



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA

ALBENDAZOL TABLETAS 200 mg/tab

PROPUESTO EN LA USP 38

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA**

PRESENTA

GUADALUPE DE LA ROSA CORTÉS

ASESOR DEL TEMA

EDUARDO RODRÍGUEZ DE SAN MIGUEL GUERRERO



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



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: Profesor: Rodríguez de San Miguel Guerrero Eduardo

VOCAL: Profesor: López Santiago Norma Ruth

SECRETARIO: Profesor: Gama González Silvia Citlalli

1er. SUPLENTE: Profesor: González Rodríguez Xochiquetzal

2° SUPLENTE: Profesor: Rivera Cárdenas Claudia Inés

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LAB. 113, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

EDUARDO RODRÍGUEZ DE SAN MIGUEL GUERRERO

SUSTENTANTE:

GUADALUPE DE LA ROSA CORTÉS

0.0 CONTENIDO

0.1	Índice de tablas	iv
0.2	Índice de figuras	vi
1.0	RESUMEN	1
2.0	INTRODUCCIÓN	2
2.1	Planteamiento del problema	3
2.2	Objetivos	4
2.2.2	Particulares	4
2.3	Hipótesis.....	5
3.0	JUSTIFICACIÓN	6
4.0	MARCO TEÓRICO	7
4.1	Albendazol.....	7
4.2	Datos químicos	7
4.3	Validación de métodos analíticos	8
4.4	Cromatografía	9
4.4.1	Cromatografía de líquidos de alta resolución	10
4.4.2	Antecedentes de la metodología para Albendazol tabletas establecida en la USP 38.....	11
PARTE EXPERIMENTAL		13
5.0	PARÁMETROS EVALUADOS	14
6.0	MATERIAL Y EQUIPO	15
7.0	REACTIVOS Y ESTÁNDARES DE REFERENCIA.....	16
8.0	METODOLOGÍA.....	17
8.1	Metodología para las soluciones de la prueba de valoración de Albendazol en tabletas de 200 mg/tab	17
8.2	Condiciones cromatográficas.....	20
8.3	Procedimiento	20
8.4	Adecuabilidad	21
8.5	Cálculos.....	22
8.6	Criterios de aceptación	23
8.7	Cromatogramas del método analítico	24
8.8	Parámetros, metodologías y criterios de aceptación para la evaluación del método analítico	26
8.9	Metodología para la verificación de la prueba de valoración de Albendazol tabletas 200 mg/tab.....	28
8.9.1	Efecto de filtro en la solución muestra y solución estándar	28
8.9.2	Especificidad.....	30
8.9.3	Linealidad del sistema	37
8.9.4	Exactitud	39
8.9.5	Repetibilidad	41
8.9.6	Precisión intermedia	42
8.9.7	Estabilidad de la solución muestra y estándar	43
9.0	DISCUSIÓN Y RESULTADOS	45
9.1	Especificidad.....	45
9.1.1	Balanza de masa	57
9.2	Linealidad del sistema.....	59
9.3	Exactitud.....	63
9.4	Repetibilidad	66
9.5	Precisión intermedia.....	67
9.6	Efecto de filtro en la solución muestra y solución estándar	69

9.7	Estabilidad de la solución	72
10.0	CONCLUSIÓN GENERAL	78
11.0	REFERENCIAS	79
12.0	ANEXOS.....	81
	Anexo I. Fórmulas y cálculos representativos.....	81
	Anexo II. Definiciones.....	85

0.1 Índice de tablas

TABLA 01.	PARÁMETROS A EVALUAR.....	6
TABLA 02.	CARACTERÍSTICAS DEL ALBENDAZOL	7
TABLA 03.	CARACTERÍSTICAS DEL PARBENDAZOL (SUSTANCIA UTILIZADA CON ESTÁNDAR INTERNO)	8
TABLA 04.	CRITERIOS ESTABLECIDOS PARA LOS PARÁMETROS DE ADECUABILIDAD	22
TABLA 05.	PARÁMETROS, METODOLOGÍAS Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN.....	26
TABLA 06.	TRATAMIENTO DE MUESTRAS PARA EVALUACIÓN DE FILTRO.	29
TABLA 07.	PREPARACIÓN DE CURVA PARA LINEALIDAD DEL SISTEMA.....	38
TABLA 08.	PREPARACIÓN DE CURVA PARA EXACTITUD.	39
TABLA 09.	PREPARACIÓN DE REPETIBILIDAD	41
TABLA 10.	PRECISIÓN INTERMEDIA.....	42
TABLA 11.	CONDICIONES DE DEGRADACIÓN FORZADA EN PRODUCTO TERMINADO.....	47
TABLA 12.	BALANCE DE MASAS PARA ESPECIFICIDAD DE ALBENDAZOL	57
TABLA 13.	CONCENTRACIÓN DE DATOS DE RESPUESTA PARA LA LINEALIDAD DE SISTEMA DE ALBENDAZOL	59
TABLA 14.	RESULTADOS ESTADÍSTICOS GLOBALES PARA LA LINEALIDAD DEL SISTEMA	60
TABLA 15.	RESULTADOS DE LOS PROMEDIOS POR NIVEL OBTENIDOS PARA LA LINEALIDAD	61
TABLA 16.	EXACTITUD DEL MÉTODO PARA ALBENDAZOL.....	63
TABLA 17.	RESULTADOS ESTADÍSTICOS PARA LA PRUEBA DE EXACTITUD.....	64
TABLA 18.	EXACTITUD POR NIVEL PARA ALBENDAZOL	65
TABLA 19.	REPETIBILIDAD DEL MÉTODO PARA ALBENDAZOL.....	66
TABLA 20.	RESULTADOS PARA LA PRECISIÓN INTERMEDIA DE ALBENDAZOL.	67
TABLA 21.	EFEECTO DE FILTRO NYLON 0.45 μ M EN EL ESTÁNDAR.....	69
TABLA 22.	EFEECTO DE FILTRO NYLON 0.45 μ M EN LA MUESTRA	69
TABLA 23.	EFEECTO DE FILTRO PVDF 0.45 μ M EN EL ESTÁNDAR.....	70
TABLA 24.	EFEECTO DE FILTRO PVDF 0.45 μ M EN LA MUESTRA.....	70

TABLA 25.	ESTABILIDAD DEL ESTÁNDAR DE ALBENDAZOL EN CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO (INYECTOR) 24 HRS PARA ESTÁNDAR Y MUESTRAS.....	72
TABLA 26.	ESTABILIDAD DEL ESTÁNDAR DE ALBENDAZOL EN CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO (INYECTOR) 48 HRS PARA ESTÁNDAR Y MUESTRAS.....	73
TABLA 27.	ESTABILIDAD DEL ESTÁNDAR DE ALBENDAZOL EN CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO (INYECTOR) 72 HRS PARA ESTÁNDAR Y MUESTRAS.....	73
TABLA 28.	ESTABILIDAD DEL ESTÁNDAR DE ALBENDAZOL EN CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO (MESA DE TRABAJO) 24 HRS PARA ESTÁNDAR Y MUESTRAS.....	74
TABLA 29.	ESTABILIDAD DEL ESTÁNDAR DE ALBENDAZOL EN CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO (MESA DE TRABAJO) 48 HRS PARA ESTÁNDAR Y MUESTRAS.....	74
TABLA 30.	ESTABILIDAD DEL ESTÁNDAR DE ALBENDAZOL EN CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO (MESA DE TRABAJO) 72 HRS PARA ESTÁNDAR Y MUESTRAS.....	75
TABLA 31.	ESTABILIDAD DEL ESTÁNDAR DE ALBENDAZOL EN CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO (REFRIGERADOR) 24 HRS PARA ESTÁNDAR Y MUESTRAS	75
TABLA 32.	ESTABILIDAD DEL ESTÁNDAR DE ALBENDAZOL EN CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO (REFRIGERADOR) 48 HRS PARA ESTÁNDAR Y MUESTRAS	76
TABLA 33.	ESTABILIDAD DEL ESTÁNDAR DE ALBENDAZOL EN CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO (REFRIGERADOR) 72 HRS PARA ESTÁNDAR Y MUESTRAS	76

0.2 Índice de figuras

FIGURA 01.	ESQUEMA PARA UN EQUIPO DE HPLC	11
FIGURA 02.	CROMATOGRAMA TIPO DE LA SOLUCIÓN BLANCO	24
FIGURA 03.	CROMATOGRAMA TIPO DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR	24
FIGURA 04.	CROMATOGRAMA TIPO DE LA SOLUCIÓN MUESTRA	25
FIGURA 05.	CROMATOGRAMA TIPO DE LA SOLUCIÓN BLANCO	45
FIGURA 06.	CROMATOGRAMA TIPO DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR	46
FIGURA 07.	CROMATOGRAMA TIPO DE LA SOLUCIÓN PLACEBO CON ESTÁNDAR INTERNO	48
FIGURA 08.	CROMATOGRAMA TIPO DE LA SOLUCIÓN MUESTRA CON ESTÁNDAR INTERNO (PRODUCTO TERMINADO CADUCO)	48
FIGURA 09.	ESPECTROS EXTRAÍDOS CORRESPONDIENTES AL PICO DE ALBENDAZOL Y GRÁFICO DE PUREZA DE PICO.....	49
FIGURA 10.	ANÁLISIS DE PUREZA DE ALBENDAZOL Y DEL PARBENDAZOL EN LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR.	50
FIGURA 11.	CROMATOGRAMA TIPO DE LA SOLUCIÓN PLACEBO DEGRADADA A 80°C DURANTE UN PERIODO DE 6 DÍAS.....	51
FIGURA 12.	ANÁLISIS DE PUREZA DEL PARBENDAZOL EN LA SOLUCIÓN PLACEBO DEGRADADA A 80°C DURANTE UN PERIODO DE 5 DÍAS.....	51
FIGURA 13.	CROMATOGRAMA TIPO DE LA SOLUCIÓN MUESTRA DEGRADADA A 80°C DURANTE UN PERIODO DE 6 DÍAS.....	52
FIGURA 14.	ANÁLISIS DE PUREZA DE LA SOLUCIÓN MUESTRA DEGRADADA A 80°C DURANTE UN PERIODO DE 6 DÍAS.....	52
FIGURA 15.	CROMATOGRAMA TIPO DE LA SOLUCIÓN PLACEBO DEGRADADA A CONDICIONES DE HUMEDAD DURANTE UN PERIODO DE 6 DÍAS.....	53
FIGURA 16.	ANÁLISIS DE PUREZA DE LA SOLUCIÓN PLACEBO DEGRADADA A CONDICIONES DE HUMEDAD DURANTE UN PERIODO DE 6 DÍAS.....	53

FIGURA 17. CROMATOGRAMA TIPO DE LA SOLUCIÓN MUESTRA DEGRADADA A CONDICIONES DE HUMEDAD DURANTE UN PERIODO DE 6 DÍAS.....	54
FIGURA 18. ANÁLISIS DE PUREZA DE LA SOLUCIÓN MUESTRA DEGRADADA A CONDICIONES DE HUMEDAD DURANTE UN PERIODO DE 6 DÍAS.....	54
FIGURA 19. CROMATOGRAMA TIPO DE LA SOLUCIÓN PLACEBO DEGRADADA A CONDICIONES OXIDANTES DURANTE 15 MIN	55
FIGURA 20. ANÁLISIS DE PUREZA DE LA SOLUCIÓN PLACEBO DEGRADADA A CONDICIONES OXIDANTES DURANTE 15 MIN.....	55
FIGURA 21. CROMATOGRAMA TIPO DE LA SOLUCIÓN MUESTRA DEGRADADA A CONDICIONES OXIDANTES DURANTE 15 MIN	56
FIGURA 22. ANÁLISIS DE PUREZA DE LA SOLUCIÓN MUESTRA DEGRADADA A CONDICIONES OXIDANTES DURANTE 15 MIN	56
FIGURA 23. GRÁFICA PARA LA LINEALIDAD DE ALBENDAZOL TABLETAS 200 MG/TAB A 5 NIVELES DE CONCENTRACIÓN	60
FIGURA 24. GRÁFICO DE RESIDUALES PARA LA LINEALIDAD	61
FIGURA 25. GRÁFICA PARA LA EXACTITUD DE ALBENDAZOL TABLETAS 200 MG/TAB A 5 NIVELES DE CONCENTRACIÓN	64

1.0 RESUMEN

En esta tesis se evaluó el comportamiento de la metodología para la valoración de Albendazol en tabletas de 200 mg/tab establecida en la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica (USP, por sus siglas en inglés). Al ser un método analítico de carácter farmacopeico, fue necesario establecer las pruebas necesarias para llevar a cabo una validación parcial del método con la finalidad de probarlo y asegurar su confiabilidad.

Los resultados obtenidos en las pruebas fueron satisfactorios y se concluyó que el método propuesto es específico, selectivo y lineal en un intervalo de concentración entre 0.04 y 0.32 mg/mL, exacto y preciso entre 0.14-0.26 mg/mL y cumple con los criterios de aceptación establecidos para cada una de las pruebas evaluadas.

El método propuesto y validado se considera como método indicativo de estabilidad, ya que tiene la capacidad de predecir el comportamiento químico del principio activo presente en la tableta recubierta de Albendazol 200 mg/tab.

2.0 INTRODUCCIÓN

En la industria farmacéutica la calidad de los productos está sujeta a diversos requerimientos establecidos por las autoridades sanitarias (Buenas prácticas de fabricación, NOM-059-SSA-2015) ⁽¹⁾. Dentro de estos requerimientos, se encuentra la validación de los métodos analíticos para garantizar la aplicabilidad de éstos a sus productos ya que es mediante el análisis de los mismos que se comprueba la calidad de los lotes fabricados.

De acuerdo con las regulaciones de nuestro país, es necesario que los métodos de prueba del área farmacéutica que se utilizan para asegurar la precisión y fiabilidad de los productos fabricados, sean regidos por compendios de carácter internacional llamados farmacopeas.

Las principales farmacopeas reconocidas son: USP (Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica, por sus siglas en inglés), FEUM (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos), BP (Farmacopea Británica por sus siglas en inglés), EP (Farmacopea Europea por sus siglas en inglés), JP (Farmacopea Japonesa por sus siglas en inglés).

Por el interés de este proyecto se utilizó la metodología indicada para prueba de valoración en Albendazol tabletas en la USP 38.

2.1 Planteamiento del problema

El método analítico utilizado para la valoración de Albendazol en tabletas de 200 mg/tab es de carácter farmacopeico ⁽²⁾. Debido a esto, es necesario comprobar que el método funciona bajo las condiciones presentes en el laboratorio.

Se requiere de una validación parcial, es decir, se busca una confirmación de que el método analítico cumple con los criterios de aceptación descritos en el numeral 8.0 de este trabajo para cada una de las pruebas y que funciona tal cual está establecido en la USP 38.

Con esta información será posible confirmar que el método cumple de forma confiable con la cuantificación de Albendazol en tabletas de 200 mg/tab, propósito para el que fue diseñado.

2.2 Objetivos

2.2.1 General

- Verificar el método analítico establecido en la USP 38 para Albendazol en su forma farmacéutica de tabletas con contenido de 200 mg/tab. Asegurar que emita resultados confiables, precisos y reproducibles, por lo tanto será un indicador de calidad para el producto liberado al mercado.

2.2.2 Particulares

- Llevar a cabo una comprobación experimental del método de valoración para cuantificación de Albendazol tabletas, planteada en la USP 38.
- Determinar las condiciones ideales de trabajo para una prueba de carácter farmacopeico.
- Determinar cuáles son las pruebas necesarias que debe incluir la validación parcial de un método compendial.
- Desarrollar individualmente las pruebas que se llevarán a cabo para realizar la verificación del método compendial.
- Obtener resultados confiables para que la metodología se pueda utilizar en los análisis de rutina.

2.3 Hipótesis

- Si la USP es un compendio de métodos reconocido a nivel mundial, entonces será posible utilizar el método para la prueba de valoración en Albendazol tabletas 200 mg/tab y por lo tanto con la verificación quedará probado su uso en el laboratorio.
- Si se llevan a cabo las pruebas necesarias para la verificación de un método farmacopeico y éstas cumplen con los criterios de aceptación establecidos, entonces se puede decir que la prueba emite resultados confiables y por lo tanto se determina que el método es un indicador de calidad para los resultados obtenidos de Albendazol tabletas.

3.0 JUSTIFICACIÓN

Se realizará la verificación del método analítico para la cuantificación de Albendazol por HPLC en tabletas 200 mg/tab, con la finalidad de corroborar que el método descrito es aplicable para llevar a cabo un análisis de rutina y con ello asegurar la calidad, seguridad y eficacia del producto durante el tiempo de vida útil del mismo.

Dado que se trata de un método compendial, el cual se encuentra descrito en la USP 38 se realizará una validación parcial que contempla las pruebas especificadas en la Tabla 01.

Tabla 01. Parámetros a evaluar

Parámetro
Especificidad
Precisión
Linealidad
Exactitud
Repetibilidad
Precisión intermedia
Estabilidad de la solución muestra y estándar
Efecto de filtro

4.0 MARCO TEÓRICO

4.1 Albendazol

El Albendazol es un medicamento que se utiliza como antihelmíntico de amplio espectro, es decir, que se utiliza como tratamiento para infestaciones por vermes, helmintos o lombrices. Pertenece a la familia de los benzimidazoles, que son fármacos poco hidrosolubles y por su rápida absorción, actúan para erradicar las lombrices parásitas del cuerpo de forma completa y rápida. Dicha absorción es variable e irregular cuando es ingerido pero mejora con alimentos grasos y sales biliares. Cabe mencionar que la clasificación biofarmacéutica de este principio activo es de baja solubilidad pero alta permeabilidad⁽³⁾.

4.2 Datos químicos

Los datos químicos del analito se presentan en la Tabla 02 y los del estándar interno en la Tabla 03.

Tabla 02. Características del Albendazol

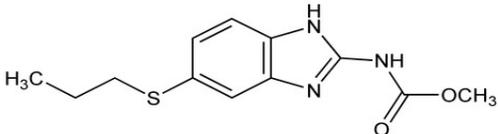
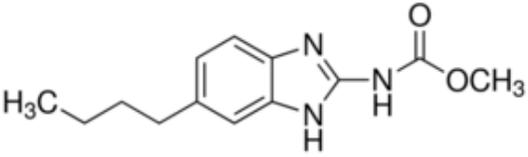
Propiedad	Albendazol
Nombre químico	Ácido <i>N</i> -[6-(Propil-tio)-1 <i>H</i> -benzimidazol-2-yl] carbámico metil éster
Fórmula condensada	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₂ S
Masa molar	265.33
Estructura	

Tabla 03. Características del Parbendazol (sustancia utilizada con estándar interno)

Propiedad	Parbendazol
Nombre químico	Metil (5-butyl-1 <i>H</i> -benzoimidazol-2-yl)carbamato, Metil 5(6)-butil-2-benzimidazol carbamato
Fórmula condensada	C ₁₃ H ₁₇ N ₃ O ₂
Masa molar	247.29
Estructura	

4.3 Validación de métodos analíticos

La validación de métodos analíticos es la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado. Así mismo, demuestra que a través de un proceso específico que se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y los atributos de calidad establecidos.

