



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

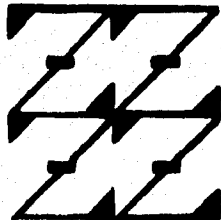
DESARROLLO Y VALIDACION DE UN
METODO ANALITICO POR CROMATOGRAFIA
DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION PARA
LA CUANTIFICACION DE CLORURO DE
BENZALCONIO EN POMADA

T E S I S

Que para obtener el Título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLGO

P r e s e n t a :

JOSE GERARDO TERRONES GUADARRAMA



LO HUMANO
EJE
DE NUESTRA REFLEXION

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D.F.

1996



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Q.F.B. MAURO ARRIETA SANCHEZ.

VOCAL: Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES.

SECRETARIO: Q.F.B. JOSE INES JUAREZ LOPEZ

1º. SUPLENTE: Q.F.B. RAMON SOTO VAZQUEZ.

2º. SUPLENTE: Q.F.B. VICTOR HUGO BECERRA LOPEZ.

SITIO DONDE SE REALIZO EL PROYECTO:

LABORATORIOS COLUMBIA S.A.

SUSTENTANTE: JOSE GERARDO TERRONES GUADARRAMA

ASESOR INTERNO: Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

GLOSARIO

b	ORDENADA
r	COEFICIENTE DE CORRELACION
r²	COEFICIENTE DE DETERMINACION
CV	COEFICIENTE DE VARIACION
IC	INTERVALO DE CONFIANZA
m	PENDIENTE
n	NUMERO DE REPLICACIONES
t	NUMERO DE DILUCIONES
y	MEDIA ARITMETICA
s²	VARIANZA
DE	DESVIACION ESTANDAR
x	DILUCION O CANTIDAD ADICIONAL
a	ANALISTA
d	DIA
gl	GRADOS DE LIBERTAD
MC	MEDIA DE CUADRADOS
F	FACTOR DE DISTRIBUCION F DE FISHER
SC	SUMA DE CUADRADOS
Σ	SUMATORIA

INDICE

Página

1.- INTRODUCCION	1
2.- GENERALIDADES	2
2.1 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE CLORURO DE BENZALCONIO	2
3.- FUNDAMENTACION DEL TEMA	4
3.1 CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION	5
3.1.1 NUMERO DE PLATOS TEORICOS	9
3.1.2 INSTRUMENTACION	12
3.2 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS	17
4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
5.- OBJETIVO	20
6.- HIPOTESIS	20
7.- DESARROLLO EXPERIMENTAL	21
7.1 REACTIVOS Y DISOLVENTES	21
7.2 MATERIAL Y EQUIPO	21
7.3 PROCEDIMIENTO	23
7.4 VALIDACION DEL METODO ANALITICO	25
8.- RESULTADOS	27
9.- ANALISIS DE RESULTADOS	36

10.- CONCLUSION	38
11.- RECOMENDACIONES	38
ANEXO I CRITERIOS DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.....	39
12.- BIBLIOGRAFIA	55

1. INTRODUCCION

En la industria farmacéutica uno de los principales objetivos es el asegurar un adecuado control de calidad de los medicamentos. es por esto que la validación hoy en día ha tomado una gran importancia.

La validación de métodos analíticos permite evaluar parámetros estadísticos como son : linealidad, precisión, exactitud y reproducibilidad , entre otros. De aquí se obtiene información sobre la confiabilidad del método analítico que se emplea en el análisis del (los) activo (s) presente (s) en una forma farmacéutica.(8)

Por otra parte, la cromatografía de alta resolución ha tenido una gran difusión desde comienzos de la década de los setentas y hoy representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio analítico moderno. Esta es usada principalmente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra se mueve. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa.

Tomando en cuenta estas referencias, cada laboratorio de acuerdo a sus necesidades llevara a cabo una validación del método analítico.

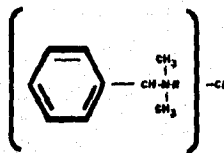
En este trabajo se presenta un método analítico desarrollado y validado para un activo (cloruro de benzalcolio) el cual está incluido en una pomada de uso medicinal (material de curación) en el tratamiento de rozaduras a nivel pediátrico.

El diseñar un desarrollo y validación por cromatografía de líquidos de alta resolución nos permite determinar efectivamente la concentración real del activo, haciendo al método específico y selectivo, a su vez de servir como un método indicativo de estabilidad del producto.

