

100
JcJ.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO
INDICADOR DE ESTABILIDAD POR CROMATOGRAFIA
DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION PARA
PIROXICAM CAPSULAS.



T E S I S

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

Que para obtener el Título de
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
p r e s e n t a
SILVIA NAVA PEREZ



México, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

I N D I C E

	Página
Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Generalidades	2
2.1 Monografía de piroxicam	2
2.2 Métodos analíticos	6
2.2.1 Cromatografía en capa fina	6
2.2.2 Análisis espectrofotométrico	6
2.2.3 Análisis por CLAR	6
2.3 Farmacología de piroxicam	8
2.3.1 Indicaciones	8
2.3.2 Reacciones secundarias	8
2.3.3 Farmacocinética	8
2.3.4 Toxicidad	9
2.3.5 Contraindicaciones	9
2.3.6 Presentación	9
2.3.7 Vía de administración	9
2.3.8 Dosis	9
2.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución	10
2.4.1 Terminología	10
2.4.2 Clasificación	10
2.4.3 Parámetros cromatográficos	12
2.4.3.1 Tiempo de retención	12
2.4.3.2 Tiempo muerto	12
2.4.3.3 Tiempo de retención corregido	12

	Página
2.4.3.4 Factor de capacidad	13
2.4.3.5 Número de platos teóricos	13
2.4.3.6 Altura equivalente a un plato teórico	14
2.4.3.7 Factor de selectividad	14
2.4.3.8 Resolución	15
2.4.4 Equipo	15
2.4.4.1 Recipientes	16
2.4.4.2 Bombas cromatográficas	16
2.4.4.3 Inyector	17
2.4.4.3.1 Inyector manual	17
2.4.4.3.2 Inyector automático	17
2.4.4.4 Columna	17
2.4.4.5 Detector	18
2.4.4.6 Registrador	19
2.4.5 Fase móvil	19
2.4.6 Fase Estacionaria	20
2.5 Validación	20
2.5.1 Evaluación del sistema	21
2.5.1.1 Precisión del sistema	21
2.5.1.2 Linealidad del sistema	22
2.5.2 Evaluación del método	26
2.5.2.1 Especificidad	26
2.5.2.2 Exactitud	27

	Página
2.5.2.3 Linearidad del método	29
2.5.2.4 Precisión del método	32
2.5.2.5 Estabilidad de la muestra	35
2.5.2.6 Tolerancia del sistema	39
2.5.3 Glosario	39
Capítulo 3. Parte experimental	41
3.1 Equipo material y reactivos	41
3.1.1 Equipo	41
3.1.2 Material	41
3.1.3 Reactivos	41
3.2 Desarrollo del método	41
3.3 Validación del método analítico	52
3.3.1 Linearidad del sistema	52
3.3.2 Precisión del sistema	52
3.3.3 Especificidad del método	52
3.3.3.1 Selección de las condiciones óptimas de degradación	52
3.3.3.2 Selección del estándar interno.	54
3.3.3.3 Selección del método analítico	55
3.3.4 Linearidad del método	56
3.3.5 Exactitud del método	56
3.3.6 Precisión	57
3.3.6.1 Repetibilidad	57

	Página
3.3.6.2 Reproducibilidad	57
3.3.7 Estabilidad de la muestra	57
3.3.8 Tolerancia del sistema	57
Capítulo 4. Resultados	58
4.1 Validación del método	58
4.1.1 Linealidad del sistema	58
4.1.2 Precisión del sistema	59
4.1.3 Especificidad	61
4.1.3.1 Selección de las condiciones óptimas de degradación	61
4.1.4 Linearidad del método	65
4.1.5 Exactitud del método al 100%	67
4.1.6 Precisión del método	68
4.1.7 Estabilidad de la muestra	69
4.1.8 Tolerancia	71
Capítulo 5. Conclusiones	72
Capítulo 6. Bibliografía	73

C A P I T U L O 1

I N T R O D U C C I O N

El desarrollo de un medicamento involucra dos parámetros importantes que son:

- a) La selección de los excipientes idoneos para obtener una máxima estabilidad del principio activo.
- b) La selección de las técnicas de cuantificación más adecuadas para este medicamento.

La necesidad de conocer la cantidad de principio activo contenido en un medicamento para asegurar su efecto terapéutico, ha llevado a desarrollar métodos que permitan la evaluación del mismo. Es entonces cuando se requiere la investigación analítica para poder desarrollar un método de cuantificación satisfactorio que sea confiable y se lleve a cabo en un tiempo razonable.

Los estudios de estabilidad se llevan a cabo desde el momento en que se propone una formulación, para asegurar que los componentes no interaccionen entre sí, corroborándolo con un método analítico adecuado.

Para que el método analítico sea indicador de estabilidad tiene que ser capaz de cuantificar el principio activo sin que interfieran los excipientes, los productos de degradación y las sustancias producidas por la interacción de los componentes.

Actualmente en la industria farmacéutica se desarrollan técnicas de análisis que, con la ayuda de instrumentos, permiten obtener métodos que cumplen satisfactoriamente los requisitos para su validación como son : Exactitud, Linearidad, Precisión y Especificidad.

El presente trabajo es un estudio sobre el desarrollo de un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para piroxicam cápsulas, el cual es confiable tanto para la cuantificación de producto en proceso y terminado como para los estudios de estabilidad.

CAPITULO 2

GENERALIDADES

2.1 MONOGRAFIA DE PIROXICAM (1, 2, 3)

NOMBRE GENERICO : Piroxicam

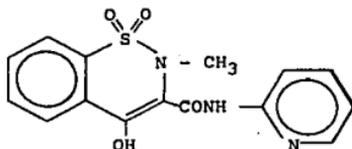
NOMBRES QUIMICOS : 2H-1,2-Benzotiacina-3-carboxamida,4-hidroxi-2-metil-N-2-piridinil-1,1-dióxido.

4-Hidroxi-2-metil-N-2-piridinil-2H-1,2-benzotiacina-3-carboxamida-1,1-dióxido.

3,4-Dihidro-2-metil-4-oxo-N-2-piridil-2H-1,2-benzotiacina-3-carboxamida 1,1-dióxido.

FORMULA CONDENSADA : C₁₅ H₁₃ N₃ O₄ S

FORMULA DESARROLLADA :



PESO MOLECULAR : 331.35

DESCRIPCION : Polvo cristalino blanco amarillento, inodoro e insípido.

SOLUBILIDAD : Muy poco soluble en agua, en ácidos diluidos y en la mayoría de los disolventes orgánicos; poco soluble en alcohol y en soluciones acuosas alcalinas.

IDENTIFICACION:

a) El espectro de absorción infrarrojo de una dispersión de la muestra en bromuro de potasio, exhibe máximos a las siguientes longitudes de onda :

3330	ó	3385	cm ⁻¹	:	-OH y -NH
1635	ó	1625	cm ⁻¹	:	amida carbonilo
1525			cm ⁻¹	:	2ª banda amida
1440			cm ⁻¹	:	-CH ₃ y Ar -C = C-
1355			cm ⁻¹	:	-CH ₃
1115	y	1070	ó 1050	-	1070 cm ⁻¹ : -SO ₂ -N-
770	y	730	ó 740	cm ⁻¹	: fenil orto disustituido

Se muestra espectro en la figura 2.1

b) El espectro de absorción ultravioleta de una solución al 0.001% en solución 0.01N de ácido clorhídrico presenta máximos a 242 y 332 nm y mínimos a 229 y 270 nm.

Se muestra espectro en la figura 2.2

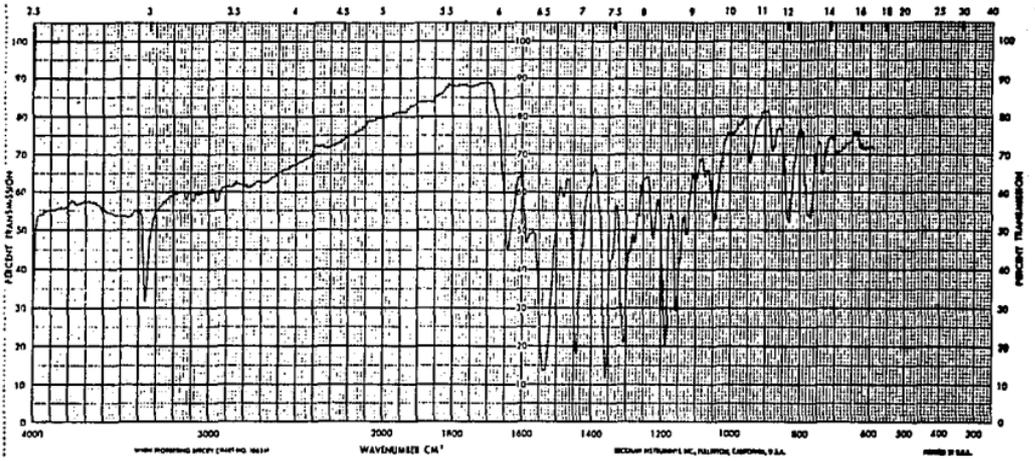
c) Preparar una solución de prueba en una mezcla de cloroformo - metanol (1 : 1) conteniendo 1 mg/ml. Simultáneamente preparar una solución con piroxicam patrón de referencia. Aplicar en una placa de sílica gel de 0.25 mm de espesor en carriles separados, 20 µl de la solución de prueba y de la solución patrón de referencia, dejar secar la cromatoplaca y desarrollarla en un sistema de solventes de tolueno-ácido acético (95 : 5) hasta que el frente llegue a tres cuartas partes de la placa. Retirar la placa de la cámara y secar al aire. Colocar la placa en la cámara y volver a desarrollarla. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y secar al aire. Localizar las manchas en la placa observando bajo luz ultravioleta en longitud de onda corta, el valor de R_f (0.38) de la mancha principal obtenida en la solución de prueba debe corresponder a la obtenida de la solución patrón de referencia.

ENSAYOS DE PUREZA :

- Agua .- Método I <921> : No más de 0.5 %
- Residuo de ignición .- <281> : No más de 0.3 %
- Metales pesados .- Método II <231> : 0.005 %

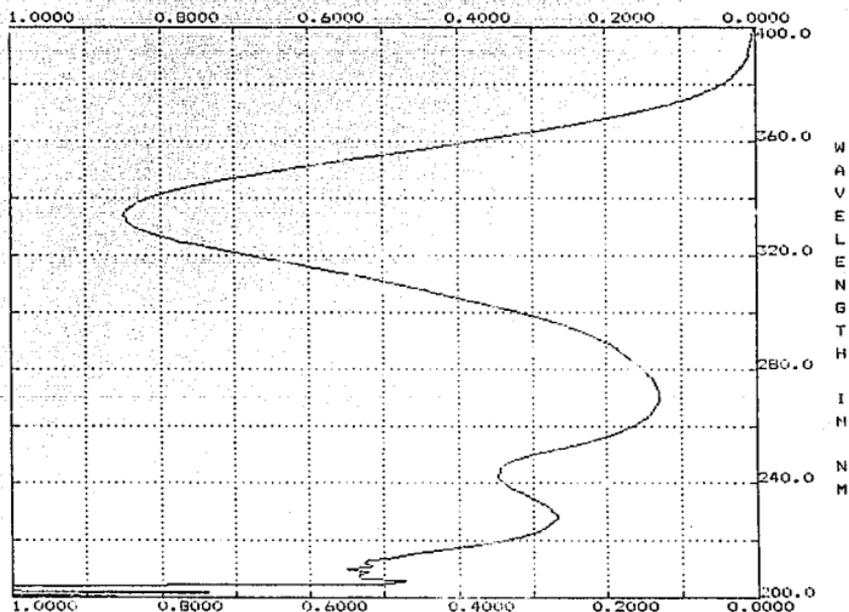
CONSERVACION : En contenedores bien cerrados y protegidos de la luz.

FIG. 2.1 ESPECTRO DE ABSORCION INFRAROJO



BECKMAN
DU-64 SPECTROPHOTOMETER

ABSORBANCE



Scan Speed: 750 nm/min

FIG. 2.2 ESPECTRO DE ABSORCION ULTRAVIOLETA

2.2 METODOS ANALITICOS

2.2.1. Cromatografía en capa fina (3)

Se utiliza para identificación de piroxicam y sus productos de degradación.