Es comprobación de que el método analítico mantiene sus características de exactitud, precisión y especificidad cuando existen cambios en la composición del producto, en el método analítico, cambios críticos en los procesos de fabricación, por citar algunos. Los parámetros de desempeño a comprobar dependerán de la naturaleza de los cambios efectuados. También llamada revalidación, co-validación (ver Anexo II para ver definiciones).

Validar es, de cierta manera, retar las condiciones del proceso analítico que se está proponiendo para que éste pueda ser utilizado como un método de rutina en el análisis de muestras. El tener métodos analíticos validados implica que se tiene evidencia de la efectividad y eficiencia del proceso que se está realizando. La USP indica que de acuerdo a las regulaciones para las buenas prácticas de manufactura es requisito que todos los métodos de prueba que se utilizan para evaluar el cumplimiento de productos farmacéuticos con especificaciones establecidas deben alcanzar estándares adecuados de exactitud y credibilidad. También de acuerdo con estas regulaciones, los usuarios de métodos analíticos descritos en la USP no requieren validar la exactitud y credibilidad de estos métodos, sin embargo, es necesario verificar la idoneidad del método bajo condiciones reales de uso. Es por eso que en esta tesis únicamente se llevó a cabo una verificación del método compendial y se hicieron los ajustes necesarios para que se adecuara a las condiciones disponibles en el laboratorio ⁽⁴⁾.

Además de que es un requerimiento regulatorio, la validación y verificación de métodos analíticos sirve como instrumento para asegurar la calidad de los datos que se están obteniendo y al implicar un conocimiento detallado del proceso analítico, es posible descartar al método como responsable de desviaciones o errores.

4.4 Cromatografía

Las técnicas de separación cromatográfica son métodos de separación multietapa en los que los componentes de una muestra se distribuyen entre dos fases, de las cuales

una es estacionaria y la otra es móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido soportado en un sólido o un gel. La fase estacionaria puede estar empacada en una columna, esparcida como una capa distribuida como una película. La fase móvil puede ser un fluido supercrítico gaseoso o líquido. La separación puede llevarse cabo por diferentes mecanismos en la adsorción, distribución de masa (partición), o intercambio de iones; o puede estar basada en las diferencias entre las propiedades fisicoquímicas de las moléculas, como son el tamaño, la masa y los cálculos de ciertos parámetros y describen requerimientos generales para la adecuación del sistema. Los tipos de cromatografía útiles en análisis cuali – cuantitativo son columna, gas, papel, capa fina y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés). En particular para desarrollar este proyecto se utilizó HPLC como técnica principal para cuantificación del analito de interés ⁽⁵⁾.

4.4.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución

HPLC es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida y es un sinónimo de cromatografía líquida a altas presiones.

Las separaciones, como ya se mencionó anteriormente, se logran por medio de procesos de partición, adsorción o intercambio de iones, dependiendo del tipo de fase estacionaria que se esté utilizando. Las fases estacionarias que más se utilizan en HPLC son de sílica modificada o cuentas poliméricas. Dichas cuentas son modificadas por medio de la adición de largas cadenas de hidrocarburos. El largo y el diámetro interno de la columna afectan también la separación. El tipo específico de empaque necesario para completar un análisis es indicado por la designación “L”

seguida de un número que determina el tipo de empaque que contiene la columna. En el término columna existen las de acero inoxidable, cubiertas de acero inoxidable y columnas poliméricas empacadas con fase estacionara. La fase móvil es un disolvente o la mezcla de varios dependiendo del analito que se esté estudiando ⁽⁵⁾.

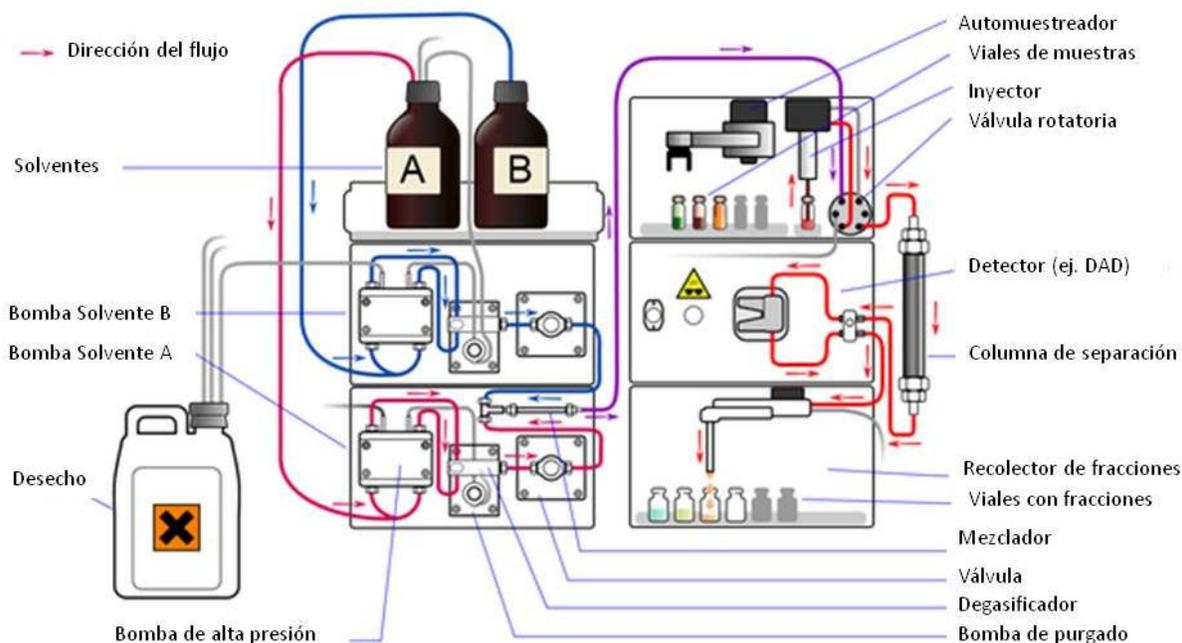


Figura 01. Esquema para un equipo de HPLC

Preparative HPLC apparatus. (2010) Recuperado de sitio web: https://en.wikipedia.org/wiki/Chromatography#/media/File:Preparative_HPLC.svg

4.4.2 Antecedentes de la metodología para Albendazol tabletas establecida en la USP 38

La farmacopea de los Estados Unidos establece una metodología de referencia para llevar a cabo las pruebas pertinentes que aseguran la calidad de un producto, sin embargo, es necesario corroborar que la metodología funciona con las condiciones que se tienen disponibles.

Se utilizaron como guías los lineamientos indicados en USP para la verificación de un método compendial y se parte del supuesto de que las condiciones marcadas en la metodología son las adecuadas para realizar el análisis. A continuación se muestran las condiciones cromatográficas planteadas en USP 38 para esta prueba:

- **Condiciones cromatográficas**

Columna: Ultrasphere ODS de 5 µm 250 x 4.6 mm

Flujo: 2.0 mL/min

Longitud de onda: 254 nm

Temperatura de la columna: no especificada por lo que se considera la temperatura ambiente (15 – 30 °C)

Volumen de inyección: 20.0 µL

Tiempo de corrida: 30 min

Fase móvil: (40:60) Fosfato monobásico de amonio: Metanol

Fue necesario probarlas para establecer las condiciones adecuadas del análisis de rutina.

Cabe mencionar que la farmacopea suele ser escueta en la descripción de sus métodos y la falta de detalle puede guiar al analista a omisiones, suposiciones o inclusive a errores analíticos. Por ellos fue necesario plantear el método de agitación mecánico, así como la temperatura del sistema y el tipo de filtro a utilizar.

Se busca que las condiciones sean óptimas para que los resultados emitidos por la prueba sean repetibles, precisos y confiables.

PARTE EXPERIMENTAL

5.0 PARÁMETROS EVALUADOS

Esta tesis proporciona los detalles de los criterios de aceptación y de las condiciones del método analítico para la cuantificación de Albendazol en tabletas 200mg/tab.

Los parámetros de desempeño evaluados fueron los indicados en la Tabla 01 (todas las pruebas se llevaron a cabo con respecto a la concentración nominal de Albendazol de 200 mg/tab).

6.0 MATERIAL Y EQUIPO

- Agitadores magnéticos
- Mortero de porcelana
- Material volumétrico común de laboratorio
- Acrodiscos con membrana de nylon y PVDF con tamaño de poro de 0.45 μm ,

Millipore

- Filtro para fase móvil, membrana de nylon 0.45 μm , Millipore
- Vial ámbar de rosca, 2 mL, para HPLC, Agilent technologies.
- Balanza semi microanalítica, Sartorius, BP211D
- Balanza ultra microanalítica, Sartorius, MSA2.75
- Balanza analítica, Sartorius, AC2105
- Baño de ultrasonido, S 900 H Elmasonic
- Cromatógrafo de Líquidos, Waters Alliance 2690 Módulo de separación
- Detector para cromatógrafo de líquidos con arreglo de diodos (DAD por sus siglas en inglés) Waters 2996
- Potenciómetro, Thermo Scientific, Orion 3 Star
- Centrifuga, Hermle Labnet, mod. 2323

7.0 REACTIVOS Y ESTÁNDARES DE REFERENCIA

- Lote PP01-15-06 de Albendazol tabletas 200 mg/tab.
- Sustancia de referencia de Albendazol, pureza 99.3% p/p, estándar secundario trazable a USP reference standards (USPRS) lote R02690.
- Sustancia de referencia Parbendazol, pureza 99.3 %p/p, Sustancia Padre: Albendazol.
- Agua purificada
- Metanol, grado HPLC, Tecsiquim
- Acido Sulfúrico RA (H_2SO_4), reactivo ACS 95-97%, Merck,
- Fosfato monobásico de amonio, reactivo ACS 99.0%, Merck
- Permanganato de potasio ($KMnO_4$), reactivo ACS $\geq 99.0\%$, Sigma Aldrich
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2), Perhydrol®, 30%, Merck

8.0 METODOLOGÍA

La información que se muestra a continuación es la que se establece como metodología final, es decir, la metodología validada.

8.1 Metodología para las soluciones de la prueba de valoración de Albendazol en tabletas de 200 mg/tab

- **Fase móvil**

Pesar aproximadamente y con exactitud 0.50 g de fosfato monobásico de amonio, y transferir a un vaso de precipitado de 1000 mL. Agregar 400 mL de agua y disolver con ayuda de un agitador magnético. Una vez disuelto adicionar 600 mL de metanol, mezclar la solución y filtrar a través de una membrana tipo Nylon de 0.45 µm. Degasificar con un baño ultrasónico durante un periodo de 5 min.

- **Ácido sulfúrico en metanol**

Preparar una mezcla de 1 mL de ácido sulfúrico RA en 99 mL de Metanol.

- **Solución de permanganato de potasio (0.085 M)**

Pesar alrededor de 1.34 g de KMnO_4 grado RA y transferir a un matraz volumétrico de 100 mL. Agregar 50 mL de agua purificada y agitar para disolver. Llevar a volumen con agua purificada y mezclar.

- **Solución de peróxido de hidrógeno 0.3%**

De la solución de peróxido de hidrógeno comercial tomar una alícuota de 10 mL y transferirla a un matraz volumétrico de 100 mL. Llevar a volumen con agua purificada y mezclar.

- **Preparación de estándar interno (EI)**

Pesar aproximadamente 150 mg de SRef Parbendazol transferir a un matraz volumétrico de 50 mL. Adicionar 5 mL de ácido sulfúrico en metanol, 25 mL de metanol y agitar mecánicamente por un periodo de 10 min. En caso de que éste no se disuelva, sonicar durante 1min. Una vez transcurrido el tiempo aforar con metanol y mezclar. Concentración aproximada: 3 mg/mL de Parbendazol.

- **Preparación de las soluciones estándar**

Pesar por duplicado aproximadamente 100 mg de SRef Albendazol y transferir a un matraz volumétrico de 50 mL. Adicionar 5 mL de ácido sulfúrico en metanol y 25 mL de metanol, agitar mecánicamente durante 10 min. Una vez transcurrido el periodo de tiempo, diluir a volumen con metanol y mezclar (*Solución stock de estándar. Concentración aproximada: 2 mg/mL*).

Transferir 5.0 mL de la *Solución stock de estándar* y 5.0 mL de la solución de estándar interno a un segundo matraz volumétrico de 50 mL, llevar a volumen con metanol y mezclar. Filtrar a través de acrodiscos tipo PVDF 0.45 µm desechando los primeros 5 mL de filtrado y verter 2 mL de muestra dentro de un vial de HPLC de color ámbar.

Concentración aproximada: 0.2 mg/mL de Albendazol y 0.3mg/mL de Parbendazol. Se denominan solución estándar 1 y solución estándar 2 a las soluciones preparadas en este punto.

- **Preparación de Muestra para Valoración**

Pesar y moler en un mortero de porcelana, hasta polvo fino, no menos de 30 tabletas. Transferir una porción del polvo equivalente a 100 mg de Albendazol (334 mg), a un matraz volumétrico de 50 mL. Adicionar 5 mL de ácido sulfúrico en metanol y 20 mL de metanol, colocar un agitador magnético en el matraz y agitar mecánicamente durante 20 minutos a 600 rpm. Una vez transcurrido el periodo de tiempo colocar el agitador magnético en el cuello del matraz y enjuagar al menos 5 veces con metanol. Retirar el agitador, diluir a volumen con metanol y mezclar. Dejar sedimentar la solución durante 15 min y del sobrenadante claro transferir una alícuota de 5.0 mL de muestra y 5.0 mL de solución de estándar interno a un segundo matraz volumétrico de 50 mL. Diluir a volumen con metanol y mezclar. Filtrar a través de acrodiscos tipo PVDF 0.45 μm desechando los primeros 5 mL de filtrado y verter 2 mL de muestra dentro de un vial de HPLC de color ámbar. Preparar esta solución por duplicado. Concentración aproximada: 0.2 mg/mL de Albendazol (ésta es la concentración considerada como 100% de Albendazol) y 0.3mg/mL de Parbendazol.

Nota: La solución estándar y la solución muestra son estables durante 72 horas en el automuestreador, en refrigerador (2 -8 °C) y en la mesa de trabajo (temperatura ambiente 15 – 30 °C) almacenadas en vial ámbar

8.2 Condiciones cromatográficas

Columna: Ultrasphere ODS de 5 µm 250 x 4.6 mm

Flujo: 1.0 mL/min

Longitud de onda: 254 nm

Temperatura de la columna: 30°C

Volumen de inyección: 20.0 µL

Tiempo de corrida: 30 min

Fase móvil: (40:60) Fosfato monobásico de amonio: Metanol

8.3 Procedimiento

Inyectar pruebas de blanco hasta obtener una línea base estable (ver figura 02), posteriormente inyectar pruebas de estándares hasta que el tiempo de retención sea constante (ver figura 03). Inyectar estándares y muestras de acuerdo a la siguiente secuencia de inyecciones:

- **Secuencia de inyecciones**

- Inyectar la solución blanco por duplicado.
- Inyectar por quintuplicado la solución estándar de valoración 1.
- Inyectar por triplicado la solución estándar de valoración 2.
- Inyectar la solución muestra 1 (el cromatograma debe ser similar al obtenido en la figura 04).
- Inyectar la solución muestra 2.
- Cada 6 inyecciones de muestra inyectar las soluciones estándar de valoración 1 y 2.
- El estándar de cierre de la secuencia analítica será con la inyección del estándar 1 y 2 de valoración.

8.4 Adecuabilidad

Permitir que la columna se acondicione durante un periodo no menor a 1 hora a flujo de trabajo, una vez acondicionada realizar un par de inyecciones de solución estándar para saturar la columna. Al término de las inyecciones de prueba verificar los parámetros de adecuabilidad indicados en la Tabla 04 mostrada a continuación (Ver cálculos en el Anexo I):

Tabla 04. Criterios establecidos para los parámetros de adecuabilidad

Parámetro de adecuabilidad	Criterio
Resolución entre el pico de Albendazol y Parbendazol	Mayor a 2.0
Factor de coleo para el pico de Albendazol	Menor a 2.0
Platos teóricos para el pico de Albendazol	Mayores a 2000
Desviación estándar relativa de las inyecciones repetidas de la solución estándar 1	Menor a 2.0%
Coefficiente de variación (%C.V.) entre las inyecciones de la solución estándar 1 y solución estándar 2	Menor a 2.0%

8.5 Cálculos

Calcular el área de los picos de Albendazol y Parbendazol (Estándar Interno) y determinar el *FR* (Factor Respuesta de Pico) de cada una de las inyecciones de preparación de Estándar y cada una de las preparaciones de Muestra de Valoración:

$$(FR) = \frac{Ws \times \text{ÁreaSTDInt} \times \text{Pureza del estándar} (\%)}{FDS \times \text{ÁreaSTD} \times 100}$$

Donde:

ÁreaSTDInt = área del pico de la solución estándar interno (Parbendazol)

ÁreaSTD = área del pico de la solución estándar (Albendazol)

FR = Factor respuesta

Ws = Peso del estándar (mg)

FDS = Factor de dilución del estándar (500)

Calcular el Factor Respuesta Promedio (*FRM*) para las preparaciones de la solución estándar y calcular el % de lo declarado de Albendazol en cada muestra conforme a la siguiente fórmula:

$$\text{Albendazol (\%de lo declarado)} = \frac{\text{ÁreaMtra} \times \text{FRM} \times \text{Pprom} \times \text{FDu} \times 100}{\text{ÁreaMtraSTDInt} \times \text{Wu} \times \text{D}}$$

Donde:

ÁreaMtra = área del pico de la muestra

FRM= Factor Respuesta Promedio de las preparaciones de estándar

FDu= Factor de dilución de la preparación de muestra (500)

Wu= Peso de la muestra (mg)

Pprom= Peso promedio de las tabletas (mg/tab)

D = Dosis (200mg/tab)

8.6 Criterios de aceptación

- El porcentaje de contenido de Albendazol (%de lo declarado) debe estar entre 90 – 110.0%.
- El %C.V. entre las inyecciones de muestra del mismo lote debe ser menor a 2.0%