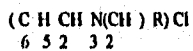
2.- GENERALIDADES

2.1 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE CLORURO DE BENZALCONIO (6)

- ESTRUCTURA QUIMICA



- FORMULA CONDENSADA



- PESO MOLECULAR

360 gr./mol

- DESCRIPCION

Cristales blancos o ligeramente amarillos en forma de escamas con un olor característico, es higroscópico, es afectado por la luz y el aire.

- SOLUBILIDAD

Es muy soluble en agua, alcohol, y acetona, insoluble en éter.

- USOS

Se utiliza como un agente antimicrobiano para organismos gram positivos, preservativo, detergente antiséptico.

En formulaciones farmacéuticas sirve como preservativo de productos oftálmicos, nasales y oídos, así como para productos parenterales.

METODO DE MANUFACTURA

El cloruro de benzalconio es formado por la reacción en solución de N-alquil-N-metil-bencilamina con cloruro de metilo en un solvente orgánico, por precipitación del compuesto cuaternario.

PRECAUCIONES

En repetidas exposiciones el cloruro de benzalconio puede provocar hipersensibilidad. En un prolongado contacto puede existir irritación de las mucosas, de los ojos. La dosis fatal de 1 a 3 gr. accidental en una ingestión puede provocar náuseas y vómito, parálisis respiratoria y asfixia.

3.- FUNDAMENTACION DEL TEMA

Día con día la industria farmacéutica se preocupa por obtener productos de mayor calidad y seguridad terapéutica, al asegurar la estabilidad de estos resulta una práctica cotidiana e imprescindible por lo que resulta necesario contar con métodos analíticos indicativos de estabilidad que brinden la mayor seguridad, tanto en el análisis cualitativo como cuantitativo asegurándose este mediante la cromatografía de líquidos de alta resolución.

Estos métodos analíticos deben contar con ciertas características, las cuales son: Que sea específico, exacto, preciso, lineal, etc. Estas características forman parte del complemento del desarrollo de un método analítico y este se conoce con el nombre de validación.

La validación es parte fundamental del desarrollo o mejoramiento de una forma farmacéutica, ya que durante esta secuencia de pruebas y análisis el químico se da cuenta si el método analítico cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado.

3.1. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION

La cromatografía líquida de alta resolución (C.L.A.R.) es una técnica analítica muy utilizada en la actualidad para el análisis de activos. Tiene una alta especificidad así como un amplio intervalo de sensibilidad que hace ideal el análisis de muchos activos tanto en formas farmacéuticas como en fluidos biológicos.

La separación de los componentes en una mezcla se lleva a cabo con una corriente de flujo. Los componentes a separarse interactúan preferentemente con la fase estacionaria y son retenidos a lo largo de esta, en CLAR se cuenta con pocas fases estacionarias y con gran diversidad de fases móviles, usándose esta en composiciones binarias, terciarias y ocasionalmente cuaternarias. Además puede utilizar soluciones reguladoras de control de pH para modificar la retención. (1)

Existen varios procesos o mecanismos de separación para la retención de las moléculas por la fase estacionaria en la cromatografía líquida. Estos pueden clasificarse de acuerdo a las fases involucradas:

- 1) Cromatografía líquido-líquido
- 2) Cromatografía líquido-sólido
- 3) Cromatografía de intercambio iónico
- 4) Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía líquido-sólido es llamada también cromatografía de adsorción, esta emplea partículas con una alta área superficial como fase estacionaria que absorben moléculas de soluto. La separación se basa en repetidas etapas de adsorción y desorción. Usualmente se utilizan sólidos polares como sílica gel, alúmina o vidrio poroso y una fase móvil no polar como cloroformo, heptano u octano. La separación se da por diferencias en la afinidad de los solutos por la superficie de la fase estacionaria. (2) Ver figura 1.

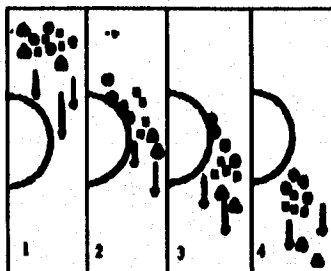


FIGURA 1.- Mecanismo de separación de una cromatografía líquido-sólido, o componente muy polar, o componente medianamente polar, o componente poco polar.

