



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO INDICATIVO DE ESTABILIDAD PARA CUANTIFICAR MALEATO DE TRIMEBUTINA Y SUS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN EN TABLETAS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

ANA CRISTINA ROJAS GALLEGOS

DIRECTOR

Dr. Vicente Jesús Hernández Abad

ASESORES

Q.F.B. Humberto Daniel Rodríguez Gaspar

Dra. Elizabeth Guadalupe Sánchez González

CIUDAD 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, por su amor, apoyo y enseñarme con su ejemplo la importancia del esfuerzo, perseverancia y valores.

A mis hermanos por su compañía en los momentos difíciles, por celebrar conmigo cada logro, por su cariño y comprensión.

A mis amigos, quienes con su amistad y apoyo me ayudaron a mantenerme firme en los momentos más desafiantes, gracias por las risas compartidas y por estar siempre cuando los necesité.

Al LIF por brindarme la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis en sus instalaciones. Agradezco a cada profesor que me brindó su conocimiento y experiencia, pero en especial al profesor Humberto por su guía y valioso conocimiento.

FINANCIAMIENTO DE TESIS:

El desarrollo de esta tesis fue financiado en su totalidad con recursos del proyecto PAPIIT IT200323 Efectividad Antihiperoglucemiantes de las matrices monolíticas de silicio que contienen glibenclamida preparadas por el método sol-gel, por lo que se agradece el apoyo de la Universidad Nacional Autónoma de México, a través de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico.

Contenido

1. Introducción.....	1
2. Marco teórico	2
2.1. Propiedades físicas y químicas del Maleato de Trimebutina	2
2.2. Rutas de degradación del Maleato de Trimebutina	2
2.3. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	3
2.3.1. Tipos de Cromatografía	3
2.3.2. Parámetros Cromatográficos.....	4
2.4. Desarrollo de métodos analíticos con la guía ICH Q14.....	5
2.4.1. Calidad por diseño	6
2.5. Validación de Métodos Analíticos.....	7
2.5.1. Linealidad.....	8
2.5.2. Precisión.....	8
2.5.3. Exactitud.....	8
2.5.4. Especificidad.....	8
2.5.5. Límite de Detección.....	8
2.5.6. Límite de Cuantificación	8
2.5.7. Precisión intermedia.....	8
2.5.8. Tolerancia.....	8
2.6. Estudios de Estabilidad.....	9
3. Planteamiento del problema.....	9
4. Pregunta de investigación.....	10
5. Objetivo general.....	10
6. Objetivos específicos	10
7. Método.....	11
7.1. Técnicas	11
7.2. Insumos	11
7.3. Materiales	11
7.4. Equipo e instrumentos.....	13
7.5. Variables	13
7.6. Hipótesis.....	14
7.7. Procedimiento.....	14

7.7.4. Validación del método analítico. Evaluación del Sistema	20
7.7.5. Validación del método analítico. Evaluación del Método.....	22
8. Resultados y Discusión	34
8.1. Adecuabilidad del Sistema	34
8.2. Especificidad del Método.....	35
8.3. Linealidad del Sistema	56
8.4. Precisión del Sistema	62
8.5. Límite de cuantificación	62
8.6. Límite de detección.....	64
8.7. Linealidad del método.....	65
8.8. Exactitud del método.....	73
8.9. Precisión intermedia.....	75
8.10. Tolerancia.....	80
8.11. Estabilidad de la muestra	87
9. Conclusiones	89
10. Referencias	90

1. Introducción

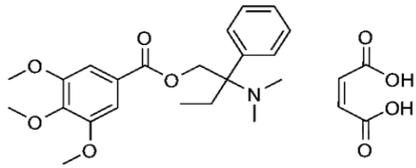
El Maleato de Trimebutina es un antiespasmódico utilizado para el tratamiento del síndrome del colon irritable. Para las formulaciones compuestas por este principio activo, es importante poder garantizar la estabilidad del fármaco ante posibles procesos de degradación durante su fabricación, almacenamiento y su uso en el mercado. La validación de métodos analíticos permite demostrar que los resultados obtenidos a partir de las pruebas experimentales que se realizaron cumplan y aseguren la exactitud y precisión de los datos analíticos.

Este estudio se enfoca en la validación de un método analítico indicativo de estabilidad que permite cuantificar e identificar el Maleato de Trimebutina en presencia de sus productos de degradación, empleando como técnica analítica la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. En la validación se llevan a cabo una variedad de parámetros, como lo son; linealidad, precisión, exactitud, especificidad, límite de cuantificación y detección, estabilidad de la muestra, tolerancia, entre otras, las cuales, nos permiten garantizar la seguridad y calidad del principio activo o del producto.

2. Marco teórico

2.1. Propiedades físicas y químicas del Maleato de Trimebutina ^{1,2}

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas del Maleato de Trimebutina

Estructura química	 <p>Figura 1. Estructura química de maleato de Trimebutina.</p>
Fórmula condensada	C ₂₆ H ₃₃ NO ₉
Nombre IUPAC	(2RS)-2-(Dimetilamino)-2-fenilbutil 3,4,5-trimetoxibenzoato (Z)-butanodioato
Peso molecular	503.5 g/mol
Descripción	polvo cristalino blanco o casi blanco
Log P	3.94-4.11
Punto de fusión	~133°C
Solubilidad	Ligeramente soluble en agua, soluble en acetonitrilo, poco soluble en acetona, ligeramente soluble en etanol (96%)

2.2. Rutas de degradación del Maleato de Trimebutina

La Trimebutina en su estructura química cuenta con un importante grupo funcional, el cual es un éster, favoreciendo de esta manera las reacciones de hidrólisis ácida y alcalina, como principales rutas de degradación. Es así que, mediante la reacción de hidrólisis de la Trimebutina se conduce a la formación de sus dos principales productos de degradación, los cuales son el ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico y 2-(dimetilamina)-2-fenilbutano, como se muestran a continuación. ³

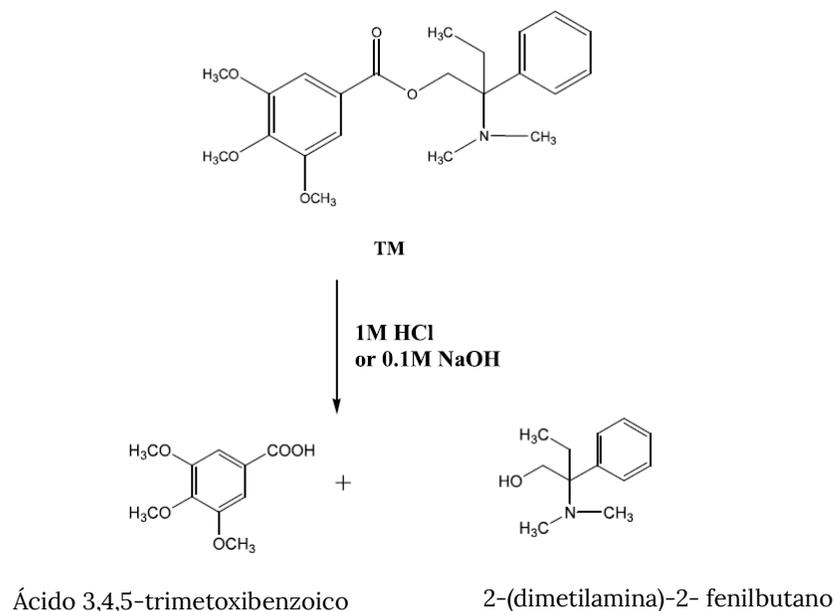


Figura 2. Productos de degradación de Trimebutina ⁴

2.3. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución ^{5,6}

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR o HPLC por sus siglas en inglés) es una técnica analítica cuya principal función es la separación e identificación de los componentes de una muestra, los componentes se distribuyen en dos fases: la fase estacionaria (fase que permanece fija) y la fase móvil, las cuales son inmiscibles entre sí.

La fase móvil se encarga de transportar la muestra a través de la fase estacionaria, las diversas fuerzas químicas y físicas que actúan entre la mezcla que se analiza y las dos fases determinan la retención y separación de los componentes individuales de la mezcla.

2.3.1. Tipos de Cromatografía ^{7,8}

2.3.1.1. Cromatografía en fase normal: En este tipo de cromatografía la fase estacionaria es altamente polar, en cambio la fase móvil es un solvente no polar, como el hexano.

2.3.1.2. Cromatografía en fase reversa: La fase estacionaria es no polar, generalmente un hidrocarburo de diferentes longitudes, tal como Octilsilano(C₈) u Octadecilsilano (C₁₈), mientras que la fase móvil es un disolvente polar, como lo es el agua, acetonitrilo o metanol, entre otros.

2.3.2. Parámetros Cromatográficos ^{9,10,11,12}

El cromatograma se genera a partir de la señal emitida por el detector, como se ilustra en la Figura 3, y a partir de este se establecen los parámetros cromatográficos.

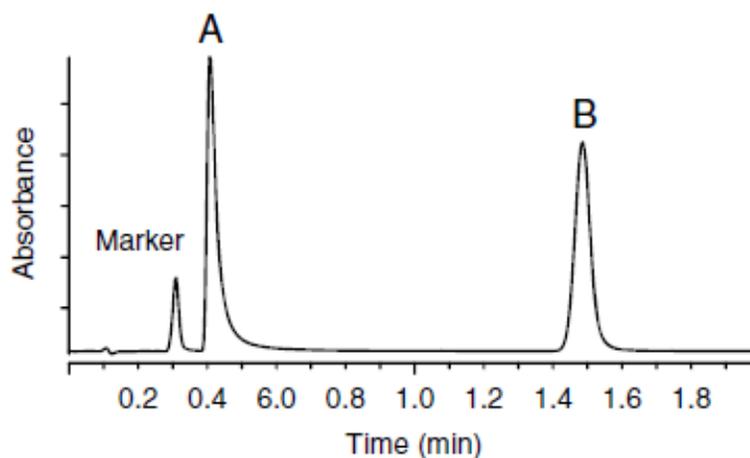


Figura 3. Cromatograma de una mezcla de componentes A y B de un detector UV. ¹³

Entre los parámetros cromatográficos que se analizan en un cromatograma se encuentran los siguientes:

2.3.2.1. Tiempo muerto (t_0): Es el tiempo que transcurre cuando se realiza la inyección de la solución a analizar y la salida de una sustancia que no interacciona con la fase estacionaria.

2.3.2.2. Tiempo de retención (t_R): Es el intervalo de tiempo que transcurre desde la inyección hasta que se alcanza la concentración máxima del soluto de interés durante la elución.

2.3.2.3. Tiempo de Retención Relativa (TRR): Las respuestas de los productos de interés en los cromatogramas, pueden ser identificadas basándose en el tiempo de retención relativa, que se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$TRR = \left(\frac{T_{analito}}{T_{referencia}} \right)$$

Donde T es el tiempo de retención

2.3.2.4. Factor de coleo: Indica la simetría que tiene un pico, la forma ideal es una curva gaussiana que corresponde a un factor de simetría de 1, mientras que un pico <1 se considera frenteo y un pico con coleo es >1.

2.3.2.5. Número de platos teóricos: El número de platos teóricos define la eficiencia de una columna cromatográfica, y, por lo tanto, la separación. Una adecuada separación no solo consta de que los componentes eluyan a distintos tiempos de retención, sino que el ancho de los picos debe de ser muy bajo, puesto que el número de platos teóricos puede calcularse en función del ancho del pico.

2.3.2.6. Resolución: Es un parámetro cuantitativo que indica la capacidad de la columna para separar dos analitos. La resolución se evalúa entre dos picos adyacentes.

2.4. Desarrollo de métodos analíticos con la guía ICH Q14

En la industria farmacéutica se emplean las guías del Consejo Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos de los Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH, por sus siglas en inglés), para asegurar la calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos. De este modo, también se aplica la guía ICH Q14 Desarrollo de métodos analíticos, la cual describe el enfoque mejorado basado en ciencia y el riesgo para desarrollar y mantener procedimientos analíticos apropiados que se integren a la gestión del ciclo de vida del método analítico y de los productos con los que se analizan las metodologías.¹⁴

2.4.1. Calidad por diseño ¹⁵

La calidad por diseño se aplica en el desarrollo y validación de un método analítico para ser considerado como un conjunto de operaciones secuenciales. Este enfoque parte de objetivos previamente definidos, destacando la importancia de comprender a fondo tanto el producto como el proceso. Asimismo, pone énfasis en el control rigurosos de dichos procesos, fundamentándose en la gestión de riesgos de calidad¹⁶. Un método analítico está sujeto a la influencia de factores externos que pueden provocar que los resultados no sean válidos.

El enfoque mejorado ofrece un método integral para desarrollar y profundizar el conocimiento sobre un procedimiento analítico. Este proceso debe incluir los siguientes elementos: Perfil analítico objetivo del método (ATP, por sus siglas en ingles), que define el propósito y uso del método, así como los atributos que serán evaluados y sus respectivas especificaciones, junto con los criterios de aceptación. También se consideran los Atributos Críticos de Calidad (CQA, por sus siglas en inglés) que son parámetros esenciales para asegurar que el producto final cumpla con los estándares de calidad requeridos; y los Parámetros Críticos del método (CMP, por sus siglas en inglés) que son aquellos factores que influyen en el desempeño del método y en su capacidad para generar resultados confiables. Además, es fundamental considerar otros aspectos que se detallan a continuación para una implementación completa y efectiva del método analítico.

2.4.1.1. Gestión de conocimiento: Se refiere a la recopilación y análisis de la investigación previa necesaria para el desarrollo del método analítico. Esto permite tomar decisiones informadas durante el desarrollo y a lo largo del ciclo de vida del producto.

2.4.1.2. Gestión de riesgos: Contribuye a entender la variabilidad de un proceso o procedimiento, abarcando los modos de falla, además, se aplican estrategias para mitigar o eliminar los riesgos asociados.

2.4.1.3. Establecimiento de Región Operable del Método Analítico

(MODR): Este paso es similar a la robustez del método donde se evalúa considerando aquellos cambios deliberados que podrían afectar su desempeño. Para este análisis, se usa un enfoque estadístico, basado en el diseño de experimentos, empleando los parámetros identificados durante la gestión de riesgos.

2.4.1.4. Estrategia de Control: Asegura que el método analítico funcione correctamente durante su uso rutinario a lo largo de todo su ciclo de vida. Esta estrategia debe establecerse antes de la validación y ser verificada al finalizar el proceso de validación.



Figura 4. Espacio de conocimiento, espacio de diseño y espacio de control, según QbD. ¹⁴

2.5. Validación de Métodos Analíticos

De acuerdo con la NOM-059-SSA1-2015, “la validación es la evidencia documentada generada a través de la recopilación y evaluación científica de datos obtenidos en pruebas específicas, cuya finalidad es demostrar la funcionalidad, robustez y consistencia de un proceso para obtener un producto de calidad”. ¹⁷

Algunas de las pruebas a realizar en la Validación de Métodos Analíticos son las siguientes: ^{18,19, 20, 21}

- 2.5.1. Linealidad:** Es la habilidad del método analítico para generar resultados que mantengan una relación directa y proporcional con la concentración de analito dentro de un rango específico.
- 2.5.2. Precisión:** Indica la dispersión entre los resultados obtenidos de manera individual al analizar varias muestras de una misma muestra homogénea.
- 2.5.3. Exactitud:** Es la concordancia que existe entre un valor de referencia y el valor que se obtiene en una muestra, es decir, el porcentaje recuperado de principio activo.
- 2.5.4. Especificidad:** Es la capacidad que tiene el método analítico para medir con precisión y exactitud la presencia del principio activo en la muestra, aún en presencia de otros componentes, como lo son; productos de degradación, productos de degradación, excipientes, entre otros.
- 2.5.5. Límite de Detección:** Es la concentración mínima de un analito en una muestra que puede ser detectada, aunque no necesariamente cuantificable como valor exacto.
- 2.5.6. Límite de Cuantificación:** Es la menor concentración de un analito en una muestra que puede ser cuantificada de manera exacta y precisa bajo las condiciones del método analítico empleado.
- 2.5.7. Precisión intermedia:** Es la variabilidad dentro de un mismo laboratorio al aplicar el método analítico en distintos días y con diferentes analistas
- 2.5.8. Tolerancia:** Es el nivel de reproducibilidad de los resultados obtenidos al analizar una misma muestra bajo diversas condiciones, como diferentes laboratorios, analistas, días, equipos, entre otros.

2.6. Estudios de Estabilidad

De acuerdo con la NOM-073-SSA1-2015, “los estudios de estabilidad son las pruebas que se efectúan a un fármaco, medicamento o remedio herbolario, por un tiempo determinado, bajo la influencia de humedad o luz en el envase que lo contiene, para demostrar el periodo de vida útil de estos. Por otro lado, los estudios de estabilidad acelerada son aquellos estudios que se realizan bajo condiciones extremas de almacenamiento para incrementar la velocidad de degradación química, biológica o los cambios físicos del medicamento”.²²

Con estos estudios podemos no solo cuantificar al principio activo, sino también identificar productos de degradación, asegurando que el medicamento mantenga su eficacia y seguridad a lo largo de su vida útil. Además, estos métodos son esenciales para determinar la fecha de caducidad, definir las condiciones óptimas de almacenamiento y garantizar el cumplimiento de normativas regulatorias.

3. Planteamiento del problema

Los estudios de estabilidad son esenciales para garantizar la calidad, eficacia y seguridad del principio activo y productos farmacéuticos a lo largo de su desarrollo, fabricación, comercialización y vida útil.²³ Actualmente, en la industria farmacéutica es de suma importancia asegurar que los medicamentos sean estables y que se cuente con la capacidad de detectar y cuantificar de manera precisa sus posibles productos de degradación bajo diversas condiciones, además de asegurar que las características físicas, químicas y biológicas del principio activo se mantengan estables, toda vez que ello es garantía de su seguridad durante el uso. De igual modo, es necesario que los métodos analíticos cumplan con los requerimientos normativos y con los estándares internacionales para su desarrollo y validación apoyados de las diferentes guías que existen, entre ellas las guías ICH.²⁴

En el caso de las tabletas de Maleato de Trimebutina, un agente terapéutico indicado para el Síndrome del colon irritable y el tratamiento de trastornos

gastrointestinales²⁵, es fundamental contar con un método analítico que permita evaluar la estabilidad del principio activo en tabletas de manera confiable. Por tal motivo, es indispensable validar un método analítico indicativo de estabilidad robusto, específico y sensible, que sea capaz de identificar y cuantificar al Maleato de Trimebutina y de sus productos de degradación utilizando la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, asegurando que los resultados sean reproducibles, precisos y exactos.

4. Pregunta de investigación

¿El método analítico indicativo de estabilidad para cuantificar e identificar Maleato de Trimebutina y sus productos de degradación, cumple con los parámetros de validación?

5. Objetivo general

Contar con un método analítico indicativo de estabilidad para cuantificar Maleato de Trimebutina en presencia de sus productos de degradación en tabletas de 200 mg de Maleato de Trimebutina, mediante la técnica analítica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

6. Objetivos específicos

- Establecer los parámetros necesarios para llevar a cabo la validación del método analítico, a través de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.
- Comprobar que los parámetros seleccionados para evaluar en la validación cumplan con los criterios de aceptación establecidos.
- Realizar el tratamiento estadístico de los datos obtenidos de las pruebas de validación, para asegurar la precisión, exactitud y confiabilidad del método analítico.

7. Método

7.1. Técnicas

Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR/HPLC por sus siglas en inglés)

7.2. Insumos

Tabla 2. Reactivos para la Validación de Métodos Analíticos

Reactivos	Marca
Sustancia de Referencia de Maleato de Trimebutina	APOTEX
Acetonitrilo grado HPLC	Tecsiquim
Acetonitrilo grado reactivo	Tecsiquim
Agua desionizada	-
Acetato de amonio	MERCK
Tabletas de Maleato de Trimebutina	Farmacias del Ahorro
Tabletas de Maleato de Trimebutina	Pharmalife
Compuesto relacionado C (methyl 3,4,5-trimethoxybenzoate)	PHARMATEX
Materia prima de Maleato de Trimebutina	APOTEX
Hidróxido de sodio, perlas	MACRON
Ácido clorhídrico	J.T. Baker
System de productos de degradación	European Pharmacopea

7.3. Materiales

Tabla 3. Materiales para la Validación del Método Analítico

Material	Capacidad/Marca
Matraces volumétricos	10 mL, 50 mL, 20 mL, 25 mL, 500 mL
Matraces Erlenmeyer	500 mL
Vaso de precipitados	500 mL

Probetas	50 mL, 100 mL
Pipeta volumétrica	2 mL, 3mL, 4 mL, 5 mL, 10 mL
Propipeta	-
Jeringas	3 mL, 10 mL
Espátula de metal	-
Micropipeta	100-1000 μ L
Reservorios para HPLC	1L
Acrodisco de membrana de Nylon	Diámetro: 25 mm Tamaño de poro: 0.45 μ m Hidrofílicos Marca: Thermo Scientific
Acrodisco de membrana de Nylon	Diámetro: 25 mm Tamaño de poro: 0.45 μ m Hidrofílicos Marca: Labfil
Membrana de Nylon	Diámetro: 47 mm Tamaño de poro: 0.45 μ m hidrofílicos Marca: Milipore
Papel glassine	-
Equipo para filtración	Matraz esmerilado de 1 L, pinza de resorte, base y tapa del tubo de 47 mm Marca: MILIPORE
Viales de vidrio con tapa	-
Vidrio de reloj	-
Mortero con pistilo	-

7.4. Equipo e instrumentos

Tabla 4. Equipos e instrumentos para la Validación del Método Analítico

Equipo/Instrumento	Marca
Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución	Hitachi
Tipo de bomba	Bomba cuaternaria
Detector	DAD
Computadora	Computadora marca DELL
Software	Software Agilent OpenLAB CDS (EZChrom Edition), versión A.04.08.
Bomba de vacío	Felisa, modelo FE-1500L
Balanza analítica	Shimadzu, modelo AUX220
Micro balanza	Mettler Toledo MT5
Balanza granataria	OHAUS, modelo 700 metric series
Equipo de purificación de agua	Mili-Q
Baño de ultrasonido	BRANSON
Parrilla de agitación	Thermolyne Cimarec 2

7.5. Variables

Tabla 5. Variables independientes y dependientes

Variable Independiente	Variable Dependiente
Temperatura	Tiempo de retención
Volumen de inyección	Altura, simetría
Columna	Platos teóricos
Longitud de onda	Resolución

7.6. Hipótesis

El método analítico indicativo de estabilidad cumplirá con los criterios de validación establecidos, permitiendo una adecuada separación, identificación y cuantificación lineal, precisa y exacta del Maleato de Trimebutina y de sus productos de degradación.

7.7. Procedimiento

De acuerdo con la guía ICH Q14 se desarrolló un método analítico para cuantificar el Maleato de Trimebutina y sus productos de degradación, durante este proceso se creó un espacio de diseño considerando variables que podrían influir en el método analítico mediante una gestión de riesgos. A partir de esta evaluación, se identificaron factores críticos que podrían afectar el rendimiento del método analítico. Posteriormente, se realizó un diseño de experimentos factorial de 2 factores que se evaluó mediante un análisis de varianza (ANOVA), determinando las condiciones adecuadas del método analítico para pasar a la validación. Antes de proceder con la validación, se llevaron a cabo pruebas prevalidación con el objetivo de minimizar posibles fallos e inclusive proponer modificaciones al método en caso necesario, con la finalidad de tener un espacio de control adecuado. Una vez seleccionado el método definitivo, se elaboró un protocolo de validación en donde se describieron a detalle todas las pruebas a realizar. Estas pruebas se ejecutaron conforme al protocolo establecido para garantizar la confiabilidad del método analítico.

7.7.1. Condiciones del método analítico o Condiciones cromatográficas del método analítico

Tabla 6. Condiciones cromatográficas del método analítico

Longitud de onda	275 nm
Columna	C18 150x4.6 mm, 5 µm
Temperatura de columna	25°C
Temperatura automuestreador	25°C
Velocidad de flujo	1 mL/min
Volumen de inyección	40 µL
Tiempo de corrida	22 minutos

7.7.2. Preparación de soluciones

7.7.2.1. Acetato de amonio

Se pesó aproximadamente y con exactitud 1.5416 g de acetato de amonio, se transfirió a un matraz volumétrico de 1000 mL y se adicionó aproximadamente 500 mL de agua y se homogenizó, finalmente se llevó al aforo con agua desionizada y se homogenizó. Se filtro con el equipo de filtración a través de una membrana de Nylon de 0.45 µm.

7.7.2.2. Acetonitrilo grado HPLC

Se filtró acetonitrilo grado HPLC con el equipo de filtración a través de una membrana de Nylon de 0.45 µm.

7.7.2.3. Agua Desionizada

Se filtró agua desionizada con el equipo de filtración a través de una membrana de Nylon de 0.45 µm.

7.7.2.4. Diluyente

Se realizó una mezcla agua desionizada: acetonitrilo grado HPLC en una proporción 50:50.