8.7 Cromatogramas del método analítico

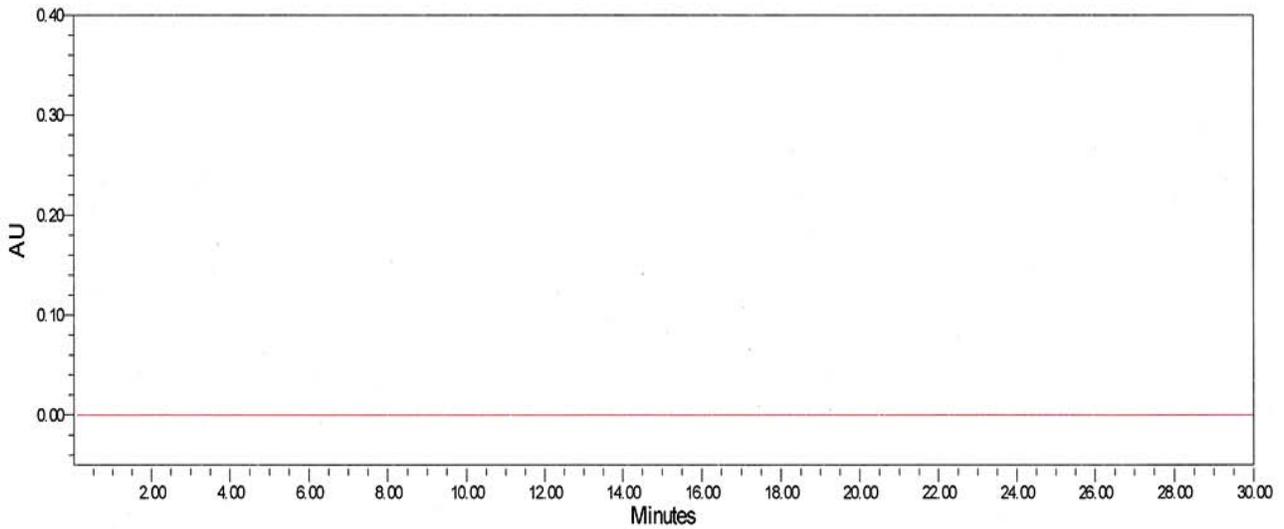


Figura 02. Cromatograma tipo de la solución blanco

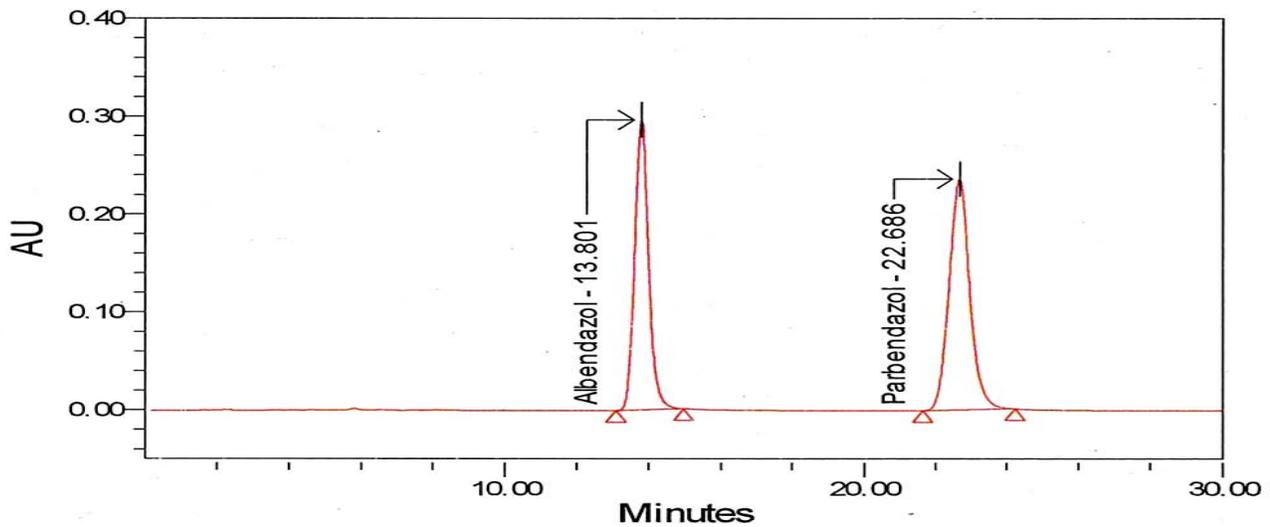


Figura 03. Cromatograma tipo de la solución estándar

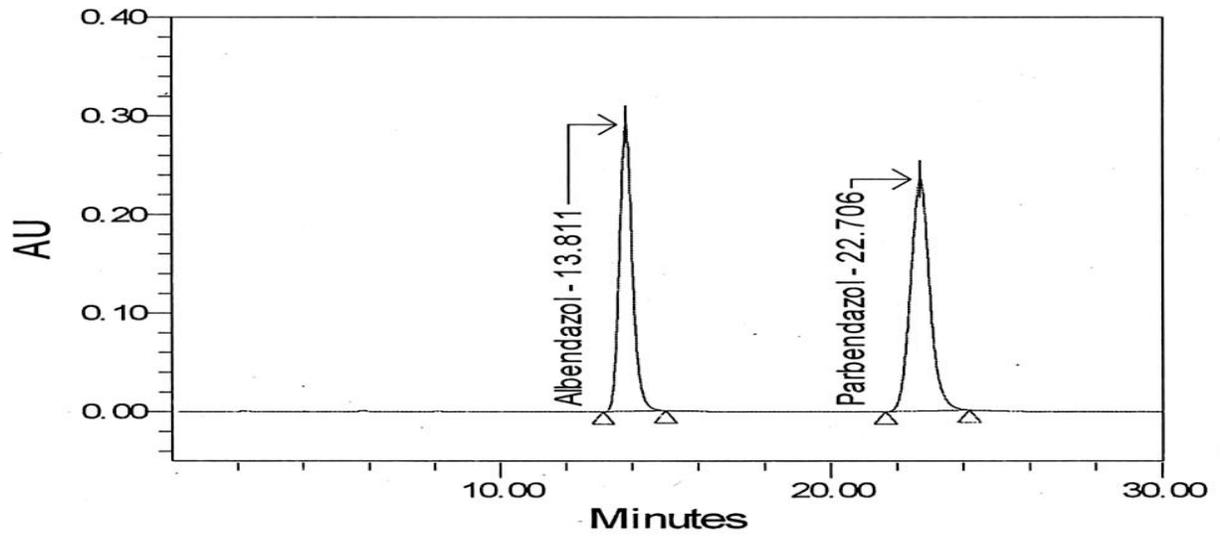


Figura 04. Cromatograma tipo de la solución muestra

8.8 Parámetros, metodologías y criterios de aceptación para la evaluación del método analítico

En la Tabla 05, la cual se muestra a continuación, se describen las pruebas que se ejecutarán para evaluar el método descrito en la USP 38 para la valoración de Albendazol tabletas y sus criterios de aceptación:

Tabla 05. Parámetros, metodologías y criterios de aceptación

Parámetro	Metodología	Criterio de Aceptación												
Especificidad	<p>Muestras a evaluar en cromatógrafo con detector de arreglo de fotodiodos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Blanco (Diluyente) 2. Placebo 3. Placebo sometido a degradación (Degradación oxidativa y Estrés Térmico y estrés por humedad) 4. Soluciones Estándar 5. Solución Muestra 6. Solución Muestra sometida a degradación forzada (Degradación por humedad , oxidativa y térmica) 7. Muestras caducas provenientes del programa de estabilidades, o de estabilidad acelerada, en caso de contar con ellas. 	<ul style="list-style-type: none"> • La prueba se acepta si cualquier sustancia de degradación presente en los análisis del blanco, placebo, producto terminado (muestra caduca), así como las muestras sometidas a las diferentes condiciones de degradación, no presenta el mismo tiempo de retención que la sustancia de interés (Albendazol) ni estándar interno (Parbendazol). • El pico correspondiente al Albendazol debe ser cromatográficamente puro, se realizará el análisis de pureza, en el que el ángulo de pureza debe ser menor al ángulo de umbral, dicho esto se puede establecer que no hay coelución de alguna otra sustancia y por lo tanto el pico se considera cromatográficamente puro. • El balance de materia debe encontrarse entre 95-105% de la cantidad inicial valorada para obtener ser considerado como un balance apropiado. 												
Linealidad del Sistema	<p>Evaluar la siguiente curva de Albendazol SRef:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Nivel de concentración en porcentaje (%)</th> <th># Preparaciones</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>20</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>80</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>100</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>120</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>160</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table>	Nivel de concentración en porcentaje (%)	# Preparaciones	20	3	80	3	100	3	120	3	160	3	<ul style="list-style-type: none"> • El coeficiente de determinación (r^2) debe ser mayor o igual a 0.999 • El error debido a la regresión debe ser menor al 3.0%. • El intercepto relativo se debe encontrar entre -0.02 a 0.02 • La pendiente relativa se debe encontrar entre 0.98 a 1.02 • El gráfico de residuales no muestra tendencia. • El %C.V. total de las muestras referido al factor respuesta debe ser ≤ 2.0.
Nivel de concentración en porcentaje (%)	# Preparaciones													
20	3													
80	3													
100	3													
120	3													
160	3													

Exactitud	Preparar por triplicado, muestras de placebo adicionado a los niveles de 70, 80, 100, 120 y 130%.	<ul style="list-style-type: none"> • El porcentaje de recobro promedio cuantificado debe encontrarse entre el 98 – 102% con un %C.V. menor al 2.0%. • El intervalo de confianza de la ordenada al origen al 95% debe incluir el 0, cualquier otro valor será debidamente justificado. • El intervalo de confianza de la pendiente al 95% debe incluir el 1, cualquier otro valor será debidamente justificado. • El intervalo de confianza (μ) debe incluir el 100% ó el valor de t calculada debe ser menor al valor de t crítica. 								
Repetibilidad	Preparar por sextuplicado, muestras de producto terminado al nivel de 100%	<ul style="list-style-type: none"> • El porcentaje de recobro cuantificado debe encontrarse entre el 90 – 110%. • El %C.V. entre las 6 muestras debe ser menor al 2.0%. 								
Precisión intermedia	Evaluar por triplicado en dos días diferentes por dos analistas diferentes la valoración de Albendazol en muestras de un lote homogéneo.	<ul style="list-style-type: none"> • El %C.V. global entre analistas y días debe ser menor al 2.0%. • Calcular la media (x), desviación estándar (sr) y el %C.V. de los porcentajes de recuperación obtenidos para cada analista. • El porcentaje recuperado de cada muestra deberá estar entre 90-110%. 								
Efecto de filtro	Preparar por triplicado, muestras de producto terminado al nivel de 100%. Las muestras se fraccionan con el siguiente tratamiento: <table border="1" data-bbox="414 1207 885 1438"> <thead> <tr> <th>Condición</th> <th>Tratamiento</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>Centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>La solución final será filtrada a través acrodiscos tipo Nylon de 0.45 μm</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>La solución final será filtrada a través de acrodiscos tipo PVDF de 0.45 μm</td> </tr> </tbody> </table>	Condición	Tratamiento	1	Centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos	2	La solución final será filtrada a través acrodiscos tipo Nylon de 0.45 μ m	3	La solución final será filtrada a través de acrodiscos tipo PVDF de 0.45 μ m	<ul style="list-style-type: none"> • El %C.V. global entre el análisis inicial y el análisis final debe ser menor al 2.0%. • La diferencia absoluta porcentual [di]% debe ser menor al 2.0% entre el análisis de la muestra centrifugada (referencia) y la muestra filtrada.
Condición	Tratamiento									
1	Centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos									
2	La solución final será filtrada a través acrodiscos tipo Nylon de 0.45 μ m									
3	La solución final será filtrada a través de acrodiscos tipo PVDF de 0.45 μ m									
Estabilidad de la solución muestra y estándar	Preparar por triplicado, muestras de producto terminado al nivel de 100%	<ul style="list-style-type: none"> • El %C.V. global entre el análisis inicial y el análisis final debe ser menor al 2.0%. • La diferencia absoluta porcentual [di]% debe ser menor al 2.0% entre el análisis inicial al tiempo 0 y el análisis al tiempo de 24, 48 o 72 hrs. 								

8.9 Metodología para la verificación de la prueba de valoración de Albendazol tabletas 200 mg/tab

8.9.1 Efecto de filtro en la solución muestra y solución estándar

8.9.1.1 Preparación de Estándar Interno (EI)

Preparar la cantidad suficiente de solución de Estándar Interno conforme al número de muestras a analizar. Seguir la metodología de preparación indicada en el punto 8.1 Metodología para las soluciones de la prueba de valoración de Albendazol en tabletas de 200 mg/tab.

8.9.1.2 Preparación de Estándar (preparar por duplicado)

Seguir la metodología de preparación indicada en el punto 8.1 Metodología para las soluciones de la prueba de valoración de Albendazol en tabletas de 200 mg/tab.

8.9.1.3 Preparación de muestras

Preparar por triplicado siguiendo la metodología indicada en el punto 8.1 Metodología para las soluciones de la prueba de valoración de Albendazol en tabletas de 200 mg/tab.

Fraccionar cada solución muestra en tres partes y tratar conforme a lo descrito en la Tabla 05.

Tabla 06. Tratamiento de muestras para evaluación de filtro.

Condición	Tratamiento
1	Centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos
2	La solución final será filtrada a través acrodiscos tipo Nylon de 0.45 μm
3	La solución final será filtrada a través de acrodiscos tipo PVDF de 0.45 μm

Se tendrá un total de 9 muestras, tres por cada condición de evaluación. Proceder al análisis de las muestras a partir de lo descrito en el punto 8.2 Condiciones cromatográficas. Obtener los resultados de valoración para cada condición de tratamiento comparando contra las soluciones de referencia (solución estándar 1 y solución estándar 2).

8.9.1.4 Criterios de aceptación

- El %C.V. global entre el análisis de las muestras de la condición 1 y las muestras de la condición 2 y 3 debe ser menor al 2.0%.
- La [di]% entre los resultados de la condición 1 y la condición 2 y 3 debe ser menor al 2.0%.

8.9.2 Especificidad

La prueba de pureza de pico (peak purity) determinada por el umbral de pureza y el ángulo de pureza fue determinada por medio de los datos que arroje el software Empower 3.

8.9.2.1 Blanco diluyente más EI (al 100%)

En un matraz volumétrico de 50 mL adicionar 5 mL de ácido sulfúrico en metanol. Diluir a volumen con metanol, mezclar y filtrar a través de un acrodisco tipo PVDF 0.45 µm descartando los primeros 15 mL del filtrado. Transferir 5.0 mL del filtrado claro y 5.0 mL de solución EI a un segundo matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con metanol y mezclar. Fraccionar a un vial para analizar conforme a lo descrito a partir del punto 8.2 de la metodología.

8.9.2.2 Blanco (al 100%)

Se hace la misma preparación del punto 8.9.2.1 Blanco diluyente más EI (al 100%) **sin** adicionar la alícuota de la solución EI. Fraccionar a un vial para analizar conforme a lo descrito a partir del punto 8.2 de la metodología.

8.9.2.3 Blanco placebo (al 100%)

Pesar con exactitud aproximadamente 368 mg de placebo y transferir a un matraz volumétrico de 50 mL. Seguir la preparación indicada en el punto 8.9.2.1 Blanco

diluyente más EI (al 100%) y fraccionar un vial para analizar conforme a lo descrito a partir del punto 8.2 de la metodología.

8.9.2.4 Solución estándar

Preparar la solución estándar de valoración a la concentración de trabajo de acuerdo a lo indicado en el punto 8.1 Metodología para las soluciones de la prueba de valoración de Albendazol en tabletas de 200 mg/tab. Fraccionar a un vial para Analizar bajo las condiciones descritas a partir del punto 8.2 de la metodología empleando un equipo HPLC con detector de arreglo de fotodiodos (DAD, por sus siglas en inglés), Programar el sistema para capturar el espectro de absorción en un intervalo de 200nm a 300nm. Registrar el cromatograma y el espectro generado, almacenar en la biblioteca del equipo para su posterior comparación (Match); Identificar cada componente y obtener su pureza cromatográfica.

8.9.2.5 Muestra de referencia preparada a partir de producto terminado caduco

Se preparan por duplicado soluciones muestra como se indica en el numeral 8.1 Metodología para las soluciones de la prueba de valoración de Albendazol en tabletas de 200 mg/tab en lo indicado en el punto *Preparación de muestra para valoración* a partir del lote de producto terminado caduco.

8.9.2.6 Placebo “degradación oxidativa”

Transferir una porción del polvo equivalente a 257 mg de placebo, a un matraz volumétrico de 50 mL. Adicionar 5 mL de ácido sulfúrico en metanol y 20 mL de metanol y agitar mecánicamente por 15 minutos adicionar 0.5 mL de peróxido de hidrógeno al 0.3%, diluir a volumen con metanol y mezclar. Dejar que la solución se equilibre a la temperatura ambiente y almacenar durante periodos de 15 min, transferir una alícuota de 5 mL del sobrenadante claro a un matraz volumétrico de 50 mL agregar 0.7 mL de permanganato de potasio 0.085 M para neutralizar y 5.0 mL de solución de Estándar Interno, diluir a volumen con metanol y mezclar. Fraccionar las soluciones a viales ámbar para analizar conforme a lo descrito a partir del punto 8.2 de la metodología.

8.9.2.7 Muestra “degradación oxidativa”

Transferir una porción del polvo de producto terminado, previamente molido, equivalente a 100mg de Albendazol (334 mg de polvo), a un matraz volumétrico de 50 mL. Adicionar 5 mL de ácido sulfúrico en metanol y 20 mL de metanol y agitar mecánicamente por 15 minutos adicionar 5 mL de peróxido de hidrógeno al 3.0%, diluir a volumen con metanol y mezclar. Dejar que la solución se equilibre a la temperatura ambiente y almacenar durante periodos de 15 min, transferir una alícuota de 5 mL del sobrenadante claro a un matraz volumétrico de 50 mL agregar 0.7 mL de permanganato de potasio 0.085 M para neutralizar y 5.0 mL de solución de Estándar Interno, diluir a volumen con metanol y mezclar. Preparar esta solución por duplicado.

Fraccionar las soluciones en viales ámbar para analizar conforme a lo descrito a partir del punto 8.2 de la metodología.

8.9.2.8 Placebo “degradación térmica”

Transferir una porción del polvo placebo que previamente fue sometido a 80°C durante un periodo de 5 días, equivalente a 100 mg de Albendazol (257 mg de polvo placebo) a un matraz volumétrico de 50 mL. Adicionar 5 mL de ácido sulfúrico en metanol y 20.0-mL de metanol y agitar mecánicamente por 15 minutos, diluir a volumen con metanol y mezclar, una vez transcurrido el tiempo transferir una alícuota de 5 mL del sobrenadante claro a un matraz volumétrico de 50 mL y 5.0 mL de solución de Estándar Interno, diluir a volumen con metanol y mezclar. Preparar esta solución por duplicado. Fraccionar las soluciones en viales ámbar para analizar conforme a lo descrito a partir del punto 8.2 de la metodología.