La cromatografía líquido-líquido o cromatografía de partición involucra una fase estacionaria líquida la cual está sobre un soporte sólido inerte. Las moléculas de la muestra se distribuyen entre la fase móvil y la estacionaria líquida determinando así la separación. La fase estacionaria puede ser polar o no polar.

Si la fase estacionaria es polar y la fase móvil es no polar, se le llama cromatografía de partición en fase normal. Si tenemos el caso contrario se llama cromatografía de partición en fase inversa.

FIGURA 2

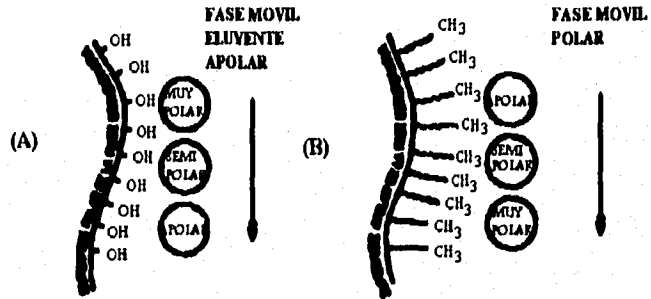


FIGURA 2.- A) Cromatografía líquido-líquido en fase normal.

B) Cromatografía líquido-líquido en fase inversa.

La cromatografía de intercambio iónico usa una fase estacionaria que puede intercambiar cationes o aniones con la fase móvil. La fase estacionaria debe tener una carga contraria a la de la muestra. Cuanto mayor sea la carga de la muestra, más fuertemente estará atraída hacia la superficie iónica y por lo tanto tardará más tiempo en ser eluida. Para controlar el tiempo de elución se puede ajustar el pH y polaridad. Los materiales usados como intercambiadores iónicos son resinas poliméricas las cuales se clasifican en catiónicas y aniónicas.

Cada tipo de material puede subdividirse en intercambiadores fuertes o débiles.

Frecuentemente los grupos ácidos sulfónicos son usados como intercambiadores catiónicos fuertes. Para intercambiadores catiónicos débiles hay muchos ácidos carboxílicos. Las resinas de intercambio aniónico fuertes contienen como sitio activo grupos cuaternarios de amonio.

La cromatografía de exclusión es un método que se basa en la separación de acuerdo al tamaño de la molécula. en este tipo de cromatografía la fase estacionaria posee poros de dimensiones diferentes, en donde la muestra es retenida o filtrada según su tamaño molecular. Las moléculas pequeñas son retenidas en los poros y son eluidas después.

Ahora bien, de los diferentes mecanismos de separación se tienen factores importantes que describen esta separación, esto se hace con ayuda de un cromatograma, en donde se representa la separación gráfica de los componentes. Ver FIGURA 3.

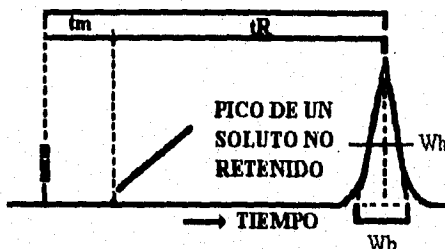


FIGURA 3.- Un cromatograma común.

Los factores que sirven para describir una separación se conocen como parámetros de retención.

VOLUMEN DE RETENCION (VR):

El volumen de retención es el volumen total de fase móvil requerido para que el componente se chya al máximo.

TIEMPO DE RETENCION (tR):

El tiempo de retención es el tiempo necesario para alcanzar la máxima elución del compuesto.

Si el flujo (F_c) de la fase móvil es constante se tiene lo siguiente:

$$t_R = V_R / F_c \dots \text{cc (1)}$$

Estos dos parámetros descritos (V_R y t_R) se deben corregir para saber exactamente el volumen o tiempo invertido que se ocupa únicamente para la elución del compuesto:

$$t_{R'} = t_R - t_M \dots \text{cc (2)}$$

$$V_{R'} = V_R - V_M \dots \text{cc (3)}$$

Donde t_R y V_R son el tiempo y el volumen de retención corregidos. t_M es el tiempo muerto que invierte la fase móvil para recorrer la columna, y V_M es el volumen muerto de fase móvil para llenar la columna.

