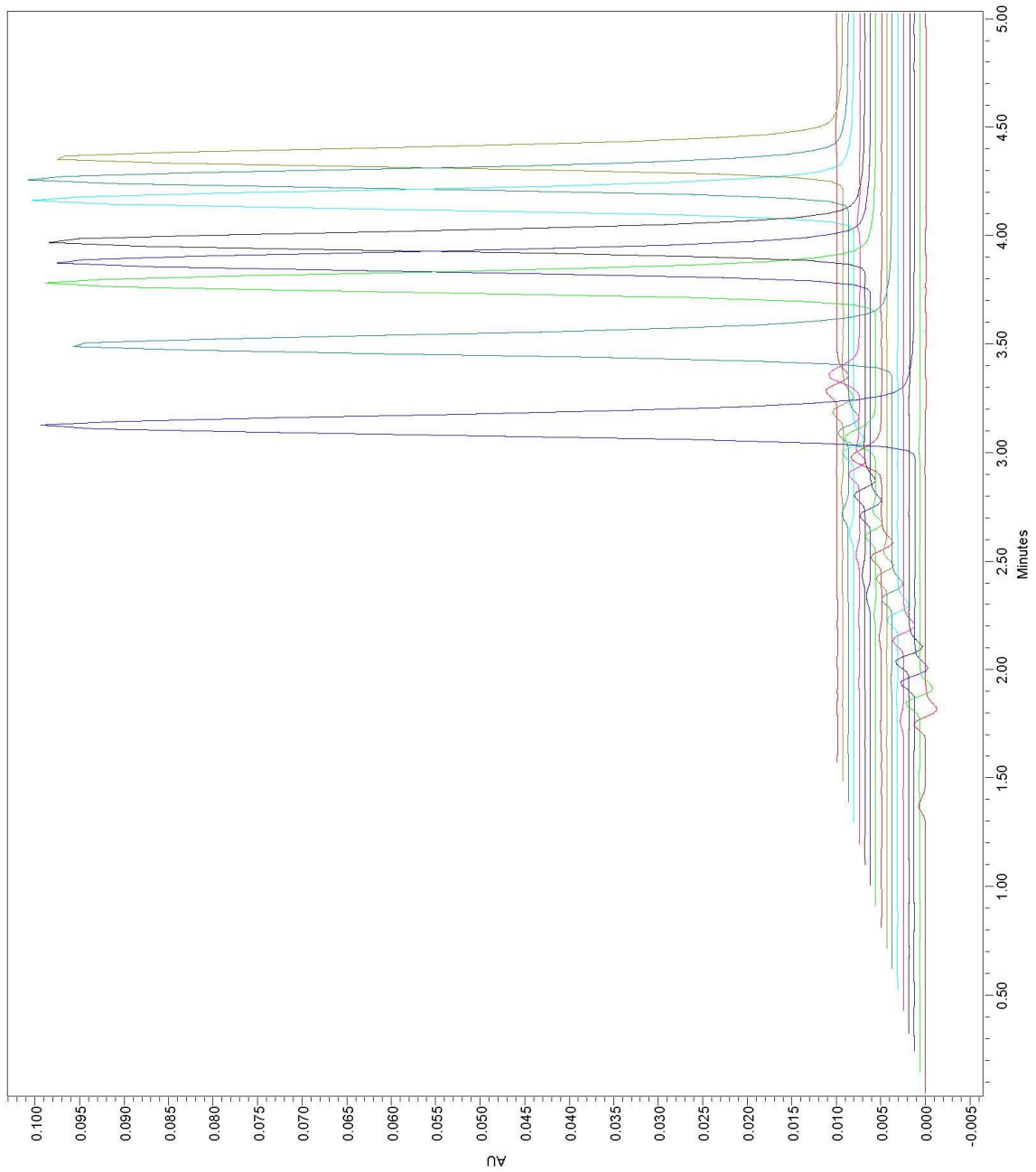
#### Mezcla Automatizada

	Nombre de la muestra	Nombre	Vial	Inj	TR	Recobro	Unidad	COLEO	Área	NPT	K'	Altura (µV)
1	MA Muestra 1	Fármaco A	22	1	2.887	96.58	%	1.14	573152	4806.88	0.76	89873
2	MA Muestra 2	Fármaco A	23	1	2.883	96.78	%	1.13	574392	4781.46	0.76	89999
3	MA Muestra 3	Fármaco A	24	1	2.882	97.45	%	1.13	578381	4766.29	0.76	90608
Mean					2.884	96.9		1.13	575308.3			
Std. Dev.					0.002	0.5		0.00	2732.17			
% RSD					0.1	0.5		0.2	0.5			

#### Mezcla Manual

	Nombre de la muestra	Nombre	Vial	Inj	TR	Recobro	Unidad	COLEO	Área	NPT	K'	Altura (µV)
1	MM Muestra 1	Fármaco A	15	1	2.975	97.28	%	1.14	576576	4672.51	0.81	87412
2	MM Muestra 2	Fármaco A	16	1	2.975	96.50	%	1.14	572025	4695.28	0.81	87491
3	MM Muestra 3	Fármaco A	17	1	2.980	97.50	%	1.14	577927	4686.42	0.82	87520
Mean					2.977	97.1		1.14	575509.5			
Std. Dev.					0.003	0.5		0.00	3092.69			
% RSD					0.1	0.5		0.4	0.5			

Cromatogramas de la prueba de especificidad



## 8.2. Recomendaciones en el uso de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

### 8.2.1. Mantenimiento de los componentes.

Típica del sistema de CLAR consiste en los siguientes componentes principales:

Recipientes de disolvente. Se deben lavar de forma continua en especial los reservorios de agua y el de fase móvil cuando es de naturaleza acuosa, ya que propicia un crecimiento bacteriano, y por otra parte se lavan los filtros de cada reservorio con agua caliente durante 15 minutos, se ultrasonican con ácido durante 5 minutos y finalmente con agua durante 5 minutos.

