



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ASPECTOS COMPARATIVOS DE LA REVALIDACIÓN DE
MÉTODO EN EL CAMBIO DE COLUMNAS ANALÍTICAS
UTILIZADAS EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA
RESOLUCIÓN (HPLC).**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

BELEN GUADALUPE DÍAZ CAMPOS



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Prof. Inés Fuentes Noriega
Vocal	Prof. Lauro Misael del Rivero Ramírez
Secretario	Prof. Juan Manuel Rodríguez
1er Suplente	Prof. María de Lourdes Mayet Cruz
2do Suplente	Prof. Blanca Estela Rivero Cruz

Sitio en donde se desarrolló el tema:

LABORATORIO DE BIOFARMACIA, DEPARTAMENTO DE FARMACIA,
CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA.

Asesor del tema

M. en C. Juan Manuel Rodríguez

Supervisor técnico

M. en C. Kenneth Rubio Carrasco

Sustentante

Belén Guadalupe Díaz Campos





Capítulo		Página
I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	GENERALIDADES	4
2.1	Aspectos generales del clorhidrato de bencidamina	5
2.1.1	Propiedades	5
2.1.2	Actividad terapéutica	8
2.1.3	Métodos analíticos para cuantificación	9
2.2	Aspectos generales de cromatografía	10
2.2.1	Cromatografía de líquidos de alta resolución	10
2.2.2	Instrumentación o equipo	12
2.2.3	Parámetros cromatográficos	16
2.3	Mejora continua	21
2.3.1	Columnas	21
2.3.2	Revalidación	25
III.	OBJETIVOS	29
IV.	METODOLOGIA	31
4.1	Parte experimental	32
4.1.1	Instrumentos y equipos	32
4.1.2	Reactivos	32
4.1.3	Sustancias de referencia	33
4.1.4	Placebo y medicamento	33
4.2	Método analítico para cuantificación de Clorhidrato de Bencidamina	33
4.2.1	Preparación de soluciones	34
4.3	Protocolo de revalidación	38
4.3.1	Condiciones del método analítico original	38
4.3.2	Condiciones del método analítico para revalidación	39
4.4	Metodologías analítica de revalidación	39
4.4.1	Adecuabilidad del sistema	39
4.4.2	Selectividad	40
4.4.3	Linealidad del sistema	41
4.4.4	Linealidad del método	42
4.4.5	Exactitud del método	42
4.4.6	Precisión del método	42
4.4.6.1	Repetibilidad	42
4.4.6.2	Precisión intermedia	43
4.4.7	Tolerancia	44
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
5.1	Ajustes del método inicial	46





5.2	Revalidación del método	47
5.3	Selectividad	47
5.4	Linealidad del sistema	49
5.5	Linealidad del método	50
5.6	Exactitud	52
5.7	Precisión	53
5.7.1	Repetibilidad	53
5.7.2	Precisión intermedia	54
5.8	Tolerancia	55
5.9	Aspectos comparativos de la revalidación	56
5.9.1	Comparativo de desempeño entre columnas	56
5.9.1.1	Desempeño de parámetro cromatográficos	57
5.9.1.2	Parámetros de revalidación	57
5.9.2	Mejora continua	58
5.9.2.1	Impacto al método analítico.	58
5.9.2.2	Impacto al análisis de muestras	60
VI.	CONCLUSIONES	62
VII.	APÉNDICE	64
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	72





Tabla		Página
1.	Cambios en el método y parámetros a revalidar	27
2.	Preparación de la curva patrón conteniendo Bencidamina	37
3.	Preparación de soluciones de Placebo Cargado	38
4.	Linealidad del sistema para Clorhidrato de Bencidamina	49
5.	Linealidad del método por HPLC para cuantificar clorhidrato de bencidamina en Crema	51
6.	Exactitud para clorhidrato de bencidamina	52
7.	Repetibilidad de clorhidrato de bencidamina en crema	53
8.	Precisión intermedia para clorhidrato de bencidamina en crema	54
9.	Recobros obtenidos al cambiar la polaridad de la fase móvil.	55
10	Parámetros cromatográficos obtenidos al variar la polaridad de la fase móvil	56
11.	Comparativo de los parámetros cromatográficos de ambas columnas utilizadas en el método analítico para cuantificar bencidamina.	57
12.	Comparativo de los parámetros de revalidación obtenidos con cada columna	58
13.	Comparación de columnas analíticas empleadas en la determinación de Bencidamina	59
14.	Aspectos comparativos referentes al método analítico al cambiar de columna	59
15.	Aspectos comparativos referentes al análisis de muestras método.	61





Figura		Página
1.	Estructura química del Clorhidrato de Bencidamina	5
2.	Espectro UV de absorción del Clorhidrato de Bencidamina	6
3.	Estructura de las impurezas del Clorhidrato de Bencidamina.	7
4.	Estructura de los productos de degradación del Clorhidrato de Bencidamina	8
5.	Esquema de la separación cromatográfica en CLAR	11
6.	Esquema de un instrumento de CLAR	13
7.	Esquema de un cromatograma	14
8.	Parámetros cromatográficos	19
9.	Esquema del empaque y tipo de partícula en una columna	22
10.	Diferentes posibilidades de columnas	23
11.	Esquema del procedimiento de la prueba de selectividad	41
12.	Esquema del procedimiento para llevar a cabo repetibilidad.	43
13.	Esquema de la prueba de tolerancia	44
14.	Cromatograma del estándar de bencidamina empleando columna Purospher Rpe	46
15.	Cromatograma del estándar de bencidamina empleando columna Zorbax eclipse XDB	46
16.	Cromatograma del blanco (etanol: agua)	47
17.	Cromatograma de la fase móvil	47
18.	Cromatograma de la mezcla de impurezas.	48
19.	Cromatograma de la mezcla de impurezas y bencidamina	48
20.	Cromatograma de muestra placebo	48
21.	Cromatograma de muestra de producto	49
22.	Gráfica obtenida para linealidad del sistema de clorhidrato de bencidamina	50
23.	Gráfica obtenida para linealidad del método para clorhidrato de bencidamina	51
24.	Cromatograma de la fase móvil	65
25.	Cromatograma del blanco	65
26.	Cromatograma de solución estándar de la mezcla de impurezas (sin ampliación)	66
27.	Cromatograma de la solución mezcla de impurezas y estándar de clorhidrato de bencidamina (sin ampliación)	66



Figura		Pagina
28.	Cromatograma de la solución estándar de la impureza AF 1346.	67
29.	Cromatograma de la solución estándar de la impureza AF 1316	67
30.	Cromatograma de la solución estándar de la impureza AF 956	68
31.	Cromatograma de la solución estándar de la impureza AF 2973	68
32.	Cromatograma de la solución estándar de la impureza AF 1088	69
33.	Cromatograma de la solución estándar de la impureza AF 1246	69
34.	Fase móvil normal acetonitrilo: Solución de lauril sulfato de sodio (55:45)	70
35.	Fase móvil acetonitrilo: Solución de lauril sulfato de sodio +5% ACN (57.75:45)	70
36.	Fase móvil acetonitrilo: Solución de lauril sulfato de sodio + 5% LLS (55:47.25)	70
37.	Solución estándar de clorhidrato de bencidamina al 100% obtenido con la columna zorbax eclipse XDB	71
36.	Solución estándar de clorhidrato de bencidamina al 100% obtenido con la columna purospher	71





Abreviatura	Significado
UV	Ultravioleta
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
%	Por ciento
cm	Centímetros
NSAID	Droga antiinflamatoria no esteroidea
g/mol	Gramo sobre mol
° C	Grado centígrado
pka	Fuerza que tienen las moléculas de disociarse
nm	Nanometros
E ^{1%} , 1cm	Absortividad molar concentraciones expresadas en moles por litro
g	Gramos
mg	Miligramos
µg	Microgramos
mL	Mililitros
FNT	Factor necrosante de tumores
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
M	Molaridad
p/v	Peso/volumen
m	Metros
mm	Milimetros
OV-17	Methyl 50% Phenyl Polysiloxane
CG	Cromatografía de gases
CL	Cromatografía de líquidos
Etc.	Etcétera
C8	Cadena de 8 carbonos
C18	Cadena de 18 carbonos
pH	Potencial hidrogeno
IUPAC	Unión internacional de química pura y aplicada
Etc.	Etcétera
Vr	Volumen de retención
Tr	Tiempo de retención
Fc	Flujo volumétrico
V ₀	Volumen muerto
T ₀	Tiempo muerto
T' _r	Tiempo de retención ajustado
Wb	Ancho a la base
W _{1/2}	Ancho del pico a la mitad de la altura
K	Factor de capacidad



A	Factor de selectividad
R	Resolución
H	Eficiencia o altura del plato teórico
N	Numero de platos teóricos
L	Longitud de la columna
W	Ancho del pico medido desde la línea base
T	Tailing o factor de coleo
μm	Micrómetros
cm	Centímetros
d_p	Diámetro de las partículas
U_x	Velocidad lineal de flujo
A	Camino múltiple
C	Tiempo finito de difusión ecuación de Van Deemter
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
ACN	Acetonitrilo
LLS	Lauril sulfato de sodio
μ	Micras
CV	Coefficiente de variación
R_s	Resolución
T	Factor de coleo
Fig.	Figura
M	Pendiente
B	Ordenada al origen
R	Coefficiente de correlación
R^2	Coefficiente de determinación
L	Litros





I INTRODUCCION



INTRODUCCIÓN

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés), permite muy buenas separaciones e identificaciones de sustancias o grupos de sustancias en un tiempo corto, tanto cualitativa como cuantitativamente, es una herramienta sumamente útil para el análisis cuantitativo de fármacos y es ampliamente utilizada en métodos analíticos en la industria.

Es de gran importancia contar con métodos analíticos validados ya que con esto se asegura que los resultados analíticos que se obtienen al analizar el producto farmacéutico son confiables. La validación de métodos analíticos es el proceso por el que se demuestra, a través de estudios de laboratorio documentados que el método cumple con la aplicación analítica deseada.

Día con día se está a la búsqueda de nuevas alternativas que mejoren los análisis de muestras; actualmente el uso de la tecnología en las columnas para HPLC permite que estas ofrezcan una gran variedad de posibilidades, en cuanto a tamaño de partícula, longitud, tipo de sílica y fase ligada, repercutiendo en el método analítico, tanto en el costo como en el tiempo.

La mejora continua de métodos analíticos y la disminución en el costo de los mismos hace que hoy en día mas fabricantes de columnas en cromatografía de líquidos, saquen al mercado columnas mas cortas con una longitud de 10 centímetro (cm) o menos, tales columnas promueven el análisis de muestras mas rápido, utilizan muestras mas pequeñas y un menor consumo de solvente, más rápida re-equilibración, sensibilidad de masa alta, cuantificación precisa y alta resolución.

Sin embargo, muchos de los métodos existentes se han desarrollado en columnas largas siendo frecuentemente transferidos a una columna corta para la mejora continua del desempeño del mismo. Este traslado podría involucrar cambios ligeros en los parámetros instrumentales o condiciones.

Cuando un método analítico se modifica para lograr, un tiempo de análisis más corto, un costo más bajo o un uso más conveniente, este método debe revalidarse antes de que se acepte para uso rutinario. También es necesario demostrar que el nuevo o alternativo método tiene características similares al método de referencia.



Por consiguiente, una comparación del desempeño entre la alternativa y el método de la referencia debe realizarse llevándose a cabo para este fin una revalidación ^[1].

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar algunos aspectos comparativos de la revalidación de métodos al cambio de columnas analíticas en HPLC y su impacto en el costo y tiempo de análisis.

Sé revalidó un método analítico para cuantificar clorhidrato de bencidamina en crema previamente desarrollado y validado, bajo las condiciones de cambio en la longitud y el tamaño de partícula de la columna cromatográfica, demostrando que éste cambio no afectó el método en sus principales características de desempeño, evidenciando la mejora continua a través del costo y tiempo de análisis.



II GENERALIDADES



2.1 ASPECTOS GENERALES DEL CLORHIDRATO DE BENCIDAMINA

2.1.1 PROPIEDADES

El clorhidrato de bencidamina es un agente anti-inflamatorio no esterooidal (AINES) con propiedades locales anestésicas y analgésicas que es ampliamente utilizado en formulaciones tópicas (crema o gel) para el alivio de síntomas asociados a condiciones inflamatorias del sistema músculo esquelético.^[2-4]

Características del Clorhidrato de Bencidamina.

Clorhidrato Bencidamina

Estructura Química ^[5-7]

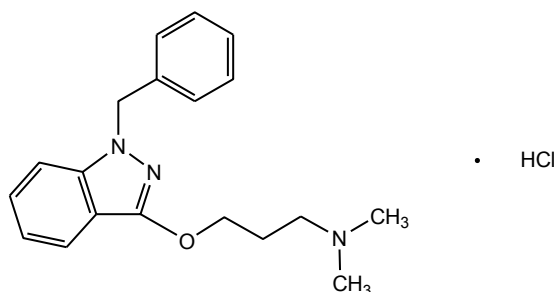


Figura 1.- Estructura química del Clorhidrato de Bencidamina

Fórmula condensada ^[5-7]

$C_{19}H_{23}N_3O$, HCl

Nombre químico ^[5-7]

Clorhidrato de 3-(1-bencil-indazol-3-iloxi) propildimetilamina
Clorhidrato de 3-(1-bencil-1*H*-indazol-3-iloxi)-*N,N*-dimetilpropilamina

**Masa molecular** ^[5,7]

345.9 g/mol

Descripción ^[5-7]

Polvo blanco cristalino

Solubilidad ^[5-7]

Muy soluble en agua, soluble en etanol (96%) y cloroformo y prácticamente insoluble en éter.

Punto de fusión ^[11] 160 °C**Coefficiente de partición** ^[6] 4.2**pKa** ^[6] 9.2

Espectro absorción ultravioleta: En la Figura 2 se muestra el Espectro de absorción del Clorhidrato de Bencidamina en solución amortiguadora con una longitud de onda máxima a 308 nm ^[6,8]

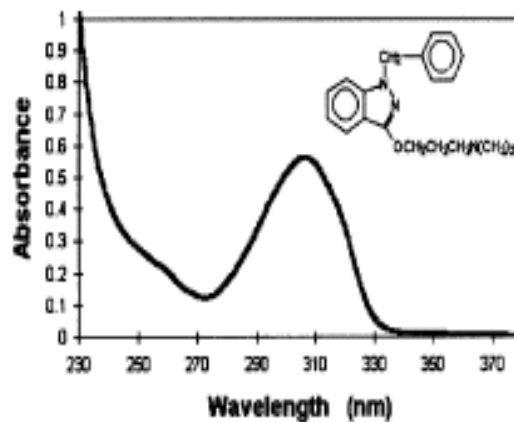


Figura 2.-Espectro UV de absorción del Clorhidrato de Bencidamina

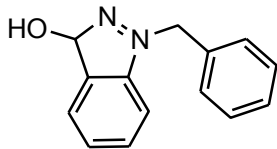
**Absortividad** [6]

$$E^{1\%, 1\text{cm}} = 144$$

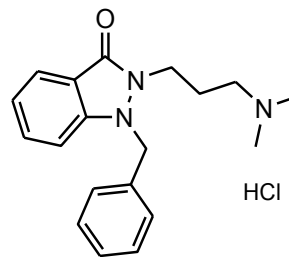
Coefficiente de extinción [9]

$$5800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

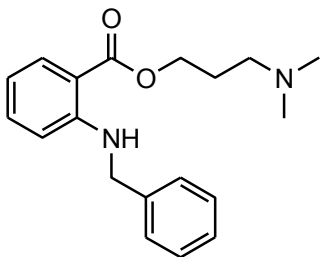
Impurezas: En la Figura 3 se muestran las estructuras de las impurezas del Clorhidrato de Bencidamina y en la Figura 4, las estructuras de los productos de degradación. [4, 7, 10,12]



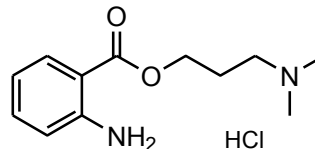
1-bencil-3-hidroxi-1H-indazol



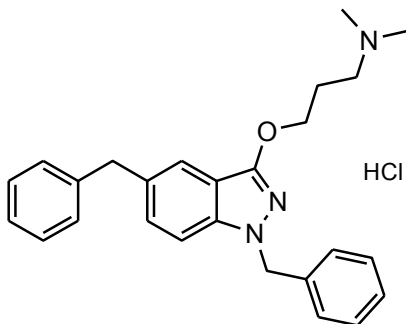
Clorhidrato de 1-bencil-2-(3-dimetilaminopropil)-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona



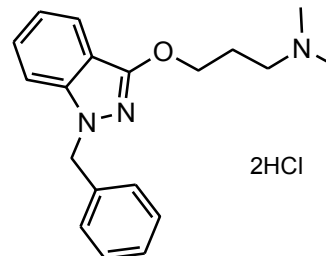
Clorhidrato de ácido 2-bencilaminobenzoico, 3-dimetilaminopropil éster



Clorhidrato ácido 2-aminobenzoico, 3-dimetilaminopropil éster



Clorhidrato de N,N-dimetil-3-[[1,5-(dibencil)-1H-indazol-3-il]oxi]-1-propanamina

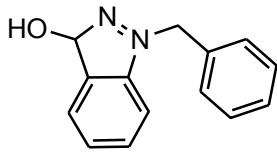


Clorhidrato de 1-bencil-3-{3-(3-dimetilaminopropil)-3-metilaminopropoxi}-1H-indazol

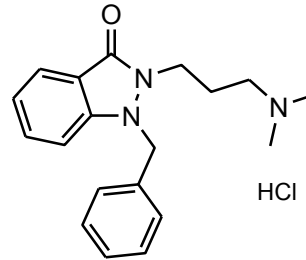
Figura 3.- Estructura de las impurezas del Clorhidrato de Bencidamina



Productos de degradación [3-4, 7,10-12]



1-bencil-3-hidroxi-1H-indazol



Clorhidrato de 1-bencil-2-(3-dimetilaminopropil)
-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona

Figura 4.- Estructura de los productos de degradación del Clorhidrato de Bencidamina

Uso Terapéutico [2, 4, 8,13]

Analgésico, antiinflamatorio tópico no esteroideo. Por sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas, está indicado en el tratamiento y alivio de los síntomas asociados a patologías del sistema músculo-esquelético: esguinces, distensiones musculares, bursitis, tendinitis, sinovitis, mialgias, periartritis, tortícolis. Este agente antiinflamatorio no esterooidal posee propiedades anestésicas locales.