Solución patrón de referencia.- Pesar exactamente 50 mg de piroxicam patrón de referencia, colocarlos en un matraz volumétrico de 50 ml, disolver y llevar a volumen con metanol.

Solución de la muestra.- Pesar exactamente 50 mg de piroxicam, colocarlos en un matraz volumétrico de 50 ml, disolver y llevar a volumen con metanol, mezclar y filtrar.

Procedimiento.- Aplicar en una cromatoplaqa cubierta con sílica GF254 en carriles separados 50 mcl de la solución de referencia y 50 mcl de la solución de la muestra, dejar un carril como blanco. Dejar secar y desarrollar en la cámara con una fase móvil de cloroformo : etanol 10:1, hasta que el frente del disolvente cubra tres cuartas partes de la placa. Retirar la placa de la cámara y secar con corriente de aire. Revelar con una lámpara de luz U.V. el Rf del piroxicam debe ser de 0.64 .

2.2.2 ANALISIS ESPECTROFOTOMETRICO (3)

Solución patrón de referencia.- Pesar 10 mg de piroxicam patrón de referencia, pasar a un matraz volumétrico de 100 ml, disolver, llevar a volumen con solución 0.01 N de hidróxido de sodio metanólico y mezclar. Pasar una alícuota de 5 ml a un matraz volumétrico de 100 ml, llevar a volumen con la misma solución y mezclar. (Concentración 5 mcg/ml).

Solución de la muestra.- Pesar 10 mg de piroxicam, pasar a un matraz volumétrico de 100 ml, disolver, llevar a volumen con solución 0.01 N de hidróxido de sodio metanólico y mezclar. Pasar una alícuota de 5 ml a un matraz volumétrico de 100 ml, llevar a volumen con la misma solución y mezclar. (Concentración 5 mcg/ml).

Leer las soluciones en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 333 nm utilizando solución 0.01 N de hidróxido de sodio metanólico como blanco.

2.2.3. ANALISIS POR CLAR (2)

Solución reguladora.- Disolver 7.72 g de ácido cítrico anhidro en 400 ml de agua, transferir a un matraz volumétrico de 1000 ml. Por separado, disolver 5.35 g de fosfato dibásico de sodio en 100 ml de agua, transferir esta solución al matraz volumétrico de 1000 ml, llevar a volumen con agua y mezclar.

Solución patrón de referencia.- Pesar con precisión una cantidad del patrón de referencia equivalente a 12.5 mg de piroxicam, transferir a un matraz volumétrico de 25 ml, disolver y llevar a volumen con solución 0.01N de ácido clorhídrico metanólico, mezclar.

Transferir una alícuota de 10 ml de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100 ml, llevar a volumen con la solución 0.01N de ácido clorhídrico metanólico y mezclar. (Conc. 50 mcg/ml).

Preparación de la muestra.- Pesar con precisión 50 mg de piroxicam, transferir a un matraz volumétrico de 100 ml, disolver y llevar a volumen con solución 0.01 N de ácido clorhídrico metanólico y mezclar. Transferir una alícuota de 10 ml de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100 ml, llevar a volumen con la solución 0.01 N de ácido clorhídrico metanólico y mezclar. (Conc. 50 mcg/ml).

CONDICIONES DEL EQUIPO

Fase móvil : Mezcla de solución reguladora y metanol (55:45), filtrada y desgasificada.

Detector : Ultravioleta.

Longitud de onda : 254 nm

Columna : De 3.9 mm X 30 cm, empacada con partículas de cerámica o sílica porosa de 5 a 10 micras de diámetro, recubiertas químicamente con octadecilsilano.

Flujo : 1.2 ml/minuto.

PROCEDIMIENTO :

Inyectar al cromatógrafo por duplicado, volúmenes iguales, (25 mccl aproximadamente), de la preparación del patrón de referencia y registrar los picos respuesta. La eficiencia de la columna determinada para el pico analítico no debe ser menor de 500 platos teóricos, el factor de coileo para el pico analítico no debe ser mayor de 1.5 y el coeficiente de variación no debe ser mayor de 2.0%.

Una vez cumplidas estas especificaciones, inyectar al cromatógrafo por duplicado, volúmenes iguales, (25 mccl aproximadamente), de la preparación del patrón de referencia y de la preparación de la muestra, obtener sus correspondientes cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales.

2.3 FARMACOLOGIA DE PIROXICAM (4, 5, 6)

Pertenece al grupo más moderno de anti-inflamatorios no esteroideos, posee una estructura química completamente diferente a todos los otros antipiréticos analgésicos. El exponente principal de este grupo es el piroxicam que deriva de la benzotiacina.

2.3.1 INDICACIONES :

El piroxicam es capaz de aliviar el dolor que nace en estructuras somáticas, el dolor inflamatorio principalmente en los animales y en el hombre en caso de fracturas, esguinces y en el pos operatorio. También produce analgesia satisfactoria en las afecciones reumáticas, como en la artritis reumatoide, osteoartritis o artrosis, espondielitis y fibrosis. Tiene acción antiflogística, inhibe la inflamación aguda - eritema, edema, exudación en los animales. En el hombre la acción antiinflamatoria se observa en afecciones reumáticas crónicas de tipo inflamatorio, como artritis del adulto y juvenil, en cuyo caso no solamente disminuye el dolor espontáneo y por compresión articular, sino también la tumefacción, la rigidez y la limitación de los movimientos articulares. Cede el proceso inflamatorio en el ataque agudo de gota, con alivio del dolor, tumefacción y restricción del movimiento. La acción antipirética es similar a la de los salicilatos, con leve disminución de la temperatura corporal en casos de fiebre.

El piroxicam inhibe la síntesis principalmente de las prostaglandinas PGE2, PGF2 alfa, PGD2, PGE1 y PGE2, actuando sobre la enzima ciclooxigenasa o prostaglandinasintetasa. Dicha inhibición enzimática explica el mecanismo de acciones antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas del piroxicam.

2.3.2 REACCIONES SECUNDARIAS :

En dosis usuales algunas veces se puede observar mareo y somnolencia. Tiene acción irritante gástrica y es capaz de provocar trastornos gastrointestinales.

2.3.3 FARMACOCINETICA :

El piroxicam se absorbe fácilmente por todas las vías. Después de la administración oral, la concentración plasmática máxima se observa a las 2.5 horas, para descender luego muy lentamente ya que su vida media es muy prolongada y todavía existe en forma evidente a las 120 horas. Los niveles plasmáticos se encuentran alrededor de 0.3 mg/dl con una dosis diaria de 10 mg. El Fármaco

se encuentra combinado con las proteínas plasmáticas en un 99%. La vida media de eliminación del piroxicam es de alrededor de 40 horas, que es prolongada y permite una sola toma diaria por vía oral.

2.3.4. TOXICIDAD :

El piroxicam no es un fármaco muy tóxico pero puede provocar náuseas, dolor epigástrico, vómito, úlcera y la aparición de sangre oculta en las heces en los tratamientos a largo plazo. Algunas veces puede ocasionar mareos, somnolencia y cefalea, también urticaria y prurito, aunque son raras.

2.3.5. CONTRAINDICACIONES :

Úlcera gastroduodenal activa o reciente, o cuando existe hipersensibilidad al fármaco.

2.3.6. PRESENTACION :

Piroxicam en cápsulas de 20 mg.

2.3.7. VIA DE ADMINISTRACION :

Oral.

2.3.8. DOSIS :

Dosis usual : 20 mg una vez al día. Puede elevarse en casos necesarios a 30 y aún a 40 mg diarios. En los casos agudos 40 mg durante dos días para continuar con dosis de mantenimiento de 20 mg diarios.

2.4 CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION

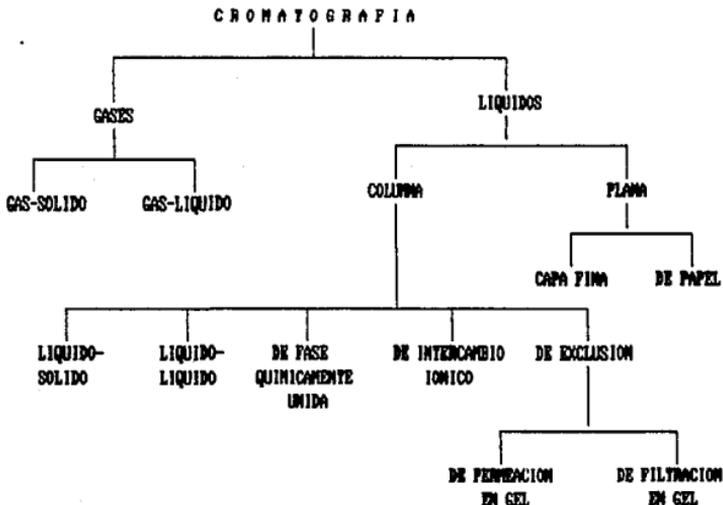
2.4.1 TERMINOLOGIA (7)

Cromatografía es un término general aplicado a una amplia gama de técnicas de separación que esencialmente se basan en la distribución de los componentes a separar entre 2 fases; una de ellas es una fase móvil, la cual puede ser un gas o un líquido, y la otra es una fase estacionaria, la cual a su vez puede ser un líquido o un sólido.

El proceso cromatográfico tiene lugar como resultado de repetidas adsorciones o repartos durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo del lecho estacionario, alcanzándose la separación gracias a las diferencias en los coeficientes de distribución de los distintos componentes de la muestra.

2.4.2 CLASIFICACION (7, 8)

Basándose en la naturaleza de la fase móvil, la cromatografía se divide en cromatografía de gases y cromatografía de líquidos, los cuales a su vez se subdividen al tomar en cuenta la naturaleza de la fase estacionaria, tal y como se muestra en el diagrama siguiente:



Para clasificar la cromatografía líquida en columna, basándose en la naturaleza de la fase estacionaria y en los procesos de separación, se pueden enumerar cuatro tipos.

- Cromatografía de Adsorción.- La fase estacionaria es un adsorbente y la separación se basa en repetidas etapas de adsorción - desorción.

- Cromatografía de Partición.- La separación no se basa en la adsorción, sino en una verdadera partición entre la fase móvil y la fase estacionaria.

- Cromatografía de Intercambio Iónico.- El lecho estacionario tiene una superficie cargada iónicamente, con carga contraria a la de la muestra. Esta técnica se usa casi exclusivamente con compuestos iónicos o ionizables. Cuanto mayor sea la carga de las muestras, más fuertemente será atraída hacia la superficie iónica y, por tanto, más tiempo tardará en ser eluida. La fase móvil es un tampón acuoso en el que el pH y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de elución.

- Cromatografía de Exclusión.- Se rellena la columna con un material que posea poros de dimensiones comprendidas entre ciertos límites, con lo que la muestra es retenida o filtrada según sea su tamaño molecular. Por razones fundamentalmente históricas, esta técnica se llama también filtración sobre geles o cromatografía sobre geles, aunque en la actualidad la fase estacionaria no queda restringida a un "gel".

La cromatografía de líquidos también se clasifica según sea la polaridad relativa de las dos fases: Cromatografía en fase normal y cromatografía en fase reversa.

En la cromatografía en fase normal el lecho estacionario es de naturaleza fuertemente polar (por ejemplo sílice) y la fase móvil es apolar (por ejemplo n-hexano o tetrahidrofurano). Las muestras polares quedan retenidas en la columna durante tiempos mayores que los materiales menos polares o apolares.

La cromatografía en fase reversa es exactamente a la inversa. El lecho estacionario es de naturaleza apolar (hidrocarburo), mientras la fase móvil es un líquido polar, normalmente agua o un alcohol. En este caso, cuanto más apolar sea la muestra, mayor será su retención.

Algunas veces se puede modificar la fase móvil para ajustar su polaridad. En fase normal, puede hacerse por adición de una sustancia más polar, en tanto que en fase reversa el aditivo será una sustancia menos polar.