Cuando se inyecta el compuesto al sistema cromatográfico, al llevarse a cabo la elución, la banda de soluto eluido se va ensanchando, este proceso se debe al equilibrio entre dos fases y la difusión longitudinal. (3)

FACTOR DE CAPACIDAD (K):

El factor de capacidad indica el tiempo que el compuesto es retenido por la columna y se define como :

$$K = t_R - t_M = t_R / t_M \dots \text{ec (4)}$$

En la práctica se debe tener k en un rango de 1 a 10 para asegurar la separación del compuesto con las posibles impurezas del disolvente, las cuales generalmente se eluyen a un tiempo igual al t_M . Si K es mayor de 10 se tiene problemas con el tiempo de análisis.

3.1.1 NUMERO DE PLATOS TEORICOS (N) :

El número de platos teóricos indica la eficiencia de la columna cromatográfica y un plato teórico (h) se define como el número de etapas de partición (equilibrios) que le ocurren al compuesto durante el paso a la columna. N se define matemáticamente como :

$$N = a (t_R/W) \dots \text{ec (5)}$$

Donde a es una constante que depende del método utilizado para determinar N . Ver FIGURA 4. W es el ancho del pico cromatográfico que también depende del método utilizado.

N depende de la longitud de la columna (L) y tamaño de partícula en forma directa. a partir de aquí se obtiene el concepto de altura equivalente a un plato teórico que se define como:

$$h = L/N \dots \text{ec (6)}$$

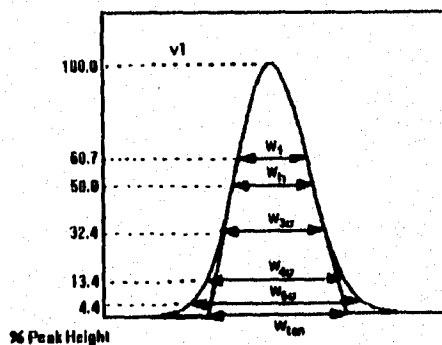
Sin embargo existe mucha discrepancia al calcular N de la manera anterior, ya se está suponiendo que el pico es simétrico. Otra manera de calcular N es descrita por James Martin.

Este método involucra una comparación de la altura y el área del pico para así valorar de alguna manera la dispersión. la ecuación es la siguiente:

$$N = 2 \left(\frac{h_{\max} (tR/A)}{\dots} \right)^2 \quad (7)$$

donde: h_{\max} = altura máxima del pico

A = área del pico



$$N = 5.54 \left(\frac{v_1}{W} \right)^2$$

w	n	method
w_1	4	Inflexion
$w_{1/2}$	5.54	1/2 Peak Height
$w_{3/4}$	9	3/4
$w_{5/6}$	16	5/6
$w_{5/8}$	25	5/8
w_{100}	16	Tangent

FIGURA 4.- Métodos para calcular la eficiencia de la columna.

Existen varios métodos para determinar el número de platos teóricos, el método más usado es el 5, debido a que tiene mayor sensibilidad, ya que toma en cuenta la asimetría de los picos cromatográficos, lo que implica que nos dará mayor información sobre la eficiencia de la columna. (2) (3)

SEPARACION (alfa) :

El factor de selectividad describe la posición relativa de dos picos adyacentes y se define como:

$$\alpha = t_R(B) / t_R(A) \dots \text{cc (8)}$$

Si $\alpha = 1$ no habrá separación ya que los tiempos de retención serían idénticos.

RESOLUCION (Rs) :

El factor de resolución es una medida de separación relativa de 2 picos. Se define la resolución como la distancia entre dos bandas dividido por el promedio del ancho de los picos determinando desde la base de los picos.

$$R_s = \frac{t_R(B) - t_R(A)}{1/2 (W_A + W_B)} \dots \text{cc (9)}$$

Si $R_s = 1.5$ se tiene una resolución ideal, es decir una resolución hasta línea base. Si $R_s = 1.0$ implica una resolución al 90%.

3.1.2. INSTRUMENTACION

Idealmente los contenedores de disolventes deben tener varios requerimientos :

- 1) Contener un volumen adecuado para análisis retrospectivos .
- 2) Contener un disolvente degasificado ya sea por calor, aplicando vacío o por sonicación.
- 3) Ser inerte con respecto al disolvente.