2.1.2 ACTIVIDAD TERAPÉUTICA

Farmacocinética [13]

En voluntarios sanos de uno y otro sexo a los que se les administró tópicamente y por única vez 2g de crema conteniendo 100 mg de clorhidrato de bencidamina; se registró una concentración máxima plasmática de 0.20 µg/ml a las 32 horas. La administración tópica del clorhidrato de bencidamina da lugar a un efecto terapéutico prolongado por una acción exclusivamente local. La bencidamina es una sustancia altamente lipofílica, muestra una baja unión a proteínas plasmáticas con una alta afinidad por membranas celulares. Esta propiedad es notoria al pH de los tejidos inflamados, lo que le permite concentrarse directamente en el foco inflamatorio. La bencidamina ha demostrado tener propiedades antiinflamatorias, analgésicas, anestésicas (localmente) y antimicrobiales.

En orina de 72 horas se encontró diferencia en cuanto al porcentaje de principio activo eliminado en forma inalterada; fue de sólo 1% entre los voluntarios de sexo masculino y 3.7% entre los de sexo femenino.



Farmacodinamia ^[13]

La bencidamina actúa por una actividad inhibitoria dosis-dependiente de algunas citocinas inflamatorias, lo cual se ha demostrado en estudios en donde se indujo la producción de FNT (factor necrosante de tumores) por lipopolisacáridos y estreptococos inactivados.

Efectos adversos ^[2-3, 11,13]

Se ha reportado, en casos raros, que el uso prolongado de la bencidamina ha dado origen a sensibilización o a reacciones dérmicas pasajeras (urticaria, fotosensibilización, dermatitis). Uno de los posibles mecanismos de las reacciones adversas es la formación de fotoproductos tóxicos que llevan al inicio de una respuesta fototóxica. Esta reacción adversa y sus efectos biológicos se producen por la acción de la luz sobre la bencidamina causando una fotodermatitis.

2.1.3 Métodos analíticos para cuantificación del Clorhidrato de bencidamina

Dentro de la normatividad mexicana, la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, proporciona los métodos analíticos para la determinación de ciertas sustancias activas y excipientes, que se encuentran como materia prima y preparados farmacéuticos. Cuando la metodología de análisis farmacopeico no se apega a las necesidades del producto o no vienen incluida, se puede desarrollar un método analítico que cubra las necesidades del producto.

En la literatura científica existen métodos analíticos para la cuantificación de Clorhidrato de Bencidamina tanto como materia prima, como producto terminado, no obstante un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) previamente desarrollado y validado en nuestro laboratorio ^[41] se documentan de manera general, a continuación.

* **Análisis Volumétrico.** ^[7]

Disolver 0.3 g en 100 mL de ácido acético anhidro. Llevar a cabo una titulación potenciométrica usando ácido perclórico (HClO₄) 0.1 M. Leer el volumen añadido en el punto de inflexión (1.0 mL de ácido perclórico 0.1 M es equivalente a 34.59 mg de Clorhidrato de Bencidamina).

*** Determinación espectrofotométrica. [12]**

- Directa: Se valora en el máximo de absorción que presenta el Clorhidrato de Bencidamina a 308 nm, se compara con una solución de referencia que contenga 0.0025% p/v de Clorhidrato de Bencidamina en Etanol (96%).

Determinación cromatográfica [12]

- Cromatografía de gases (enjuague bucal y spray oromucosal)

Se utiliza una columna de vidrio (2mx2mm), con un soporte de tierra de diatomeas cubierto con un tres por ciento (peso/peso) de fenil metil silicón fluido (50% fenil) (OV-17 es adecuado) y mantenida a 260° con un detector de ionización de flama.

- Cromatografía líquida [41]

Se utiliza una columna C-18 de 125 x 4.0 mm, con una fase móvil de acetonitrilo 550 mL, 2.307 g de dodecil sulfato de sodio, 445 mL de agua y 5 mL de ácido acético a una longitud de onda de 305 nm, volumen de etanol 10 mL y flujo de 1.0 mL/minuto.

2.2 ASPECTOS GENERALES DE CROMATOGRAFÍA**2.2.1 CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR) [6,14-15, 18, 22, 25, 26,28]**

La cromatografía líquida clásica, para muestras no volátiles o termolábiles, en muchas ocasiones no lograba la eficiencia y sensibilidad que ofrecía la cromatografía gaseosa (CG), debido a lo cual se hizo necesario lograr que la cromatografía líquida (CL) proporcionase ventajas similares a las de la cromatografía de gases (CG). Para optimizar la técnica fue necesario hacer cambios como: incrementar la velocidad de la fase móvil, automatizarse, adaptarse a muestras mucho más pequeñas y utilizar presiones elevadas para impulsar el paso del disolvente a través de la columna que contiene partículas muy finas, para conseguir separaciones de gran resolución.

Como consecuencia surge la CLAR que permite muy buenas separaciones e identificaciones de grupos de sustancias,



macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de otros grupos polifuncionales de alto peso molecular en un corto tiempo, tanto cualitativa como cuantitativamente. Es la técnica analítica de separación mas ampliamente utilizada debido a sus cualidades de sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y su gran adaptabilidad a sustancias que son de gran interés.

Para esta técnica es necesario que la muestra sea soluble en un disolvente, ya que la fase móvil es un líquido, el cual pasa a través de la columna donde se lleva a cabo la separación cromatográfica debido a las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra con ambas fases, móvil y estacionaria, tales interacciones pueden ser:

- a) Adsorción líquido-sólido.
- b) Reparto líquido-líquido ó Partición.
- c) Intercambio de iones.
- d) Exclusión por tamaño.
- e) Fluidos supercríticos. [24]

Obteniéndose así los diferentes tiempos de retención, para cada analito en estudio.

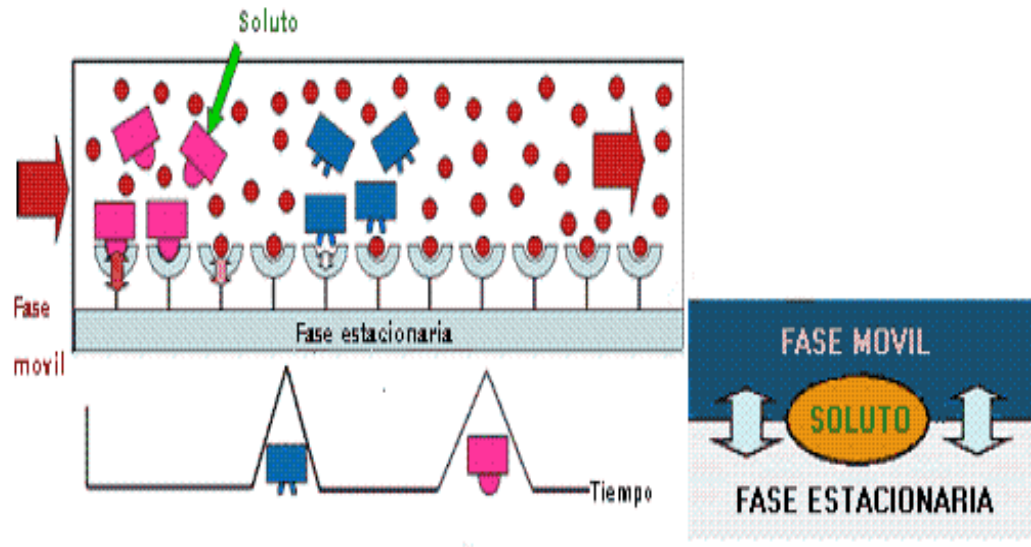


Figura 5.- Esquema de la separación cromatográfica en CLAR



La CLAR se puede clasificar de acuerdo a la polaridad relativa y a las posibilidades de separación que ofrecen la amplia variedad de fases que se puede utilizar, de acuerdo a lo cual se tiene:

Fase normal: para llevar a cabo la separación se usa una fase estacionaria polar (casi siempre hidrófila) generalmente sílica, y una fase móvil no polar (hexano, tetracloruro de carbono, benceno, etc.) lo que favorece la retención de compuestos polares y la elusión de compuestos no polares.

Fase reversa: en esta se utiliza una fase estacionaria no polar (Generalmente Sílica enlazada con cadenas de grupos orgánicos de 8 y 18 átomos de Carbono (C8 y C18 respectivamente) y una fase móvil polar (Agua, Soluciones "Amortiguadoras de pH", Acetonitrilo, Metanol, etc.) de esta forma los compuestos no polares serán retenidos y los compuestos polares eluidos. El mecanismo de separación en cromatografía de fase reversa depende de interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de soluto en la fase móvil y el ligando hidrofóbico inmovilizado en la fase estacionaria.

2.2.2 INSTRUMENTACIÓN O EQUIPO [6,14-15,18-19,20-22,24-26,28]

Los equipos CLAR consta de un suministro de fase móvil (depósito), sistema de bombeo que proporciona presión a la fase móvil, un sistema de inyección para introducir la muestra, una columna cromatográfica en donde se lleva a cabo la separación de los componentes de la muestra, los cuales al salir de esta son conducidos por la fase móvil en el orden en que emergieron hacia un detector que registra la respuesta en función de la concentración y el tiempo, posteriormente pasan al ordenador de datos para procesar y visualizar los resultados.

En la Figura 6 se esquematiza de manera general un sistema cromatográfico.

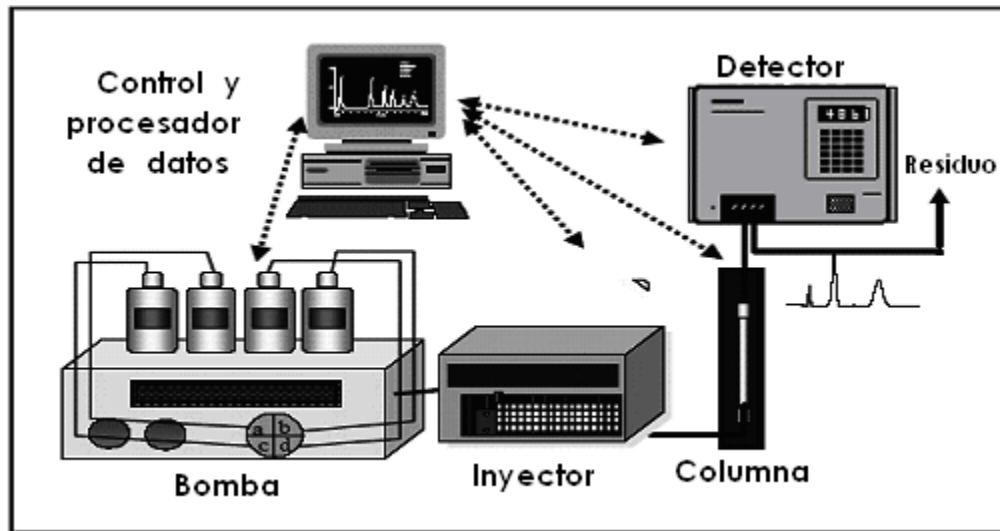


Figura 6. Esquema de un instrumento de CLAR

Para Tswett el término cromatograma consistía en una serie de bandas coloreadas separadas a lo largo de la columna, de acuerdo a su mayor o menor grado de adsorción al relleno. Actualmente según la IUPAC el concepto es: un gráfico u otra representación de la respuesta del detector, concentración del efluente u otra cantidad usada como una medida de la concentración del efluente, versus el volumen de efluente o tiempo. [17, 21,20]

El cromatograma, se emplea para determinar la identidad y la concentración de cada uno de los componentes, y aparece como en forma de campana a un determinado tiempo. Las curvas resultantes representan exactamente el proceso de distribución tal como ha ocurrido durante el tiempo de residencia de los solutos en la columna. [14-15, 17,24]

El cromatograma como se muestra en la Figura 7, se emplea para determinar la identidad y la concentración de cada uno de los componentes, y aparece como en forma de campana a un determinado tiempo. Las curvas resultantes representan exactamente el proceso de distribución tal como ha ocurrido durante el tiempo de residencia de los solutos en la columna. [14-15, 17,24]

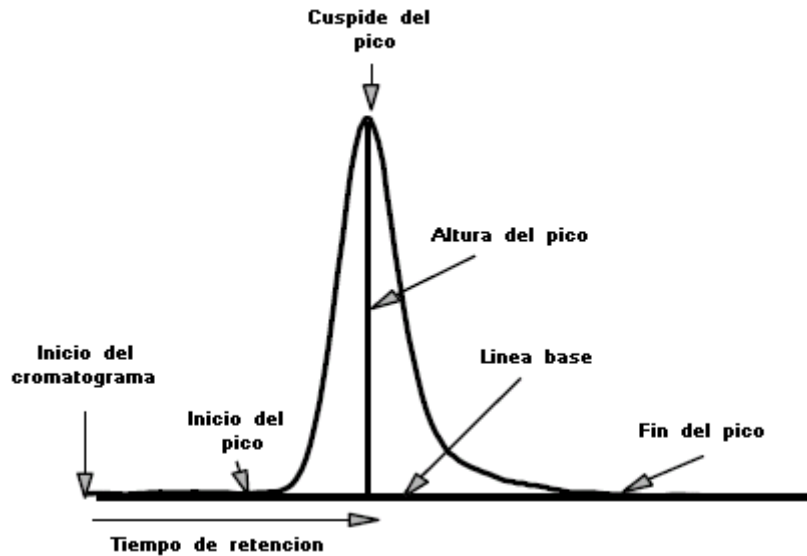


Figura 7.- Esquema de un cromatograma

El cromatograma inicia en el momento en que la muestra en ensayo es inyectada. A partir de ese momento, se encuentran las siguientes señales y parámetros:

Volumen de retención (V_r): o volumen de elución es el volumen de fase móvil eluida entre la inyección y la elución de la concentración máxima del soluto. Se puede obtener directamente del cromatograma multiplicando el tiempo de retención correspondiente, T_r , por el gasto o flujo volumétrico, F_c , expresado como el volumen de fase móvil por unidad de tiempo. ^[18,20]

$$V_r = T_r F_c$$

Volumen muerto (V_0): es el volumen total de disolvente entre el punto de inyección y el de detección, exceptuando el correspondiente a las partículas de fase estacionaria (la columna). Comprende el volumen que la fase móvil puede ocupar entre las partículas y la pared de la columna, en el interior de las tuberías, uniones, fritados, etc. ^[18,20]



Tiempo muerto, (T_0): es el tiempo requerido para eluir un soluto que no se retiene en la fase estacionaria. Tiempo que un soluto permanece en fase móvil. Representa el espacio vacío de la columna. [18,20]

Tiempo de retención, (T_r): el tiempo que un soluto permanece en la columna, se mide desde el momento de la inyección hasta la elución del máximo del pico. Es característico del soluto para condiciones de operación constantes. Auxiliar en la identificación del compuesto. [14-15, 18,20]

Tiempo de retención ajustado (T'_r): mide el tiempo que el componente permanece en fase estacionaria. Se calcula de la siguiente manera: [18,20]

$$T'_r = T_r - T_0 \quad [18,22]$$

Ancho a la base (W_b): es la porción de la línea base interceptada por las tangentes al pico. Para un pico gaussiano es igual a 4. Tradicionalmente usado en el cálculo de la eficiencia del sistema. [18,20]

Ancho a la mitad de la altura ($W_{1/2}$): es una medida más reproducible, adecuada para evaluar manualmente la eficiencia del sistema (platos teóricos). [18,20]

Línea base: es la porción del cromatograma donde solo se aprecia la elución de la fase móvil, sin señal debida al soluto. [20]

Comportamiento de retención: depende en parte de las velocidades relativas que se determinan a su vez por las relaciones de partición de los solutos entre las dos fases, es decir, las diferencias en el grado al cual los solutos son lavados o se reparten entre la fase móvil y la estacionaria. [18,20]



2.2.3 PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS [14-15, 17, 19, 20,21-23,25]

Factor de capacidad (K): es el parámetro de retención usado más comúnmente, se emplea ampliamente para describir las velocidades de migración de solutos en columnas y es expresado como el cociente entre el número de moles de soluto en la fase estacionaria y el número de moles de soluto en la fase móvil.

$K = (\text{cantidad de sustancia en la fase estacionaria}) / (\text{cantidad de sustancia en la fase móvil})$

Cuando un soluto entra al sistema cromatográfico inmediatamente se reparte o distribuye entre la fase móvil y la estacionaria. La concentración en cada fase está dada por el factor de capacidad que cuando es mayor que 20 a 30, los tiempos de elusión se vuelven muy largos. Idealmente, las separaciones se deben realizar bajo condiciones en las cuales los factores de capacidad para los solutos de una mezcla estén límites de 1 y 5. Cuando $K = 1$, el soluto se encuentra igualmente distribuido entre las dos fases, es una medida del tiempo transcurrido en la fase estacionaria en relación al tiempo transcurrido en fase móvil.

En fase reversa, K disminuye al aumentar la proporción del componente orgánico y disminuir la proporción de agua. En la cromatografía líquida, el factor de capacidad se puede manipular frecuentemente para dar mejores separaciones variando la composición de la fase móvil y de la fase estacionaria.

Factor de selectividad (α): se refiere a la separación entre dos picos adyacentes y es el cociente entre los factores de capacidad de estos picos. Depende de la naturaleza de las dos fases, y la fase estacionaria es el factor más importante, siempre se debe tratar de seleccionar una fase lo mas selectiva posible para poder separar cualquier par de solutos difíciles de separar.

Los intervalos más útiles son de 1.05 a 2.0, ya que con valores mayores se pierde tiempo analítico.

Si no existe separación, α es igual a la unidad y su valor aumenta cuando aumenta la separación. El α de los picos "1" y "2" se calcula del cromatograma y se expresa como:

$$\alpha = K_1/K_2$$



donde K_1 es la proporción de participación para las especies 1 retenida con más fuerza en tanto que K_2 es la constante para la especies retenidas menos fuertemente, es decir las eluidas más rápidamente, también referido como retención relativa.

Resolución: es la medición de la capacidad de la columna para separar dos analitos. Se define como la separación entre dos picos y la anchura media de estos, expresando la calidad de la separación en términos cuantitativos y se calcula para cada par de picos en unidades de tiempo de la siguiente manera:

$$R = \frac{(t_2 - t_1)}{\frac{1}{2} (w_2 + w_1)}$$

Depende tanto de la selectividad como de la eficiencia de la columna y también se puede expresar en términos de esta. Se puede mejorar la resolución incrementando la separación de los picos y disminuyendo la anchura de estos. Esto involucra la selectividad de la columna cuando se alejan más los picos y la eficiencia cuando se intenta disminuir el ancho del pico.

La resolución mínima aceptable en mezclas sencillas es 1.0, una resolución de 1.5 representa separación a la línea base.