2.4.3 PARAMETROS CROMATOGRAFICOS (2, 7, 8, 9,)

2.4.3.1 TIEMPO DE RETENCION (t_r)

El tiempo de retención es el tiempo que transcurre desde la inyección hasta el momento en que se obtiene el punto de máxima concentración por la señal o pico, este valor siempre será igual en la misma columna y en las mismas condiciones de trabajo.

$$t_r = t_0 + t'_r$$

2.4.3.2 TIEMPO MUERTO (t_0)

Si un componente no es retenido y sale a la misma velocidad de la fase móvil se le llama t_0 o tiempo muerto, pues es el tiempo en que la fase móvil se traslada de un lado a otro de la columna.

2.4.3.3 TIEMPO DE RETENCION CORREGIDO (t'_r)

Es el tiempo que las moléculas del soluto permanecen en la fase estacionaria.

$$t'_r = t_r - t_0$$

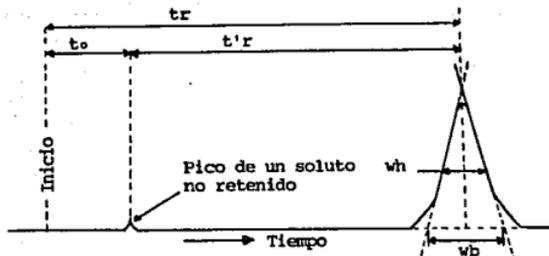


Fig. 2.3 Muestra un cromatograma típico, donde :

t_r = tiempo de retención.
 t_o = tiempo muerto
 t'_r = tiempo de retención corregido.
 w_b = anchura de la base del pico
 w_h = anchura del pico medida al 50 % de la altura total

2.4.3.4 FACTOR DE CAPACIDAD (K)

El factor de capacidad es el tiempo durante el cual puede retenerse cada componente en la columna. La fase estacionaria retarda al soluto en un tiempo t'_r , mientras t_o representa el tiempo que permanece en la fase móvil; por tanto, el cociente entre ambos dará dicho valor, llamado factor de capacidad K.

$$K = \frac{t'_r}{t_o} = \frac{t_r - t_o}{t_o} = \frac{\text{tiempo en la fase estacionaria}}{\text{tiempo en la fase móvil}}$$

Por otra parte conociendo el factor de capacidad, se puede calcular el tiempo de retención de un compuesto.

$$t_r = t_o (1+K)$$

En la práctica hay que esforzarse por conseguir un valor del factor de capacidad por lo menos igual a uno para el primer pico de interés, con el fin de asegurar su separación del disolvente y sus posibles impurezas, las cuales generalmente se eluyen a un tiempo igual o muy próximo a t_o .

2.4.3.5 NUMERO DE PLATOS TEORICOS (N)

La eficiencia de la columna se mide por los platos teóricos N, estos miden el ensanchamiento de la banda del soluto a medida que pasa a través de la columna. Los platos teóricos se calculan directamente del cromatograma.

Utilizando el método de las tangentes, N se determina de acuerdo con la siguiente fórmula.

$$N = 16 \left[\frac{t_r}{w_b} \right]^2$$

Donde :

N = Número de platos teóricos.
 t_r = Tiempo de retención del soluto.
 w_b = Ancho del pico en la base.

Se trazan dos tangentes por los puntos de inflexión y se mide la longitud de la línea base donde cortan las tangentes. Ver figura 2.4.

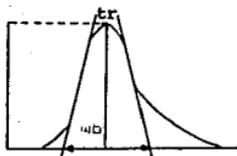


Fig. 2.4

2.4.3.6 ALTURA EQUIVALENTE A UN PLATO TEÓRICO (AEPT)

Es la longitud de la columna necesaria para generar un plato teórico y se calcula de la siguiente manera :

$$AEPT = \frac{L}{N}$$

Donde :

AEPT = Altura equivalente a un plato teórico.

L = Longitud de la columna.

N = Número de platos teóricos.

2.4.3.7 FACTOR DE SELECTIVIDAD (α)

El factor de selectividad es la relación del tiempo que dos picos permanecen en la fase estacionaria. Debido a que en ésta fase es en donde se lleva a cabo la separación de acuerdo a la interacción que haya con cada uno de los compuestos, la salida de la columna será más rápida o más lenta.

Si el valor es $\alpha = 1$ los dos picos tienen solubilidades iguales con respecto a la fase estacionaria y no se realiza la separación, así mientras más elevados sean los valores de α , mayor la selectividad de la fase estacionaria y más fácil la separación.

$$\alpha = \frac{tr(B) - t_0}{tr(A) - t_0}$$

Donde :

$t_r (A)$ y $t_r (B)$ = Tiempo de retención del soluto A y B
 t_o = Tiempo muerto.

2.4.3.8 RESOLUCION (R)

La resolución es una medida de la capacidad que tiene una columna para separar dos picos y es definida como la distancia que hay entre el centro de los picos, dividida entre el promedio del ancho de los mismos.

$$R = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{1/2 (wb_1 + wb_2)} = \frac{\Delta t}{1/2 (wb_1 + wb_2)}$$

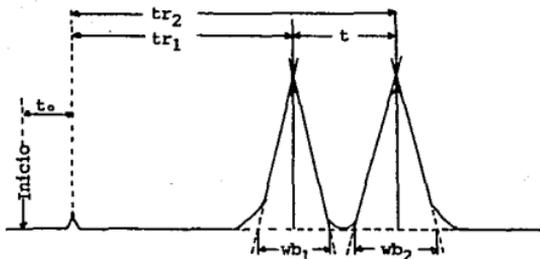


Fig. 2.5 Ilustración de valores medidos sobre un cromatograma con dos picos muy cercanos.

2.4.4 EQUIPO (7, 8, 9, 10, 11)

Los componentes esenciales que forman parte de un cromatógrafo de líquidos son : Recipientes, bomba, inyector, columna, detector, y registrador. (fig. 2.6).

2.4.4.1 RECIPIENTES

Su misión será contener los disolventes que se emplean como fase móvil. Su forma puede variar desde el propio frasco en que comercialmente viene contenido el solvente hasta un complejo sistema capaz de filtrar, degasificar, etc., el solvente.

El recipiente debe taparse de manera conveniente. A través del tapón pasa el tubo que conduce la fase móvil a la cámara de mezcla primero y a la bomba después, este tubo succionador, de acero o de teflón, finaliza en un filtro que garantiza la limpieza física del solvente.

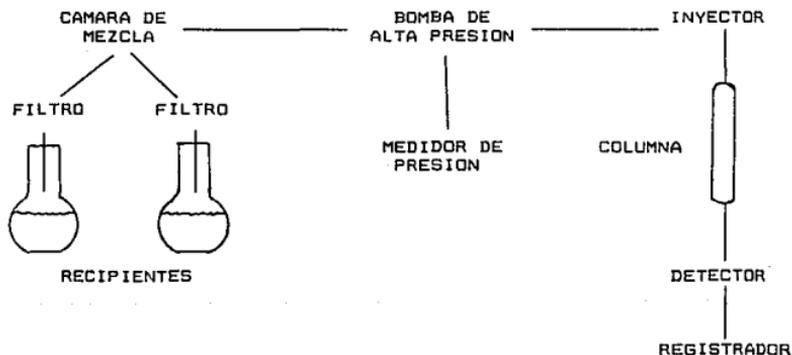


Fig. 2.6 Representación de los componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos.

2.4.4.2 BOMBAS CROMATOGRAFICAS

Se entiende por bomba cromatográfica aquel dispositivo o sistema capaz de proporcionar a la fase móvil la presión necesaria para que, operando al flujo o velocidad precisa, atraviese la columna cromatográfica.

El objetivo principal de cualquier bomba destinada a usarse en CLAR consiste en entregar a la columna un flujo de fase móvil constante, confiable y preciso bajo varias condiciones de presión; no importa cuantos pistones tenga la bomba, entre mejor haga la entrega de disolvente mejor será la bomba.

2.4.4.3 INYECTOR

Toda separación depende en gran medida de que la muestra llegue en forma adecuada a la columna; esto requiere un inyector que se coloca entre la bomba de alta presión y la columna. La mejor manera de introducir la muestra es en pequeña cantidad, ya que ayuda a obtener picos angostos y simétricos.

2.4.4.3.1 INYECTOR MANUAL

La manera más sencilla de introducir la muestra, es utilizando una jeringa, donde por medio de un abrir y cerrar de válvulas manualmente, se desvía el flujo de la fase móvil mientras se aplica la muestra en la cámara de carga (loop) y luego se reanuda a través de él completándose la inyección.

2.4.4.3.2. INYECTOR AUTOMATICO

Inyecta por sí solo las muestras disminuyendo el error en la medición del volumen a inyectar y aumentando la reproducibilidad de las inyecciones.

2.4.4.4 COLUMNA

En todo sistema cromatográfico, la columna es el corazón del sistema puesto que en ella se lleva efecto la separación de los componentes de la mezcla en estudio.

Básicamente la columna consiste en un segmento de tubo de algún material inerte, de diámetro uniforme y capaz de resistir altas presiones. De entre todos los materiales, el acero inoxidable es el más usado.

La longitud de la columna varía entre 5 y 50 cm y están rellenas de partículas de diámetro muy pequeño (5-15 μm). El diámetro interno de las columnas está generalmente comprendido entre 2 y 5 mm. Con respecto a la forma o geometría de la columna, por regla general, se prefieren las rectas.

Los materiales usados para empacar la columna son de dos tipos, superficialmente poroso o pelicular y totalmente poroso.

El adsorbente pelicular consiste de partículas esféricas generalmente vitreas, no porosas, recubiertas de una capa muy fina de adsorbente poroso, como gel de sílice o alúmina. El espesor de esta capa es 1/40 del diámetro total de la partícula. Las moléculas de soluto pueden penetrar a la capa superficial pero no al soporte sólido.

El adsorbente totalmente poroso tiene un tamaño de partícula de 3 a 20 micras y su distribución de tamaño de partícula está perfectamente controlada. Tiene una amplia superficie para interaccionar con los solutos y tiene un tamaño promedio de poro de aproximadamente 80 Å permitiendo que la mayoría de la sustancias se difundan dentro de los poros. La sílica gel es el material que se usa con mayor frecuencia.

Aunque no forman parte de la columna como tal, las conexiones entre columnas, así como entre columna detector o el inyector, deben ser herméticas y de tamaño pequeño. En los extremos de la columna se coloca un disco de metal o teflón poroso para evitar que el relleno de la columna se afloje o se pierda y se produzcan caídas de presión muy grandes.

Actualmente las columnas de CLAR se han desarrollado con un alto grado de eficiencia (aproximadamente 10 000 platos teóricos por metro de columna).

2.4.4.5 DETECTOR

Durante mucho tiempo el desarrollo de la cromatografía en fase líquida se vió obstaculizado por falta de detectores adecuados. El detector ideal sería aquel que cumpliera con los siguientes requisitos: Altamente sensible, estable, de lectura continua y de respuesta universal.

Al considerar un detector en términos de aplicación a un cierto problema, deben tenerse en cuenta ciertas propiedades generales, tales como:

Respuesta.- Puede ser universal o selectiva, según la capacidad que tenga el detector de trabajar con todo tipo de muestras o solo con un tipo específico.

Sensibilidad.- La sensibilidad de un detector se define como la relación entre la señal generada y la cantidad de muestra que produce dicha señal.

Ruido.- Es la variación en la señal del instrumento que no es atribuida a la muestra y que puede ser producida por fallas electrónicas, variaciones de flujo o temperatura, fluctuaciones en el voltaje, burbujas de aire atrapadas en el detector, etc.

Linealidad.- para utilizar la señal generada por el detector como una medida cuantitativa, dicha señal debe guardar una relación lineal con la concentración de la muestra, esta propiedad se conoce como linealidad.

El intervalo lineal de un detector se puede definir como la relación entre las concentraciones máximas y mínimas respecto a las cuales la respuesta del detector es lineal.

Estabilidad.- Un buen detector debe ser insensible a los cambios de temperatura y a la variación de flujo a la vez de ser compatible con programaciones de fase móvil.

Actualmente en CLAR se utilizan principalmente los detectores ópticos. En estos detectores se hace pasar la corriente líquida a través de una microbureta de pequeño volumen (aproximadamente 10 mcl), la cual es atravesada por un rayo de luz y se detectan variaciones en la intensidad de la luz causadas por absorción ultravioleta, emisión de fluorescencia, o cambio en el índice de refracción, (según el tipo de detector utilizado), que resulta de la interacción con los componentes de la muestra que pasan sucesivamente a través de la cubeta.