7.7.2.5. Fase móvil

Con las preparaciones mencionadas anteriormente de Acetato de amonio y Acetonitrilo grado HPLC, se desgasificaron las soluciones durante 5 minutos, posteriormente realizar el siguiente gradiente para acondicionar el equipo.

Tabla 7. Gradiente en elución para la Validación del método analítico

Tiempo (min)	% Acetato de amonio	% Acetonitrilo grado HPLC
0	45	55
4	45	55
9	35	65
16	35	65
17	45	55
22	45	55

7.7.2.6. Preparación de Solución NaOH 1M

Se pesaron aproximadamente y con exactitud 4 g de NaOH en una balanza granataria, posteriormente se vertieron en un matraz volumétrico de 100 mL, y se adiciono aproximadamente 50 mL de agua hasta homogeneizar, se dejó enfriar a temperatura ambiente, y después se llevó a volumen de aforo con agua.

7.7.2.7. Preparación de Solución HCl 1M

Se midieron 9 mL de HCl concentrado, y se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 mL que contenía aproximadamente 30 mL de agua y se llevó a volumen de aforo con agua.

7.7.2.8. Preparación de Sustancia de Referencia de Maleato de Trimebutina

Se pesó aproximadamente y con exactitud 25 mg de Sustancia de Referencia del Maleato de Trimebutina, se transfirió a un matraz volumétrico de 50 mL, añadiendo 35 mL de diluyente y sometiendo a la acción de ultrasonido durante 5 minutos, posteriormente se aforó con diluyente y se homogenizó. Se tomaron 10 mL de la solución con una jeringa y se filtró con un acrodisco de membrana de Nylon de 0.45 μm , desechando los primeros 5 mL y transfiriendo a su vial correspondiente. Teniendo una concentración aproximada de 0.5 mg/mL.

7.7.2.9. Preparación de muestra de tabletas de Maleato de Trimebutina

Se pesaron 10 tabletas de Trimebutina sobre un vidrio de reloj en la balanza analítica y se calculó su peso promedio, posteriormente se trituraron hasta polvo fino en un mortero con pistilo.

Se pesó aproximadamente y con exactitud el equivalente a 25 mg de polvo de tabletas de Maleato de Trimebutina en la micro balanza, se transfirieron a un matraz volumétrico de 50 mL. Se adicionaron aproximadamente 35 mL de diluyente y se sometió a la acción de ultrasonido durante 30 minutos, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente, llevando al aforo con diluyente y homogenizando.

7.7.2.10. Preparación de solución Stock de Maleato de Trimebutina para la Linealidad del Sistema de Valoración

Se pesaron aproximadamente y con exactitud 50 mg de Sustancia de Referencia del Maleato de Trimebutina, se transfirieron a un matraz volumétrico de 50 mL, añadiendo 35 mL de diluyente y se sometió a la acción de ultrasonido durante 5 minutos, después se aforó con diluyente y se homogenizó.

7.7.2.11. Preparación de solución Stock de Maleato de Trimebutina para la Linealidad del Sistema de Productos de degradación

Se pesaron aproximadamente y con exactitud 25 mg de Sustancia de Referencia de Maleato de Trimebutina, se transfirió a un matraz volumétrico de 50 mL, se añadieron 35 mL de diluyente y se sometió a la acción de ultrasonido durante 5 minutos, posteriormente se aforo con diluyente y se homogenizo.

7.7.2.12. Preparación de Placebo

Se pesaron aproximadamente y con exactitud los excipientes que se muestran en la tabla 8, directamente en un frasco para posteriormente mezclarlos.

Tabla 8. Pesos para la mezcla de excipientes

Excipiente	Gramos (g)
Lactosa monohidratada	2.8758
Almidón de maíz	0.5898
Ácido tartárico	0.08426
Estearato de magnesio	0.08426
Sílica gel	0.1685
Carboximetilalmidón sódico	0.1685

7.7.3. Procedimiento General

Se inyectó por sextuplicado la Sustancia de Referencia 1 (numeral 7.7.2.8.) y se midieron sus respuestas. El coeficiente de variación (CV) $\leq 2\%$ para las respuestas de Trimebutina, los platos teóricos mayores a 2000 y la asimetría alrededor de 1.

Posteriormente, se realizaron 3 inyecciones de la Sustancia de Referencia 2 (numeral 7.7.2.8.) que cumpliera con los mismos criterios mencionados anteriormente para la Sustancia de referencia 1, se evaluó la confrontación de referencias mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recobro} = \frac{ABC_{SRef 2}}{ABC_{SRef 1}} * \frac{P_{SRef 1}}{P_{SRef 2}} * 100\%$$

La confrontación de estándares debió encontrarse entre 98.0% y 102.0% para Valoración.

La confrontación de estándares para productos de degradación debió encontrarse entre 94.3% y 105.7%, de acuerdo con la fórmula de Horwitz.

Una vez que se verificó la Adecuabilidad del sistema, se inyectaron 3 preparaciones de las muestras de tabletas de Maleato de Trimebutina (numeral 7.7.2.9.) y se calculó el porcentaje de contenido por cada muestra de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ contenido} = \frac{\text{Respuesta Mtra.}}{\bar{x}\text{Respuesta Sref1}} * \frac{\text{Peso Sref1(mg)}}{\text{Dil. Sref(mL)}} * \frac{\text{Dil. Mtra(mL)}}{\text{Peso mtra(mg)}} * \frac{\text{P.P}}{\text{C.T.}} * \text{Pureza}$$

La fórmula para calcular el porcentaje de contenido de productos de degradación se muestra a continuación:

$$\% \text{ P.D.} = \frac{\text{Respuesta TRR.}}{\bar{x}\text{Respuesta Sref1}} * \frac{\text{Peso Sref1(mg)}}{\text{Dil. Sref(mL)}} * \frac{\text{Dil. Mtra(mL)}}{\text{Peso mtra(mg)}} * \frac{\text{P.P}}{\text{C.T.}} * \text{Pureza}$$

El porcentaje de contenido para la Valoración debió encontrarse entre 90.0% y no más de 110%.

El promedio del porcentaje de contenido para productos de degradación debió ser mayor a 0.05% para ser identificado como como producto de degradación, pero menor a 0.2% como valor máximo.

7.7.4. Validación del método analítico. Evaluación del Sistema

7.7.4.1. Adecuabilidad del Sistema

Se preparó por duplicado la preparación de Sustancia de Referencia que se describe en el numeral 7.7.2.8. De la primera solución se realizaron 6 inyecciones, denominada como Sref 1 y de la segunda solución se realizaron 3 inyecciones, nombrada como Sref 2, tal como se indica en el numeral 7.7.3.

Criterios de Aceptación:

El Coeficiente de Variación (CV) de las áreas bajo la curva de la Sref1 y Sref2 debe ser $\leq 2\%$

El % de recobro debe ser entre 98.0% y 102.0%

Platos teóricos > 2000

Asimetría alrededor de 1

7.7.4.2. Linealidad del Sistema

Linealidad para niveles de Valoración

Para la linealidad a niveles de Valoración se realizó por triplicado una curva del nivel del 10-120% a partir la Solución Stock descrita en el numeral 7.7.2.10. A partir de esta solución se tomaron las alícuotas correspondientes para llegar a las concentraciones que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 9. Concentraciones de Linealidad del Sistema para niveles de Valoración

Nivel (%)	Solución Stock	Alícuota (mL)	Dilución (mL)	Concentración (mg/mL)
120	$\left(\frac{50 \text{ mg}}{50 \text{ mL}}\right)$	6	10	0.6
100		5	10	0.5
80		4	10	0.4
60		3	10	0.3
40		2	10	0.2
20		1	10	0.1
10		0.5	10	0.05

Una vez obtenidas las soluciones de cada nivel, se tomaron 10 mL de cada una de las soluciones con una jeringa y se filtró con un acrodisco de membrana de Nylon de 0.45 μm , desechando los primeros 5 mL y transfiriendo a su vial correspondiente.

Linealidad para niveles de Productos de degradación

Para la Linealidad a niveles de Productos de degradación se realizó por triplicado una curva del nivel del 10-500% a partir de una solución Stock que se describe en el numeral 7.7.2.11. A partir de esta solución se tomaron las alícuotas correspondientes para llegar a las concentraciones que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 10. Concentraciones de Linealidad del Sistema para niveles de Productos de degradación

Nivel (%)	Solución Stock	Alícuota (mL)	Dilución (mL)	Alícuota (mL)	Dilución (mL)	Concentración (mg/mL)
500	$\left(\frac{25\text{mg}}{50\text{ mL}}\right)$	1	50	NA	NA	0.005
100				2	10	0.001
80				4	25	0.0008
60				3	25	0.0006
40				2	25	0.0004
20				1	25	0.0002
10				0.5	25	0.0001

NA: No aplica, solo se realiza la alícuota de 1 mL en 50 mL para llegar a la concentración de 0.005 mg/mL

Una vez obtenidas las soluciones de cada nivel, se tomaron 10 mL de cada una de las soluciones con una jeringa y se filtró con un acrodisco de membrana de Nylon de 0.45 μm , desechando los primeros 5 mL y transfiriendo a su vial correspondiente.

Criterios de aceptación para ambas evaluaciones de linealidad:

Coeficiente de determinación (r^2) ≥ 0.98

Pendiente (m) diferente de cero

El Intervalo de confianza de la pendiente no debe incluir el cero

7.7.4.3. Precisión del Sistema

A partir de la solución Stock que se describe en la Linealidad del Sistema para niveles de Valoración, se prepararon seis diluciones al nivel del 100% como se indica la Tabla 9.

Criterio de aceptación:

El CV de las áreas bajo la curva debe ser $\leq 2\%$.

7.7.5. Validación del método analítico. Evaluación del Método

7.7.5.1. Especificidad del método

Se prepararon soluciones de blanco, placebo, materia prima y producto terminado de Maleato de Trimebutina las cuales se sometieron a condiciones de estrés, a continuación, se menciona la preparación de dichas soluciones.

7.7.5.1.1. Preparación de Blanco Control

Se tomaron 10 mL de Diluyente (ver numeral 7.7.2.4.) con una jeringa de 10 mL, se filtró con un acrodisco de membrana de Nylon de 0.45 μm , desechando los primeros 5 mL, y transfiriendo a su vial correspondiente. Este procedimiento se realizó por duplicado.

7.7.5.1.2. Preparación de Blanco en condiciones ácidas

En un matraz volumétrico de 50 mL, se adicionaron 35 mL de diluyente, posteriormente se añadió 1 mL de la solución de HCl 1M, se dejó pasar 30 minutos para que se lleve a cabo la reacción. Después de transcurrir los 30 minutos, se neutralizó con 1 mL de la solución de NaOH 1M, se aforó con

diluyente y se homogenizó. Se tomaron 10 mL de la solución con una jeringa y se filtró con un acrodisco de membrana de Nylon de 0.45 μm , desechando los primeros 5 mL y transfiriendo a su vial correspondiente. Este procedimiento se realizó por duplicado.

7.7.5.1.3. Preparación de Blanco en condiciones alcalinas

En un matraz volumétrico de 50 mL, se adicionaron 35 mL de diluyente, posteriormente se añadió 1 mL de la solución de NaOH 1M, se dejó pasar 1 minuto para que se llevará a cabo la reacción. Después de transcurrir el minuto, se neutralizó con 1 mL de la solución de HCl 1M, se aforó con diluyente y se homogenizó. Se tomaron 10 mL de la solución con una jeringa y se filtró con un acrodisco de membrana de Nylon de 0.45 μm , desechando los primeros 5 mL y transfiriendo a su vial correspondiente. Este procedimiento se realizó por duplicado.

7.7.5.1.4. Preparación de materia prima control

Se pesaron aproximadamente y con exactitud 25 mg de materia prima de Maleato de Trimebutina, se transfirieron a un matraz volumétrico de 50 mL, se añadieron 35 mL de diluyente y se sometió a la acción de ultrasonido durante 5 minutos. Se aforo con diluyente y se homogenizo. Se tomaron 10 mL de la solución con una jeringa y se filtró con un acrodisco de membrana de Nylon de 0.45 μm , desechando los primeros 5 mL y transfiriendo a su vial correspondiente. Este procedimiento se realizó por duplicado.

7.7.5.1.5. Preparación de materia prima en condiciones ácidas

Se pesaron aproximadamente y con exactitud 25 mg de materia prima, se transfirieron a un matraz volumétrico de 50 mL, se

añadieron 35 mL de diluyente y se sometió a la acción de ultrasonido durante 5 minutos.

Se añadió 1 mL de la solución de ácido clorhídrico 1M, después de 1 minuto de que se efectuó la reacción se neutralizo con 1 mL de hidróxido de sodio, se terminó de aforar con diluyente y se homogenizo. Se tomaron 10 mL de la solución con una jeringa y se filtró con un acrodisco de membrana de Nylon de 0.45 μm , desechando los primeros 5 mL y transfiriendo a su vial correspondiente. Este procedimiento se realizó por duplicado.

7.7.5.1.6. Preparación de materia prima en condiciones alcalinas

Se pesaron aproximadamente y con exactitud 25 mg de materia prima, se transfirieron a un matraz volumétrico de 50 mL, se añadieron 35 mL de diluyente y se sometió a la acción de ultrasonido durante 5 minutos.

Se añadió 1 mL de la solución de hidróxido de sodio 1M, después de 1 minuto de que se efectuó la reacción se neutralizo con 1 mL de ácido clorhídrico, se terminó de aforar con diluyente y se homogenizo. Se tomaron 10 mL de la solución con una jeringa y se filtró con un acrodisco de membrana de Nylon de 0.45 μm , desechando los primeros 5 mL y transfiriendo a su vial correspondiente. Este procedimiento se realizó por duplicado.

7.7.5.1.7. Preparación de producto terminado control

Se pesó aproximadamente y con exactitud el equivalente a 25 mg de polvo de tabletas de Maleato de Trimebutina, se transfirieron a un matraz volumétrico de 50 mL. Se adicionaron 35 mL de diluyente y sometió a la acción de ultrasonido durante 30 minutos, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente, se aforo con diluyente y se homogenizo. Se tomaron 10 mL de la solución con una jeringa y se filtró con un acrodisco

de membrana de Nylon de 0.45 μm , desechando los primeros 5 mL y transfiriendo a su vial correspondiente. Este procedimiento se realizó por duplicado.

7.7.5.1.8. Preparación de producto terminado en condiciones alcalinas

Se pesó aproximadamente y con exactitud el equivalente a 25 mg de polvo de tabletas de Maleato de Trimebutina, se transfirieron a un matraz volumétrico de 50 mL. Se adicionaron 35 mL de diluyente y sometió a la acción de ultrasonido durante 30 minutos, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadió 1 mL de la solución de NaOH 1M, se dejó pasar 1 minuto para efectuar la reacción. Una vez transcurrido el minuto se neutralizó con 1 mL de la solución de HCl 1M, finalmente se aforo con diluyente y se homogenizo. Se tomaron 10 mL de la solución con una jeringa y se filtró con un acrodisco de membrana de Nylon de 0.45 μm , desechando los primeros 5 mL y transfiriendo a su vial correspondiente. Este procedimiento se realizó por duplicado.

7.7.5.1.9. Preparación de producto terminado en condiciones ácidas

Se pesó aproximadamente y con exactitud el equivalente a 25 mg de polvo de tabletas de Maleato de Trimebutina, se transfirieron a un matraz volumétrico de 50 mL. Se adicionaron 35 mL de diluyente y sometió a la acción de ultrasonido durante 30 minutos, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadió 1 mL de la solución de HCl 1M, se dejaron pasar 30 minutos para efectuar la reacción. Una vez transcurrido los 30 minutos se neutralizó con 1 mL de la solución de NaOH 1M, finalmente se aforo con diluyente y se homogenizo. Se tomaron 10 mL de la solución con una jeringa y se filtró con un acrodisco de membrana de Nylon de 0.45 μm ,

desechando los primeros 5 mL y transfiriendo a su vial correspondiente. Este procedimiento se realizó por duplicado.

7.7.5.1.10. Preparación de excipientes para ver la interferencia con el Maleato de Trimebutina sin hidrólisis

Se consideraron algunos excipientes para realizar una formula tentativa de las tabletas de Maleato de Trimebutina, ya que no se tiene la formulación correspondiente a las tabletas que se utilizaron para llevar a cabo el análisis, los excipientes que se utilizaron se muestran en la siguiente Tabla, al igual que el peso y diluciones correspondiente a cada excipiente. Cada procedimiento se realizó por duplicado.

Tabla 11. Diluciones de excipientes para su preparación correspondiente

Excipiente	Peso (mg)	Dilución (mL)	Alícuota	Dilución (mL)	Concentración (mg/mL)
Lactosa monohidratada	18	10	5	50	0.18
Almidón de maíz	7	20	5	50	0.035
Ácido tartárico	5	20	1	50	0.005
Estearato de magnesio	5	20	1	50	0.005
Gel de Sílice	5	10	1	50	0.01
Carboximetilalmidón sódico	5	10	1	50	0.01

7.7.5.1.11. Preparación de placebo control

Se pesó aproximadamente y con exactitud 22.29 mg de la preparación de placebo (mezcla de excipientes utilizados en la

formulación), se transfirieron a un matraz volumétrico de 50 mL. Se adicionaron 35 mL de diluyente, posteriormente se sometió a la acción de ultrasonido durante 30 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente, se aforo con diluyente y se homogenizo. Se tomaron 10 mL de la solución con una jeringa y se filtró con un acrodisco de membrana de Nylon de 0.45 μm , desechando los primeros 5 mL y transfiriendo a su vial correspondiente. Este procedimiento se realizó por duplicado.

7.7.5.1.12. Preparación de placebo en condiciones alcalinas

Se pesó aproximadamente y con exactitud 22.29 mg de la preparación de placebo (mezcla de excipientes utilizados en la formulación), se transfirieron a un matraz volumétrico de 50 mL. Se adicionaron 35 mL de diluyente, posteriormente se sometió a la acción de ultrasonido durante 30 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Después se añadió 1 mL de la solución de NaOH 1M, se dejó pasar 1 minuto para efectuar la reacción, una vez transcurrido el minuto se neutralizo con 1 mL de la solución de HCl 1M, finalmente se aforo con diluyente y se homogenizo. Se tomaron 10 mL de la solución con una jeringa y se filtró con un acrodisco de membrana de Nylon de 0.45 μm , desechando los primeros 5 mL y transfiriendo a su vial correspondiente. Este procedimiento se realizó por duplicado.

7.7.5.1.13. Preparación de placebo en condiciones ácidas

Se pesó aproximadamente y con exactitud 22.29 mg de la preparación de placebo (mezcla de excipientes utilizados en la formulación), se transfirieron a un matraz volumétrico de 50 mL. Se adicionaron 35 mL de diluyente, posteriormente se sometió a la acción de ultrasonido durante 30 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Después se añadió 1 mL de la

solución de HCl 1M, se dejaron pasar 30 minutos para efectuar la reacción, una vez transcurrido los 30 minutos se neutralizo con 1 mL de la solución de NaOH 1M, finalmente se aforo con diluyente y se homogenizo. Se tomaron 10 mL de la solución con una jeringa y se filtró con un acrodisco de membrana de Nylon de 0.45 μm , desechando los primeros 5 mL y transfiriendo a su vial correspondiente. Este procedimiento se realizó por duplicado.

Criterios de aceptación:

No debe haber interferencia alguna de las respuestas de excipientes y productos de gradación con la respuesta de la Trimebutina.

La pureza espectral de la Trimebutina debe ser ≥ 0.99 .

7.7.5.2. Linealidad del método

Se llevó a cabo por triplicado una curva para niveles de Valoración y para niveles de productos de degradación.

Linealidad para niveles de Valoración

Se abarcaron niveles del 60-120%, en cada uno de los niveles se pesó el peso correspondiente a cada nivel que indica la Tabla 12, así como el peso de la cantidad de placebo, ambas pesadas se adicionaron a un matraz de 50 mL, se añadieron 35 mL de diluyente, sometiendo a la acción de ultrasonido durante 30 minutos, después de este tiempo se dejó atemperar, se aforo con diluyente y se homogenizo. Se tomaron 10 mL de la solución con una jeringa y se filtró con un acrodisco de membrana de Nylon de 0.45 μm , desechando los primeros 5 mL y transfiriendo a su vial correspondiente. Esto se realizó con cada uno de los niveles.

Tabla 12. Curva de Maleato de Trimebutina para niveles de Valoración

Nivel (%)	Peso de muestra (mg)	Volumen (mL)	Cantidad de placebo (mg)	Concentración (mg/mL)
120	30	50	17.29	0.6
100	25	50	22.29	0.5
80	20	50	27.29	0.4
60	15	50	32.29	0.3

Linealidad para niveles de Productos de degradación

Se realizó una solución Stock en donde se pesaron aproximadamente y con exactitud 10 mg de Sustancia de referencia, los cuales se vertieron a un matraz volumétrico de 20 mL. De igual modo, se pesaron aproximadamente y con exactitud 37.29 mg de placebo, los cuales se adicionaron al matraz volumétrico de 20 mL, se adicionó diluyente para posteriormente someter a la acción de ultrasonido durante 30 minutos, después del tiempo transcurrido se terminó de aforar con diluyente y se homogenizo.

Esta solución Stock se realizó por triplicado y a partir de cada una de las soluciones se llevaron a cabo las diluciones pertinentes a cada nivel que se muestra en el siguiente Tabla.

Tabla 13. Curva de Maleato de Trimebutina para niveles de Productos de degradación

Nivel (%)	Stock	Cantidad de placebo (mg)	Alícuota (mL)	Dilución (mL)	Alícuota (mL)	Dilución (mL)	Concentración (mg/mL)
500	$\frac{10 \text{ mg}}{20 \text{ mL}}$	37.29	5	50	5	50	0.005
100					1	50	0.001
80					0.8	50	0.0008
60					0.6	50	0.0006
40					0.4	50	0.0004
20					0.2	50	0.0002
10					0.1	50	0.0001

Criterios de aceptación:

Coefficiente de determinación (r^2) ≥ 0.98

El Intervalo de confianza de la pendiente debe incluir la unidad

El Intervalo de confianza de la ordenada al origen debe incluir al cero

El $CV_{y/x}$ del porcentaje de recobro $\leq 2\%$ para el Maleato de Trimebutina

El $CV_{y/x}$ del porcentaje de recobro $\leq 5.7\%$ para Compuesto Relacionado

7.7.5.3. Exactitud del método

A partir de la preparación en la linealidad del método a niveles de Valoración, se preparó por sextuplicado el nivel del 100%, que corresponde a la concentración de 0.5 mg/mL, como se muestra en la Tabla 12.

Para el nivel de productos de degradación, de igual modo, se preparó por sextuplicado el nivel del 100% que corresponde a la concentración de 0.001 mg/mL, como se muestra en la Tabla 13.

Criterios de aceptación:

El porcentaje de recobro para la cuantificación de Valoración del Maleato de Trimebutina debe estar dentro del rango del 98-102%.

El coeficiente de variación (CV) para la Valoración del Maleato de Trimebutina es $\leq 2\%$

El porcentaje de recobro para la cuantificación de productos de degradación debe estar dentro del rango del 94.3-105.7% de la especificación.

El coeficiente de variación (CV) para productos de degradación es $\leq 5.7\%$

7.7.5.4. Precisión intermedia

Un analista preparó en días diferentes días por duplicado la preparación de Sustancia de Referencia que se indica en el numeral 7.7.2.8. Además de llevar a cabo la Adecuabilidad del sistema que se describe en el numeral 7.7.4.1.

El mismo analista preparó en días diferentes por triplicado la preparación de las muestras de tabletas que se describen en el numeral 7.7.2.9. Es importante mencionar, que se ocuparon dos marcas de tabletas diferentes con la misma preparación antes mencionada.

Un segundo analista realizó los procedimientos anteriores por triplicado en días distintos al primer analista.

Criterios de aceptación:

El coeficiente de variación (CV) Interdía es $\leq 2\%$.

El coeficiente de variación (CV) Interanalista es $\leq 2\%$.

El coeficiente de variación (CV) Total es $\leq 2\%$.

Criterios de aceptación para productos de degradación:

El coeficiente de variación (CV) Interdía es $\leq 5.7\%$.

El coeficiente de variación (CV) Interanalista es $\leq 5.7\%$.

El coeficiente de variación (CV) Total es $\leq 5.7\%$.