Frecuentemente se utilizan contenedores de vidrio o de acero inoxidable. (10)

El disolvente es la fase móvil, su función es acarrear la muestra a través de la columna produciendo una distribución razonable (factor de capacidad) entre las fases. El disolvente debe de disolver a la muestra, debe tener una alta pureza, preferentemente calidad CLAR. Otros factores importantes que hay que considerar: bajo costo , baja viscosidad , baja toxicidad y bajo punto de ebullición. (11) (16).

Dependiendo del tipo de columna empleada se utilizan diferentes disolventes, como se muestra a continuación:

Disolventes comunes en CLAR

TIPO de CLAR	Disolventes
Fase normal	Hexano, cloroformo, acetato de etilo, cloruro de metileno.
Fase inversa	Agua, metanol, acetonitrilo.
Intercambio iónico	Soluciones reguladoras usualmente 0.01 a 0.1 M
Exclusión molecular	Agua (ocasionalmente en pequeñas cantidades de alcoholes)
Permeación en gel	Tolueno, cloroformo, THF, triclorobenceno, piridina

SISTEMA DE BOMBEO

Este sistema es uno de los componentes más importantes en CLAR. La bomba es muy importante para obtener alta resolución, alta velocidad de análisis y reproducibilidad en análisis cuantitativos.

Los requerimientos que debe tener una bomba son :

- 1) Flujo estable, para que el ruido hacia el detector sea mínimo.
- 2) Que proporcione un rango de flujo bajo (0.1 a 10 ml/min).
- 3) Entregue un volumen constante para facilitar el análisis cuantitativo y cualitativo.
- 4) Tolerancia a altas presiones (6000 psi) y una fácil adaptabilidad para operación en gradiente. (psi= unidades de presión para CLAR). (11)

Hay dos tipos de sistema de bombeo. El primero es una bomba tipo pistón recíproco, en donde el pistón está en contacto directo con el solvente . El segundo es una bomba que se opera por un tornillo de transmisión desplazando el solvente del reservorio a través de este, éste sistema se utiliza particularmente en operaciones en gradiente en donde la velocidad de la jeringa se controla electrónicamente. El más común es la bomba tipo pistón recíproco.

SISTEMA DE INYECCION

La inyección de la muestra a la columna presenta algo de problemas a causa de las altas presiones involucradas en CLAR . Hay dos tipos de inyección : manual y automática: En ambos sistemas el volumen inyectado tiene que ser reproducible para obtener un correcto análisis cuantitativo.

- a) En la inyección manual se utilizan jeringas de 5 hasta 200 microlitros con las que se carga el sistema de inyección para que después este tome el volumen y lo descargue a la columna.

b) la inyección automática utiliza una serie de válvulas y pistones, en donde la muestra se coloca en pequeños viales para que después la jeringa tome el volumen requerido automáticamente de muestra y lo descargue a la columna. (4)

COLUMNA

La columna en el sistema cromatográfico es el corazón de CLAR, es un tubo de material inerte, de diámetro uniforme y resistente a altas presiones. Contiene a la fase estacionaria en donde se llevan a cabo las separaciones de los componentes. Las columnas por CLAR varían principalmente por el tipo de separación deseada y por las características de los materiales de empaque. La columna más usada mide de largo de 10 a 30 cm, tienen un diámetro interno de 3 a 4 mm y el empaque de la columna es de diámetros pequeños (3 y 10 micras).

Las columnas que comercialmente se utilizan en CLAR son: sílica, alúmina, octadecilsilano, octasilano, fenilo, dimetilsilano, diol, nitrilo, anilino, ciano, entre otros. Los dos primeros tipos se utilizan en CLS y las demás se utilizan en cromatografía de partición.

DETECTOR

El propósito del detector es el de medir la concentración del componente en la fase móvil. Este produce una señal electrónica proporcional a la concentración del componente. Los detectores más comunes son: espectrofotómetro UV/vis, índice de refracción diferencial (IR), detector de fluorescencia y detector electroquímico.

