



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**Verificación de un método analítico por HPLC para la
cuantificación de citalopram en tabletas de 20 mg**

Tesis

**Que para obtener el título de
Licenciada en Farmacia**

Presenta:

Montserrat Ramírez López

Asesora:

Dra. Clara Luisa Domínguez Delgado

Coasesora:

Dra. María de la Luz Zambrano Zaragoza

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y abuelos

“En primer lugar, les agradezco a mis padres y abuelos que siempre me han brindado su apoyo incondicional para poder cumplir todos mis objetivos personales y académicos. Ellos son los que con su cariño me han impulsado siempre a perseguir mis metas y nunca abandonarlas frente a las adversidades”.

También a mis asesoras

“Le agradezco muy profundamente a mis asesoras por su dedicación y paciencia, sin sus palabras y correcciones precisas no hubiese podido lograr llegar a esta instancia tan anhelada. Gracias por su guía y todos sus consejos, los llevaré grabados para siempre en la memoria en mi futuro profesional”.

Así como al proyecto:

INFRA-322008 “Fortalecimiento de la infraestructura y consolidación del grupo multidisciplinario de investigación para la aplicación en áreas biológicas siguiendo los principios de química verde”.

A todos mis docentes

“Son muchos los docentes que han sido parte de mi camino universitario, y a todos ellos les quiero agradecer por transmitirme los conocimientos necesarios para hoy poder estar aquí, sin ustedes los conceptos serían solo palabras.”.

Gracias a la casa de estudios

“Por último agradecer a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán que me ha dado tanto, y al mismo tiempo me ha permitido obtener mi tan ansiado título.”

ÍNDICE

También a mis asesoras	2
A todos mis docentes	2
Gracias a la casa de estudios	2
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
LISTA DE DEFINICIONES.....	9
1. INTRODUCCIÓN	11
2. MARCO TEÓRICO	13
2.1 MARCO REGULATORIO	13
2.2 PARÁMETROS DE DESEMPEÑO DEL MÉTODO ANALÍTICO	14
2.2.1. Linealidad	15
2.2.1.1. Linealidad del sistema.....	15
2.2.1.2. Linealidad del método	15
2.2.2. Especificidad.....	16
2.2.3. Selectividad del método	16
2.2.4. Precisión (reproducibilidad/ repetibilidad).....	16
2.2.5. Exactitud y repetibilidad del método.....	17
2.2.6. Límite de detección	17
2.2.7. Límite de cuantificación.....	19
2.2.8. Tolerancia del método.....	21
2.2.9. Robustez del método	21
3. VERIFICACIÓN.....	22
4. TÉCNICAS ANALÍTICAS CROMATOGRÁFICAS USADAS PARA VERIFICACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	23
4.1. Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC)	24
4.2. Cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC)	24
4.3. Cromatografía de Gases.....	24
4.4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)	25
5. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS.....	27
5.1. Retención cromatográfica o factor de capacidad	27
5.2. Factor de coeio	28
5.3. Platos teóricos	29
5.4 Resolución cromatográfica.....	30
5.5. Partes de un Cromatograma.....	30
6. BROMHIDRATO DE CITALOPRAM.....	32
6.1. Propiedades Fisicoquímicas	32
.....	32
6.2. Mecanismo de Acción.....	32
6.3. Farmacocinética	33
7. OBJETIVOS.....	34
7.1 OBJETIVO GENERAL	34
7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
7.3 JUSTIFICACIÓN	34
8. INSUMOS Y MATERIALES	35
9. METODOLOGÍA	38
10. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	50

11.	CONCLUSIONES	65
12.	PERSPECTIVAS	65
13.	ANEXOS.....	66
	13.1 INCERTIDUMBRE	66
	13.2 Linealidad del método	67
	13.3 Reproducibilidad.....	67
	13.4 Repetibilidad	69
	13.5 Recuperacion y Sesgo	71
	13.6 Selectividad.....	72
	13.7 Monografía de bromhidrato de citalopram	73
14.	REFERENCIAS	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Jerarquía del marco legal para la protección a la salud en México ...	13
Figura 2. Etapas del proceso del estado validado del método analítico.....	23
Figura 3. Partes de un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución.	25
Figura 4. Diagrama de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.	27
Figura 5. Pico cromatográfico asimétrico.	29
Figura 6. Partes de un cromatograma.....	31
Figura 7. Molécula de Bromhidrato de Citalopram.	32
Figura 8. Cromatograma de muestras de valoración de citalopram obtenido con un detector de luz UV a una longitud de onda de 254 nm.....	50
Figura 9. Cromatograma adecuabilidad del sistema citalopram obtenido con un detector de luz UV a una longitud de onda de 254 nm.....	52
Figura 10. Cromatograma de linealidad del método de citalopram obtenido con un detector de luz UV a una longitud de onda de 254 nm.....	53
Figura 11. Gráfica de linealidad de método de citalopram.	54
Figura 12. Cromatograma precisión intermedia obtenido con un detector de luz UV a una longitud de onda de 254 nm.	54
Figura 13. Cromatograma repetibilidad obtenido con un detector de luz UV a una longitud de onda de 254 nm.	57
Figura 14. Cromatograma de recuperación y sesgo obtenido con un detector de luz UV a una longitud de onda de 254 nm.	59
Figura 15. Gráfica de recuperación de citalopram.....	60
Figura 16 Comparación de cromatograma de solución blanco (A) contra cromatograma con muestra de citalopram (B) obtenido con un detector de luz UV a una longitud de onda de 254 nm.	61
Figura 17. Cromatograma de muestras de selectividad a condiciones normales (a, b) y condiciones de temperatura (c, d) obtenido con un detector de luz UV a una Longitud de onda de 254 nm.....	62
Figura 18. Cromatograma de muestras de selectividad a condiciones de hidrólisis básica (a, b), hidrolisis acida (c, d) y degradación fotolítica (e, f) obtenidas con un detector de luz UV a una longitud de onda de 254 nm.	62
Figura 19. Diagrama de análisis causa raíz (diagrama de Ishikawa)	66
Figura 20. Monografía de bromhidrato de citalopram recuperado de la FEUM 12 edición.....	73
Figura 21. Monografía de bromhidrato de citalopram recuperado de la FEUM 12 edición.....	74
Figura 22. Monografía de bromhidrato de citalopram recuperada de la FEUM 12 edición.....	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de desempeño de la validación y/o verificación de un método analítico.	14
Tabla 2. Material para la realización de la verificación analítica de citalopram.	35
Tabla 3. Equipos/instrumentos para la realización de la verificación analítica de citalopram.....	35
Tabla 4. Reactivos para la realización de la verificación analítica de citalopram.	35
Tabla 5. Insumos para la realización de la verificación analítica de citalopram.	36
Tabla 6. Estándares para la realización de la verificación analítica de citalopram.....	36
Tabla 7. Placebo analítico para la verificación analítica de citalopram.....	36
Tabla 8. Preparación de muestras para la linealidad del método.	41
Tabla 9. Preparación de muestras para reproducibilidad.	43
Tabla 10. Preparación de muestras para la repetibilidad.	44
Tabla 11. Preparación de muestras para recuperación y sesgo.	46
Tabla 12. Resultados obtenidos de estándares para valoración de citalopram. Recobro: 100.17%.....	51
Tabla 13. Resultados obtenidos de las muestras para valoración de citalopram.	51
Tabla 14. Resultados obtenidos de la adecuabilidad del sistema de citalopram.	52
Tabla 15. Resultados obtenidos para el parámetro de linealidad del método de citalopram.....	53
Tabla 16. Cálculo de la ecuación de la recta de la linealidad del método de citalopram.....	54
Tabla 17. Resultados obtenidos de reproducibilidad de citalopram Día 1 Analista 1.....	55
Tabla 18. Resultados obtenidos de reproducibilidad de citalopram Día 2 Analista 1.....	55
Tabla 19. Resultados estadísticos Analista 1, Día 1 y 2.....	55
Tabla 20. Resultados obtenidos de reproducibilidad de citalopram Día 1 Analista 2.....	55
Tabla 21. Resultados obtenidos de reproducibilidad de citalopram Día 2 Analista 2.....	56
Tabla 22. Resultados estadísticos Analista 2, Día 1 y 2.....	56
Tabla 23. Cálculo de repetibilidad a una concentración al 90% de citalopram Día 1 y 2.....	57
Tabla 24. Datos estadísticos concentración 90%, Día 1 y 2.....	57
Tabla 25. Cálculo de repetibilidad a una concentración al 100% de citalopram Día 1 y 2.....	58
Tabla 26. Datos estadísticos concentración 100%, Día 1 y 2.....	58
Tabla 27. Cálculo de repetibilidad a una concentración al 110% de citalopram Día 1 y 2.....	58
Tabla 28. Datos estadísticos concentración 110%, Día 1 y 2.....	58
Tabla 29. Resultados obtenidos de recuperación y sesgo de citalopram.....	60
Tabla 30. Cálculo de la ecuación de la recta de recuperación de citalopram... ..	60
Tabla 31. Cálculo de muestras de selectividad de citalopram.....	63

Tabla 32. Criterios de aceptación para la Verificación Analítica de citalopram de acuerdo con el PNO-CCQ-037- Versión 7B “Verificación de métodos analíticos”, basado en la FEUM 12 edición.	64
Tabla 33. Cálculo de estándares de linealidad del método	67
Tabla 34. Cálculo de estándares de reproducibilidad Analista 1, Día 1	67
Tabla 35. Cálculo de estándares de reproducibilidad Analista 1 Día 2	67
Tabla 36. Cálculo de estándares de reproducibilidad Analista 2 Día 1	68
Tabla 37. Cálculo de estándares de reproducibilidad Analista 2 Día 2	68
Tabla 38. Análisis de varianza de un factor concentración de citalopram al 90%	68
Tabla 39. Análisis de varianza de un factor concentración de citalopram al 100.0%	69
Tabla 40. Análisis de varianza de un factor concentración de citalopram al 110%	69
Tabla 41. Cálculo de estándares de repetibilidad de citalopram Día 1.....	69
Tabla 42. Cálculo de estándares de repetibilidad de citalopram Día 2.....	70
Tabla 43. Análisis de varianza de un factor concentración de citalopram al 90.0%	70
Tabla 44. Análisis de varianza de un factor concentración de citalopram al 100.0%	70
Tabla 45. Análisis de varianza de un factor concentración de citalopram al 110.0%	71
Tabla 46. Cálculos de estándares de recuperación y sesgo de citalopram.....	71
Tabla 47. Cálculo del intervalo de confianza para la pendiente de recuperación de citalopram.....	71
Tabla 48. Cálculo del intervalo de confianza para la ordenada al origen de recuperación de citalopram	72
Tabla 49. Intervalo de confianza para el recobro de la recuperación	72
Tabla 50. Recobro de la recuperación de citalopram	72
Tabla 51. Cálculo de estándares de selectividad de citalopram.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

b_1	Pendiente.
b_0	Ordenada al origen.
CV	Coeficiente de variación o desviación estándar relativa.
$CV_{x/y}$	Coeficiente de variación de regresión.
ER	Estándar de referencia.
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
g	Gramos.
mg	Miligramos.
μg	Microgramos.
mL	Mililitros.
μL	Microlitros.
n	Números de mediciones o recobros o blancos o muestras o determinaciones.
r^2	Coeficiente de determinación.
S	Desviación estándar.
S^2	Varianza.
σ^2	Varianza poblacional.
IC (β_1)	Intervalo de confianza para la pendiente poblacional.
IC (β_0)	Intervalo de confianza para la ordenada al origen poblacional.
IC (μ)	Intervalo de confianza para la media poblacional.
PDA	Detector de Arreglo de Diodos
%	Porcentaje o por ciento.
Sref	Sustancia de referencia.
$S_{x/y}$	Desviación estándar de regresión.
$t_{0.975 \text{ gl}}$	Valor de la distribución t de Student asociada a los grados de libertad.

LISTA DE DEFINICIONES

- **Analito.** Componente específico de una muestra a medir en un análisis. ²
- **Criterio de aceptación.** Indicador predefinido mediante el cual un resultado se considera que esta dentro de los límites o que excede los límites indicados de especificación. ²
- **Especificaciones.** Descripción del material, sustancia o producto, que incluye la definición de sus propiedades y características, con las tolerancias de variación de los parámetros de calidad. ²
- **Excipiente farmacéutico.** Toda sustancia, distinta del ingrediente farmacéutico activo. ²
- **Metodología de prueba.** Procedimiento para determinar si un producto o materia prima cumple con las especificaciones establecidas. ²
- **Método analítico.** Descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se debe cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra. ²
- **Método analítico desarrollado internamente.** Método desarrollado por el propio laboratorio. ²
- **Muestra.** Parte representativa de materia a evaluar. ²
- **Muestra analítica.** Parte representativa del sistema de objeto de estudio. ²
- **Muestra adicionada.** Porción representativa del material a evaluar, a la que se le adicionan cantidades conocidas del analito. ²
- **Parámetros de desempeño.** Ciertas especificaciones a estudiar en un protocolo de validación/ verificación. ²
- **Placebo analítico.** Muestra que contiene todos los componentes de una muestra a excepción del analito. ²
- **Placebo adicionado.** Muestra de un placebo analítico al se le adiciona una cantidad conocida del analito de interés. ²
- **Placebo.** Muestra que no contiene el analito de interés. ²
- **Recobro.** Cantidad de analito determinada en el placebo adicionado, empleando el método analítico. ²
- **Revalidación.** Comprobación de que el método analítico mantiene su rendimiento cuando existen cambios en la composición del producto. ²
- **Sustancia de referencia.** 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 la sustancia en evaluación. ²

- **Sustancia de referencia primaria.** Sustancia que es designada por tener la más alta calidad microbiológica y química, cuyas propiedades se aceptan sin referencia a otras sustancias. ²
- **Sustancia de referencia secundaria.** Sustancia cuyas propiedades se asignan por comparación con una sustancia de referencia primaria, o bien, cuando está certificada mediante un procedimiento reconocido científicamente. ²

1. INTRODUCCIÓN

El citalopram es un medicamento antidepresivo que pertenece al grupo de los inhibidores selectivos de la receptación de serotonina. Está indicado en el tratamiento de la depresión, el trastorno de angustia y en el tratamiento del trastorno obsesivo compulsivo (TOC).³

En la *Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015 Buenas prácticas de fabricación de medicamentos* se establece que todos los procesos de fabricación de los medicamentos deben ser validados, incluidos los métodos analíticos, esto debido a que la validación es la demostración de que un método es apto para su realización en el laboratorio a partir de pruebas documentadas. El proceso de validación permite el conocimiento de las características de funcionamiento del método y proporciona un grado de confianza en el mismo y en los resultados obtenidos al aplicarlo. La validación de un método es el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio; que las características de desempeño del método satisfacen los requisitos para su aplicación analítica.⁶

Por otra parte, la verificación es la confirmación mediante la aportación de evidencia documentada de que se han cumplido los requisitos especificados. La confirmación puede comprender acciones tales como la realización de pruebas y demostraciones documentadas.¹

Un método analítico es una serie de procedimientos que nos permite conocer nuestro analito de interés, tanto cualitativa como cuantitativamente. Es importante la validación de los métodos analíticos, ya que esto permite emitir resultados confiables y adecuados para la determinación de analitos provenientes de muestras de diversa índole. Los métodos analíticos utilizados para determinar la calidad de los productos farmacéuticos están determinados a partir de ciertos criterios de acuerdo con la normatividad vigente tanto nacional como extranjera.

El uso de la estadística es fundamental para dar soporte en el proceso de validación, sobre todo para el manejo y análisis de los datos, lo que posibilita emitir juicios con criterios que lleven a una correcta evaluación del método.

En México el documento legal instituido por la Ley General de Salud donde se establecen los métodos de análisis y los requerimientos necesarios sobre identidad, pureza, contenido, características físicas y químicas, que garantizan la calidad de los fármacos, preparados farmacéuticos, radiofármacos y productos biológicos, en cuanto

a su eficacia, seguridad y calidad es la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM).¹

“Los métodos analíticos de la FEUM no requieren ser validados, sino únicamente se requiere verificar su aplicabilidad al producto, bajo las condiciones de operación del laboratorio y en función del propósito analítico deseado” de acuerdo con lo establecido en la *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, (2018), 12 Edición Apéndice III pág. 147, México D.F.*¹

En el presente trabajo se realizó la verificación de un método analítico para la valoración de una especialidad farmacéutica que contiene citalopram 20 mg, forma farmacéutica tableta, empleando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) establecido en la FEUM 12ª edición y utilizando como referencia los parámetros de desempeño establecidos en el procedimiento interno *Verificación de Métodos Analíticos (PNO-CCQ-037-Versión 7B)*, así como la Guía de Validación de Métodos Analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, A.C. En el método analítico se obtuvieron picos cromatográficos de citalopram con tiempos de retención similares para la muestra y el estándar, por lo tanto, el método es específico. El estándar y el análisis del placebo nos demuestra que ningún excipiente interfiere con el pico del principio activo, se detectó la presencia de productos de degradación del citalopram al realizar el análisis del principio activo sometido a diferentes procedimientos de degradación forzada. Inicialmente se estudiaron los fundamentos del HPLC, el tipo de equipo que se utilizó, continuando con un análisis químico del principio activo que incluye su estructura química y por último el desarrollo de la verificación del método.

Por temas de confidencialidad tanto el nombre de la empresa como el nombre comercial del producto farmacéutico serán protegidos.

2. MARCO TEÓRICO

Un elemento esencial para el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación de medicamentos es la validación y/o verificación de la metodología analítica, que permite demostrar que la fabricación de los medicamentos cumple con las características esenciales para así asegurar la calidad de estos.⁶

La validación o la verificación de un método debe tener ciertas características normalizadas y experimentales de las que se obtienen datos sobre su exactitud, precisión, etc. Cualquier método analítico nuevo que este por realizarse en un laboratorio además de estar documentado, también es necesario que los analistas responsables de su ejecución tengan una formación universitaria del área de las ciencias químicas y biológicas; así como una capacitación adecuada.

Los métodos analíticos utilizados para determinar la calidad de los productos farmacéuticos están determinados a partir de ciertos criterios de acuerdo con la normatividad vigente nacional.

2.1 MARCO REGULATORIO

En México existe un marco legal para protección de la salud de los mexicanos, dicho marco crea las bases para que, a través de su cumplimiento, los fabricantes de medicamentos puedan asegurar la eficiencia, seguridad y calidad de los medicamentos que fabrican y el cual está establecido, en orden jerárquico, como se muestra en la Figura 1.



Figura 1. Jerarquía del marco legal para la protección a la salud en México

De esta manera, el documento legal instituido por la Ley General de Salud en donde se establecen los métodos de análisis y los requerimientos necesarios sobre identidad, pureza, contenido, características físicas y químicas que garanticen la calidad de los fármacos, preparados farmacéuticos, radiofármacos y productos biológicos es la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM).¹

2.2 PARÁMETROS DE DESEMPEÑO DEL MÉTODO ANALÍTICO

La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (*Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, (2018), 12 Edición Apéndice III pag. 147, México D.F.*) indica que “los métodos analíticos de la FEUM no requieren ser validados, sino únicamente verificar su aplicabilidad al producto, bajo las condiciones de operación del laboratorio y en función del propósito analítico deseado”. Esto implica que se tiene que cumplir con ciertos parámetros de desempeño, los cuales están agrupados en cuatro categorías, cada categoría es específica para el método a evaluar como se muestra en la Tabla 1:¹

Tabla 1. Parámetros de desempeño de la validación y/o verificación de un método analítico.