8.9.2.9 Muestra “degradación térmica”

Pesar y moler hasta polvo fino no menos de 20 tabletas. Transferir una porción del polvo equivalente a 100 mg de Albendazol (334 mg de polvo que previamente fue sometido a 80°C durante un periodo de 5 días), a un matraz volumétrico de 50 mL. Adicionar 5 mL de ácido sulfúrico en metanol y 20 mL de metanol y agitar mecánicamente por 15 minutos, diluir a volumen con metanol y mezclar. Dejar la solución a temperatura ambiente, una vez transcurrido el tiempo transferir una alícuota

de 5 mL del sobrenadante claro a un matraz volumétrico de 50 mL y 5.0 mL de solución de Estándar Interno, diluir a volumen con metanol y mezclar. Preparar esta solución por duplicado. Fraccionar las soluciones en viales ámbar para analizar conforme a lo descrito a partir del punto 8.2 de la metodología.

8.9.2.10 Placebo “degradación por humedad”

Colocar placebo en un pesafiltros adecuado sin tapa e introducirlo en un desecador acondicionado con una solución saturada de cloruro sodio a temperatura ambiente, con el fin de lograr una atmósfera saturada de humedad. Analizar al tiempo cero y a los cinco días de exposición a la humedad. Una vez transcurrido el tiempo de exposición. Transferir una porción del polvo equivalente a 100mg de Albendazol (257 mg de placebo), a un matraz volumétrico de 50 mL. Adicionar 5 mL de ácido sulfúrico en metanol y 20 mL de metanol y agitar mecánicamente por 15 minutos, diluir a volumen con metanol y mezclar. Dejar la solución a temperatura ambiente, transferir una alícuota de 5 mL del sobrenadante claro a un matraz volumétrico de 50 mL y 5.0 mL de solución de Estándar Interno, diluir a volumen con metanol y mezclar. Preparar esta solución por duplicado. Fraccionar las soluciones en viales ámbar para analizar conforme a lo descrito a partir del punto 8.2 de la metodología.

8.9.2.11 Muestra “degradación por humedad”

Colocar 20 tabletas previamente molidas hasta polvo fino en un pesafiltros adecuado sin tapa e introducirlo en un desecador acondicionado con una solución saturada de cloruro sodio a temperatura ambiente, con el fin de lograr una atmósfera saturada de humedad. Analizar al tiempo cero y a los cinco días de exposición a la humedad, una vez transcurrido el tiempo de exposición. Transferir una porción del polvo equivalente a 100 mg de Albendazol (334 mg de polvo), a un matraz volumétrico de 50 mL. Adicionar 5 mL de ácido sulfúrico en metanol y 20 mL de metanol y agitar mecánicamente por 15 minutos, diluir a volumen con metanol y mezclar. Dejar la solución a temperatura ambiente, transferir una alícuota de 5 mL del sobrenadante claro a un matraz volumétrico de 50 mL y 5.0 mL de solución de Estándar Interno, diluir a volumen con metanol y mezclar. Preparar esta solución por duplicado. Fraccionar las soluciones en viales ámbar para analizar conforme a lo descrito a partir del punto 8.2 de la metodología.

8.9.2.12 Criterios de aceptación

- La prueba se acepta si cualquier sustancia de degradación presente en los análisis del blanco, placebo, producto terminado (muestra caduca), así como las muestras sometidas a las diferentes condiciones de degradación, no presenta el mismo tiempo de retención que la sustancia de interés (Albendazol) ni estándar interno (Parbendazol).

- Se reporta en términos de ángulo de pureza (ángulo del contraste espectral calculado por comparación de los espectros en el pico respecto del espectro tomado del ápice del pico) y umbral de pureza (suma del ángulo del ruido más el ángulo del solvente). Si el ángulo de pureza resulta menor que el umbral de pureza (por 4 pases de pureza), significa que no se detecta una diferencia espectral. No habrá entonces evidencia espectroscópica de coelución y el pico se considerará cromatográficamente puro.
- El balance de materia debe encontrarse entre 95-105% de la cantidad inicial valorada para obtener ser considerado como un balance apropiado.

8.9.3 Linealidad del sistema

8.9.3.1 Stock de SRef de Albendazol

Pesar con exactitud 200 mg de Albendazol SRef y poner en un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 10 mL de ácido sulfúrico en metanol y 50 mL de metanol. Agitar hasta disolver. Llevar a volumen con metanol y mezclar. Concentración aproximada de 2mg/mL. Preparar esta solución por triplicado.

8.9.3.2 Preparación de solución EI

Transferir aproximadamente 600 mg de SRef Parbendazol a un matraz volumétrico de 50 mL. Adicionar 5 mL de ácido sulfúrico en metanol, 25 mL de metanol, agitar hasta disolver. Llevar a volumen con metanol y mezclar. Concentración aproximada: 3mg/mL.

8.9.3.3 Curva de linealidad

Preparar una curva empleando cada una de las tres soluciones stock de SRef de Albendazol y la solución de Estándar Interno tal como se indican en la *Tabla 07*.

Preparación de curva para linealidad del sistema.

Tabla 07. Preparación de curva para linealidad del sistema

Nivel de Albendazol (%) con respecto a la concentración nominal	Concentración final de Albendazol (mg/mL)	Alícuota Stock Albendazol (mL)	Alícuota Estándar interno, Parbendazol (mL)	Volumen del matraz (mL)	Concentración de Estándar Interno, Parbendazol (mg/mL)
20	0.10	1	5	50	0.30
80	0.16	4	5	50	0.30
100	0.20	5	5	50	0.30
120	0.24	6	5	50	0.30
160	0.26	8	5	50	0.30

Preparar y estabilizar el sistema cromatográfico conforme a lo indicado en el punto 8.2 de la metodología e inyectar cada una de las soluciones de la curva. Registrar la respuesta obtenida para cada nivel de concentración, calcular a través de un análisis de regresión lineal y por el método de mínimos cuadrados: pendiente (b), intercepto (a), desviación estándar (DE), el coeficiente de correlación (r), el coeficiente de determinación (r^2) y la ecuación de la recta.

8.9.3.4 Criterios de aceptación:

- El coeficiente de determinación (r^2) debe ser mayor o igual a 0.99
- El error debido a la regresión debe ser menor al 3.0%.
- El intercepto relativo se debe encontrar entre -0.02 a 0.02
- La pendiente relativa se debe encontrar entre 0.98 a 1.02
- El gráfico de residuales no muestra tendencia.
- El %C.V. total de las muestras referido al factor respuesta debe ser ≤ 2.0 .

8.9.4 Exactitud

Preparar por triplicado y de forma independiente, al menos 5 niveles de concentración de soluciones de Albendazol en placebo con respecto a la concentración de trabajo (2.0 mg/mL de Albendazol y 3.0 mg/mL de Estándar Interno).

8.9.4.1 Preparación de placebo adicionado con SRef de Albendazol

Preparar por triplicado para cada nivel de concentración la cantidad en mg de placebo y SRef de Albendazol indicada en la tabla 07 y transferirlos a cada matraz volumétrico de 50 mL. Continuar con la preparación y análisis de los mismos conforme a lo indicado a partir del punto 8.1 de la metodología en el punto *preparación de muestra de valoración* desde donde indica: Adicionar 5 mL de ácido sulfúrico en metanol.

Tabla 08. Preparación de curva para exactitud.

Nivel (%) de Albendazol	Peso de SRef de Albendazol (mg)	Peso de Placebo (mg)	Volumen (mL)	Concentración de Albendazol (mg/mL)	Alícuota (mL)	Volumen (mL)	Concentración final de Albendazol (mg/mL)	Concentración final de Estándar Interno de Parbendazol (mg/mL)
70	70	257	50	0.80	5.0	50.0	0.14	0.30
80	80	257	50	1.60	5.0	50.0	0.16	0.30
100	100	257	50	2.00	5.0	50.0	0.20	0.30
120	120	257	50	2.40	5.0	50.0	0.24	0.30
130	130	257	50	2.80	5.0	50.0	0.26	0.30

Preparar y estabilizar el sistema cromatográfico conforme a lo indicado en el punto 8.2 de la metodología e inyectar cada una de las soluciones de la curva. Registrar la respuesta obtenida para cada nivel de concentración, calcular a través de un análisis de regresión lineal y por el método de mínimos cuadrados: pendiente (b), intercepto

(a), desviación estándar (DE), el coeficiente de correlación (r), el coeficiente de determinación (r^2), la ecuación de la recta.

8.9.4.2 Criterios de Aceptación

- El porcentaje de recobro cuantificado para cada nivel debe encontrarse entre el 98% – 102% con un %C.V. menor al 2.0%.
- El porcentaje recuperado de cada muestra analizada debe cumplir con el intervalo de 98-102%
- El valor de ordenada al origen al 95% debe incluir el 0, cualquier otro valor será debidamente justificado.
- El valor de la pendiente al 95% debe incluir el 1, cualquier otro valor será debidamente justificado.

8.9.5 Repetibilidad

8.9.5.1 Preparación de placebo adicionado con SRef de Albendazol

Preparar por sextuplicado y de forma independiente, la cantidad en mg de muestra de producto terminado de acuerdo a lo indicado en la *Tabla 09 Preparación de repetibilidad*, y transferirlos a cada matraz volumétrico de 50 mL, continuar con la preparación y análisis de los mismos conforme a lo indicado a partir del punto 8.1 de la metodología en el punto *preparación de muestra de valoración* desde donde indica: Adicionar 5 mL de ácido sulfúrico en metanol.

Tabla 09. Preparación de repetibilidad

Nivel (%) de Albendazol	Peso de la muestra (mg)	Volumen (mL)	Concentración de Albendazol (mg/mL)	Alicuota (mL)	Volumen (mL)	Concentración final de Albendazol (mg/mL)	Concentración final de Estándar Interno de Parbendazol (mg/mL)
100	330	50	2.00	5.0	50.0	0.20	0.30

Preparar y estabilizar el sistema cromatográfico conforme a lo indicado en el punto 8.2 de la metodología e inyectar cada una de las soluciones de la curva. Registrar la respuesta obtenida para cada nivel de concentración.

8.9.5.2 Criterios de aceptación

- El porcentaje de recobro cuantificado debe encontrarse entre el 90 – 110%.
- El %C.V. entre las 6 muestras debe ser menor al 2.0%.

8.9.6 Precisión intermedia

8.9.6.1 Preparación de muestras Valoración

La precisión Intermedia será evaluada por dos diferentes analistas, en dos diferentes días. La precisión intermedia se llevará a cabo de acuerdo a lo indicado en la *Tabla 10. Precisión intermedia* empleando muestra de un lote estándar de producto terminado conforme a lo indicado en el punto 8.0 Metodología. Analizar las muestras como lo indica el método analítico propuesto a partir del punto 8.2 Condiciones cromatográficas.

Tabla 10. Precisión intermedia

Día	Analista 1	Analista 2
1	3 muestras	3 muestras
2	3 muestras	3 muestras

8.9.6.2 Criterios de aceptación

- El %C.V. global entre ambos analistas y en ambos días debe ser menor al 2.0%.
- Calcular la media (\bar{x}), desviación estándar (DE) y el %C.V. de los porcentajes de recuperación obtenidos para cada analista.
- El porcentaje recuperado de cada muestra deberá estar entre 90-110%.

8.9.7 Estabilidad de la solución muestra y estándar

Preparar por triplicado muestras de producto terminado a la concentración del 100%, conforme a lo descrito en la metodología en la sección 8.1 Metodología para las soluciones de la prueba de valoración de Albendazol en tabletas de 200 mg/tab, en el punto de *preparación de muestra para valoración*.

La concentración de 100% es de 0.2 mg/mL para Albendazol y 0.3 mg/mL para Parbendazol.

De igual manera preparar soluciones de referencia por duplicado como se indica en el punto 8.1 de la sección 8.0 Metodología.

Fraccionar cada solución preparada para analizar al tiempo inicial, 24, 48 y 72 horas de preparación. Conservando las fracciones en diferentes condiciones de almacenamiento: mesa de trabajo, refrigeración y en el inyector.

Analizar conforme a lo descrito a partir del punto 8.2 condiciones cromatográficas, a cada tiempo contra soluciones de estándar de recién preparación.

8.9.7.1 Criterio de aceptación

- El %C.V. global entre el análisis de tiempo cero o inicial y el análisis al tiempo indicado debe ser menor al 2.0%.
- La [di] % a cada tiempo de análisis debe ser menor del 2.0% con respecto al análisis del tiempo cero o análisis inicial.

DISCUSIÓN Y RESULTADOS

9.0 DISCUSIÓN Y RESULTADOS

9.1 Especificidad

Se prepararon por duplicado las soluciones stock de estándar y posteriormente la soluciones estándar de trabajo. Tales muestras fueron analizadas al mismo tiempo que una solución blanco de acuerdo al método analítico descrito, se inyectaron en el sistema cromatográfico y se procedió a calcular el ángulo de pureza y el umbral de pureza de Albendazol por medio del software Empower 3 como se indica en la parte experimental de la ejecución.

Se obtuvo el siguiente cromatograma tipo para la solución blanco, Figura 05, que está constituida únicamente por el diluyente en el que se prepararon las soluciones.

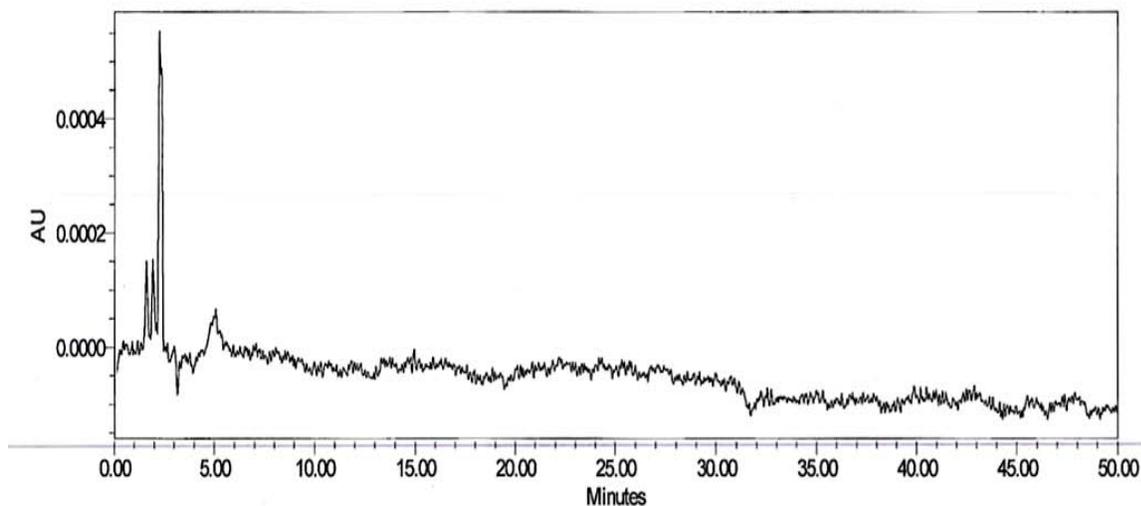


Figura 05. Cromatograma tipo de la solución blanco

A continuación se puede observar en la figura 06 el cromatograma tipo de la solución estándar, la cual establece como criterio de referencia los picos que se deberán obtener tanto para las soluciones estándar, como para las soluciones muestra. Cualquier pico que se obtenga fuera del cromatograma de la solución blanco y de la solución estándar se considera como impureza o componente de la matriz del producto terminado.

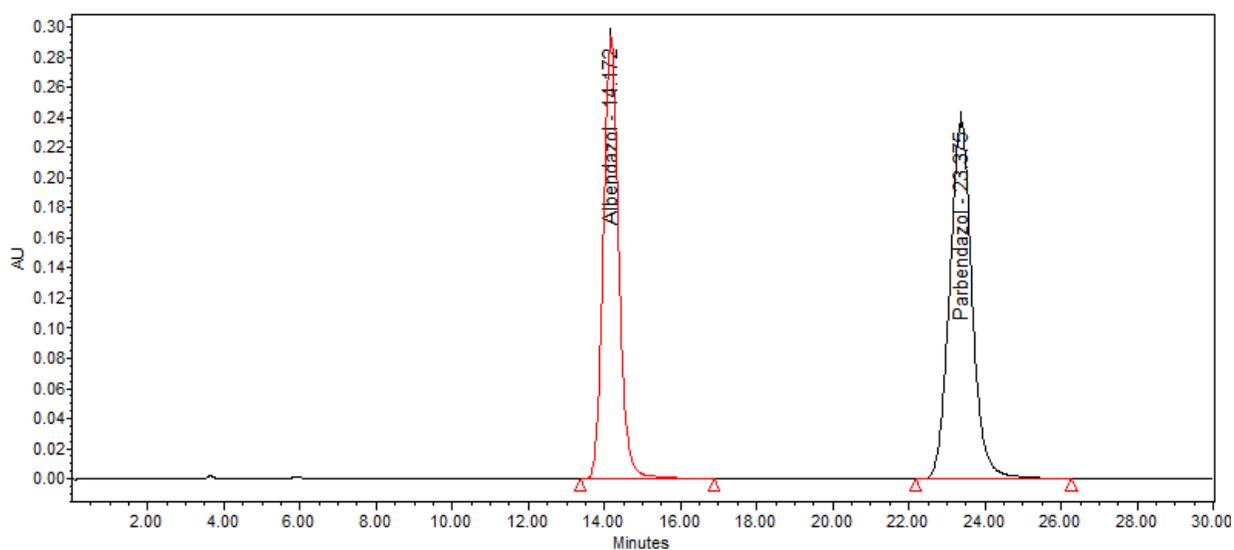


Figura 06. Cromatograma tipo de la solución estándar

La figura 06 no presenta interferencia debida al medio de dilución (metanol) ya que sólo se observan los picos correspondientes a Albendazol y Parbendazol. La solución estándar fue analizada para obtener la pureza cromatográfica y así confirmar que los picos no coeluyen con alguna otra sustancia perteneciente a reactivos o solventes de preparación que puedan causar interferencia; los picos correspondientes a Albendazol y Parbendazol muestran una resolución mayor a 2.0, por lo que el método proporciona

una identificación óptima para las sustancias de interés. Los resultados obtenidos en el análisis de 4 pases de pureza muestran resultados satisfactorios ya que el ángulo de pureza es menor que el umbral de pureza en cada caso (ver figura 10) por lo que no hay evidencia espectroscópica de coelución y los picos presentes en la solución estándar se consideran cromatográficamente puros.

Se prepararon por duplicado, a partir de placebos y muestras homogéneas de producto terminado sometidas a diferentes condiciones de degradación, soluciones de acuerdo al método analítico establecido. Se inyectaron en el sistema cromatográfico y se calculó el ángulo de pureza y el umbral de pureza de la sustancia de interés y del estándar interno. A continuación se muestran las figuras correspondientes a los cromatogramas obtenidos para las distintas condiciones de degradación. Ver Figura 07 a 10.

Como resumen de los parámetros de degradación para el punto 8.9.2 de la sección experimental, se coloca la Tabla 11.