7.7.5.5. Límite de cuantificación

A partir de la linealidad del sistema de niveles de productos de degradación (niveles del 10-120%), se calculó el límite de cuantificación con la siguiente fórmula:

$$LC = \frac{10 * S}{b}$$

Donde:

LC= Límite de cuantificación

S=Desviación estándar de la respuesta

b= Pendiente de la curva de concentración vs respuesta

Criterios de aceptación:

El coeficiente de variación (CV) es $\leq 5.7\%$

La señal ruido debe ser >10

7.7.5.6. Límite de detección

Al igual que en el límite de cuantificación, a partir de la linealidad del sistema de los niveles de productos de degradación se calculó el límite de cuantificación con la siguiente formula:

$$LD = \frac{3.3 * S}{b}$$

Donde:

LD= Límite de detección

S= Desviación estándar de la respuesta

b= Pendiente de la curva concentración vs respuesta

Criterios de aceptación:

El coeficiente de variación (CV) es $\leq 5.7\%$

La señal ruido debe ser >3

7.7.5.7. Tolerancia

Se llevó a cabo la prueba de Tolerancia haciendo uso de las condiciones cromatográficas que se encuentran en el siguiente Tabla.

Tabla 14. Condiciones cromatográficas para la prueba de Tolerancia

Condición Cromatográfica	Condición inicial	Cambio de condición
Columna	LUNA C18 150x4.6 mm, 5 μ m	ZORBAX C18 150x4.6mm, 5 μ m
Equipo	Cromatógrafo de líquidos HPLC, marca Hitachi Primaide, detector UV-Vis y con Arreglo de Diodos	Cromatógrafo de líquidos HPLC, marca Hitachi, detector UV-Vis

Cada condición cromatográfica se realizó de manera independiente, por lo cual se llevó a cabo la prueba de Adecuabilidad del sistema descrita en

el apartado 7.7.4.1. Tras verificar el cumplimiento de la confrontación de estándares para esta prueba, se preparó por triplicado la preparación de la muestra descrita en el apartado 7.7.2.9. Para ello, se tomaron 10 mL de cada solución con una jeringa, se filtraron con un acrodisco de membrana de Nylon de 0.45 μm , desechando los primeros 5 mL, y luego se transfirió a su vial correspondiente.

Criterios de aceptación:

El coeficiente de variación (CV) es $\leq 2\%$.

El % de contenido de las muestras debe encontrarse entre 90% y no más del 110%.

El coeficiente de variación (CV) para productos de degradación es $\leq 5.7\%$.

El % de contenido para productos de degradación debe ser mayor a 0.05%, pero menor a 0.2%.

7.7.5.8. Estabilidad de la muestra

Se prepararon soluciones de Sustancia de referencia y producto terminado de Maleato de Trimebutina para posteriormente inyectarse en el Cromatógrafo de Líquidos a las 24 horas después de su preparación, como se indica en la siguiente Tabla.

Tabla 15. Condiciones para estabilidad de la muestra

Muestra	Tiempo (h)	Nº de lecturas	Condición
Sustancia de referencia	0	3 lecturas	-
	24	3 lecturas	Temperatura ambiente y Refrigeración
Producto terminado	0	3 lecturas	-
	24	3 lecturas	Temperatura ambiente y Refrigeración

Para la preparación de la Sustancia de Referencia se llevó a cabo el procedimiento que se indica en el apartado 7.7.2.8. y posteriormente realizar la prueba de Adecuabilidad del sistema que se encuentra en el numeral 7.7.4.1.

En el caso del producto terminado, se llevó a cabo la preparación de las muestras por triplicado como se indica en el numeral 7.7.2.9.

Criterios de aceptación:

La Confrontación de estándares de la Sref debe estar entre 98-102%.

La Diferencia porcentual absoluta (DI) <2%.

El % de contenido de la muestra deber ser entre 90% y no más del 110%.

8. Resultados y Discusión

8.1. Adecuabilidad del Sistema

Para asegurar el correcto funcionamiento del sistema y que los resultados cumplieran con los criterios de aceptación establecidos, se llevó a cabo la Adecuabilidad del Sistema, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 16. Datos de la Sustancia de Referencia 1 de Maleato de Trimebutina

Datos de Sustancia de Referencia 1			
No. Muestra	ABC	Simetría	Platos teóricos
1	81554836	0.92632	13134
2	81748463	0.92556	13082
3	81997120	0.92646	13092
4	81817963	0.94083	13278
5	81958643	0.92332	13187
6	82028162	0.93612	13307

Promedio	81850864.5	0.9298	13180
DE	180910.32		
CV	0.22		

Tabla 17. Datos de Sustancia de Referencia 2 de Maleato de Trimebutina

Datos de Sustancia de Referencia 1			
No. Muestra	ABC	Simetría	Platos teóricos
1	82670700	0.93596	13099
2	82723218	0.92143	13185
3	82837705	0.93605	13237
Promedio	82743874.3	0.9311	13173.67
DE	85397.19		
CV	0.10		

Confrontación de estándares
101.13 %

Los resultados obtenidos muestran que el Coeficiente de Variación de las áreas bajo la curva de Sref1 y Sref2 es inferior al 2%. Asimismo, la confrontación de los estándares se encuentra dentro del criterio de aceptación, que oscila entre el 98.0% y el 102.0%, además, se observa una simetría cercana a 1 y con más de 2000 platos teóricos. Estos parámetros indican que el sistema es confiable.

8.2. Especificidad del Método

Para la especificidad, se busca garantizar que la respuesta obtenida del principio activo provenga exclusivamente del componente de interés, sin interferencias de otros componentes como, excipientes, productos de

degradación, entre otros ²⁶. Es fundamental asegurar que las señales provenientes de las inyecciones del blanco, producto terminado y materia prima no interfiere en la cuantificación de la Trimebutina. En el análisis bajo condiciones de estrés, los cromatogramas correspondientes a la degradación ácida y alcalina, mostrados en la Figura 5 y Figura 6 respectivamente, indican que no se observan respuestas que puedan interferir, esto confirma que el diluyente, tanto en condiciones normales como de estrés, no presenta interferencia con la respuesta de Trimebutina.

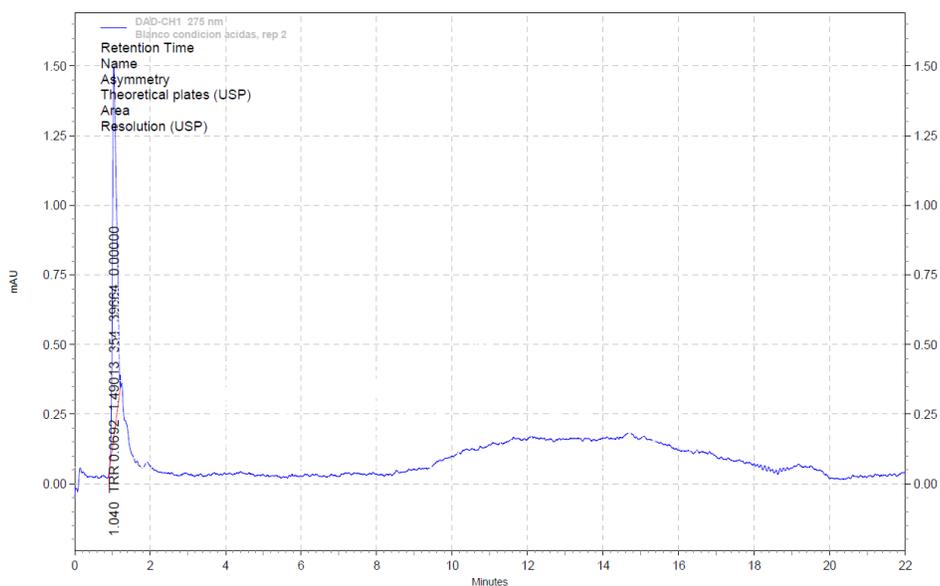


Figura 5. Blanco de degradación en condiciones ácidas

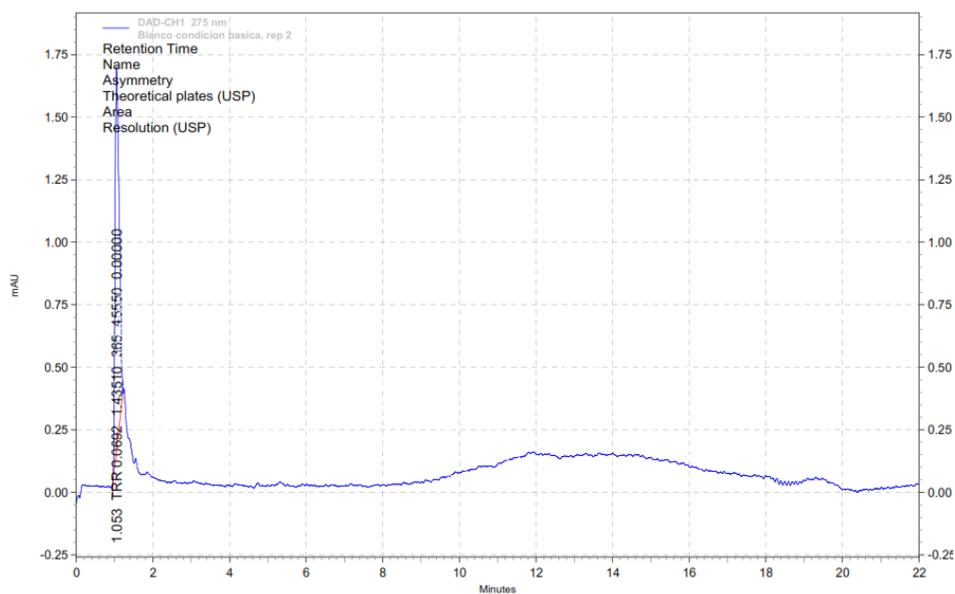


Figura 6. Blanco de degradación en condiciones alcalinas

Posterior a los análisis de los blancos, se realizó la evaluación de materia prima. En primer lugar, se evaluó el umbral de pureza espectral, de la materia prima en comparación con la Sustancia de Referencia de Trimebutina, obteniéndose el espectro mostrado en la figura 7. Los resultados indicaron que la materia es equivalente en pureza a la Sustancia de referencia, corroborado por el Índice de Similitud (SI), que tuvo un valor de 1.

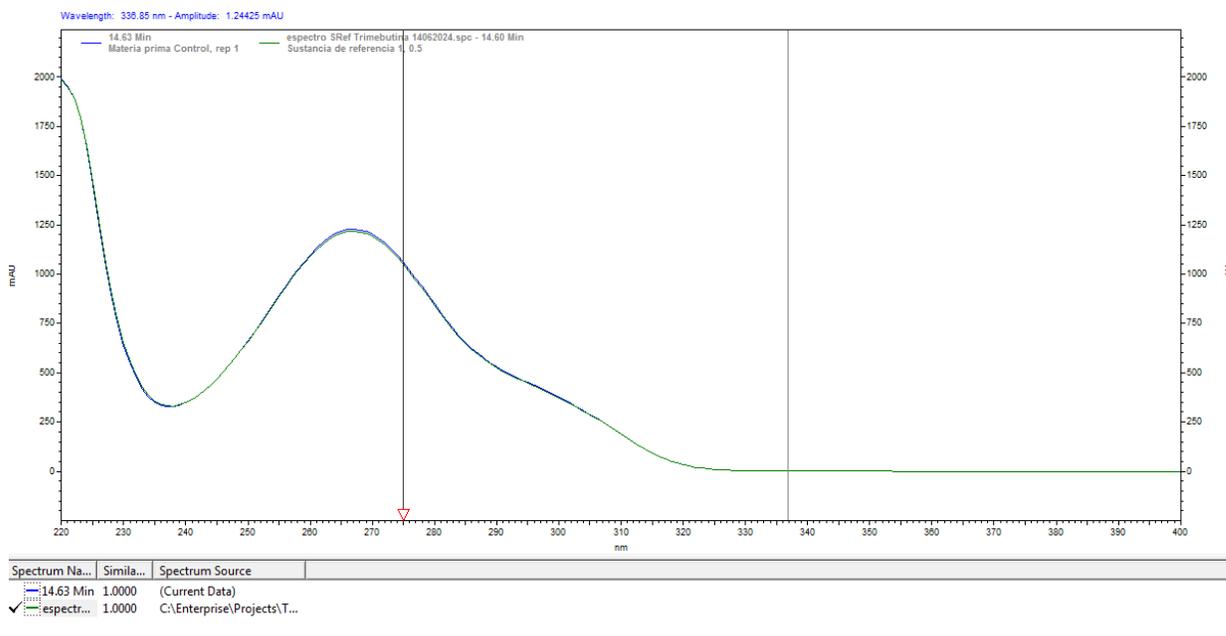


Figura 7. Comparación de materia prima con Sref. El espectro de color azul corresponde a la materia prima y el espectro verde a la Sustancia de Referencia

Dicho lo anterior, se cuantificó el porcentaje de contenido para determinar la cantidad recuperada del principio activo, evaluando así la degradación que había presentado la Trimebutina, considerando que la degradación no debe superar el 25% del principio activo ²⁷. No obstante, se observó que la hidrólisis básica provoca una degradación mayor, resultando un porcentaje de contenido de aproximadamente 77%-78%. En contraste, la hidrólisis ácida mostró un porcentaje de contenido de entre 84% y 85%, lo cual se explica porque la Trimebutina, al ser una molécula de carácter ácido y que posee un grupo funcional éster, es más susceptible a la hidrólisis básica, que constituye su principal ruta de degradación. Los porcentajes obtenidos confirman esta susceptibilidad.

En cuanto a las señales identificadas como TRR (Tiempo de Retención Relativa), se calculó su porcentaje de contenido para determinar cuáles podrían ser productos de degradación. De acuerdo con la guía ICH Q3, la dosis máxima diaria del Maleato de Trimebutina equivale a 600 mg. En cuanto al límite de identificación de productos de degradación, se establece que el valor máximo permitido de 0.2%, mientras que el mínimo aceptable debe ser mayor a 0.05% ²⁸. En el análisis de la materia prima, la única señal con un porcentaje de contenido de 0.1% fue el TRR 0.15, como se muestra en las figuras 8 y 10 para la degradación ácida y alcalina, respectivamente. Por lo tanto, esta señal se considera un posible producto de degradación.

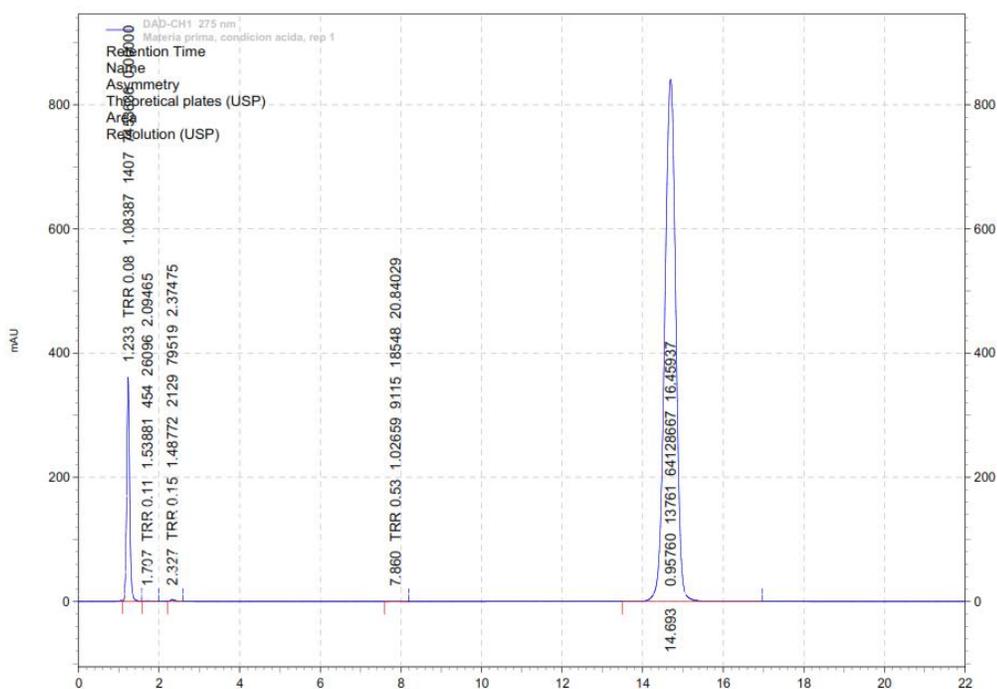


Figura 8. Degradación de materia prima en condiciones ácidas

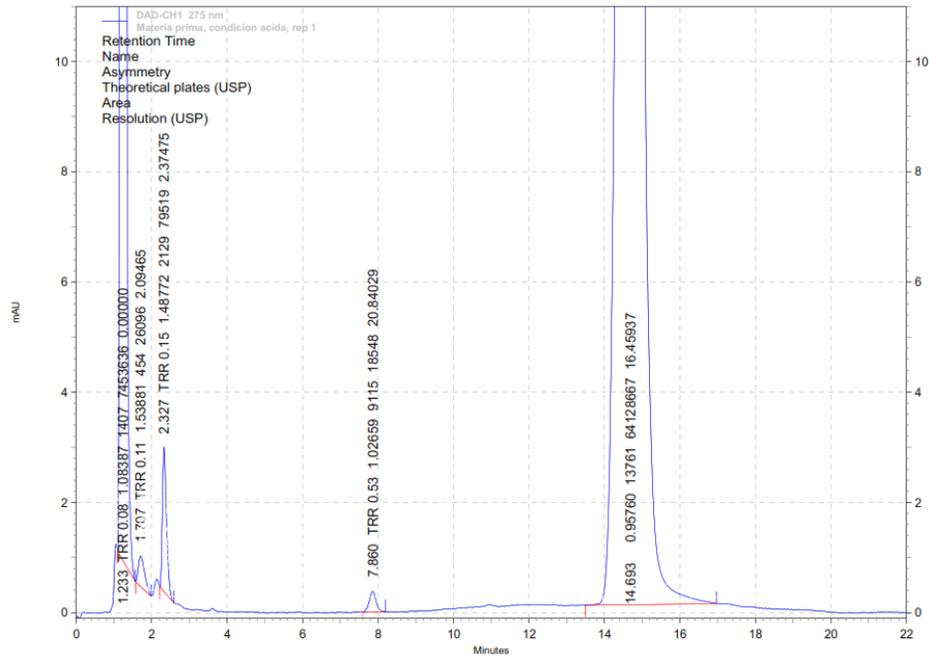


Figura 9. Aumento de cromatograma de degradación de materia prima en condiciones ácidas

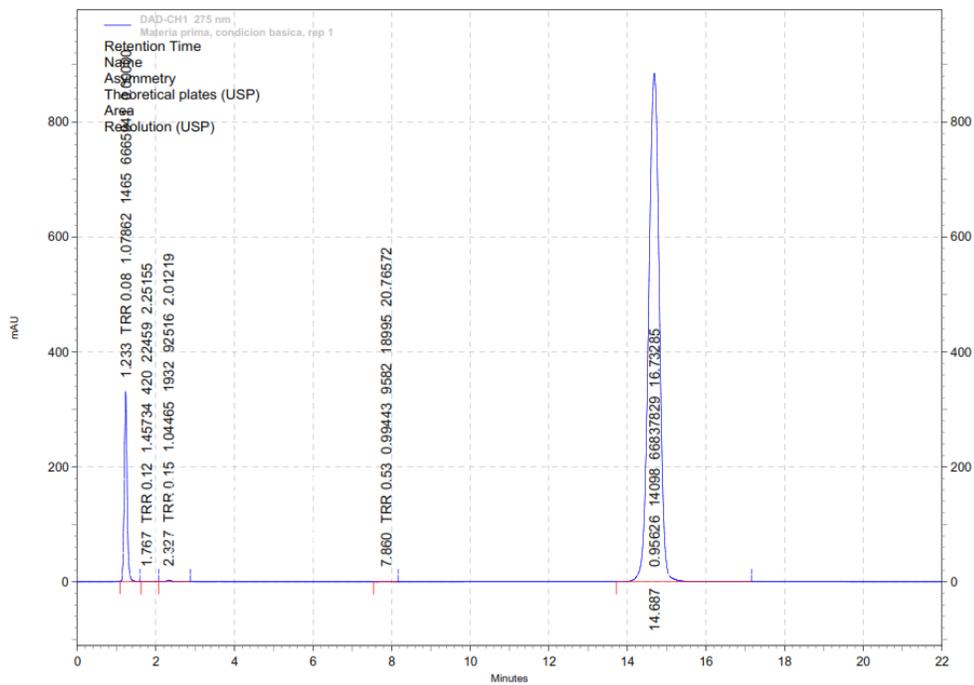


Figura 10. Degradación de materia en condiciones alcalinas

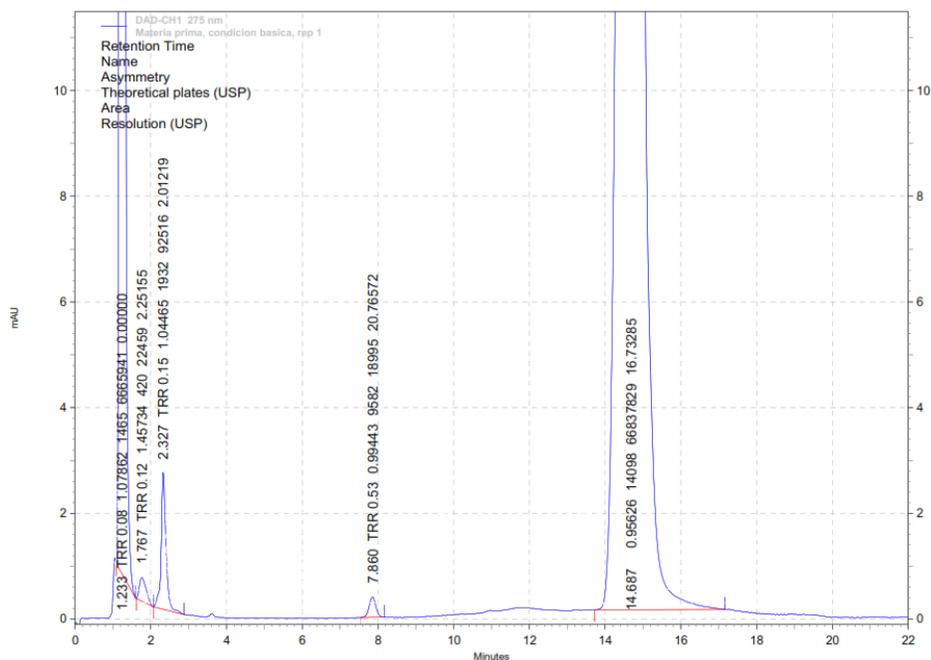


Figura 11. Aumento de cromatograma de degradación de materia prima en condiciones alcalinas

Además de las muestras previamente mencionadas, se realizó el análisis de seis excipientes que se consideraron como una fórmula tentativa del Maleato de Trimebutina, debido a que no se disponía de la fórmula exacta de las tabletas utilizadas en el análisis. El principal motivo para examinar estos excipientes fue determinar si había alguna interferencia con la Trimebutina, habiendo descartado previamente posibles interferencias con el blanco y materia prima. En el cromatograma siguiente se pueden observar los excipientes analizados.

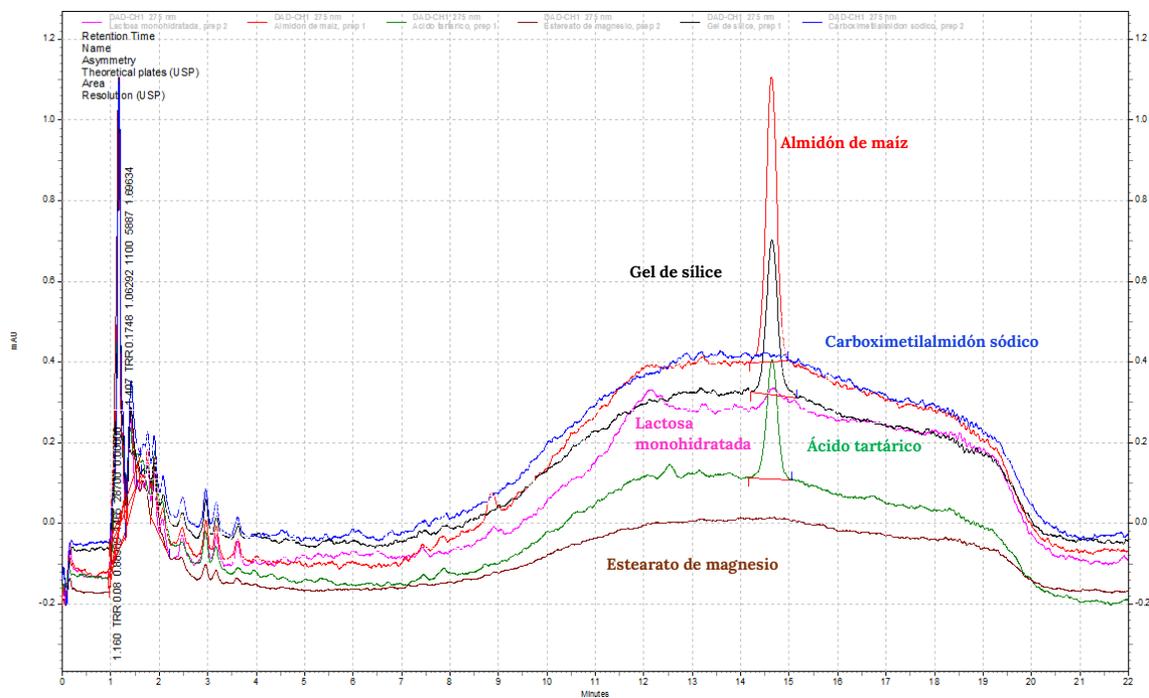


Figura 12. Cromatogramas de excipientes

Como se puede observar tres de los excipientes (almidón de maíz, gel de sílice y ácido tartárico) presentan una respuesta en el mismo tiempo de retención que la Trimebutina. Se procedió a calcular el porcentaje de contenido de cada uno, obtenido aproximadamente 0.001% para el almidón de maíz, 0.00001% para el ácido tartárico y 0.00004% para el gel de sílice. Dado que estos valores están por debajo del 1%, se consideran no significativos, y no afectan la cuantificación de Trimebutina. No obstante, se utilizó el detector PDA (Detector de Arreglo de Diodos) para evaluar la similitud de estas respuestas en comparación con la Sustancia de Referencia de Trimebutina y descartar posibles contaminaciones. Al realizar esta comparación, como se muestra en la figura 14, se observó que las señales en el espectro no son similares, lo cual confirma con un índice de similitud de -0.0382 , un valor alejado de 1.00, indicando que no hay coincidencia con la Sustancia de Referencia. Lo mismo ocurre con los otros

excipientes mostrados en las Figuras 14 y 15, ya que ambos presentan índices de similitud muy alejados de 1.00 y sus espectros tampoco coinciden.