Parámetro	Categoría				
	I Valoración	Impurezas y productos de degradación		III Físicas	IV Identidad
		Ila Cuantitativo	Ilb Prueba límite		
Repetibilidad	SI	SI	NO	SI	NO
Reproducibilidad	SI	SI	NO	SI	NO
Selectividad	SI	SI	SI	NO	SI
Límite de detección	NO	NO	SI	NO	NO
Límite de cuantificación	NO	SI	NO	NO	NO
Incertidumbre	SI	SI	NO	SI	
Recuperación y Sesgo	SI	SI	NO	NO	NO

Las pruebas para evaluar y sus criterios de aceptación empleados en la verificación de acuerdo con la Guía de Validación de Métodos Analíticos editada por el Colegio

Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, A.C. se describen a continuación:

2.2.1. Linealidad

2.2.1.1. Linealidad del sistema

Definición: La linealidad del sistema es la exactitud de los resultados obtenidos entre la relación de la respuesta analítica y la concentración del analito, en el cual se demuestra que al aumentar la concentración del analito la respuesta aumenta de la misma manera, y de forma inversa, al disminuir la concentración del analito, la respuesta disminuirá de igual manera en un intervalo definido y en este intervalo los resultados deben ser precisos y exactos.⁴

Determinación: Se determina a partir de un intervalo que incluya al menos cinco niveles de concentración por triplicado, que se puede realizar, ya sea por pesadas independientes o diluciones. Se debe de determinar el valor de la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1)$.⁴

Parámetros de Aceptación:

- Confirmar visualmente la existencia de la linealidad.
- $r^2 \geq 0.98$
- $IC(\beta_1)$ no debe incluir el cero
- C.V. < 2 %

2.2.1.2. Linealidad del método

Definición: La linealidad del método es la capacidad de un método analítico que permite demostrar que los resultados obtenidos son directamente proporcionales a la concentración del analito.¹

Determinación: Se determina a la cantidad de placebo adicionado equivalente a una muestra analítica por triplicado, seleccionando al menos cinco niveles de concentración tanto inferior y superior por triplicado.^{1,4}

Parámetros de Aceptación:

- Confirmar visualmente la existencia de la linealidad.
- $r^2 \geq 0.98$
- Determinar la cantidad recuperada

- IC (β_1) no debe incluir el cero
- C.V.< 2 %

2.2.2. Especificidad

Definición: La especificidad es la capacidad del método analítico para medir en la muestra solo el analito sin interferencia de impurezas, excipientes o productos de degradación.⁴

Determinación: Para determinar la especificidad, se debe demostrar que la respuesta analítica se debe únicamente al analito.⁴

Parámetros de Aceptación:

La respuesta debe de ser únicamente del analito.

2.2.3. Selectividad del método

Definición: La selectividad es la capacidad que tiene el método de detectar impurezas, productos de degradación o componentes de la misma muestra bajo condiciones de degradación forzada.⁴

Determinación: Para la selectividad el analito se debe de someter a condiciones que generen su inestabilidad química a través de temperatura, luz, en condiciones ácidas, básicas, oxidativas, etc.⁴

Parámetros de Aceptación:

Si existe una degradación mayor o igual al 30% se debe justificar.

2.2.4. Precisión (reproducibilidad/ repetibilidad).

Definición: Es el grado de concordancia entre los resultados obtenidos bajo las mismas condiciones.⁴

Reproducibilidad

Definición: La reproducibilidad es el grado de concordancia de los resultados obtenidos dentro de un mismo laboratorio realizado en diferentes días y con diferentes analistas.⁴

Determinación: La reproducibilidad se determina a partir de tres niveles de concentración cuyo contenido este incluido en el intervalo lineal; para realizarse en dos diferentes días y por dos diferentes analistas bajo las mismas condiciones analíticas.

Calcular el porcentaje de recuperación de los niveles de concentración, la media aritmética (\bar{y}), desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV).

Parámetros de Aceptación:

- $CV \leq 2 \%$

Repetibilidad

Definición: La repetibilidad es el grado de concordancia entre los resultados obtenidos por un analista bajo las mismas condiciones dentro de un laboratorio.

Determinación: La repetibilidad se determina a partir de tres niveles de concentración cuyo contenido este incluido en el intervalo lineal; para realizarse en dos diferentes días y por un analista, bajo las mismas condiciones analíticas.⁴

Calcular el porcentaje de recuperación de los niveles de concentración, la media aritmética (\bar{y}), desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV).

Parámetros de Aceptación:

- $CV \leq 2 \%$

2.2.5. Exactitud y repetibilidad del método

Definición: La exactitud de un método analítico es la proximidad de un resultado al valor real.⁴

Determinación: Se determina a través de cinco niveles de concentración por sextuplicado, en donde se calcula el porcentaje recuperado del analito en cada nivel, calcular el promedio aritmético (\bar{y}), desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$ del porcentaje de recobro.⁴

Parámetros de Aceptación:

- 98-102% para métodos cromatográficos

2.2.6. Límite de detección.

Definición: El límite de detección (LD) es la cantidad mínima de análisis en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada.²

Determinación con base en señal ruido: Aplica para métodos que utilizan instrumentos para medir la respuesta analítica y presenta una señal ruido basal. Se determina la respuesta del blanco (reactivos, placebos analíticos, etc.) y la respuesta de muestras analíticas (analito, placebos adicionados) en un intervalo de concentraciones del analito que incluya la especificación de la prueba de impurezas. Determinar aquella cantidad del analito que genere una respuesta con respecto a la muestra blanco en una proporción 3 a 1.⁴

Determinación con base en la curva de calibración y la desviación estándar de los blancos: Aplica tanto a métodos instrumentales como no instrumentales. Se preparan tres concentraciones a concentraciones menores o donde el valor esté incluido dentro de la especificación de la prueba de impurezas. Preparar 5 blancos, puede ser de reactivos, placebos, etc. y medir la respuesta analítica. Para la curva de calibración, sin incluir los blancos, calcular la pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$). Calcular la desviación estándar (S_b) de los blancos.

El límite de detección con base en la curva de calibración y la desviación estándar de los blancos se calcula con la siguiente formula:⁴

$$LD = \frac{3.3 (S_b)}{b^1}$$

Parámetros de aceptación:

- El $IC(\beta_1)$ no debe incluir el cero
- $r^2 \geq 0.98$
- El LD debe de ser menor a la especificación de la prueba de impurezas.

Determinación con la curva de calibración y la desviación estándar de regresión:

Este procedimiento aplica tanto a métodos instrumentales como a no instrumentales. Se deben preparar por lo menos 3 concentraciones de la sustancia a concentraciones menores de la especificación de la prueba de impurezas.

Calcular el valor de la pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2), la desviación estándar de regresión ($S_{x/y}$) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$).

El límite de detección con la curva de calibración y la desviación estándar de regresión se calcula con la siguiente fórmula:⁴

$$LD = \frac{3.3 (S_{x/y})}{b^1}$$

Parámetros de aceptación:

- El IC(β_1) no debe incluir el cero
- $r^2 \geq 0.98$
- El LD debe de ser menor a la especificación de la prueba de impurezas.

Determinación con la curva de calibración y la desviación estándar de la ordenada al origen:

Este procedimiento aplica tanto a métodos instrumentales como a no instrumentales. Se deben preparar por lo menos 3 concentraciones de la sustancia a concentraciones menores de la especificación de la prueba de impurezas.

Calcular el valor de la pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2), la desviación estándar de regresión (S_{b0}) y el intervalo de confianza para la pendiente (IC(β_1)).

El límite de detección con la curva de calibración y la desviación estándar de la ordenada al origen se calcula con la siguiente fórmula: ⁴

$$LD = \frac{3.3 (Sb^0)}{b^1}$$

Parámetros de aceptación:

- El IC(β_1) no debe incluir el cero
- $r^2 \geq 0.98$
- El LD debe de ser menor a la especificación de la prueba de impurezas.

2.2.7. Límite de cuantificación

Definición: El límite de cuantificación (LC) es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser determinada con exactitud y precisión aceptable, bajo las condiciones de aplicación del método. ¹

Determinación con base en señal ruido: Aplica para métodos que utilizan instrumentos para medir la respuesta analítica y presenta una señal ruido basal. Se determina la respuesta del blanco (reactivos, placebos analíticos, etc.) y la respuesta de muestras analíticas (analito, placebos adicionados) en un intervalo de concentraciones inferiores del analito que incluya la especificación de la prueba de impurezas. Determinar aquella cantidad del analito que genere una respuesta con respecto a la muestra blanco en una proporción 10 a 1. ⁴

Parámetros de aceptación:

- El Límite de Cuantificación debe ser menor a la especificación del contenido/ valoración de la prueba de impurezas.

Determinación con la curva de calibración y la desviación estándar de los blancos:

Aplica tanto a métodos instrumentales como no instrumentales. Se preparan tres concentraciones a concentraciones menores o que la concentración este incluida dentro de la especificación de la prueba de impurezas. Preparar 5 blancos, puede ser de reactivos, placebos, etc. y medir la respuesta analítica. Para la curva de calibración sin incluir los blancos calcular la pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$). Calcular la desviación estándar (S_b) de los blancos.

El límite de cuantificación con la curva de calibración y la desviación estándar de los blancos se calcula con la siguiente fórmula: ⁴

$$LC = \frac{10 (S^b)}{b^1}$$

Parámetros de aceptación:

- El $IC(\beta_1)$ no debe incluir el cero
- $r^2 \geq 0.98$
- El LC debe de ser menor a la especificación de la prueba de impurezas.

Determinación la curva de calibración y la desviación estándar de la regresión:

Este procedimiento aplica tanto a métodos instrumentales como a no instrumentales. Se deben preparar por lo menos 3 concentraciones de la sustancia a concentraciones menores de la especificación de la prueba de impurezas.

Calcular el valor de la pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2), la desviación estándar de regresión ($S_{x/y}$) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$).

El límite de cuantificación con base en la curva de calibración y la desviación estándar de la regresión se calcula con la siguiente fórmula: ⁴

$$LC = \frac{10 (S_{x/y})}{b^1}$$

Parámetros de aceptación:

- El $IC(\beta_1)$ no debe incluir el cero
- $r^2 \geq 0.98$
- El LC debe de ser menor a la especificación de la prueba de impurezas.

Determinación con base en la curva de calibración y la desviación estándar de la ordenada al origen: Este procedimiento aplica tanto a métodos instrumentales como a no instrumentales. Se deben preparar por lo menos 3 concentraciones de la sustancia a concentraciones menores de la especificación de la prueba de impurezas.

Calcular el valor de la pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2), la desviación estándar de regresión (S_{b_0}) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$).

El límite de cuantificación con la ordenada al origen y la desviación estándar de regresión se calcula con la siguiente fórmula: ⁴

$$LC = \frac{10 (S_{b_0})}{b^1}$$

Parámetros de aceptación:

- El $IC(\beta_1)$ no debe incluir el cero
- $r^2 \geq 0.98$
- El LC debe de ser menor a la especificación de la prueba de impurezas.

2.2.8. Tolerancia del método

Definición: La tolerancia es el grado de reproducibilidad de los resultados de prueba obtenidos por el análisis de la misma muestra, bajo una variedad de condiciones tales como: diferentes laboratorios, analistas, instrumentos, lotes de reactivos, días, etc. ⁴

Determinación: Se deben establecer aquellos factores ajenos al método como: diferentes equipos, lotes de reactivos, columnas, etc., que se pueden presentar al reproducir el método en otras condiciones. Fijar por lo menos dos condiciones y analizar una misma muestra por lo menos por triplicado a cada condición. Calcular la media aritmética (\bar{y}), desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV) del contenido. ⁴

Parámetros de Aceptación:

- $CV \leq 2\%$ para métodos cromatográficos

2.2.9. Robustez del método

Definición: Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentar variaciones pequeñas pero deliberadas, en las características normales de operación del método. ⁴

Determinación: Se deben establecer aquellos factores instrumentales (temperatura de la columna, presión en la columna, velocidad de flujo, etc.) y/o factores no instrumentales (pH de fases, etc.), que se consideran críticos. Calcular la media

aritmética de la condición normal de operación (\bar{y}_0) y de cada condición de operación diferente a la condición normal (\bar{y}_i). Calcular la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto a la condición normal ($|d_i|$).⁴

Parámetros de aceptación:

- $|d_i| \leq 2\%$ para métodos cromatográficos

3. VERIFICACIÓN

La verificación es fundamental dentro de un laboratorio de control de calidad ya que con ello se asegura que el método es confiable. Por lo que es importante que para este proceso se asigne a un responsable de realizar dicha tarea. Normalmente se establece que dentro de un laboratorio se validan métodos normalizados y no normalizados.

Los métodos normalizados son aquellos que normalmente son desarrollados por organismos confiables y reconocidos como las farmacopeas, a los cuales se les realiza una verificación o validación menor, con la cual se pueda comprobar que el método es ejecutable en el laboratorio.

Los métodos no normalizados son aquellos que son nuevos o desarrollados por el laboratorio o que son publicados en artículos científicos.

Para ejecutar un método analítico es necesario conocer la técnica por la que se llevará a cabo el análisis cuantitativo o cualitativo, así mismo aplicar la técnica para la determinación del analito y que toda metodología esté documentada, es necesario crear un procedimiento para así plasmar los parámetros de desempeño en un protocolo. Al obtener los resultados obtenidos experimentales es necesario plasmarlo en un reporte para así mantener el estado validado del método.

Figura 2. Etapas del proceso del estado validado del método analítico.



4. TÉCNICAS ANALÍTICAS CROMATOGRÁFICAS USADAS PARA VERIFICACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La Química Analítica es una rama de las ciencias químicas que permite desarrollar métodos a partir de técnicas analíticas con ayuda de instrumentos analíticos, esto con el fin de estudiar, separar e identificar los componentes de una muestra. La cual es muy utilizada en la industria farmacéutica, química, alimenticia, en medicina, medio ambiente, etc.

La técnica analítica es la herramienta para llevar a cabo un análisis químico y así poder conocer el analito estudiado o de interés. Actualmente, las técnicas en un laboratorio permiten identificar la composición, la estructura y la cantidad de una sustancia. Este análisis puede ser cualitativo o cuantitativo.

La cromatografía es una técnica que se desarrolló a principios del siglo XX, que permite la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla. Por lo que la cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una

mezcla son transportados por una fase móvil (gas o líquido), y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido.¹⁶

4.1. Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC)

La cromatografía de exclusión por tamaño o también llamada cromatografía de permeación por gel (GPC), es una técnica que ayuda a la caracterización de polímeros a partir de tamaños moleculares.⁸

Cuenta con ciertas características, los solutos normalmente son sustancias de diferente peso molecular y dependiendo de su medida y estructura, éstos se retienen o se eluyen a través de la columna; la fase estacionaria es inerte por lo que el analito no interactúa químicamente con la fase estacionaria, ni con la fase móvil.⁸

Permite la separación de proteínas, por lo que es muy utilizada tanto en el desarrollo como en la fabricación para la caracterización de moléculas bioterapéuticas.⁸

4.2. Cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC)

Una extensión de TLC es la cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC), que es una herramienta robusta, simple, rápida y eficiente en el análisis cuantitativo de compuestos. HPTLC es una técnica analítica basada en TLC, pero con mejoras destinadas a aumentar la resolución de los compuestos a separar y permitir el análisis cuantitativo de los compuestos. Como consecuencia, HPTLC ofrece una mejor resolución y un límite de detección más bajo.²⁹

4.3. Cromatografía de Gases

La cromatografía de gases es una técnica analítica que permite separar mezclas de compuestos volátiles y térmicamente estables en sus componentes individuales, existen dos tipos de cromatografía de gases, la de partición donde la fase móvil es un gas y la estacionaria es un sólido; y la de adsorción en donde la fase móvil es un gas y la estacionaria es un líquido.¹

Los gases transportadores más utilizados son el Helio, Nitrógeno e Hidrógeno, el tipo de gas a utilizar se va a determinar no solo por el tipo de detector sino también por la eficiencia de separación y la velocidad.

Los tipos de detectores más utilizados son el de conductividad térmica (TCD); el detector de ionización de flama (FID) que es sensible a todos los compuestos de carbono; el detector de ionización de flama alcalina que se utiliza con muestras que estén compuestos por átomos de Nitrógeno, Azufre y Fosforo; el detector de captura de electrones (ECD) es selectivo para compuestos que tienen Cetonas y Halógenos y el detector espectro de masas que es un detector universal que es altamente sensible y selectivo.¹

4.4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)

La cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) o también conocida por su nombre en inglés High Performance Liquid Chromatography (HPLC) es una técnica analítica muy utilizada en el campo científico tanto como en el industrial. Esta técnica cromatográfica permite separar compuestos a partir de la interacción con la fase estacionaria, por lo que es posible identificarlos y cuantificarlos. Esta técnica es muy utilizada por su sensibilidad y es la indicada para el análisis de compuestos poco volátiles, iónicos y termolábiles. Dentro de sus aplicaciones se encuentra el análisis de fármacos, biomoléculas, contaminantes, dentro de la industria alimenticia el análisis de aditivos, edulcorantes, antioxidantes, en la medicina para análisis forenses y medicina clínica.

El proceso cromatográfico de esta técnica se basa en el equilibrio de distribución de los componentes de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria, el analito es retenido en la columna por lo que al ser detectado da una señal que se le conoce como pico cromatográfico (Figura 3). El éxito de esta técnica se basa en la preparación de la muestra, las características de la columna, la preparación de la fase móvil, el tipo de detector, la polaridad de los compuestos.⁷



Figura 3. Partes de un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución.

Esencialmente, un cromatógrafo de líquidos de alta resolución consta de las siguientes partes:

Reservorio: En él se encuentra la fase móvil, la cual debe estar filtrada y desgasificada para evitar obstrucciones por posible material particulado. Los reservorios suelen estar hechos de vidrio, donde están contenidas las líneas de los equipos los cuales deben de tener un filtro llamado frit, el cual permite que la fase móvil entre libre de partículas extrañas.

Sistema de bombeo: Su objetivo es impulsar la fase móvil a través de la columna, las cuales deben mantener un flujo laminar y velocidad constante, para así asegurar que la fase móvil llegue a la columna y pueda ser arrastrado el analito.

Sistema de inyección: Está conformado por una aguja automática que pica los viales y obtiene una cantidad pequeña de muestra previamente preparada.

Detector: El detector es el encargado de captar la señal analítica obtenida de la muestra. Para seleccionar el mejor detector es necesario conocer las propiedades del o los solutos que se deseen analizar. Los detectores se pueden clasificar en universales y selectivos, los más empleados son:

Universales:

Detector de índice de refracción.

Detector de conductividad eléctrica.

Selectivos:

Detector de luz UV/VIS

Detector de radioactividad.

Detector de fluorescencia.

Detector electroquímico.

Espectrómetro de masas.

Los detectores universales son completamente inespecíficos y detectan variaciones en la propiedad física de la fase móvil. Los detectores del tipo selectivos son muy específicos y miden alguna propiedad física o química propia de la muestra.¹

Columna: La columna cromatográfica es un cilindro metálico que contiene la fase estacionaria y es donde se lleva a cabo la separación del analito. El material de empaque y las características dependen de la separación que se desea lograr.

Las columnas analíticas más utilizadas en cromatografía de líquidos son las C18 (L1) octildecil-silano enlazadas químicamente a sílica porosa o a micropartículas de cerámica de 5 a 10 μm de diámetro; las C8 (L7) octilsilano enlazado químicamente a partículas de sílica totalmente porosa de 5 a 10 μm de diámetro; las CN (L10) grupos nitrilo químicamente enlazados a partículas de sílica porosa de 5 a 10 μm de diámetro.

Registrador: La señal obtenida debe ser registrada por un sistema computarizado, en la cual se puede observar el cromatograma en donde se pueden obtener parámetros cromatográficos importantes y donde se puede realizar la integración de la respuesta producida por cada pico (Figura 4).

Una buena integración es aquella en la que el inicio y final del pico tocan la línea base.

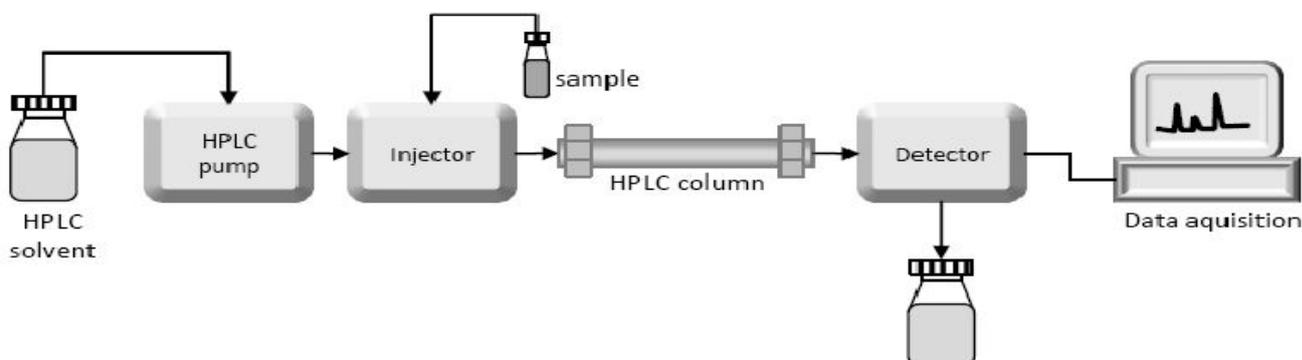


Figura 4. Diagrama de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

5. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS

5.1. Retención cromatográfica o factor de capacidad

La función de la cromatografía es separar los componentes de una mezcla, es necesario garantizar que existe una adecuada retención de los compuestos a separar con la fase estacionaria, para que se logre dicha separación. Un parámetro que mide la calidad de dicha interacción es el factor de capacidad cromatográfico (k'), la cual se calcula con la siguiente fórmula.¹

$$K' = (t_{\infty} - t_0)/t_0$$

Donde:

t_a = Tiempo de retención del primer pico en eluir.

t_0 = Tiempo muerto de la columna (corregido por la velocidad de flujo de trabajo).