El detector más usado en CLAR es el de absorción ultravioleta. Un detector de este tipo, de longitud de onda variable, capaz de controlar desde 190 a 800 nm, resulta adecuado para la detección de casi todas las muestras.

2.4.4.6 REGISTRADOR

Su función es representar en un registro gráfico la señal proporcionada por el detector. Generalmente se utilizan registradores potenciométricos de 1 o 10 milivoltios.

Otras características deseables de los registradores son respuesta rápida de la pluma y velocidad variable del papel.

2.4.5 FASE MOVIL (10)

Aunque la fase móvil no es parte del instrumental propiamente dicho, el control de la presión, el flujo y la composición de la misma, son muy importantes. Las características que debe presentar toda fase móvil para ser utilizada en cromatografía líquida son las siguientes :

- Disolver la muestra.
- No degradar o disolver la fase estacionaria.
- Tener baja viscosidad.
- Ser compatible con el detector utilizado.
- Tener alta pureza.

Muchas veces, en especial con fases móviles polares hay una marcada tendencia del oxígeno y otros gases a disolverse en el líquido. Si estos gases se gasifican dentro del instrumento y forman burbujas pueden afectar seriamente el funcionamiento del detector y la eficiencia de la columna. La fase móvil se degasifica usando vacío o un baño ultrasónico.

2.4.6 FASE ESTACIONARIA (B)

Al igual que en cualquier proceso cromatográfico, la separación en cromatografía líquida se lleva a cabo mediante interacciones entre la muestra y la fase estacionaria. Por consiguiente, la apropiada selección de esta última representa una decisión clave en cromatografía de líquidos.

El tamaño de partícula es muy importante, para que la fase móvil y la muestra disuelta difundan con facilidad. En la práctica con el fin de aproximarse a la condición ideal, las partículas de relleno deben de ser tan pequeñas como sea posible, para que la muestra este en contacto con la mayor superficie posible de la fase estacionaria.

Existe, sin embargo, un límite inferior de tipo práctico. Aproximadamente por debajo de unos $3\mu\text{m}$ de diámetro, las partículas empiezan a empaquetarse de manera tan compacta que el líquido no puede bombearse con facilidad a lo largo de la columna. La mayoría de las columnas comercialmente asequibles hoy en día contienen rellenos con partículas cuyo tamaño promedio es de $5-15\mu\text{m}$, en tanto que en muchos rellenos pelliculares presentan tamaños de $37-42\mu\text{m}$.

2.5 VALIDACION (12, 13, 14, 15 y 16)

La validación de un método analítico puede definirse como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa, en este caso, en términos de parámetros analíticos.

La validación de un método analítico depende básicamente de la determinación de su : Especificidad, Exactitud, Precisión, Linealidad, Estabilidad de la muestra y Tolerancia del sistema.

La validación incluye dos partes :

- 1a SISTEMA
- Precisión
- Linealidad

2ª METODO

- Especificidad
- Exactitud
- Linealidad
- Precisión
- Estabilidad de la muestra
- Tolerancia

2.5.1 EVALUACION DEL SISTEMA

2.5.1.1 PRECISION DEL SISTEMA

Es el grado de concordancia de medidas individuales de un proceso y se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100 % establecido en la linealidad del sistema.

- CRITERIO :

$$CV \leq 1.5 \%$$

- CALCULOS :

a) Tabular los resultados.

$$y_1, y_2, y_3, \dots, y_N$$

b) Cálculos preliminares.

$$\Sigma y = y_1 + y_2 + y_3 + \dots + y_N$$

$$\Sigma y^2 = y_1^2 + y_2^2 + y_3^2 + \dots + y_N^2$$

$$\bar{y} = \frac{\Sigma y}{N}$$

$$DE = \left[\frac{N (\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{N (N-1)} \right]^{1/2}$$

c) Cálculos finales.

Coefficiente de variación :

$$CV = \frac{DE}{y} \times 100$$

2.5.1.2 LINEARIDAD DEL SISTEMA

La linealidad de un sistema es la habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

Se determina, construyendo una curva de calibración (concentración vs respuesta medida), utilizando cuando menos cinco diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo análisis cuando menos por duplicado para cada dilución.

El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método ; para control de calidad y de seguimiento de la estabilidad de un fármaco en una forma farmacéutica, deberá estar incluida la concentración seleccionada como 100 % .

- CRITERIOS :

$$CV \leq 1.5 \%$$

$$r \geq 0.99$$

$$r^2 \geq 0.98$$

- CALCULOS :

a) Tabular los resultados en base al siguiente formato:

Concentración de la dilución de la solución patrón (x)	Propiedad medida (y)
x_1	$y_{11} , y_{12} \dots y_{1n}$
x_2	$y_{21} , y_{22} \dots y_{2n}$

x_3	y_{31}	y_{32}	y_{3n}
.
.
x_t	y_{t1}	y_{t2}	y_{tn}

t = número de diluciones.

n = número de replicaciones (propiedad medida) de cada dilución de la solución patrón.

Para proceder a los siguientes cálculos, es necesario que el número de replicaciones por dilución sean equivalentes.

b) Cálculos preliminares para coeficiente de correlación y coeficiente de determinación :

$$\Sigma x = n (x_1 + x_2 + \dots + x_t)$$

$$\Sigma y = y_{11} + y_{12} + \dots + y_{1n} + y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n} + \dots + y_{t1} + \dots + y_{t2} + \dots + y_{tn}$$

$$\Sigma x^2 = n (x_1^2 + x_2^2 + \dots + x_t^2)$$

$$\Sigma y^2 = y_{11}^2 + y_{12}^2 + \dots + y_{1n}^2 + y_{21}^2 + y_{22}^2 + \dots + y_{2n}^2 + \dots + y_{t1}^2 + y_{t2}^2 + \dots + y_{tn}^2$$

$$\Sigma xy = x_1 (y_{11} + y_{12} + y_{1n}) + x_2 (y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n}) + \dots + x_t (y_{t1} + y_{t2} + \dots + y_{tn})$$

c) Cálculos finales para coeficiente de correlación y coeficiente de determinación.

$$r = \left[\frac{[nt \sum(xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[nt \sum(x^2) - (\sum x)^2] [nt \sum(y^2) - (\sum y)^2]} \right]^{1/2}$$

$$r^2 = \frac{[nt \sum(xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[nt \sum(x^2) - (\sum x)^2] [nt \sum(y^2) - (\sum y)^2]}$$

d) Cálculos preliminares para el coeficiente de variación:

- Calcular para cada punto de la linealidad del sistema el siguiente factor:

$$F = \frac{\text{propiedad medida (y)}}{\text{conc. de la dilución de la soluc. patrón (x)}}$$

$$F_{11} = \frac{y_{11}}{x_1}$$

$$F_{12} = \frac{y_{12}}{x_1}$$

$$F_{1n} = \frac{y_{1n}}{x_1}$$

.

.

.

$$F_{t1} = \frac{y_{t1}}{x_t}$$

$$F_{t2} = \frac{y_{t2}}{x_t}$$

$$F_{tn} = \frac{y_{tn}}{x_t}$$

- Calcular la suma de factores, la suma de cuadrados de factores y la media del factor :

$$\Sigma F = F_{11} + F_{12} + F_{1n} + \dots + F_{t1} + F_{t2} + F_{tn}$$

$$\Sigma F^2 = F_{11}^2 + F_{12}^2 + F_{1n}^2 + \dots + F_{t1}^2 + F_{t2}^2 + F_{tn}^2$$

$$\bar{F} = \frac{\Sigma F}{N}$$

Donde :

N = número de puntos de la linealidad del sistema.

e) Cálculos finales para el coeficiente de variación :

$$DE = \left[\frac{N (\Sigma F^2) - (\Sigma F)^2}{N (N - 1)} \right]^{1/2}$$

$$CV = \frac{DE}{F} \times 100$$

2.5.2 EVALUACION DEL METODO

2.5.2.1 ESPECIFICIDAD

Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

- ESPECIFICIDAD PARA METODOS DE CONTROL DE CALIDAD

Con el método propuesto :

- a) Analizar placebos del producto.
- b) Identificar las respuestas del (los) activo (s), y si procede de los excipientes y/o de otras sustancias presentes .

CRITERIO :

Confirmar que el método desarrollado es capaz de cuantificar la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes.

- ESPECIFICIDAD PARA METODOS INDICADORES DE ESTABILIDAD

En caso de contar con los posibles productos de degradación, preparar muestras con placebo "añadido" de estos y la sustancia de interés, analizar con el método propuesto.

Si no se cuenta con los productos de degradación, es necesario degradar la muestra bajo diferentes condiciones. La degradación debe ser tal, que la concentración de la sustancia en estudio esté disminuida por lo menos en un 25 % con respecto a la original.

Se sugieren los siguientes métodos para degradar la sustancia; la persona que realice el estudio deberá escoger aquel que, de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas del compuesto, sea el más adecuado :

a) Colocar la sustancia de interés el placebo y muestras del lote del producto en un horno a 70-120°C o a 20°C por debajo del punto de fusión de la sustancia de interés durante un apropiado número de días (dos a cuatro semanas).

b) Exponer la sustancia de interés, el placebo y muestras del lote del producto a la luz UV o a la luz fluorescente y/o a humedad.

c) Si es necesario, hacer soluciones de la sustancia de interés ajustando el pH a 1-2 y/o a 10-12 y colocarlas a 60°C-80°C durante dos a cuatro semanas.

d) Si se trata de formas farmacéuticas líquidas o semi sólidas pueden degradarse por oxidación (con peróxido de hidrógeno) y permanecer de dos a cuatro semanas a temperatura ambiente ; y/o por hidrólisis (pH 1-2 y 10-12), colocando las muestras a 60°C - 80°C durante dos a cuatro semanas.

CRITERIO :

Verificar que los productos de degradación y/o sustancias relacionadas no interfieran con la cuantificación de la sustancia de interés utilizando el método desarrollado.

Ajustar las condiciones de operación para obtener la máxima resolución.

2.5.2.2 EXACTITUD

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

Se determina de cuando menos seis placebos cargados, de manera independiente, con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100 %, utilizando el método propuesto. Haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

CRITERIO :

El porcentaje recuperado y el CV deberán estar de acuerdo con la tabla I.

TABLA I

MÉTODOS :		
Cromatográficos	98 - 102 %	≤ 2 %
Titrimétricos	98 - 102 %	≤ 2 %
Químicos y espectrofotométricos	97 - 103 %	≤ 3 %
Microbiológicas	95 - 105 %	≤ 5 %

Para suspensiones y semisólidos en los métodos cromatográficos y titrimétricos se acepta una ampliación del 1 % en el intervalo expresado en el promedio de recobro y el CV ≤ 3 %.

CÁLCULOS :

a) Tabular los resultados del porcentaje recuperado (R), con base al siguiente formato :

$$R_1, R_2, R_3, \dots, R_N$$

b) Cálculos preliminares :

$$ER = R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_N$$

$$ER^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + \dots + R_N^2$$

$$\bar{R} = \frac{\sum R}{N}$$

$$DE = \left[\frac{N \sum R^2 - (\sum R)^2}{N(N-1)} \right]^{1/2}$$

c) Cálculos finales :

Coeficiente de variación.

$$CV = (DE / \bar{R}) 100$$

2.5.2.3 LINEARIDAD DEL METODO :

Se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos tres diferentes cantidades de la sustancia de interés, (placebos cargados), cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado.

Las concentraciones de los placebos cargados deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema, incluyendo siempre la correspondiente al 100 % .

La amplitud del estudio dependerá del uso y aplicaciones del método, (control de calidad, estudios de estabilidad, etc.) y deberá llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

CRITERIO :

Cantidad adicionada vs cantidad recuperada: $m \approx 1$, $b \approx 0$, $r^2 \geq 0.98$.

Porcentajes recuperados : Los CV a cada nivel y los globales de todo el intervalo de la linealidad deben estar de acuerdo a la Tabla I.