Fotómetro UV/vis FIGURA 5. Este detector es de longitud de onda fija de doble haz, del lado izquierdo consta de una lámpara de mercurio que emite (esencialmente haz monocromático) una línea aguda de espectro con una fuerte línea a 253.7 nm (254). Un lente de cuarzo enfoca la radiación UV en las celdas de muestra y referencia. La celda de muestra contiene usualmente de 10 a 20 microlitros. La celda de referencia usualmente es llenada con aire. Un filtro remueve las radiaciones no requeridas. La radiación pasa a través de las celdas de referencia y muestra llegando a los 2 fotodetectores. La producción de estos 2 fotodetectores pasa a través de amplificadores que producen una señal eléctrica para ser graficada. (5)

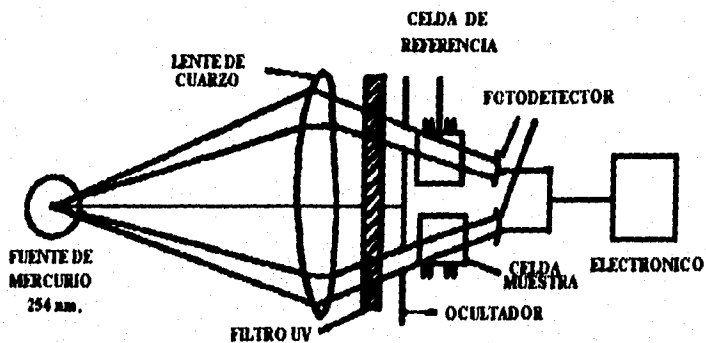


FIGURA 5 Esquema de un fotómetro UV, 254 nm.

Con este fotómetro se dispone de varias longitudes de onda, cada una con un filtro apropiado: 254,280,313,365,436 y 546 nm.

CLASIFICACION DE DETECTORES

Espectrofotómetro UV/vis.

Este detector es el más comúnmente utilizado a la fecha en CLAR, ver FIGURA 6. Es un detector de longitud de onda variable que permite la selección de una longitud de onda de 190 a 700 nm. La luz de origen se enfoca en la entrada de la apertura de un monocromador. Por lentes apropiados esta luz blanca se enfoca en la rejilla en donde la dispersa en varias longitudes de onda. Por la posición de esta rejilla se elige la longitud de onda que pasa a través de la celda de muestra y referencia por medio de un haz de luz dividido. La señal del detector se obtiene comúnmente en absorbancias. Este detector permite incrementar la sensibilidad y/o selectividad de los componentes de interés.

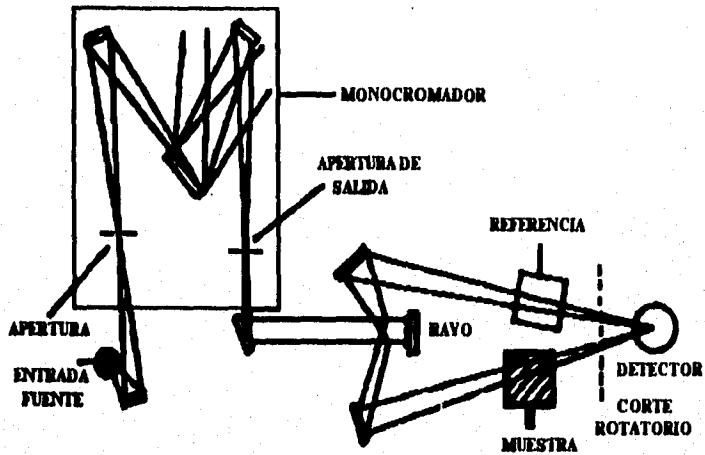


FIGURA 6 Esquema de un detector espectrofotométrico para CLAR.

Detector de fotoiodos.

Este detector es una adición reciente a los espectrofotómetros UV/VIS, es un detector que se basa en el arreglo lineal de fotoiodos.

Este instrumento permite ver los espectros rápidamente y además almacenarlos. Los beneficios que aporta son : determinar la pureza del pico y ver los espectros a diferentes tiempos de elución así como de leer una sola vez a 6 diferentes longitudes de onda.

Detector fluorimétrico.

Los detectores fluorimétricos o de fluorescencia son altamente sensitivos y selectivos. La selectividad se basa en que ciertos compuestos emiten luz cuando son excitados con luz UV. Esto hace que los compuestos de interés sean distinguidos rápidamente de aquellos que no exhiban fluorescencia. La sensibilidad incrementa si la intensidad de fluorescencia del compuesto es mayor, esta puede llegar a detectar hasta 10 ng de muestra.

Detector de índice de refracción.