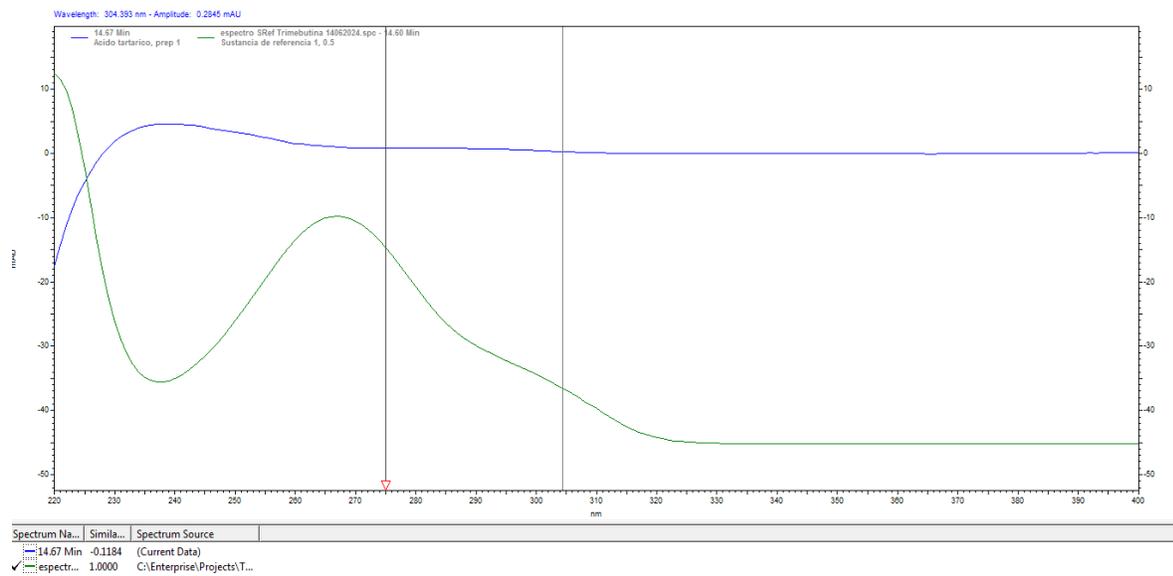


Figura 13. Comparación de Sref con Almidón de maíz. El espectro de color azul corresponde al almidón de maíz y el espectro verde a la Sustancia de Referencia.

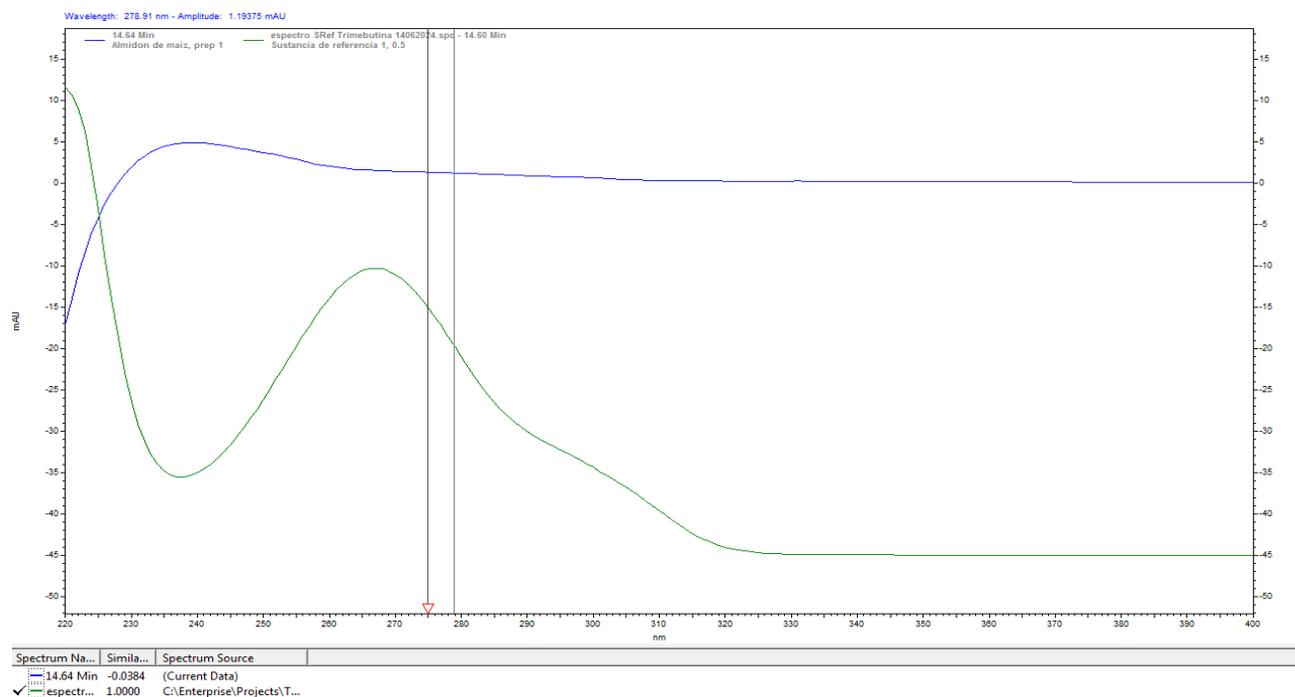


Figura 14. Comparación de Sref con Ácido tartárico. El espectro de color azul corresponde al ácido tartárico y el espectro verde a la Sustancia de Referencia.

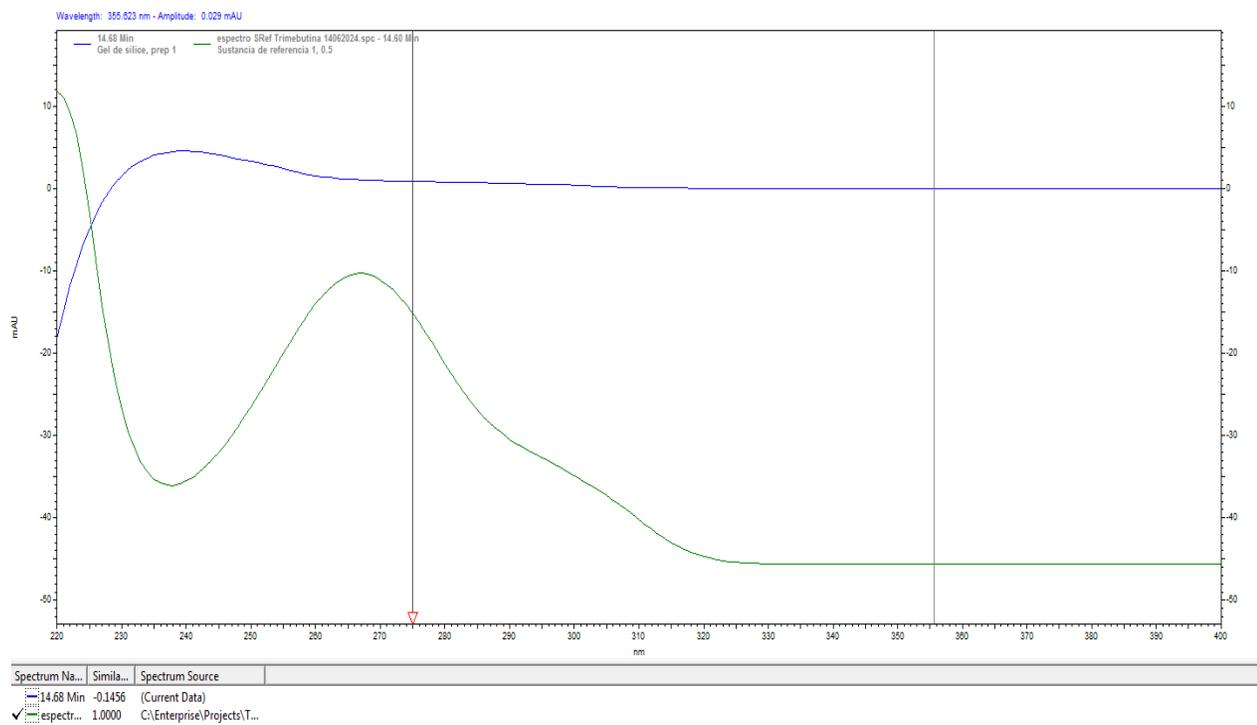


Figura 15. Comparación de Sref con gel de sílice. El espectro de color azul corresponde a la Gel de Sílice y el espectro verde a la Sustancia de Referencia.

Dado que no hubo interferencia por parte de los excipientes y no afectaron la cuantificación de Trimebutina, se procedió a analizar el placebo bajo condiciones de hidrólisis ácida (Figura 16) y alcalina (Figura 17). En ambos casos, no se observaron respuestas adicionales en los cromatogramas, lo que confirma que no se tendría interferencia en la cuantificación de la Trimebutina, puesto que este placebo se utilizará en pruebas posteriores.

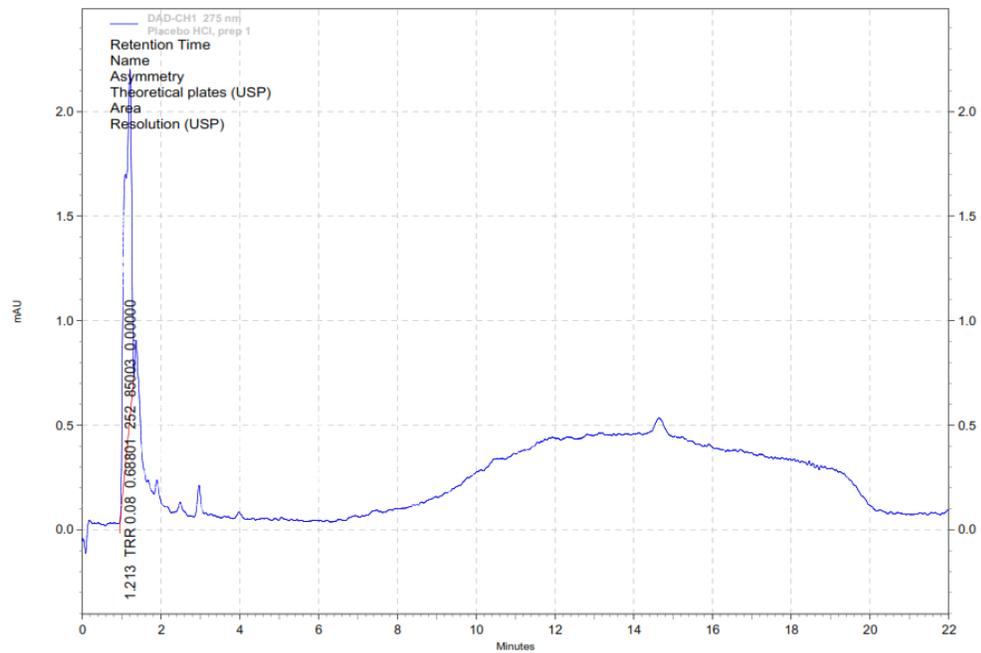


Figura 16. Placebo en degradación ácida

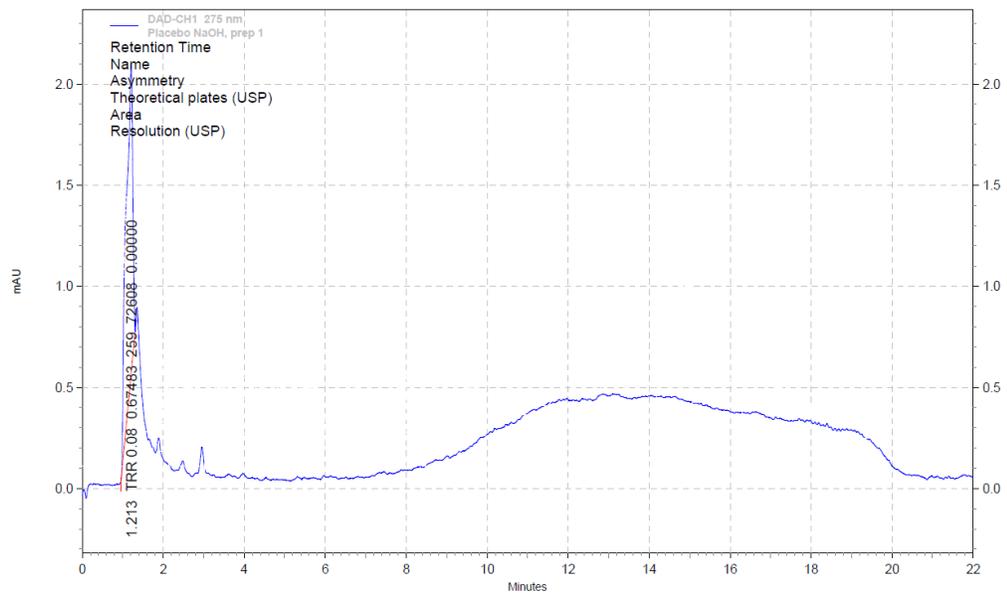


Figura 17. Placebo en degradación alcalina

Para la evaluación del producto terminado, se determinó el umbral de pureza espectral comparándolo con la Sustancia de Referencia de Trimebutina, tal como se realizó con el análisis de materia prima. El espectro que se obtuvo,

representado en la figura 18, mostró que el producto terminado presenta una pureza equivalente a la de la Sustancia de Referencia, con un índice de similitud de 0.9995.

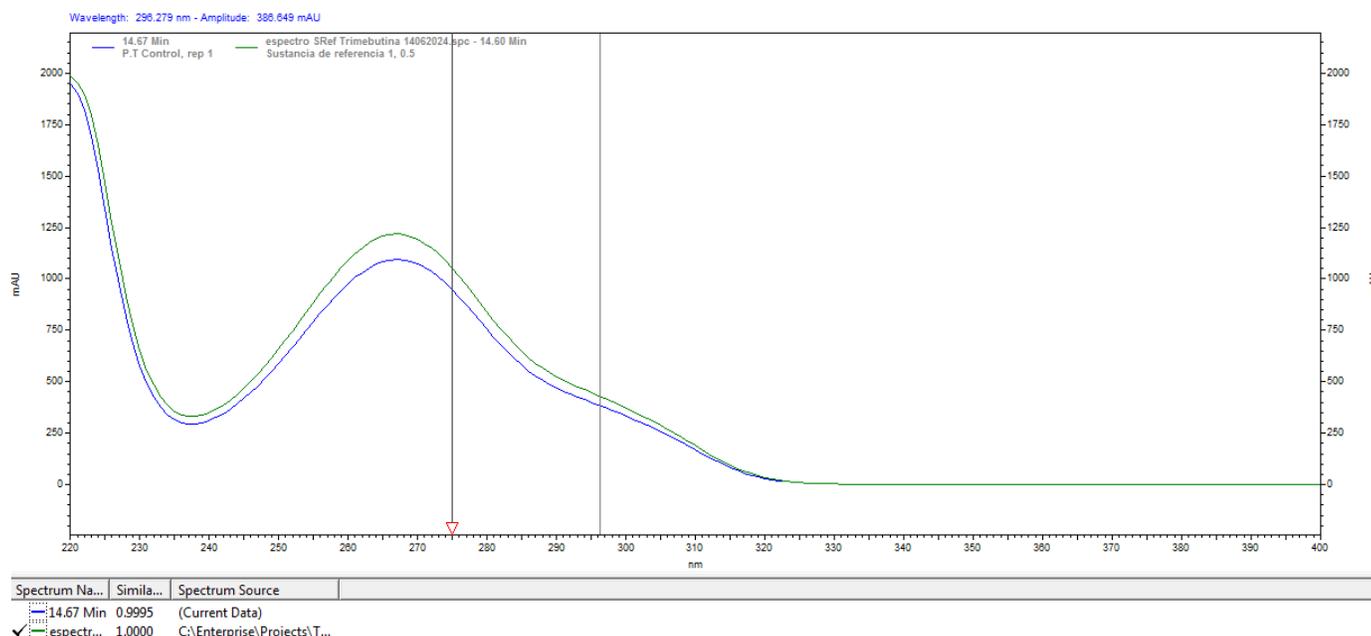


Figura 18. Comparación de Sref con Producto Terminado. El espectro de color azul corresponde al producto terminado y el espectro verde a la Sustancia de Referencia.

Teniendo en cuenta lo anterior, se calcularon los porcentajes de contenido, encontrando que la hidrólisis alcalina resultó en un porcentaje menor, alrededor de 72%, mientras que en la hidrólisis ácida presentó un porcentaje entre 76-77%. Al comparar estos porcentajes con los de la materia prima, se observa que en el producto terminado se recupera una menor cantidad de Trimebutina. Esto probablemente se deba al equilibrio químico que se está llevando a cabo, ya que la hidrólisis de ésteres es una reacción reversible que establece un equilibrio entre el éster y sus productos, incluso con la neutralización realizada, es posible que la posición del equilibrio se vea afectada, sin detener completamente la reacción; además, la presencia de un exceso de agua puede desplazar el equilibrio hacia los productos, mientras que

las interacciones con los excipientes también podrían influir en la continuidad de la reacción.²⁹

Es importante mencionar que las tabletas de Maleato de Trimebutina utilizadas en la prueba de especificidad y pruebas subsecuentes fueron sometidas a estabilidad acelerada, lo cual se considera un factor relevante para el bajo porcentaje de contenido obtenido. Sin embargo, la degradación del principio activo no supera el 25%, excepto en el caso de la hidrólisis básica, como se mencionó anteriormente.

En cuanto a las nuevas señales observadas en los cromatogramas de degradación del producto terminado, se calcularon los porcentajes de contenido de cada una. En el cromatograma bajo condiciones alcalinas mostrado en la Figura 19, se identificó el TRR 0.53 con un porcentaje de contenido del 0.05% y el TRR 0.87 con un 0.2%, además del TRR 0.15 que ya se había detectado en el análisis de la materia prima. Estas señales son consideradas productos de degradación, y en el cromatograma de la Figura 20 se muestra un aumento en la altura del cromatograma para mejorar la visibilidad de estas respuestas.

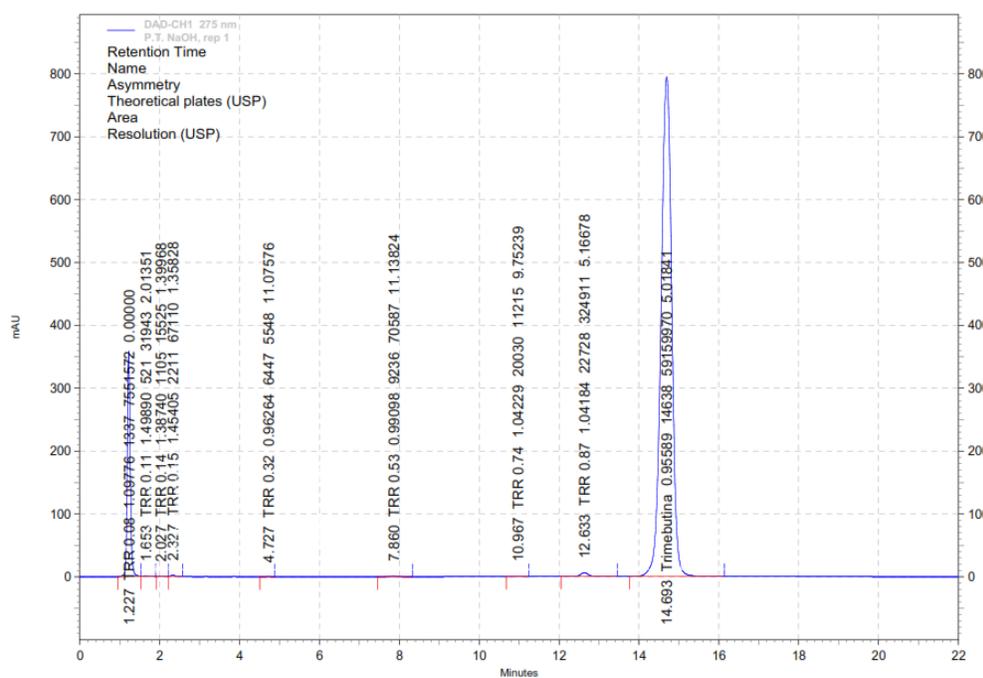


Figura 19. Degradación de producto terminado en condiciones alcalinas

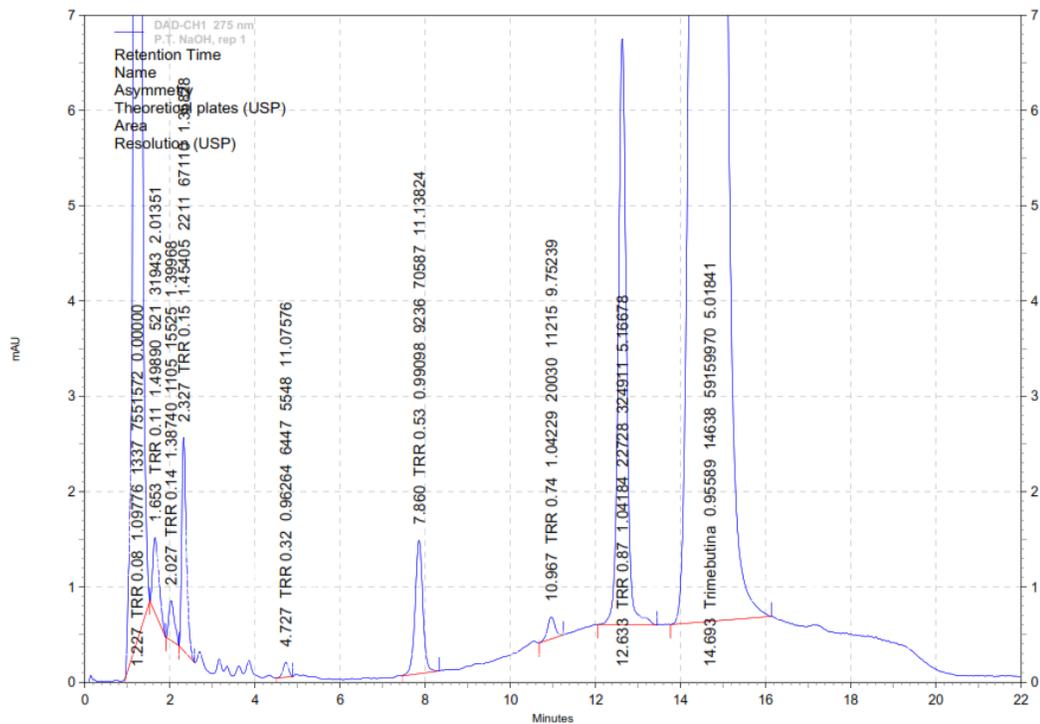


Figura 20. Aumento de cromatograma de degradación de producto terminado en condiciones alcalinas

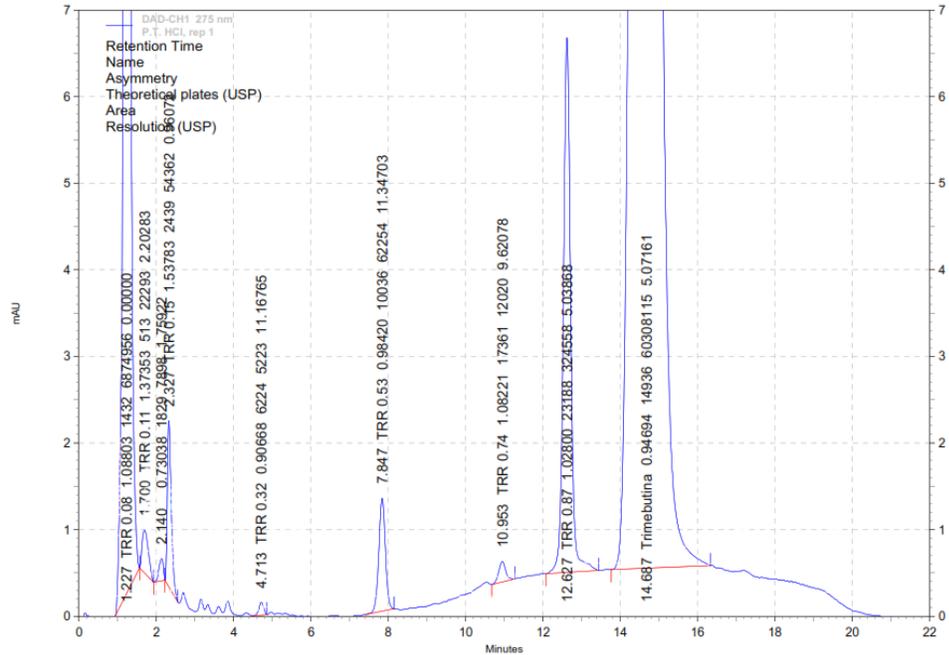


Figura 22. Aumento de cromatograma de degradación de producto terminado en condiciones ácidas

Como parte de la prueba de especificidad, se realizó el análisis de una mezcla de productos de degradación farmacopéicas (system impurity code y0001260), obteniéndose el cromatograma que se muestra a continuación.