Tabla 11. Condiciones de degradación forzada en Producto Terminado

Degradación	Concentración
Calor	6 días a 80 +/-10°C
Oxidación	5 mL de H ₂ O ₂ al 3.0% , 15 min
Humedad	6 días en cámara saturada de cloruro de sodio

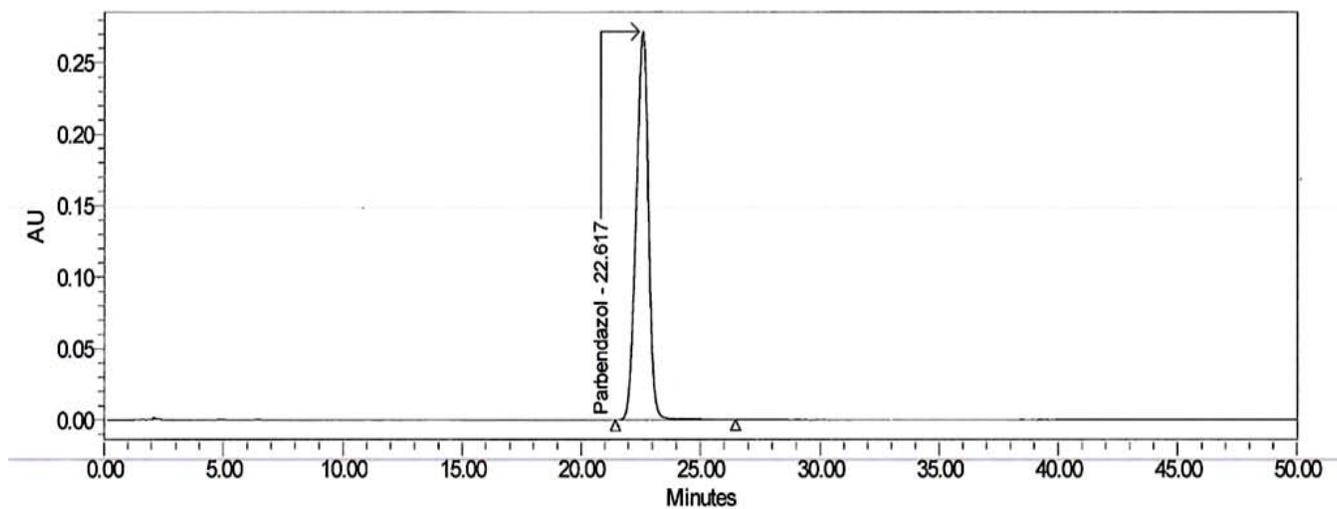


Figura 07. Cromatograma tipo de la solución placebo con estándar interno

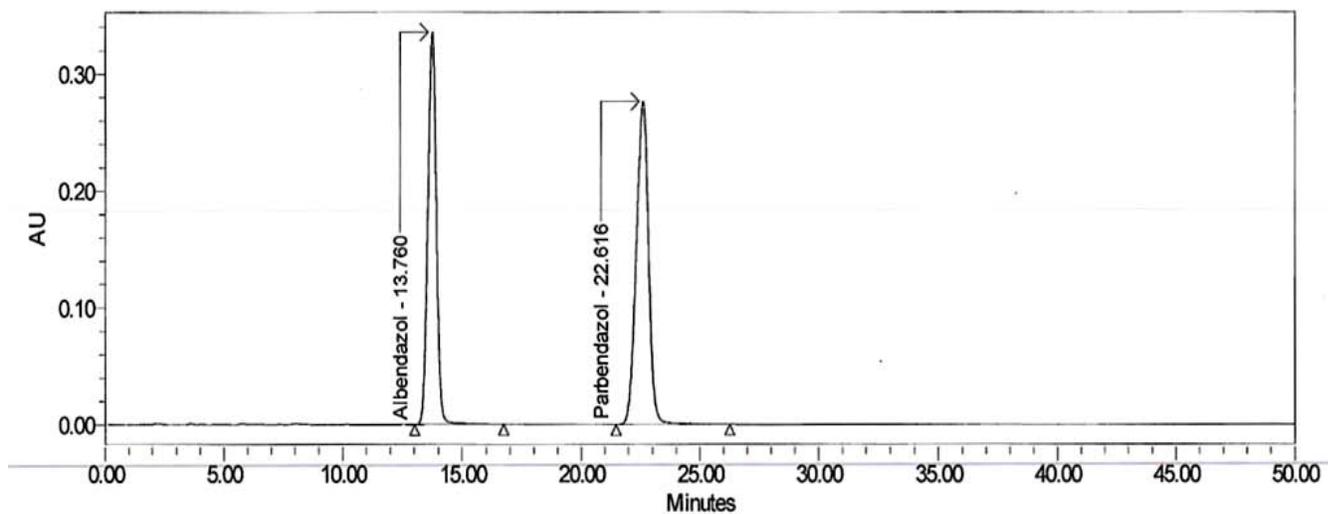


Figura 08. Cromatograma tipo de la solución muestra con estándar interno (producto terminado caduco)

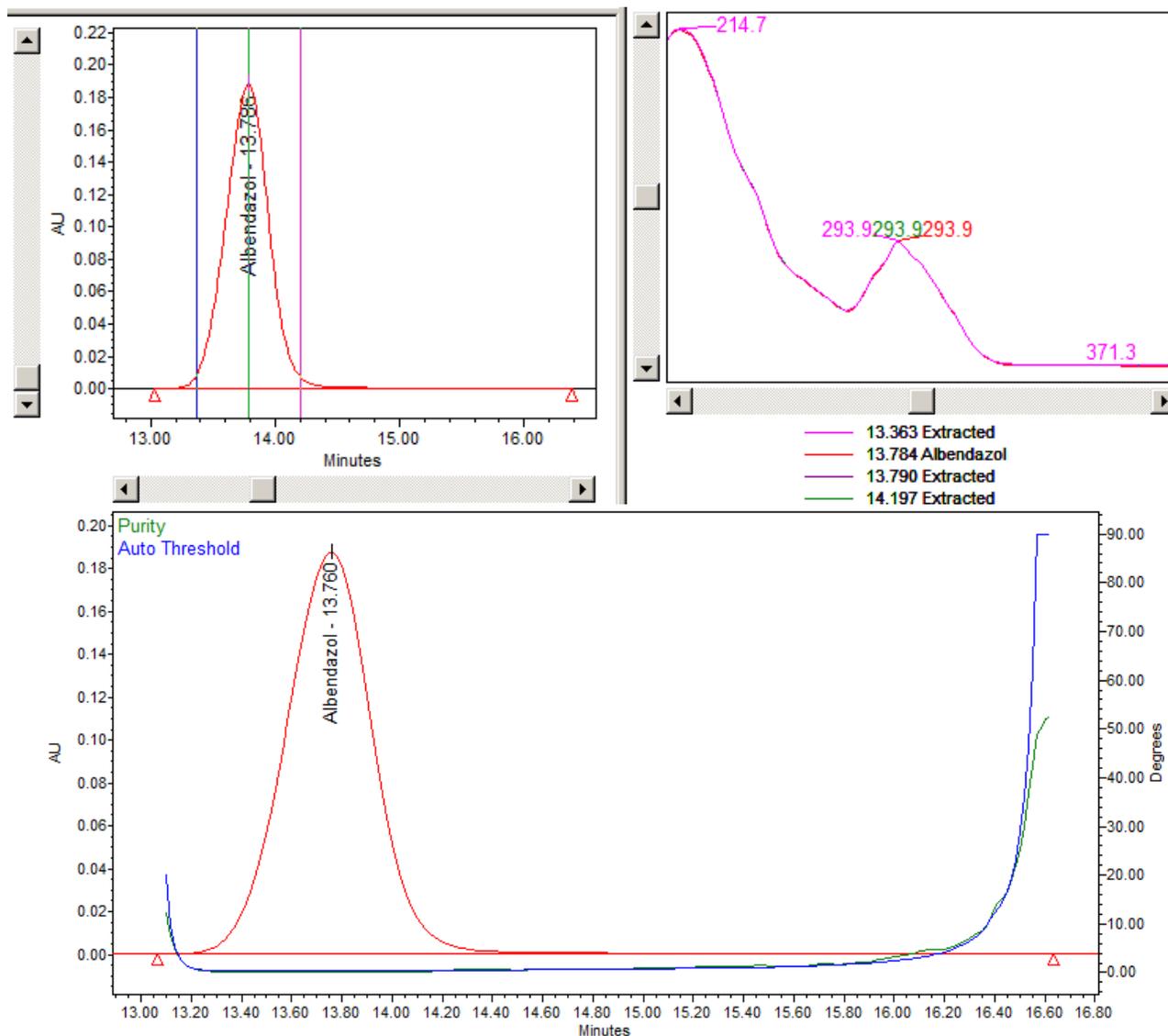


Figura 09. Espectros extraídos correspondientes al pico de Albendazol y gráfico de pureza de pico

PDA Result Table										
	Name	RT	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Purity2 Angle	Purity2 Threshold	Purity3 Angle	Purity3 Threshold	Purity4 Angle	Purity4 Threshold
1	Albendazol	13.760	0.042	1.005	0.018	1.006	0.011	1.006	0.010	1.006
2	Parbendazol	22.616	0.129	1.006	0.014	1.007	0.012	1.007	0.010	1.007

Figura 10. Análisis de pureza de Albendazol y del Parbendazol en la solución estándar.

El análisis de pureza para la muestra de producto terminado caduco arroja resultados satisfactorios porque el ángulo de pureza para cada uno de los picos presentes en la muestra son menores que el umbral de pureza, como se muestra en las figuras 9 y 10, por lo que no hay evidencia espectroscópica de coelución y los picos presentes en la solución muestra y se consideran cromatográficamente puros.

Una vez sometidas las muestras a la condición de degradación indicadas en la tabla 10, se analizaron y prepararon las soluciones de acuerdo al método analítico, se evaluó la pureza cromatográfica para cada pico presente y se obtuvieron los cromatogramas y resultados mostrados en las figuras 11 a 22.

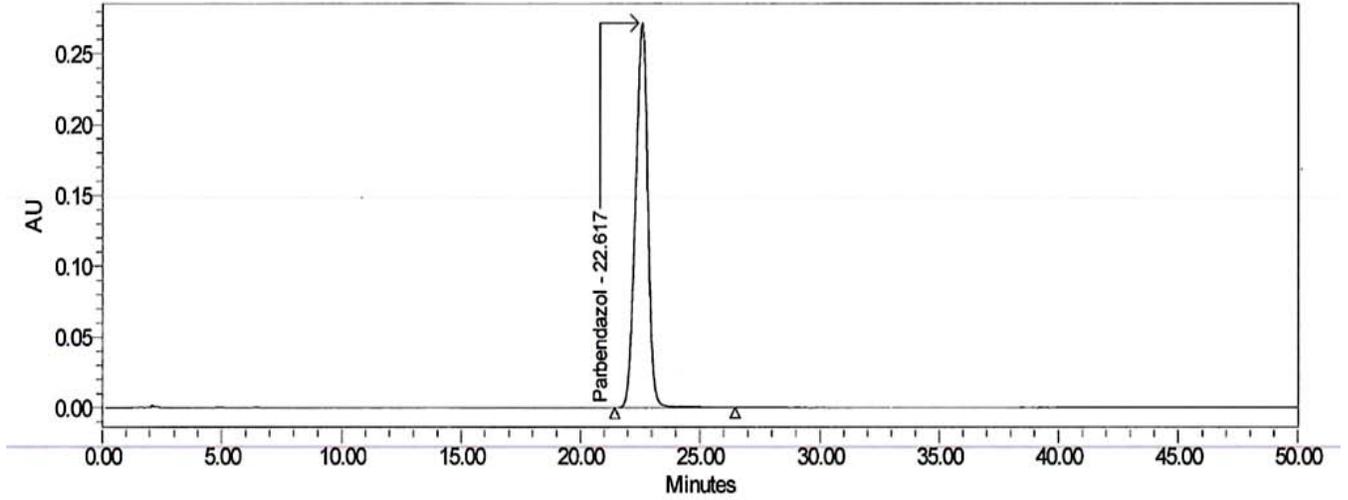


Figura 11. Cromatograma tipo de la solución placebo degradada a 80°C durante un periodo de 6 días

PDA Result Table

	Name	RT	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Purity2 Angle	Purity2 Threshold	Purity3 Angle	Purity3 Threshold	Purity4 Angle	Purity4 Threshold
1	Albendazol	13.701								
2	Parbendazol	22.594	0.113	1.006	0.013	1.007	0.011	1.007	0.009	1.007

Figura 12. Análisis de pureza del Parbendazol en la solución placebo degradada a 80°C durante un periodo de 5 días

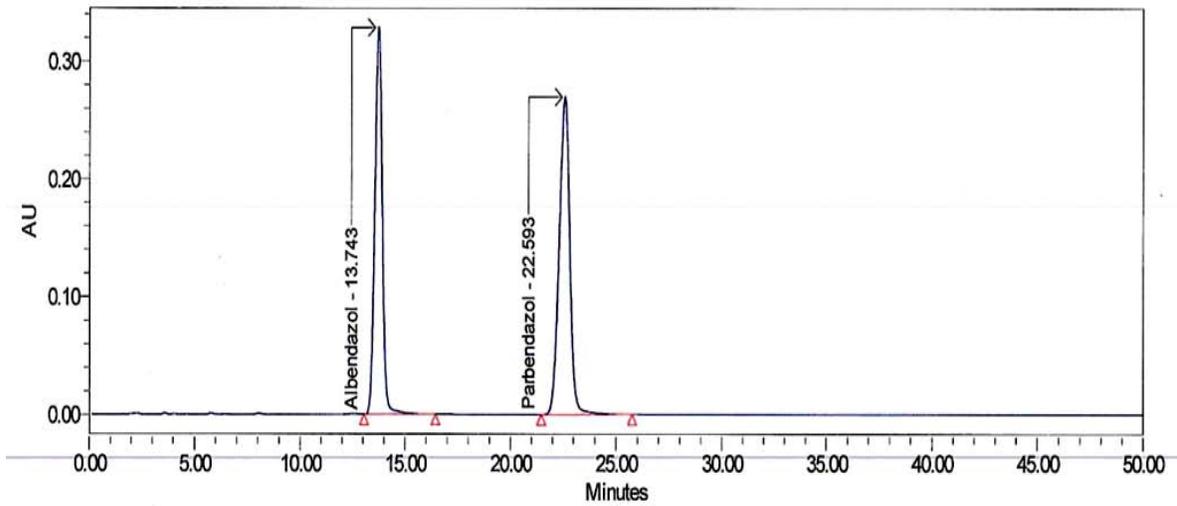


Figura 13. Cromatograma tipo de la solución muestra degradada a 80°C durante un periodo de 6 días

PDA Result Table

	Name	RT	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Purity2 Angle	Purity2 Threshold	Purity3 Angle	Purity3 Threshold	Purity4 Angle	Purity4 Threshold
1	Albendazol	13.743	0.038	1.005	0.017	1.005	0.012	1.006	0.011	1.006
2	Parbendazol	22.593	0.115	1.005	0.014	1.006	0.012	1.006	0.011	1.006

Figura 14. Análisis de pureza de la solución muestra degradada a 80°C durante un periodo de 6 días

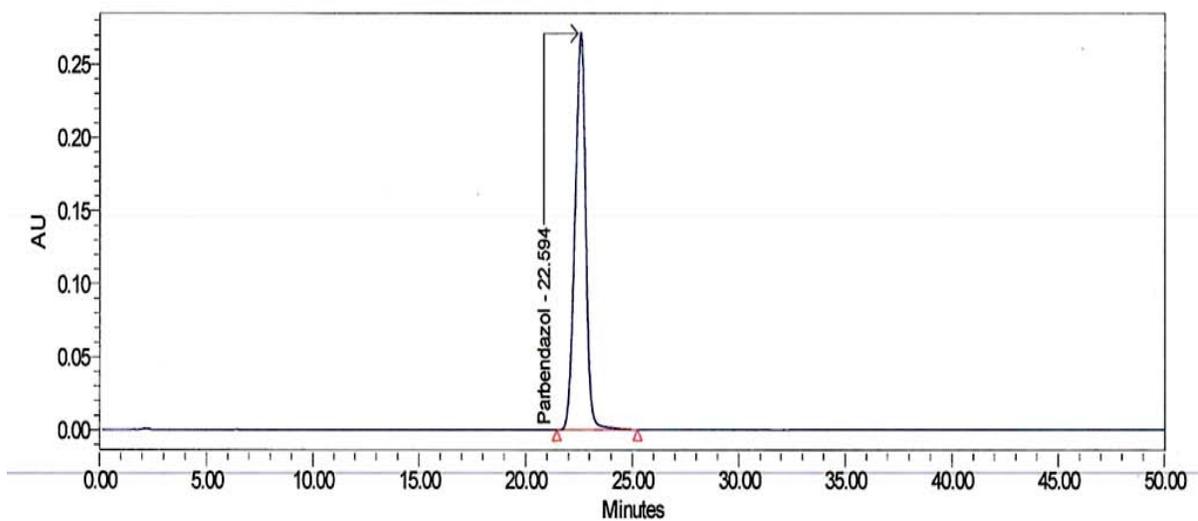


Figura 15. Cromatograma tipo de la solución placebo degradada a condiciones de humedad durante un periodo de 6 días

PDA Result Table

	Name	RT	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Purity2 Angle	Purity2 Threshold	Purity3 Angle	Purity3 Threshold	Purity4 Angle	Purity4 Threshold
1	Albendazol	13.701								
2	Parbendazol	22.594	0.137	1.005	0.013	1.006	0.010	1.006	0.009	1.006

Figura 16. Análisis de pureza de la solución placebo degradada a condiciones de humedad durante un periodo de 6 días

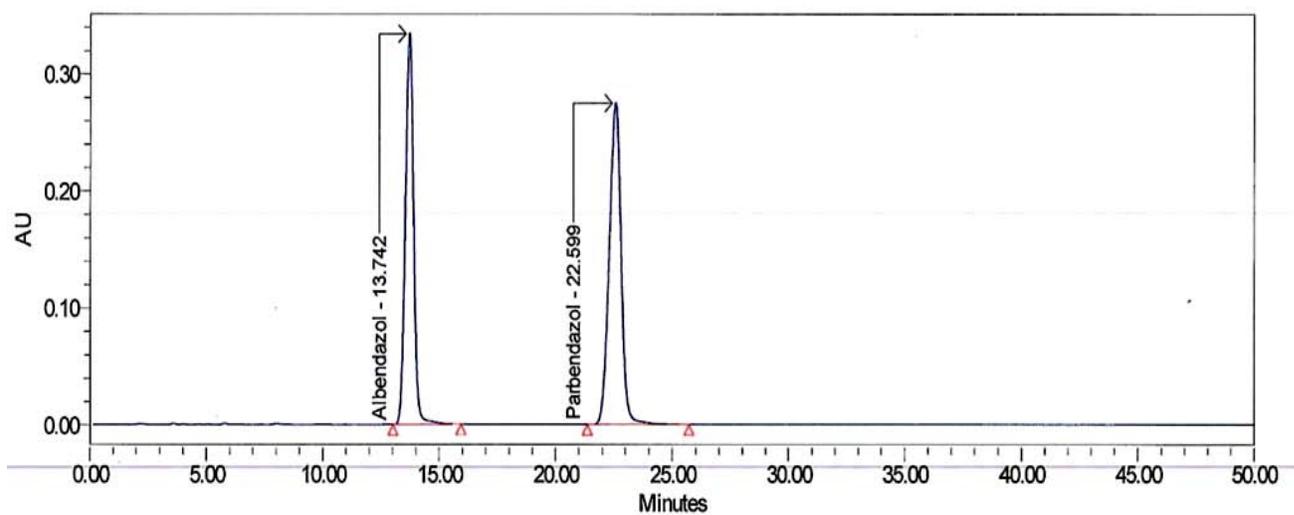


Figura 17. Cromatograma tipo de la solución muestra degradada a condiciones de humedad durante un periodo de 6 días