Este es un detector universal, es más costoso que el detector UV, requiere de un control de temperatura y control de flujo. La sensibilidad se limita a 1 microgramo de muestra.

Detector electroquímico.

Este detector se basa en que muchas moléculas orgánicas e inorgánicas incluyendo muchas drogas pueden ser electroquímicamente oxidadas o reducidas por un electrodo adecuado. Este detector tiene una alta sensibilidad pero es menos selectivo que un detector fluorimétrico.

GRAFICADOR

Muestra la carta de registro que ayuda a la identificación de los picos, observando su forma y tamaño de estos.

INTEGRADOR

Además de las funciones antes mencionadas del graficador, el integrador posee varios métodos para cuantificar y reportar los componentes presentes en el cromatograma utilizando las alturas y/o áreas de los picos.

3.2. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

La validación de métodos analíticos tiene como objetivo el certificar la validez de los métodos analíticos mediante análisis estadísticos de acuerdo a parámetros a evaluar como son :

Linealidad del sistema, exactitud, linealidad y precisión del método analítico, de esta manera se puede evaluar si el método es confiable o no estadísticamente. (14)

LINEALIDAD DEL SISTEMA

Consiste en la relación que se establece entre la cantidad del activo y una respuesta que puede ser biológica, física o química; representada por una recta.

El intervalo de concentraciones siempre debe de incluir el 100 % del activo establecido.

PRECISIÓN DEL SISTEMA

Se define como la concordancia relativa entre mediciones repetidas independientes, de una misma propiedad bajo las mismas condiciones.

LINEALIDAD DEL METODO

Es la relación que se establece entre la cantidad de fármaco recuperado y el valor real de la cantidad de fármaco adicionado.

EXACTITUD

La exactitud es la concordancia absoluta entre el valor de una propiedad medida experimentalmente y su valor real de referencia.

ESPECIFICIDAD

Determina si el método analítico es específico con los productos de degradación del activo o componentes de la formulación, es decir se confirma si el método es capaz de cuantificar solamente al activo de interés.

REPRODUCIBILIDAD

Determina el grado de reproducibilidad al realizar mediciones repetidas independientes, esta es determinada por lo menos por dos analistas, en días diferentes. (14)

4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En nuestros días con el auge en el desarrollo o mejoramiento de los fármacos y lanzamiento de nuevos productos, el campo del análisis farmacéutico se ha enfrentado con una serie de problemas cada vez mayores respecto al análisis de los principios activos.

El problema se traduce en asegurar la calidad de los resultados obtenidos, es decir, que tales técnicas proporcionen resultados confiables, lo cual solo se puede garantizar mediante una validación quien tiene como objetivo el certificar la validez de los métodos analíticos y consiste en determinar a través de estudios de laboratorio, la exactitud y establecer la precisión con la cual se cuantifica el contenido en una formulación.

El desarrollo y validación de un método por cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación de clonuro de benzalconio, ayuda substancialmente, el cual junto con otros ingredientes forman parte de la formulación de una pomada o ungüento.

Para su determinación es relativamente difícil ya que por otras técnicas de análisis como espectrofotometría uv-vis existe interacción de los otros ingredientes que lo acompañan a la longitud de onda máxima de 262 nanómetros, siendo que el clonuro de benzalconio se encuentre en concentraciones bajas de 1 mg/gr. de pomada.

Además se tiene el problema que en el laboratorio farmacéutico no se cuenta con un método de análisis que cumpla con los requerimientos de la FDA (Food, Drugs of Administration), al tratarse de un producto de exportación. Por otra parte el realizar el desarrollo por esta técnica (CLAR) nos trae con sígo otras ventajas como el de poder reducir tiempos de análisis, costos, etc.

Resolviendo un problema para el laboratorio farmacéutico. (13)

5.- OBJETIVOS

Desarrollar y validar un método analítico específico y selectivo por cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificar cloruro de benzalconio en una pomada o ungüento.

6.- HIPOTESIS

Si se desarrolla un método analítico por CLAR para cloruro de benzalconio, entonces se va a evaluar satisfactoriamente la cantidad presente de este activo en la formulación de la pomada o ungüento.

Si se somete a diferentes condiciones de degradación (medio ácido, básico, oxidación, condiciones ambientales) materia prima, formulación pomada y placebo, entonces se sabrá la especificidad del método para cloruro de benzalconio.