Se recomienda que para métodos farmacopeicos $k' > 1.5$

Factores que influyen en el factor de capacidad: fase estacionaria, fase móvil y temperatura.

5.2. Factor de coleo

Algunas veces es útil establecer un factor de coleo para limitar el máximo permisible con relación a la asimetría del pico. Para propósitos farmacopeicos, el factor de coleo T , se define como la relación de la distancia del ancho del pico $W_{0.05}$, dividido entre dos veces la distancia f , del máximo del pico hacia el lado izquierdo del pico (Figura 5). Estas distancias deben medirse a un punto que corresponde a un 5 % de la altura partiendo de la línea base. Para un pico simétrico el factor de coleo es la unidad y el valor de T aumenta conforme el coleo va siendo más pronunciado. El cálculo se expresa por la fórmula:¹

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

Donde:

$W_{0.05}$ = Relación de la distancia del ancho del pico.

f = Distancia del máximo del pico hacia el lado izquierdo del pico.

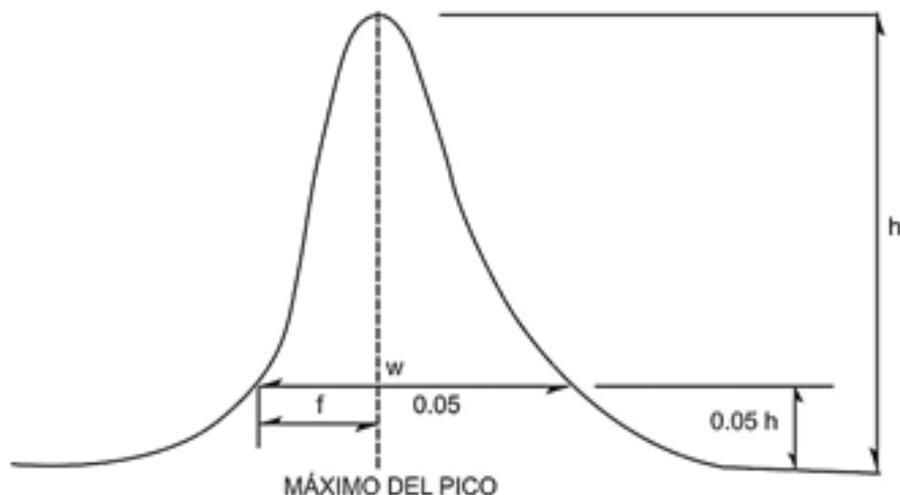


Figura 5. Pico cromatográfico asimétrico.

Se recomienda que $T < 2.0$, y que este no vaya aumentando a lo largo del análisis.

5.3. Platos teóricos

Una medida de la eficiencia de una columna en particular se puede conocer calculando el número de platos teóricos (N) de la columna con la siguiente fórmula:¹

$$N = 16 (t/w)^2$$

Donde:

t = Tiempo de retención de la sustancia.

W = Ancho de la base del pico obtenido extrapolando los lados del pico hasta la línea base, en las mismas unidades de tiempo que t .

El valor de N es dependiente de la sustancia que está siendo analizada y de las condiciones de operación tales como la velocidad de flujo, la temperatura, la cantidad del empaque de la columna y la uniformidad de éste. Se recomienda el monitoreo de los platos teóricos desde el inicio del análisis, ya que una disminución de platos teóricos es un indicio del deterioro de la columna.¹

5.4 Resolución cromatográfica

Como una medida de la eficiencia de la separación de dos componentes en una mezcla, objetivo final de la cromatografía, la resolución (R) se determina por la siguiente fórmula:¹

$$R = 2 [(t_2 - t_1)/(W_2 + W_1)]$$

Donde:

t_2 y t_1 = Tiempos de retención para los componentes.

W_2 y W_1 = Anchos correspondientes de las bases de los picos obtenidos extrapolando los lados de los picos hasta la línea base.

El factor de resolución (R) es importante para asegurar la separación de dos componentes que eluyen muy cerca uno del otro y para establecer la eficiencia del sistema.

Es recomendable que $R > 2$, a menos que se distingan un valor diferente en la monografía individual.

La resolución se puede aumentar mejorando la selectividad, con pequeñas variaciones de selectividad se pueden conseguir cambios en la resolución.

5.5. Partes de un Cromatograma

Un cromatograma es una representación gráfica que se obtiene de la interacción entre la fase móvil y la fase estacionaria con la muestra de interés a través del tiempo.

En la Figura 6 se observa un ejemplo de cromatograma que representa una separación de dos sustancias: t_{R1} y t_{R2} son los tiempos en que tarda en eluir el analito a determinada longitud de onda; t_m es el tiempo muerto que representa el tiempo en el que se presenta la primera respuesta en el cromatograma; W_1 y W_2 es lo ancho de los picos con respecto a la línea base.

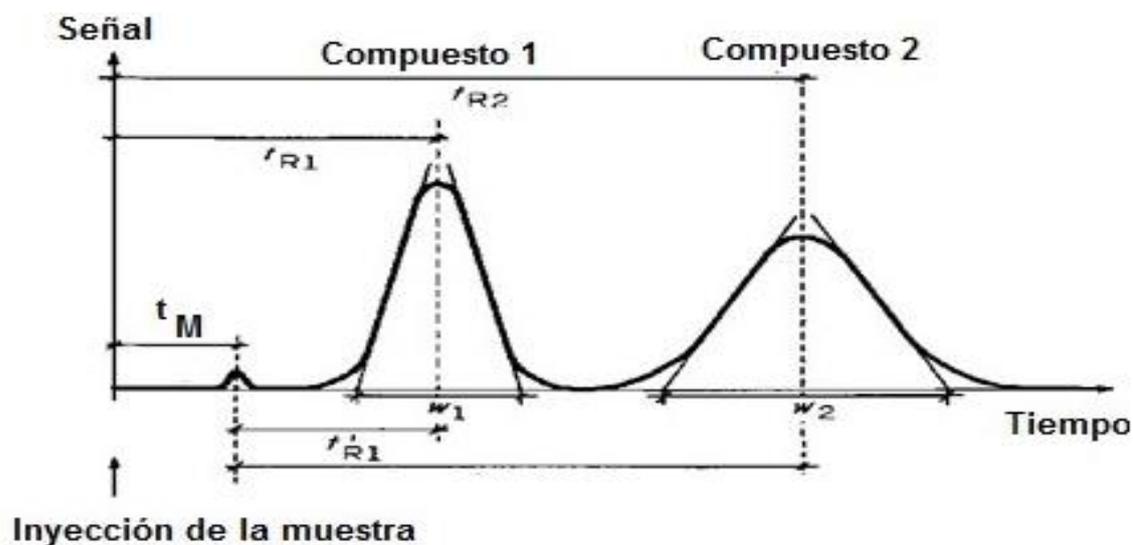


Figura 6. Partes de un cromatograma.

Lo ideal es obtener un pico tipo Gaussiano, cuando no se obtiene pueden existir muchas causas por las cuales el pico no cumple con los parámetros cromatográficos antes descritos, los cuales pueden ser con respecto a la naturaleza de la fase estacionaria, la fase móvil, la longitud de la columna o la composición de la columna, el tipo de detector o el volumen de inyección de la muestra.

Si hablamos de la naturaleza de la fase estacionaria y de la fase móvil entre más similar sea a la composición del analito habrá mayor retención, por lo que se ve reflejado en los tiempos de retención y en consecuencia en la forma de los picos.

Entre mayor longitud de la columna se tendrán un mayor número de platos teóricos, pero los tiempos de retención serán mayores y a consecuencia los picos serán menos asimétricos y con menos altura.

Por lo tanto, se deben elegir cada uno de los parámetros que puedan afectar o beneficiar al análisis para así lograr la mejor separación y se pueda obtener un método reproducible, sensible y selectivo que permita la cuantificación e identificación del analito o analitos presentes.

6. BROMHIDRATO DE CITALOPRAM

El citalopram es un medicamento antidepresivo que pertenece al grupo de los inhibidores selectivos de la receptación de serotonina. Está indicado en el tratamiento de la depresión y para prevenir las recurrencias/recaídas. También, está indicado en el tratamiento del trastorno de angustia y del trastorno obsesivo compulsivo (TOC).³

6.1. Propiedades Físicoquímicas

La estructura de la molécula de Bromhidrato de Citalopram se encuentra representada en la figura 7.

Fórmula molecular: $C_{20}H_{21}FN_2O \cdot HBr$

Peso molecular: 405.3 g/mol

Fórmula desarrollada: Bromhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-1-(4-fluorfenil)-1,3-dihidro-5-isobenzofurancarbonitrila (1:1)

Características físicas: Polvo cristalino blanco o casi blanco.

Solubilidad: Ligeramente soluble en agua, soluble en cloroformo, metanol y etanol, prácticamente insoluble en éter etílico.

Punto de fusión: 182-189 °C.¹⁹

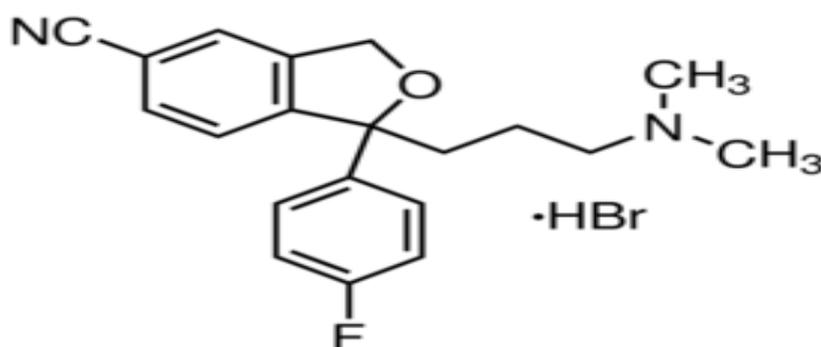


Figura 7. Molécula de Bromhidrato de Citalopram.

6.2. Mecanismo de Acción

Antidepresivo derivado de la fenilbutilamina. Actúa inhibiendo de forma selectiva la recaptación de serotonina por parte de la membrana presináptica neuronal, potenciando la transmisión serotoninérgica en el Sistema Nervioso Central. Tiene muy poca afinidad hacia los receptores colinérgicos (M), y carece de actividad significativa sobre los receptores adrenérgicos (alfa y beta), dopaminérgicos (D), histaminérgicos (H), serotoninérgicos (5-HT, 5-hidroxitriptamina) y otros neurotransmisores. Aunque citalopram no tiene afinidad por los receptores opioides, potencia el efecto

antinociceptivos de los analgésicos narcóticos. Su efecto sedante es mínimo, incluso asociado a alcohol. Citalopram disminuye la cantidad de sueño paradójico y aumenta el porcentaje de las fases de sueño profundo.³

6.3. Farmacocinética

Después de la administración oral, el citalopram, un compuesto altamente lipofílico, se absorbe rápida y casi completamente en el tracto gastrointestinal de voluntarios sanos. La biodisponibilidad oral del fármaco es del 80 %, lo que demuestra que el metabolismo de primer paso es limitado. Su biodisponibilidad no se ve afectada por los alimentos.^{12, 13} Después de una dosis única de 40 mg de citalopram, la concentración plasmática máxima (C_{max}) se alcanza en dos a cuatro horas en voluntarios sanos.¹

El citalopram se metaboliza por N-desmetilación sobre todo por las isoenzimas del citocromo P450 CYP3A4 y CYP2C19, aunque el citalopram es el producto que predomina en el plasma. Los estudios farmacológicos han demostrado que el citalopram es entre 8 y 10 veces más potente que sus metabolitos como inhibidor de la recaptación de serotonina. Aproximadamente el 30% del citalopram se excreta por vía renal, siendo la semi-vida de eliminación en los individuos sanos de unas 35 horas.³

7. OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL

- Realizar la verificación de un método analítico para la cuantificación de bromhidrato de citalopram por medio de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) de acuerdo con los parámetros de aceptabilidad establecidos en la FEUM 12ª edición, los criterios del procedimiento normalizado de operación interno *PNO-CCQ-037-Versión 7B Verificación de Métodos Analíticos* y la *Guía de Validación de Métodos Analíticos* editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, A.C

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar un esquema para la verificación de un método analítico para cuantificar bromhidrato de citalopram con exigencias de linealidad, repetibilidad, reproducibilidad, selectividad, recuperación y sesgo.
- Demostrar la validez de la metodología y así verificar los parámetros de aceptabilidad para validar la técnica en función de los criterios establecidos en el PNO-CCQ-037-Versión 7B Verificación de Métodos Analíticos, la Guía de Validación de Métodos Analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, A.C.

7.3 JUSTIFICACIÓN

Al hablar de la calidad, seguridad y eficacia que deben cumplir los productos farmacéuticos destinados a mejorar la salud de la población, debe considerarse la responsabilidad que recae en los profesionales involucrados en el control de la calidad, pues además de demostrar su profesionalismo y ética, deben tener y aplicar los conocimientos adquiridos durante su formación que le permitan diseñar y ejecutar métodos analíticos adecuados para ser validados y/o verificados para su posterior aplicación en el control de la calidad de productos farmacéuticos, sobre todo de aquellos medicamentos controlados en el que la potencia del fármaco es de especial riesgo, como los son las tabletas de bromhidrato de citalopram.

8. INSUMOS Y MATERIALES

Tabla 2. Material para la realización de la verificación analítica de citalopram.

Material	Volumen
Vaso de precipitados	100 mL
Matraz volumétrico	10 mL, 20 mL, 50 mL, 500 mL
Pipeta volumétrica	5 mL
Viales graduados	1.5 mL
Tubos de ensaye	N/A
Reservorio vidrio	1000 mL

Tabla 3. Equipos/instrumentos para la realización de la verificación analítica de citalopram.

Equipo	Marca/Modelo
Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficacia.	Agilent 1260 Infinity
Microbalanza analítica	Mettler Toledo /XPE56
Balanza analítica	Ohaus Explorer E12140
Baño ultrasónico	Digital Ultrasonic Cleaner
Potenciómetro	Mettler Toledo
Lámpara UV	Analytikjena
Parrilla de agitación	Thermo Scientific

Tabla 4. Reactivos para la realización de la verificación analítica de citalopram.

Reactivos	Marca/Proveedor	Lote	Fecha Caducidad
Agua HPLC	J.T. Baker	C36W13	2025/08/31
Metanol HPLC	J.T. Baker	C27W36	2026/07/13
Acetonitrilo HPLC	J.T. Baker	E07W61	2027/01/13
Hidróxido de Sodio	J.T. Baker	C07W07	2023/04/13
Ácido Clorhídrico	J.T. Baker	C49W34	2026/12/07
Bromuro de Dodeciltrimetilamonio	Sigma Aldrich	LSP23671	2023/11/05
Fosfato Dibásico de Sodio Anhidro	Silver Quim	094641	2025/06/14
Bromhidrato de Citalopram	DVA mexicana	MP23456	2026/08/12

Tabla 5. Insumos para la realización de la verificación analítica de citalopram.

Insumos	Marca/Proveedor	Lote	Fecha Caducidad
Acrodisco Nylon 0.45µm	AGILENT TECHNOLOGIES	N/A	No aplica
Columna Cromatográfica L1 5µm C18 250x 4.6 mm	AGILENT TECHNOLOGIES	N/A	No Aplica
Placebo	N/A	5360-16-003	No Aplica

Placebo: la preparación del placebo se describe más adelante.

Tabla 6. Estándares para la realización de la verificación analítica de citalopram.

Nombre del estándar	Lote	Caducidad
Bromhidrato de Citalopram	EP228-01	Vigente
Compuesto Relacionado F de Citalopram	EP02-01	Vigente

PLACEBO

Se realizará la preparación de 10 gramos placebo analítico de citalopram, de acuerdo con la fórmula cuantitativa se conservará en envase bien cerrado a temperatura ambiente como se indica en las condiciones de almacenamiento del producto.

Tabla 7. Placebo analítico para la verificación analítica de citalopram.

Materia Prima	Peso
Celulosa Microcristalina PH102	2.628 g
Croscarmelosa de Sodio	0.239 g
Lactosa monohidratada malla 200	6.197 g
Polividona K30	0.479 g
Estearato de Magnesio	0.12 g
Recubrimiento Opadry II 85F18378 Blanco	0.359 g

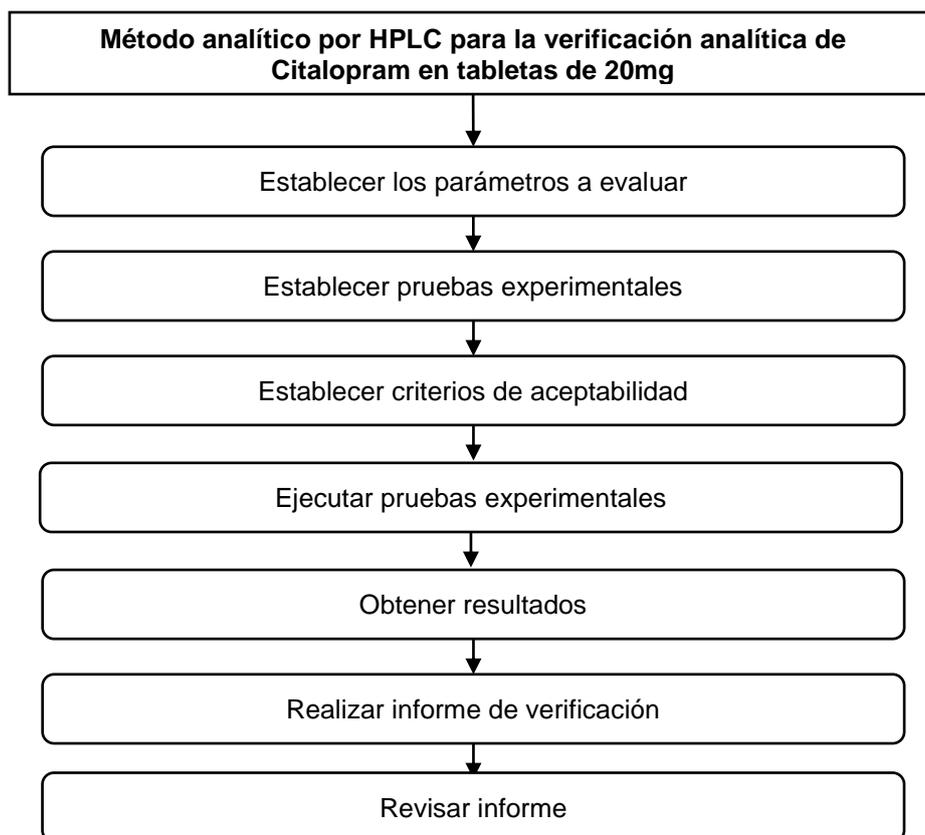


Diagrama 1. Metodología para la verificación analítica de citalopram en tabletas de 20 mg.

9. METODOLOGÍA

La metodología utilizada tiene como referencia los parámetros de desempeño del PNO-CCQ-037-Versión 7B Verificación de Métodos Analíticos.

MÉTODO DE ANÁLISIS DE VALORACIÓN DE CITALOPRAM EN TABLETAS

Preparación de Soluciones

- **Solución reguladora:** Se transfirió a un matraz volumétrico de 500 mL 0.71 g de fosfato dibásico de sodio anhidro, se agregó 250 mL de agua, se agitó hasta disolver, se llevó al aforo con agua y se mezcló.
- **Diluyente:** Se preparó una mezcla de metanol: solución reguladora (80:20).
- **Fase móvil:** Se preparó una solución de diluyente que contenga 770 mg/L de bromuro de dodeciltrimetilamonio, se filtró y desgasificó.
- **Preparación del patrón interno:** Se pesó 12.5 mg de la SRef de citalopram compuesto relacionado F, se transfirió a un matraz volumétrico de 20 mL, se aforó con solución diluyente.
- **Preparación de referencia:** Se transfirió 25 mg SRef de bromhidrato de citalopram en un matraz volumétrico de 20 mL, se aforó con solución diluyente. Se tomó una alícuota de 5 mL de la solución anterior, en un matraz volumétrico de 50 mL y una alícuota de 5 mL de patrón interno, se mezcló y aforó con solución diluyente. Esta preparación se filtró con una membrana de nylon de 0.45 µm.
- **Preparación de la muestra:** Se pesaron 10 tabletas y se calculó su peso promedio. Se trituraron hasta polvo fino, se pesó el equivalente a 25 mg de citalopram, se transfirió a un matraz volumétrico de 50 mL, se agregó 15 mL de solución diluyente, se mezcló y se sometió a la acción del ultrasonido durante 10 minutos, se enfrió y se llevó al aforo con el mismo disolvente, se mezcló. Se tomó una alícuota de 10 mL de la solución anterior, en un matraz volumétrico de 50 mL y una alícuota de 5 mL de patrón interno, se mezcló y aforó con solución diluyente. Esta preparación se filtró con una membrana de nylon de 0.45 µm.