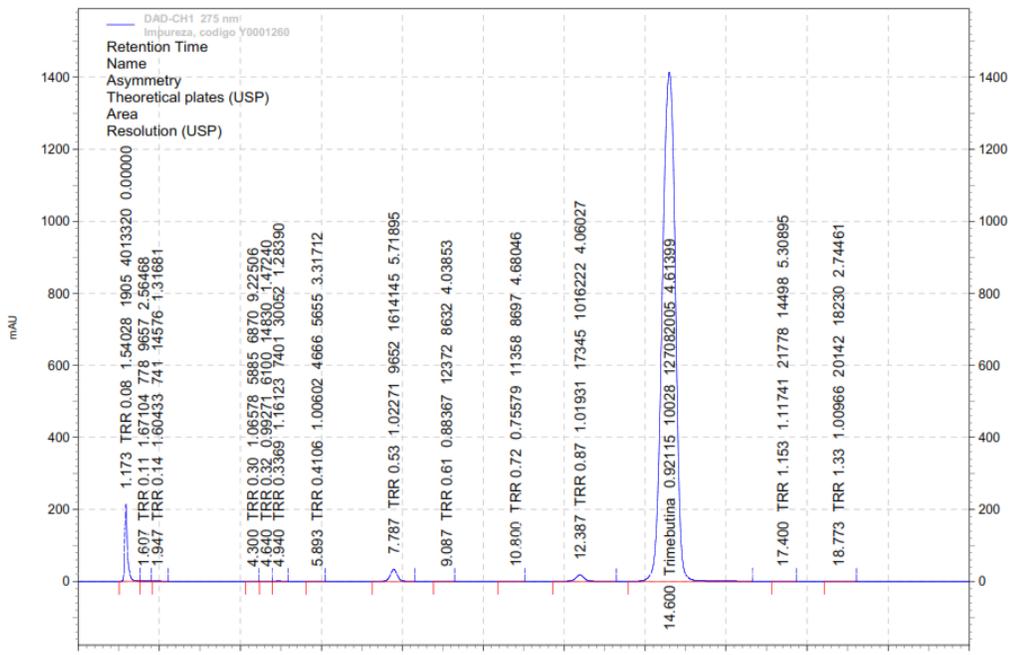


Figura 23. Impureza con código y0001260

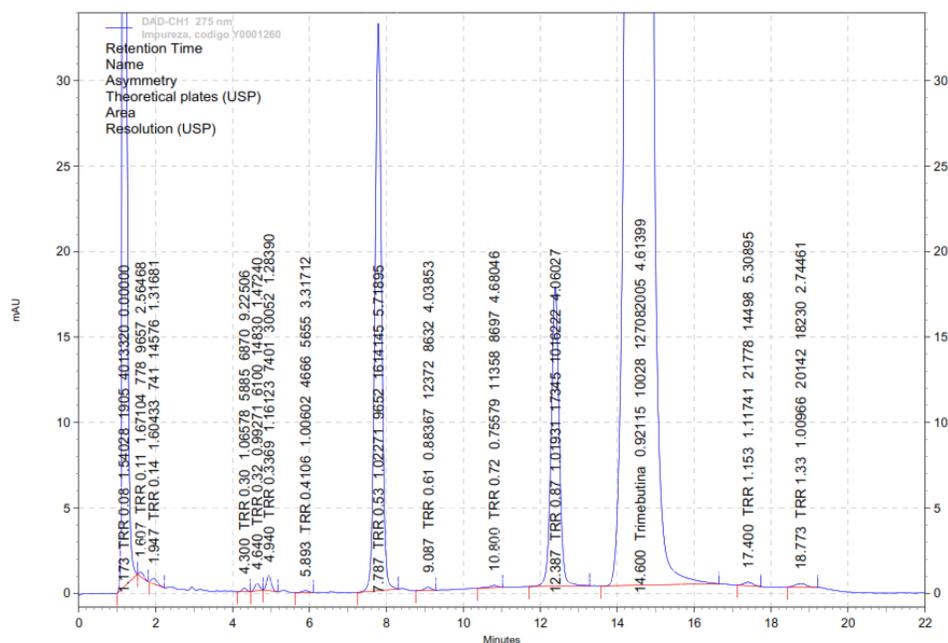


Figura 24. Aumento de cromatograma de impureza con código y0001260

Como se puede ver en el cromatograma anterior, hay señales que ya fueron identificadas durante la cuantificación de producto terminado, por lo cual ya tienen un TRR definido. Sin embargo, los picos con TRR 0.53 y TRR 0.87, previamente identificados como productos de degradación, muestran mayor altura en este cromatograma de productos de degradación, lo cual se aprecia mejor en el cromatograma de la Figura 24. Para corroborar que estas señales coincidieran con los TRR que se habían identificado anteriormente en los cromatogramas de producto terminado, se utilizó el detector PDA y se compararon los espectros para evaluar el índice de similitud. En la Figura 25, al comparar ambas señales, se obtuvo un índice de similitud de 0.8842, inferior a 0.99, lo que indica que los espectros no son similares. De igual modo, el espectro mostrado en la Figura 26 presenta un índice de similitud de 0.8340, lo que también señala la falta de similitud entre los espectros. Esto confirma que los TRR identificados desde el análisis de producto terminado corresponden a

productos de degradación y no a productos de degradación, como las contenidas en el sistema (impurity code y0001260) que se analizó.

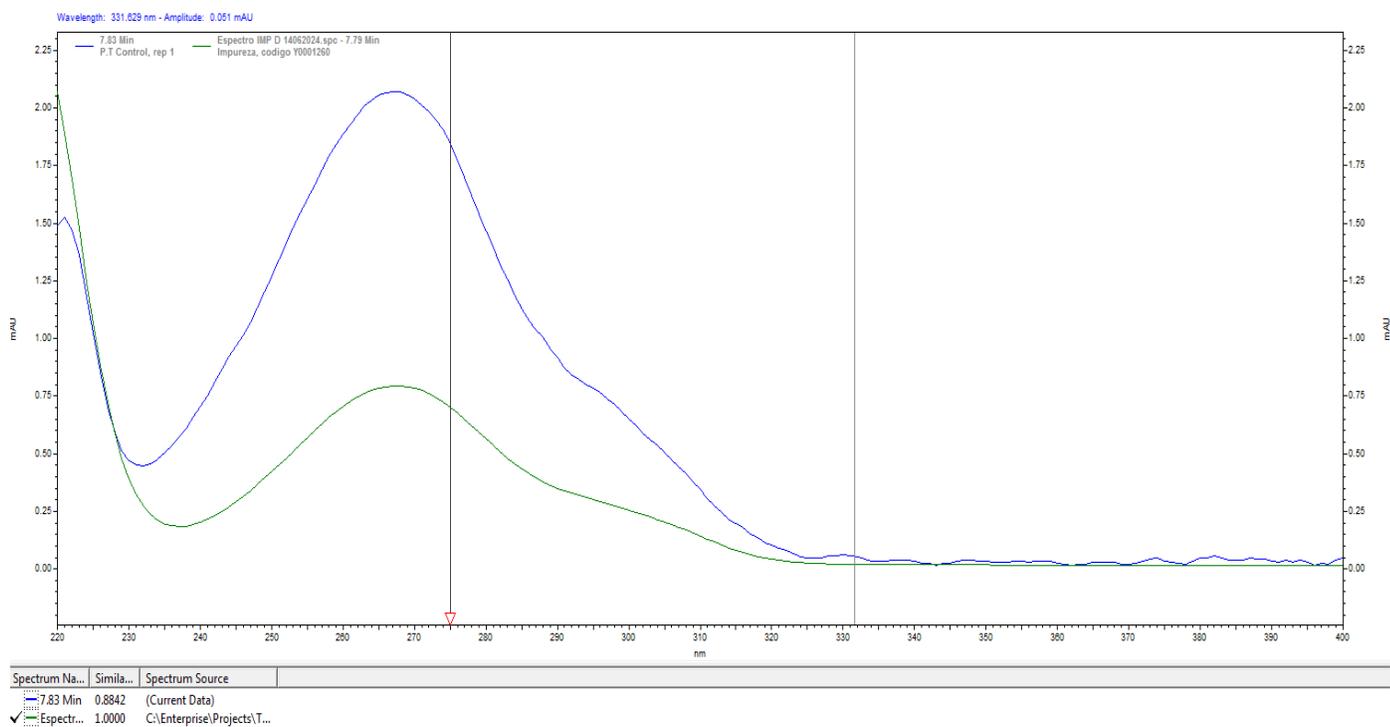


Figura 25. Comparación de espectros. El espectro azul corresponde al TRR 0.53 de producto terminado y el espectro verde al TRR 0.53 de la impureza con código y0001260.

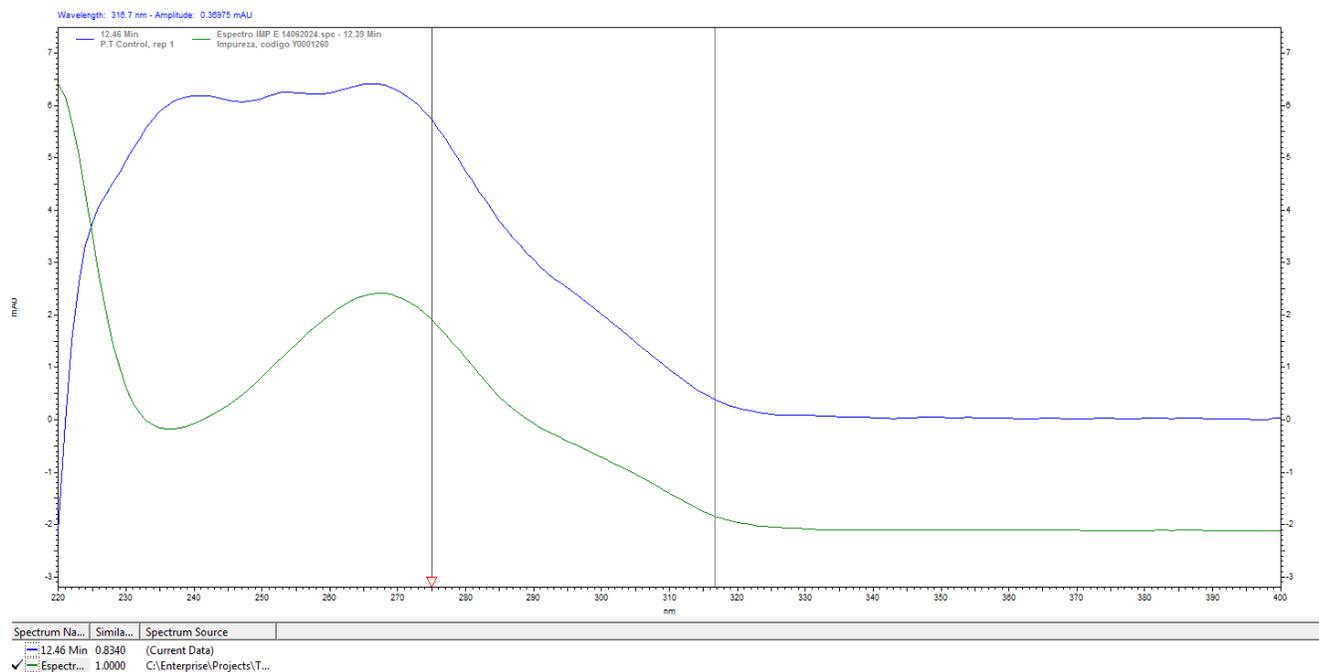


Figura 26. Comparación de espectros. El espectro azul corresponde al TRR 0.87 de producto terminado y el espectro verde al TRR 0.87 de la impureza con código y0001260.

Debido a estos resultados, fue necesario comparar con el Compuesto Relacionado C (methyl 3,4,5-trimethoxybenzoate), una impureza identificada durante las pruebas del desarrollo del método analítico, que se identificó como una impureza del Maleato de Trimebutina. Este compuesto no cumple con el criterio para ser considerado un producto de degradación, ya que en los análisis realizados su porcentaje de contenido es inferior a 0.05%. Además, su porcentaje de contenido no aumenta a lo largo del tiempo, ni se observa un incremento en la señal bajo condiciones de estrés. En el cromatograma siguiente se muestra la respuesta correspondiente al Compuesto Relacionado C.

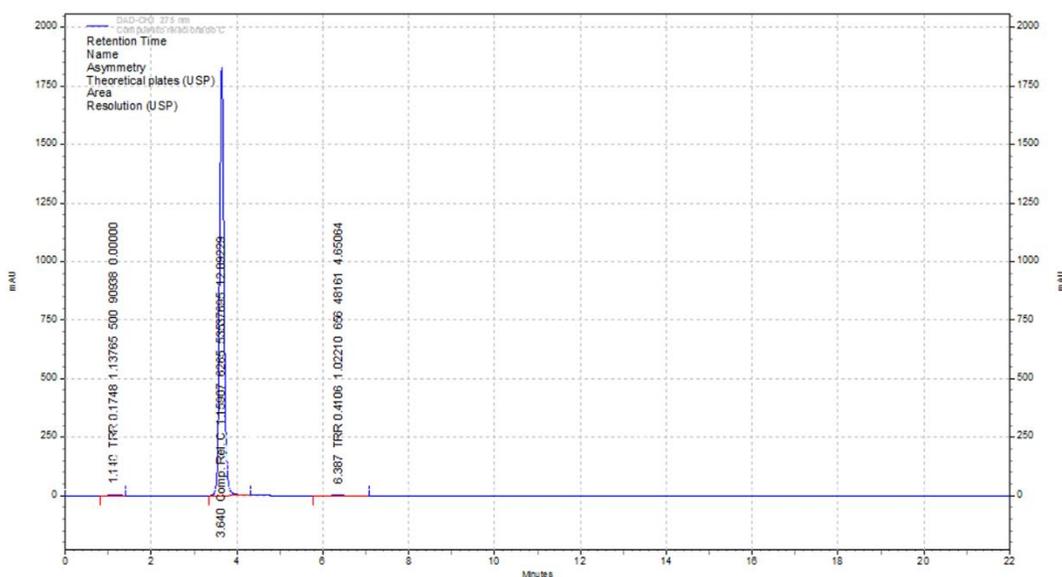


Figura 27. Cromatograma del Compuesto Relacionado C

Se procedió a comparar las señales obtenidas de la Impureza con código y0001260. En el espectro de la Figura 28 el índice de similitud es de 0.9825, lo cual indica que son similares, sin embargo, se tiene una diferencia espectral de 2%, la cual no se encuentra dentro de especificación.

Por otro lado, en la Figura 29 el índice de similitud es de 0.9979, un valor muy cercano a 1.00, lo cual indica que los espectros son altamente similares. A pesar de que los tiempos de retención no coinciden, esta similitud posiblemente se debe a la detección del enantiómero correspondiente a la impureza, dado al arreglo estructural de la impureza¹. Sin embargo, no es posible identificar con precisión a cuál impureza específica pertenece el enantiómero, dado que no se dispone de las impurezas individuales para un análisis detallado.

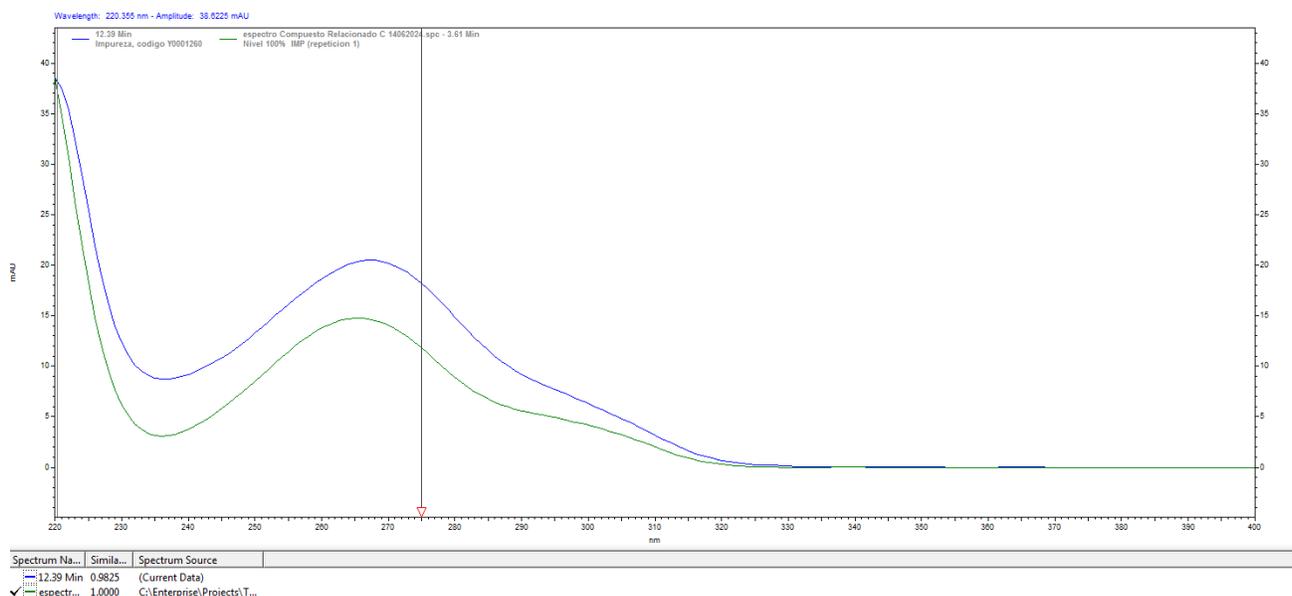


Figura 28. Comparación de espectros. El espectro azul corresponde al TRR 0.87 de la Impureza con código y0001260 y el espectro verde al Compuesto Relacionado C.

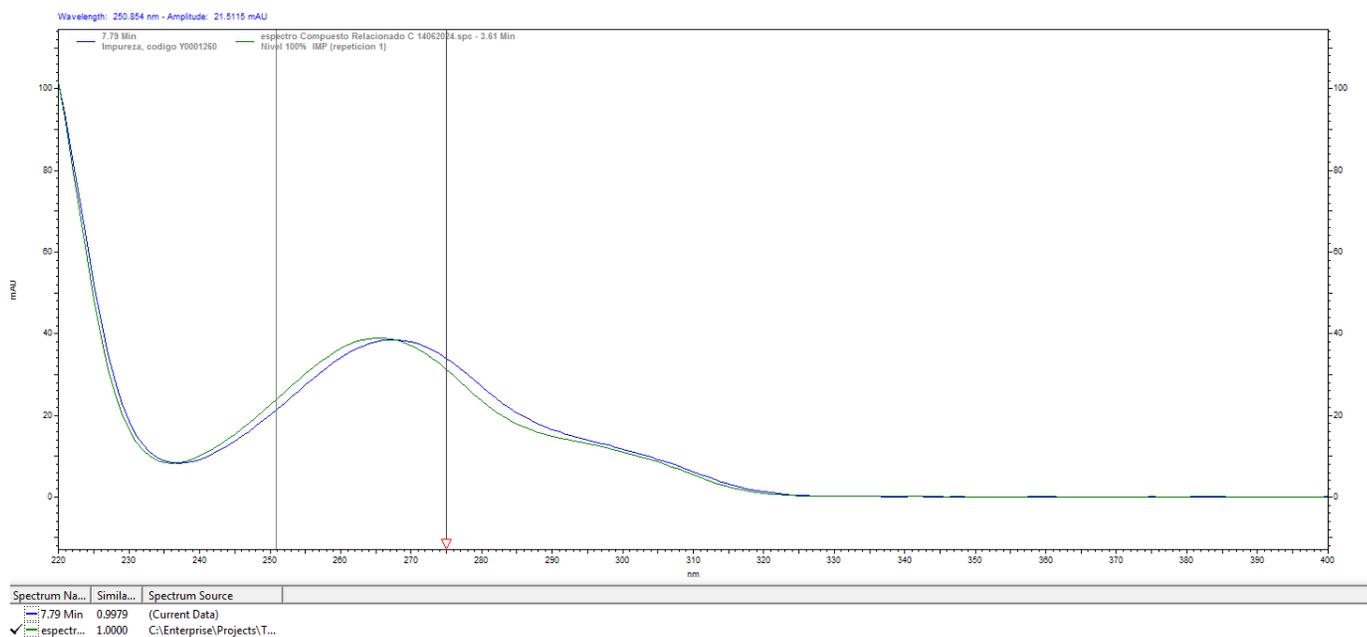


Figura 29. Comparación de espectros. El espectro azul corresponde al TRR 0.53 de la Impureza con código y0001260 y el espectro verde al Compuesto Relacionado C.

8.3. Linealidad del Sistema

Linealidad del Sistema Niveles de Valoración

De acuerdo con la linealidad del sistema que se realizó por triplicado de los niveles del 10-120%, se obtuvieron los datos que se muestran a continuación.

Tabla 18. Datos de Linealidad del Sistema de Maleato de Trimebutina para niveles de Valoración

Nivel (%)	Concentración (mg/mL)	ABC	Promedio	DE	CV
10	0.05	8402834 8610480 8503611	8505641.7	103838	1.22
20	0.1	16893932 16899652 17141311	16978298	141202	0.83
40	0.2	34303481 34307778 34919062	34510107	354172	1.03
60	0.3	51785063 51862491 51715528	51787694	73516.8	0.14
80	0.4	69218129 69050207 69499620	69255985	227086	0.33
100	0.5	85665686 85005180 85472448	85381105	339595	0.40
120	0.6	103319927 102208085 102874209	102800740	559550	0.54

Tabla 19. Criterios de aceptación de Linealidad del Sistema de niveles de Valoración

Parámetro	Respuesta
m (b1)	171423051
b (b0)	83756.9881
r²	0.9998
IC inferior	170403057
IC superior	172443045

De acuerdo con los datos obtenidos se tiene un coeficiente de determinación (r^2) mayor a 0.98, la pendiente es diferente de cero y los intervalos de confianza no incluyen el cero, es decir, incluye el valor de la pendiente, por lo tanto, existe una relación lineal. Lo cual se puede observar en la siguiente gráfica, donde se graficó la concentración respecto a las áreas bajo la curva de cada nivel.

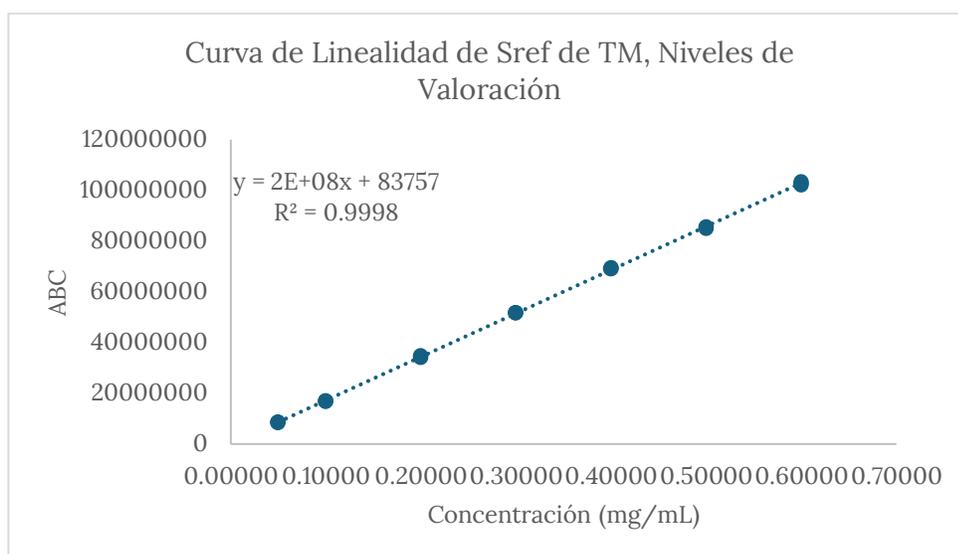


Figura 30. Linealidad del Sistema con Sref a niveles de Valoración.