Eficiencia: es la medida cuantitativa de la magnitud del ensanchamiento de un pico durante su separación y esta reflejada por el número de platos teóricos de la columna en donde se realiza el proceso cromatográficos. Para su medición se emplea el número de platos teóricos (N). ^[14, 15,16] El grado de ensanchamiento del pico depende del tiempo que la fase móvil está en contacto con la fase estacionaria. Es expresada como:

$$H = L / N$$



En donde:

L = longitud de la columna
N = numero de platos teóricos

La anchura del pico está relacionada directamente con el tiempo de residencia en la columna e inversamente a la velocidad de flujo de la fase móvil. Algunas de las variables que afectan estas velocidades son controlables y se pueden aprovechar para mejorar las separaciones.

Platos teóricos: se refiere a tratar a la columna como si estuviera dividida en cortes o zonas en las que se consigue un equilibrio transitorio del soluto entre las fases, antes de que la fase móvil lo envíe hacia la siguiente **zona, cada corte se llama "plato" y su espesor "altura equivalente del plato teórico" (H).**

El número total de platos teóricos de una columna representa el poder de separación de la columna. Una buena columna tiene un número alto de platos teóricos. Se calcula con cualquiera de las ecuaciones:

$$N = 16 (t / W)^2 \quad N = 5.545 (t_r / W_{1/2})^2$$

Donde:

t = tiempo de retención del soluto.
W = Ancho del pico medido desde la línea base.
W_{1/2} = Ancho del pico a la mitad de la altura

Asimetría (T): o factor de cola (Tailing) se da cuando un pico resulta no ser simétrico y es una de las formas más comunes de alejamiento de la curva gaussiana, su medición es importante ya que puede llevar, de acuerdo a su magnitud, a considerable errores en la cuantificación ya que no se puede integrar el pico con exactitud, e incluso a enmascarar picos adyacentes. Se define como la relación de la distancia de uno a otro lado del pico, W_{1/2}, dividido entre dos veces la distancia, f, del máximo del pico hacia el lado izquierdo del pico. Esta distancia debe medirse a un punto que corresponda a un 5 por ciento de la altura partiendo de la línea base. ^[17,18]

$$T = W_{1/2} / 2f$$

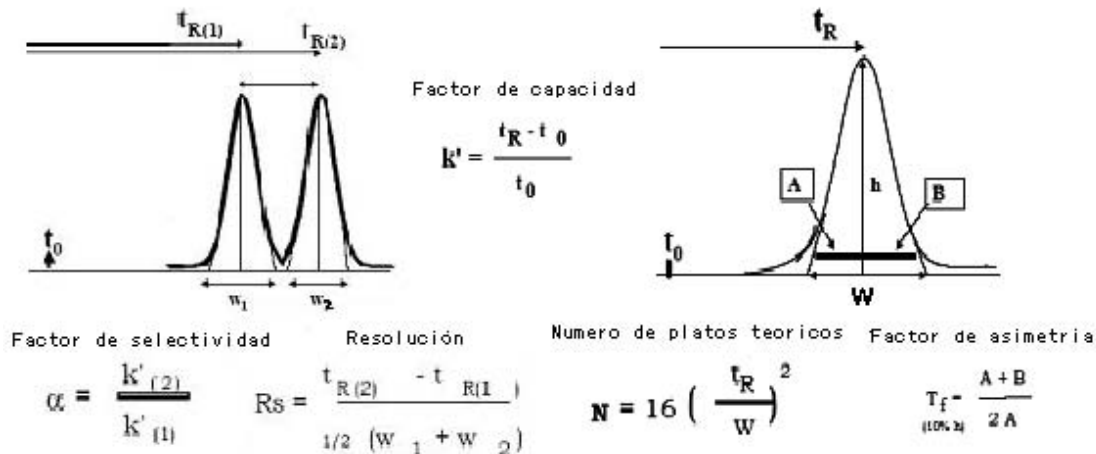


Figura 8.- Parámetros cromatográficos

El éxito en la aplicación de la CLAR para un compuesto dado depende de la combinación correcta de las condiciones de operación, es decir: la preparación de la muestra, el tipo de la columna. La fase móvil, la longitud y diámetro de la columna. La velocidad del flujo de la fase móvil, el tipo de detección, el algoritmo de integración, etc. [14]

La HPLC como cualquier otro método cromatográfico, es una herramienta sumamente útil para el análisis cuantitativo de mezclas de sustancias. El rápido crecimiento de este método analítico se basa fundamentalmente en la simplicidad con la cual se obtienen resultados cuantitativos por lo cual es ampliamente utilizada para métodos analíticos en la industria. [20,29]

El método analítico es la descripción con suficiente detalle de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir para realizar el análisis de un componente específico de una muestra. [29]

Una vez que un método se ha desarrollado, establecido e incluso validado puede llevarse a cabo alguna optimización. La mejora continua es necesaria para lograr la mejor posible separación de todos los componentes en un tiempo más corto, en el caso de bajas concentraciones detectadas, o bien para reducir recursos humanos, recursos materiales, consumo de disolventes así como reducir sus respectivos residuos para una menor contaminación, en cada caso las condiciones tienen que ser perfeccionadas para lograr la mejora continua. [25]



Últimamente, la necesidad de implementar métodos más rápidos en HPLC se ha vuelto un problema importante para los laboratorios farmacéuticos, para los cuales la reducción de costo y tiempo en métodos analíticos es de importante interés. ^[30]

Hoy en día los analistas buscan optimizar los métodos analíticos para reducir el tiempo de análisis involucrado, aumentar el análisis de muestras y reducir costos. Los atributos deseables de un nuevo método para su mejora continua consisten en seleccionar las condiciones que promuevan la adecuada resolución de los analitos de interés en un tiempo de análisis razonablemente mas corto, de fácil adaptación a la instrumentación, con un mínimo de costos y problemas. ^[17, 26,31]

Los avances tecnológicos hoy en día permiten ofrecer nuevas alternativas para la mejora continua de métodos, en particular los adelantos referentes a columnas cromatográficas ofrecen una amplia variedad de posibilidades para utilizar a estas como una herramienta para mejorar un método analítico. La Mejora continua de un método se puede llevar a cabo por medio de modificar cualquiera de los siguientes factores:

- ❖ Cambio en el disolvente, lo cual modifica el factor de capacidad (k).
- ❖ Modificando el factor de eficiencia y numero de platos teóricos, realizando a la columna cualquiera de los siguiente cambios:
 - ✓ la dimensión (columnas más cortas, columnas con menor diámetro)
 - ✓ tamaño de partícula (menor tamaño)
 - ✓ fase estacionaria
- ❖ Cambio en el disolvente, pH, fase estacionaria, aditivos de la fase móvil y la temperatura, para cambiar el factor de selectividad (α) ^[26,27]



2.3 MEJORA CONTINUA [1, 17, 25, 31,32]

La Mejora continua de un método consiste en seleccionar las condiciones que produzcan la resolución necesaria en un tiempo de análisis razonablemente corto, con un mínimo de costos y problemas. [17]

Cualquier método analítico debe asegurar que es confiable y sirve para los fines deseados, para lo cual se lleva a cabo la validación del mismo. Cuando este método es modificado para su optimización se convierte en un nuevo o alternativo método, el cual también debe demostrar que cuenta con las mismas características de desempeño que el método de referencia o inicial, por lo cual también debe validarse o bien revalidarse antes de ser aprobado para su uso rutinario. [1,31]

La instrumentación en HPLC ha tenido un crecimiento fenomenal, la mejora en material de empaque de columnas lleva al desarrollo de cromatografía en fase reversa en 1970. En 1990 el desarrollo de microcolumnas, columnas especializadas, detectores estables, han incrementado ampliamente la velocidad y eficiencia de la instrumentación y análisis en HPLC [25]

2.3.1 COLUMNAS

Dependiendo de la naturaleza de la muestra o bien de la facilidad para el analista, se puede modificar cualquiera de los siguientes factores: lograr la presión más baja posible y por consiguiente costo de equipo más económico, tiempo de análisis más corto, longitud de columna mínima, o la mejor resolución. En muchos casos es posible cambiar un factor por otro para lograr la adecuada mejora continua.

Como se cuenta con distintos parámetros que se pueden modificar para lograr una mejora continua, se tiene una amplia libertad de cambiar cualquiera de estos por lo que resulta hasta cierto punto difícil seleccionar el más adecuado y conveniente para lograr el mejor desempeño de un método. Sin embargo se cuenta ya con criterios que deben seguir los analistas con respecto a número de platos teóricos, tiempo, presión y diámetro de partícula en cuanto al funcionamiento de columnas. [17, 32,40]



El tiempo de corrida analítica depende de las características de retención del analito, fase móvil, velocidad de flujo y longitud de columna. El decremento de tiempo por corrida analítica para la reducción de la retención puede comprometer la resolución y la integración cromatográfica del análisis. El decremento de la longitud de la columna puede causar cambios en la retención, con cambios en la selectividad y decremento de eficiencia pero siempre debe proveer el desempeño requerido. [32,34-35,40]

Las columnas convencionales consisten en la actualidad en partículas completamente porosas con diámetros de 5-10 μ m, y con longitudes de 10-25cm y diámetro interior normalmente de 4 o 4.6 mm. La mayoría de columnas modernas que tienen como base sílica utilizan partículas esféricas, estas partículas tienen un rango de tamaño de 3 a 5 micras y son empacadas con micropartículas esféricas que resulta en columnas estables con alta eficiencia. [1, 17, 23, 26, 33,35]

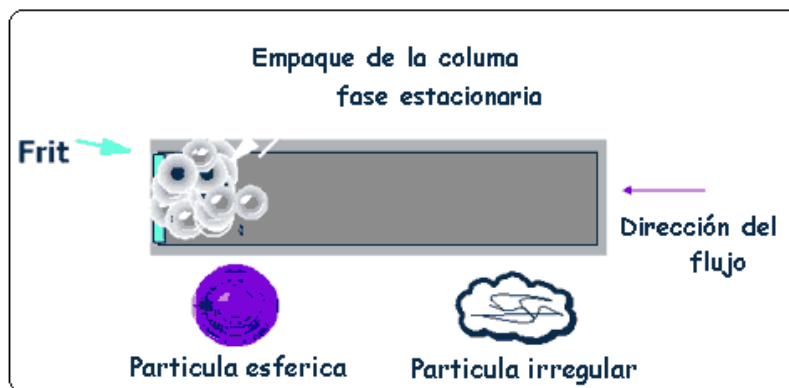


Figura 9.- Esquema del empaque y tipo de partícula en una columna.

En el transcurso de pocos años se han hecho grandes avances en la cromatografía líquida de alta resolución, en lo relacionado con columnas y sus empaques. Hoy día, más fabricantes de columnas para cromatografía de líquidos sacan al mercado columnas con una longitud más corta de 10 cm o menos, o bien con tamaños de partícula menores, tales columnas promueven el análisis de muestras en tiempos mas cortos y rápidos, disminuyen el tamaño de muestra a analizar así como el consumo del disolvente, ofreciendo una cuantificación precisa y una alta resolución. La tendencia actual es emplear este tipo de columnas cortas en métodos analíticos por HPLC para su Mejora continua. [1,35]



Figura 10.- Diferentes posibilidades de columnas.

Para muchas columnas, aumentar el flujo o la velocidad de migración a través de la fase estacionaria afectará la resolución y separación adversamente. Por consiguiente, se diseñan nuevas columnas para disminuir tiempo de análisis cromatográfico sin descuidar desviaciones significantes en los resultados. Estas columnas tienen el mismo diámetro interior pero con longitud mucho más corta que la mayoría de las otras columnas, y son empaquetadas con partículas más pequeñas que son típicamente menores a $3 \mu\text{m}$ de diámetro.

Actualmente las columnas de longitud corta son usadas sin sacrificar eficiencia, logrando significativa reducción del tiempo de análisis, con el beneficio de usar menos disolventes. Las columnas cortas empaquetadas con partículas muy pequeñas, permiten incluso con el incremento en la velocidad, la resolución entre dos picos que eluyen muy cercanamente, por lo que esta no se ve comprometida. [32, 34,40]

Al usar partículas más pequeñas en las columnas se tiene muchas ventajas las más importantes son: una resolución superior, análisis más rápidos, y aumentó en la capacidad de muestra para analizar. La eficiencia de la columna es el resultado de un empaque homogéneo con materiales que tiene tamaño de partícula pequeño debido a que la difusión se minimiza y la transferencia ocurre más rápidamente. Las pequeñas partículas son empaquetadas para reducir longitud de la columna, mejorar la transferencia de masa y separar rápidamente las moléculas. La longitud de la columna y el tamaño de las partículas del empaque, se escogen de manera que se obtenga la efectividad deseada en términos de retención y número de placas teóricas. [17-18, 31,35]



La eficacia de una columna empaquetada aumenta al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria. Se puede ver cómo se hacen más estrechos los picos, y cómo se resuelve un pico nuevo de los componentes que se eluyen más lentamente, al disminuir el tamaño de las partículas se reduce la altura de plato, el número de platos teóricos de una columna de longitud L (cm) es:

$$N = 3500 L (\text{cm})/d_p (\mu\text{m})$$

donde d_p es el diámetro de las partículas. Cuanto más pequeña son las partículas, mayor es el número de platos, aumentar la eficiencia es equivalente a disminuir la altura del plato (H) en la ecuación de van Deemter

$$H=A+ (B/u_x)+Cu_x$$

U_x = velocidad lineal de flujo

Una razón de qué las partículas pequeñas originen mejor resolución es que permiten un flujo más uniforme a través de la columna, reduciendo así el término de camino múltiple (A) de la ecuación de van Deemter. Otra razón es que el camino que debe recorrer el soluto en su difusión en la fase móvil que hay entre las partículas es del orden del tamaño de las partículas. Cuanto más pequeñas son las partículas, menor es la distancia en la que debe difundirse el soluto en la fase móvil. Este efecto disminuye el término C de la ecuación-de van Deemter, correspondiente al tiempo finito de difusión.

La desventaja que tienen las partículas pequeñas es la resistencia que ofrecen al flujo del disolvente. En la cromatografía analítica de alta eficacia, las partículas pequeñas aseguran mayor eficacia pero requieren mayor presión para lo que se requiere equipo especializado. ^[26]

Comúnmente se evalúa el efecto de la variación de longitud de la columna los siguientes parámetros: eficiencia, factor de capacidad y resolución. El número de plato puede ser incrementado alargando la columna, cambiando el diámetro de partícula del empaque se optimiza la velocidad de flujo y se incrementa la resolución, pero se puede exceder el máximo de presión permitida. ^[19,33]



El número de plato, N, describe el número de platos teóricos que son necesarios para llevar a cabo la separación. La siguiente ecuación es usada para expresar N:

$$N=5.54(tr/w_{1/2})^2$$

donde $w^{1/2}$ es el ancho de la banda cromatográfica a la mitad de la altura, y tr es el tiempo de retención. Es importante notar que N incrementa con el incremento de longitud de la columna. El orden para comparar la eficiencia de columnas con diferentes longitudes, es emplear la altura de plato teórico (H) en lugar de N.

$$H \text{ (mm)}=L(\text{mm})/N$$

En teoría la altura de plato teórico (N/L) es independiente de la longitud de columna esto significa, entre otras cosas que los resultados se verán principalmente influenciados por la longitud de la columna y el diámetro de la partícula.

Uno de los efectos más dramáticos de la reducción de longitud de columna es la reducción del tiempo de retención, reduciendo el tiempo por análisis

Algunos problemas que se pueden encontrar con el uso de este tipo de columnas es que la retención puede estar en el rango ideal ($k=2-10$) pero con inadecuada resolución, o bien la retención puede estar fuera de este rango. [33,35]

2.3.2 REVALIDACIÓN

Para el desarrollo químico-farmacéutico de un nuevo medicamento es imprescindible la utilización de un método analítico que permita cuantificar el producto mayoritario en forma de materia prima o como ingrediente activo de una formulación. Para asegurar confiabilidad, los métodos analíticos se someten a un proceso de validación, mediante el cual se comprueba si el método es lo suficientemente confiable y si los resultados previstos se obtienen dentro de las condiciones establecidas. La validación de los métodos analíticos se fundamenta en la determinación de diversos parámetros, que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan. [36]



La revalidación es la repetición de la validación del proceso para garantizar que los cambios en el proceso, método o equipo introducidos no afectan negativamente a las características del proceso ni a la calidad del producto.

La mayoría de los métodos analíticos validados que se emplean en la industria, se desarrollaron en columnas de tamaño de 25 o 10 cm, el alto consumo de disolvente lleva a contaminaciones del medio ambiente importante así como menor análisis de muestras por lo que se busca la mejora continua de estos tanto a nivel ecológico como económico. En una mejora continua al ser trasladados a una columna corta se pueden ver involucrados ligeros cambios en los parámetros cromatográficos y de desempeño. ^[1, 32, 37,40]

Ahora, cuando un método analítico se modifica o un nuevo se desarrolla para reemplazar uno existente o para lograr un mejor desempeño, como por ejemplo: tiempo de análisis más corto, un costo más bajo o un uso más conveniente, el nuevo método debe validarse antes de ser aceptado para su uso de rutina. También es necesario demostrar que el nuevo o alternativo método no presente peores características de actuación que el existente o método de referencia, por el contrario debe demostrar que se comporta de manera semejante o bien que presente un mejor desempeño. Por consiguiente, una comparación y evaluación de los comportamientos y desempeños de ambos métodos se deben realizar. ^[1]

Con la actual tendencia de utilizar en los métodos el uso de columnas más cortas, el llevar a cabo la comparación de ambos métodos se vuelve cada vez más importante. Además, que los métodos tienen que ser dóciles a la instrumentación existente y minimizar los costos de la inversión. El consumo de disolvente se debe ver finalmente disminuido, para minimizar gastos e incrementar la productividad.