CALCULOS :

1º Cantidad adicionada - Cantidad recuperada

a) Tabular los resultados con base al siguiente formato :

Cantidad adicionada (x)	Cantidad recuperada (y)
$x_{11} , x_{12} , \dots , x_{1n}$	$y_{11} , y_{12} , \dots , y_{1n}$
$x_{21} , x_{22} , \dots , x_{2n}$	$y_{21} , y_{22} , \dots , y_{2n}$
.....
$x_{t1} , x_{t2} , \dots , x_{tn}$	$y_{t1} , y_{t2} , \dots , y_{tn}$

t = número de cantidades adicionadas

n = número de replicaciones (cantidad recuperada) por cada cantidad adicionada.

Para proceder a los siguientes cálculos, es necesario que el número de cantidades recuperadas (replicaciones) de cada cantidad adicionada, sean equivalentes.

b) Cálculos preliminares :

$$\Sigma x = x_{11} + x_{12} + \dots + x_{1n} + x_{21} + x_{22} + \dots + x_{2n} + \dots + x_{t1} + x_{t2} + \dots + x_{tn}$$

$$\Sigma y = y_{11} + y_{12} + \dots + y_{1n} + y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n} + \dots + y_{t1} + y_{t2} + \dots + y_{tn}$$

$$\Sigma x^2 = x_{11}^2 + x_{12}^2 + \dots + x_{1n}^2 + x_{21}^2 + x_{22}^2 + \dots + x_{2n}^2 + \dots + x_{t1}^2 + x_{t2}^2 + \dots + x_{tn}^2$$

$$\Sigma y^2 = y_{11}^2 + y_{12}^2 + \dots + y_{1n}^2 + y_{21}^2 + y_{22}^2 + \dots +$$

$$y_{2n}^2 + \dots + y_{t1}^2 + y_{t2}^2 + \dots + y_{tn}^2$$

$$\Sigma xy = x_{11} y_{11} + x_{12} y_{12} \dots + x_{1n} y_{1n} + x_{21} y_{21} +$$

$$x_{22} y_{22} + \dots + x_{2n} y_{2n} + x_{t1} y_{t1} + x_{t2} y_{t2}$$

$$+ \dots + x_{tn} y_{tn}$$

c) Cálculos finales :

$$m = \frac{nt (\Sigma xy) - (\Sigma x) (\Sigma y)}{nt (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2}$$

$$b = \frac{\Sigma y - m (\Sigma x)}{nt}$$

$$r^2 = \frac{[nt (\Sigma xy) - (\Sigma x) (\Sigma y)]^2}{[nt (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2] [nt (\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]}$$

29 Porcentaje recuperado

Cálculo el porcentaje recuperado (R) para cada cantidad recuperada, con la siguiente ecuación :

$$R = (y / x) 100$$

a) Tabular los resultados :

$$R_1, R_2, R_3, \dots, R_N$$

b) Cálculos preliminares :

$$\Sigma R = R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_N$$

$$\Sigma R^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + \dots + R_N^2$$

$$\bar{R} = (\Sigma R)/N \quad DE = \left[\frac{N (\Sigma R^2) - (\Sigma R)^2}{N (N - 1)} \right]^{1/2}$$

c) Cálculos finales :

Coefficiente de variación :

$$CV = (DE/\bar{R}) 100$$

2.5.2.4 PRECISION DEL METODO

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestras de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación.

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

a) REPETIBILIDAD.- Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.)

b) REPRODUCIBILIDAD.- Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos etc.)

Se determina de una muestra homogénea del producto cercana al 100 % de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado.

CRITERIO :

El CV total debe cumplir con los siguientes criterios.

<u>METODOS</u>	CV
Cromatográficos	≤ 2 %
Químicos y Espectrofotométricos	≤ 3 %
Microbiológicos	≤ 5 %

NOTA : - Dependiendo de la naturaleza de la muestra el CV puede incrementarse.

CALCULOS :

El siguiente procedimiento únicamente es aplicable cuando se utilicen dos días dos analistas y tres determinaciones.

a) Tabular los resultados con base en el siguiente formato :

ANALISTA

		ANALISTA	
		1	2
DIA	1	y_{111}	y_{211}
		y_{112}	y_{212}
		y_{113}	y_{213}
	2	y_{121}	y_{221}
		y_{122}	y_{222}
		y_{123}	y_{223}

b) Cálculos preliminares :

$$y \dots = y_{111} + y_{112} + y_{113} + y_{121} + y_{122} + y_{123} + y_{211} + y_{212} + y_{213} + y_{221} + y_{222} + y_{223}$$

$$\Sigma y^2 \dots = y_{111}^2 + y_{112}^2 + y_{113}^2 + y_{121}^2 + y_{122}^2 + y_{123}^2 + y_{211}^2 + y_{212}^2 + y_{213}^2 + y_{221}^2 + y_{222}^2 + y_{223}^2$$

$$\bar{y} = y \dots / N$$

$$DE = \left[\frac{N (\Sigma y^2) - (y \dots)^2}{N (N-1)} \right]^{1/2}$$

N = número total de determinaciones
(en este caso específico N = 12)

c) Cálculos finales :

Coefficiente de variación

$$CV = (DE / \bar{y}) \cdot 100$$

2.5.2.5 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de mantener su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de mantenerse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de tres muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones.

Almacenar las muestras analizadas bajo distintas condiciones (por ejemplo temperatura ambiente, refrigeración, protegidas de la luz etc.), durante un tiempo preestablecido por el analista dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia. Reanalizarlas bajo las mismas condiciones de operación, utilizando una solución de referencia recientemente preparada, para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido en el método analítico. La determinación debe ser efectuada por un mismo analista.

CRITERIO :

La muestra es estable si el IC para la diferencia de la media de los resultados de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto no exceda los siguientes porcentajes con respecto al 100 %:

MÉTODOS

Cromatográficos	± 2 %
Titrimétricos	± 2 %
Químicos y Espectrofotométricos	± 3 %
Microbiológicos	± 5 %

CÁLCULOS :

a) Tabular los resultados con base al siguiente formato y calcular los resultados indicados :

CONDICION / TIEMPO

INICIAL	1	2	m
y_1	y_4	y_7	y_{n-2}
y_2	y_5	y_8	y_{n-1}
y_3	y_6	y_9	y_n

b) Cálculos preliminares para el intervalo de confianza :

MEDIA	\bar{y}_0	\bar{y}_1	\bar{y}_2	\bar{y}_m
VARIANZA	s_0^2	s_1^2	s_2^2	s_m^2

Varianza ponderada :

$$Sp^2 = \frac{2s_0^2 + 2s_1^2}{2(c+1)}$$

$$Sp^2 = \frac{2s_0^2 + 2s_2^2}{2(c+1)}$$

$$Sp^2 = \frac{2s_0^2 + 2s_m^2}{2(c+1)}$$

c) Cálculos finales para el intervalo de confianza :

Para cada condición x tiempo :

$$IC = (\bar{Y}_1 - \bar{Y}_0) \pm t^* \times \sqrt{Sp_1^2 \left[\frac{2}{3} \right]}$$

Donde :

* = Valor de la t de Dunnett con c comparaciones y 2 (c + 1) grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975.

d) Cálculos preliminares para el coeficiente de variación
Para cada condición / tiempo / muestra calcular el factor (I) con la siguiente fórmula :

$$I = \frac{(\text{análisis muestra / condición / tiempo})_i}{(\text{análisis inicial}_i)} \times 100$$

$$I_1 = \frac{Y_4}{Y_1} \times 100$$

$$I_2 = \frac{Y_5}{Y_2} \times 100$$

$$I_3 = \frac{Y_6}{Y_3} \times 100$$

$$I_4 = \frac{Y_7}{Y_1} \times 100$$

$$I_5 = \frac{Y_8}{Y_2} \times 100$$

$$I_6 = \frac{Y_9}{Y_3} \times 100$$

$$I_7 = \frac{Y_{n-2}}{Y_1} \times 100$$

$$I_8 = \frac{Y_{n-1}}{Y_2} \times 100$$

$$I_9 = \frac{Y_n}{Y_3} \times 100$$

Para cada condición / tiempo calcular la media del factor (I) con la siguiente fórmula :

$$\bar{I} = \frac{\sum I (\text{condición / tiempo})}{N}$$

Donde :

N = número de muestras por cada condición / tiempo

$$\bar{I}_1 = \frac{I_1 + I_2 + I_3}{3}$$

$$\bar{I}_2 = \frac{I_4 + I_5 + I_6}{3}$$

$$\bar{I}_3 = \frac{I_7 + I_8 + I_9}{3}$$

La media del factor (I) para cada condición / tiempo deberá cumplir con los siguientes criterios :

<u>METODOS</u>	VALOR DE \bar{I}
Cromatográficos	98 - 102 %
Titrimétricos	98 - 102 %
Químicos y espectrofotométricos	97 - 103 %
Microbiológicos	95 - 105 %

2.5.2.6 TOLERANCIA DEL SISTEMA

La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, sistemas de elución tipos de empaque (soporte, fase estacionaria, etc.), condiciones ambientales, etc.

2.5.3 GLOSARIO

b = Ordenada al origen o intercepto

r = Coeficiente de correlación

r² = Coeficiente de determinación

CV = Coeficiente de variación

IC = Intervalo de confianza al 95 %

Σ = Sumatoria

m = Pendiente
 n = Número de replicaciones
 t = Número de diluciones o número de cantidades adicionadas
 \bar{y} = Media aritmética
 N = Número total de determinaciones
 DE = Desviación estándar
 x = Dilución o cantidad adicionada
 y = Propiedad medida o cantidad recuperada
 R = Porcentaje recuperado
 \bar{R} = Promedio aritmético del porcentaje recuperado
 t = Valor de la distribución t de Student con una probabilidad acumulada de 0.975
 t^* = Valor de la distribución t de Dunnett con una probabilidad acumulada de 0.975
 Sp^2 = Varianza ponderada
 $LSIC$ = Límite superior del intervalo de confianza al 95 %
 $LIIC$ = Límite inferior del intervalo de confianza al 95 %
 F = Valor de la distribución F de Fisher con una probabilidad acumulada 0.975
 DEp = Desviación estándar ponderada
 gl = Grados de libertad
 $y...$ = y total

 F = factor para cálculos en la Linearidad del sistema
 I = factor para cálculos en la Estabilidad de la muestra
 c = número de comparaciones en la prueba de t de Dunnett

C A P I T U L O 3

P A R T E E X P E R I M E N T A L

3.1 EQUIPO MATERIAL Y REACTIVOS

3.1.1 EQUIPO

- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución equipado con :

Bomba Waters modelo 600 E
Inyector manual Waters modelo U6K
Detector Waters modelo 484 de longitud de onda variable.
Integrador Waters modelo 745 B

- Columna micro Bondapak C_{18} de acero inoxidable de 3.9 mm x 30cm y 10 micras de tamaño de partícula.
- Baño de ultrasonido Fisher Scientific.
- Agitador mecánico Elecsa.
- Balanza analítica Mettler AJ 150
- Potenciómetro Beckman modelo 40 pH Meter.

3.1.2 MATERIAL

- Microjeringa Hamilton de 25 mcl.
- Equipo de filtración Millipore.
- Membranas de filtración Millipore Tipo HV de 0.45 μ m
- Material de vidrio comunmente usado en el Laboratorio.

3.1.3 REACTIVOS

- Agua HPLC.
- Metanol HPLC.
- Metanol R.A.
- Acido fosfórico.
- Fosfato dibásico de sodio heptahidratado.
- Piroxicam Sustancia Patrón de Referencia.
- Naproxeno Sustancia Patrón de Referencia.

3.2 DESARROLLO DEL METODO

Lo primero que se hizo fue estandarizar una cantidad de materia prima de piroxicam para contar con un patrón de referencia secundario de pureza conocida, el cual se utilizó en el desarrollo del método y su validación.

Se decidió desarrollar un método para la valoración de piroxicam cápsulas, debido a que el de la USP XXII no es confiable ya que desde el principio no se estabiliza el sistema y da unos picos como se muestra en la figura 3.1

El sistema cromatográfico que recomienda la USP XXII es el siguiente:

BUFFER.- Disolver 7.72 g de ácido cítrico anhidro en 400 ml de agua y por separado disolver 5.35 g de fosfato de sodio dibásico en 100 ml de agua. Adicionar la solución de fosfato a la solución de ácido cítrico, diluir con agua a 1000 ml y mezclar.