Finalmente, en la siguiente imagen se muestran los niveles de una de las curvas que se realizó, ejemplificando los niveles del 10% al 120% con Sustancia de Referencia.

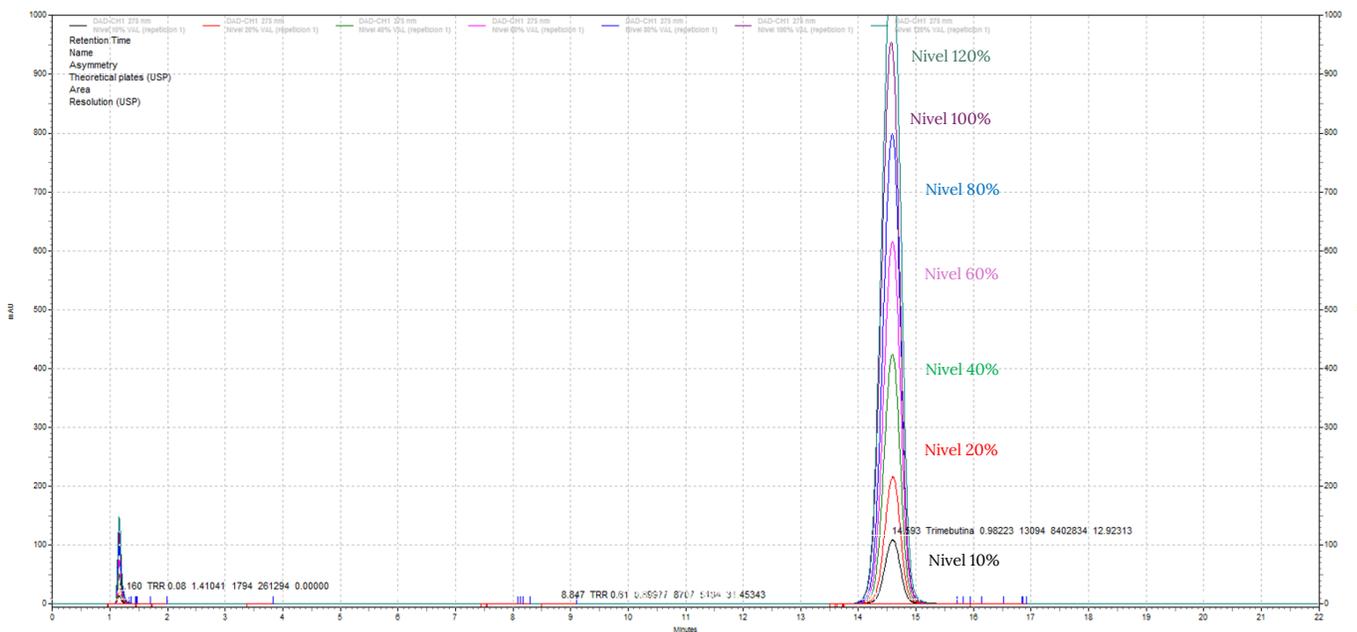


Figura 31. Cromatogramas de Linealidad del Sistema en niveles de Valoraciones (10%-120%)

Linealidad del Sistema para Niveles de Productos de degradación

De acuerdo con la literatura para el caso del Maleato de Trimebutina la concentración límite para productos de degradación es de 0.001 mg/mL, considerando este valor como el 100% para construir la curva a niveles bajos que oscila del 10%-500%. Es importante señalar que el incremento que se tuvo del 100% a 500% se realizó para cubrir un rango considerable de concentración, debido a las bajas concentraciones empleadas. Además, permite calcular el límite de cuantificación (LC) y el límite de detección (LD) del método para cuantificar con precisión el Maleato de Trimebutina. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

Tabla 20. Datos de Linealidad del Sistema de niveles de Productos de degradación

Nivel (%)	Concentración (mg/mL)	ABC	Promedio	DE	CV
10	0.0001	18806 17825 17148	17926.3333	833.632013	4.65
20	0.0002	34611 32866 33586	33687.6667	876.931202	2.60
40	0.0004	70809 71906 66484	69733	2866.67979	4.11
60	0.0006	108540 103760 98566	103622	4988.43182	4.81
80	0.0008	148725 134165 141962	141617.333	7286.11668	5.14
100	0.001	184216 169156 170940	174770.667	8228.3902	4.71
500	0.005	854554 834467 833128	840716.333	12002.4578	1.43

Tabla 21. Criterios de aceptación de Linealidad del Sistema a niveles de productos de degradación

Parámetro	Respuesta
m (b1)	167592316.3
b (b0)	3407.3675
r2	0.9995
S_{y/x}	6347.2078
IC inferior	165777210.2
IC superior	169407422.4

De acuerdo con los resultados obtenidos en la evaluación de la linealidad a niveles de productos de degradación, se obtuvo un coeficiente de determinación (r^2) superior a 0.98, con un valor específico de 0.9995. La pendiente es diferente de cero y los intervalos de confianza no incluyen el cero, lo cual confirma la presencia de una relación lineal. Esto se observa en la siguiente gráfica, donde se han representado las concentraciones en función de las áreas bajo la curva de cada nivel, mostrando que la respuesta aumenta proporcionalmente con la concentración. En la figura 34 se muestra el cromatograma que ilustra las concentraciones de una de las curvas y el aumento de las respuestas en el cromatograma de la figura 33.

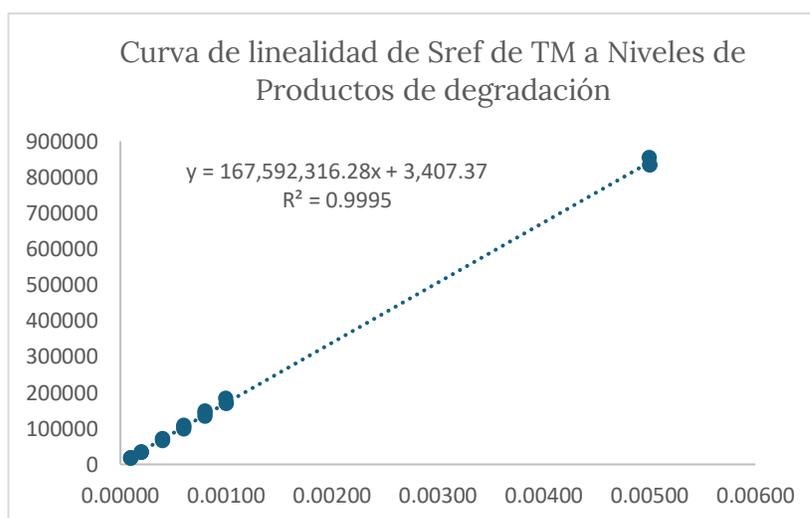


Figura 32. Linealidad del Sistema con Sref a niveles de productos de degradación.

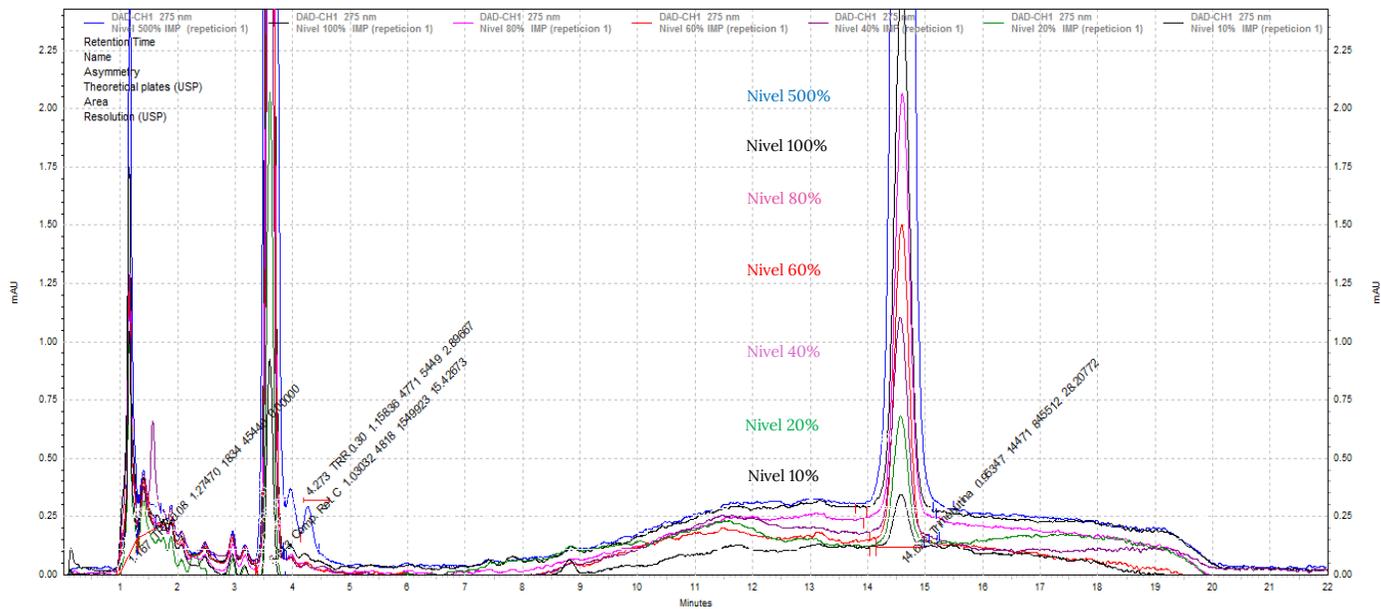


Figura 33. Aumento de cromatogramas de Linealidad del Sistema en niveles de productos de degradación (10%-500%).

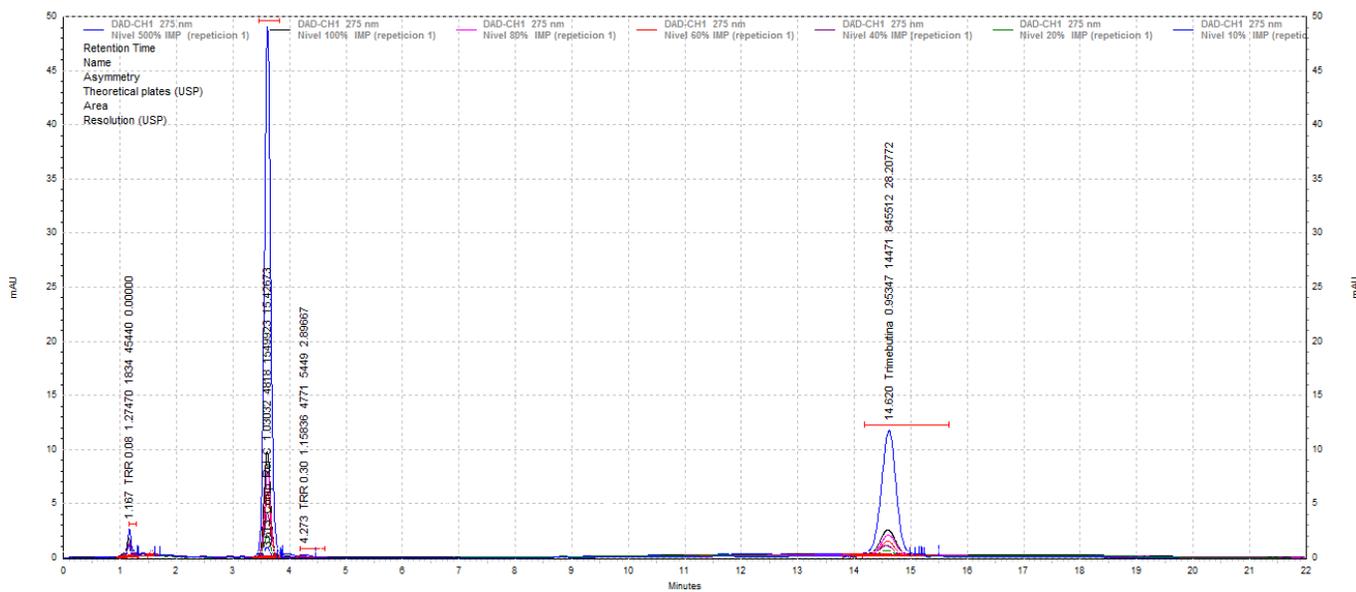


Figura 34. Cromatogramas de las concentraciones de Linealidad del Sistema en niveles de productos de degradación.

8.4. Precisión del Sistema

Los resultados obtenidos de muestras preparadas a partir de la misma solución estándar se presentan en la Tabla siguiente.

Tabla 22. Datos de precisión del sistema

N° de muestra	ABC
1	84757340
2	84795657
3	84369066
4	84948813
5	83968991
6	84537033
Promedio	84562816.67
DE	355494.07
CV (%)	0.42

Se comprobó la consistencia de los resultados, obteniendo un coeficiente de variación (CV) de 0.42%, que se encuentra por debajo del 2%. Por lo tanto, se concluye que el método analítico es preciso.

8.5. Límite de cuantificación

Para determinar la concentración mínima en la que se puede cuantificar el principio activo, se calculó el límite de cuantificación a partir de la linealidad del sistema a niveles de productos de degradación, utilizando la fórmula siguiente, cuyos datos se describe en el numeral 7.7.2.5.

$$LC = \frac{10 * S}{b}$$

En esta fórmula se sustituyeron los datos de la Tabla 21, que corresponden a la curva de la linealidad del sistema a niveles de productos de degradación.

$$LC = \frac{(10)(6347.2078)}{167592316.3}$$

$$LC = 0.000379 \text{ mg/mL}$$

El límite de cuantificación que se obtuvo fue de 0.000379 mg/mL el cual nos dice que el Maleato de Trimebutina puede ser cuantificado con exactitud y precisión en concentraciones superiores a dicho valor. Otra manera de poder calcular el límite de cuantificación es aquel basado en la señal-ruido de la respuesta. En seguida se muestran los promedios de la relación señal-ruido para cada concentración, los cuales cumplen con lo señalado en la literatura, que establece que dicha relación debe ser superior a 10^{30} . En el primer nivel, que corresponde al 10%, presenta un coeficiente de variación (CV) menor a 10. Por esta razón, se establece que a partir del 20% se cumple con la especificación requerida. A partir de este nivel, también se considera que los resultados pueden cuantificarse con exactitud y precisión.

Tabla 23. Promedio de la relación Señal-ruido en relación a la linealidad del Sistema.

Nivel (%)	Concentración (mg/mL)	Promedio de Señal-ruido	CV (%)
10	0.0001	10.8	9.47
20	0.0002	21.3	20.39
40	0.0004	44.9	23.32
60	0.0006	62.1	20.16
80	0.0008	91.1	21.07
100	0.001	96.5	25.54
500	0.005	378.1	29.36

8.6. Límite de detección

Para determinar la concentración mínima a la cual el método es capaz de detectar, se calculó el límite de detección, a partir de la linealidad del sistema a niveles de productos de degradación, utilizando la fórmula siguiente, cuyos datos se describen en el numeral 7.7.2.6

$$LD = \frac{3.3 * S}{b}$$

En esta fórmula se sustituyen los datos de la Tabla 21, que corresponden a la curva de la linealidad del sistema a niveles de productos de degradación

$$LD = \frac{(3.3)(6347.2078)}{167592316.3}$$

$$LD = 0.0001250 \text{ mg/mL}$$

El límite de detección obtenido fue de 0.00012498 mg/mL, lo cual indica que, en términos de la linealidad del sistema, el Maleato de Trimebutina puede detectarse a concentraciones superiores a dicho valor. Cabe destacar que el límite de detección es adecuado, ya que se encuentra por debajo del umbral mínimo de identificación que es de 0.05 mg/mL.

Al igual que en límite de cuantificación, el límite de detección también se puede calcular a través de la relación señal-ruido, con un criterio de aceptación mayor a 3 y contrastar con la regresión evaluada. Como se muestra en la Tabla 23, todos los promedios y coeficientes de variación de la relación señal-ruido están por encima de este valor, lo que confirma que todos los niveles pueden ser detectados.

8.7. Linealidad del método

Linealidad del método a niveles de Valoración

En la linealidad del método se obtuvieron los siguientes datos de las curvas preparadas.

Tabla 24. Datos de Linealidad del método a niveles de Valoración

Nivel (%)	Cantidad real adicionada (mg)	Cantidad de placebo (mg)	ABC Muestra	Cantidad recuperada	% Recobro
60	14.91	32.29	50215214	15.09	101.21
	14.89	32.3	49007941	14.73	98.90
	14.90	32.29	50347089	15.13	101.54
80	19.83	27.29	65625890	19.73	99.48
	19.84	27.3	65124587	19.58	98.67
	19.85	27.29	66453566	19.98	100.63
100	24.77	22.29	80913206	24.32	98.21
	24.81	22.29	82980336	24.94	100.52
	24.80	22.28	83034668	24.96	100.63
120	29.73	17.29	98728845	29.68	99.82
	29.74	17.29	97259302	29.24	98.30
	29.78	17.31	97899318	29.43	98.82
				PROMEDIO	99.73
				DE	1.16
				CV (%)	1.17

Tabla 25. Criterios de aceptación de la Linealidad del método a niveles de Valoración

Parámetro	Respuesta	
r²	0.9985	
m	0.9773	
b	0.4188	
IC[B₁]m	1.0043	0.9502
IC[B₀]b	1.0408	-0.2032
% CV_{y/x}	1.0465	
IC [% recobro]inf	98.98	98-102%
IC [% recobro]sup	100.47	

De acuerdo con los datos obtenidos se puede concluir que la linealidad a niveles de Valoración del Maleato de Trimebutina es lineal, además que cumple con los parámetros que se establecen en la Tabla 25, en donde se tiene un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9985, el cual es mayor a 0.98, por otro lado, el intervalo de confianza de la pendiente incluye la unidad, es decir, la pendiente se encuentra dentro de estos intervalos. De igual modo, los intervalos de confianza de la ordenada al origen deben incluir el cero, y se tiene un intervalo que va de -0.2032 a 1.0408 y el coeficiente de variación de la regresión ($\% CV_{y/x}$) es menor a 2%, teniendo un valor de 1.0465, por lo tanto, el método analítico es lineal a niveles altos, lo cual se demuestra en la siguiente gráfica.

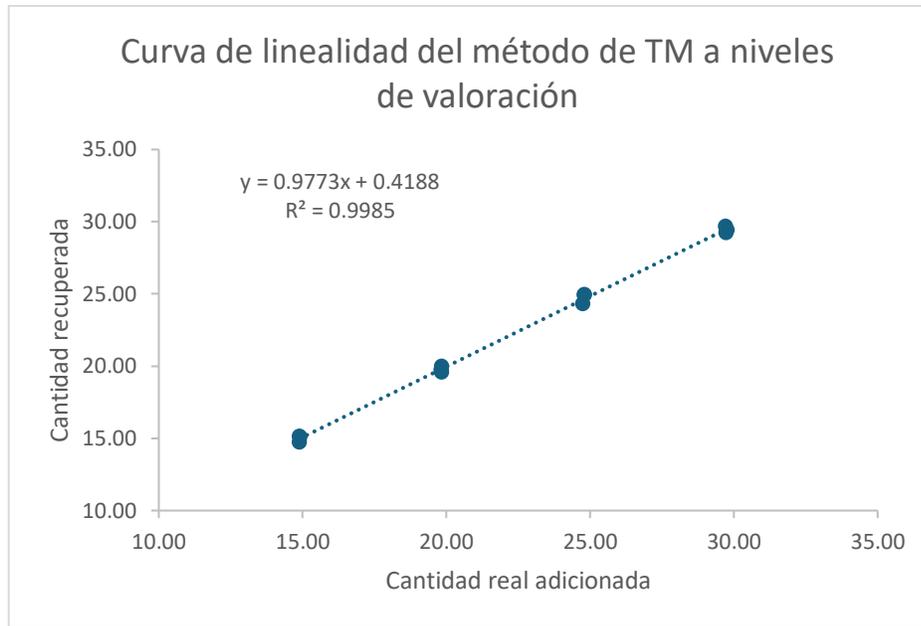


Figura 35. Curva de linealidad del método a niveles altos

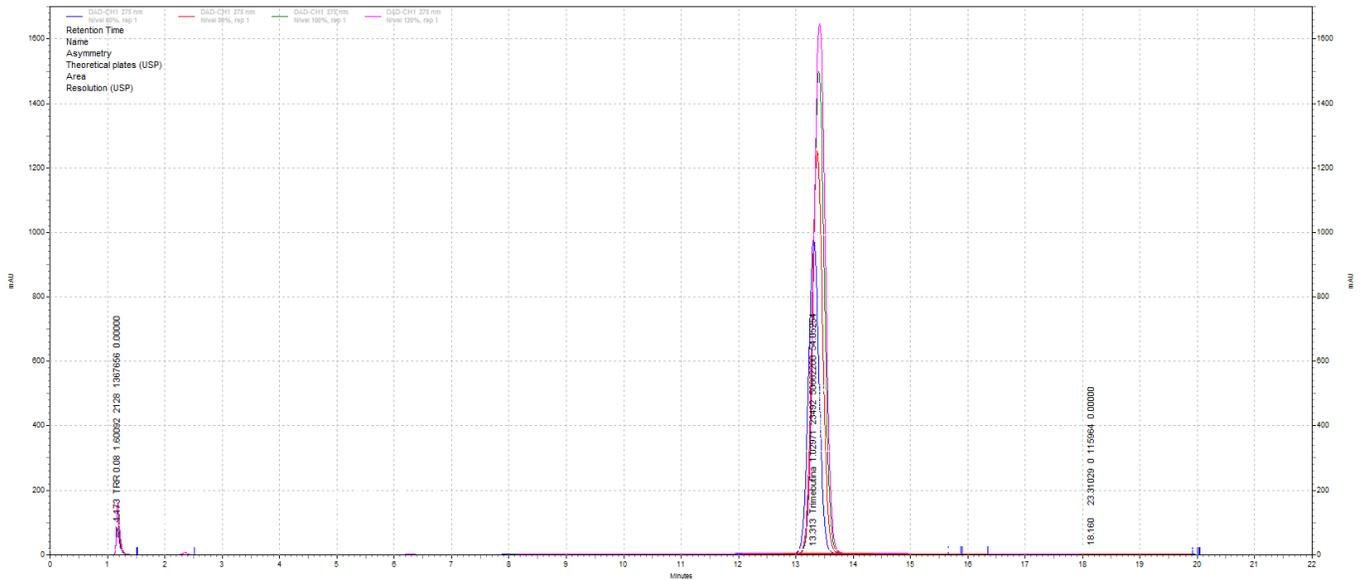


Figura 36. Curva de linealidad del método a niveles de valoración

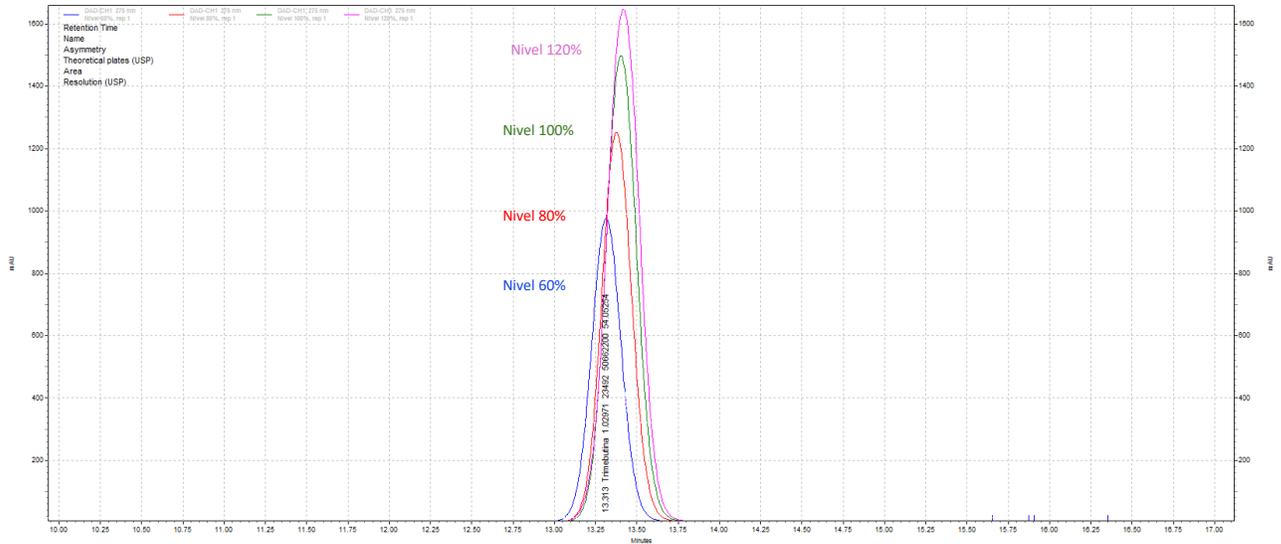


Figura 37. Aumento de cromatogramas de linealidad del método a niveles de valoración

Es importante mencionar que no se tomó en cuenta el nivel del 140% en la linealidad del método, ya que al realizar la curva a este nivel se obtuvieron porcentajes de recobro menores a 98%, esto fue debido a que la concentración a este nivel sobrepasaba la altura máxima que puede detectar el detector del equipo, por lo tanto, a este nivel ya no se estaba cuantificando de manera exacta y precisa, es por eso que se descartó las respuestas que se obtuvieron a este nivel. Es así que en los cromatogramas que se encuentran en las Figuras 36 y 37 abarcan los niveles de 60%-120%, rango que aún cubre las necesidades de las especificaciones de contenido planteadas para el producto. Por lo tanto, una oportunidad de mejora sería disminuir el volumen de inyección para garantizar una cuantificación exacta y precisa del pico de interés en el nivel del 140 %, sin afectar la cuantificación de los productos de degradación.