Condiciones de equipo

Detector de luz UV a una longitud de onda de 254 nm. Columna de 4.6 mm x 25 cm, empacada con L1 de 5µm, velocidad de flujo de 1 mL/min. Temperatura de la columna 45 °C.

Procedimiento

Se inyectó al cromatógrafo, por sextuplicados volúmenes iguales (10 µL) de la preparación de referencia y por triplicado la preparación de la muestra, se registraron los picos respuesta, la resolución R entre citalopram y compuesto relacionado F no es menor a 1.5, la eficacia de la columna no es menor que 2000 platos teóricos.

Se obtuvieron sus correspondientes cromatogramas y se calculó la cantidad de citalopram (C₂₀H₂₁FN₂O) en la porción de muestra tomada por medio de la siguiente fórmula:

$$CD \left(\frac{A_m}{A_{ref}} \right) \left(\frac{324.39}{405.30} \right)$$

Dónde:

C = cantidad de bromhidrato de citalopram en la preparación de referencia.

D = Factor de dilución de la muestra.

A_m = Área bajo la curva del pico obtenida en el cromatograma con la preparación de la muestra.

A_{ref} = Área bajo la curva del pico obtenida en el cromatograma con la preparación de referencia.

324.39 = Peso molecular del citalopram g/mol.

405.30 = Peso molecular de bromhidrato de citalopram g/mol.

MÉTODO DE ANÁLISIS DE ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

- **Solución reguladora:** Se transfirió a un matraz volumétrico de 500 mL 0.71 g de fosfato dibásico de sodio anhidro, se agregó 250 mL de agua, se agitó hasta disolver, se llevó al aforo con agua destilada y se mezcló
- **Diluyente:** Se preparó una mezcla de metanol: solución reguladora (80:20).
- **Fase móvil:** Se preparó una solución con diluyente que contenga 770 g/L de bromuro de dodeciltrimetilamonio, se filtró y se desgasificó.
- **Preparación del patrón interno:** Se pesó 12.5 mg de la SRef de citalopram compuesto relacionado F, se transfirió a un matraz volumétrico de 20 mL, se aforó con solución diluyente.

- **Preparación de referencia:** Se transfirió 25 mg SRef de bromhidrato de citalopram en un matraz volumétrico de 20 mL, se aforó con solución diluyente. Se tomó una alícuota de 5 mL de la solución anterior y se transfirió a un matraz volumétrico de 50 mL y se adiciono una alícuota de 5 mL de patrón interno, se mezcló y aforó con solución diluyente. Esta preparación se filtró con una membrana de nylon de 0.45 μm .

Condiciones de equipo: Detector de luz UV a una longitud de onda de 254 nm. Columna de 4.6 mm x 25 cm, empacada con L1 de 5 μm , velocidad de flujo de 1 mL/min. Temperatura de la columna 45 °C.

Procedimiento: Se inyectó al cromatógrafo por sextuplicado, volúmenes iguales 10 μL de la preparación de referencia, la resolución R entre citalopram y compuesto relacionado F no es menor que 1.5, la eficacia de la columna no es menos que 2000 platos teóricos de acuerdo a su monografía correspondiente en la FEUM.

MÉTODO DE ANÁLISIS DE LINEALIDAD DEL MÉTODO

Método de trabajo: Se debe realizar el recobro en un intervalo de concentraciones que abarquen el 100% de la cantidad de analito, el límite inferior y el límite superior indicado en la monografía del producto, a su vez se debe contemplar un punto por encima y por debajo de los parámetros de aceptación. Por lo cual se tomaron concentraciones equivalentes a 80%, 90%, 100%, 110% y 120% para realizar esta prueba.

Preparación de soluciones

- **Solución reguladora:** Se transfirieron a un matraz volumétrico de 500 mL 0.71 g de fosfato dibásico de sodio anhidro, se agregaron 250 mL de agua, se agitó hasta disolver, se llevó al aforo con agua y se mezcló.
- **Diluyente:** Se preparó una mezcla de metanol: solución reguladora (80:20).
- **Fase móvil:** Se preparó una solución en diluyente que contenía 770 mg/L de bromuro de dodeciltrimetilamonio, se filtró y se desgasificó.
- **Preparación del Patrón Interno:** Se pesaron 12.5 mg de la SRef de citalopram compuesto relacionado F, se transfirieron a un matraz volumétrico de 20 mL, se aforó con solución diluyente.

- **Preparación de referencia:** Se transfirieron 25 mg SRef de bromhidrato de citalopram en un matraz volumétrico de 20 mL, se aforó con solución diluyente. Se tomó una alícuota de 5 mL de la solución anterior, en un matraz volumétrico de 50 mL y una alícuota de 5 mL de patrón interno, se mezcló y aforó con solución diluyente. Esta preparación se filtró con una membrana de nylon de 0.45 μm .
- **Preparación de la muestra:** De acuerdo con la Tabla 8, se pesó una cantidad de la muestra necesaria para llegar a las concentraciones de 80.0 %, 90.0 %, 100.0 %, 110.0% y 120.0 % adicionando una cantidad de placebo adicionado equivalente al 100% de la concentración del analito:

Tabla 8. Preparación de muestras para la linealidad del método.

Nivel de concentración (%)	Cantidad adicionada de bromhidrato de citalopram	Concentración mg/mL
80.00	20.0 mg	0.08
90.00	22.5 mg	0.09
100.00	25.0 mg	0.10
110.00	27.5 mg	0.11
120.00	30.0 mg	0.12

Se pesó una cantidad del polvo equivalente a lo indicado en la tabla 8, se transfirió a un matraz volumétrico de 20 mL, se agregó 10 mL de solución de diluyente, se mezcló y se sometió a la acción del ultrasonificación durante 10 minutos, se enfrió y llevó al aforo con el mismo disolvente, se tomó una alícuota de 5 mL y transfirió a un matraz volumétrico de 50 mL y se adicionó 5 mL de patrón interno, se aforó con la solución diluyente. Esta preparación se filtró con una membrana de nylon de 0.45 μm .

Condiciones de equipo

Detector de luz UV a una longitud de onda de 254 nm. Columna de 4.6 mm x 25 cm, empacada con L1 de 5 μm , velocidad de flujo de 1 mL/min. Temperatura de la columna 45 °C.

Procedimiento

Se inyectó al cromatógrafo por sextuplicado, volúmenes iguales (10 μL) de la preparación de referencia y tres de la muestra, se registraron los picos respuesta, la resolución R entre citalopram y compuesto relacionado F no es menor a 1.5, la eficacia de la columna no es menor que 2000 platos teóricos.

MÉTODO DE ANÁLISIS DE PRECISIÓN

1. Reproducibilidad

Método de trabajo: Se corroboró la precisión analítica entre analistas, en los criterios máximos, mínimos y centrales como se indica en la monografía del producto. De acuerdo a la F.E.U.M los criterios de aceptación para tabletas de bromhidrato de citalopram son: una cantidad no menor al 90.0% y una cantidad no mayor a 110.0% de la cantidad indicada en el marbete. Por lo tanto, se empleó como parámetros superiores e inferiores las concentraciones de trabajo para la reproducibilidad de un 90.0, 100.0 y 110.0% con relación al 100% del analito de interés, se realizó la preparación de la muestra a analizar por triplicado, se realizó este procedimiento en dos días y por dos analistas.

Preparación de soluciones

- **Solución reguladora:** Se transfirió a un matraz volumétrico de 500 mL 0.71 g de fosfato dibásico de sodio anhidro, se agregó 250 mL de agua, se agitó hasta disolver, se llevó al aforo con agua y se mezcló.
- **Diluyente:** Se preparó una mezcla de metanol: solución reguladora (80:20).
- **Fase móvil:** Se preparó una solución diluyente que contenga 770 mg/L de bromuro de dodeciltrimetilamonio, se filtró y desgasificó.
- **Preparación del patrón interno:** Se pesó 12.5 mg de la SRef de citalopram compuesto relacionado F, se transfirió a un matraz volumétrico de 20 mL, se aforó con solución diluyente.
- **Preparación de referencia:** Se transfirió 25 mg SRef de bromhidrato de citalopram en un matraz volumétrico de 20 mL, se aforó con solución diluyente. Se tomó una alícuota de 5 mL de la solución anterior en un matraz volumétrico de 50 mL y una alícuota de 5 mL de patrón interno, se mezcló y se aforó con solución diluyente. Esta preparación se filtró con una membrana de nylon de 0.45 µm.
- **Preparación de la muestra:** De acuerdo con la Tabla 9, se pesó una cantidad de la muestra necesaria para llegar a la concentración final equivalente al 90 %, 100 % y 110 %, adicionando una cantidad de placebo adicionado equivalente al 100% de la concentración del analito:

Tabla 9. Preparación de muestras para reproducibilidad.

Nivel de concentración (%)	Cantidad adicionada de bromhidrato de citalopram	Concentración mg/mL
90	22.5 mg	0.09
100	25.0 mg	0.10
110	27.5 mg	0.11

Se pesó una cantidad del polvo equivalente a lo indicado en la tabla 9, se transfirió a un matraz volumétrico de 20 mL, se agregó 10 mL de solución diluyente, se mezcló y se sometió a la acción del ultrasonido durante 10 minutos, se enfrió y se llevó al aforo con el mismo disolvente, se tomó una alícuota de 5 mL y se transfirió a un matraz volumétrico de 50 mL y se adicionó 5 mL de patrón interno, se aforó con la solución diluyente. Se filtró esta preparación con una membrana de nylon de 0.45 μm .

Condiciones de equipo

Detector de luz UV a una longitud de onda de 254 nm. Columna de 4.6 mm x 25 cm, empacada con L1 de 5 μm , velocidad de flujo de 1 mL/min. Temperatura de la columna 45 °C.

Procedimiento

Se inyectaron al cromatógrafo por sextuplicado, volúmenes iguales (10 μL) de la preparación de referencia, la resolución R entre citalopram y compuesto relacionado F no es menos que 1.5, la eficacia de la columna no es menos que 2000 platos teóricos, inyectar al cromatógrafo por separado volúmenes iguales (10 μL) por triplicado la preparación de las muestras a los 3 niveles de concentración.

2. Repetibilidad

Método de trabajo: Se corroboró la repetibilidad de resultados en los criterios máximos, mínimos y en el nivel central, indicados en la monografía del producto. El criterio de aceptación de citalopram indica que no debe contener menos de 90.0% y no más de 110.0% indicado en el marbete, por lo tanto, se emplearon como parámetros superiores e inferiores las concentraciones de 90.0% y 110.0%, por lo que se realizó la repetibilidad a las concentraciones de 90%, 100% y 110% respectivamente, realizando este procedimiento 2 días distintos preparando por triplicado cada muestra en cada nivel de trabajo.

Preparación de soluciones

- **Solución reguladora:** Se transfirió a un matraz volumétrico de 500 mL 0.71 g de fosfato dibásico de sodio anhidro, se agregó 250 mL de agua, se agitó hasta disolver, se llevó al aforo con agua y se mezcló.
- **Diluyente:** Se preparó una mezcla de metanol: solución reguladora (80:20).
- **Fase móvil:** Se preparó una solución en diluyente que contenga 770 mg/L de bromuro de dodeciltrimetilamonio, se filtró y desgasificó.
- **Preparación del patrón interno:** Se pesó 12.5 mg de la SRef de citalopram compuesto relacionado F, se transfirió a un matraz volumétrico de 20 mL, se aforó con solución diluyente.
- **Preparación de referencia:** Se transfirió 25 mg SRef de bromhidrato de citalopram en un matraz volumétrico de 20 mL, se aforó con solución diluyente. Se tomó una alícuota de 5 mL de la solución anterior, en un matraz volumétrico de 50 mL y una alícuota de 5 mL de patrón interno, se mezcló y aforó con solución diluyente. Esta preparación se filtró con una membrana de nylon de 0.45 µm.
- **Preparación de la muestra:** De acuerdo con la tabla 10 se pesó una cantidad de la muestra necesaria para llegar a la concentración final equivalente al 90 %, 100 % y 110 %, se adicionando una cantidad de placebo adicionado al 100% de la concentración del analito, como se indica en la tabla:

Tabla 10. Preparación de muestras para la repetibilidad.

Nivel de concentración (%)	Cantidad adicionada de bromhidrato citalopram	Concentración mg/mL
90	22.5 mg	0.09
100	25.0 mg	0.10
110	27.5 mg	0.11

Se pesó una cantidad del polvo equivalente a lo indicado en la tabla 10, se transfirió a un matraz volumétrico de 20mL, se agregó 10 mL de solución diluyente, se mezcló y se sometió a la acción del ultrasonido durante 10 minutos, se enfrió y se llevó al aforo con el mismo disolvente, se tomó una alícuota de 5 mL y se transfirió a un matraz volumétrico de 50 mL y se adicionó 5 mL de patrón interno, se aforó con la solución de diluyente. Esta preparación se filtró con una membrana de nylon de 0.45 µm.

Condiciones de equipo

Detector de luz UV a una longitud de onda de 254 nm. Columna de 4.6 mm x 25 cm, empacada con L1 de 5µm, velocidad de flujo de 1 mL/min. Temperatura de la columna 45 °C.

Procedimiento

Se inyectó al cromatógrafo por sextuplicado, volúmenes iguales (10 µL) de la preparación de referencia; la resolución R entre citalopram y compuesto relacionado F no es menor que 1.5, la eficacia de la columna no es menor que 2000 platos teóricos, se inyectó al cromatógrafo por separado volúmenes iguales (10 µL) de la preparación de las muestras por triplicado.

MÉTODO DE ANÁLISIS DE RECUPERACIÓN Y SESGO

Método de trabajo: Se realizó el recobro en un intervalo de concentraciones que abarcaron el 100% de la cantidad de analito, el límite inferior y el límite superior indicado en la monografía del producto, a su vez se contempló un punto por encima y por debajo de los parámetros de aceptación. Por lo cual se tomaron concentraciones equivalentes a 80%, 90%, 100%, 110% y 120% para realizar esta prueba.

Preparación de soluciones

- **Solución reguladora:** Se transfirió a un matraz volumétrico de 500 mL 0.71 g de fosfato dibásico de sodio anhidro, se agregó 250 mL de agua, se agitó hasta disolver, se llevó al aforo con agua y se mezcló.
- **Diluyente:** Se preparó una mezcla de metanol: solución reguladora (80:20).
- **Fase móvil:** Se preparó una solución diluyente que contenga 770 mg/L de bromuro de dodeciltrimetilamonio, se filtró y se desgasificó.
- **Preparación del patrón interno:** Se pesó 12.5 mg de la SRef de citalopram compuesto relacionado F, se transfirió a un matraz volumétrico de 20 mL, se aforó con solución diluyente.
- **Preparación de referencia:** se transfirió 25 mg SRef de bromhidrato de citalopram en un matraz volumétrico de 20 mL, se aforó con solución diluyente. Se tomó una alícuota de 5 mL de la solución anterior, en un matraz volumétrico de 50 mL y una

alícuota de 5 mL de patrón interno, se mezcló y aforó con solución diluyente. Esta preparación se filtró con una membrana de nylon de 0.45 µm.

- **Preparación de la muestra:** De acuerdo con la tabla 11, se pesó una cantidad de la muestra necesaria para llegar a las concentraciones requeridas de 80%, 90%, 100%, 110% y 120% se adicionó una cantidad de placebo adicionado equivalente al 100% de la concentración del analito:

Tabla 11. Preparación de muestras para recuperación y sesgo.

Nivel concentración (%)	Cantidad adicionada de bromhidrato de citalopram	Concentración mg/mL
80	20.0 mg	0.08
90	22.5 mg	0.09
100	25.0 mg	0.10
110	27.5 mg	0.11
120	30.0 mg	0.12

Se pesó una cantidad del polvo equivalente a lo indicado en la tabla 11, se transfirió a un matraz volumétrico de 20 mL, se agregó 10 mL de solución diluyente, se mezcló y sometió a la acción del ultrasonido durante 10 minutos, se enfrió y se llevó al aforo con el mismo disolvente, se tomó una alícuota de 5 mL y se transfirió a un matraz volumétrico de 50 mL y se adicionó 5 mL de patrón interno, se aforó con la solución diluyente. Esta preparación se filtró con una membrana de nylon de 0.45 µm.

Condiciones de equipo

Detector de luz UV a una longitud de onda de 254 nm. Columna de 4.6 mm x 25 cm, empacada con L1 de 5 µm, velocidad de flujo de 1 mL/min. Temperatura de la columna 45 °C.

Procedimiento

Se inyectó al cromatógrafo por sextuplicado, volúmenes iguales (10 µL) de la preparación de referencia y por triplicado la preparación de la muestra, se registraron los picos respuesta, la resolución R entre citalopram y compuesto relacionado F no es menor a 1.5, la eficacia de la columna no es menor que 2000 platos teóricos.

MÉTODO DE ANÁLISIS DE ESPECIFICIDAD Y SELECTIVIDAD

Método de trabajo: Se debe corroborar si existe algún interferente (excipientes, productos de degradación, impurezas o contaminantes) que presenten lecturas indeseables para el analito de interés; para lo cual se debe proporcionar un ambiente adecuado para la degradación de este y observar si presenta o no interferencias.

Preparación de soluciones

- **Solución reguladora:** Se transfirieron a un matraz volumétrico de 500 mL 0.71 g de fosfato dibásico de sodio anhidro, se agregó 250 mL de agua, se agitó hasta disolver, se llevó al aforo con agua y se mezcló.
- **Diluyente:** Se preparó una mezcla de metanol: solución reguladora (80:20).
- **Fase Móvil:** Se preparó una solución con diluyente que contenía 770 mg/L de bromuro de dodeciltrimetilamonio, se filtró y se desgasificó.
- **Preparación del patrón interno:** Se pesaron 12.5 mg de la SRef de citalopram compuesto relacionado F, se transfirieron a un matraz volumétrico de 20 mL, se aforó con solución diluyente.
- **Preparación de referencia:** Se transfirió 25 mg SRef de bromhidrato de citalopram en un matraz volumétrico de 20 mL, se aforó con solución diluyente. Se tomó una alícuota de 5 mL de la solución anterior, en un matraz volumétrico de 50 mL y una alícuota de 5 mL de patrón interno, se mezcló y aforó con solución diluyente. Esta preparación se filtró con una membrana de nylon de 0.45 μm .
- **Preparación de la muestra:** Se sometieron a diferentes condiciones dos muestras con concentración equivalente al 100% del analito de interés, las condiciones de trabajo a las que se sometió las muestras fueron las siguientes:
 - Condiciones ambientales normales ($25.0\text{ C}^{\circ} \pm 2.0\text{ C}^{\circ}$).
 - Condiciones ácidas y de temperatura ($\text{pH} = 2.0 \pm 1 / 80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$).
 - Condiciones básicas y de temperatura ($\text{pH} = 10.0 \pm 1 / 80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$).
 - Condiciones foto líticas (luz UV).
 - Muestras sometidas a calentamiento ($80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Muestra sometida a condiciones normales: Se preparó por duplicado la muestra cómo se indica en el método de análisis de valoración.

Muestras sometidas a condiciones ácidas y de temperatura: Se pesó una cantidad equivalente a 25 mg de citalopram y transfirió a un tubo de ensaye, se adicionó una alícuota de 5 mL de solución de ácido clorhídrico 1.0 N, se ajustó el pH de la solución a 2.0 ± 1 . Se indujo a calentamiento a una temperatura no menor a $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$, por un periodo de tiempo no menor a 40 minutos ± 10 minutos, pasado el tiempo, se enfrió a temperatura ambiente y se adicionó una alícuota de 5 mL de solución de hidróxido de sodio 1.0 N. Terminada la acción, se transfirió cuantitativamente el contenido del tubo a un matraz volumétrico de 20 mL, se adicionaron 15 mL de solución diluyente y se sometió a ultrasonido durante 10 minutos, se llevó al aforo con el mismo disolvente, se tomó una alícuota de 5 mL en un matraz volumétrico de 50 mL y se adicionó una alícuota de 5 mL de patrón interno y se llevó al aforo con el mismo disolvente, se filtró a través de una membrana de nylon de $0.45\text{ }\mu\text{m}$, descartando los primeros mililitros del filtrado.