La revalidación se hace necesaria con métodos previamente validados, pero que deben volver a evaluarse por variaciones de algún factor instrumental (cambio de equipo o de alguno de sus componentes, del tipo u origen de la columna, etc.) de la matriz que contiene la muestra o de la proporción relativa del analito. ^[20,38]



Los parámetros de validación dependen del alcance del método, se pueden considerar los siguientes parámetros: selectividad, rango, linealidad, precisión, exactitud, tolerancia, límite de cuantificación y límite de detección. En alguna vez durante la vida del método, por una razón u otra, la revalidación del método pueden llegar a ser necesaria y las principales circunstancias en las que se da son las siguientes:

- ❖ Cambio en la síntesis del fármaco
- ❖ cambio en la composición medicamento (cambios en la manufactura de lotes, cambios en la formulación)
- ❖ cambio en el procedimiento analítico (diluciones o preparación de la muestra, cambio en instrumentación, cambio en condiciones analíticas). [27,32,38]

El grado de revalidación requerido depende de la naturaleza de los cambios efectuados ciertos cambios pueden requerir validación. Se deben establecer y justificar criterios apropiados para la revalidación de métodos analíticos, así como para mantener un control de cambio. Cualquier cambio crítico a un método analítico, da lugar a uno nuevo y por lo tanto requiere de una validación como tal, en la Tabla 1 se relacionan los cambios, su impacto y los parámetros a considerar para llevar cabo una revalidación [36,38-39]

Cambio	Impacta	Parámetro a revalidar
Instrumento de medición	Variación en el sistema de medición	Precisión del sistema Adecuabilidad del sistema
Concentración de la solución de referencia	Exactitud del método	Linealidad del sistema y exactitud del método
Formulación del producto	Exactitud del método	Exactitud y repetibilidad del método Linealidad del método Selectividad
Equipos	Variación de método	Tolerancia
Proveedor de columnas	Variación de método	Tolerancia

Tabla 1.- Cambios en el método y parámetros a revalidar.



Un cambio de longitud de columna o de marca de columna no debe ser tomando a la ligera en un método probado, y mas cuando esto conduce a ajustes en el método por lo cual el método debe ser revalidado y los parámetros de la revalidación dependerán del alcance del proyecto. ^[27, 32,38]

Hoy en día la cromatografía rápida con el uso de columnas de menor longitud conduce a reducción del tiempo de análisis, siendo más económico y práctico siempre y cuando se lleva a cabo tomado las condiciones necesarias pertinentes. ^[1,23]



III OBJETIVOS



OBJETIVO

Aplicar la mejora continua para la evaluación del impacto en el costo y tiempo de análisis de un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para cuantificar clorhidrato de bencidamina en crema, mediante el cambio de columna analítica.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Realizar la mejora continua y revalidación de un método analítico para cuantificar clorhidrato de bencidamina en crema.
- Llevar a cabo el comparativo entre la columna Zorbax eclipse XDB C18 y la columna Purospher RPe 18 empleadas para cuantificar clorhidrato de bencidamina en crema.
- Determinar el impacto del uso de la columna Zorbax eclipse XDB C18 en el costo y tiempo análisis.



IV
METODOLOGIA



4.1 PARTE EXPERIMENTAL

4.1.1 INSTRUMENTOS Y EQUIPOS

- Balanza Analítica Sartorius Modelo A210P
- Mili-Q-Water System Millipore
- Equipo de Ultrasonido Transsonic 700/H
- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Agilent HP Serie 1050.
 - Bomba Cuaternaria
 - Inyector automático
 - Detector de arreglo de diodos

- Columna cromatográfica. Zorbax Eclipse XDB C-18 1.8 μ 4.6 mm x 50 mm.
- Matraces volumétricos 10, 20, 50 y 100mL
- Pipetas volumétricas 1 y 5mL
- Pipetas graduadas 1 y 5mL
- Matraces Kitasato
- Agitador magnético
- Parrilla de agitación
- Membranas de Nylon de 0.45 μ m.
- Acrodiscos de filtración de 0.45 μ , de PVDF
- Jeringas de plástico de 10 mL
- Pipetas Pasteur de plástico
- Vasos de precipitados 50, 250 y 1000 mL
- Probetas 10, 50 y 500 mL
- Viales para cromatógrafo
- Pro pipetas
- Naves de pesado
- Espátulas
- Frasco
- Reservorios para fase móvil

4.1.2 REACTIVOS

- Agua desionizada.
- Etanol absoluto anhidro J. T. Baker.
- Acetonitrilo (ACN) HPLC J. T. Baker.
- Lauril sulfato de sodio (LSS) RS-112.
- Ácido acético J. T. Baker.



4.1.3 SUSTANCIA DE REFERENCIA

- Estándar de Clorhidrato de bencidamina. Potencia 99%. Lote 013K0987.
- Clorhidrato de 1-bencil-3-[3-(3-dimetilaminopropil)-3-metilaminopropoxi]-1H-indazol, AF 1346. Lote RS 5/02.
- Clorhidrato de ácido 2-bencilaminobenzoico, 3-dimetilaminopropil éster, AF 1259. Lote RS 5/02.
- 1-bencil-3-hidroxi-1H-indazol, AF 956. Lote RS 8/01.
- Clorhidrato ácido 2-aminobenzoico, 3-dimetilaminopropil éster, AF 1316. Lote RS 2/02.
- Clorhidrato de N,N-dimetil-3-[[1,5-(dibencil)-1H-indazol-3-il]oxi]-1-propanamina, AF 2973. Lote RS 3.
- Clorhidrato de 1-bencil-2-(3-dimetilaminopropil)-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona, AF 1088. Lote RS 6/94.

4.1.4 PLACEBO Y MEDICAMENTO

- Placebo. Lote LP0502-05. Vigencia 31/Junio/2007 Almacenar a temperatura ambiente en lugar seco.
- Crema. Lote 553983 y 551041. Caducidad DIC2007 Conservar el tubo bien cerrado a temperatura ambiente a no más de 30°C y en un lugar seco.

4.2 MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CLORHIDRATO DE BENCIDAMINA EN CREMA

El método analítico utilizado fue previamente desarrollado y validado en nuestro laboratorio (Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de clorhidrato de bencidamina en crema mediante cromatografía de líquidos de alta resolución ^[41] pero se realizaron algunas modificaciones debido a que se cambia el tipo de columna empleada.



4.2.1 Preparación de soluciones

1. **Blanco:** filtrar mezcla etanol: agua (80:20)
2. Solución estándar de Clorhidrato de Bencidamina al 100% (300 µg/mL).

Pesar 30.0 mg de Clorhidrato de Bencidamina sustancia de referencia, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 30 mL de etanol absoluto, adicionar 20 mL de agua y mezclar, llevar a volumen con etanol absoluto y agitar.

3. Soluciones estándar de las impurezas

3.1 Solución de la impureza AF 1346 Clorhidrato de 1-bencil-3-[3-(3-dimetilaminopropil)-3-metilaminopropoxi]-1H-indazol, (0.15 µg/mL)

Pesar exactamente 7.5 mg de AF 1346 sustancia de referencia, transferir a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver con 20 mL de etanol absoluto, llevar a volumen con el mismo disolvente, tomar una alícuota de 1.0 mL y transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar a volumen con etanol absoluto, tomar una alícuota de 1.0 mL transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con etanol absoluto.

3.2 Solución de la impureza AF 956 1-bencil-3-hidroxi-1H-indazol (0.15 µg/mL)

Pesar exactamente 7.5 mg de AF 956 sustancia de referencia, transferir a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver con 20 mL de etanol absoluto, llevar a volumen con el mismo disolvente, tomar una alícuota de 1.0 mL y transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar a volumen con etanol absoluto, tomar una alícuota de 1.0 mL transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con etanol absoluto.

3.3 Solución de la impureza AF 1316 Clorhidrato ácido 2-aminobenzoico, 3-dimetilaminopropil éster (0.15 µg/mL)

Pesar exactamente 7.5 mg de AF 1316 sustancia de referencia, transferir a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver con 20 mL de etanol absoluto, llevar a volumen con el mismo disolvente, tomar una alícuota de 1.0 mL y transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar a volumen con etanol absoluto, tomar una alícuota de 1.0 mL transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con etanol absoluto.



3.4 Solución de la impureza AF 1088 Clorhidrato de 1-bencil-2-(3-dimetilaminopropil)-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (0.15 µg/mL)

Pesar exactamente 7.5 mg de AF 1088 sustancia de referencia, transferir a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver con 20 mL de etanol absoluto, llevar a volumen con el mismo disolvente, tomar una alícuota de 1.0 mL y transferirla a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar a volumen con etanol absoluto, tomar una alícuota de 1.0 mL transferirla a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con etanol absoluto.

3.5 Solución de la impureza AF 2973 Clorhidrato de N,N-dimetil-3-[[1,5-(dibencil)-1H-indazol-3-il]oxi]-1-propanamina (0.15 µg/mL)

Pesar exactamente 7.5 mg de AF 2973 sustancia de referencia, transferir a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver con 20 mL de etanol absoluto, llevar a volumen con el mismo disolvente, tomar una alícuota de 1.0 mL y transferirla a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar a volumen con etanol absoluto, tomar una alícuota de 1.0 mL transferirla a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con etanol absoluto.

3.6 Solución de la impureza AF 1259 Clorhidrato de ácido 2-bencilaminobenzoico, 3-dimetilaminopropil éster (0.15 µg/mL)

Pesar exactamente 7.5 mg de AF 1259 sustancia de referencia, transferir a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver con 20 mL de etanol absoluto, llevar a volumen con el mismo disolvente, tomar una alícuota de 1.0 mL y transferirla a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar a volumen con etanol absoluto, tomar una alícuota de 1.0 mL transferirla a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con etanol absoluto.

3.7 Solución estándar de la mezcla de impurezas (AF 956, AF 1316, AF 1346, AF 1088, AF 1259, AF 2973 (15 µg/mL))

Pesar aproximadamente con exactitud 15 mg de cada impureza (AF 956, AF 1316, AF 1346, AF 1088, AF 1259 y AF 2973) de Clorhidrato de Bencidamina sustancia de referencia, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y llevar a volumen con etanol absoluto, tomar una alícuota de 1.0 mL, transferirla a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con etanol absoluto.



4. Solución estándar de Clorhidrato de Bencidamina (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$), con la mezcla de las impurezas (0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

Pesar aproximadamente con exactitud 30 mg de Clorhidrato de Bencidamina Sustancia de referencia, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, disolverlo con 30 mL de etanol absoluto, adicionar una alícuota de 1.0 mL de la solución estándar de la mezcla de las impurezas (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 20 mL de agua, llevar a volumen con etanol absoluto y mezclar.

5. Solución de Lauril sulfato de sodio.

Pesar 2.307 g de lauril sulfato de sodio, transferirlos a un vaso de precipitados de 1L, agregar 445 mL de agua desionizada, agitar mediante agitador magnético, hasta disolverlo completamente, agregar una alícuota de 5 mL de ácido acético, mezclar.

6. Fase móvil acetonitrilo: Solución de lauril sulfato de sodio (LSS) (55: 45)

Mezclar 450 mL de solución de lauril sulfato de sodio y 550 mL de Acetonitrilo HPLC, filtrar a través de membranas de nylon 0.45 μ y desgasificar.

7. Fase móvil con adición de 5% más de acetonitrilo

Mezclar 450 mL de solución de lauril sulfato de sodio y 577.5 mL de Acetonitrilo HPLC, filtrar a través de membranas de nylon 0.45 μ y desgasificar; proporción LLS: ACN (45: 57.75).

8. Fase móvil con adición de un 5% mas de solución de Lauril sulfato de sodio

Mezclar 472.5 mL de solución de lauril sulfato de sodio y 550 mL de Acetonitrilo HPLC, filtrar a través de membranas de nylon 0.45 μ y desgasificar; proporción LLS: ACN (47.25: 55).

9. Solución de muestra de crema (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

En un vaso de precipitados vaciar 2 tubos de crema al menos y homogeneizarlos manualmente por 5 minutos, pesar 0.6 g de muestra, colocar en un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 30 mL de etanol absoluto, agitar mecánicamente para fragmentar y sonicar por 30 minutos, transcurrido el tiempo, dejar enfriar a temperatura ambiente, agregar 20 mL de agua y mezclar perfectamente, llevar a volumen con etanol absoluto agitar y filtrar con acrodiscos de PVDF de 0.45micras.



10. Solución placebo de la crema (6 µg/mL)

Colocar en un vaso de precipitado muestra placebo de crema, homogeneizar por 5 minutos manualmente, pesar 0.6 g de placebo crema en un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 30 mL de etanol absoluto, agitar manualmente para fragmentar y someter a la acción de ultrasonido por 30 minutos, transcurrido el tiempo dejar enfriar a temperatura ambiente, adicionar 20 mL de agua y mezclar, llevar a volumen con etanol absoluto, agitar y filtrar con acrodiscos de PVDF de 0.45µ.

11. Solución patrón de estándar de Clorhidrato de Bencidamina 600 µg/mL (linealidad del sistema).

Pesar aproximadamente con exactitud 60 mg de Clorhidrato de Bencidamina sustancia de referencia, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 30 mL de etanol absoluto, adicionar 20 mL de agua, llevar a volumen con etanol absoluto y mezclar.

12. Soluciones de la curva de calibración para linealidad del sistema.

Las curvas de calibración se preparan bajo el esquema descrito en la Tabla 2, partiendo de la solución patrón de estándar de clorhidrato de bencidamina 600µg/mL y aforando con solución de etanol/agua (80:20).

Tabla 2. - Preparación de la curva patrón conteniendo Bencidamina

Nivel (%)	Alícuota de la solución patrón (mL)	Aforo (mL)	Concentración de Clorhidrato de bencidamina (µg/mL)
50	5.0	20	150
70	7.0	20	210
100	5.0	10	300
120	6.0	10	360
140	7.0	10	420

13. Soluciones de placebo cargado.

Colocar en un vaso de precipitado muestra placebo de crema, homogeneizar por 5 minutos manualmente, pesar en un matraz volumétrico de 100 mL la cantidad de placebo de crema, así como la cantidad de Clorhidrato de Bencidamina sustancia de referencia



correspondiente a cada nivel tal como se indica en la Tabla 3, adicionar 30 mL de etanol absoluto, agitar manualmente para fragmentar y someter a la acción de ultrasonido por 30 minutos, transcurrido el tiempo dejar enfriar a temperatura ambiente, adicionar 20 mL de agua, mezclar, llevar a volumen con etanol absoluto, agitar y filtrar con acrodiscos de PVDF 0.45 μ .

Tabla 3.- Preparación de soluciones de Placebo Cargado

Nivel de concentración (%)	Cantidad de Clorhidrato de bencidamina (mg)	Cantidad de placebo (g)	Concentración de Clorhidrato de bencidamina (μ g/mL)
50	15	0.585	150
70	21	0.579	210
100	30	0.570	300
120	36	0.564	360
140	42	0.558	420

4.3 PROTOCOLO DE REVALIDACIÓN

4.3.1 Condiciones del método analítico original

Las condiciones cromatográficas iniciales fueron las siguientes^[43]:

Columna :	Purospher RPe 18 5 μ 125 mm x 4.0 mm
Fase móvil:	Acetonitrilo: Solución de lauril sulfato de sodio (55: 45)
Longitud de Onda:	305 nm
Volumen de inyección:	10 μ L
Flujo:	1.0 mL / minuto.

Debido a que se realizó un cambio de columna fue necesario hacer ajustes en las condiciones cromatográficas por lo que una vez ajustados



los parámetros cromatográficos las condiciones empleadas en la revalidación del método analítico fueron las siguientes:

4.3.2 Condiciones del método analítico para la revalidación

Columna:	Zorbax Eclipse XDB-C18 50 mm x 4.6mm 1.8 μ
Fase móvil:	Acetonitrilo: Solución de lauril sulfato de sodio (55:45)
Longitud de Onda:	305 nm
Volumen de inyección:	3 μ L
Flujo:	1.3 mL/minuto.

4.4 Metodología analítica de revalidación

4.4.1 Adecuabilidad del sistema

Sé prepara solución estándar de Clorhidrato de Bencidamina al 100%.

Sé inyectó cinco veces la solución estándar de Clorhidrato de Bencidamina al 100%, se intercalaron inyecciones de solución de estándar cada 6 inyecciones de muestra y al final de cada prueba, verificando que se cumpliera con los criterios de aceptación siguientes:

El coeficiente de variación (CV) no debe exceder el 2%.

Secuencia de picos invariable.

Factor de capacidad (k') > 2

Resolución para parejas de picos (R_s) \geq 1.5

Factor de coeol (T) \leq 2

Tiempo de retención (T_r) aproximadamente constante

Numero de platos teóricos: (N) reportar el numero de platos teóricos encontrados.

Nota: Cada vez que sé realice un análisis sé verifica la adecuabilidad y se inyecta un blanco de fase móvil así como el disolvente a utilizar (etanol absoluto).



4.4.2 Selectividad

Debido a que se contaron con las impurezas de bencidamina, se realizó la prueba como se indica a continuación y se esquematiza en la Figura 11:

Se prepararon las siguientes soluciones:

- ❖ solución de placebo
- ❖ solución estándar de bencidamina al 100%
- ❖ solución de muestra de crema
- ❖ solución de cada impureza
- ❖ solución mezcla de las impurezas
- ❖ solución mezcla de estándar de bencidamina con impurezas.

Se inyectó una vez cada solución y se analizó, verificando que no existiera interferencia con el pico de la bencidamina (compuesto de interés).

Criterio de aceptación: Cualquier señal que se registre de las soluciones analizadas, no deben interferir con la señal de Clorhidrato de Bencidamina y la resolución con respecto al pico de interés debe ser \geq a 1.5. Analizar con estándares recién preparados al 100%.