FASE MOVIL : Buffer: Metanol 55:45

COLUMNA : μ Bondapak C_{18} de 30 cm de largo por 3.9 mm de diámetro interno y de 5 a 10 micras de tamaño de partícula.

DETECTOR : UV

LONGUITUD DE ONDA : 254 nm.

FLUJO : 1.2 ml/min.

VOLUMEN DE INYECCION : 25 μ l.

Para probar el método farmacopéico se utilizaron muestras de piroxicam en ácido clorhídrico metanólico 0.01N a una concentración de 50 mcg/ml.

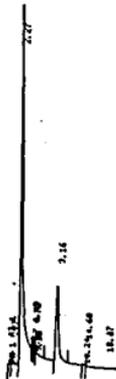


FIG. 3.1 SISTEMA CROMATOGRAFICO USP XXII

En base a que con el método de la USP XXII no se puede cuantificar el piroxicam se decidió cambiar las condiciones cromatográficas.

METODO CROMATOGRAFICO 1.- Es el resultado de las modificaciones de un método reportado en la literatura (3).

Fase móvil : Isopropanol : Acido acético : Agua (30:1:70).

Columna : μ Bondapack C_{18} de 10 μ de tamaño de partícula.

Longitud de onda : 254 nm

Flujo : 0.8 ml/min.

Concentración : 100 mcg/ml en metanol.

Volumen de inyección : 25 μ l

Atenuación : 64.

Velocidad de carta : 0.25 cm/min.

Como se puede observar en la siguiente figura, con éste método hubo mucha interferencia del solvente y el pico del piroxicam esta muy coaleado.



FIG. 3.2 .- METODO 1

METODO CROMATOGRAFICO 2.- Reportado en la literatura (17).

Fase móvil : Isopropanol : Acido fórmico 0.1M : KH_2PO_4 0.1M
(176: 1: 1000).

Columna : μ Bondapack C_{18} de 10 μ de tamaño de partícula.

Longitud de onda : 254 nm

Flujo : 0.5 ml/min.

Concentración : 100 mcg/ml en metanol.

Volumen de inyección : 10 μ l

Atenuación : 64.

Velocidad de carta : 0.25 cm/min.

Como se puede observar en el cromatograma que se muestra en la siguiente figura el pico del piroxicam no se alcanza a separar del frente del disolvente.



FIG. 3.3 .- METODO 2

METODO CROMATOGRAFICO 3.- En este método se modificó la fase móvil del método 1 cambiando el agua por KH_2PO_4 0.1M y el ácido acético concentrado por diluido, también se cambió el flujo y el volumen de inyección.

Fase móvil : Isopropanol : Acido acético 0.1M : KH_2PO_4 0.1M (30:1:70).

Columna : μ Bondapak C_{18} de 10 μ de tamaño de partícula.

Longitud de onda : 254 nm

Flujo : 0.5 ml/min.

Concentración : 100 mcg/ml en metanol.

Volumen de inyección : 10 μ l

Atenuación : 64.

Velocidad de carta : 0.25 cm/min.

Como se puede observar en el cromatograma obtenido en la siguiente figura, el pico del piroxicam no se alcanza a separar totalmente del frente del disolvente.



FIG. 3.4 . 1 METODO 3

METODO CROMATOGRAFICO 4.- En este método se decidió probar una fase móvil lo más sencilla posible.

Fase móvil : Metanol : Agua (40:60)

Columna : μ Bondapack C_{18} de 10 μ de tamaño de partícula.

Longitud de onda : 254 nm

Flujo : 1.0 ml/min.

Concentración : 100 mcg/ml en metanol.

Volumen de inyección : 10 μ l

Atenuación : 64.

Velocidad de carta : 0.25 cm/min.

Como se puede observar en el siguiente cromatograma el piroxicam se retiene demasiado en la fase estacionaria.

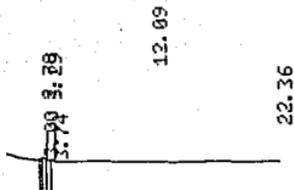


FIG. 3.5 .- METODO 4

METODO CROMATOGRAFICO 5.- En este método se modificó la fase móvil del método anterior.

Fase móvil : Metanol : Agua (55:45)

Columna : μ Bondapak C_{18} de 10 μ de tamaño de partícula.

Longitud de onda : 254 nm

Flujo : 1.0 ml/min.

Concentración : 100 mcg/ml en metanol.

Volumen de inyección : 10 μ l

Atenuación : 64.

Velocidad de carta : 0.25 cm/min.

Como se puede observar en el cromatograma de la siguiente figura el pico de piroxicam no se resuelve totalmente.

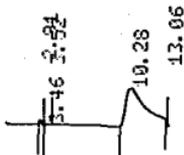


FIG. 3.6 .- METODO 5

METODO CROMATOGRAFICO 6.- En este método se modificó la fase móvil del método 5 .

Fase móvil : Metanol : Agua (80:20)

Columna : μ Bondapack C_{18} de 10 μ de tamaño de partícula.

Longitud de onda : 254 nm

Flujo : 1.0 ml/min.

Concentración : 100 mcg/ml en metanol.

Volumen de inyección : 10 μ l

Atenuación : 64.

Velocidad de carta : 0.25 cm/min.

Como se puede observar en el cromatograma que se muestra en la siguiente figura el pico de piroxicam presenta un coelo muy pronunciado.

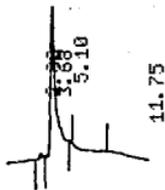


FIG. 3.7 .- METODO 6

METODO CROMATOGRAFICO 7.- En este método se decidió modificar la fase móvil del método reportado en la USP XXII, utilizando el metanol en otra proporción, un buffer también de fosfato de sodio dibásico pero sin ácido cítrico para no dañar tanto la columna y agua.

Fase móvil : Metanol : Agua : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.026M (40:30:30)

Columna : μ Bondapak C_{18} de 10 μ de tamaño de partícula.

Longitud de onda : 254 nm

Flujo : 0.8 ml/min.

Concentración : 100 mcg/ml en metanol.

Volumen de inyección : 25 μ l

Atenuación : 64.

Velocidad de carta : 0.25 cm/min.

Como se puede observar en el cromatograma obtenido en la siguiente figura el pico del piroxicam presenta un cabeceo muy pronunciado.

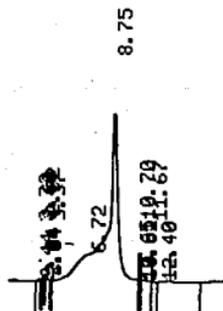


FIG. 3.8 .- METODO 7

METODO CROMATOGRAFICO B.- En este método se decidió modificar la fase móvil del método anterior cambiándole las proporciones.

Fase móvil : Metanol : Agua : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.026M (50:25:25)
Columna : μ Bondapack C_{18} de 10 μ de tamaño de partícula.
Longitud de onda : 254 nm
Flujo : 0.8 ml/min.
Concentración : 100 mcg/ml en metanol.
Volumen de inyección : 10 μ l
Atenuación : 64.
Velocidad de carta : 0.25 cm/min.

Como se puede observar en el cromatograma obtenido en la siguiente figura el pico de piroxicam ya se resuelve mejor y de aquí se parte para afinar el método.

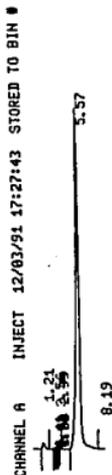


FIG. 3.9 .- METODO B

METODO CROMATOGRAFICO 9.- En este método se modificó la fase móvil con respecto a la del método 8, dejandola únicamente con metanol y buffer ajustado a pH 7.8 .

Fase móvil : Metanol : Agua : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.026M pH 7.8 (40:60)
Columna : μ Bondapak C_{18} de 10 μ de tamaño de partícula.
Longitud de onda : 254 nm
Flujo : 1.2 ml/min.
Concentración : 25 mcg/ml en una solución Metanol : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.026M (10:30)
Volumen de inyección : 10 mcl
Atenuación : 64.
Velocidad de carta : 0.25 cm/min.

Como se puede observar en el cromatograma de la siguiente figura, el piroxicam ya presenta un pico bien definido, delgado y simétrico. Este método cromatográfico es el seleccionado para nuestro estudio.



FIG. 3.10.- METODO 9

3.3 VALIDACION DEL METODO ANALITICO

Una vez que se tuvieron las condiciones adecuadas para obtener cromatogramas aceptables, se procedio a la validación del método llevando a cabo las siguientes pruebas :

3.3.1 LINEARIDAD DEL SISTEMA .

Se determinó haciendo diluciones de una misma solución patrón de piroxicam para tener concentraciones de 15, 20, 22.5, 25, 27.5 y 30 mcg/ml, que equivalen a 60 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 % y 120 % de la concentración elegida como 100 % (25 mcg/ml). Se analizó cada solución por triplicado. Se consideró un blanco de las soluciones como el 0 % .

3.3.2 PRECISION DEL SISTEMA .

Se analizó por sextuplicado una solución de piroxicam conteniendo 100 % de la cantidad seleccionada según la prueba de linealidad del sistema.

3.3.3 ESPECIFICIDAD DEL METODO .

3.3.3.1 SELECCION DE LA CONDICIONES OPTIMAS DE DEGRADACION.

Para evaluar la especificidad del método por CLAR, se procedió a degradar el principio activo, el placebo y la formulación, en condiciones :

- a) Ácidas.
- b) Básicas
- c) Oxidativas
- d) Calor.
- e) Luz UV.
- f) Luz solar.

En la tabla 1 se muestran las condiciones y los tiempos a los cuales se sometieron a degradación las diferentes muestras.

MUESTRA	TIPO DE DEGRADACION	TIEMPO DE EXPOSICION
PIROXICAM	Acida a reflujo	4 hrs.
	Básica a reflujo	2 hrs.
	Oxidación a temp. amb.	5 días
	Calor 80°C	30 días
	Luz UV	30 días
	Luz solar	30 días
FORMULACION	Acida a reflujo	4 hrs.
	Básica a reflujo	2 hrs.
	Oxidación a temp. amb.	5 días
	Calor 80°C	30 días
	Luz UV	30 días
	Luz solar	30 días
PLACEBO	Acida a reflujo	4 hrs.
	Básica a reflujo	2 hrs.
	Oxidación a temp. amb.	5 días
	Calor 80°C	30 días
	Luz UV	30 días
	Luz solar	30 días

TABLA 1 CONDICIONES DE DEGRADACION

Una vez que se fijaron las condiciones de degradación se procedió a verificar la aparición de productos de degradación en los cromatogramas obtenidos, aplicando el método propuesto y calculando el porcentaje recuperado de piroxicam, después de degradar las muestras.

Con las condiciones de degradación ya establecidas, se inyectaron las muestras degradadas y sin degradar de piroxicam, formulación y placebo en el sistema cromatográfico elegido, para compararlas y poder verificar si alguno de los excipientes interfiere con el pico del compuesto de interés o si alguno de los productos de degradación del mismo o de los excipientes presenta interferencia en la respuesta del principio activo.

El análisis de muestras degradadas mostró que los productos de degradación eluyeron antes que el pico de piroxicam ($t_r = 7.09$) como se puede observar en la figura 3.11, por lo que el posible estandar interno, deberá eluir después del pico de interés.

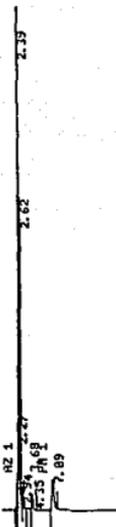


Fig. 3.11

3.3.3.2 SELECCION DEL ESTANDAR INTERNO.

Después de seleccionar el sistema cromatográfico y que se ha demostrado su especificidad, se buscó el posible estandar interno inyectando muestras de nipagin, nipasol, fenilbutazona, diclofenaco y naproxeno; se observaron el tiempo de retención, la forma del pico cromatográfico y la separación entre el piroxicam y la sustancia de prueba.

La sustancia seleccionada como estándar interno fue el naproxeno (fig. 3.12).