PDA Result Table

	Name	RT	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Purity2 Angle	Purity2 Threshold	Purity3 Angle	Purity3 Threshold	Purity4 Angle	Purity4 Threshold
1	Albendazol	13.742	0.042	1.004	0.012	1.005	0.010	1.005	0.009	1.005
2	Parbendazol	22.599	0.122	1.005	0.014	1.006	0.012	1.006	0.010	1.006

Figura 18. Análisis de pureza de la solución muestra degradada a condiciones de humedad durante un periodo de 6 días

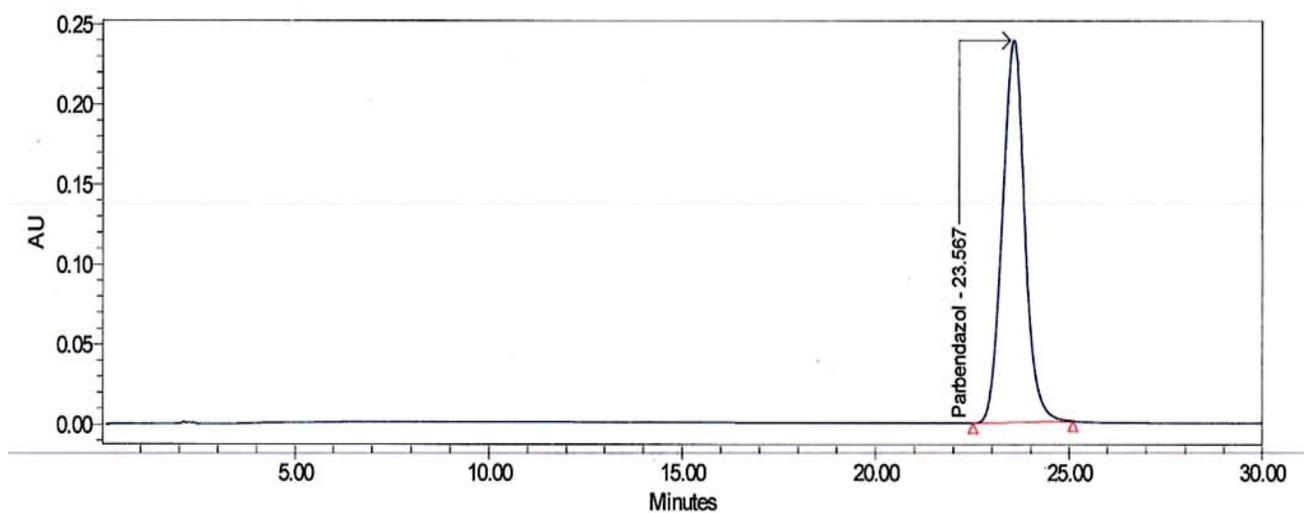


Figura 19. Cromatograma tipo de la solución placebo degradada a condiciones oxidantes durante 15 min

PDA Result Table

	Name	RT	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Purity2 Angle	Purity2 Threshold	Purity3 Angle	Purity3 Threshold	Purity4 Angle	Purity4 Threshold
1	Albendazol	14.300								
2	Parbendazol	23.567	0.109	1.007	0.011	1.008	0.010	1.008	0.008	1.008

Figura 20. Análisis de pureza de la solución placebo degradada a condiciones oxidantes durante 15 min

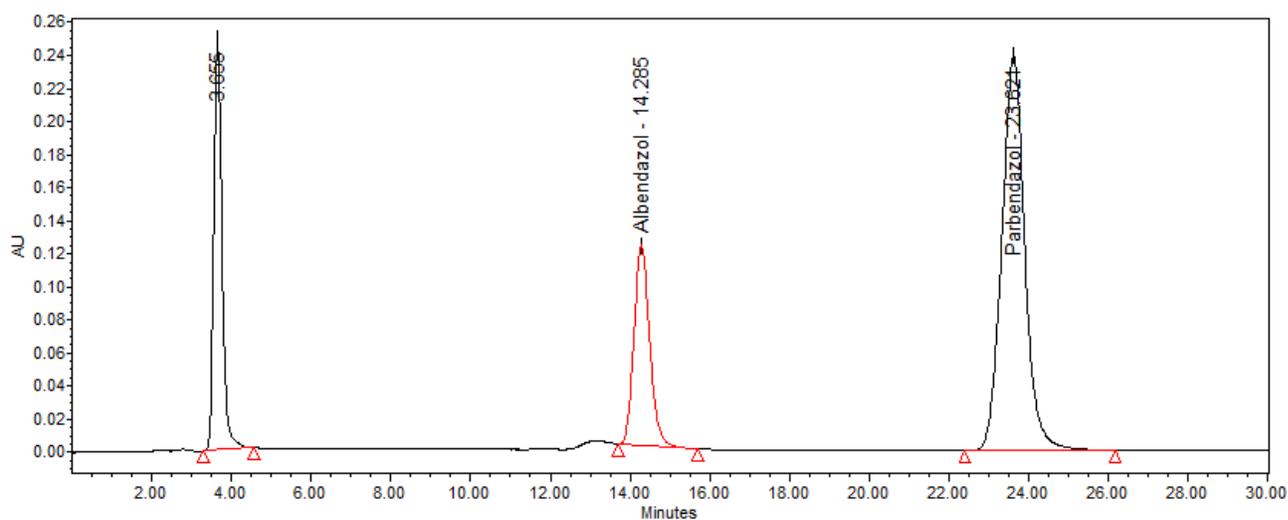


Figura 21. Cromatograma tipo de la solución muestra degradada a condiciones oxidantes durante 15 min

PDA Result Table

	Name	RT	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Purity2 Angle	Purity2 Threshold	Purity3 Angle	Purity3 Threshold	Purity4 Angle	Purity4 Threshold
1		3.655	1.032	1.005	0.177	1.006	0.036	1.006	0.017	1.006
2	Albendazol	14.285	0.114	1.012	0.018	1.013	0.014	1.013	0.013	1.013
3	Parbendazol	23.621	0.103	1.006	0.012	1.007	0.010	1.007	0.009	1.007

Figura 22. Análisis de pureza de la solución muestra degradada a condiciones oxidantes durante 15 min

Los tiempos de retención se mantienen constantes a lo largo de las inyecciones realizadas en la secuencia cromatográfica. Por medio del análisis de pases de pureza, es posible determinar que no existe ningún componente que coeluya con el pico de Albendazol o el pico de Parbendazol. Se concluye que el método es específico y selectivo para las moléculas de interés.

9.1.1 Balance de masa

Se realizó la prueba de balance de masas como un análisis complementario a la prueba de especificidad.

Se determinó el balance de masa de cada una de las muestras analizadas cuantificando el total de los productos de degradación, adicionando el método de impurezas (el cual se llevó a cabo como una validación independiente a la presentada en este proyecto) y utilizando el resultado obtenido en la valoración. Estos resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Balance de masas para especificidad de Albendazol

CONDICIÓN	# MUESTRA	% ALBENDAZOL	DESV. EST	% PROMEDIO	%C.V.	%IMPUREZAS TOTALES ¹	% ENSAYO + IMPUREZAS TOTALES
INCIAL	1	98.5	0.1	98.6	0.1	0.60	99.2
	2	98.7					
TÉRMICA 80°C, 6 DIAS	1	98.4	0.2	98.3	0.2	0.96	99.2
	2	98.1					
HUMEDAD 6 DIAS	1	98.2	0.0	98.2	0.0	0.56	98.8
	2	98.2					
H ₂ O ₂ 3.0% 15 min	1	38.6	1.5	39.7	3.7	24.62	64.3
	2	40.7					

1. El %Impurezas totales se obtuvo del resultado obtenido en la validación de sustancias relacionadas de Albendazol, realizado como una validación independiente de ésta.

En análisis espectral de pureza cromatográfica para cada uno de los compuestos conocidos y desconocidos obtenidos en las pruebas de degradación forzada muestran resultados óptimos ya que el ángulo de pureza es menor que el umbral de pureza (aproximadamente un valor de ángulo de pureza de 0.1 contra un umbral de pureza de un valor de 1.0), por lo que no hay evidencia espectroscópica de coelución y los picos se consideran cromatográficamente puros. De acuerdo a este análisis se considera que el método de Valoración por HPLC para cuantificación de Albendazol en tabletas es específico y selectivo cumpliendo satisfactoriamente con el propósito para el que fue diseñado. El análisis de pureza fue realizado completamente en el sistema Empower 3.

El balance de masas indica un resultado óptimo para las pruebas de degradación de calor y humedad, es decir, que cumple con el criterio de aceptación establecido de un porcentaje de recuperación de 95 – 110%, sin embargo, para la prueba de degradación oxidativa se obtuvo un resultado más bajo del esperado debido a que la degradación fue extrema, esto aunado a que la adición de permanganato de potasio, siendo una agente también oxidante, en contacto de peróxido de hidrógeno no logró un equilibrio en la reacción y por lo tanto no se efectuó adecuadamente la neutralización. Aun así, la degradación extrema en condiciones oxidantes muestra un adecuado análisis de pureza de pico ya que no existe coelución de ninguna sustancias con respecto a los picos de interés de Albendazol y Parbendazol.

9.2 Linealidad del sistema

Los resultados de linealidad del sistema de sistema de Albendazol tabletas 200 mg se muestran a continuación. Las curvas se evaluaron por triplicado partiendo de soluciones stock preparadas de forma independiente como se indica en la Tabla 07. Los resultados de esta prueba se muestran en la Tabla 13 y se puede apreciar una gráfica con la regresión lineal obtenida en la Figura 23.

Tabla 13. Concentración de datos de respuesta para la linealidad de sistema de Albendazol

Nivel (%)	Concentración variable indicada X_i (mg/mL)	Respuesta variable dependiente $y_{i_{real}}$	x_i^2	y_i esperada	Residuales
20 %	0.0397	1495401	0.001578783	1583561	-88159.87513
	0.0397	1501415	0.001577678	1583021	-81605.96565
	0.0397	1515244	0.001577836	1583098	-67854.80963
80 %	0.1589	6212958	0.025260527	6209222	3735.59806
	0.1589	6122730	0.025242854	6207064	-84334.53823
	0.1589	6680762	0.025245379	6207372	473389.08354
100 %	0.1987	7691480	0.039469574	7751109	-59628.73004
	0.1986	7779455	0.03944196	7748412	31043.66294
	0.1986	7746561	0.039445904	7748797	-2235.79627
120 %	0.2384	9275633	0.056836187	9292996	-17362.97464
	0.2383	9372511	0.056796422	9289759	82751.92111
	0.2383	9316885	0.056802102	9290222	26663.60712
160 %	0.3179	12216394	0.10104211	12376771	-160376.75345
	0.3178	12378165	0.100971418	12372455	5710.51796
	0.3178	12311336	0.100981515	12373071	-61734.94770
Suma	2.9	111616931.5	0.67227		
Promedio	0.2	7441128.8	0.04482		

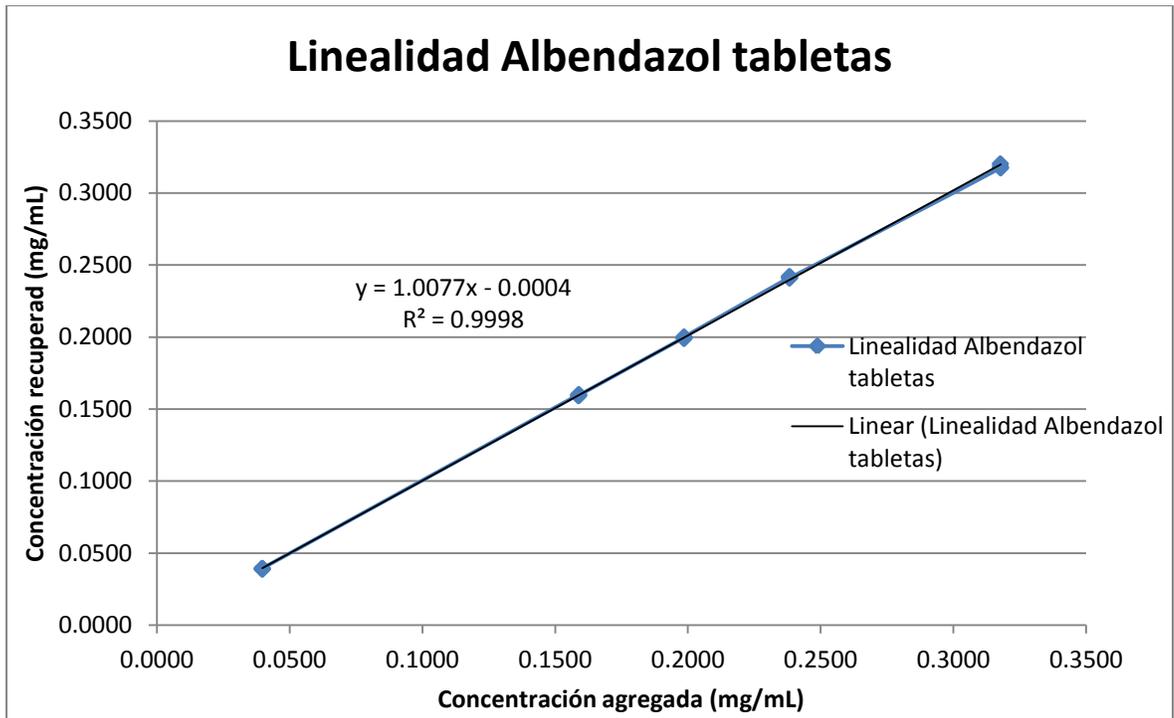


Figura 23. Gráfica para la linealidad de Albendazol tabletas 200 mg/tab a 5 niveles de concentración

Tabla 14. Resultados estadísticos globales para la Linealidad del Sistema

Estadístico	Símbolo	Resultado	Criterio de Aceptación
Pendiente relativa	b_0	1.0077	0.98 a 1.02
Intercepto relativo	a_0	-0.0004	Cae dentro del intervalo \pm 10% de la conc. Nominal -0.02 a 0.02
Coeficiente de correlación	r	0.9999	---
Coeficiente de determinación	r^2	0.9998	$\geq 0,999$
Error estándar relativo de la estimación	$S_{y/x}$ rel.	0.0258	$\leq 3.0 \%$
IC AL 95%			
T de tablas		2.1448	
Límite de confianza inferior		0.1386 mg/mL	
Límite de confianza superior		0.2448 mg/mL	

Tabla 15. Resultados de los promedios por nivel obtenidos para la linealidad

Parámetro	20%	80%	100%	120%	160%
Máximo	99.1	100.7	100.7	101.6	100.8
Mínimo	97.7	100.3	100.2	101.1	99.9
% Recobro	98.6	100.5	100.5	101.3	100.3
Desv. est.	0.8	0.3	0.3	0.2	0.5
C.V.	0.8	0.2	0.3	0.2	0.5

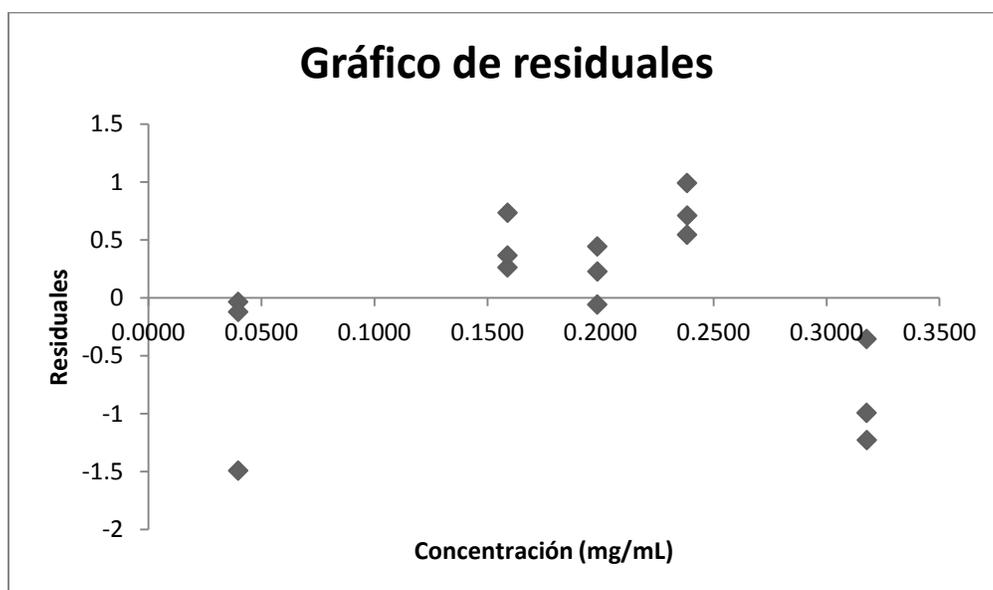


Figura 24. Gráfico de Residuales para la linealidad

El método propuesto para la identificación y cuantificación de Albendazol muestra un comportamiento lineal ya que el valor de r^2 es 0.9985, mayor al indicado en los criterios de aceptación, el %C.V. global es $\leq 2.0\%$, el intervalo del intercepto relativo incluye el valor numérico "0", el valor del intervalo de la pendiente relativa incluye el valor numérico "1", el error de regresión es menor al 3.0%, y el gráfico de residuales no presenta tendencia por lo que el método muestra una respuesta proporcional a la

concentración que se determina. Se cumplen con todos los criterios de aceptación y el intervalo de concentraciones determinado como intervalo lineal para la prueba se encuentra entre 0.0397 mg/mL y 0.3189 mg/mL.

9.3 Exactitud

La prueba se evaluó preparando 5 niveles por triplicado de muestras de placebo adicionando las cantidades equivalentes de Albendazol a cada nivel de concentración, como se indica en la tabla 16. También se incluyen los resultados obtenidos para el recobro de cada nivel de concentración. Los niveles evaluados fueron de 70-130 %.