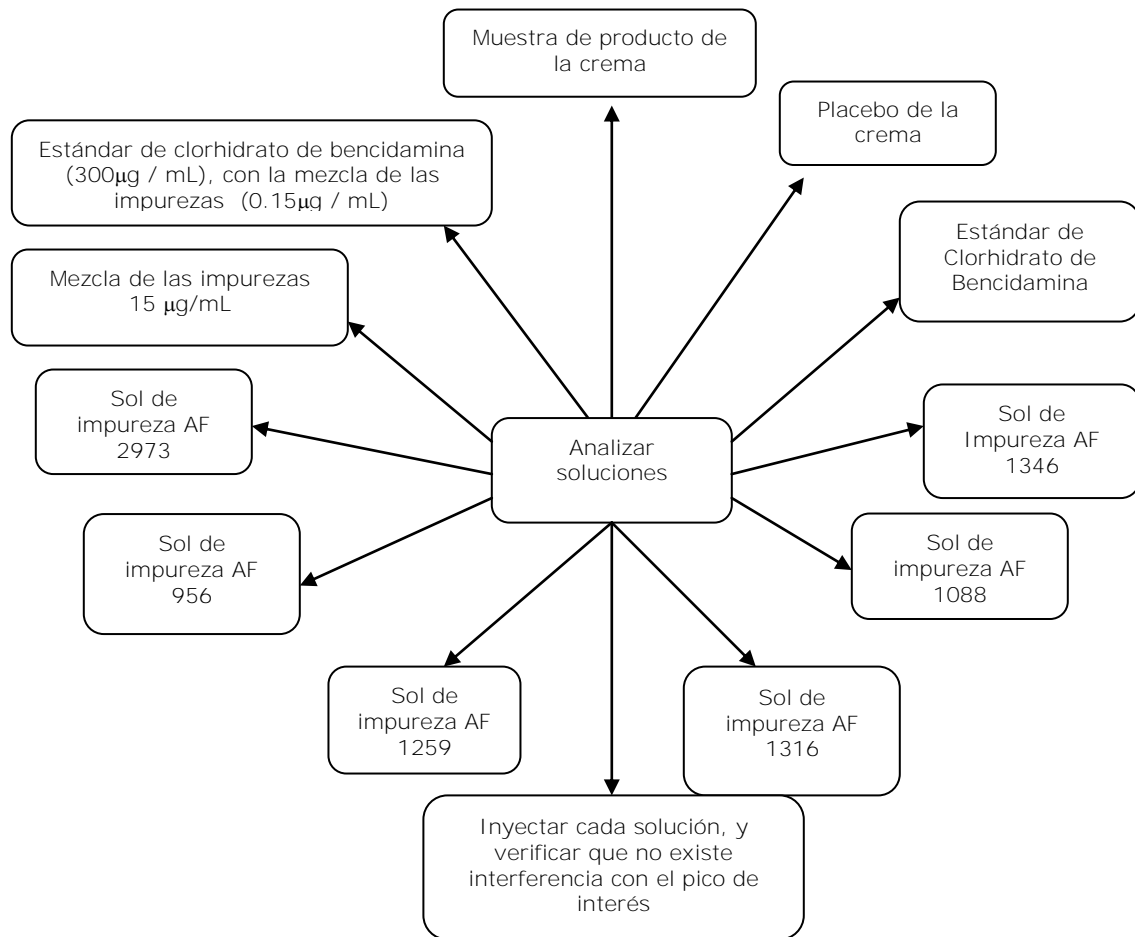


Figura 11.- Esquema del procedimiento de la prueba de selectividad

4.4.3 Linealidad del sistema

Curva de calibración sin excipiente

A partir de la solución patrón de estándar de Clorhidrato de Bencidamina 600 µg/mL se prepararon dos curvas de calibración. Cada solución de las curva de calibración (150-420µg/mL) se inyectó por triplicado.

Se analizó y determino la relación que existe entre la concentración de Clorhidrato de Bencidamina y su respuesta expresada como área.

Criterio de aceptación: El coeficiente de determinación debe ser mayor o igual a 0.98.



4.4.4 Linealidad del método

Método del placebo

Se prepararon dos curvas de calibración de placebo cargado con pesadas independientes utilizando 5 niveles de concentración, la soluciones de placebo cargado de las curvas de calibración se inyectó cada muestra una vez.

Se analizó y determino la relación que existe entre la concentración de Clorhidrato de bencidamina y la respuesta expresada como área.

De los datos obtenidos se calculó la ordenada al origen, pendiente y el coeficiente de determinación de la recta.

Criterio de aceptación: El coeficiente de determinación no debe ser mayor a 0.98.

4.4.5 Exactitud del método

A la cantidad de placebo analítico equivalente a una muestra analítica por duplicado se le adicionó la cantidad de principio activo correspondiente al 50, 70, 100, 120 y 140% manteniendo constante la cantidad de placebo en cada nivel, se inyectó una vez cada muestra. Se evaluó con 2 soluciones de estándar de clorhidrato de bencidamina al 100%.

Fueron calculados el porcentaje recuperado de Clorhidrato de bencidamina, el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada nivel evaluado.

Criterio de aceptación: El promedio de los por cientos de recobro deben encontrarse entre el 98 al 102 %.

4.4.6 Precisión del método

Se evaluó la precisión del método llevando a cabo las pruebas de repetibilidad y precisión intermedia.

4.4.6.1 Repetibilidad

Para la prueba de repetibilidad se preparó en un día, por el mismo analista tres soluciones de muestra de crema y cada muestra se inyectó por triplicado ver Figura 12.



Calcular el porcentaje de recuperación, promedio, desviación estándar y coeficiente de variación del porcentaje de recuperación de las tres replicas analizadas.

Criterio de aceptación: Coeficiente de variación sobre las 9 determinaciones (tres por replica) debe ser menor o igual al 2%.

4.4.6.2 Precisión intermedia

Se llevó a cabo la precisión intermedia por dos analistas en diferente días, en el mismo día cada analista preparó tres soluciones de muestra de crema, inyectando cada solución por triplicado. En diferente día los mismos analistas realizaron el mismo proceso.

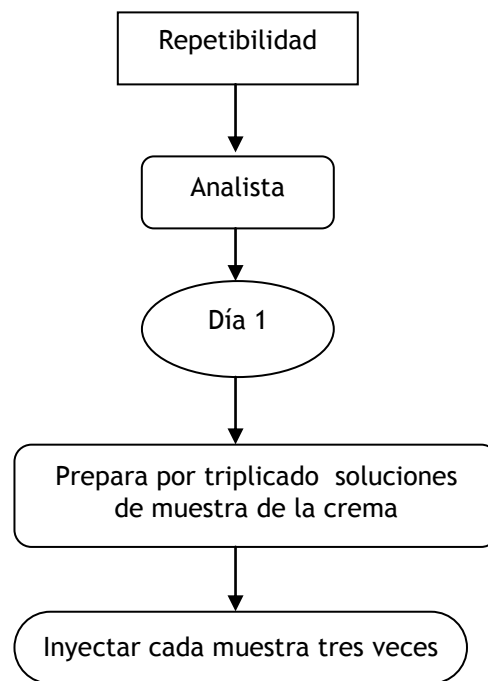


Figura 12. Esquema del procedimiento para llevar a cabo la repetibilidad.

De los datos obtenidos tanto por día, como por analista y de los totales, calcular el porcentaje recuperado, promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

Criterio de aceptación: Coeficiente de variación del porcentaje de recuperación para cada día de análisis, por analista y en el total sobre las 12 determinaciones no debe ser mayor al 2%.



4.4.7 Tolerancia

Se evaluó la tolerancia modificando la polaridad de la fase móvil, se prepararon 2 soluciones de producto de crema, y se inyectó cada solución por triplicado, estas misma muestras y de la misma manera se corrieron primero con fase móvil con adición de 5% de acetonitrilo y después con fase móvil con adición de 5% de lauril sulfato de sodio, tal como se muestra en el siguiente diagrama de la figura 13:

Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de recuperación para las soluciones que se analizaron, con cada una de las fases utilizadas, así como el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para cada fase empleada.

Criterio de aceptación: Verificar que los parámetros cromatográficos como el tiempo de retención (T_r) no tenga una variación de ± 1 minuto, el área permanezca constante, α (T), resolución (R_s) sigan cumpliendo, el por ciento de recobro de Clorhidrato de Bencidamina debe mantenerse casi constante así como reportar el número de platos teóricos.

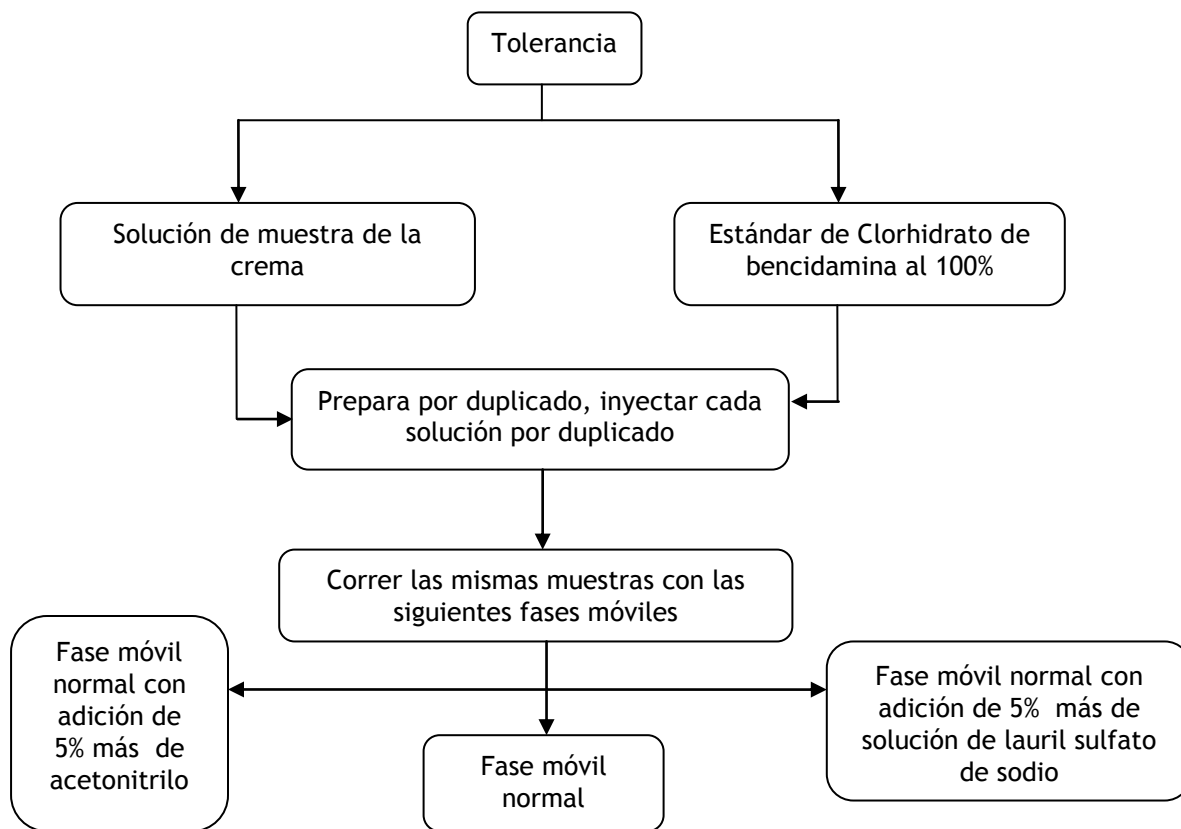


Figura 13- Esquema del la prueba de tolerancia.



V
RESULTADOS
Y
DISCUSION



5.1 AJUSTES DEL METODO INICIAL.

Los ajustes que se realizaron al método fueron con respecto al flujo, y volumen de inyección los cromatogramas que se muestran a continuación son los obtenidos para cada columna, como se puede observar el tiempo de retención se redujo de 6.631 minutos de la columna Purospher (125 mm) a 2.7 minutos en la Zorbax Eclipse (50 mm).

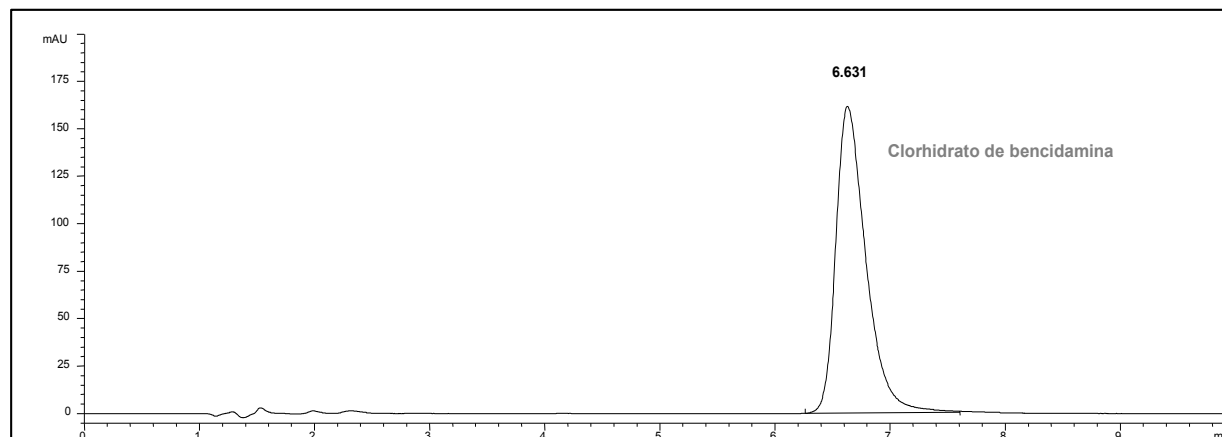


Figura14. Cromatograma del estándar de bencidamina empleando columna Purospher Rpe

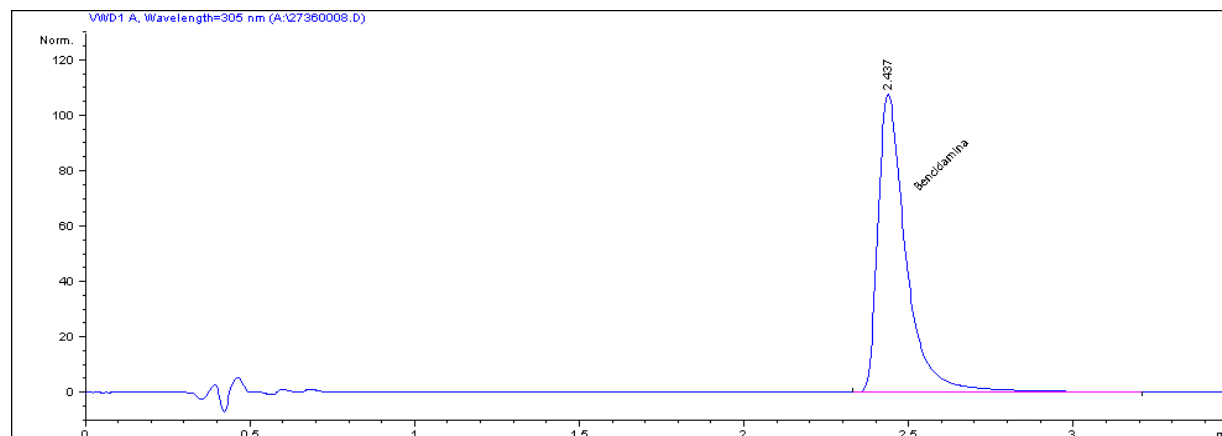


Figura 15. Cromatograma del estándar de bencidamina empleando columna Zorbax eclipse XDB



5.2 REVALIDACIÓN DEL METODO

Debido al cambio en la columna analítica se llevó a cabo la revalidación del método analítico para cuantificar Clorhidrato de bencidamina en crema, con el fin de verificar que el método analítico seguía cumpliendo con los criterios establecidos y los resultados obtenidos para los parámetros evaluados se presentan a continuación.

5.3 SELECTIVIDAD

Se probó la selectividad del método al analizar soluciones de estándar de bencidamina, muestras placebo, muestras de impurezas, y muestras de producto con impurezas. Como podemos observar en las figuras de la 16 a la 21 no se observa ninguna señal debida al placebo, blanco, fase móvil y/o impurezas al mismo tiempo de retención que el Clorhidrato de Bencidamina, por consiguiente se puede señalar que de acuerdo a los datos obtenidos el método es selectivo ya que no se observa ninguna interferencia con el pico de interés.

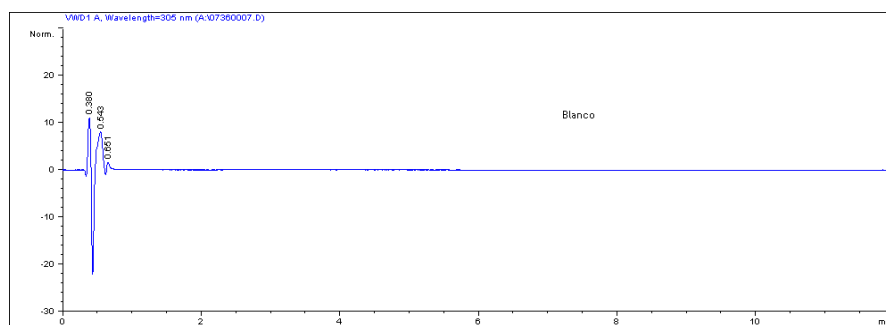


Figura 16. Cromatograma del blanco (etanol: agua)

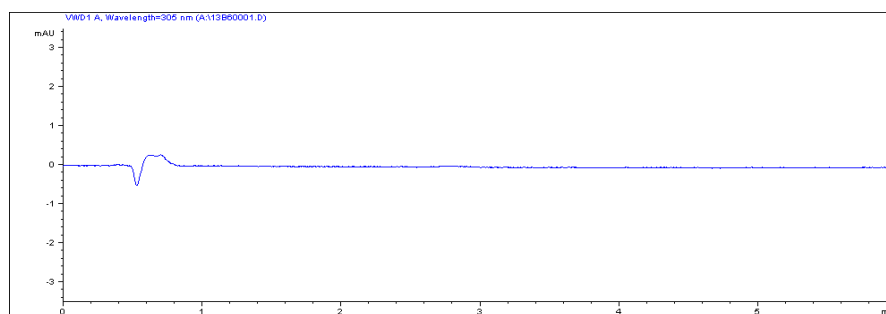


Figura17. Cromatograma de la fase móvil.

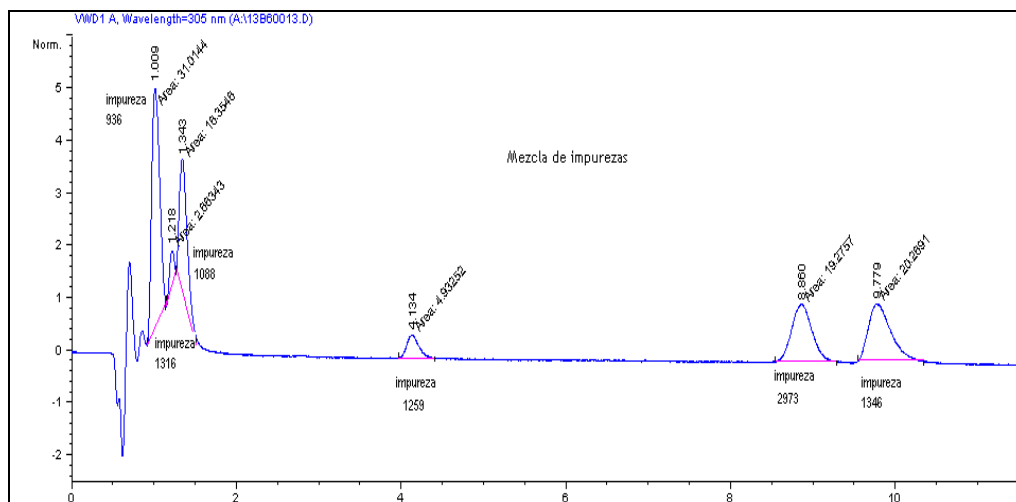


Figura 18. Cromatograma de la mezcla de impurezas

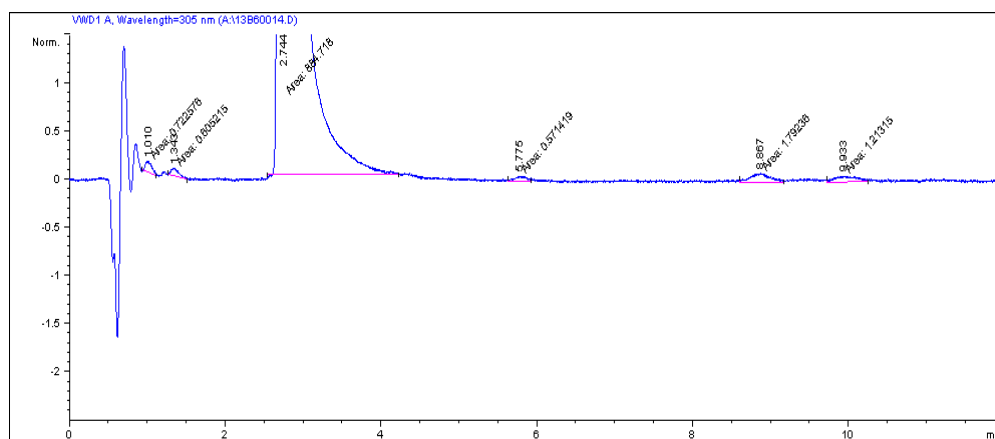


Figura 19. Cromatograma de la mezcla de impurezas y benidamina.