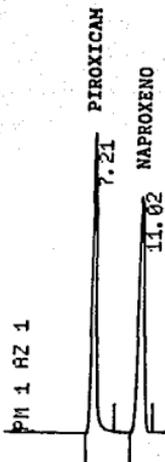


Fig. 3.12

3.3.3.3 SELECCION DEL METODO ANALITICO.

El método analítico quedó de la siguiente manera :

Solución buffer de fosfato dibásico de sodio 0.026M pH 7.8 .- Pesar 6.97 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, transferirlos a un matraz volumétrico de 1000 ml, disolver y llevar a volumen con agua, mezclar y ajustar el pH a 7.8 con ácido fosfórico. 0.1M.

Solución de estandar interno.- Pesar con exactitud alrededor de 30 mg de naproxeno, transferir a un matraz volumétrico de 100 ml, disolver y llevar a volumen con metanol.

Solución patrón de referencia.- Pesar con exactitud alrededor de 25 mg de piroxicam, transferir a un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar 50 ml de metanol, sonicar 5 minutos, agitar mecánicamente por 15 minutos; llevar a volumen con metanol y mezclar tomar una alícuota de 5 ml y vertirla en un matraz volumétrico de 50 ml, adicionar 5 ml de la solución del estandar interno y llevar a volumen con una solución de metanol-buffer (10:30).

Preparación de la muestra.- Pulverizar finamente el contenido de no menos de 20 cápsulas. Pesar el equivalente a 25 mg de piroxicam, transferir a un matraz volumétrico de 100 ml, adicionar 50 ml de metanol, sonicar 5 minutos y después agitar mecánicamente durante 15 minutos; llevar a volumen con metanol y mezclar. Filtrar por papel filtro Whatman del No. 1, tomar una alícuota de 5 ml y vertirla en un matraz volumétrico de 50 ml, adicionar 5 ml de la solución del estandar interno y llevar a volumen con una solución de metanol-buffer (10:30).

Fase móvil : Metanol: Buffer (40:60)

Flujo : 1.2 ml/min.

Atenuación : 64

Volumen de inyección : 10 µl.

Columna : µ Bonadapack C₁₈ de 10µ de tamaño de partícula (30 cm de longitud x 3.9 mm de diámetro interno).

Longitud de onda : 254 nm.

Velocidad de carta : 0.25 cm/min.

3.3.4 LINEARIDAD DEL METODO.

Se evaluó analizando por triplicado placebos cargados a los niveles de 60%, 80%, 90%, 100%, 110%, y 120% de la cantidad seleccionada, adicionando el naproxeno, y considerando placebos sin piroxicam como 0%.

Se determinó la pendiente, el intercepto y el coeficiente de determinación.

3.3.5 EXACTITUD DEL METODO.

Se llevó a cabo analizando por sextuplicado placebos cargados al 100%, con la adición del naproxeno y determinando el porcentaje recuperado.

3.3.6 PRECISION.

3.3.6.1 REPETIBILIDAD.

Se determinó con el cálculo del coeficiente de variación de los resultados obtenidos en la exactitud al 100%.

3.3.6.2 REPRODUCIBILIDAD.

Se evaluó con el estudio de determinaciones independientes de una misma muestra homogénea de producto terminado, en dos días por dos analistas con 3 replicas por día.

3.3.7 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

Se determinó analizando tres muestras a la misma concentración inmediatamente después de su preparación y volviendolas a analizar a las 24 y 48 horas habiendolas almacenado bajo las siguientes condiciones.

- a) Temperatura ambiente expuestas a la luz.
- b) Temperatura ambiente en la obscuridad.
- c) Refrigeración.

3.3.8 TOLERANCIA DEL SISTEMA .

Se hizo comparando los resultados de tres análisis independientes de una misma muestra al modificar la fase móvil de la manera siguiente :

FASES MOVILES

- 1.- Metanol : Buffer (45:55)
- 2.- Metanol : Buffer (40:60)
- 3.- Metanol : Buffer (35:65)

Se hicieron estas modificaciones en las fases móviles, para determinar que tanto afectan, las variaciones en su preparación, debidas a un probable error del analista, en los resultados de la cuantificación de las muestras.

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1 VALIDACION DEL METODO

4.1.1 LINEARIDAD DEL SISTEMA

NIVEL %	CONCENT. mcg/ml	AREA PIROXICAM	FACTOR AREA/CONC.
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
60	15	559456	37297.06
60	15	557434	37162.26
60	15	560317	37354.46
80	20	754383	37719.15
80	20	753363	37668.15
80	20	751779	37588.95
90	22.5	842411	37440.48
90	22.5	850271	37789.82
90	22.5	852054	37869.06
100	25	950147	38005.88
100	25	934625	37385.00
100	25	941531	37661.24
110	27.5	1043297	37938.07
110	27.5	1025557	37292.98
110	27.5	1022769	37191.60
120	30	1135672	37855.73
120	30	1104551	36818.36
120	30	1145117	38170.56

TABLA 2 DATOS OBTENIDOS DE LA LINEARIDAD DEL SISTEMA A LOS NIVELES DE 60% A 120%

	OBTENIDO	CRITERIO DE ACEPTACION.
COEFICIENTE DE DETERMINACION (r^2)	0.9994	≥ 0.98
COEFICIENTE DE VARIACION (CV)	0.9287 %	≤ 1.50 %

TABLA 3 RESULTADOS DE LA LINEAREIDAD DEL SISTEMA

4.1.2 PRECISION DEL SISTEMA .

NIVEL %	AREA PIROXICAM
100	901547
100	904573
100	914088
100	910844
100	906235
100	900123

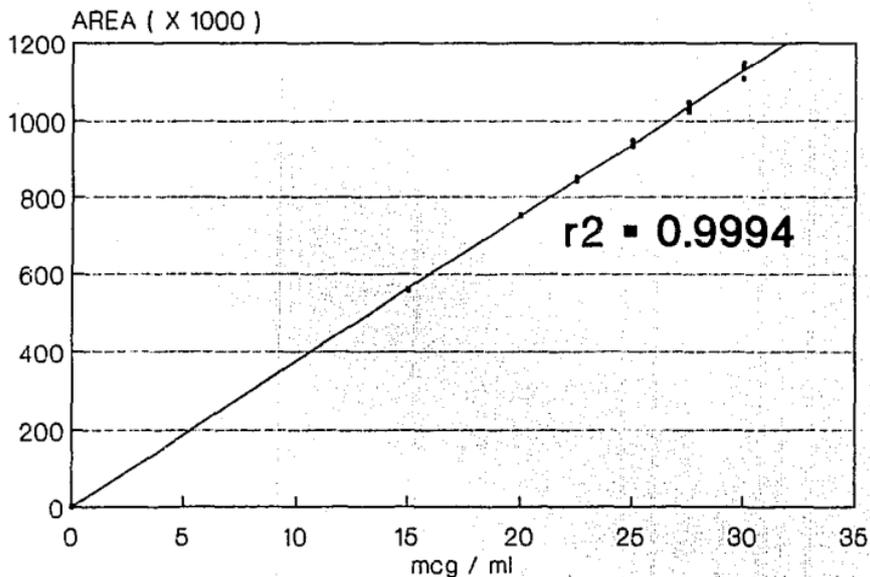
TABLA 4 DATOS DE LA PRECISION DEL SISTEMA

	OBTENIDO	CRITERIO DE ACEPTACION.
MEDIA (X)	911071.66	----
DESVIACION ESTANDAR (DE)	13013.90	----
COEFICIENTE DE VARIACION (CV)	0.5942 %	≤ 1.5 %

TABLA 5 RESULTADOS DE LA PRECISION DEL SISTEMA

LINEARIDAD DEL SISTEMA PIROXICAM

09



GRAFICA No. 1

4.1.3 ESPECIFICIDAD .

4.1.3.1 SELECCION DE CONDICIONES OPTIMAS DE DEGRADACION

Los resultados obtenidos de los estudios de degradación de acuerdo a la tabla I fueron los siguientes :

TIEMPO EN HORAS	CONDICION	PORCENTAJE RECUPERADO	tr	FIGURA No.
PIROXICAM MATERIA PRIMA	Acida	aprox. 96.2 %	7.82	fig. 4.1 1
	Básica	aprox. 69.26 %	7.24	fig. 4.1 2
	Oxidación	aprox. 91.67 %	7.0	fig. 4.1 3
	Calor	aprox. 100.0 %	7.05	fig. 4.1 4
	Luz U V	aprox. 100.0 %	7.01	fig. 4.1 5
	Luz solar	aprox. 100.0 %	7.24	fig. 4.1 6
FORMULACION PIROXICAM	Acida	aprox. 91.35 %	7.81	fig. 4.2 1
	Básica	aprox. 67.11 %	7.07	fig. 4.2 2
	Oxidación	aprox. 22.3 %	7.09	fig. 4.2 3
	Calor	aprox. 97.73 %	7.5	fig. 4.2 4
	Luz U V	aprox. 97.09 %	7.03	fig. 4.2 5
	Luz solar	aprox. 90.41 %	7.12	fig. 4.2 6

TABLA 6 PORCENTAJES RECUPERADOS DESPUES DE DEGRADAR LAS MUESTRAS.

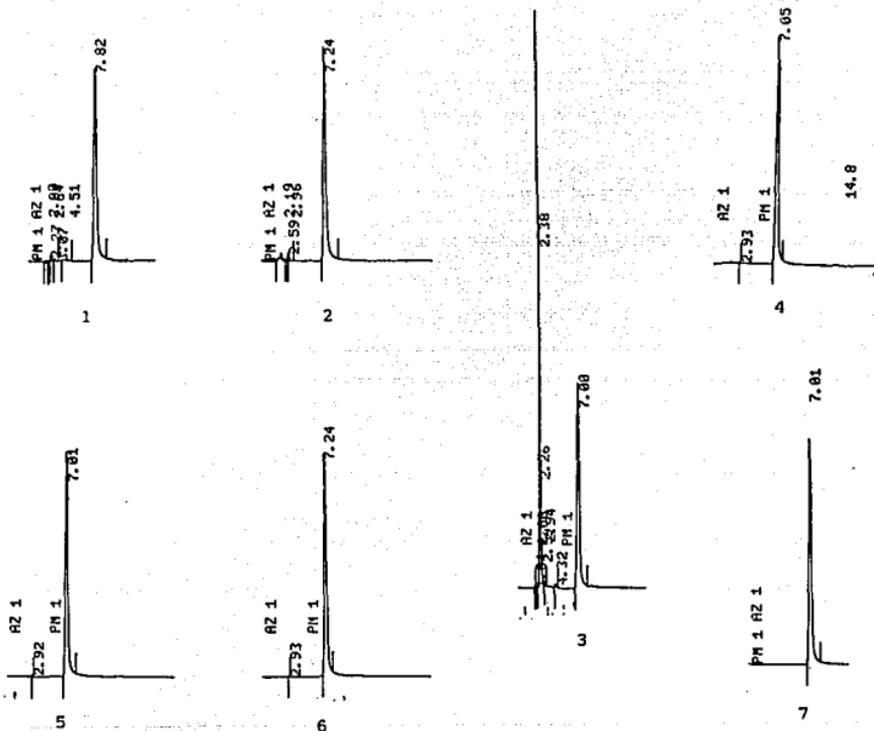


FIG. 4.1 Cromatogramas representativos de la especificidad del método para la materia prima de piroxicam. 1 materia prima degradada con ácido; 2 materia prima degradada con base; 3 materia prima degradada en condiciones de oxidación; 4 materia prima degradada con calor; 5 materia prima degradada con luz UV; 6 materia prima degradada con luz solar; 7 materia prima sin degradar.