Tabla 16. Exactitud del método para Albendazol

NIVEL	PESO (mg)	CONC. ADICIONADA (mg/mL)xi	RESPUESTA ALBENDAZOL	RESPUESTA ESTANDAR INTERNO	CONC. RECUPERADA (mg/mL) yi	% RECOBRO	%C.V.
70%	70.04	0.1391	5580897.3499	9338436.6443	0.1393	100.2	0.2
	70.18	0.1394	5602803.8545	9337085.2555	0.1399	100.4	
	70.25	0.1395	5538463.2404	9262762.9893	0.1394	99.9	
80%	80.10	0.1591	6431968.8275	9327799.6400	0.1607	101.0	0.4
	80.28	0.1594	6314369.8005	9198717.2030	0.1600	100.4	
	80.36	0.1596	6261560.8943	9120164.7102	0.1600	100.3	
100%	100.25	0.1991	7807684.3244	9210027.0295	0.1976	99.3	0.9
	100.09	0.1988	8098862.6964	9406638.3427	0.2007	101.0	
	100.08	0.1988	7717735.6415	9093566.8512	0.1978	99.5	
120%	120.25	0.2388	9762133.5634	9244512.6739	0.2462	103.1	1.6
	120.08	0.2385	9264830.5454	9014216.0540	0.2396	100.5	
	120.33	0.2390	9274229.3247	9046749.0839	0.2390	100.0	
130%	130.31	0.2588	10565457.3399	9568423.8387	0.2590	100.1	0.4
	130.13	0.2584	10601486.5779	9560856.5379	0.2601	100.6	
	130.23	0.2586	10590290.4565	9519023.3478	0.2609	100.9	

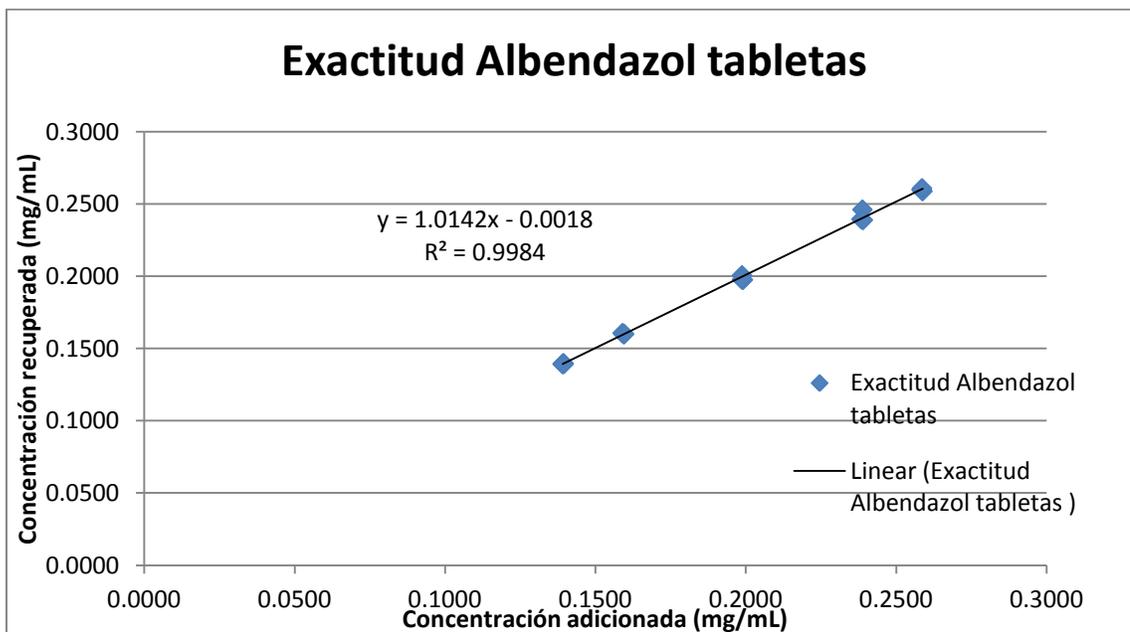


Figura 25. Gráfica para la exactitud de Albendazol tabletas 200 mg/tab a 5 niveles de concentración

Tabla 17. Resultados estadísticos para la prueba de exactitud

Estadístico	Símbolo	Resultado	Criterio de Aceptación
Pendiente relativa	b_0	1.0142	0.98 a 1.02
Intercepto relativo	a_0	-0.0018	Cae dentro del intervalo \pm 10% de la conc. Nominal -0.02 a 0.02
Coefficiente de correlación	r	0.9992	---
Coefficiente de determinación	r^2	0.9984	$\geq 0,999$
Error estándar relativo de la estimación	$S_{y/x}$ rel.	0.0123	$\leq 3.0 \%$
IC AL 95%			
T de tablas		2.1448	
Límite de confianza inferior		0.1737 mg/mL	
Límite de confianza superior		0.2264 mg/mL	

Tabla 18. Exactitud por nivel para Albendazol

	Exactitud por Nivel				
	70%	80%	100%	120%	130%
Máximo	100.4	101.0	101.0	103.1	100.9
Mínimo	99.9	100.3	99.3	100.0	100.1
% Recobro	100.1	100.6	99.9	101.2	100.5
Des. vest	0.2	0.4	0.9	1.7	0.4
C.V.	0.2	0.4	0.9	1.6	0.4

El método propuesto para la cuantificación de Albendazol en tabletas recubiertas de 200 mg es preciso y exacto, ya que el porcentaje de recobro está dentro del intervalo de 98 - 102%, para todos los niveles de concentración, establecido en los criterios de aceptación indicados en la tabla 04. Cumple con un %C.V. menor al 2.0% para cada nivel, el intervalo de la ordenada al origen incluye el valor numérico "0" y el valor de intervalo de la pendiente incluye el valor numérico "1". Se determinó el intervalo de confianza para esta prueba, encontrándose éste entre valores de concentración de 0.1737 – 0.2264 mg/mL.

9.4 Repetibilidad

La prueba se evaluó preparando 6 muestras de producto terminado al nivel de 100 % con respecto a la concentración nominal. Los resultados se muestran en la tabla 21.

Tabla 19. Repetibilidad del método para Albendazol

NIVEL	PESO (mg)	RESPUESTA ALBENDAZOL	RESPUESTA ESTÁNDAR INTERNO	% ALBENDAZOL	
100%	330.91	7532999.03	9176902.54	96.9	
	330.89	7590596.70	9187511.23	97.5	
	330.94	7625035.26	9153759.93	98.3	Resultados Global
	330.75	7559068.66	9160604.26	97.4	Promedio= 97.52%
	330.52	7575082.46	9102132.22	98.3	Desv.est=0.66
	330.68	7419602.04	9049305.91	96.8	%C.V.= 0.67%
					Mínimo= 96.8%
					Máximo= 98.3%

El método propuesto para la cuantificación de Albendazol en tabletas recubiertas es repetible y apto para el uso para el que fue diseñado, porque el porcentaje de principio activo cuantificado para cada una de las 6 muestras y el total está dentro del intervalo 90 – 110 % establecido en los criterios de aceptación en la tabla 04. Así mismo, se cumple con un %C.V. menor al 2.0%, el cual es un parámetro fundamental para evaluar la repetibilidad del método.

9.5 Precisión intermedia

La precisión Intermedia se evaluó con dos diferentes analistas, en dos diferentes días preparando dos soluciones estándar y tres muestras utilizando el lote de producto terminado indicado en la sección 7.0 Reactivos y Estándares de referencia, de este trabajo. La Tabla 20 resume los resultados obtenidos por ambos analistas en ambos días, así como el análisis estadístico de los mismos. Se realizó un análisis ANOVA con la finalidad de demostrar que las medias poblacionales no difieren entre si de forma significativa.

Tabla 20. Resultados para la precisión intermedia de Albendazol.

		% DE ALBENDAZOL				
ANALISTA	# Muestra	DIA 1	DIA 2	ANALISTA #1		
1	1	96.9	97.9	Promedio= 97.97%	RESULTADOS GLOBALES	
	2	97.5	98.5	Desv. est.= 0.68		Estadístico al 95%
	3	98.3	98.7	Var= 0.46		Entre Días
2	1	97.9	98.3		Entre analistas	
	2	97.8	98.0		F tablas=4.9646	
	3	98.2	98.3	ANALISTA #2	Fcalc. =4.5459	Fcalc.=0.1619
				Promedio= 98.08%	% De Albendazol	
				Desv. est.= 0.21	Promedio=98.03%	
					Desv. est.=0.48	
					%C.V.=0.49 %	

Var= variación %

El porcentaje de recobro está dentro del intervalo indicado en el criterio de aceptación, obteniéndose como media de ambos analistas un valor de 97.77%. Se obtiene también, un valor de %C.V. total de 0.52%, lo que satisface el criterio establecido de menor o igual a 2.0% global entre analistas y días. El análisis de ANOVA realizado, emite como resultado una F calculada ($F_{calc.}$) menor a las F de tablas (F_{tablas}) por lo que se considera una prueba satisfactoria y se confirma que las medias poblacionales no presentan una diferencia significativa entre ellas.

El método propuesto para la cuantificación de Albendazol en tabletas recubiertas de 200 mg, es preciso y reproducible por diferentes analistas en días diferentes.

9.6 Efecto de filtro en la solución muestra y solución estándar

La prueba se evaluó preparando dos estándares y tres muestras de producto terminado. Las soluciones se filtraron por medio de membranas de nylon 0.45 μm y membrana de PVDF 0.45 μm . Dichas membranas fueron elegidas debido a dos principales factores, la disponibilidad y la compatibilidad química. La referencia utilizada fue la muestra centrifugada a 6000 rpm durante 10 minutos. Ver resultados en las Tablas 22 a 24.

Tabla 21. Efecto de filtro Nylon 0.45 μm en el estándar

#ESTÁNDAR	CENTRIFUGADA (%RECOBRO)	NYLON 0.45 μm (%RECOBRO)
1	100.2	100.2
2	100.1	99.8
PROMEDIO=	100.2	100.0
DESV. EST.=	0.1	0.3
%C.V.=	0.1	0.3
Resultados Global		
Promedio= 100.06%		
Desv.est=0.21		
Diferencia absoluta (%)		
[di]% = 0.089		

Tabla 22. Efecto de filtro Nylon 0.45 μm en la muestra

#MUESTRA	CENTRIFUGADA (%RECOBRO)	NYLON 0.45 μm (%RECOBRO)
1	98.0	98.0
2	98.1	97.8
3	98.1	98.2
PROMEDIO=	98.06	97.91
DESV. EST.=	0.10	0.14
%C.V.=	0.10	0.14
Resultados Global		
Promedio= 98.04 %		
Desv.est=0.14		
Diferencia absoluta (%)		
[di]% = 0.333		

Tabla 23. Efecto de filtro PVDF 0.45 µm en el estándar

#ESTÁNDAR	CENTRIFUGADA (%RECOBRO)	PVDF 0.45 µm (%RECOBRO)
1	100.2	100.3
2	100.1	99.9
PROMEDIO=	100.2	100.1
DESV. EST.=	0.1	0.3
%C.V.=	0.1	0.3
Resultados Global		
Promedio= 100.11%		
Desv.est=0.20		
Diferencia absoluta (%)		
[di]%=0.247		

Tabla 24. Efecto de filtro PVDF 0.45 µm en la muestra

#MUESTRA	CENTRIFUGADA (%RECOBRO)	PVDF 0.45 µm (%RECOBRO)
1	98.0	97.9
2	98.1	97.8
3	98.1	98.2
PROMEDIO=	98.06	97.82
DESV. EST.=	0.10	0.09
%C.V.=	0.10	0.09
Resultados Global		
Promedio= 98.01%		
Desv.est=0.16		
Diferencia absoluta (%)		
[di]%=0.086		

Para los dos tipos de membrana se determina el %C.V. entre las muestras y la referencia se obtiene un resultado dentro del criterio de aceptación indicado en la tabla 04. Debido a que en la prueba no se percibe un efecto de filtro, es decir, que no es posible percibir una interferencia debida a la composición del filtro o que se detecte alguna pérdida en el porcentaje de recobro debido a que el filtro retenga el API.

La [di] % es menor a 2.0% en ambos los casos, sin embargo, ya que las muestras tratadas con el filtro tipo PVDF muestran una diferencia absoluta menor, y que en la compatibilidad química se determina que la membrana de PVDF tiene mayor capacidad para soportar disolventes orgánicos y medios ácidos⁽⁶⁾ (la membrana de Nylon tiene una resistencia limitada a medios ácidos), se concluye que el tipo de membrana a utilizar para el análisis es indiferente pero se establecen como filtros para la prueba de valoración, acrodiscos con membrana tipo PVDF 0.45 μm .

9.7 Estabilidad de la solución

La prueba se realizó preparando 3 muestras de producto terminado, las muestras se analizaron y prepararon de acuerdo a lo indicado en la parte experimental de este proyecto, específicamente en el punto 8.9.7. Los resultados se muestran a continuación en las Tablas 25 a 33:

Tabla 25. Estabilidad del estándar de Albendazol en condiciones de almacenamiento (inyector) 24 hrs para estándar y muestras

#ESTÁNDAR	REF. DÍA 0 (%)	24 HRS (%)
1	100.3	99.5
2	99.7	99.7
PROMEDIO=	100.0	99.6
DESV. EST.=	0.4	0.1
%C.V.=	0.4	0.1
Resultados Global		
Promedio=99.80		
Desv.est=0.36		
Diferencia absoluta (%)		
[di]% = 0.219		

#MUESTRA	REF. DÍA 0 (%)	24 HRS (%)
1	97.9	98.2
2	98.5	99.0
3	98.7	98.8
PROMEDIO=	98.38	98.67
DESV. EST.=	0.40	0.46
%C.V.=	0.41	0.47
Resultados Global		
Promedio=98.52		
Desv.est=0.42		
Diferencia absoluta (%)		
[di]% = 0.151		

Tabla 26. Estabilidad del estándar de Albendazol en condiciones de almacenamiento (inyector) 48 hrs para estándar y muestras

#ESTÁNDAR	REF. DÍA 0 (%)	48 HRS (%)
1	100.3	99.0
2	99.7	99.1
PROMEDIO=	100.0	99.1
DESV. EST.=	0.4	0.1
%C.V.=	0.4	0.1
Resultados Global		
Promedio=99.54		
Desv.est=0.60		
Diferencia absoluta (%)		
[di]% =0.473		

#MUESTRA	REF. DÍA 0 (%)	48 HRS (%)
1	97.9	98.3
2	98.5	99.0
3	98.7	98.4
PROMEDIO=	98.38	98.58
DESV. EST.=	0.40	0.41
%C.V.=	0.41	0.42
Resultados Global		
Promedio=98.48		
Desv.est=0.38		
Diferencia absoluta (%)		
[di]% =0.104		

Tabla 27. Estabilidad del estándar de Albendazol en condiciones de almacenamiento (inyector) 72 hrs para estándar y muestras

#ESTÁNDAR	REF. DÍA 0 (%)	72 HRS (%)
1	100.3	99.2
2	99.7	98.7
PROMEDIO=	100.0	98.9
DESV. EST.=	0.4	0.3
%C.V.=	0.4	0.3
Resultados Global		
Promedio=99.48		
Desv.est=0.69		
Diferencia absoluta (%)		
[di]% =0.537		

#MUESTRA	REF. DÍA 0 (%)	72 HRS (%)
1	97.9	98.6
2	98.5	98.8
3	98.7	98.7
PROMEDIO=	98.38	98.67
DESV. EST.=	0.40	0.09
%C.V.=	0.41	0.10
Resultados Global		
Promedio=98.52		
Desv.est=0.31		
Diferencia absoluta (%)		
[di]% =0.151		

Tabla 28. Estabilidad del estándar de Albendazol en condiciones de almacenamiento (mesa de trabajo) 24 hrs para estándar y muestras

#ESTÁNDAR	REF. DÍA 0 (%)	24 HRS (%)
1	100.3	100.2
2	99.7	99.9
PROMEDIO=	100.0	100.1
DESV. EST.=	0.4	0.2
%C.V.=	0.4	0.2
Resultados Global		
Promedio=100.04		
Desv.est=0.27		
Diferencia absoluta (%)		
[di]% =0.029		

#MUESTRA	REF. DÍA 0 (%)	24 HRS (%)
1	97.9	98.5
2	98.5	99.0
3	98.7	99.0
PROMEDIO=	98.38	98.72
DESV. EST.=	0.40	0.36
%C.V.=	0.41	0.37
Resultados Global		
Promedio=98.59		
Desv.est=0.39		
Diferencia absoluta (%)		
[di]% =0.174		

Tabla 29. Estabilidad del estándar de Albendazol en condiciones de almacenamiento (mesa de trabajo) 48 hrs para estándar y muestras

#ESTÁNDAR	REF. DÍA 0 (%)	48 HRS (%)
1	100.3	101.1
2	99.7	99.8
PROMEDIO=	100.0	100.4
DESV. EST.=	0.4	0.9
%C.V.=	0.4	0.9
Resultados Global		
Promedio=100.23		
Desv.est=0.65		
Diferencia absoluta (%)		
[di]% =0.216		

#MUESTRA	REF. DÍA 0 (%)	48 HRS (%)
1	98.6	98.8
2	99.2	99.0
3	99.4	98.9
PROMEDIO=	99.07	98.87
DESV. EST.=	0.41	0.15
%C.V.=	0.41	0.15
Resultados Global		
Promedio=98.98		
Desv.est=0.29		
Diferencia absoluta (%)		
[di]% =0.250		

Tabla 30. Estabilidad del estándar de Albendazol en condiciones de almacenamiento (mesa de trabajo) 72 hrs para estándar y muestras

#ESTÁNDAR	REF. DÍA 0 (%)	72 HRS (%)
1	100.3	100.7
2	99.7	100.6
PROMEDIO=	100.0	100.7
DESV. EST.=	0.4	0.0
%C.V.=	0.4	0.0
Resultados Global		
Promedio=100.34		
Desv.est=0.45		
Diferencia absoluta (%)		
[di]% =0.324		

#MUESTRA	REF. DÍA 0 (%)	72 HRS (%)
1	98.6	99.3
2	99.2	99.9
3	99.4	99.5
PROMEDIO=	99.07	99.60
DESV. EST.=	0.41	0.36
%C.V.=	0.41	0.36
Resultados Global		
Promedio=99.32		
Desv.est=0.41		
Diferencia absoluta (%)		
[di]% =0.620		

Tabla 31. Estabilidad del estándar de Albendazol en condiciones de almacenamiento (refrigerador) 24 hrs para estándar y muestras

#ESTÁNDAR	REF. DÍA 0 (%)	24 HRS (%)
1	100.3	100.4
2	99.7	100.2
PROMEDIO=	100.0	100.3
DESV. EST.=	0.4	0.2
%C.V.=	0.4	0.2
Resultados Global		
Promedio=100.17		
Desv.est=0.32		
Diferencia absoluta (%)		
[di]% =0.159		

#MUESTRA	REF. DÍA 0 (%)	24 HRS (%)
1	97.9	98.5
2	98.5	99.2
3	98.7	98.8
PROMEDIO=	98.38	98.82
DESV. EST.=	0.40	0.34
%C.V.=	0.41	0.34
Resultados Global		
Promedio=98.60		
Desv.est=0.41		
Diferencia absoluta (%)		
[di]% =0.227		

Tabla 32. Estabilidad del estándar de Albendazol en condiciones de almacenamiento (refrigerador) 48 hrs para estándar y muestras

#ESTÁNDAR	REF. DÍA 0 (%)	48 HRS (%)
1	100.3	99.9
2	99.7	99.8
PROMEDIO=	100.0	99.9
DESV. EST.=	0.4	0.1
%C.V.=	0.4	0.1
Resultados Global		
Promedio=99.95		
Desv.est=0.26		
Diferencia absoluta (%)		
[di]% =0.062		

#MUESTRA	REF. DÍA 0 (%)	48 HRS (%)
1	97.9	98.9
2	98.5	100.0
3	98.7	99.5
PROMEDIO=	98.38	99.46
DESV. EST.=	0.40	0.56
%C.V.=	0.41	0.56
Resultados Global		
Promedio=98.92		
Desv.est=0.74		
Diferencia absoluta (%)		
[di]% =0.549		

Tabla 33. Estabilidad del estándar de Albendazol en condiciones de almacenamiento (refrigerador) 72 hrs para estándar y muestras

#ESTÁNDAR	REF. DÍA 0 (%)	72 HRS (%)
1	100.3	101.0
2	99.7	100.9
PROMEDIO=	100.0	101.0
DESV. EST.=	0.4	0.1
%C.V.=	0.4	0.1
Resultados Global		
Promedio=100.49		
Desv.est=0.60		
Diferencia absoluta (%)		
[di]% =0.472		

#MUESTRA	REF. DÍA 0 (%)	72 HRS (%)
1	97.9	99.1
2	98.5	99.7
3	98.7	99.2
PROMEDIO=	98.38	99.33
DESV. EST.=	0.40	0.33
%C.V.=	0.41	0.33
Resultados Global		
Promedio=98.85		
Desv.est=0.62		
Diferencia absoluta (%)		
[di]% =0.481		

El método propuesto para la cuantificación de Albendazol en tabletas recubiertas de 200 mg, presenta una estabilidad de 72 horas en el automuestreador, en el refrigerador (2 -8 °C) y en la mesa de trabajo (temperatura ambiente 15 – 30 °C) en vial ámbar, respectivamente para la solución muestra y para la solución estándar. La diferencia [di]% relacionando el valor de porcentaje de contenido inicial vs la evaluación de porcentaje de contenido final es menor al 2.0% en todos los casos.