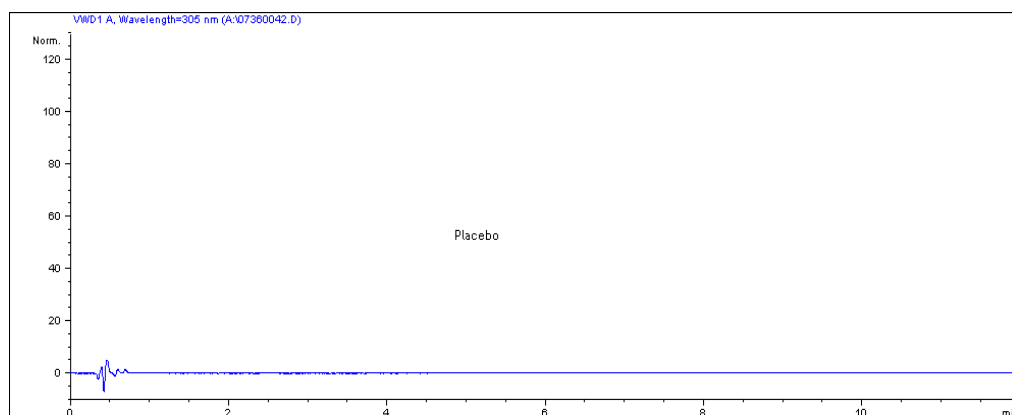


Figura 20. Cromatograma de muestra placebo

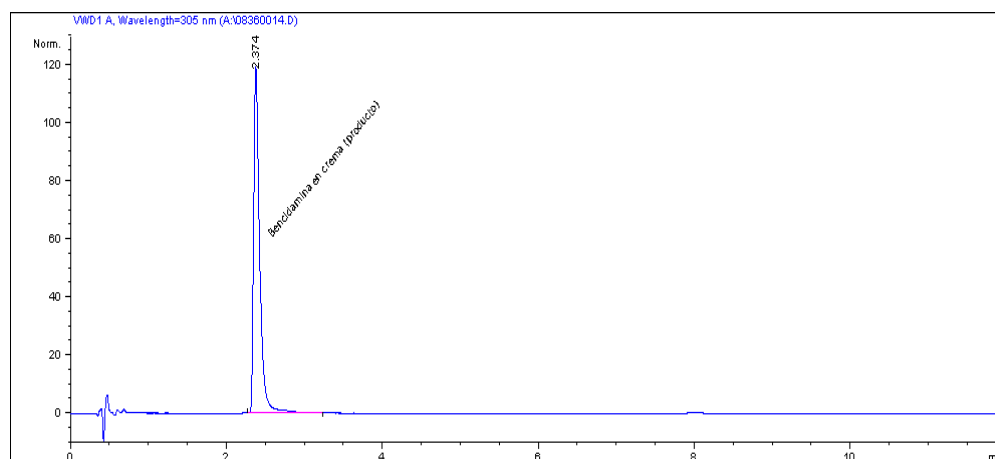


Figura 21. Cromatograma de Muestra de producto

5.4 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Después de evaluar la linealidad del sistema se obtuvieron los datos que se observan en la Tabla 4 y la Figura 22:

Tabla 4. Linealidad del sistema para Clorhidrato de Bencidamina

Promedio					
Concentración	Curva 1	Curva 2	Promedio	Desviación	C.V.
150	307.926	314.452	311.189	4.6	1.5
210	440.868	453.020	446.944	8.6	1.9
300	625.132	641.012	633.072	11.2	1.8
360	751.271	770.042	760.657	13.3	1.7
420	881.159	904.096	892.628	16.2	1.8
Coef. R ²	0.9999	0.9998	0.9998		

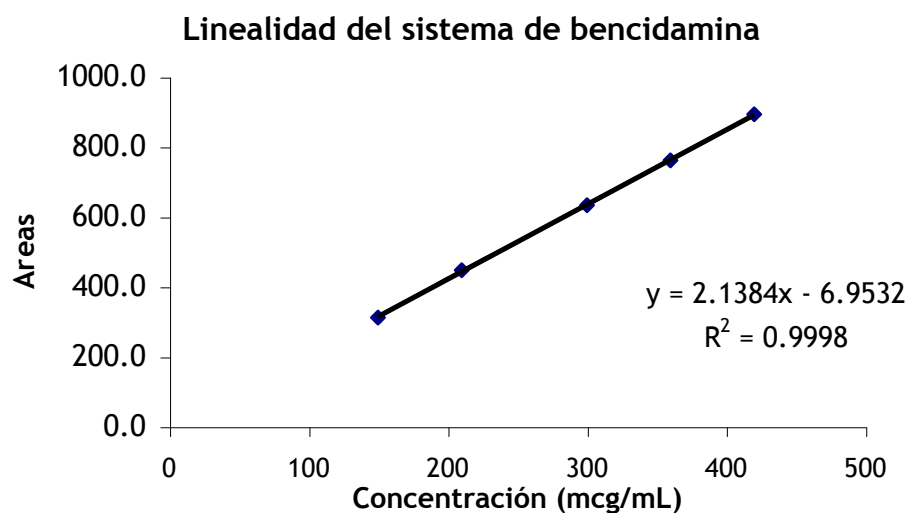


Figura 22 Gráfica obtenida para linealidad del sistema de clorhidrato de bencidamina.

Los datos de linealidad del sistema al analizarse estadísticamente se ajustan al modelo de una línea recta, cuya ecuación es la que se describe a continuación:

$$Y = m * x + b$$

m = pendiente

b = ordenada al origen

R = coeficiente de correlación

R² = coeficiente de determinación

$$y = 2.1384x - 6.9532$$

m = 2.1384

b = - 6.9532

R = 0.9999

R² = 0.9998

De acuerdo a lo anterior el sistema presenta un comportamiento lineal dentro del intervalo de concentración nominal de 150 0 420 $\mu\text{g/mL}$ de Clorhidrato de bencidamina con un coeficiente de determinación mayor a 0.98.

5.5 LINEALIDAD DEL MÉTODO

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos para la prueba de linealidad del método analítico para cuantificar clorhidrato de bencidamina, después de analizar dos curvas a cinco niveles de concentración.



Tabla 5. Linealidad del método por HPLC para cuantificar clorhidrato de bencidamina en Crema.

Promedio					
Concentración	Curva 1	Curva 2	Promedio	Desviación	C.V.
150	318.471	320.447	319.459	1.4	0.4
210	444.494	441.063	442.779	2.4	0.5
300	632.800	637.104	634.952	3.0	0.5
360	768.156	766.785	767.471	1.0	0.1
420	890.717	896.748	893.733	4.3	0.5
Coef. R ²	0.9999	0.9998	0.9999		

La gráfica obtenida concentración (x) contra áreas (y) correspondiente a la linealidad del método se muestra en la Figura 23.

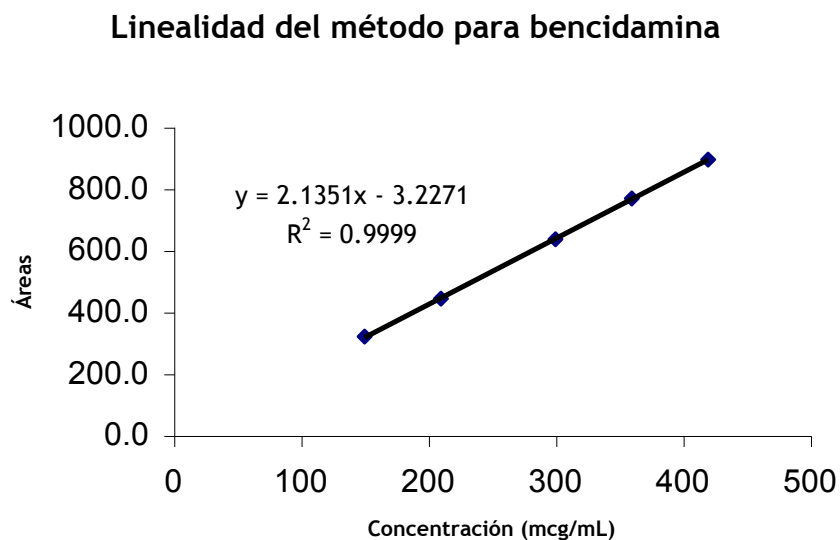


Figura 23. Gráfica obtenida para linealidad del método para clorhidrato de bencidamina.



Los datos de linealidad del método después de someterse al análisis estadístico se ajustan al modelo de una línea recta, cuya ecuación se describe a continuación:

$$Y = m * x + b$$

m = pendiente

b = ordenada al origen

r = coeficiente de correlación

r² = coeficiente de determinación

$$y = 2.1351x - 3.2271$$

m = 2.1351

b = - 3.2271

r = 0.9999

r = 0.9999

Por los resultados obtenidos se observa que el método presenta un comportamiento lineal en el intervalo de concentración nominal de 150 a 420 $\mu\text{g/mL}$ de clorhidrato de bencidamina con un coeficiente de determinación mayor a 0.98.

5.6 EXACTITUD

Al realizar la prueba de exactitud a cinco niveles de concentración se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 6 que se presenta a continuación:

Tabla 6. Exactitud para clorhidrato de bencidamina.

Nivel	Muestra	% de recobro	Promedio	C.V.
50	1	98.5	99.4	0.014
	2	100.4		
70	1	98.7	98.8	0.001
	2	98.9		
100	1	99.5	99.6	0.002
	2	99.8		
120	1	100.7	100.6	0.001
	2	100.5		
140	1	100.1	100.3	0.003
	2	100.5		

Promedio	99.8
Desviacion estandar	0.7
% C.V.	0.7



Los datos analizados para exactitud muestran que para cada nivel se obtuvo un por ciento de recobro dentro de lo especificado (98-102%), con coeficiente de variación menor a 2%.

Se obtuvo como promedio de todos los niveles un recobro de 99.8%, con un coeficiente de 0.7%, por lo cual el método cumple con lo especificado por la prueba, y al cambio de columna analítica continua siendo exacto.

5.7 PRECISIÓN

5.7.1 REPETIBILIDAD

La Tabla 7 muestra los resultados obtenidos en la prueba de repetibilidad para clorhidrato de bencidamina en crema, obtenidos por el mismo analista en dos diferentes días.

Tabla 7. Repetibilidad de clorhidrato de bencidamina en crema.

Clorhidrato de bencidamina		
Día	Muestra	% Recobro
1	1	98.8
		98.7
		98.4
	2	98.2
		98.6
		98.2
	3	98.1
		97.8
		98.3
Promedio		98.3
Desviación estándar		0.3
% C.V.		0.3

Como se puede observar el coeficiente de variación obtenido es menor a 2 % por lo cual el método cumple con la prueba de repetibilidad.



5.7.2 PRECISIÓN INTERMEDIA

En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos en la precisión intermedia para clorhidrato de bencidamina en crema obtenidos entre 2 analistas en 2 diferentes días.

Tabla 8. Precisión intermedia para clorhidrato de bencidamina en crema.

Clorhidrato de bencidamina			
Día	Muestra	% Recobro	
		Analista 1	Analista2
1	1	98.8	101.4
		98.7	101.7
		98.4	101.4
	2	98.2	100.5
		98.6	100.7
		98.2	100.8
	3	98.1	101.7
		97.8	101.5
		98.3	102.0
2	1	98.9	98.3
		98.5	98.1
		98.4	98.1
	2	99.4	98.8
		99.4	99.0
		99.1	99.4
	3	98.7	98.9
		99.2	99.3
		99.4	99.0
Promedio		99.4	
Desviación estándar		1.2	
% C.V.		1.2	



5.8 TOLERANCIA

Se verificó la tolerancia del método con respecto a la fase móvil modificando la polaridad de la fase móvil en una adición de 5%, los resultados del por ciento de recobro y parámetros cromatográficos obtenidos bajo cada una de las condiciones se muestran en las Tablas 9 y 10.

Tablas 9. Recobros obtenidos al cambiar la polaridad de la fase móvil.

Fase	Muestra	Área	% Recobro
Normal	1	636.513	100.0
		636.951	100.1
	2	646.126	101.5
		642.050	100.9
	3	638.562	100.4
		640.652	100.7
Normal + 5% ACN	1	643.296	100.8
		643.237	100.8
	2	650.220	101.9
		643.828	100.9
	3	639.699	100.3
		643.070	100.8
Normal + 5% LSS	1	643.683	100.7
		644.830	100.9
	2	651.559	102.0
		646.066	101.1
	3	641.489	100.4
		643.963	100.8

Como podemos observar el porcentaje de recobro para la fase móvil normal se encuentra entre 100.0 –101.5%, para fase móvil con un %5 más de ACN fué de 100.3-101.9 %, y para la fase móvil con un 5% de LLS fué de 100.4-102.0%, de acuerdo con estos resultados obtenidos el porcentaje de recobro obtenido con cada una de las fases evaluada se encuentra dentro del criterio de aceptación del 98.0 al 102.0%.



Tabla 10. Parámetros cromatográficos obtenidos al variar la polaridad de la fase móvil.

Parámetro cromatográfico	Fase normal + 5% de acetonitrilo	Fase Normal	Fase normal + 5% de lauril sulfato de sodio
Área	643.8915	640.1424	645.2652
% Recuperado	100.9	100.6	101.0
Tr (min)	2.2	2.4	2.7
T	0.5	0.5	0.5
K	4.1	4.6	5.2
N	3900	4894	4475

Como podemos observar el Tr permanece constante, el área registrada se mantiene constante, k fue mayor a dos, T fue menor a dos y el valor de N fue de 4894, por consiguiente se cumple con los criterios de aceptación la prueba cumple.

Los respectivos cromatogramas que se obtuvieron de esta prueba se pueden consultar en el Apéndice.

En base a los resultados obtenidos tanto para el por ciento de recobro como en los criterios cromatográficos se demostró que el método es tolerante a cambios en un 5% en la polaridad de la fase móvil.

5.9 ASPECTOS COMPARATIVOS DE LA REVALIDACION

5.9.1 COMPARATIVO DE DESEMPEÑO ENTRE COLUMNAS

Se puede observar en las Tablas 11 y 12 los parámetros cromatográficos y los resultados de la validación del método analítico obtenidos empleando las dos diferentes columnas en donde se cumplen con los criterios de aceptación.



5.9.1.1 Desempeño de parámetros cromatográficos

Tabla 11.- Comparativo de los parámetros cromatográficos de ambas columnas utilizadas en el método analítico para cuantificar bencidamina.

Columna	Factor de capacidad K	Tiempo de retención	T	Platos teóricos
Zorbax Eclipse XDB-C18	4.6	2.4	0.5	4894
Purospher RPe 18	5.1	6.5	0.6	3364

Se puede observar para los parámetros cromatográficos que el valor del factor de capacidad para la columna zorbax es menor que para la columna purospher, lo que nos indica que permanece menor tiempo en la columna, por lo cual presenta menor tiempo de retención el compuesto de interés, que es lo que se observa en los datos obtenidos. Se tiene una mejor eficiencia y separación de la bencidamina con la columna zorbax ya que esta presenta un mayor número de platos teóricos, así como el valor de asimetría (tailing) que posee es menor lo cual nos conduce a menor error en la cuantificación y a que posibles picos adyacentes no se vean enmascarados.

Por lo tanto la columna zorbax presenta parámetros cromatográficos mas adecuados para la cuantificación de bencidamina en crema.

5.9.1.2 Parámetros de revalidación

El comparativo de los parámetros de revalidación muestra que la linealidad del método para ambas columnas presenta pendiente y ordenada al origen parecidas, en tanto que el coeficiente de correlación es el mismo para las dos columnas.

En la exactitud del método ambas columnas presentan por cientos de recobro dentro de especificaciones (98% -102%) y son muy cercanos los valores obtenidos. Al evaluar la precisión, se tiene que los valores son muy similares



para la repetibilidad en tanto que para la precisión intermedia se obtienen los mismos valores.

Tabla 12. Comparativo de los parámetros de revalidación obtenidos con cada columna.

Columna	Linealidad del método	Selectividad del método	Exactitud	Precisión		Tolerancia a cambio en la proporción de fase móvil
				Repetibilidad	Precisión intermedia	
Zorbax Eclipse XDB-C18	$y = 2.1351x - 3.2271$ $R^2 = 0.9998$	Selectivo	99.8	Promedio 98.7 % C.V. 0.5	Promedio 99.4 % C.V. 1.2	Tolerante
Purospher RPe 18 5 μ	$y = 1.0147x - 6E-06$ $R^2 = 0.9998$	Selectivo	100.5	Promedio 98.8 % C.V. 0.9	Promedio 99.4 % C.V. 1.2	Tolerante (Ref. 41)

Como se puede ver ambas columnas presentan tolerancia al cambio de polaridad en la fase móvil. Debido a lo anterior se puede decir que el desempeño de las columnas con respecto a los parámetros evaluados no se alteran.

El desempeño de los parámetros de revalidación evaluados permanecen dentro de especificaciones, es decir su desempeño no se muestra afectado con respecto al cambio de columna.

5.9.2 MEJORA CONTINUA

Después de implementar la mejora continua al método analítico para cuantificar clorhidrato de bencidamina, lo cual impacto en el cambio de columna implementándose el uso de la columna Zorbax Eclipse XDB-C18, en lugar de la columna Purospher RPe 18 con la que se validó originalmente el método, se realizó un análisis comparativo del impacto de la mejora continua realizado.