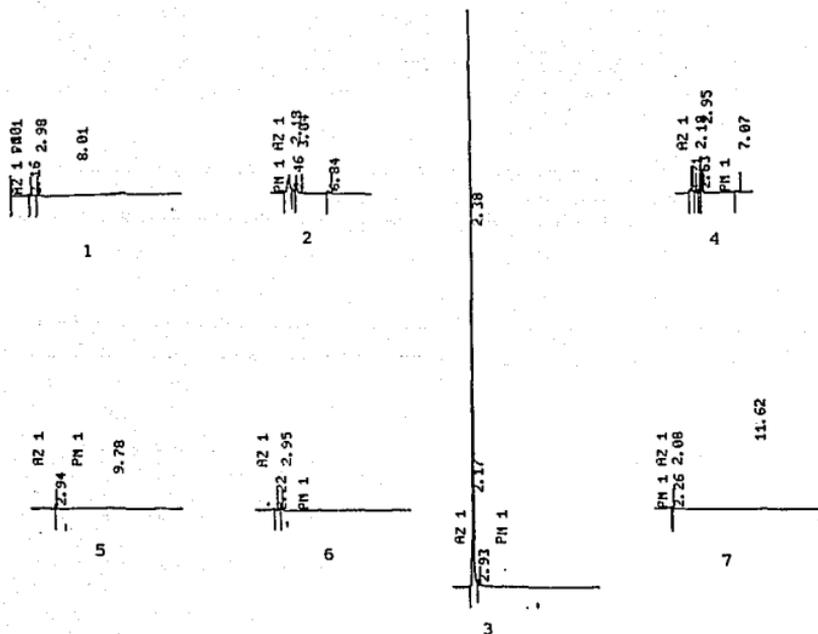


FIG. 4.3 Cromatogramas representativos de la especificidad del método para el placebo de piroxicam. 1 placebo degradado con ácido; 2 placebo degradado con base; 3 placebo degradado en condiciones de oxidación; 4 placebo degradado con calor; 5 placebo degradado con luz UV; 6 placebo degradado con luz solar; 7 placebo sin degradar.

El placebo degradado en condiciones ácidas, básicas, de oxidación, calor, luz U.V. y luz solar no presenta ningún producto de degradación que interfiera con la respuesta del piroxicam.

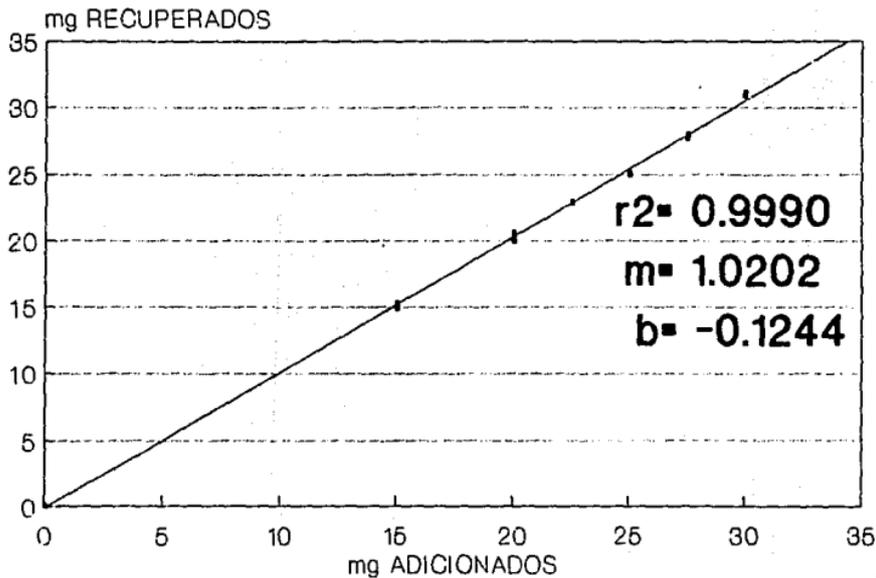
El placebo sin degradar no presenta señal alguna de que pudiera interferir con la respuesta del piroxicam.

4.1.4 LINEARIDAD DEL METODO (Gráfica No. 2)

NIVEL %	MILIGRAMOS ADICIONADOS	MILIGRAMOS RECUPERADOS	PORCIENTO RECUPERADO
0	0.0	0	0
0	0.0	0	0
0	0.0	0	0
60	15.0	14.90	99.36
60	15.0	15.21	101.43
60	15.0	15.29	101.98
80	20.0	20.16	100.81
80	20.0	20.61	103.05
80	20.0	19.92	99.61
90	22.5	22.92	101.90
90	22.5	22.90	101.80
90	22.5	22.98	102.14
100	25.0	24.97	99.91
100	25.0	25.12	100.51
100	25.0	25.11	100.45
110	27.5	28.04	101.99
110	27.5	27.70	100.74
110	27.5	27.69	100.70
120	30.0	30.89	102.99
120	30.0	31.15	103.85
120	30.0	30.94	103.13

TABLA 7 DATOS DE LINEARIDAD DEL METODO, OBTENIDOS
CON PLACEBO ADICIONADO A LOS NIVELES DE 0% A 120%

LINEARIDAD DEL METODO PIROXICAM



GRAFICA No. 2

	OBTENIDO	CRITERIO DE ACEPTACION
PENDIENTE (m)	1.0202	≈ 1.0
INTERCEPTO (b)	-0.1244	≈ 0.0
COEFICIENTE DE DETERMINACION (r ²)	0.9990	≥ 0.98
MEDIA % RECUPERADO (\bar{x})	101.46	98 - 102
COEFICIENTE DE VARIACION (CV)	1.2731	≤ 2.0

TABLA 8 RESULTADOS DE LA LINEARIDAD DEL METODO

4.1.5 EXACTITUD DE METODO AL 100 %

CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	POR CIENTO RECUPERADO
25	24.97	99.91
25	25.12	100.51
25	25.11	100.45
25	25.18	100.74
25	25.75	103.01
25	25.18	100.74

TABLA 9 DATOS DE EXACTITUD DEL METODO, OBTENIDOS CON PLACEBOS ADICIONADOS AL 100 %.

	OBTENIDO	CRITERIO DE ACEPTACION
MEDIA % (X)	99.99 %	---
COEFICIENTE DE VARIACION (CV)	0.71 %	≤ 2 %

TABLA 12 RESULTADOS DE LA REPRODUCIBILIDAD

4.1.7 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

TIEMPO EN HORAS	POR CIENTO DE RECOBRO		
	MUESTRA 1	MUESTRA 2	MUESTRA 3
0	99.94	98.93	100.96
24	100.91	99.57	100.22
48	98.67	97.95	99.25

TABLA 13 DATOS DE LA ESTABILIDAD DE LA MUESTRA A TEMPERATURA AMBIENTE.

TIEMPO EN HORAS	POR CIENTO DE RECOBRO		
	MUESTRA 1	MUESTRA 2	MUESTRA 3
0	99.94	98.93	100.96
24	101.44	101.02	100.44
48	98.61	98.33	99.41

TABLA 14 DATOS DE LA ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN REFRIGERACION.

TIEMPO EN HORAS	POR CIENTO DE RECOBRO		
	MUESTRA 1	MUESTRA 2	MUESTRA 3
0	99.94	98.93	100.96
24	101.07	101.39	102.88
48	100.17	99.21	103.28

TABLA 15 DATOS DE LA ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN LA OBSCURIDAD A TEMPERATURA AMBIENTE.

CONDICION	MEDIA DEL FACTOR I	
	24 HORAS	48 HORAS
TEMPERATURA AMBIENTE	100.29 %	98.67 %
REFRIGERACION	101.03 %	98.83 %
OBSCURIDAD A TEMPERATURA AMBIENTE	101.83 %	100.93 %

TABLA 16 RESULTADOS DE LA ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

La muestra es estable en las 3 condiciones probadas, ya que el valor de la media para el factor I se encuentra entre 98-102 %. La media del factor I se determina como se explica ampliamente en el inciso "d" del punto 2.5.2.5 correspondiente a la estabilidad de la muestra con las siguientes fórmulas principales :

$$I = \frac{(\text{análisis muestra/condición/tiempo})_i}{(\text{análisis inicial } i)} \times 100$$

$$\bar{I} = \frac{\sum EI(\text{condición/tiempo})}{N}$$

Donde :

N = Número de muestras por cada condición/tiempo.

4.1.8 TOLERANCIA

Se modificó la proporción de metanol y fosfato dibásico de sodio.

FASE MOVIL	ml MeOH	ml Na ₂ HPO ₄	% RECOBRO	\bar{X}	% C V
1	45	55	99.75 100.54	100.14	0.5578
* 2	40	60	100.40 99.47	99.93	0.6580
3	35	65	98.16 96.66	97.41	1.0888

* Condiciones originales.

TABLA 17 RESULTADOS DE LAS MODIFICACIONES DE LA FASE MOVIL

Aunque no existe un criterio de aceptación bien definido para tolerancia, se puede decir de acuerdo a los datos de la tabla anterior, que el método es tolerante para las variaciones de las fase móvil. Sin embargo hay que tener cuidado al prepararla, ya que los recobros obtenidos en la fase móvil 3, varían un poco con respecto a los de la original.

C A P I T U L O 5

C O N C L U S I O N E S

El sistema utilizado para la valoración por CLAR de la USP XXII para piroxicam tarda alrededor de 2 1/2 horas para estabilizarse y obtener un ruido menor de 200, los picos del estándar empiezan a salir con coeficientes de variación arriba de 7 y únicamente después de 10 inyecciones baja el coeficiente de variación a 3, por lo tanto los resultados son poco confiables y por esta razón se decidió desarrollar otro método y validarlo.

Debido a esto se desarrolló y validó un método analítico más adecuado utilizando cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa, para piroxicam en cápsulas, el cual logra separar y cuantificar el piroxicam de sus productos de degradación.

Analizando los datos obtenidos de la validación del método, éste es preciso, lineal, exacto y reproducible.

Las muestras listas para el análisis son estables, hasta por 48 horas, tanto a temperatura ambiente como en refrigeración y en la oscuridad.

El método es tolerante para las variaciones de la fase móvil que se probaron obteniéndose recobros satisfactorios con respecto a la fase móvil original.

Este método analítico puede emplearse para análisis en control de calidad y para seguir la estabilidad de la formulación debido a que ni el placebo ni los productos de degradación interfieren en la cuantificación del principio activo, con lo que se puede decir que cumplimos con el objetivo de este trabajo el cual era desarrollar un método analítico indicador de estabilidad para piroxicam en cápsulas.

C A P I T U L O 6

B I B L I O G R A F I A

- 1.- The Merck Index. Eleventh Edition, 1989. Merck & Co., Inc. USA. p. 1192.
- 2.- U.S. Pharmacopeia XXII, National Formulary XVII. 1990 pp. 1091 y 1565.
- 3.- Klaus Florey. Analytical Profiles of Drug Substances. Academic Press Inc Vol. 15 pp. 509 - 531.
- 4.- Litter, Manuel. Farmacología. 4ª Edición. Ed. El Ateneo. 1988.
- 5.- Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 6ª Edición 1981. Editorial Médica Panamericana.
- 6.- Goth, A. Farmacología Médica. 6ª Edición 1973. Editorial Interamericana.
- 7.- Perkin - Elmer de México, S.A. Curso de Introducción a la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Del 5 al 7 de julio de 1989. pp. 3 - 24.
- 8.- R.W. Yost, L.S. Ettre, R.D. Conclon, Perkin - Elmer. Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica. 1980 pp. 4 - 5.
- 9.- Adrián García de Marina, Benito del Castillo. Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Primera Edición 1988. Editorial Limusa, S.A. de C.V. p. 36.
- 10.- Beckman Instruments de México, S.A. de C.V. Curso de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. pp. 1 - 13.
- 11.- Connors, K.A. Curso de Análisis Farmacéutico 2ª Edición en Español. Editorial Reverté, S.A. 1980. p. 442.
- 12.- Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. Guía de Validación de Métodos Analíticos. pp. 1 - 67.
- 13.- Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. (Ma. Eugenia Guerrero) Conferencia Validación

de Métodos Analíticos.

- 14.- Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C. (Graciela Aguilar)
Curso Validación de Métodos Analíticos.
- 15.- Guerra, J. Validación de Métodos Analíticos por la FDA Pharm
Tech. Mar. 1986. Vol. 10, Num. 3. pp. 74 - 78.
- 16.- Fontani, F. Validación de Métodos Analíticos para Productos
Farmacéuticos. Boll Chim Farm. Feb. 1987. Vol. 126, Num.
2. pp. 66 - 74.
- 17.- Clark's. "Insolation and Identification of Drugs in
Pharmaceutical, Body Fluids and Post Mortem Material".
Segunda Edición. The Pharmaceutical Society of Great
Britain. p. 214 - 215.