10.0 CONCLUSIÓN GENERAL

El método propuesto es específico y selectivo debido a que no se encontró ningún tipo de interferente debido a productos de degradación o excipientes en el producto terminado. El método también es lineal entre 0.04 y 0.32 mg/mL, exacto y preciso entre 0.14-0.26 mg/mL ya que cumple con los criterios de aceptación para cada una de las pruebas evaluadas.

Se considera como método indicativo de estabilidad, ya que tienen la capacidad de predecir el comportamiento químico del principio activo presente en la tableta recubierta de Albendazol 200 mg/tab.

Así mismo se evaluó la estabilidad de las muestras preparadas con la finalidad de que el analista tuviera seguridad de que al inyectar, ya sea el día de preparación o 72 horas después, la variación de los resultados fuera mínima y los resultados siguieran siendo confiables.

Las pruebas realizadas a lo largo de esta verificación son la evidencia de que es posible utilizar las metodologías que se encuentran establecidas en las farmacopeas. Es necesario considerar que en algunos casos será necesario modificar algunos parámetros para adecuar el sistema a las condiciones disponibles en el laboratorio.

Finalmente se concluye que el método propuesto para la cuantificación de Albendazol es aplicable para el fin para el que fue diseñado, ya que cumple con los parámetros desempeño y criterios estadísticos sugeridos para la evaluación del mismo.

11.0 REFERENCIAS

1. Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA-2015. Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.
2. Marques, Margareth R.C. (2015). Albendazol Tabletas. En Farmacopea de los Estados Unidos de América. Estados Unidos: USP38 NF33. (2351-2352).
3. Facultad de Medicina, UNAM (2016). *Albendazol*. Sitio web: http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/Albendazol.htm [Consultado 01 Dic. 2016].
4. Pappa, Horacio N. (2015). <1225> Validación de los procedimientos compendiales. En Farmacopea de los Estados Unidos de América. Estados Unidos : USP 38 NF33. (1640-1645).
5. Pappa, Horacio N. (2015). <621> Cromatografía. En Farmacopea de los Estados Unidos de América. Estados Unidos: USP38 NF33. (459).
6. Pall Corporation. (2006). Use of Acrodisc® Syringe Filters for Analytical Sample Preparation; Including HPLC and Dissolution Testing. Technical guide.(30)
7. Vega, Guillermo. (2011) Secretaría de Salud. Comisión de control analítico y ampliación de cobertura. Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos. Clave: CCAYAC-P-058.
8. U.S. Department of Health and Human Services. (2009). Guidance for industry ANDAs: Impurities in Drug Substances. Food and Drug Administration.Sitio

Web:<https://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/98d0514/98d-0514-gdl0002.pdf> [Consultado 18 Abr. 2017]

9. Harris, Daniel C. (2003). Análisis químico cuantitativo. España: Reverté. Cap. 23, 3^{ra} edición.
10. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos (2002). Guía de Validación de Métodos Analíticos. Edición 2002.
11. Waters Corporation. (1996). Waters 996 Photodiode Detector: Peak Purity I. What is peak purity analysis? En Performance Perspectives. Estados Unidos.
12. Committee for Human Medical Products. (2015). ICH Q8 (R2): Desarrollo Farmacéutico.
13. Secretaria de salud. Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2014) Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 7^a ed. (2789 – 2800).
14. Skoog, Douglas, A., Holler James, F., Nieman Timothy A. (2000) Principios de análisis instrumental. Estados Unidos. 5^a ed. Mc Graw Hill. (785 – 800).
15. N/A. (2017). Software para cromatografía Empower 3. de Waters Sitio web: http://www.waters.com/waters/es_MX/Empower-3-Chromatography-Data-Software/nav.htm?cid=513188&lset=1&locale=es_MX [Consultado 17 Abr. 2017].

12.0 Anexos

Anexo I. Fórmulas y cálculos representativos

a) Parámetros de adecuabilidad

Cálculo de la resolución (R_s):

$$R_s = 2 \times \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$$

Donde:

t_{R1} = tiempo de retención del componente 1

t_{R2} = tiempo de retención del componente 2

W_1 = el ancho correspondiente a la base del pico del componente 1 en la línea base

W_2 = el ancho correspondiente a la base del pico del componente 2 en la línea base

Cálculo del número de platos teóricos (N):

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

Donde:

t_R = tiempo de retención de la substancia

W = es el ancho del pico en su base

Cálculo para el factor de coileo (A_s):

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

Donde:

$W_{0.05}$ = ancho del pico a una altura de 5% a partir de la línea base

f = es la distancia entre la altura máxima del pico y el borde principal del pico a una altura de 5% a partir de la línea base

Nota: Los parámetros de adecuabilidad fueron calculados con el programa Empower 3, sin embargo, en esta sección se expresa la forma manual de realizar los cálculos.

b) Especificidad

Cálculo del Factor respuesta del estándar:

$$FRstd = \frac{Peso\ estándar\ (mg) * Potencia\ (\%) * ÁreaStdInt}{FDStd * ÁreaStd * 100\ \%}$$

Donde:

FRstd: Factor respuesta del estándar

FDStd: Factor de dilución del estándar

Cálculo del %de Albendazol en la muestra:

$$\% \text{ de Albendazol} = \frac{MFR * ÁreaMuestra * PesoProm.* FDMuestra * 100\%}{ÁreaStdIntMtra * PesoMuestra * Dosis}$$

Donde:

MFR: Factor respuesta promedio de los estándares.

FDMuestra: Factor de dilución de la muestra

Ejemplo de cálculo de % de Albendazol:

$$FRstd_01 = \frac{100.04\ mg}{500} \times \frac{99.30\ \%}{8127235.65} \times \frac{9534455.78}{100\ \%} = 0.2331$$

$$\% \text{ de Albendazol} = \frac{0.2342197 \quad | \quad 8204412 \quad | \quad 667.62 \text{ mg} \quad | \quad 500 \quad | \quad 100\%}{9728469 \quad | \quad 334.83 \text{ mg} \quad | \quad 200 \text{ mg}} = 98.46 \%$$

c) Exactitud

Cálculo de concentraciones adicionadas y recuperadas:

$$\text{Conc. adicionada (mg/mL)} = \frac{\text{PesoStd (mg Albendazol)}}{50 \text{ mL}} * \frac{5 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} * \frac{\text{potencia\%}}{100\%}$$

$$\text{Conc. recuperada (mg/mL)} = \frac{\text{Área mtra} * \text{MFR}}{\text{Área STD Int}}$$

Cálculo de %Recobro de Albendazol en las muestras:

$$\% \text{ de Recobro} = \frac{\text{Conc. recuperada (mg/mL)} * 100\%}{\text{Conc. Adicionada (mg/mL)}}$$

Ejemplo de cálculo de %Recobro de Albendazol:

$$\text{Conc. Adicionada (mg/mL)} = \frac{70.0400 \text{ mg} \quad | \quad 5 \text{ mL} \quad | \quad 99.3\%}{50 \text{ mL} \quad | \quad 50 \text{ mL} \quad | \quad 100\%} = 0.1391 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Conc. Recuperada (mg/mL)} = \frac{5580897.3499 \quad | \quad 2.3311623\text{E-}01}{9338436.6443} = 0.1393 \text{ mg/mL}$$

$$\% \text{ Recobro} = \frac{0.1393 \quad | \quad 100}{0.1391} = 100.2 \%$$

d) Linealidad

Para el gráfico de residuales, se hace el cálculo por medio de Excel de la ecuación de la línea de tendencia y posteriormente se calculan los residuales como se muestra a continuación:

$$\text{Residual} = \text{valor observado}(\% \text{ Recobro}) - \text{valor predecido}$$

Se grafica el valor de concentración adicionada vs. Residual para obtener la gráfica correspondiente (ver Figura 22).

Los valores estadísticos para la regresión lineal y cálculo del intervalo de confianza fueron calculados por medio del programa Excel.

e) Precisión intermedia

Los valores estadísticos para la regresión lineal y ANOVA fueron calculados por medio del programa Excel, así como los cálculos de los coeficientes de variación y la varianza entre muestras para cada analista y valores globales.

f) Repetibilidad

Aplican los mismos cálculos utilizados en la sección 11.1.1 Especificidad.

g) Estabilidad y Efecto de filtro

El %C.V. se determina de la siguiente manera:

$$\%C.V. = \frac{Desv.Est.}{Promedio} * 100$$

Este es la misma fórmula que se utiliza para calcular el %C.V. en todos los demás análisis.

Para fines de conocimiento del comportamiento de la muestra, también se calculó la diferencia absoluta ([di]%) porcentual entre el análisis inicial y el análisis a prueba con el siguiente cálculo:

$$\%di = Abs \left[\frac{(resultado\ inicial - resultado\ a\ prueba)}{resultado\ inicial + resultado\ a\ prueba} \right] * 100$$

Anexo II. Definiciones

- **Adecuación del sistema:** Verificación de que la reproducibilidad del sistema cromatográfico, espectrofotométrico y/o de Absorción Atómica son adecuados y que éste opera con base a criterios preestablecidos, que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados obtenidos con un método analítico a lo largo de una corrida. Estas pruebas se basan en el concepto de que el equipo, sistemas electrónicos, operaciones analíticas y muestras a analizar constituyen un sistema integral que puede ser evaluado como tal ^(5,7).
- **Analito:** Se define como el componente específico a medir en una muestra en un análisis ⁽⁷⁾.
- **Balance de masas:** Es el parámetro de desempeño basado en la ley de conservación de la materia, donde se establece que el producto de una reacción fisicoquímica es el resultado de la suma de sus reactivos o de forma inversa la descomposición de un producto es la suma de sus degradaciones. En la validación de métodos analíticos se define como el proceso de la suma del valor del ensayo y los niveles de los productos de degradación, hasta que se alcance el 100 % del valor inicial, considerando la variación analítica y la especificación del ensayo ⁽⁹⁾. Se instituye como una prueba en donde se asegura la especificidad del método, pero se establece como un control de calidad para demostrar que el método analítico detecta adecuadamente todos los productos de degradación y evalúa la

capacidad del método de contabilizarlos adecuadamente. Dado que los productos de degradación desconocidos podrían ser potencialmente tóxicos y así afectar la seguridad del medicamento es imperativo que el método analítico cumpla la prueba de balance de masas para confirmar la seguridad del medicamento.

- **Blanco de muestra:** Una muestra que contenga todas las sustancias involucradas en el análisis con excepción del analito (placebo). Adicionar también, cuando estén disponibles, las impurezas o sustancias de estructura similar. Son indispensables para determinar las interferencias que pudieran ser significativas durante el análisis, a pesar de la dificultad para obtenerlos ⁽⁷⁾.
- **Criterios de aceptación:** Son los parámetros bajo los cuales se consideran aceptables los resultados de una prueba ⁽⁷⁾.
- **EMPOWER 3:** es un software desarrollado por la compañía Waters, para sistemas cromatográficos que permite generar, almacenar, procesar y reportar los resultados analíticos. Este software es el que se utiliza en el laboratorio y tiene varias funcionalidades, desde calcular automáticamente los factores cromatográficos (resolución, factor de retención y platos teóricos) hasta ejecutar el algoritmo para la prueba de pureza de pico ⁽⁶⁾.

- **Especificidad:** Es la capacidad de un método para medir inequívocamente el analito de interés en presencia de componentes que pueden estar presentes en la muestra. Típicamente estos componentes pueden incluir componentes de la misma muestra (impurezas sintéticas), productos de degradación (sustancias relacionadas), conservadores, excipientes, estándar interno, reactivos del análisis etc. La especificidad se cumple demostrando la separación adecuada de componentes. Es una de las pruebas más importantes que indican la confiabilidad de un método y es uno de los primeros parámetros que deben ser evaluados en una validación analítica. Muestra su máxima aplicación cuando la técnica propuesta se emplea para determinar el analito en estudios de estabilidad (Métodos indicativos de estabilidad) ^(4, 5, 7).
- **Estándar:** Sustancia que es empleada como referencia del analito a identificar o cuantificar.
- **Estándar interno:** Es una sustancia pura ausente en la muestra que se añade en concentración fija a los estándares y a la muestra. Posteriormente se miden las respuestas del analito y del estándar interno y por medio de un cociente entre ambas respuestas y se hace la relación con las concentraciones de los estándares. Este método tiene como ventaja la eliminación o minimización de la fluctuación instrumental o errores instrumentales y de preparación ya que ambos componentes experimentan las mismas variaciones ⁽¹⁰⁾.

- **Exactitud:** Expresa la concordancia entre el valor obtenido o recuperado del analito y la cantidad adicionada ⁽⁴⁾. Expresa la proximidad entre el valor que es aceptado como verdadero o de referencia y el valor encontrado, obtenido al aplicar el procedimiento de análisis un cierto número de veces y se debe de establecer en todo el intervalo de prueba. La medición de la exactitud implica:
 - Qué el analito está completamente disuelto en la muestra.
 - Qué la respuesta leída en el detector se deba solamente a la muestra analizada.
 - Qué la respuesta del analito en la muestra es la misma que la respuesta del analito en el estándar.
 - Qué el método analítico utilizado sea específico y selectivo.
- **Intervalo de trabajo:** Es el intervalo entre la concentración mayor y menor del analito en la muestra que ha demostrado tener adecuada precisión, exactitud y linealidad. Generalmente se demuestra después de realizar los experimentos de precisión, exactitud y linealidad ⁽⁴⁾.
- **Linealidad:** Habilidad (dentro de un intervalo dado) para obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración de principio activo en la muestra ^(4, 7).
- **Muestra:** porción del analito a identificar o cuantificar ⁽¹¹⁾.

- **Parámetros de desempeño:** Son pruebas analíticas y criterios de aceptación para cada uno de los parámetros establecidos en el protocolo de validación ⁽⁷⁾.
- **Precisión:** Se puede expresar como la varianza, desviación estándar o %C.V. de las mediciones. Es la concordancia de los resultados individuales obtenidos cuando se aplica un método repetidamente en varias muestras de un lote homogéneo. La precisión se mide a tres niveles: Repetibilidad, Precisión Intermedia y Reproducibilidad; según aplique ⁽⁴⁾.
- **Pureza de Pico:** Es un análisis diseñado para detectar la presencia de impurezas o sustancias que coeluyan con el pico de interés. Es un análisis del espectro de absorbancia del pico para determinar si éste se comporta de la misma manera o existen diferencias. En caso de que haya diferencias, esto es una señal de que dos o más picos están coeluyendo ⁽¹²⁾.
- **Recobro:** Es la cantidad recuperada del analito en la porción de la muestra o muestra adicionada una vez que esta es conducida a través del método analítico completo. El recobro permite evaluar la eficiencia de la extracción de la partícula de interés, el proceso de preparación y las interferencias posibles al aplicar el método. Se expresa en términos de porcentaje ⁽⁷⁾.

- **Repetibilidad:** Expresa la precisión de una muestra homogénea bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo de tiempo corto, por un mismo analista, usando un mismo instrumento ó equipo. Se expresa también como precisión intra – ensayo ⁽⁷⁾.
- **Reproducibilidad:** Expresa la precisión entre laboratorios, estudios en colaboración, que usualmente se aplican a la estandarización de la metodología. Cuando se realiza la reproducibilidad no es necesario hacer la precisión intermedia, puesto que la reproducibilidad es un estudio más amplio que la incluye de suyo ^(4, 7).
- **Selectividad:** Es la capacidad del método para medir inequívocamente al analito en la presencia de otros componentes esperados como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz ^(4, 7).
- **Sustancia de referencia:** Toda aquella sustancia de uniformidad reconocida destinada a utilizarse en comprobaciones analíticas, físicas, químicas o microbiológicas en el transcurso de las cuales sus propiedades se comparan con las sustancias en evaluación ^(4, 5).
- **Validación:** Se define como el proceso que a través de estudios o pruebas de laboratorio, establece que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para su aplicación analítica ⁽⁷⁾.

- **Validación parcial (verificación analítica):** En una validación parcial se llevan a cabo únicamente las pruebas suficientes que muestren evidencia objetiva que demuestre que al aplicar un método compendial o normalizado se cumplen con las especificaciones del mismo y que se cuenta también con la competencia técnica para realizarlo adecuadamente tomando en consideración las propias instalaciones, el equipo y el personal ⁽⁷⁾.