Linealidad del método a niveles de productos de degradación

A continuación, se muestran cada uno de los resultados obtenidos de las tres curvas que se llevaron a cabo para la linealidad a niveles de productos de degradación, abarcando los mismos niveles que en linealidad del sistema.

Tabla 26. Datos de linealidad del método a niveles de productos de degradación

Nivel (%)	Cantidad real adicionada (mg)	Cantidad de placebo (mg)	ABC Muestra	Cantidad recuperada	% Recobro
10	0.0001	37.29	19460	0.0001	120.55
	0.0001	37.30	18592	0.0001	115.06
	0.0001	37.29	19285	0.0001	119.46
20	0.0002	37.29	34033	0.0002	105.41
	0.0002	37.30	34048	0.0002	105.35
	0.0002	37.29	34086	0.0002	105.58
40	0.0004	37.29	67734	0.0004	104.79
	0.0004	37.30	67575	0.0004	104.55
	0.0004	37.29	64680	0.0004	100.17
60	0.0006	37.29	102148	0.0006	105.46
	0.0006	37.30	100179	0.0006	103.33
	0.0006	37.29	101962	0.0006	105.27
80	0.0008	37.29	135937	0.0008	105.26
	0.0008	37.30	133834	0.0008	103.53
	0.0008	37.29	136058	0.0008	105.35
100	0.0010	37.29	166940	0.0010	103.41
	0.0010	37.30	170103	0.0011	105.27
	0.0010	37.29	169477	0.0011	104.99
500	0.0050	37.29	852631	0.0053	105.64
	0.0050	37.30	841748	0.0052	104.18
	0.0050	37.29	848448	0.0053	105.12
PROMEDIO					106.56
DE					5.17
CV					4.85

Tabla 27. Criterios de aceptación para la linealidad del método a niveles de Productos de degradación

Parámetro	Respuesta	
r^2	0.999	
m	1.0494	
b	0.0000003	
IC[B₁]m	1.0536	1.0452
IC[B₀]b	0.000009	-0.000008
% CV_{y/x}	1.22	
IC [% recobro]sup	108.92	94.3-105.7%
IC [% recobro]inf	104.20	

En los datos anteriores se puede observar que se tiene un coeficiente de determinación (r^2) de 0.999 el cual es mayor a 0.98, por otro lado, los intervalos de confianza de la ordenada al origen deben incluir el cero, y se tiene un intervalo que va de -0.000008 a 0.000009 y el coeficiente de variación de la regresión ($\% CV_{y/x}$) es menor a 5.7%, teniendo un valor de 1.22%. Por otro lado, el intervalo de confianza de la pendiente no incluye la unidad, es decir, la pendiente se encuentra por encima de esta, debido a que se está recuperando mayor cantidad de principio activo, lo cual también se visualiza con los intervalos de confianza del % de recobro que no cumplen con el criterio de estar entre 94.3-105.7%, debido a que no se está cuantificando de manera exacta, ya que se está recuperando más del 100%, la causa probable es que se deba al tipo de filtro que se utilizó en esta prueba, lo cual se explica mejor en el apartado de Exactitud del método. Además, se debe considerar que para el nivel del 10% los porcentajes de recobro son mayores a 105.7%, que es el valor máximo permitido por la especificación, lo cual se contrasta con las pruebas de límite de cuantificación y detección que, a este nivel, siendo la concentración más baja, podía ser detectada, pero no

se considera como un valor exacto ni preciso para su cuantificación. Esta falta de precisión en la evaluación de linealidad impide obtener resultados consistentes y fiables. Por estas razones se podría tener en cuenta como oportunidad de mejora ajustar el rango de concentraciones para mejorar la precisión, como es el caso del nivel del 10%, e incorporar más puntos entre el 100% y el 500%. Esto permitirá detectar posibles puntos de inflexión y optimizar la calidad del ajuste lineal, brindando un mejor resultado para la pendiente. Además, aumentar el número de réplicas por nivel contribuiría a reducir la variabilidad a lo largo del rango experimental.³¹

A pesar de lo antes mencionado, el método analítico es lineal en los niveles establecidos exceptuando el nivel más bajo a niveles de productos de degradación. Al igual que en los niveles de valoración, el método sigue siendo lineal a pesar del rango estrecho que se maneja. Esta linealidad se evidencia en la gráfica de la figura 38, y los cromatogramas de las figuras 39 y 40 ilustran los niveles evaluados.

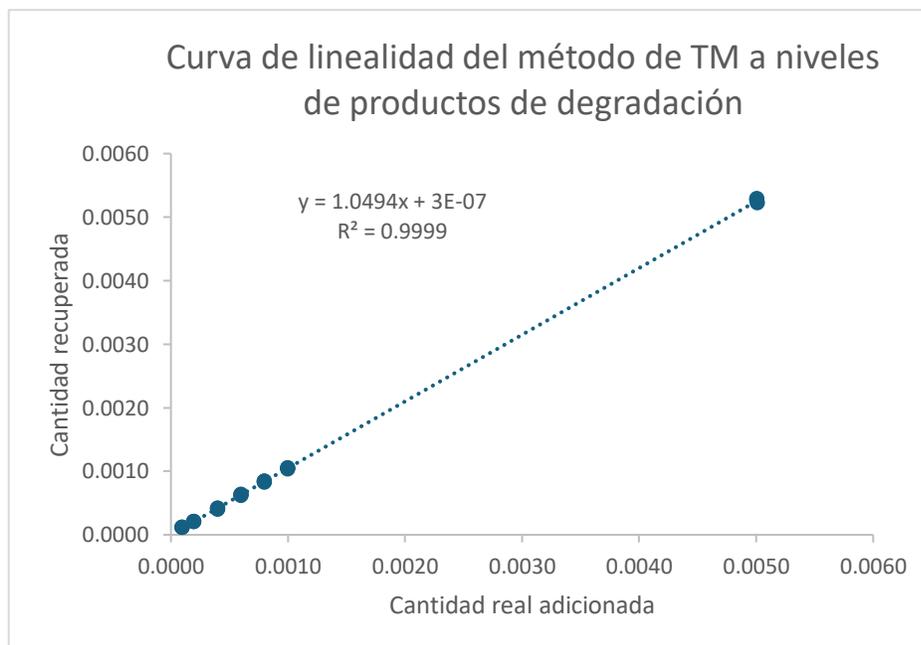


Figura 38. Curva de linealidad del método nivel de 10%-500%

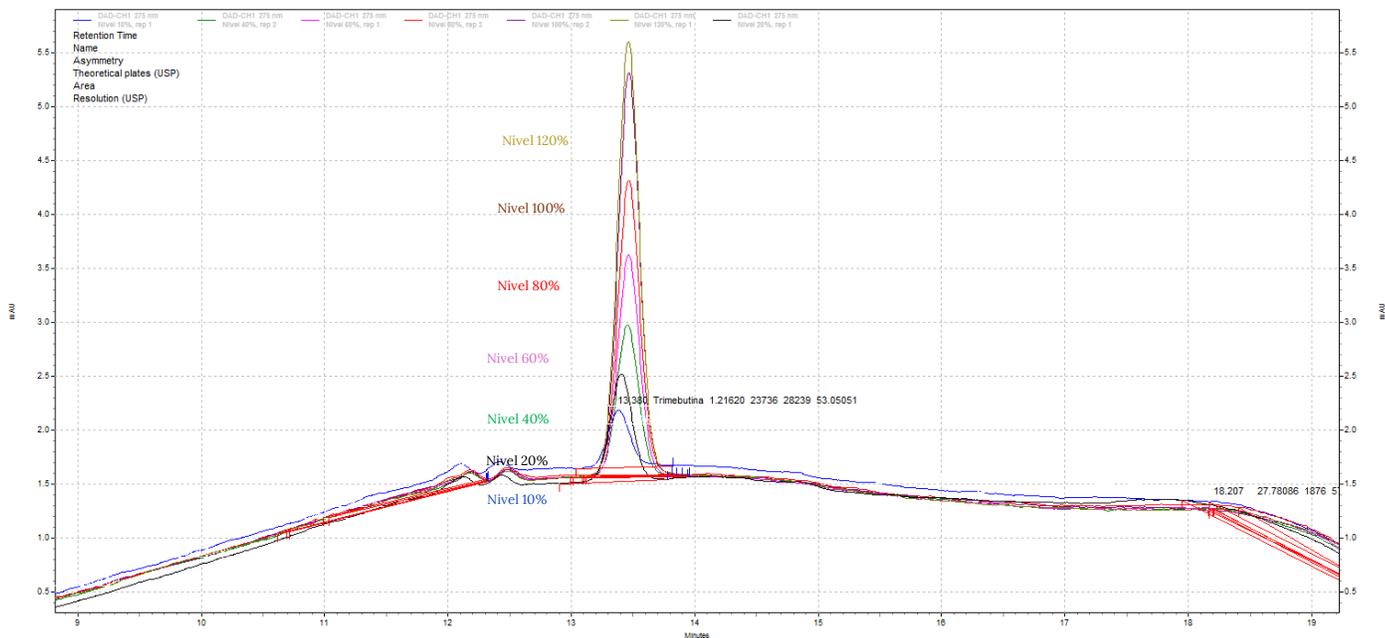


Figura 39. Cromatogramas de linealidad del método a niveles de productos de degradación

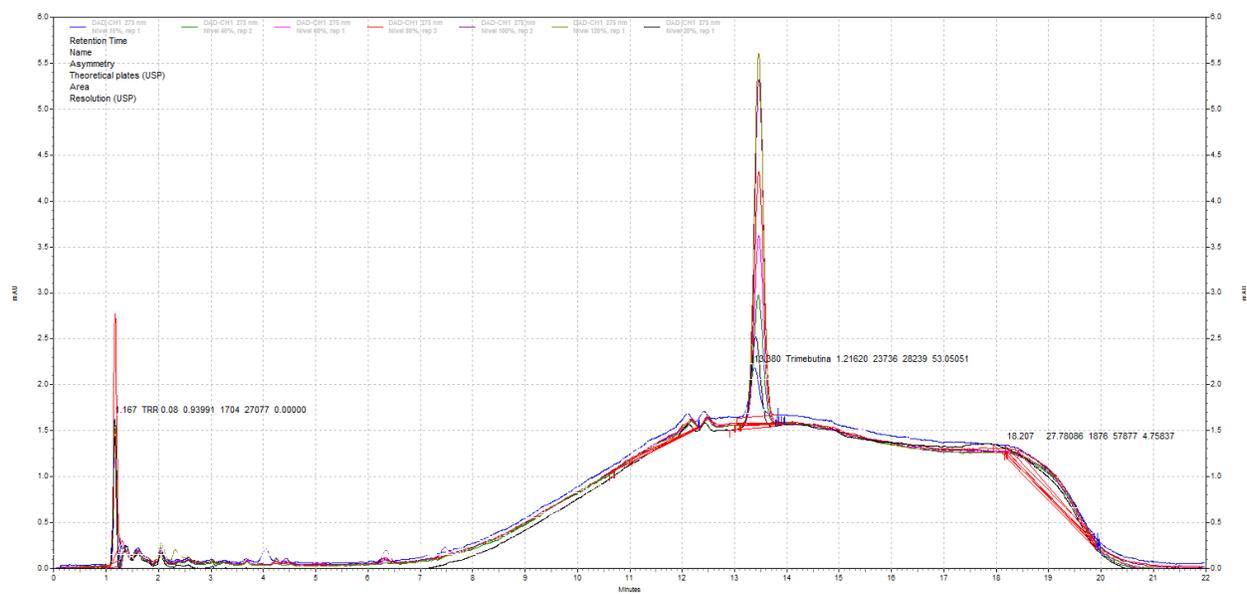


Figura 40. Cromatogramas de linealidad del método a niveles de productos de degradación

8.8. Exactitud del método

Se calculó el porcentaje de contenido a partir de las muestras que se prepararon por sextuplicado. En primer lugar, se evaluó la exactitud del método a niveles de valoración, los resultados obtenidos se presentan en la tabla siguiente.

Tabla 28. Exactitud del método a niveles de valoración con Acrodisco marca Thermo Scientific

Concentración (mg/mL)	ABC	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	% de Recobro
0.5	84596427	25	24.72	98.88
0.5	85483182	25	24.98	99.92
0.5	86250882	25	25.20	100.81
0.5	85256246	25.02	24.91	99.57
0.5	84309554	25	24.64	98.55
0.5	85197027	25.03	24.90	99.46
PROMEDIO				99.53
DE				0.80
CV (%)				0.80

Como se puede observar, tanto el porcentaje de recobro en cada repetición como en el promedio se encuentran dentro del rango especificado que es de 98-102%. Además, el Coeficiente de variación (CV) es de 0.80%, lo cual es un valor menor al 2%, por lo tanto, se concluye que el método analítico es considerado exacto para los niveles de valoración.

En cambio, en la exactitud del método a niveles de productos de degradación se tuvieron algunos inconvenientes en cuanto a los acrodiscos que se utilizaban inicialmente que eran de marca Thermo Scientific, pues debido a la falta de insumos se tuvo que hacer el análisis de exactitud con una marca diferente que son los acrodiscos de marca Labfil, esta comparación se realizó en la prueba de Tolerancia. De tal manera que se

llevó a cabo la exactitud del método con ambas marcas de filtros, dichos datos se muestran en las Tablas siguientes con la marca correspondiente.

Tabla 29. Exactitud del método a niveles de productos de degradación con Acrodisco marca Thermo Scientific

Concentración (mg/mL)	ABC	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	% de Recobro
0.001	173913	25.02	24.94	99.69
0.001	184074	25.04	26.40	105.43
0.001	181712	25.04	26.06	104.07
0.001	176835	25.03	25.36	101.32
0.001	172857	25.02	24.79	99.08
0.001	172769	25.02	24.78	99.03
PROMEDIO				101.44
DE				2.73
CV (%)				2.69

Tabla 30. Exactitud del método a niveles de productos de degradación con filtro Labfil.

Concentración (mg/mL)	ABC	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	% de Recobro
0.001	173093	10.05	10.6292	105.76
0.001	171966	10.01	10.5600	105.49
0.001	170882	10.03	10.4934	104.62
0.001	172626	10.05	10.6005	105.48
0.001	169975	10.02	10.4377	104.17
0.001	167974	10.01	10.3148	103.05
PROMEDIO				104.76
DE				1.04
CV (%)				0.99

Como se puede observar, los acrodiscos de la marca Labfil, presentaron un porcentaje de recobro más alto, alcanzando 105.75% en la primera repetición, lo cual supera el límite superior de la especificación (94.3-105.7%). Aunque el promedio está dentro del rango permitido, una de las repeticiones está fuera de especificación, lo que sugiere el método no cumple con los criterios de exactitud. En contraste, los acrodiscos de la marca Thermo Scientific, como se muestra en la Tabla 29, mostraron que todas las repeticiones cumplen con la especificación, al igual que el promedio y el Coeficiente de Variación (CV), que es de 2.69% y está por debajo del límite de 5.7%. Esto indica que el método analítico es exacto para los niveles de productos de degradación cuando se utilizan los filtros Thermo Scientific.

Este análisis se justifica con base en la literatura, que señala que los filtros de membrana pueden variar según la marca. Algunos filtros pueden adsorber menor cantidad de analito³² o liberen trazas del material del filtro o del agente humectante, lo que puede interferir con el analito de interés y aumentar el porcentaje de recobro.

Es importante aclarar que, al comparar ambas marcas se realizaron ajustes en las preparaciones de la muestra. Inicialmente, se trabajó con materia prima sin conocer el porcentaje de contenido, ya que este no fue calculado antes de la validación, por lo tanto, se utilizó Sustancia de Referencia para el análisis. Como punto de mejora, se podría llevar a cabo la caracterización de la materia prima o preparar muestras cargadas con Sustancia de referencia.

8.9. Precisión intermedia

En la prueba de precisión intermedia el objetivo principal es evaluar la reproducibilidad del método analítico bajo condiciones variables dentro de un mismo laboratorio, en distintos días y con diferentes analistas.

Considerando estos parámetros, se realizó la prueba de precisión intermedia, utilizando tabletas de distinta marca que se sometieron a estabilidad acelerada en diferentes estufas a la misma temperatura (60°C). En una de las estufas que contenían las tabletas de Maleato de Trimebutina de la marca Pharmalife se observa que las tabletas experimentaron cristalización, lo que produce una degradación significativa. Esto se puede apreciar en el cromatograma de la Figura 41, donde la altura del pico correspondiente a la Trimebutina es muy baja. No obstante, debido a la alta degradación, los picos de los productos de degradación aumentan en altura, como se muestra en la Figura 42, lo que se traduce en un incremento en su porcentaje de contenido.

Sin embargo, como se observa en la Tabla 31, los porcentajes de contenido de las tabletas Pharmalife no cumplen con el criterio de aceptación, que establece que el contenido debe ser no menor al 90% ni mayor al 110%. En este caso, el porcentaje total de las tabletas Pharmalife fue de 23.62%, debido a la degradación excesiva. Por lo tanto, las tabletas cristalizadas no se incluyeron en el análisis de precisión intermedia posterior.

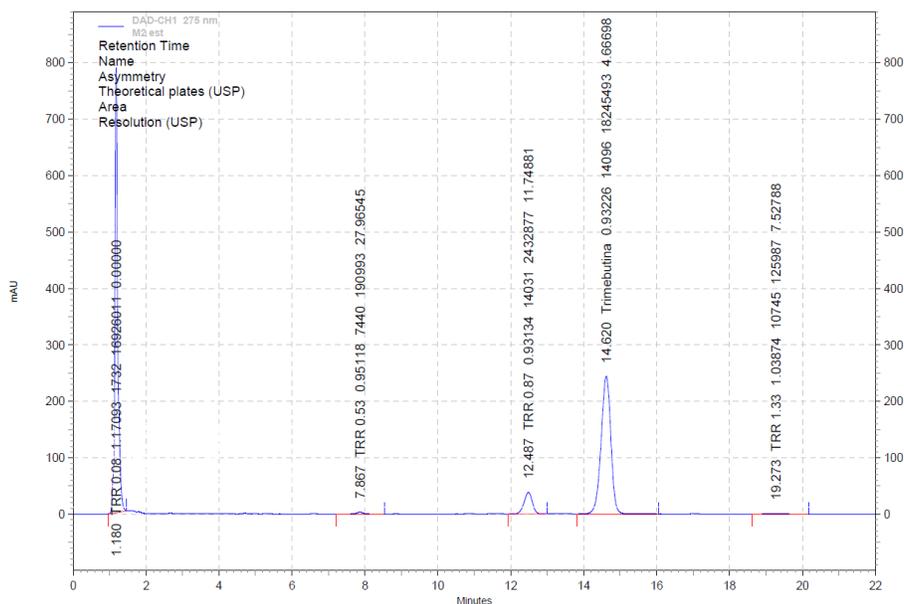


Figura 41. Cromatograma de tabletas de Maleato de Trimebutina, marca Pharmalife

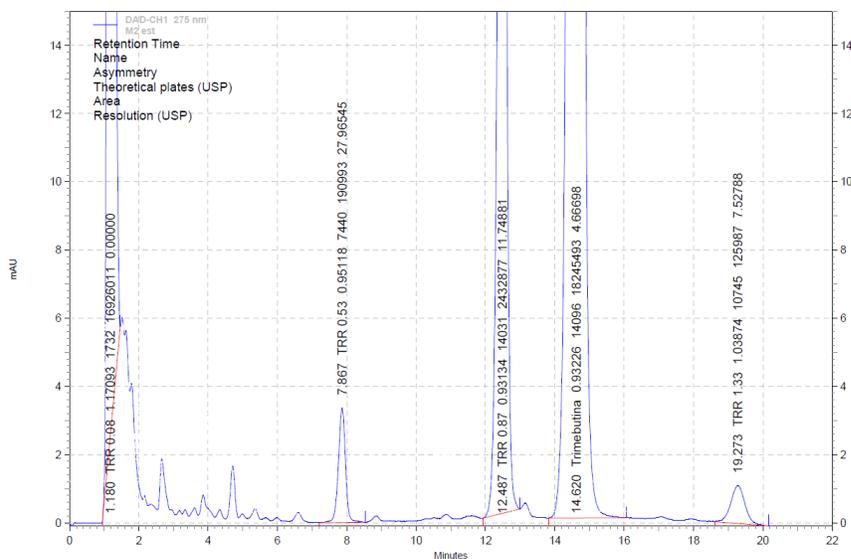


Figura 42. Aumento de cromatograma de tabletas de Maleato de Trimebutina, marca Pharmalife

Tabla 31. Porcentajes de contenido de las tabletas de Maleato de Trimebutina de la marca Pharmalife

Tabletas de Maleato de Trimebutina, marca Pharmalife		
	Analista 1	Analista 2
Día 1	21.20	21.79
	21.48	21.44
	22.21	21.62
Día 2	22.01	29.02
	21.57	29.95
	21.69	29.45
Promedio Total	23.62	
DE Total	3.55	
CV Total	15.00	

En contraste, las tabletas de marca Farmacia del Ahorro no presentan cristalización, a diferencia de las tabletas de marca Pharmalife. Esto podría atribuirse a variaciones en la composición química de su formulación, la humedad o incluso el proceso de fabricación. Estos factores podrían haber influido en la estabilidad física del producto, previniendo la aparición de cristales.

Dicho lo anterior, las tabletas de Trimebutina de la marca Farmacia del Ahorro mostraron que la Trimebutina no se degradó más del 25%, lo que permitió una cuantificación aceptable y homogénea. En los cromatogramas en la Figura 43, se observa que no se produjo una degradación total en comparación con las tabletas cristalizadas. Además, el porcentaje de contenido cumplió con el criterio de aceptación, con un promedio de 96.30%, lo cual está dentro del rango establecido (no menor al 90% ni mayor al 110%). Asimismo, en los productos de degradación, cuyas respuestas se muestran en el cromatograma de la Figura 44, la altura de los picos no es tan alta como en las tabletas cristalizadas, pero aún es posible cuantificar los productos de degradación en términos de porcentaje de contenido.

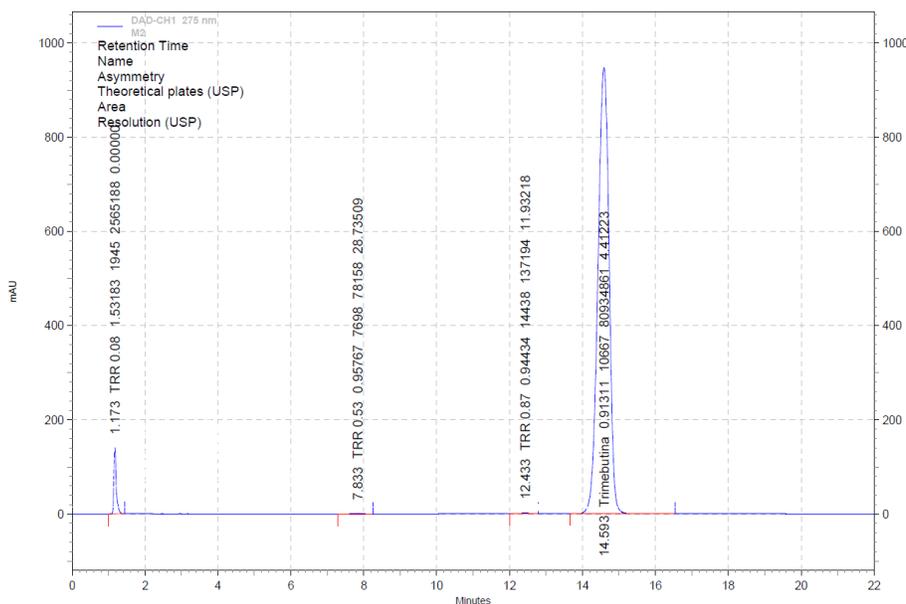


Figura 43. Cromatograma de tabletas de Maleato de Trimebutina, marca Farmacias del Ahorro.