Muestras sometidas a condiciones básicas y de temperatura: Se pesó una cantidad equivalente a 25 mg de citalopram, se transfirió a un tubo de ensaye, se adicionó una alícuota de 5 mL de solución de hidróxido de sodio 1.0 N, se ajustó el pH de la solución a 10.0 ± 1 . Se indujo a calentamiento a una temperatura no menor a $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}$, por un periodo de tiempo no menor a 40 minutos ± 10 minutos, se enfrió a temperatura ambiente y se adicionó una alícuota de 5 mL de solución de ácido clorhídrico 1.0 N. Terminada la acción, se transfirió cuantitativamente el contenido del tubo a un matraz volumétrico de 20 mL, se adicionó 10 mL de solución diluyente y sometió a la acción de un baño de ultrasonido durante 10 minutos, se llevó al aforo con el mismo disolvente, se tomó una alícuota de 5 mL en un matraz volumétrico de 50 mL y se adicionó 5 mL de patrón interno y se llevó al aforo con el mismo disolvente, se filtró a través de una membrana de nylon de $0.45\text{ }\mu\text{m}$, descartando los primeros mililitros del filtrado.

Muestras sometidas a luz UV: Pesar una cantidad equivalente a 25 mg de citalopram se transfirió a un matraz volumétrico de 20 mL, se adicionó 10 mL de solución diluyente y se sometió a la acción de un baño de ultrasonido durante 10 minutos, se enfrió y se llevó al aforo, en seguida se confinó a la cámara de luz UV por un tiempo no menor a 48 horas, pasado el tiempo, se retiró de la cámara y se tomó una alícuota de 5 mL en un matraz volumétrico de 50 mL y se adicionó 5 mL de patrón interno, se llevó al aforo con solución diluyente, se mezcló y filtró a través de una membrana de nylon de $0.45\text{ }\mu\text{m}$ de porosidad, descartando los primeros mililitros del filtrado.

Muestra sometida a condición de temperatura: Se pesó una cantidad equivalente de 20 mg de citalopram, se transfirió a un matraz volumétrico de 20 mL, se adicionaron 10 mL de solución diluyente y se sometió a la acción de un baño de ultrasonido durante 10

minutos, se indujo a un calentamiento, a una temperatura de no menor de 80 °C, por un tiempo no menor a 60 minutos \pm 10 minutos, pasado el tiempo, se permitió a la muestra alcanzar la temperatura ambiente y se llevó al aforo con diluyente, se tomó una alícuota de 5 mL en un matraz de 50 mL y se adicionó 5 mL de patrón interno, se filtró a través de una membrana de nylon de 0.45 μ m de porosidad, descartando los primeros mililitros del filtrado.

Condiciones de equipo

Detector de luz UV a una longitud de onda de 254 nm. Columna de 4.6 mm x 25 cm, empacada con L1 de 5 μ m, velocidad de flujo de 1 mL/min. Temperatura de la columna 45 °C.

Procedimiento

Se inyectó al cromatógrafo por sextuplicado, volúmenes iguales (10 μ L) de la preparación de referencia; la resolución R entre citalopram y compuesto relacionado F no es menor que 1.5, la eficacia de la columna no es menor que 2000 platos teóricos; y se inyectó al cromatógrafo por separado volúmenes iguales (10 μ L) por duplicado la preparación de las muestras a diferentes condiciones.

10. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Con las pruebas realizadas para la verificación analítica de bromhidrato de citalopram de acuerdo con la FEUM doceava edición, se obtuvieron los datos que se presentan a continuación.

En las tablas de resultados se nombra al compuesto como citalopram y no como bromhidrato de citalopram, esto se debe a que la molécula activa es el citalopram, con el bromhidrato forma una sal que mejora la solubilidad del compuesto en agua. Por esta razón la materia prima y el estándar empleado se adquieren como bromhidrato de citalopram, se realiza un ajuste de peso para tomar únicamente la fracción correspondiente al citalopram.

Resultados y análisis de resultados para el análisis de valoración de citalopram

Los resultados obtenidos para la prueba de valoración se muestran en la Figura 8, Tabla 12, y Tabla 13.

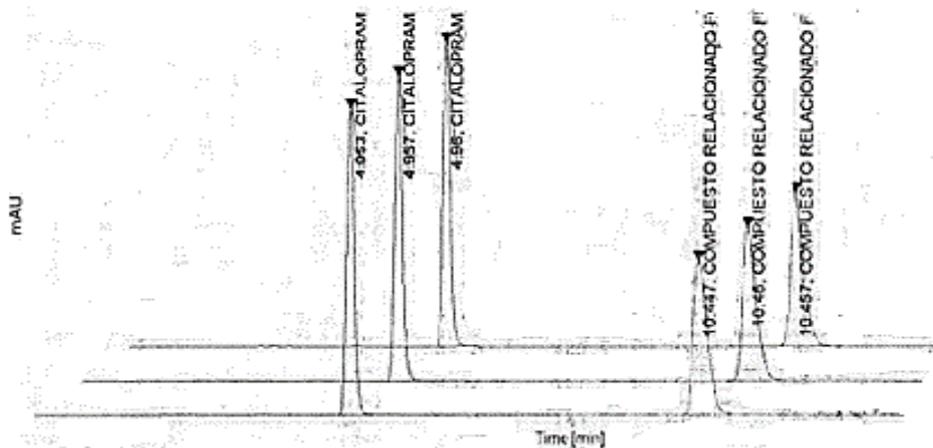


Figura 8. Cromatograma de muestras de valoración de citalopram obtenido con un detector de luz UV a una longitud de onda de 254 nm.

Tabla 12. Resultados obtenidos de estándares para valoración de citalopram. Recobro: 100.17%

Estándar 1	Bromhidrato de citalopram	Compuesto F	Factor Respuesta	Estándar 2	Bromhidrato de citalopram	Compuesto F	Factor Respuesta
Peso	25.02 mg	12.5 mg		Peso	25 mg	12.5 mg	
Área	7081746	7071690	1.00	Área	7065098	7089654	0.99
	7051966	7047171	1.00		7034512	7054326	0.99
	7096434	7051455	1.00				
	7087298	7069835	1.00				
	7093626	7058587	1.00				
	7027295	7003608	1.00				
Promedio	7073061	7050391	1.00	Promedio	7049805	7071990	0.99
CV	0.39%		*	CV	0.31%		*

*Se utilizó un estándar 1 y un estándar 2 los cuales sirven para demostrar que el sistema es apto para cuantificar y obtener resultados confiables; las 6 repeticiones del estándar 1 indicaron que el sistema es preciso y la confrontación con el estándar 2 demostraron la exactitud.

Tabla 13. Resultados obtenidos de las muestras para valoración de citalopram.

Muestra	Peso	Área citalopram	Área Compuesto F	Factor Respuesta	% Valoración	Promedio valoración	% CV
1	171.20 mg	7054632	7043764	1.00	99.71	99.67%	0.04%
2	171.12 mg	7064321	7058609	1.00	99.68		
3	171.30 mg	7053254	7043876	1.00	99.63		

Durante la verificación del método, se tuvo una serie de condiciones reportadas en la bibliografía de la FEUM (fase móvil, longitud de onda, etc.) con las cuales se obtuvieron los primeros cromatogramas. Estas pruebas ayudaron a determinar si era posible el desarrollo de la verificación del método. Este método utiliza el método del patrón interno en el cual se añade a todas las muestras en cantidad conocida el compuesto F, el cual es similar al analito y su adición no causa ningún tipo de interferencia y se puede distinguir del compuesto principal que es el Citalopram, por lo que nos ayudó en la cuantificación por medio del factor respuesta.

Se desarrolló el análisis de valoración del Citalopram, la FEUM marca que debe de estar entre los valores de 90-110 %, por lo que se obtuvo una valoración de 99.67 % y un CV= 0.04, lo cual está dentro del intervalo establecido.

Resultados y análisis para la prueba de adecuabilidad del sistema de citalopram

Los resultados obtenidos para la prueba de adecuabilidad se muestran en la Figura 9 y Tabla 14. Como se observa que los picos de citalopram y del compuesto relacionado F mostraron una resolución mayor a 1.5 y pudieron cuantificarse sin problema con el método propuesto. Se realizaron 6 inyecciones consecutivas de adecuabilidad del

sistema para citalopram dando un coeficiente de variación de 0.4% entre inyecciones y una asimetría de 1.22. La FEUM 12 edición marca que la resolución entre citalopram y compuesto relacionado F no debe ser menor que 1.5 y se obtuvo una resolución de 18; el factor de coeio no debe de ser mayor de 2 y se obtuvo un factor de coeio de 1.2; la eficacia de la columna no debe ser menor que 2000 platos teóricos y se obtuvieron 10736.07; por lo que cumple los requisitos de adecuabilidad del sistema que marca el método de la FEUM 12 edición y nos permite determinar que el sistema funciona.

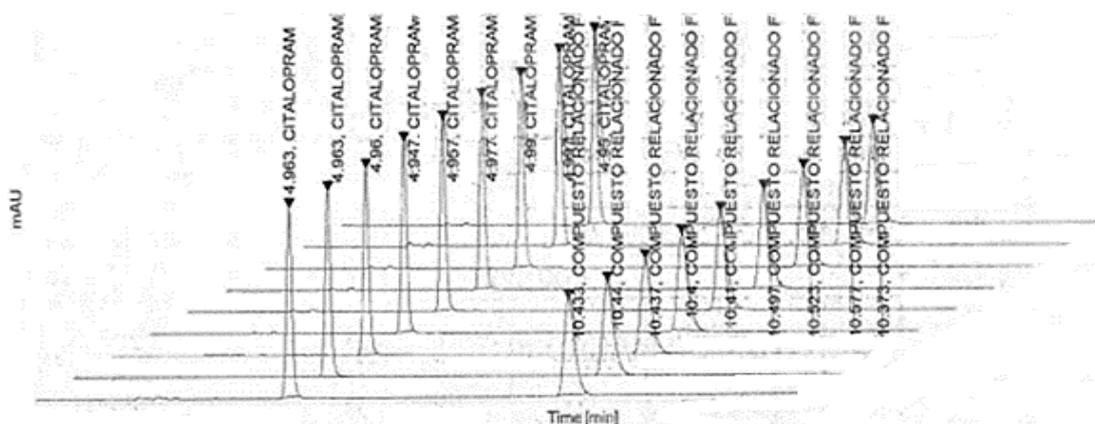


Figura 9. Cromatograma adecuabilidad del sistema citalopram obtenido con un detector de luz UV a una longitud de onda de 254 nm.

Tabla 14. Resultados obtenidos de la adecuabilidad del sistema de citalopram.

Peso Estándar 1 bromhidrato de citalopram	Peso Compuesto F	Área citalopram	Área Compuesto F	Factor respuesta	CV %
25.01 mg	12.5 mg	7051696.00	7021690.00	1.00	0.39
		7081866.00	7047171.00	1.00	
		7045234.00	7051455.00	0.99	
		7057298.00	7089835.00	0.99	
		7093626.00	7058587.00	1.00	
		7027295.00	7003608.00	1.00	
Promedio		7059502.50	7045391.00	1.00	

Resultados y análisis de resultados para el parámetro de linealidad del método de citalopram

Los resultados obtenidos para la prueba de linealidad se muestran en la Figura 10 y 11; y Tabla 15 y 16. Mediante una curva de calibración de cantidad adicionada contra

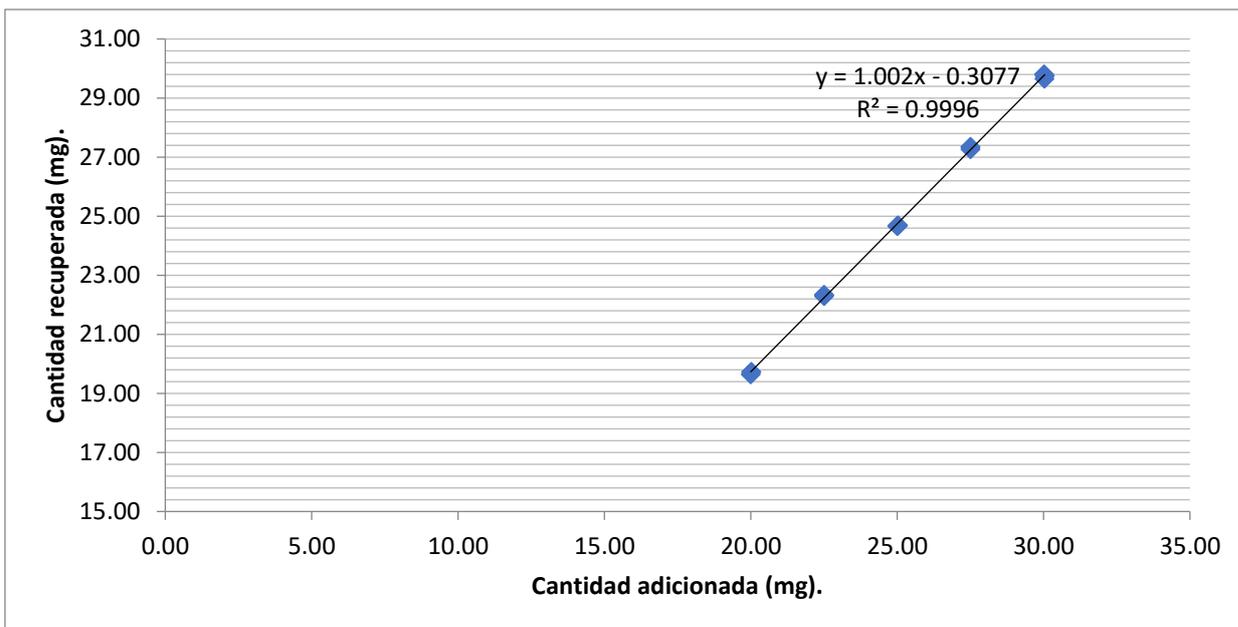


Figura 11. Gráfica de linealidad de método de citalopram.

Tabla 16. Cálculo de la ecuación de la recta de la linealidad del método de citalopram

ECUACIÓN RECTA	
b1	1.0020
b0	-0.3077
r2	0.9996

Resultados y análisis de resultados para la prueba de reproducibilidad

Los resultados obtenidos para la prueba de reproducibilidad se muestran en la Figura 12 y Tablas 17-22.

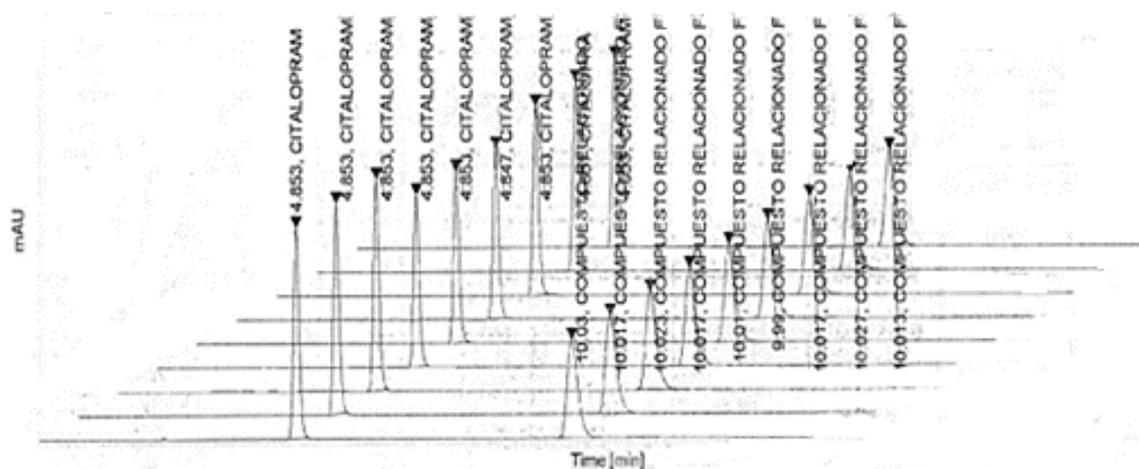


Figura 12. Cromatograma precisión intermedia obtenido con un detector de luz UV a una longitud de onda de 254 nm.

Tabla 17. Resultados obtenidos de reproducibilidad de citalopram Día 1 Analista 1.

Día 1						
Cantidad Adicionada	Área citalopram	Área Compuesto F	Factor Respuesta	Cantidad obtenida	% Recobro	CV por nivel de conc.
22.51 mg	6396044	7034902	0.90	22.81 mg	101.34	0.05
22.51 mg	6391822	7036969	0.90	22.79 mg	101.24	
22.51 mg	6402669	7046276	0.90	22.80 mg	101.28	
25.02 mg	7103521	7031109	1.01	25.35 mg	101.31	0.31
25.03 mg	7045973	7013721	1.00	25.20 mg	100.70	
25.03 mg	7089628	7026379	1.00	25.32 mg	101.14	
27.51 mg	7866274	7070812	1.11	27.91 mg	101.46	0.15
27.52 mg	7847701	7037332	1.11	27.98 mg	101.67	
27.51 mg	7867888	7079476	1.11	27.88 mg	101.36	

Tabla 18. Resultados obtenidos de reproducibilidad de citalopram Día 2 Analista 1.

Día 2						
Cantidad Adicionada	Área citalopram	Área Compuesto F	Factor Respuesta	Cantidad obtenida	% Recobro	CV por nivel de conc.
22.51 mg	6374740	7156500	0.89	22.25 mg	98.83	0.10
22.50 mg	6365492	7139979	0.89	22.27mg	98.96	
22.50 mg	6371613	7161143	0.88	22.22 mg	98.76	
25.00 mg	7075220	7151252	0.98	24.71 mg	98.84	0.07
25.00 mg	7069864	7156116	0.98	24.67 mg	98.70	
25.01 mg	7074959	7153491	0.98	24.70 mg	98.77	
27.51 mg	7787259	7138524	1.09	27.25 mg	99.04	0.03
27.50 mg	7806153	7157710	1.09	27.24 mg	99.05	
27.50 mg	7778729	7136150	1.09	27.22 mg	99.00	

Tabla 19. Resultados estadísticos Analista 1, Día 1 y 2.

	Día 1	Día 2	Global
$\sum y$	911.49	889.94	1801.44
$\sum y^2$	92313.95	88000.01	180313.96
\bar{y}	101.28	98.88	100.08
n	9	9	18
S	0.26	0.13	1.25
CV	0.26	0.13	1.25

Tabla 20. Resultados obtenidos de reproducibilidad de citalopram Día 1 Analista 2.

Día 1						
Cantidad Adiciona	Área citalopram	Área Compuesto F	Factor Respuesta	Cantidad obtenida	% Recobro	CV por nivel de conc.
22.51 mg	6461795	7027760	0.91	22.78 mg	101.18	0.07
22.50 mg	6449589	7025873	0.91	22.74 mg	101.06	
22.51 mg	6449130	7023035	0.91	22.75 mg	101.05	
25.02 mg	7148971	7031201	1.01	25.18 mg	101.66	0.23
25.01 mg	7144258	7013721	1.01	25.12 mg	100.46	

25.03 mg	7154457	7043350	1.01	25.08 mg	100.19	0.30
27.50 mg	7896644	7066676	1.12	27.81 mg	101.14	
27.51 mg	7867682	7045949	1.11	27.66 mg	100.54	
27.50 mg	7904655	7058991	1.11	27.74 mg	100.86	

Tabla 21. Resultados obtenidos de reproducibilidad de citalopram Día 2 Analista 2.