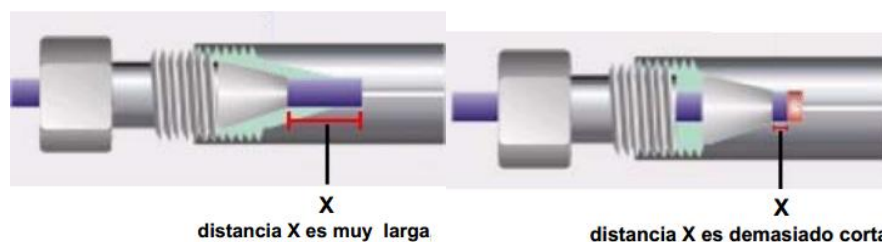
Es importante filtrar los solventes de los reservorios diariamente y cambiar el agua diariamente.

Bomba.

Inyector. Se lava la aguja de forma adicional a la que se realiza durante la corrida y se purga cada día antes de comenzar la corrida.

Columna. Se debe lavar con agua a un flujo que no ejerza una presión mayor a la que soporta la columna con una mezcla compuesta de agua con el solvente orgánico con el que se trabajó a la misma proporción de la fase móvil (en caso de uso de buffer) y finalmente, a flujo de 1 mL/min con la solución en la que se encontraba almacenada, que por lo general es 65:35, agua: acetonitrilo, en caso de no trabajar con la columna durante un periodo prolongado. Cada uno de estos lavados se realiza durante 25 minutos.

Es importante realizar correctamente la conexión de la columna, debido a que se puede llegar a presentar presiones bajas o una caída paulatina de la presión por alguna posible fuga. También se puede llegar a presentar alteraciones en el resultado, ya sea áreas pequeñas hasta un pico partido.



Una vez que la columna ha llegado al final de su vida útil es posible utilizar un corto periodo después realizando un lavado de los filtros de la columna, esto se muestra el segmento "Lavado de Filtros de la Columna", presentado adelante en el presente anexo.

Detector. Uno de los problemas comunes que se presenta al emplear buffers de sales es la precipitación de estas sales en la celda que provoca una presión superior a la que soporta el equipo. Este problema se soluciona realizando un lavado de la celda con agua, cambiando el flujo al orificio de salida de la celda y aumentando el flujo paulatinamente hasta 5 mL/min, esto se realiza hasta que se observa un flujo constante en el orificio de entrada de la celda.

### 8.2.2. Lavado de Filtros de la Columna

Una vez que la columna ha llegado al número de inyecciones capaz de realizar, se puede extender su vida realizando un lavado de los filtros, como se menciona a continuación:

1. Abrir cuidadosamente la turca que sostiene el filtro de forma horizontal.
2. Se saca el filtro de la tuerca, debido a que generalmente se queda adherido, en caso de que no se encuentre de esta manera se quita con cuidado de la columna tratando de no tocar el empaque de la columna.
3. Se limpia con el dedo las orillas de la columna siendo aún más cuidadoso de no alterar el material de empaque.
4. Se lavan los filtros junto con la tuerca con ácido acético al 10% durante 5 minutos ultrasonicándolos.
5. Se repite el paso de ser necesario, es decir, si se observa turbia la solución de lavado.
6. Una vez concluido en paso anterior, se colocan ahora en Acetonitrilo a ultrasonicar por 5 minutos, en caso de tornarse turbia la solución, repetir hasta obtener una solución transparente.
7. Finalmente se colocan los filtros y las tuercas en un vaso con agua a ultrasonicar por 5 minutos hasta que se deje de percibir el olor a Acetonitrilo.

### 8.2.3. Lavado del equipo

También se debe realizar un lavado semanal del equipo que consiste en:

1. Filtrar todos los solventes (Acetonitrilo y Metanol) y el agua (que sea nueva, preferentemente)
2. Quitar los filtros de las tuberías de los reservorios
3. Lavarlos en agua a punto de ebullición por 5 minutos
4. Este lavado se repite hasta que el agua de lavado no se encuentre turbia
5. Una vez limpios los filtros, colocarlos en su correspondiente tubería
6. Quitar la columna en caso de estar conectada y colocar una unión de volumen muerto.
7. Colocar todos los reservorios en agua (tibia, de preferencia para disolver mejor los restos de las sales de los fosfatos, en caso de uso de buffer) y poner a flujo de 2mL/min y una proporción 25:25:25:25 todos los reservorios durante 10 minutos.
8. Colocar en su lugar cada tubería y poner al 100% agua a flujo de 4mL/min (de forma paulatina desde 1 hasta llegar a 4mL/min) durante 10 – 15 minutos.
9. Una vez transcurrido el tiempo cambiar a 100% Metanol y poner a un flujo de 4 mL/min paulatinamente durante 15 – 20 minutos.
10. Regresar 100% de agua y a flujo de 4mL/min durante 10 minutos.
11. Purgar con la fase móvil antes de comenzar una prueba.

En caso de que el equipo no haya sido lavado durante un largo tiempo se recomienda lavar el equipo con ácido nítrico al 5% durante 30-60 minutos, seguido de esto se lava con agua al 100% durante un tiempo necesario hasta el agua de la tubería de residuos llegue al pH inicial del agua.