5.9.2.1 Impacto al método analítico

En las Tablas 13 se hace un comparativo entre las dos columnas empleadas para la determinación de bencidamina en crema, manifestando cuales son los principales aspectos de mejora continua al método.



Tabla 13. Comparación de columnas analíticas empleadas en la determinación de Bencidamina.

Columna	Zorbax Eclipse XDB	Purospher Rpe
Dimensiones de la columna	50 x 4.6mm	125 x 4.0mm
Tamaño de partícula	1.8 μ	5 μ
Grupo polar sobre el silanol	C-18	C-18

Cada columna presenta el mismo grupo polar sobre el silanol (fase ligada), con la misma carga carbonada (C18) por lo que la retención no se ve afectada debido a este factor. Con respecto a las dimensiones de columna, la columna zorbax es de menor dimensión que la columna purospher por lo que ofrece un análisis más rápido (cromatografía rápida) dando tiempos de retención más cortos, sin perder resolución ya que tiene un menor tamaño de partícula lo que aumenta la eficiencia. Estos dos aspectos son los principales factores de impacto al método analito.

Tabla 14. Aspectos comparativos referentes al método analítico al cambiar de columna.

Columna	Zorbax eclipse XDB	Purospher Rpe
Flujo (mL/minuto)	1.3	1.0
Volumen de inyección (μ L)	3	10
Longitud de onda (nm)	305	305
Tiempo total por muestra analizada (minutos)	3.5	8.5

Con respecto a las condiciones del método analítico se observa que solo se ven modificadas aquellas que están relacionadas con la columna analítica utilizada. Se cambio el volumen de inyección el cual fue disminuido ya que las características de la columna permiten obtener cromatogramas mejor definidos con áreas mayores.



En base a la presión de trabajo que el equipo permite y debido a que la columna soporta altas presiones sin dañarse, se modificó la velocidad de flujo incrementándose, con esto directamente se ve afectado el tiempo total por muestra analizada el cual se ve disminuido en un 47%, lo que permiten optimizar y agilizar el desempeño del método para cuantificación de bencidamina en crema por inyección. La única condición que no se modificó es la longitud de onda, ya que esta no depende de la columna que se este utilizando, sino de otros factores.

La mejora continua se ve reflejada con la implementación de columna zorbax la cual ofrece un tiempo de análisis más rápido y corto sin pérdida de eficiencia y resolución.

5.9.2.2 Impacto al análisis de muestras

La mejora continúa implantada al método analítico para la cuantificación de clorhidrato de bencidamina se puede ver reflejado en el análisis de muestras.

El impacto es relevante en tiempo, reducción de insumos, contaminantes y en el costo por análisis.

La tabla que a continuación se presenta expone datos referentes a insumos utilizados por ambas columnas. Para lo cual se asume un análisis de 5000 muestras estableciendo que un lote comprende 1000 muestras, se esta realizando el comparativo entre columnas en cuanto a tiempos y costos al analizar 5 lotes.



Tabla 15. Aspectos comparativos referentes al análisis de muestras

Columna	Zorbax eclipse XDB	Purospher Rpe
Tiempo total por muestra analizada (minutos)	3.5	8.5
Tiempo total de 5000 muestras analizadas (5 lotes)(horas)	292 horas (12días)	708horas (30días)
Consumo total de fase móvil (litros)	22.7	42.5
Cantidad de acetonitrilo consumida (L)	10.2	19.1
Costo por litro de acetonitrilo	13.5 dólares	
Costo total de acetonitrilo (dólares)	137.7	257.9
Cantidad de Lauril sulfato de sodio consumida (g)	57.6	107.8
Costo por gramo de Lauril sulfato de sodio	0.56 dólares	
Costo total de Lauril sulfato de sodio (dólares)	32.3	60.4
Precio de columna (dólares)	556	908

Se tiene un ahorro del 47% en el análisis de 5 lotes en cuanto a tiempo de corrida con el uso de la columna zorbax lo cual se ve reflejado en el menor costo de los disolventes utilizados así como en el de uso de equipo, disminución de desechos, eficiencia del proceso, impactando en la reducción de tiempo y costo del análisis.



VI
VI
CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

La mejora continua realizada al método, su respectiva revalidación y análisis comparativo demuestran que el cambio en la reducción de la longitud de una columna analítica, repercute positivamente en el tiempo y costo de análisis, así como en la reducción de desechos.

El cambio de columna Purospher RPe 18 a la columna Zorbax eclipse XDB C18 no afectó al método analítico para cuantificar Clorhidrato de Bencidamina en Crema comprobándose que se mantuvo, específico, lineal, exacto, preciso y tolerante en el intervalo de concentración de 150 $\mu\text{g/mL}$ a 420 $\mu\text{g/mL}$, debido a lo anterior se puede decir que el desempeño de las columnas con respecto a los parámetros evaluados no se alteran. El impacto de la implementación de la mejora continua en el desempeño del método se ve reflejado en tiempo y costos de análisis favorablemente.



VII
VII
APÉNDICE



Se presentan los cromatogramas correspondientes al blanco y a la fase móvil que se utilizaron durante la revalidación del método, en los cuales se observa que ninguno de estos interfiere con la señal del pico de interés.

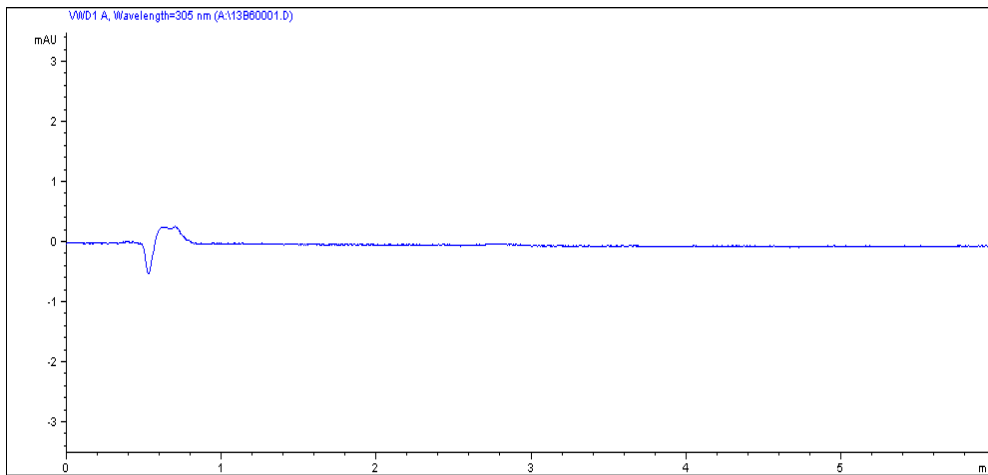


Figura 24. Cromatograma de la fase móvil

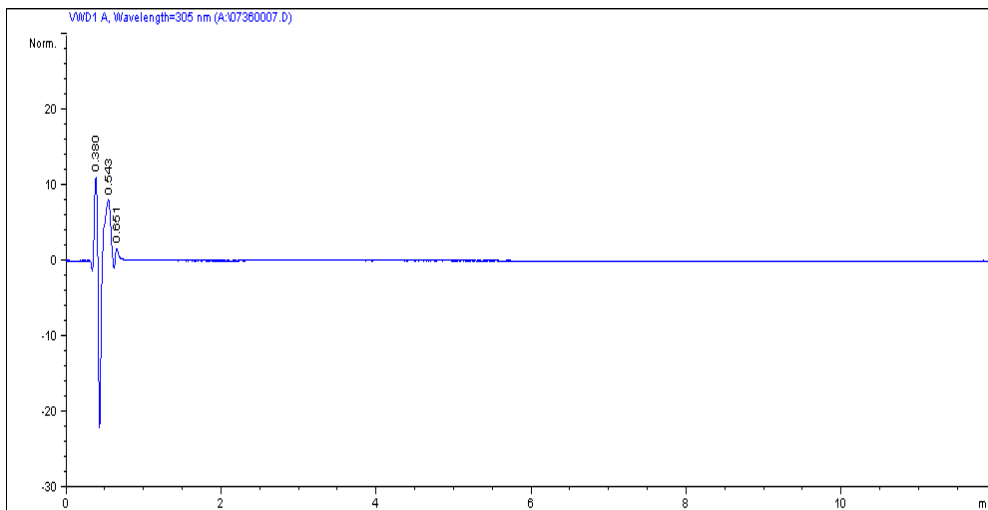


Figura 25. Cromatograma del blanco



Selectividad

Los cromatogramas que se muestran a continuación se obtuvieron durante la evaluación de la prueba de especificidad que se llevo a cabo.

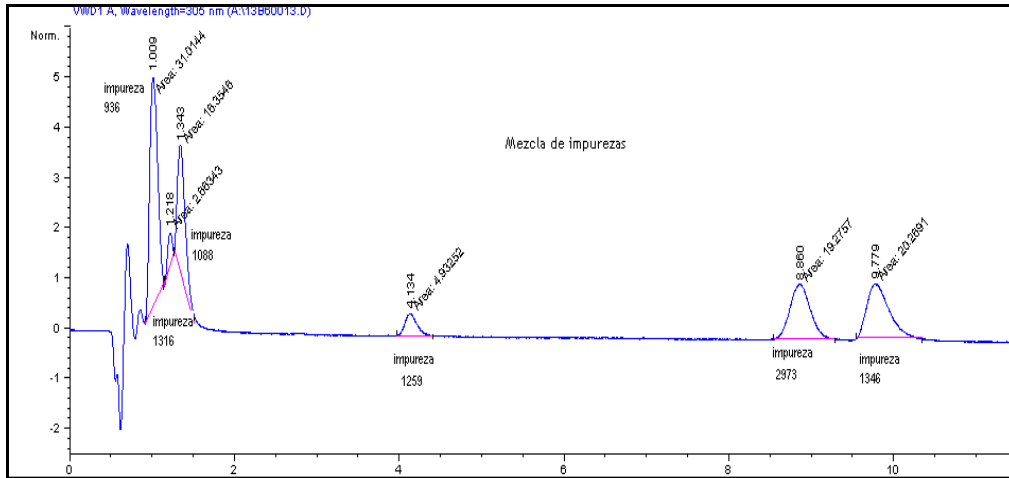


Figura 26. Solución estándar de la mezcla de impurezas (sin ampliación).

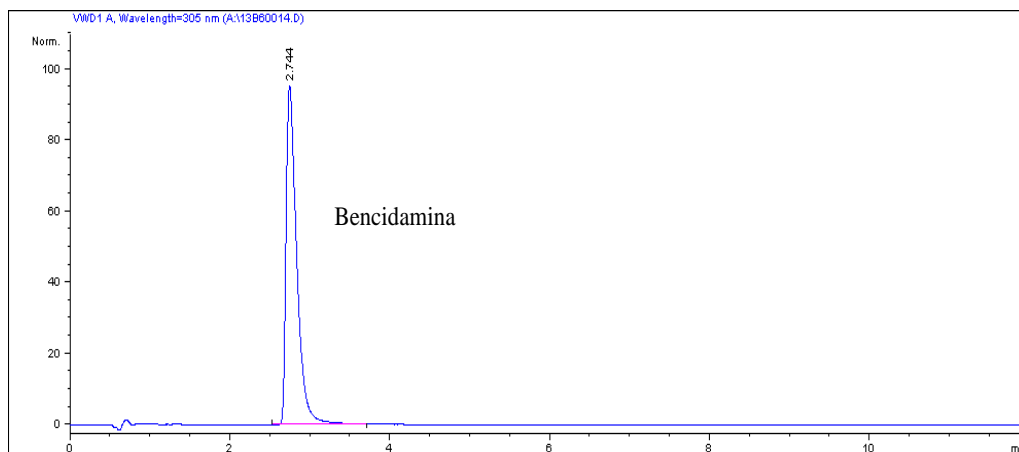


Figura 27. Solución de la mezcla de impurezas y estándar de clorhidrato de bencidamina (sin ampliación).

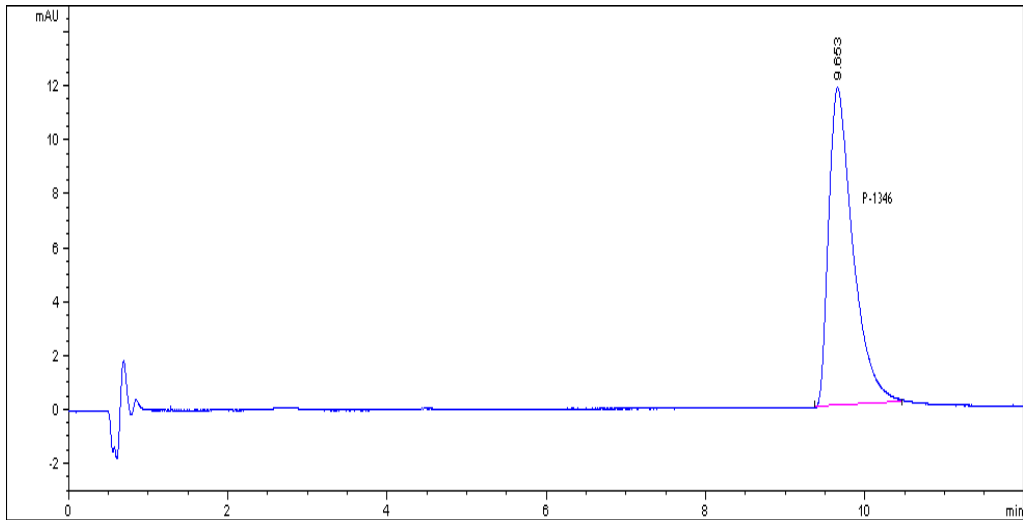


Figura 28. Solución estándar de la impureza AF 1346.

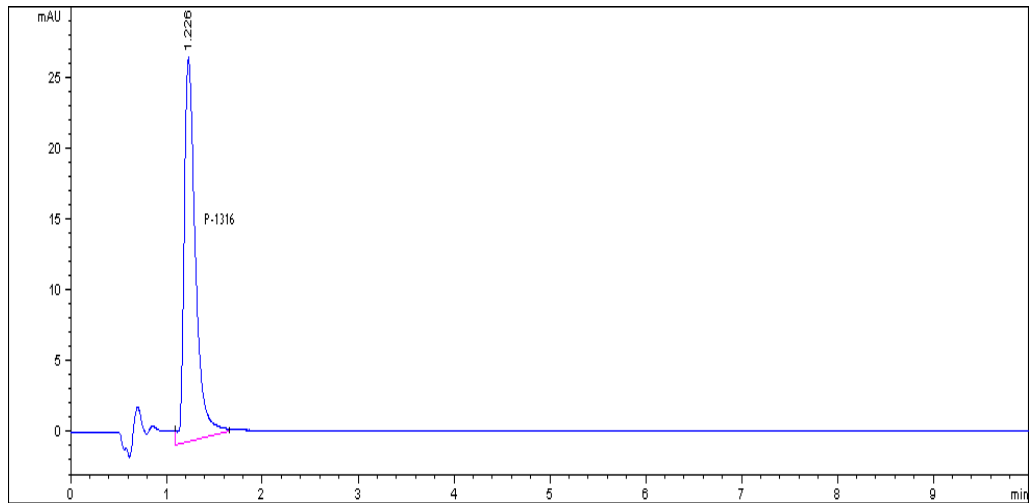


Figura 29. Solución estándar de la impureza AF 1316.

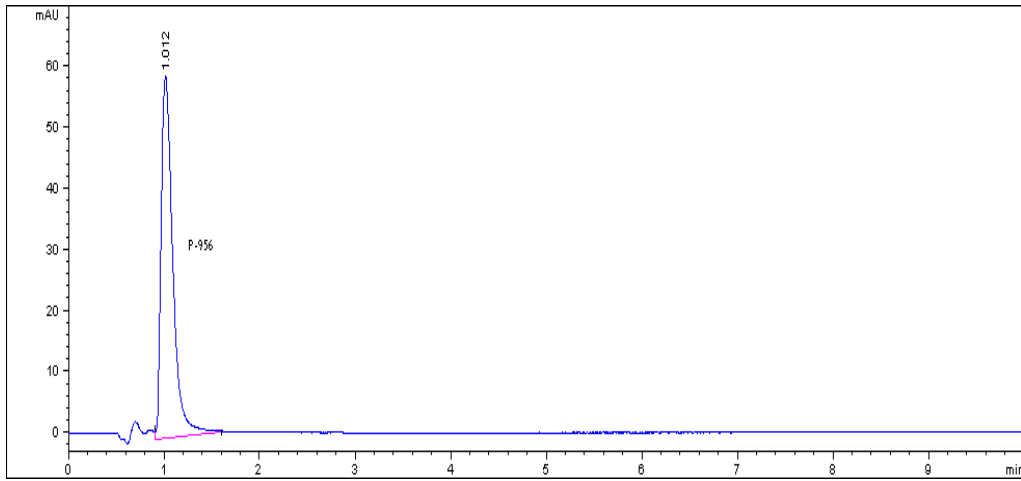


Figura 30. Solución estándar de la impureza AF 956.

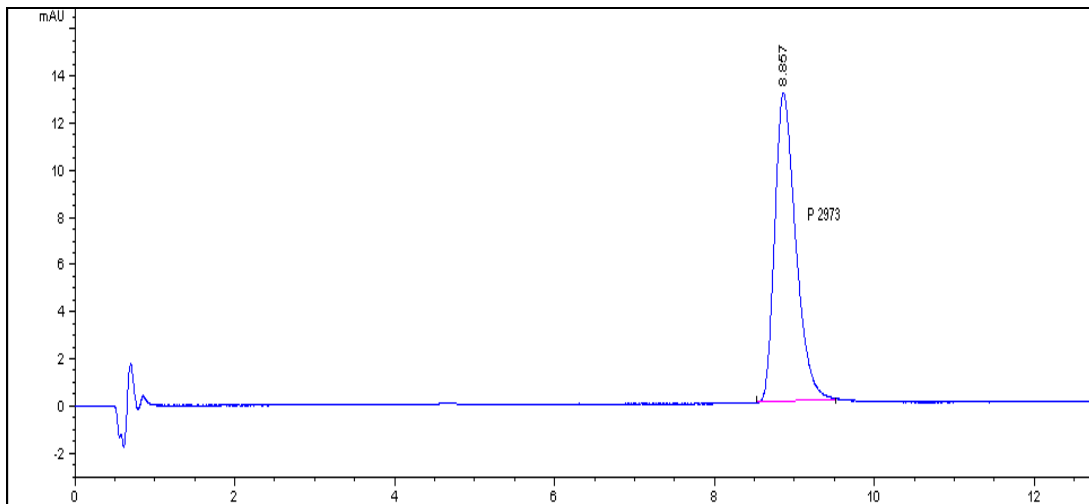


Figura 31. Solución estándar de la impureza AF 2973.