Día 2						
Cantidad adicionada	Área citalopram	Área Compuesto F	Factor respuesta	Cantidad obtenida	% Recobro	CV por nivel de conc.
22.50 mg	6372651	7150528	0.89	22.20 mg	98.68	0.46
22.51 mg	6331591	7155189	0.88	22.04 mg	97.93	
22.51 mg	6348591	7179509	0.88	22.03 mg	97.86	
25.06 mg	7102424	7177690	0.98	24.65 mg	98.37	0.04
25.04 mg	7083707	7164722	0.98	24.63 mg	98.36	
25.09 mg	7097711	7159615	0.99	24.70 mg	98.43	
27.50 mg	7772649	7191576	1.08	26.93 mg	97.91	0.38
27.51 mg	7769062	7171753	1.08	26.99 mg	98.10	
27.51 mg	7794213	7156075	1.08	27.13 mg	98.63	

Tabla 22. Resultados estadísticos Analista 2, Día 1 y 2

	Día 1	Día 2	Global
$\sum y$	907.14	884.28	1791.42
$\sum y^2$	91435.41	86883.54	178318.95
\bar{y}	100.79	98.25	99.52
n	9	9	18
S	0.35	0.31	1.35
CV	0.35	0.32	1.35

Se determinó la desviación estándar global de los diferentes analistas, el coeficiente de variación y la media aritmética; dando como resultado una media aritmética (\bar{y}) para el analista 1 de 100.08 y una media aritmética (\bar{y}) para el analista 2 de 99.52; una desviación estándar (S) para el analista 1 de 1.25 y una desviación estándar (S) de 1.35 para el analista 2; un coeficiente de variación (CV) de 1.25 para el analista 1 y un coeficiente de variación (CV) de 1.35 para el analista 2.

Se determinó el coeficiente de variación global para la prueba dando un resultado global de 1.30 %, por lo que el método fue reproducible en dos días diferentes con dos analistas diferentes. Los cálculos y evidencia se encuentran en el anexo de la página 66, además de que se realiza la prueba de A.N.O.V.A. multifactorial 2x2, para determinar si existe diferencia entre analistas y días realizados, determinando que para la concentración al 90.0%, se tiene una $F_{calculada} 0.26 < F_{tablas}$ de 4.96, para 100.0% se tiene una $F_{calculada}$

$0.51 < F_{\text{tablas}}$ de 4.96, para 110.0% se tiene una $F_{\text{calculada}} 0.80 < F_{\text{tablas}}$ 4.96, no rechazando la hipótesis nula (H_0) que dice no existe diferencia significativa entre las medias de los analistas en los diferentes días.

Resultados y análisis de resultados para la prueba de repetibilidad

Los resultados obtenidos para la prueba de repetibilidad se muestran en la Figura 13 y Tablas 23-28.

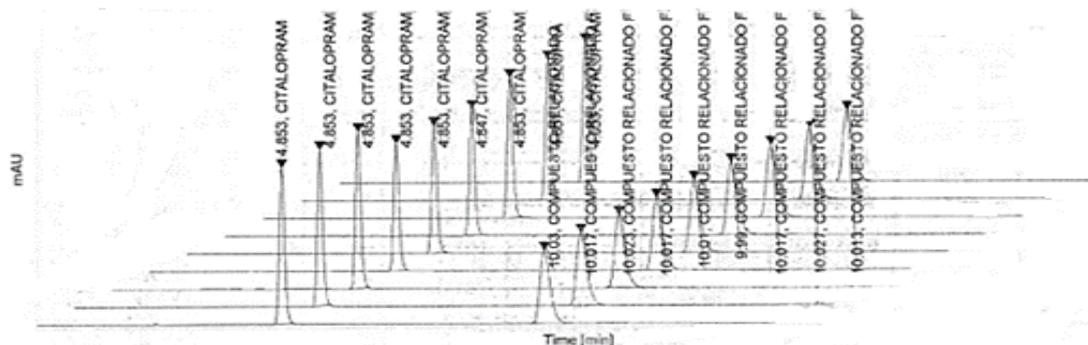


Figura 13. Cromatograma repetibilidad obtenido con un detector de luz UV a una longitud de onda de 254 nm.

Tabla 23. Cálculo de repetibilidad a una concentración al 90% de citalopram Día 1 y 2.

	Muestra	Cantidad adicionada	Área citalopram	Área Compuesto F	Factor respuesta	Cantidad recuperada	% Recobro
Día 1	1	22.52 mg	6361942	7064220	0.90	22.60 mg	100.33
	2	22.55 mg	6390936	7083721	0.90	22.64 mg	100.38
	3	22.50 mg	6343923	7072897	0.89	22.50 mg	100.02
Día 2	1	22.58 mg	6321461	6971346	0.90	22.65 mg	100.29
	2	22.56 mg	6327966	6995114	0.90	22.59 mg	100.14
	3	22.52 mg	6320245	6979650	0.90	22.61 mg	100.42

Tabla 24. Datos estadísticos concentración 90%, Día 1 y 2.

	Día 1	Día 2	Global
Σy	300.73	300.85	601.58
Σy^2	30146.48	30170.34	60316.82
\bar{y}	100.2	100.28	100.26
n	3	3	6
S	0.20	0.14	0.15
CV	0.20	0.14	0.15

Tabla 25. Cálculo de repetibilidad a una concentración al 100% de citalopram Día 1 y 2.

	Muestra	Cantidad Adicionada	Área Citalopram	Área Compuesto F	Factor Respuesta	Cantidad Recuperada	% Recobro
Día 1	1	25.30 mg	7083421	7065318	1.00	25.15 mg	99.42
	2	25.40 mg	7089332	7050374	1.00	25.23 mg	99.32
	3	25.20 mg	7079528	7065269	1.00	25.14 mg	99.76
Día 2	1	24.99 mg	7008425	7042038	0.99	24.85 mg	99.46
	2	25.00 mg	6989842	7031879	0.99	24.82 mg	99.30
	3	25.00 mg	7030644	7094476	0.99	24.75 mg	99.00

Tabla 26. Datos estadísticos concentración 100%, Día 1 y 2.

	DIA 1	DIA 2	GLOBAL
Σy	298.51	297.75	596.26
Σy^2	29702.52	29552.03	59254.55
\bar{y}	99.50	99.25	99.38
n	3	3	6
S	0.23	0.23	0.25
CV	0.23	0.24	0.25

Tabla 27. Cálculo de repetibilidad a una concentración al 110% de citalopram Día 1 y 2.

	Muestra	Cantidad Adicionada	Área Citalopram	Área Compuesto F	Factor Respuesta	Cantidad Recuperada	% Recobro
Día 1	1	27.45 mg	7755322	7023382	1.10	27.70 mg	100.93
	2	27.53 mg	7727162	7026916	1.09	27.59 mg	100.22
	3	27.49 mg	7774410	7092930	1.09	27.50 mg	100.04
Día 2	1	27.49 mg	7739887	7018079	1.10	27.54 mg	100.19
	2	27.51 mg	7759103	7023680	1.10	27.59 mg	100.29
	3	27.50 mg	7755588	7037911	1.10	27.52 mg	100.07

Tabla 28. Datos estadísticos concentración 110%, Día 1 y 2.

	Día 1	Día 2	Global
Σy	301.18	300.55	601.73
Σy^2	30236.92	30110.02	60346.94
\bar{y}	100.4	100.18	100.29
n	3	3	6
S	0.47	0.11	0.33
CV	0.47	0.11	0.32

Se realizó la prueba de repetibilidad del método, en dos días diferentes y con los criterios de aceptación del producto, de no menos del 90.0%, y no más del 110% de Citalopram, obteniendo los resultados en cada uno de estos parámetros. El criterio de aceptación de 90.0% fue de un C.V de 0.15%; en 100.00% se obtuvo un % C.V. de 0.25%; y en el

110.0 % un %C.V. de 0.32 % para ambos días de trabajo. Además se realizó la prueba de A.N.O.V.A. de un factor, verificando si existía diferencia entre días para el análisis, elaborando la hipótesis para cada criterio de aceptación, obteniendo una $F_{calculada}$ para el criterio de aceptación de la concentración al 90.0% de $F=0.08 < F_{tablas}=7.71$, el criterio de aceptación de la concentración al 100.0% de $F=1.77 < F_{tablas}=7.71$, el criterio de aceptación de la concentración al 110.0% de $F=0.57 < F_{tablas}=7.71$, no rechazando la hipótesis nula en ninguno de los casos, indicando que el método es repetible; los cálculos y evidencia se encuentran en el anexo de la página 68.

Resultados y análisis de resultados para las pruebas de recuperación y sesgo

Los resultados obtenidos para las pruebas de recuperación y sesgo se muestran en las Figuras 14 y 15; así como Tablas 29 y 30.

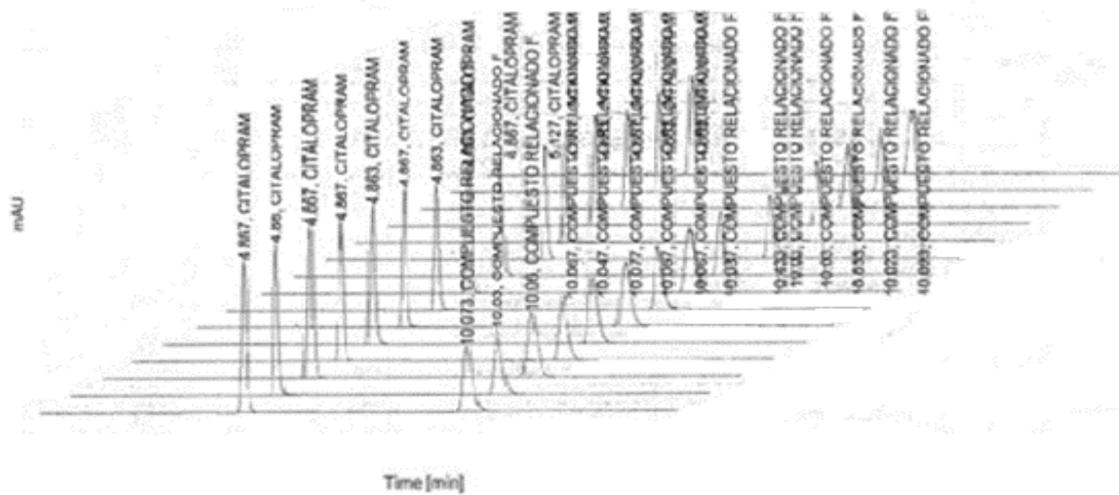


Figura 14. Cromatograma de recuperación y sesgo obtenido con un detector de luz UV a una longitud de onda de 254 nm.

Tabla 29. Resultados obtenidos de recuperación y sesgo de citalopram.

Muestra	% Concentración	Cantidad adicionada (mg)	Área citalopram	Área Compuesto F	Factor respuesta	Cantidad recuperada (mg)	% Recobro	Sesgo
1	80	20.02	5685070	7056415	0.80	19.73	98.55	1.45
2	80	20.01	5676787	7048967	0.80	19.72	98.55	1.45
3	80	20.00	5676969	7076175	0.79	19.65	98.23	1.77
1	90	22.50	6438911	7058469	0.89	22.34	99.28	0.72
2	90	22.51	6425076	7055637	0.89	22.30	99.06	0.94
3	90	22.51	6474315	7098022	0.89	22.34	99.23	0.77
1	100	25.01	7125943	7070413	0.99	24.68	98.68	1.32
2	100	25.03	7126594	7065736	0.99	24.70	98.68	1.32
3	100	25.00	7128761	7073442	0.99	24.68	98.72	1.28
1	110	27.50	7926648	7095473	1.09	27.36	99.48	0.52
2	110	27.51	7905880	7082250	1.08	27.34	99.37	0.63
3	110	27.50	7929828	7119609	1.10	27.27	99.18	0.82
1	120	30.02	8583414	7049936	1.20	29.81	99.31	0.69
2	120	30.04	8583637	7063074	1.20	29.76	99.07	0.93
3	120	30.03	8572813	7078738	1.19	29.66	98.76	1.24

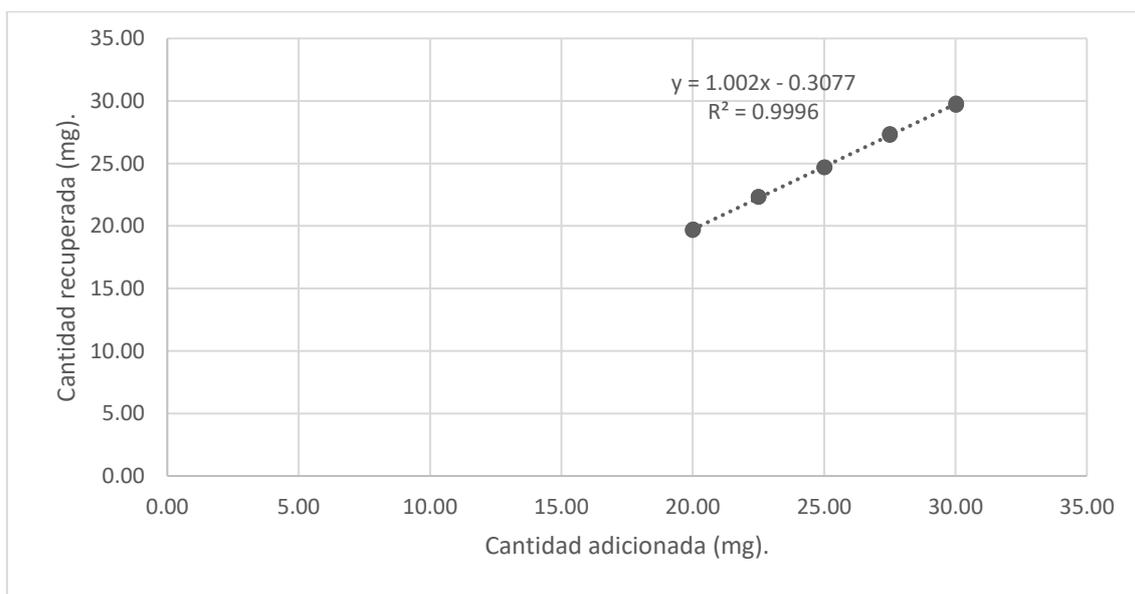


Figura 15. Gráfica de recuperación de citalopram.

Tabla 30. Cálculo de la ecuación de la recta de recuperación de citalopram.

Ecuación de la recta	
b1	1.0020
b0	-0.3077
r2	0.9996

Mediante una curva de calibración de cantidad adicionada contra cantidad recuperada con niveles de 80, 90, 100, 110 y 120 se determinó la exactitud y sesgo del método. Se obtuvo el porcentaje de recobro de las muestras de Citalopram a los distintos niveles de trabajo, obteniendo un recobro global de 100.31% y el IC(μ) indica que para ser preciso se debe de obtener valores entre 100.50 y 100.13, con un C.V. global 0.4%.

En cuanto al sesgo, todos los valores obtenidos tuvieron una diferencia absoluta menor a 2 comparados con el valor de referencia, por lo que no hay diferencia significativa entre el valor obtenido y el valor de referencia.

Se obtuvo una r^2 mayor a 0.98, obteniendo como resultado una r^2 de 0.9996 por lo que se puede decir que el método es lineal.

Resultados y análisis de resultados para el parámetro de especificidad

Los resultados obtenidos para el parámetro de especificidad se muestran en la Figura 16.

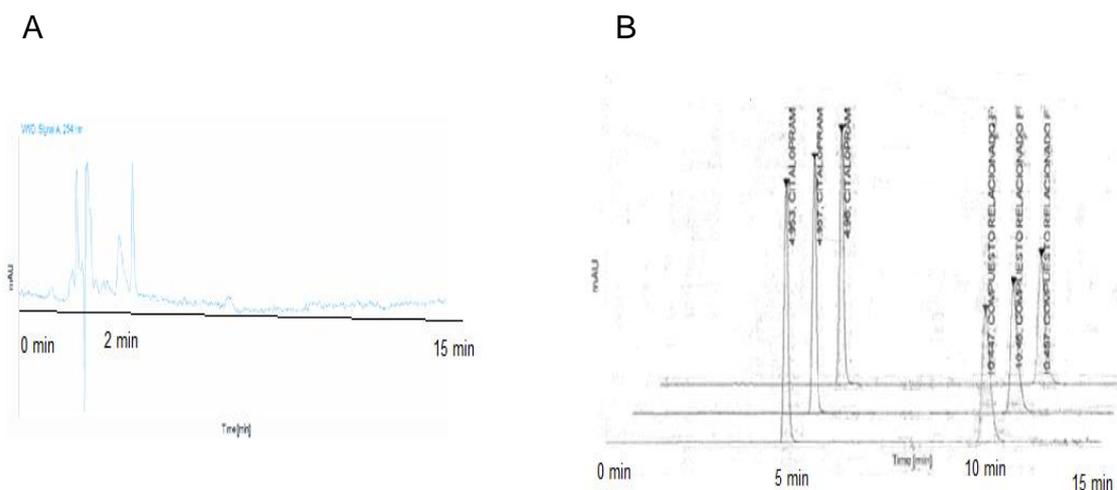


Figura 16 Comparación de cromatograma de solución blanco (A) contra cromatograma con muestra de citalopram (B) obtenido con un detector de luz UV a una longitud de onda de 254 nm.

En el cromatograma obtenido del lado izquierdo se puede observar que la respuesta es únicamente del analito, ya que no presenta respuesta en el tiempo de retención del citalopram ni del compuesto F.

Resultados y análisis resultados para el parámetro de selectividad

Los resultados obtenidos para la prueba de selectividad se muestran en las Figuras 17 y 18; así como en la Tablas 31.

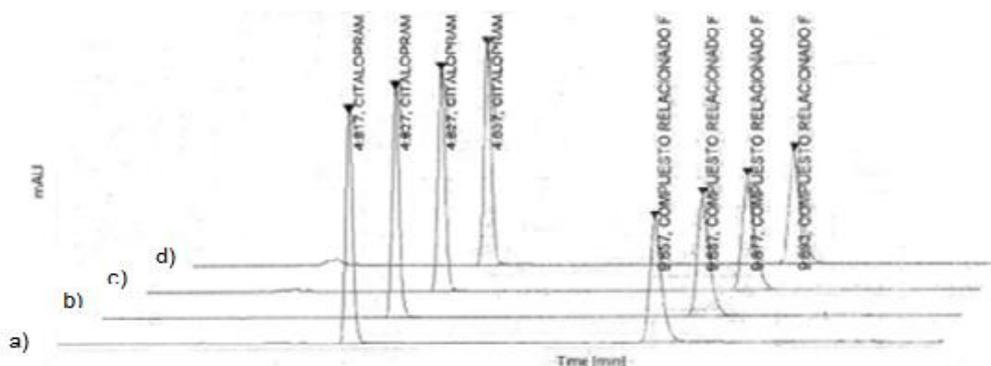


Figura 17. Cromatograma de muestras de selectividad a condiciones normales (a, b) y condiciones de temperatura (c, d) obtenido con un detector de luz UV a una Longitud de onda de 254 nm.

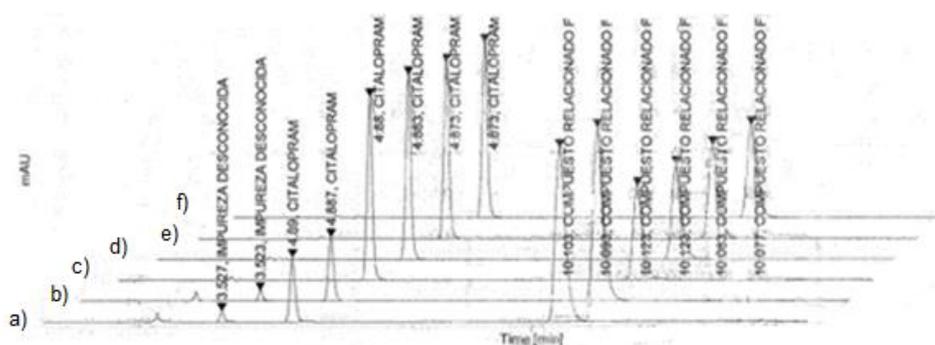


Figura 18. Cromatograma de muestras de selectividad a condiciones de hidrólisis básica (a, b), hidrólisis ácida (c, d) y degradación fotolítica (e, f) obtenidas con un detector de luz UV a una longitud de onda de 254 nm.

Tabla 31. Cálculo de muestras de selectividad de citalopram.

Muestra	Condición	Cantidad adicionada (mg)	Área citalopram	Área Compuesto F	Factor respuesta	Cantidad recuperada (mg)	% Recobro	% Degradación
1	Normal	25.3	6995255	6912920	1.01	25.21	99.64	0.36
2		25.0	6943683	6927883	1.00	24.97	99.88	0.12
1	Temperatura	25.01	6776772	6904162	0.98	24.45	97.77	2.23
2		25.00	6810002	6927774	0.98	24.49	97.95	2.05
1	pH Ácido	25.03	7138909	7048693	1.01	25.23	100.80	0.80
2		25.02	7089271	7031522	1.00	25.12	100.39	0.39
1	pH Básico	25.04	2469602	13148686	0.18	4.68	18.69	81.31
2		25.03	2488295	13189977	0.18	4.70	18.78	81.22
1	Fotolíticas	25.00	6952622	7071010	0.98	24.50	97.98	2.02
2		25.01	6985227	7054543	0.99	24.67	98.63	1.37

El parámetro de selectividad demuestra que, a las diferentes condiciones de operación planteadas, el analito mostró diferentes resultados en cuanto a su degradación. En condiciones básicas se observó una degradación del 81% del analito, mientras que, en condiciones ácidas, temperatura, luz UV no presentó diferencia significativa. Sin embargo, se encontró que el citalopram es un fármaco que, en condiciones hidrolíticas, oxidativas y fotolíticas se producen productos de degradación.