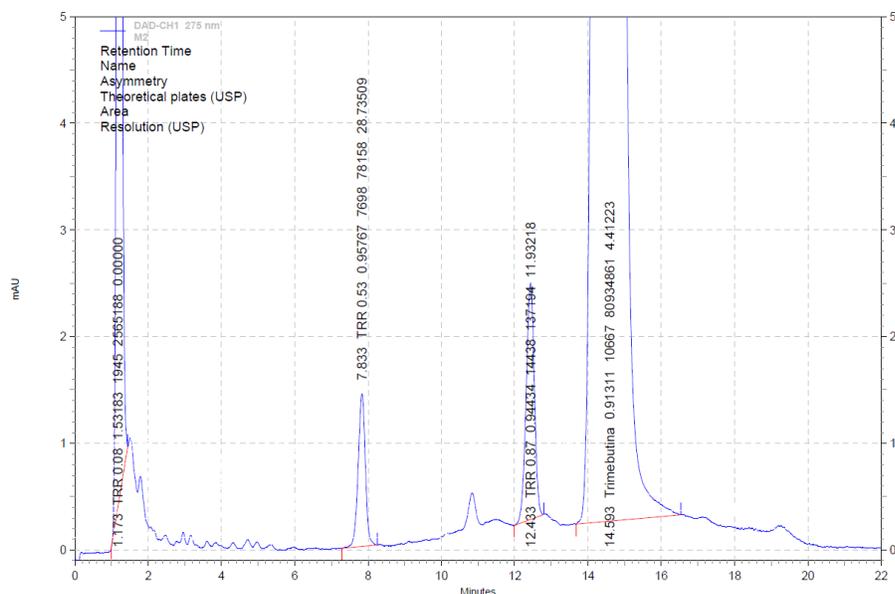


Figura 44. Aumento de cromatograma de tabletas de Maleato de Trimebutina, marca Farmacias del Ahorro.

Tabla 32. Porcentajes de contenido de las tabletas de Maleato de Trimebutina, marca farmacias del ahorro

Tabletas de Maleato de Trimebutina, marca Farmacias del Ahorro		
	Analista 1	Analista 2
Día 1	95.64	96.44
	95.33	96.20
	95.62	95.00
Día 2	95.97	98.56
	94.08	98.75
	96.33	97.60
Promedio Total	96.30	
DE Total	1.40	
CV Total	1.45	

Se continuó el análisis con las tabletas de Farmacias del Ahorro, obteniendo los resultados generales para los porcentajes del Maleato de Trimebutina y sus productos de degradación, los cuales se presentan en la Tabla 33 y la

Tabla 34, respectivamente. Los datos muestran que el método analítico posee una buena reproducibilidad, con Coeficientes de Variación (CV) inferiores a 2% y, en el caso de los productos de degradación, menores a 5.7% para todas las variables evaluadas (Interdía, Interanalista y Total). Esto demuestra que las variaciones no impactan de manera significativa en la precisión del método, pero cuando el producto experimental una degradación excesiva, los resultados pueden mostrar una mayor variabilidad, lo que podría deberse a las condiciones de estrés y a las posibles interacciones entre el principio activo y los excipientes.

Tabla 33. Datos de los porcentajes de contenido de Maleato de Trimebutina

Variable	Promedio	Desviación estándar (DE)	% CV
Interdía	96.29	0.83	0.86
Interanalista	96.29	1.13	1.17
Total	96.29	1.39	1.45

Tabla 34. Datos de los porcentajes totales de productos de degradación

Variable	Promedio	Desviación estándar (DE)	% CV
Interdía	0.27	0.01	5.37
Interanalista	0.27	0.003	1.25
Total	0.27	0.01	4.50

8.10. Tolerancia

Se consideraron variables externas al método analítico, mediante la evaluación de un cambio de equipo y el uso de una marca de columna diferente a la habitual. A continuación, se presentan las tablas que comparan los porcentajes de contenido obtenidos en las condiciones evaluadas, para

las tabletas de Maleato de Trimebutina y sus respectivos productos de degradación.

Tabla 35. Comparación de porcentaje de contenido con cambio de equipo

	Cromatógrafo de líquidos HPLC, marca Hitachi, detector UV-Vis	Cromatógrafo de líquidos HPLC, marca Hitachi Primaide, detector PDA
No. Mtra	% contenido	% contenido
1	94.66	95.64
2	94.30	95.33
3	94.35	95.62
Promedio	94.43	95.53
DE	0.92	0.17
CV (%)	0.21	0.18

Tabla 36. Comparación de porcentajes de contenido de productos de degradación con cambio de equipo

Cromatógrafo de líquidos HPLC, marca Hitachi, detector UV-Vis			Cromatógrafo de líquidos HPLC, marca Hitachi Primaide, detector PDA	
No. Mtra	% Contenido TRR 0.55	% Contenido TRR 0.85	% Contenido TRR 0.53	% Contenido TRR 0.87
1	0.0693	0.0502	0.0926	0.1640
2	0.0691	0.0521	0.0921	0.1616
3	0.0664	0.0502	0.0968	0.1753
Promedio	0.0683	0.0509	0.0938	0.1670
DE	0.0016	0.0011	0.0026	0.0073
CV (%)	2.31	2.18	2.75	4.38

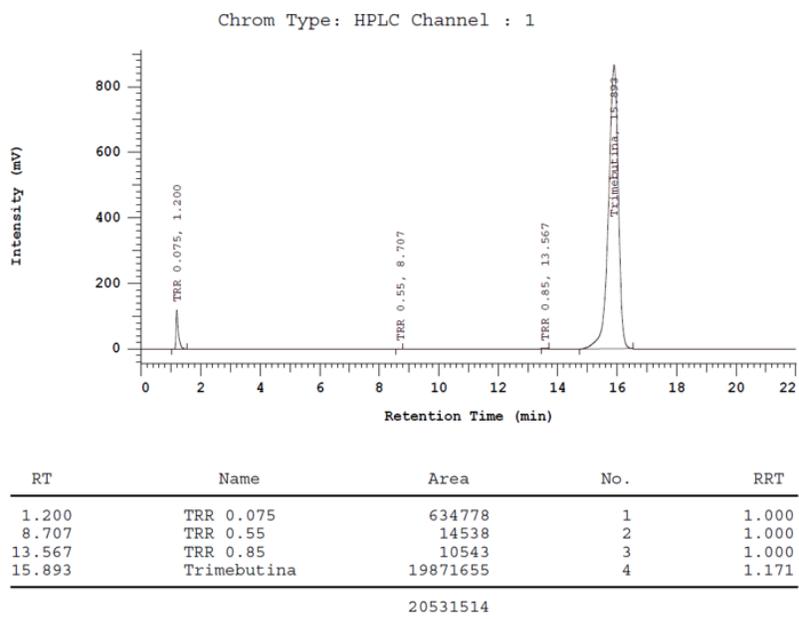


Figura 45. Cromatograma de tabletas de Maleato de Trimebutina en equipo Hitachi con detector UV-Vis.

Al comparar ambos equipos, y según los resultados de la Tabla 32, el equipo Hitachi con detector UV-Vis, utilizado en la prueba de tolerancia, cumple con el porcentaje de contenido que debe encontrarse entre 90% y no más del 110%, incluso el Coeficiente de variación (CV) de 0.21%, está por debajo del límite del 2% cumpliendo con los criterios de prueba de tolerancia. De igual modo, los productos de degradación cumplen con los criterios establecidos, al tener porcentajes de contenido superiores a 0.05% y no inferiores al 0.2%, con un coeficiente de variación (CV) menor a 5.7%. Es importante mencionar, que los TRR son aproximados de acuerdo al perfil del cromatograma. Sin embargo, este equipo carece de un control de temperatura de la columna, lo que provoca variaciones en el tiempo de retención del pico de interés, incrementando el tiempo en el que normalmente aparecía la Trimebutina.

Asimismo, se observó una disminución de la asimetría, cercana a 0.8 lo que es evidente en el cromatograma de la figura 45, donde se aprecia el frenteo.

Como se mencionó anteriormente, también se llevó a cabo el análisis de una columna distinta a la que se usaba inicialmente, con la cual se realizó la comparación de los parámetros cromatográficos que se muestran a continuación tanto para el Maleato de Trimebutina y sus productos de degradación.

Tabla 37. Parámetros cromatográficos de la columna Zorbax C18

Columna ZORBAX C18				
No. Mtra.	Asimetría	TR	Resolución	% contenido
1	1.02	13.26	6.04	91.82
2	1.03	13.25	6.01	92.43
3	1.02	13.24	6.02	92.56
Promedio				92.27
DE				0.40
CV (%)				0.43

Tabla 38. Parámetros cromatográficos de la columna Luna C18

Columna LUNA C18				
No. Mtra.	Asimetría	TR	Resolución	% contenido
1	0.87	14.71	4.39	96.44
2	0.88	14.72	4.38	96.19
3	0.87	14.72	4.39	95.00
Promedio				95.88
DE				0.77
CV (%)				0.80

Tabla 39. Comparación de porcentajes de contenido de productos de degradación con cambio de columna

Columna ZORBAX C18			Columna LUNA C18	
No. Mtra.	% Contenido TRR 0.45	% Contenido TRR 0.74	% Contenido TRR 0.53	% Contenido TRR 0.87
1	0.0965	0.1730	0.0928	0.1651
2	0.1046	0.1739	0.0920	0.728
3	0.1049	0.1751	0.0938	0.1603
Promedio	0.1020	0.1740	0.0929	0.1661
DE	0.0048	0.0011	0.0009	0.0063
CV (%)	4.66	0.62	0.97	3.77

Tras el cambio de columna, que fue cambio de marca, diferente número de parte, así como diferente endcapping, diferente carga de carbono y de igual modo variando la unión del ligando a la sílice. Con estas diferencias entre columnas se obtuvo un impacto significativo en el desempeño del método analítico. En primer lugar, se notó una mejora en la asimetría al utilizar la columna ZORBAX. En contraste, la columna LUNA mostró una asimetría deficiente, lo que generó errores en la cuantificación, como se evidencia en la Tabla 38, donde el porcentaje de contenido fue de 95.88%, superior al obtenido con la columna ZORBAX. La presencia de picos más anchos y asimétricos podría ser consecuencia de la acumulación de contaminantes fuertemente retenidos en la columna, o bien, de una disminución en la eficiencia de la columna, derivado del uso en el transcurso de la validación.³³

Otro factor afectado por el cambio de columna fue el tiempo de retención, que se redujo al usar la columna ZORBAX. También, se observó una mejora significativa en la resolución del pico de Trimebutina con la columna

ZORBAX, alcanzando un valor alrededor de 6, frente a una resolución de 4.3 con la columna LUNA. Esto demuestra que, aunque ambas columnas compartían el mismo ligando en la fase estacionaria, las diferencias en la fabricación y materiales empleados por los proveedores pueden influir en la separación, favoreciendo de esta manera la resolución del pico de la Trimebutina respecto a sus productos de degradación.

Finalmente, en ambas columnas se cumplieron los criterios establecidos para los productos de degradación, con porcentajes de contenido entre 0.05% y 0.2%. Tanto los porcentajes de contenido como los coeficientes de variación se mantuvieron dentro de las especificaciones. Cabe destacar que, para los tiempos de retención relativa (TRR), no se establece una especificación fija, puesto que son aproximaciones al comportamiento del perfil cromatográfico.

Mencionado lo anterior fue conveniente reemplazar la columna LUNA por la columna ZORBAX, debido al mejor rendimiento que esta tenía en cuanto a los parámetros cromatográficos que se evaluaron, los cual se puede ejemplificar en los siguientes cromatogramas.

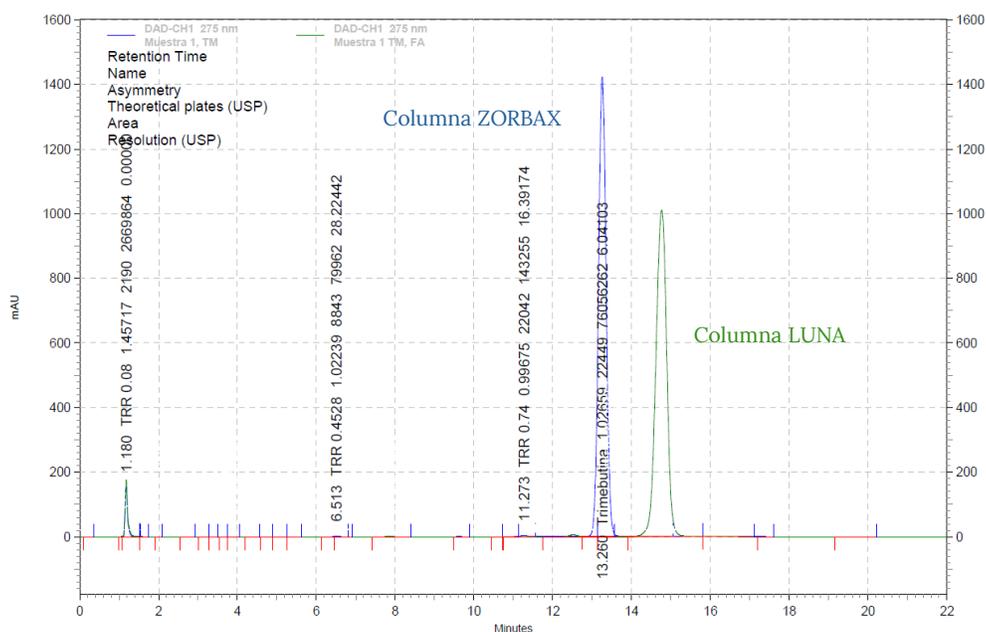


Figura 46. Comparación de cromatogramas de cambio de columna

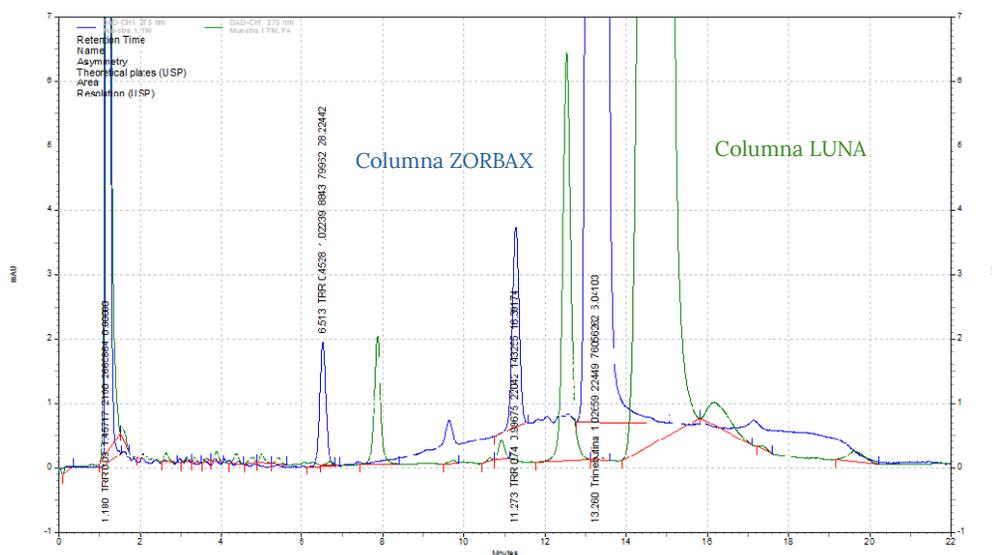


Figura 47. Aumento de cromatogramas con cambio de columna

Otra de las variables que se comentó en la evaluación de las muestras en exactitud del método fue la comparación de marcas de acrodiscos, en la siguiente tabla se muestran los porcentajes de recobro obtenido por cada filtro.

Tabla 40. Comparación de marcas de acrodiscos de membrana de Nylon

	Acrodisco Thermo Scientific	Acrodisco Labfil
Concentración (mg/mL)	% de recobro	% de recobro
0.001	99.69	105.76
0.001	105.43	105.49
0.001	104.07	104.62
0.001	101.32	105.48
0.001	99.08	104.17
0.001	99.03	103.05

Promedio	101.44	104.76
DE	2.73	1.04
CV (%)	2.69	0.99

Como se mencionó previamente en la prueba de exactitud, los acrodiscos de la marca Labfil no cumplen con los criterios establecidos en la prueba de exactitud debido al elevado porcentaje de recobro obtenido, lo que indica que las muestras se están saturando. En contraste, los filtros de la marca Thermo Scientific cumplen con los criterios establecidos. Esto demuestra que el tipo de filtro empleado impacta significativamente en el rendimiento del método analítico. Por lo tanto, el método resulta ser exacto cuando se utilizan filtros Thermo Scientific. En contraste, los filtros Labfil no cumplen con los criterios de exactitud, ya que causan lixiviación y afectan negativamente al porcentaje de recobro.

8.11. Estabilidad de la muestra

En las pruebas prevalidación se llevó a cabo el análisis de estabilidad de la muestra, sin embargo, para confirmar los resultados que se obtuvieron se volvió a realizar dicha prueba, obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 41. Condiciones de estabilidad de Sustancia de Referencia

No. Inyecciones	ABC Tiempo cero	ABC Tiempo a 24 horas	
		Temperatura ambiente	Refrigeración
1	83737401	82923506	82755329
2	83789419	82899046	82786969
3	83770146	82871662	82790686
4	83882144		
5	83702933		
6	83747018		

Promedio	83771510.2	82898071.33	82777661.3
DE	61690.46	25935.74	19429.46
CV (%)	0.07	0.03	0.02
% equivalente tiempo cero		98.96	98.81
DI		1.04	1.19

Tabla 42. Confrontación de estándares de Sustancia de Referencia a condiciones en estabilidad

Confrontación de estándares Sref (%) Tiempo cero	Confrontación de estándares Sref (%) Tiempo a 24 horas	
	Temperatura ambiente	Refrigeración
101.77	98.97	98.81

Tabla 43. Porcentaje de contenido de tabletas de Maleato de Trimebutina a condiciones en estabilidad

	% de contenido Tiempo cero	% de Contenido Tiempo a 24 horas	
		Temperatura ambiente	Refrigeración
% de contenido de muestra	98.74	96.97	97.44
% equivalente tiempo cero		98.20	98.68
DI		1.79	1.32

En la Tabla 41 se calculó la Diferencia porcentual absoluta (DI) para cada condición en estabilidad, obteniéndose valores a 2%. También se calculó la confrontación de estándares al tiempo cero, obteniendo un valor de 101.77%, dentro del rango aceptable de 98-102%. Este valor se comparó con la confrontación de estándares a temperatura ambiente y refrigeración a las 24 horas, mostrando una reducción en el porcentaje hasta aproximadamente el 98%, como se visualiza en la Tabla 42. Aunque estos resultados aún cumplen con los criterios establecidos, se observa una disminución significativa en los porcentajes, lo que sugiere que no sería adecuado mantener las muestras de referencia más allá del tiempo estipulado, ya que podrían salirse de especificación.

De manera similar, para las tabletas del Maleato de Trimebutina se calculó el porcentaje de contenido, y según la Tabla 43, se encuentran dentro del rango aceptable de 90% a 110%. La DI para ambas condiciones es menor a 2%. Sin embargo, tanto la Sustancia de referencia como las tabletas de Maleato de Trimebutina se consideran estables en los tiempos evaluados, una prolongación en las condiciones de estabilidad podría generar una reducción en las áreas bajo la curva, disminuyendo los porcentajes de contenido, lo que llevaría a incumplir con las especificaciones. Por lo tanto, no se recomienda extender el tiempo de análisis más allá de las 24 horas que se han demostrado en esta prueba de estabilidad.

9. Conclusiones

Los resultados obtenidos demuestran que el método analítico indicativo de estabilidad, permite cuantificar al Maleato de Trimebutina y a sus productos de degradación de manera precisa, exacta, lineal y estable.

10. Referencias

1. Farmacopea Europea. 7a ed. Francia: EDQM; 2010.
2. Japanese Pharmacopoeia [Internet]. 17 ed. Tokyo, Japan: Ministry of Health, Labour and Welfare; 2016 [Consultado el 24 de junio del 2024]. Disponible en: <http://jpdb.nihs.go.jp/jp17e/>
3. Gindy A., Emara S. y Hadad G. Determinación espectrofotométrica y cromatográfica de líquidos del maleato de trimebutina en presencia de sus productos de degradación. J. Pharm. Biomed. Anal [Internet]. 2003 [Consultado el 24 de junio del 2024]; vol. (33): 231-241. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0731708503002851?via%3Dihub>
4. Lofty H., Morgan E., Mohammed Y., Abdelkawy M. Different aspects in manipulating overlapped spectra used for the analysis of trimebutine maleate and structure elucidation of its degradation products. Future J. Pharm Sci. 2019; vol. 5 (7): pp 1-14.
5. Gismera M., Quintana M., Silva M. Introducción a la Cromatografía Líquida de Alta Resolución. España: UAM; 2009.
6. Suarez D., Morales Y. Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. Semilleros. 2018; vol 4 (1): pág. 8-14.
7. Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., Crouch S.R. Fundamentos de química analítica. 9ª ed. México: CENAGE Learning; 2015.
8. Barquero M. Mecanismos y aplicaciones de la Cromatografía Líquida de Alto Desempeño. 1ª ed. Costa Rica: Serie Química; 2004.
9. Quattrocchi A. O, Abelaira de A. S, Laba F. R. Introducción al HPLC. Aplicación y práctica. Buenos Aires: Artes Gráficas Farro; 1992.
10. United States Pharmacopoeial Convention. U.S. Pharmacopoeia: United States Pharmacopoeial / National Formulary. Vol. 4. USP 43 / NF 38. Rockville; 2020
11. Lough W., Wainer I. High Performance Liquid Chromatography. 1ª ed. UK: Blackie Academic & Professional; 1995.

12. Kazakevick Y., Lobrtto R. HPLC for Pharmaceutical Scientists. USA: Jhon Wiley & Sons, Inc; 2007.
13. Dong M. HPLC and UHPLC for Practicing Scientist. 2^a ed. USA: Wiley; 2019.
14. Ferrándiz V. Aplicación de la Calidad por diseño (QBD) en el desarrollo de un método de análisis de eritrocitos humanos por citofluorimetría: comparación con la metodología de desarrollo tradicional. An. Real Acad. Farm. 2020; Vol. 86 (4): pp 237-256.
15. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals Human Use. Analytical Procedure Development Q14. USA; 2023.
16. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals Human Use. Pharmaceutical Development Q8 (R2). USA; 2009.
17. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos. México: Diario Oficial de la Federación; 2015.
18. Swartz M., Krull I. Handbook of Analytical Validation. USA: CRC Press; 2012.
19. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 11 ed. México: Secretaría de Salud, Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos; 2014.
20. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals Human Use. Validation of Analytical Procedures ICH Q2(R1): USA; 2023.
21. Ermer J., Nethercote P. Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice. 2^a ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2006.
22. Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios: México: Diario Oficial de la Federación; 2016.
23. González O., Ramírez I., Ramírez B. Estabilidad de fármacos: estudios predictivos de estabilidad acelerada frente a estudios de estabilidad ICH. PMC [Internet]. 2022 [Consultado 09 agosto 2024]; Vol. 14 (11). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9693625/>

24. Bajaj S., Singla D., Sakhuja N. Stability Testing of Pharmaceutical Products. JAPS [Internet]. 2012 [Consultado 09 agosto 2024]; Vol. 2 (3): pp 129-138. Disponible en: https://japsonline.com/abstract.php?article_id=409&sts=2
25. García G. VADECUM Farmacéutico. 13a edición. México: Rezza Editores; 2004.
26. Suresh R., Anarthanan V., Manavalan R., Valliappan K. Aspects of validation in HPLC method development for pharmaceutical analysis-comparison of validation requirements by FDA, USP and ICH. IJPSR [Internet] 2010. [Consultado 24 agosto 2024]; Vol 1 (12): página 123-132. Disponible en: <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=0c32af753f bcd02a6f037337c095effdd5f2bafd>
27. Mejía R. Desarrollo y Validación de un Método analítico por CLAR para Cuantificar Naproxeno y Paracetamol en Suspensión [Tesis]. [Mexico]: UNAM; 1995.
28. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals Human Use. Impurities in new drug products Q3B(R2): USA; 2006.
29. McMurry J. Organic Chemistry. 7^a ed. United States: THOMSON; 2008.
30. Hernández V., Sánchez E. Introducción a la Validación de Métodos Analíticos para el Laboratorio Farmacéutico de Control de Calidad. UNAM, FES Zaragoza; 2017.
31. Araujo P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. J. Chromatogr. B [Internet]. 2008 [Consultado 24 septiembre 2024]; Vol. 877 (23): pp 2224-2234. Disponible en: [Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation - ScienceDirect](#)
32. Carson M., Thompson R. Analyte Loss Due to Membrane Filter Adsorption as Determined by High-Performance Liquid Chromatography. Journal of Chromatographic Science. 2000; Vol 38: pp 1-7.
33. Snyder L., Kirkland J., Glajch J. Practical HPLC Method Development. 2^a ed. New York: Wiley; 1997.