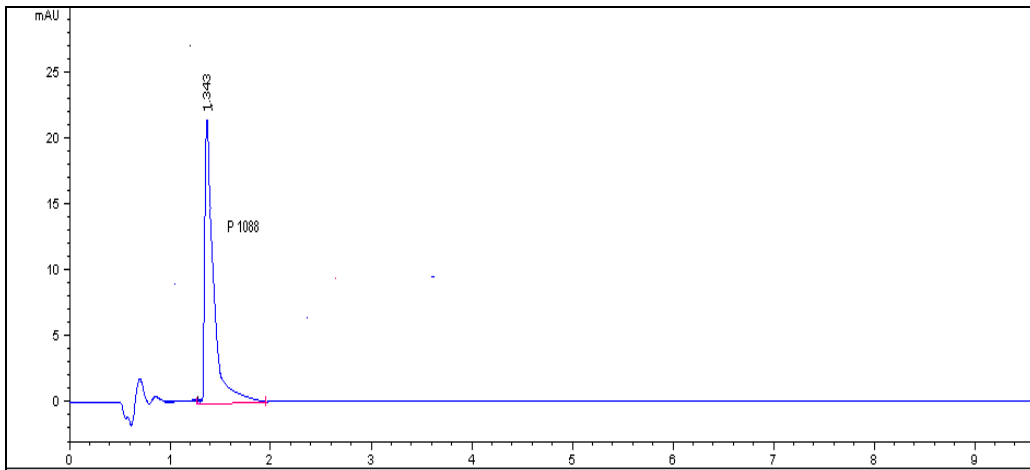


Figura 32. Solución estándar de la impureza AF 1088

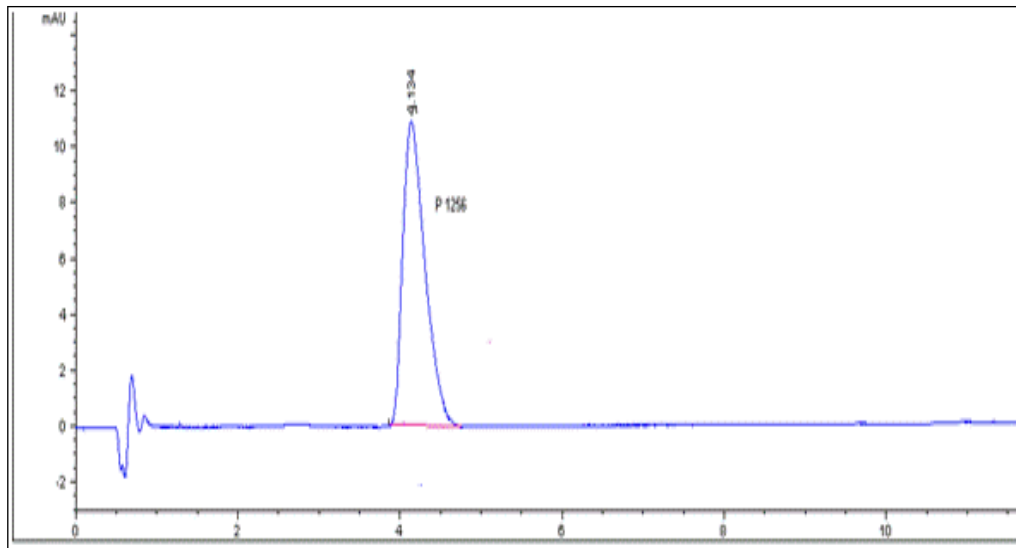


Figura 33. Solución estándar de la impureza AF 1246



Tolerancia

Los siguientes cromatogramas pertenecen al cambio de fase móvil realizado en la prueba de tolerancia en los que se observa que el tiempo de retención no se modifica ± 1 minuto.

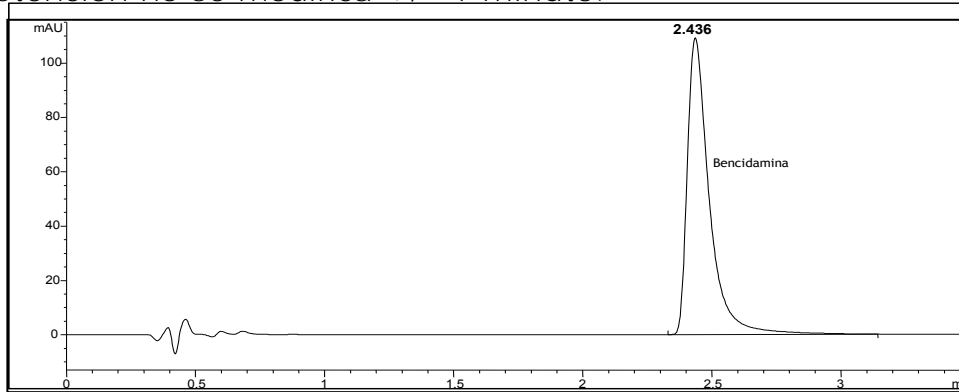


Figura 34.-Fase móvil normal acetonitrilo: Solución de lauril sulfato de sodio (55:45).

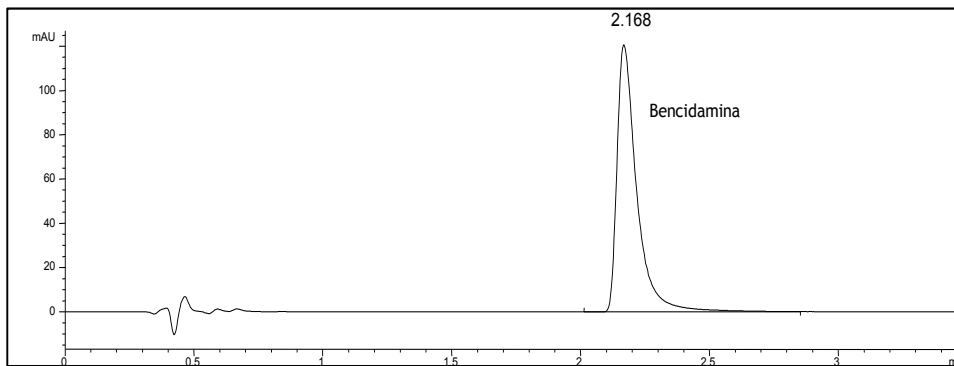


Figura 35.-Fase móvil acetonitrilo: Solución de lauril sulfato de sodio +5% ACN (57.75:45).

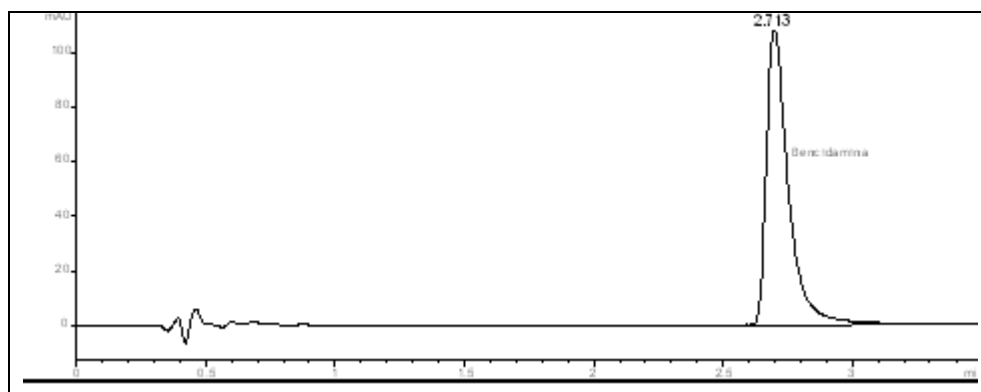


Figura 36.- Fase móvil acetonitrilo: Solución de lauril sulfato de sodio + 5% LLS (55:47.25)



Comparación entre columnas

A continuación se observan los cromatogramas obtenidos por cada columna utilizada, en los que se puede observar el tiempo de retención obtenido.

Columna Zorbax eclipse XDB

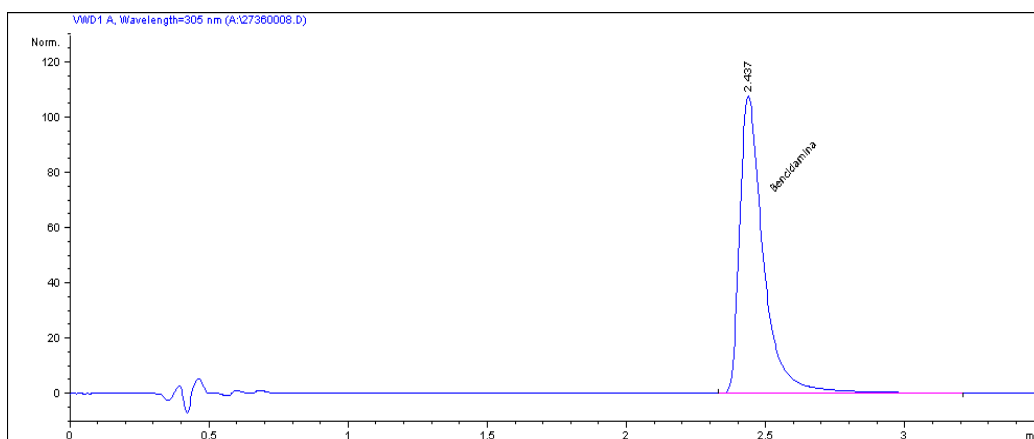


Figura 37. Solución estándar de clorhidrato de bencidamina al 100% obtenido con la columna zorbax eclipse XDB

Columna Purospher

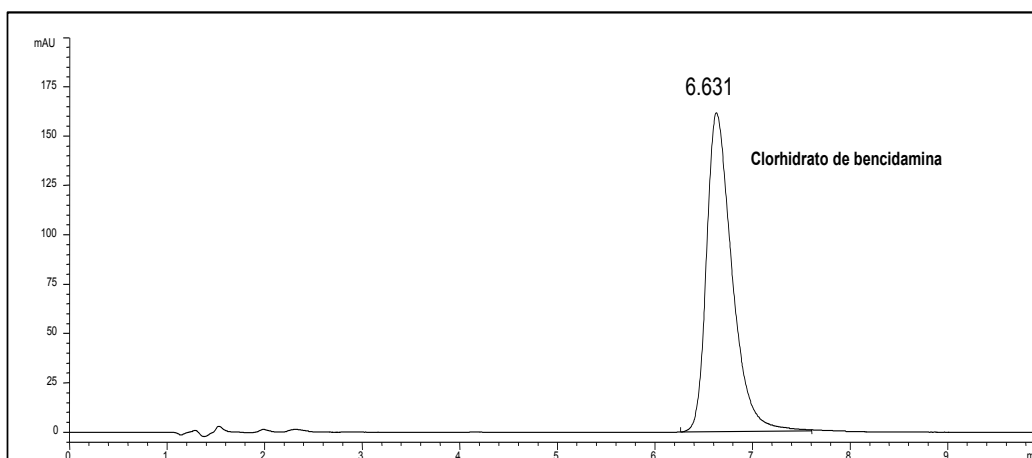


Figura 38. Solución estándar de clorhidrato de bencidamina al 100% obtenido con la columna purospher



VIII
VIII
BIBLIOGRAFIA
BIBLIOGRAFIA



1. - A. Nguyen Minh Nguyet, A.M. van Nederkassel, L. Tallieu, S. Kuttatharmmakul, E. Hunda, Y. Hua, J. Smeyers-Verbeke, Y. Vander Heyden. Statistical method comparison: short- and long-column liquid chromatography assays of ketoconazole and formaldehyde in shampoo. *Analytica chimica acta*. 516 (2004). pag 87-106
- 2.- Wang Jian, E. Moore Douglas, A study of the photodegradation of benzydamine in pharmaceutical formulations using HPLC with diode array detection., *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis.*, Vol 10 No 7, 1992., pág: 535-540, Sidney Australia.
3. - Vargas Franklin, Rivas Carlos y ETAL, Photodegradation of benzydamine: phototoxicity of an isolated photoproduct on erythrocytes. *Journal of pharmaceutical science*, Vol 82 No 4, 1993, pág: 371-372.
4. - Giuseppe Carlucci, Pietro Mazzeo. High-performance liquid chromatographic determination of 1-benzyl-1H-indazol-3-ol in benzydamine in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.*, 14 (1996), pág: 655-657.
- 5.- Diccionario de Química y productos químicos, HAWLEY, Revisado por N. Irvingsax/Richard J. Lewis, SR; Ediciones Omega S.A., 1993, pp 723
- 6.- **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, Edited by Anthony C. Moffat**, M. David Osselton and Brian Widdop, Vol II, Third Edition 2004., PpP Pharmaceutical Press London Chicago, pp 689-690.
7. - British Pharmacopoeia Volumen I., United Kingdom., 2002., pp 208-209.
8. - Douglas E. Moore and Jian Wang. Electron-transfer mechanisms in photosensitization by the anti-inflammatory drug benzydamine. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.*, 43 (1998)., 175-180.
- 9.- Douglas E. Moore., Drug-Induced Cutaneous Photosensitivity Incidence, Mechanism, Prevention and Management., *Drug safety.*, 25 (5) 2002., 345-372.
- 10.- AF 1316, AF 2973, AF 1088, AF 956, AF 1259, AF 1346 Impurezas de clorhidrato de bencidamina información obtenida de Angelini Proveedor.



- 11.- Franklin Vargas, Carlos Rivas, Rubén Machado, Zaideth Sarabia, and I. Lopez. Photoproducts of benzydamine and azapropazone: demonstration of their phototoxicity in vitro., Journal Photochemistry and Photobiology B: Biology. Jan 17(1) (1993)., 41-45.
- 12.- British Pharmacopoeia Volumen I., United Kingdom., 2002., pp 1962.
- 13.- Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, DEF. Edición 49, México 2003, Thomson PLM.
- 14.- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Octava edición México 2004 Vol.1 Métodos Generales de Análisis 0241. Cromatografía, pág: 367-383.
- 15.-The United States Pharmacopeia, USP 28, NF 23, 2004, <621> Chromatography
16. - Principles and Practice of Chromatography by Raymond P. W. Scott, part of the Chrom-Ed. Tomado de <http://www.chromatography-online.org/Principles/contents.html>
- 17.- Willard H; Merritt L. L; Dean A.J; Métodos instrumentales de análisis, capítulos 15, 17-18. Compañía Editorial Continental S.A. de C.V. México 1981.
- 18.- Metodos fisicoquímicos en biotecnología, trabajos de investigación, cromatografía de fase reversa. Tomado de <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Cromatografia>.
- 19.- Cromatografía de líquidos de alta resolución. Tema 4, tomado de <http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8248/4/T4cromatliquid.pdf>
- 20.- Oscar Alberto Quattrocchi, Sara Inés Abelaira de Andrizzi, Raúl Felipe Laba., Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica., Impreso en la Argentina en Artes Gráficas SA, California 2750/50, (1289) Buenos Aires., 1992.
- 21.- Skoog A.D., West M.D. Análisis instrumental : Capítulo 26.- Introducción a los métodos cromatograficos. Nueva editorial interamericana, 1991.



- 22.- Principles and practice of cromatography tomado de <http://www.chromatography-online.org/1/contents.html>
- 23.- HPLC Basis tomado de <http://www.forumsci.co.il/HPLC>
24. - David Harvey. Química Analítica Moderna., 2002., Mc Graw Hill., Cap 12.
25. - Enciclopedia of pharmaceutical Technology, second edition Volumen 1 A-D, edited by James Swarbrick and James C. Boylan. 2002 Marcel Dekker, Inc. pag: 414-425.
26. - Eventos & Formación > Primers > HPLC - High Performance Liquid Chromatography, tomado de http://www.waters.com/waters/es_ES/
27. - J. T. Carstensen and C. T. Rhodes. Drug Stability: Principles and Practices third Edition Revised, and Expanded: Principles and Practices (Drugs and the Pharmaceutical Sciences) **Taylor & Francis** 2000 pág. 329-385
- 28.- Química analítica.Tutoriales de cromatografía. Cromatografía líquida de alta eficiencia tomado de <http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/hplc.htm>
29. - Pungor E., A Practical Guide to Instrumental Analysis., CRC Press, Inc., U.S.A., 1995.
30. - Lubor Urbánek, Dagmar Solichova, Bohuslav Melichar, Josef Dvorak. Optimization and validation of a high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E in human serum using monolithic column and diode-array detection. Analytica chimica acta (2006). Pag 1-6.
- 31.- R.Dams, W.E. Lambert, K.M. Clauwaert, A.P. De Leenheer. Comparison of phenyl-type columns in the development of a fast liquid chromatographic system for eighteen opiates commonly found in forensic toxicology. Journal of chromatography A 896 (2000) pág: 311-319.
32. - Leslie A. Romanyshyn, Philip R. Tiller. Ultra-sorth columns and ballistic gradients: considerations for ultra-fast chromatographic liquid chromatographic-tandem mass spectrometric analysis. Journal of chromatography A, 928 (2001) pág: 41-51



33. - Christopher M. Riley, W. John Lough, Irving Wainer. Pharmaceutical and biomedical applications of liquid chromatography, capítulos 3,10. Pergamont edit. 1994
34. - D. Broske Alan, D. Ricker Robert, J. Permar Bernard, Chen Wu, Joseph Maureen. The influence of sub-two micron particles on HPLC performance. Agilent Technologies 2003, pág: 1-7
- 35.- Flores Lugo Lidia. Validación del método de valoración de acipimox en cápsulas por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), tesis. UNAM México 1996.
36. - Satinder Ahuja Michael W Dong .Validation of HPLC Methods. Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC .Volumen 6 pag 191-218 (2005)
- 37.- W.R.G. Baeyens, G. Van der Weken, E. Smet, A.M. García-Campaña, J.P. Remon. Comparison of morphine and hydromorphone analysis on reversed phase columns with different diameters. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 32 (2003) pág: 913-920
38. - q2a Validation of analytical procedure: methodology., tripartite International Conference on Harmonisation (ICH) Text., London., 6 November 1996guiaq2a
- 39.- Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. **"Guía de validación de métodos analíticos. Edición 2002. México.** Comisión de validación de métodos analíticos. METODOS ANALÍTICOS GUÍA DE VALIDACIÓN. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C., 2002.
- 40.-Intelligent Speed (**IS™**) Columns, tomado de la biblioteca de documentación.
<http://www.waters.com/waters/library.htm?lid=1531268&cid=511436>
- 41.- Gonzales Marquez Yareni. Tesis: Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de clorhidrato de bencidamina en crema mediante cromatografía de líquidos de alta resolución. Facultad de química UNAM, septiembre 2006.