El citalopram químicamente es (RS)-1-[3-(dimetilamino)propil]-1-(p-fluorofenil)-5-carbonitrilo ftalano, por lo que en condiciones hidrolíticas, oxidativas y ambientes fotolíticos se producirán varias impurezas o productos de degradación. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con aquellos obtenidos por otros investigadores como Manav Sharm y Cols.¹², que utilizaron un sistema cromatográfico Waters con un detector PDA, con una columna C8 (150 mm x 4.6 mm d.i., 5 mm, Spherisorb, Waters) con una fase móvil compuesta de acetonitrilo y una solución amortiguadora de acetato de amonio (0.025 mol L⁻¹; 35:65 v/v; pH* 4,5) a un flujo de 0,50 mL min⁻¹ con un volumen de inyección de 20 mL. El fármaco fue sometido a diferentes condiciones de degradación, en donde se obtuvo una degradación del 98.99% en condiciones básicas utilizando una concentración de 0.1 mol de NaOH a 85 °C. En condiciones ácidas, los mismos investigadores obtuvieron una degradación del 41% con una concentración de 2 M HCl a 85 °C y la exposición del fármaco a una temperatura de 50 °C y luz UV-Vis no resultó en ningún aumento en el área del pico ni formación de ningún otro producto que sugiriera que el fármaco en estado sólido era inestable al calor y la luz. Sin embargo,

bajo condiciones ácidas y medios alcalinos después de la exposición a la luz en solución, el fármaco es fotosensible.

Otros autores como González Hinojosa²⁵ reportaron una degradación en medio básico y sin diferencia significativa para medio ácido, fotólisis, termólisis, en su desarrollo experimental. Utilizaron un cromatógrafo líquido de alta eficiencia marca Agilent Serie 1100, una columna RP Selec B C8, con una fase móvil preparada con una solución de ácido fosfórico 0.05 N, ajustada a pH=4 con trietilamina (TEA)/ metanol (50:50), con detector UV, a una longitud de onda 254 nm, a flujo: 1 mL/minuto, inyectando 20 µL de muestra. Para la hidrólisis ácida utilizó una solución de HCl 0.5 N; para la hidrólisis básica utilizó NaOH 0.5 N; para la fotólisis utilizó una lámpara que simulara la luz UV exponiendo la muestra durante una semana; y para la termólisis la muestra fue sometida a 105 °C por una semana.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Tabla 32. Criterios de aceptación para la Verificación Analítica de citalopram de acuerdo con el PNO-CCQ-037- Versión 7B “Verificación de métodos analíticos”, basado en la FEUM 12 edición.

Prueba	Criterio de aceptación	Resultados obtenidos
Análisis de Valoración	Recobro: 90.0 - 110%	Recobro: 99.67%
Adecuabilidad del sistema.	C.V. ≤ 2.0 Resolución > 1.5 Platos teóricos > 2000 Factor de Coleo < 2	C.V. = 0.4 Resolución= 18 Platos teóricos =10736.07 Factor de coleo= 1.2
Linealidad el método	$r^2 > 0.98$	$r^2 = 0.99$
Reproducibilidad (Precisión)	Recobro: 90.0 - 110% CV ≤ 2.0%	Analista 1 Recobro= 100.8% C.V. =1.25 Analista 2 Recobro= 99.52% C.V.= 1.35
Repetibilidad (Precisión)	Recobro: 90.0 - 110% CV ≤ 2.0%	Recobro= 99.97% C.V.=0.24
Recuperación y sesgo	IC (µ) 98-102 CV ≤ 2.0% $r^2 > 0.98$	IC (µ)= 100.31 C.V.=0.4% $r^2 = 0.9996$
Especificidad	La respuesta es únicamente del analito.	La respuesta es únicamente del analito.
Selectividad	Si existe una degradación mayor al 30%, justificar.	Degradación a pH Básico de 81.31%

11. CONCLUSIONES

De acuerdo con el procedimiento PNO-CCQ-037-Versión 7B "Verificación de Métodos Analíticos" y los criterios de aceptación del método de valoración para la cuantificación de citalopram que se encuentra en Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 12 edición, los parámetros de desempeño para métodos cromatográficos plasmados en los resultados de este trabajo indican que cumplen con los criterios mínimos necesarios para determinar que el método analítico cumple con los criterios de verificación y puede ser aplicado dentro del laboratorio para el análisis de tabletas de citalopram de 20 mg; se cumplió con los criterios de aceptación establecidos para un método cromatográfico comprobando que el método es lineal, selectivo, reproducible, exacto y apto para la cuantificación de citalopram.

12. PERSPECTIVAS

En los últimos años el consumo de antidepresivos ha ido en aumento, por lo que la depresión es considerada actualmente un trastorno mental de gran importancia social y por ello es importante como farmacéutico ofrecer medicamentos antidepresivos las tabletas de citalopram, que sean confiables, de calidad y seguros para su tratamiento. De lo anterior, la verificación analítica asegura que un método analítico sea preciso confiable y válido para obtener medicamentos de manera segura y eficaz. Se espera que esta empresa farmacéutica dedicada a la fabricación de medicamentos pueda ofrecer este medicamento antidepresivo, cumpliendo con los estándares requeridos normativos y de calidad.

13. ANEXOS

En este Anexo se encuentran por apartado, todos los resultados relativos a los parámetros realizados para la verificación de citalopram.

13.1 INCERTIDUMBRE

Se llevo a cabo el análisis de la incertidumbre, ya que nos permite conocer que factores pueden afectar a los resultados obtenidos.

El cálculo de la incertidumbre aplica solo para métodos cuantitativos y se debe de considerar todas aquellas fuentes de variabilidad que puedan afectar los resultados, ya sean errores sistemáticos o aleatorios. En el apéndice IV. Estimación de la incertidumbre de métodos analíticos farmacopeicos de la FEUM 12a ed., se establece que no es necesario aplicar la incertidumbre para los métodos farmacopeicos. Por otra parte, en el PNO-CCQ-037-Versión 7B “Verificación de métodos analíticos” se menciona que es necesario hacer un análisis de causa raíz con un diagrama de Ishikawa, el cual se presenta a continuación. ²

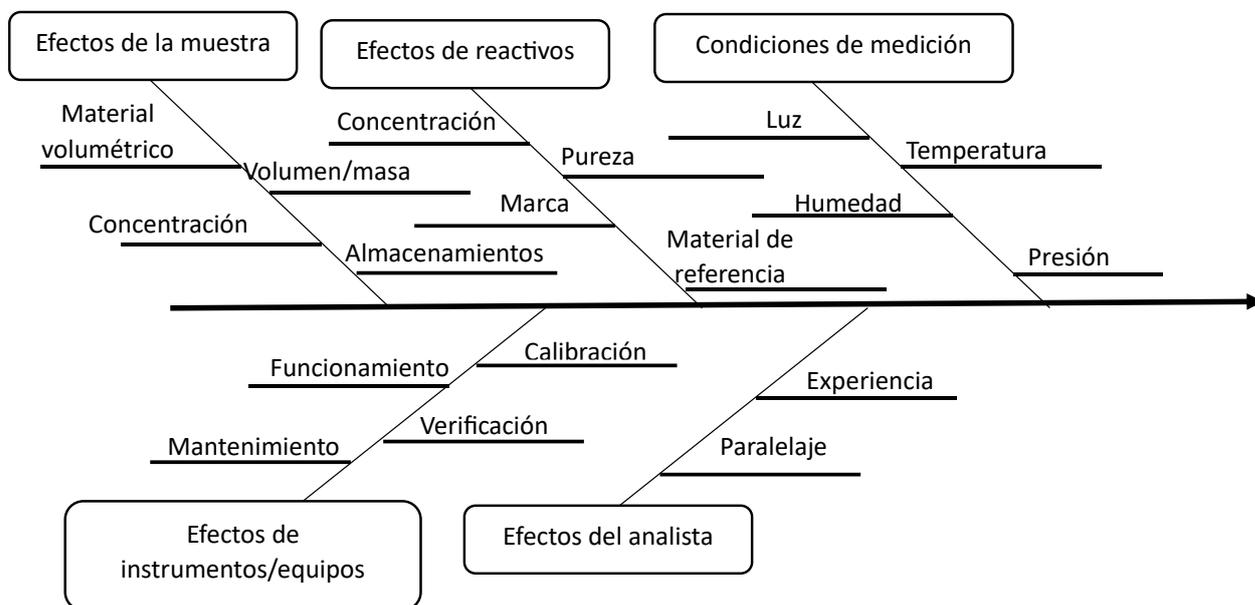


Figura 19. Diagrama de análisis causa raíz (diagrama de Ishikawa)

13.2 Linealidad del método

Tabla 33. Cálculo de estándares de linealidad del método

Estándar 1	Bromhidrato de citalopram	Compuesto F	Factor respuesta
Peso	25.00 mg	12.5 mg	
Área	7045564	7024418	1.00
	7013023	7083744	0.99
	7013572	7089213	0.99
	7041151	7052863	1.00
	7012702	7077889	0.99
	7020630	7097001	0.99
Promedio	7024440	7070855	0.99
CV	0.21%		

Estándar 2	Bromhidrato de citalopram	Compuesto F	Factor respuesta
Peso	25.00 mg	12.5 mg	
Área	7076251	7056718	1.00
	7066832	7040603	1.00
Promedio	7071542	7071542	1.00
CV	0.09%		

13.3 Reproducibilidad

Tabla 34. Cálculo de estándares de reproducibilidad Analista 1, Día 1

Estándar 1	Bromhidrato de citalopram	Compuesto F	Factor respuesta
Peso	25.03 mg	12.5 mg	
Área	7076661	7024418	1.00
	7064188	7083744	0.99
	7086879	7089213	0.99
	7011007	7052863	0.99
	7064885	7077889	0.99
	7020255	7097001	0.99
Promedio	7053979	7070855	0.99
CV	0.44%		

Estándar 2	Bromhidrato de citalopram	Compuesto F	Factor respuesta
Peso	25.01 mg	12.5 mg	
Área	7076251	7056718	1.00
	7066832	7040603	1.00
Promedio	7071542	7048661	1.00
CV	0.09%		

Tabla 35. Cálculo de estándares de reproducibilidad Analista 1 Día 2

Estándar 1	Bromhidrato de citalopram	Compuesto F	Factor respuesta
Peso	25.00 mg	12.5 mg	
Área	6892889	6877479	1.00
	6911797	6892768	1.00
	6898157	6887760	1.00
	6906519	6866771	1.00
	6902989	6880469	1.00
	6901416	6863092	1.00
Promedio	6902295	6878057	1.00
CV	0.09%		

Estándar 2	Bromhidrato de citalopram	Compuesto F	Factor respuesta
Peso	25.01 mg	12.5 mg	
Área	6949692	7019636	0.99
	6975368	7024702	0.99
Promedio	6962530	7022169	0.99
CV	0.26%		

Tabla 36. Cálculo de estándares de reproducibilidad Analista 2 Día 1

Estándar 1	Bromhidrato de citalopram	Compuesto F	Factor respuesta	Estándar 2	Bromhidrato de citalopram	Compuesto F	Factor respuesta
Peso	25.02 mg	12.5 mg		Peso	25.02 mg	12.5 mg	
Área	7051696	7013394	1.00	Área	7033524	7067862	1.00
	7081866	7047171	1.00		7096722	7051123	1.00
	7045234	7051455	0.99				
	7057298	7089835	0.99				
	7093626	7058587	1.00				
	7027295	7021499	1.00				
Promedio	7059503	7046990	1.00	Promedio	7065123	7059493	1.00
CV	0.35%			CV	0.63%		

Tabla 37. Cálculo de estándares de reproducibilidad Analista 2 Día 2

Estándar 1	Bromhidrato de citalopram	Compuesto F	Factor respuesta	Estándar 2	Bromhidrato de citalopram	Compuesto F	Factor respuesta
Peso	25.01 mg	12.5 mg		Peso	25.01 mg	12.5 mg	
Área	7095552	6967253	1.00	Área	7077143	7112101	1.00
	7002558	6937434	1.00		7077276	7103413	1.00
	6993233	6944464	1.00				
	7003717	6950721	1.00				
	7004956	6945402	1.00				
	7004490	6955106	1.00				
Promedio	7017418	6950063	1.00	Promedio	7077209	7107757	1.00
CV	0.55%			CV	0.00%		

Tabla 38. Análisis de varianza de un factor concentración de citalopram al 90%

	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Analista 1	6	600.42	100.07	1.78
Analista 2	6	597.76	99.63	2.67

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor Crítico para F
Entre grupos	0.59	1	0.59	0.26	0.62 *	4.96
Dentro de los grupos	22.27	10	2.23			
Total	22.86	11				

* $P > 0.05$ por lo que la hipótesis nula se acepta.

Tabla 39. Análisis de varianza de un factor concentración de citalopram al 100.0%

	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Analista 1	6	599.45	99.91	1.60
Analista 2	6	596.47	99.41	1.28

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor Crítico para F</i>
Entre grupos	0.74	1	0.74	0.51	0.49*	4.96
Dentro de los grupos	14.43	10	1.44			
Total	15.17	11				

* $P > 0.05$ por lo que la hipótesis se acepta.

Tabla 40. Análisis de varianza de un factor concentración de citalopram al 110%

	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Analista 1	6	601.57	100.26	1.84
Analista 2	6	597.19	99.53	2.18

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor Crítico para F</i>
Entre grupos	1.60	1	1.60	0.80	0.39*	4.96
Dentro de los grupos	20.08	10	2.01			
Total	21.67	11				

* $P > 0.05$ por lo que la hipótesis nula se acepta.

13.4 Repetibilidad**Tabla 41. Cálculo de estándares de repetibilidad de citalopram Día 1**

Estándar 1	Bromhidrato de citalopram	Compuesto F	Factor respuesta
Peso	25.03 mg	12.5 mg	
Área	7076661	7024418	1.00
	7064188	7083744	0.99
	7086879	7089213	0.99
	7011007	7052863	0.99
	7064885	7077889	0.99
	7020255	7097001	0.99
Promedio	7053979	7070855	1.00
CV	0.44%		

Estándar 2	Bromhidrato de citalopram	Compuesto F	Factor respuesta
Peso	25.01 mg	12.5 mg	
Área	7076251	7076251	1.00
	7066832	7066832	1.00
Promedio	7071542	7071542	1.00
CV	0.09%		

Tabla 42. Cálculo de estándares de repetibilidad de citalopram Día 2

Estándar 1	Bromhidrato de citalopram	Compuesto F	Factor respuesta	Estándar 2	Bromhidrato de citalopram	Compuesto F	Factor respuesta
Peso	25.02 mg	12.5 mg		Peso	25.01 mg	12.5 mg	
Área	7051696	7013394	1.00	Área	7033524	7067862	1.00
	7084866	7047171	1.00		7096722	7051123	1.00
	7045234	7051455	0.99				
	7057298	7089835	0.99				
	7093626	7058587	1.00				
	7027295	7021499	1.00				
Promedio	7060003	7046990	1.00	Promedio	7071542	7071542	1.00
CV	0.35%			CV	0.09%		

Tabla 43. Análisis de varianza de un factor concentración de citalopram al 90.0%

	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Día 1	3	300.73	100.24	0.04
Día 2	3	597.19	100.28	0.02

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor Crítico para F
Entre grupos	0.00	1	0.00	0.08	0.79*	7.71
Dentro de los grupos	0.12	4	0.03			
Total	0.12	5				

* P > 0.05 por lo que la hipótesis nula se acepta.

Tabla 44. Análisis de varianza de un factor concentración de citalopram al 100.0%

	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Día 1	3	298.51	99.50	0.05
Día 2	3	297.75	99.25	0.05

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor Crítico para F
Entre grupos	0.10	1	0.10	1.77	0.25*	7.71
Dentro de los grupos	0.22	4	0.05			
Total	0.31	5				

* P > 0.05 por lo que la hipótesis nula se acepta.

Tabla 45. Análisis de varianza de un factor concentración de citalopram al 110.0%

	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Día 1	3	301.18	100.39	0.22
Día 2	3	300.55	100.18	0.01

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor Crítico para F
Entre grupos	0.07	1	0.07	0.57	0.49*	7.71
Dentro de los grupos	0.46	4	0.12			
Total	0.53	5				

* $P > 0.05$ por lo que la hipótesis nula se acepta.

13.5 Recuperación y Sesgo

Tabla 46. Cálculos de estándares de recuperación y sesgo de citalopram

Estándar 1	Bromhidrato de citalopram	Compuesto F	Factor respuesta	Estándar 2	Bromhidrato de citalopram	Compuesto F	Factor respuesta
Peso	25.00 mg	12.5 mg		Peso	25.00 mg	12.5 mg	
Área	7045564	7024418	1.00	Área	7076251	7056718	1.00
	7013023	7083744	0.99		7066832	7040603	1.00
	7013572	7089213	0.99				
	7041151	7052863	1.00				
	7012702	7077889	0.99				
	7020630	7097001	0.99				
Promedio	7024440	7070855	0.99	Promedio	7071542	7071542	1.00
CV	0.21%			CV	0.09%		

Tabla 47. Cálculo del intervalo de confianza para la pendiente de recuperación de citalopram

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA PENDIENTE	
S_{b1}	0.0058
S_{x/y}	0.0791
IC(β₁)	1.01 0.99

Tabla 48. Cálculo del intervalo de confianza para la ordenada al origen de recuperación de citalopram

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA ORDENADA AL ORIGEN		
Sb0	0.1458	
C.V.x/y	0.0800	
IC(β_0)	0.01	-0.72

Tabla 49. Intervalo de confianza para el recobro de la recuperación

INTERVALO DE CONFIANZA PARA EL RECOBRO		
IC(μ_1)	100.50	100.13

Tabla 50. Recobro de la recuperación de citalopram

Recobro de la Recuperación	
\bar{y}	100.31
S	0.40
C.V.	0.40

13.6 Selectividad

Tabla 51. Cálculo de estándares de selectividad de citalopram

Estándar 1	Bromhidrato de citalopram	Compuesto F	Factor respuesta	Estándar 2	Bromhidrato de citalopram	Compuesto F	Factor respuesta
Peso	25.00 mg	12.5 mg		Peso	25.01 mg	12.5 mg	
Área	6892889	6877479	1.00	Área	6949692	7019636	0.99
	6911797	6892768	1.00		6975368	7024702	0.99
	6998157	6887760	1.00				
	6906519	6866771	1.01				
	6902989	6880469	1.00				
	6901416	6863092	1.01				
Promedio	6902294	6878057	1.00	Promedio	6962530	7022169	0.99
CV	0.09%			CV	0.26%		

13.7 Monografía de bromhidrato de citalopram

2262 Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, duodécima edición.

$$CD \left(\frac{A_m}{A_{ref}} \right)$$

Donde:

C = Cantidad por mililitro de la preparación de referencia.

D = Factor de dilución de la muestra.

A_m = Área bajo el pico obtenido en el cromatograma con la preparación de la muestra.

A_{ref} = Área bajo el pico obtenido en el cromatograma con la preparación de referencia.

CITALOPRAM, BROMHIDRATO DE. TABLETAS

Contiene bromhidrato de citalopram, equivalente a no menos del 90.0 % y no más del 110.0 % de citalopram ($C_{20}H_{21}FN_2O$) indicada en el marbete.

SUSTANCIAS DE REFERENCIA. Bromhidrato de citalopram, citalopram compuesto relacionado A, B, C, E y F, manejar de acuerdo a las instrucciones de uso.

Compuesto relacionado de citalopram A:

1-(3-dimetilaminopropil)-1-(4-fluorofenil)-1,3-dihidroisobenzofuran-5-carboxamida; $C_{20}H_{23}FN_2O_2$; PM 342.22.

Compuesto relacionado de citalopram B:

1-(3-dimetilaminopropil)-1-(4-fluorofenil)-3-hidroxi-1,3-dihidroisobenzofuran-5-carbonitrilo; $C_{20}H_{21}FN_2O_2$; PM 340.22.

Compuesto relacionado de citalopram C:

3-[3-(dimetilamino)propil]-1-(4-fluorofenil)-6-ciano-1(3H)-isobenzofuranona; $C_{20}H_{19}FN_2O_2$; PM 338.22.

Compuesto relacionado de citalopram E:

1-(3-dimetilaminopropil)-1-(4-fluorofenil)-1,3-dihidrobenzofuran-5-carbonitrilo-*N*-óxido. $C_{20}H_{21}FN_2O_2$; PM 340.22.

Compuesto relacionado de citalopram F:

dimetil-(1-metil-3,3-difenilalil) amina clorhidrato. $C_{18}H_{21}NHCl$; PM 286.64.

ENSAYOS DE IDENTIDAD

A. MGA 0351. Triturar hasta polvo fino no menos de 25 tabletas, pesar una cantidad del polvo equivalente a 200 mg de citalopram, pasar a un matraz pequeño, agregar 30 mL de agua, agitar y filtrar sobre un embudo de separación, agregar a esta solución 1 mL de solución de hidróxido de sodio 1 N, extraer con 50 mL de ciclohexano por agitación durante 10 min pasar la capa de ciclohexano a través de un filtro tratado con silicón, reducir el volumen filtrado a 3 mL aproximadamente, utilizando calor leve si es necesario. Transferir la solución caliente a un pequeño tubo de centrifuga y permitir la cristalización por enfriamiento, auxiliándose con una espátula para raspar las paredes del tubo. Centrifugar y decantar el ciclohexano. Secar el residuo en un desecador al vacío. Utilizar 2 mg de este residuo mezclado con 300 mg de bromuro de potasio para obtener el espectro de absorción. El espectro de absorción IR de la dispersión de la muestra exhibe máximo a las mismas longitudes de onda que una preparación de referencia de bromhidrato de citalopram tratada en forma similar.

B. MGA 0241, CLAR. El tiempo de retención obtenido en el cromatograma con el pico mayor de la preparación de la muestra preparada como se indica en la *Valoración* corresponde al obtenido con la preparación de referencia preparada como se indica en la *Valoración*.

DISOLUCIÓN. MGA 0291, Aparato 1. Q= 80 %.

Medio de disolución a pH 1.5. Transferir en un matraz volumétrico de 1 000 mL, 118 mL solución de ácido clorhídrico 1 N y 82 mL de solución de hidróxido de sodio 1 N, llevar al aforo con agua y mezclar. Ajustar el pH a 1.5 con solución de hidróxido de sodio a 1 N.

Preparación de referencia. Preparar una solución de SRef de bromhidrato de citalopram en medio de disolución que contenga 12 µg/mL de bromhidrato de citalopram.

Procedimiento. Colocar cada tableta en el aparato con 800 mL del medio de disolución, accionarlo a 100 rpm durante 30 min, filtrar inmediatamente un volumen de esta solución a través de un filtro de 0.45 µm. Pasar una alícuota de 10 mL del filtrado a un matraz volumétrico de 25 mL, llevar al aforo con el medio de disolución y mezclar. Obtener la absorbancia de 239 nm empleando celdas de 1 cm y medio de disolución como blanco de ajuste.

Calcular el porcentaje de $C_{20}H_{21}FN_2O$ disuelto por medio de la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{100 CD \left(\frac{A_m}{A_{ref}} \right)}{M} \right) \left(\frac{324.39}{405.30} \right)$$

Donde:

C = Cantidad por mililitro de bromhidrato de citalopram en la preparación de referencia.

D = Factor de disolución de la muestra.

A_m = Absorbancia obtenida con la preparación de la muestra.

A_{ref} = Absorbancia obtenida con la preparación de referencia.

M = Cantidad de citalopram indicada en el marbete.

324.39 = Peso molecular de citalopram.

405.30 = Peso molecular del bromhidrato de citalopram.

UNIFORMIDAD DE DOSIS. MGA 0299. Cumple los requisitos.

Solución reguladora, diluyente, patrón interno, y preparación de referencia. Proceder como se indica en la *Valoración*.

Preparación de la muestra. Transferir una tableta a un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 10 mL de solución reguladora, agitar mecánicamente hasta desintegrar totalmente. Agregar 40 mL de metanol y someter a la acción de un baño de ultrasonido durante 5 min, enfriar a temperatura ambiente, llevar aforo con patrón interno. Si es necesario hacer diluciones con diluyente para obtener una solución de prueba de concentración de 0.1 mg/mL de citalopram y 0.025 mg/mL de patrón interno. La solución de prueba se filtra por una membrana filtrante de 0.45 µm o de porosidad fina.

Procedimiento. Como se indica en la *Valoración*.

Calcular la cantidad de citalopram por tableta por medio de la siguiente fórmula:

Figura 20. Monografía de bromhidrato de citalopram recuperado de la FEUM 12 edición

$$C D \left(\frac{A_m}{A_{ref}} \right) F$$

Donde:

C = Cantidad por mililitro de citalopram en la preparación de referencia.

D = Factor de disolución de la muestra.

A_m = Área relativa obtenida en el cromatograma con la preparación de la muestra.

A_{ref} = Área relativa obtenida en el cromatograma con la preparación de referencia.

F = Factor de conversión de bromhidrato de citalopram a citalopram (405.30 y 324.39 respectivamente) pesos moleculares.

SUSTANCIAS RELACIONADAS. MGA 0241, CLAR.

Solución reguladora. Transferir 3.15 g de fosfato monobásico de potasio y 3.60 g de fosfato dibásico de sodio a un matraz volumétrico de 1 000 mL, llevar al aforo a 1 000 mL con gua, mezclar.

Fase móvil. Preparar una mezcla filtrada desgasificada de solución reguladora, metanol y acetonitrilo (55:38:7) ajustar el pH a 6.5 con ácido fosfórico y hacer los ajustes necesarios para obtener el sistema cromatográfico adecuado.

Preparación de referencia concentrada. Preparar una solución en fase móvil que contenga 0.5 mg/mL aproximadamente de SRef de bromhidrato de citalopram.

Preparación de referencia. Diluir una alícuota de la preparación de referencia concentrada con fase móvil, para obtener una solución que contenga 0.625 µg/mL de bromhidrato de citalopram.

Solución de sensibilidad. Diluir una alícuota de la preparación de referencia con la fase móvil para obtener una concentración de la solución que contenga 0.05 µg/mL de bromhidrato de citalopram.

Soluciones de los compuestos relacionados. Preparar por separado soluciones con fase móvil que contengan 0.1 mg/mL de compuestos relacionados A, B, C y E.

Solución para identificar picos. Preparar una mezcla de las soluciones de los compuestos relacionados que contenga 0.001 mg/mL de cada uno, usando preparación de referencia concentrada como diluyente.

Solución de resolución. Transferir a un matraz volumétrico de 50 mL, una alícuota de 0.5 mL de la solución del compuesto relacionado C (0.1 mg/mL) y una alícuota de 25 mL de la solución de referencia concentrada, llevar al aforo con fase móvil y mezclar. Esta solución contiene 1 µg/mL de compuesto relacionado C de citalopram y 250 µg/mL de bromhidrato de citalopram.

Preparación de la muestra. Pesar 10 tabletas y calcular su peso promedio, triturar hasta polvo fino y transferir el polvo cuantitativamente a un matraz volumétrico de 200 mL, agregar 25 mL de la solución reguladora y agitar, homogenizar y agregar 100 mL de una mezcla de metanol:agua (50:50), mezclar y someter a la acción de un baño de ultrasonido

durante 5 min dejar enfriar y llevarlo aforo con mezcla de metanol:agua (50:50), mezclar y dejar asentar los excipientes. Diluir se es necesario para obtener una solución con una concentración de 0.5 mg/mL de citalopram en fase móvil. (Tomar en cuenta la concentración del marbete). Filtrar una porción de esta solución a través de una membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0.45 µm de porosidad, utilizar este filtrado para la prueba.

Condición del equipo. Detector de luz UV a una longitud de onda de 239 nm, columna de 4.6 mm × 15 cm, empacada con L1 de 5 µm temperatura mantenida a 45 °C, velocidad de flujo de 0.8 mL/min.

Procedimiento. Inyectar al cromatógrafo, repetidas veces, volúmenes iguales (20 µL) de la preparación de referencia registrar los picos respuesta, el pico correspondiente a citalopram no muestra bordes ni excesivo coileo, el factor K no es menor a 3.5, la eficiencia de la columna no es menor que 5 000 platos teóricos, el factor de coileo no es más de 1.5 y el coeficiente de variación no es mayor al 5 %. Inyectar al cromatógrafo volúmenes iguales (20 µL) de la solución de sensibilidad, verificar que la relación de la respuesta no es menor que 3. Inyectar al cromatógrafo volúmenes iguales (20 µL) de la solución de resolución, registrar los picos respuestas, la resolución R entre el compuesto relacionado C y citalopram no es menor que 3. Inyectar al cromatógrafo volúmenes iguales (20 µL) de solución para la identificación de picos y registrar los picos respuesta de los cuatro picos de los compuestos relacionados.

Nota: como apoyo para la identificación, los tiempos de retención relativa se anotan en la *Tabla 1*.

Una vez ajustados los parámetros de operación, inyectar al cromatógrafo por separado, volúmenes iguales (20 µL) de la solución de referencia y de la preparación de la muestra, registrar los picos respuesta y medir las áreas.

Calcular el porcentaje de cada impureza por medio de la siguiente fórmula:

$$100 \left(\frac{A_m}{A_{ref}} \right) \left(\frac{324.39}{405.30} \right) \left(\frac{C_{ref}}{C_m} \right) F$$

Donde:

A_m = Área bajo el pico obtenida en el cromatograma con la solución de la muestra, respuesta individual para cada compuesto relacionado de citalopram.

A_{ref} = Área bajo el pico obtenida en el cromatograma con la solución de referencia.

324.39 = Peso molecular de citalopram.

405.30 = Peso molecular del bromhidrato de citalopram.

C_{ref} = Cantidad de bromhidrato de citalopram en la solución de referencia y en la preparación de la muestra.

C_m = Citalopram a citalopram en la solución de referencia y en la preparación de la muestra.

F = Es el factor de respuesta relativo de cada impureza relativo a citalopram base, las respuestas para los componentes relacionados se encuentran en la siguiente tabla:

Figura 21. Monografía de bromhidrato de citalopram recuperado de la FEUM 12 edición

2264 Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, duodécima edición.

Compuestos relacionados de citalopram	Tiempo de retención relativo	Factor de respuesta relativo (F)	Límite % (NMD)
Compuesto relacionado A	0.43	0.77	0.2
Compuesto relacionado B	0.60	0.98	0.25
Compuesto relacionado C	0.83	0.69	0.25
Compuesto relacionado E	1.32	0.91	0.1
Cualquier otra impureza individual no identificada	—	1.0	0.2 de cada uno
Totales de impurezas conocidas y desconocidas	—	—	0.8

NMD = No más de.

VALORACIÓN. MGA 0241. CLAR.

Solución reguladora. Transferir a un matraz volumétrico de 500 mL 0.71 g de fosfato dibásico de sodio anhidro, agregar 250 mL de agua, agitar hasta disolver, llevar al aforo con agua y mezclar.

Diluyente. Mezcla de metanol:solución reguladora (80:20).

Patrón interno. Preparar una solución con diluyente, que contenga 0.25 mg/mL de la SRef de citalopram compuesto relacionado F.

Fase móvil. Preparar una solución en diluyente que contenga 770 mg/L de bromuro de dodeciltrimetilamonio, filtrar y desgasificar, hacer los ajustes necesarios para obtener el sistema cromatográfico adecuado.

Preparación de referencia concentrada. Preparar la solución en diluyente que contenga 1.25 mg/mL de la SRef de bromhidrato de citalopram.

Preparación de referencia. Transferir una alícuota de 5 mL de la preparación de referencia concentrada a un matraz volumétrico de 50 mL, agregar una alícuota de 5 mL de patrón interno, llevar al aforo con diluyente y mezclar. Esta solución contiene 125 µg/mL de bromhidrato de citalopram y 25 µg/mL de compuesto relacionado F.

Preparación de la muestra. Pesar 10 tabletas y calcular su peso promedio. Transferirlas a un matraz volumétrico de 200 mL, agregar 25 mL de solución reguladora agitar mecánicamente hasta desintegrar, agregar 100 mL de metanol y someter a la acción de un baño de ultrasonido durante 5 min, dejar enfriar a temperatura ambiente y llevar al aforo con diluyente, dejar en reposo hasta que el residuo se sedimente; transferir exactamente un volumen medio del sobrenadante claro a un matraz volumétrico de 50 mL para obtener una concentración final entre 0.090 mg/mL y 0.10 mg/mL de citalopram, agregar una alícuota de 5 mL de patrón interno y llevar al aforo con diluyente, mezclar. Filtrar esta preparación a través de membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0.45 µm o de porosidad fina.

Condición del equipo. Detector de luz UV a una longitud de onda de 254 nm, columna de 4.6 mm × 25 cm, empacada con L1 de 5 µm, velocidad de flujo de 1 mL/min. Temperatura de la columna 45 °C.

Procedimiento. Inyectar al cromatógrafo, repetidas veces, volúmenes iguales (10 µL) de la preparación de referencia y registrar los picos respuesta, el tiempo de retención relativo es aproximadamente de 1.36 para el compuesto relacionado F y 1.0 para citalopram, la resolución R entre citalopram y compuesto relacionado F no es menor que 1.5, la eficiencia de

la columna no es menor que 2 000 platos teóricos, calculada del pico de citalopram y el coeficiente de variación no es mayor que 1.5 % para el pico del citalopram. Una vez ajustados los parámetros de operación, inyectar al cromatógrafo, por separado, volúmenes iguales (10 µL) de la preparación de referencia y de la preparación de la muestra. Obtener sus correspondientes cromatogramas y medir las áreas bajo los picos.

Calcular la cantidad de citalopram ($C_{20}H_{21}FN_2O$) en la porción de muestra tomada por medio de la siguiente fórmula:

$$CD \left(\frac{A_m}{A_{ref}} \right) \left(\frac{324.39}{405.30} \right)$$

Donde:

C = Cantidad de bromhidrato de citalopram en la preparación de referencia.

D = Factor de dilución de la muestra.

A_m = Área bajo el pico obtenida en el cromatograma con la preparación de la muestra.

A_{ref} = Área bajo el pico obtenida en el cromatograma con la preparación de referencia.

324.39 = Peso molecular del citalopram.

405.30 = Peso molecular de bromhidrato de citalopram.

Relacionar el valor obtenido con el peso promedio por tableta calculado al principio de la valoración.

Figura 22. Monografía de bromhidrato de citalopram recuperada de la FEUM 12 edición

14. REFERENCIAS

1. FEUM Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 12 Edición Tomo III México D.F. 2018, apéndice III.
2. PNO-CCQ-037-Versión 7B “Verificación de Métodos Analíticos”, Empresa Farmacéutica Mexicana dedicada a la Fabricación de Medicamentos Genéricos.
3. Catálogo de Especialidades Farmacéuticas. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, Madrid (2003).
4. Guía de Validación de Métodos Analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, A.C. (2002).
5. CCAYAC-P-04/1 Criterios para la verificación de Métodos Físicoquímicos Farmacopeicos. (2011)
6. NOM-059-SSA1-2015 Buenas prácticas de fabricación de medicamentos.
7. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC): principio, tipos, instrumentación y aplicaciones. (s. f.). <https://laboratoryinfo.com/hplc/>. Recuperado 6 de agosto de 2022, de <https://laboratoryinfo.com/hplc/>
8. Gutiérrez-Bouzánl , Burdóll A., Cegarra J. (2009) La cromatografía de exclusión: Análisis de la distribución de pesos moleculares en siliconas por GPC, Instituto de Investigación Textil y Cooperación Industrial de Terrassa Universidad Politécnica de Cataluña, España Recuperado de <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/13132/LA%20CROMATOGRAFIA%20EXCLUSIVA%20ANALISIS%20DE%20LA%20DISTRIBUCION%20DE%20PESOS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
9. Snyder, L., Kirkland, J., y Dolan, J. (2010). Introduction to modern liquid chromatography (3.ª ed.). Hoboken, EE. UU.: John Wiley & Sons Inc. Snyder, L., Kirkland, J., y Glajch, J. (1997). Practical HPLC method development (2.ª ed.). Hoboken, EE. UU.
10. Chow, D, Holler J, Nieman T (2001) “Principies of Instrumental Analysis” 5ª ed. McGraw-Hill, Madrid.
11. Cohen Y, Pradeau D, (1998) “Análisis Químicos Farmacéuticos de Medicamentos” UTEHA, Noriega, México.
12. Budavari S, (2001) The Merck Index: an Ebcyclopedia of Chemical, Drugs and Biologicals” 13ª-ed. Merck Whitehouse Station, USA.
13. Harris D, (2003) “Quantitative Chemical Analysis” 2ª ed. Reverte, España.
14. Skoog D, (2001) “Química Analítica” 3ª ed. McGraw-Hill Interamericana, México.
15. Manav Sharma, Parikshit R. Jawa, Ravinder S. Gill and Gulshan Bansal (2011), Citalopram Hydrobromide: Degradation Product Characterization and a Validated

- Stability-Indicating LC-UV Method, Department of Pharmaceutical Sciences and Drug Research, Punjabi University Patiala, India. Recuperado 6 de agosto de 2022, de <https://www.scielo.br/j/bchs/a/dV9Vw8PDX9vVZrKqJSSHbMg/?format=pdf&lang=en>
16. Guía práctica de Agilent sobre Cromatografía de Exclusión por Tamaño, (s. f.). Recuperado 6 de agosto de 2022, de <https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-3651ES.pdf>
 17. Castaños, E. (2015, 15 agosto). Cromatografía de Exclusión por Tamaño. Cienciadelux. Recuperado 6 de agosto de 2022, de <https://cienciadelux.com/2015/08/15/cromatografia-de-exclusion-por-tamano/>
 18. Báez Pérez, Quiñones Gálvez, Molina Torres, E. J. J. (2017, 25 junio). Sistema de análisis de imágenes de placas de HPTLC. Scielo. Recuperado 25 de julio de 2022, de <http://scielo.sld.cu/pdf/rcci/v11n3/rcci08317.pdf>
 19. Farmacopea Brasileña, 5ta Edición, Brasilia, 2010, página 704.
 20. N, Miller, James.; C. Miller, Jane (2002). Estadística y Quimiometria para Química Analítica. Madrid: Pearson Education.
 21. Sgariglia, M. Soberón, J., Sampietro, D. & Vattuone, M. Cromatografía: Conceptos y Aplicaciones. Arakuku. 2010
 22. Nebsen Marianne; M.El-Maraghy Christine; M.Amer Sawsan; Salem Hesham (2015), Quantitative Determination of Citalopram Hydrobromide by Spectrophotometry and Chemometry in presence of its degradation products and additives in Pharmaceutical Preparation; International Conference on Advances in Agricultural, Biological & Environmental Sciences; London, UK. Recuperado 10 de agosto de 2022, <https://icbe.org/upload/7028C0715105.pdf>
 23. Ramu B, Method Development and Validation for the Determination of Citalopram Hbr by Hplc Method in Bulk Drug and Pharmaceutical Dosage Form, KVK College of Pharmacy, Hyderabad, Telangana, India 2017.
 24. ICH Harmonised Guideline, Validation of Analytical Procedures Q2(R2), 2022.
 25. González Hinojosa C. (2006). Aplicación Del Cálculo De Incertidumbre Combinada A La Validación De Una Metodología Analítica Por HPLC, en un producto que contiene Citalopram Bromhidrato. (Tesis para obtener el Título De Químico Farmacéutico). Universidad Austral De Chile, Facultad De Ciencias Escuela de Química y Farmacia. Valdivia, Chile.
 26. Marcos Jurado J. (2008). Aplicación de Microsoft Excel a la Química Analítica: Validación de Métodos Analíticos. Departamento de Química Analítica.
 27. Maroto A., Boqué R., Riu J., Rius X. (2001). Incertidumbre y Precisión. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica. Instituto de Estudios Avanzados, Universitat Rovira I Virgili.
 28. Attimarad, M., Ahmed, K. K. M., Aldhubaib, B. E., & Harsha, S. (2011). High-performance thin layer chromatography: A powerful analytical technique in

pharmaceutical drug discovery. *Pharmaceutical Methods*,. Recuperado de <https://doi.org/10.4103/2229-4708.84436>

29. Arce Osuna, Mariana. (1997). "Buenas prácticas de laboratorio en cromatografía de líquidos de alta resolución". (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/3424379>