Si se realiza la validación de métodos analíticos para el método desarrollado para cloruro de benzalconio, entonces el método cumple con las características para el cual fue diseñado.

7.- DESARROLLO EXPERIMENTAL

7.1. REACTIVOS Y DISOLVENTES.

- Acetonitrilo Grado CLAR, Merck.
- Etanol absoluto J.T. Baker.
- Agua deionizada
- Acido acético glacial J.T. Baker.
- Acetato de sodio J.T. Baker.
- Cloruro de benzalconio. (estándar de referencia marca SIGMA).
- Formulación placebo
- Formulación pomada

7.2. MATERIAL.

- Matraces volumétricos de 250 ml. Kimax
- Matraces volumétricos de 100 ml. Kimax
- Vasos de precipitado de 150 ml. Pyrex
- Pipetas volumétricas de 15 ml. Pyrex
- Pipetas volumétricas de 10 ml. Pyrex
- Probetas de 50 ml. Kimax
- Probetas de 100 ml. Kimax
- Probetas de 250 ml. con tapón esmerilado. Pyrex
- Cuba para baño de hielo.
- Embudos de talle corto. Kimax
- Papel filtro (Whatman) No. 4
- Agitador magnético.
- Membranas Millipore de 0.45 micras de (tipo hidrofílicas).

EQUIPO

- Parrilla de calentamiento con agitación.
- Baño ultrasónico.
- Bomba de vacío (Waters).
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución WATERS 600.
- Detector de longitud de onda variable modelo 490E.
- Integrador Hewlett Packard modelo HP 3396A.
- Columna Waters ciano (CN) de 15 cm de longitud.
- Potenciómetro Beckman.
- Electrodo de combinación rellenable con medio celda de plata-cloruro de plata.

CONDICIONES EXPERIMENTALES

Preparación de soluciones:

Solución buffer de acetato de sodio 0.1 M a pH 6.-Pesar 3.4 gr. de acetato de sodio; colocar en un matraz volumétrico de 250 ml, adicionar 100 ml de agua y disolver. Llevar al aforo con agua y mezclar. Ajustar el pH de la solución a 6.0 con ácido acético glacial..

Mezcla agua-etanol.- mezclar en una proporción(20:80) agua y etanol para análisis.

Fase móvil.- Mezclar en una proporción(80:20) acetonitrilo CLAR y solución de acetato de sodio 0.1 M pH 6 en una probeta con tapón esmerilado. Filtrar la fase móvil a través de una membrana de 0.45 micras de diámetro de poro y degasificar en baño ultrasónico o con agitación y vacío por 5 minutos.

Solución stock de cloruro de benzalconio :

Pesar con exactitud el equivalente a 45 mg de cloruro de benzalconio y transferir cuantitativamente a un matríz volumétrico de 100 ml disolver con una mezcla agua-etanol (20:80), llevar a volumen con el mismo disolvente y agitar.

Preparación del estándar:

Adicionar 15 ml de la solución stock de cloruro de benzalconio dentro de un vaso de precipitado de 150 ml, adicionando 50 ml de la mezcla agua-etanol (20:80).

Preparación de la muestra:

Adicionar el contenido de por lo menos 3 tubos de ponada dentro de un mortero de porcelana, mezclar hasta homogeneizar.

Pesar con exactitud el equivalente a 2 gr. de ponada dentro de un vaso de precipitado de 150 ml, adicionar 10 ml de la solución stock de cloruro de benzalconio y 50 ml de la mezcla agua-etanol.

7.3. PROCEDIMIENTO

Colocar en una parrilla de calentamiento a 70 grados centígrados las preparaciones, agitar con barra magnética durante 15 min. Enfriar a temperatura ambiente y colocar en un baño de hielo por 10 min., filtrar la solución a través de papel filtro de poro cerrado (Whatman No 4), recibir el filtrado en un matríz volumétrico de 100 ml.

Adicionar al vaso de precipitado de 150 ml, 30 ml de la mezcla agua-etanol (20:80) y colocar el vaso en la parrilla de calentamiento. Agitar con barra magnética por 10 min. Enfriar la solución a temperatura ambiente y colocar en baño de hielo por 10 min. Filtrar la solución a través del mismo papel filtro recibiendo el filtrado en el mismo matríz volumétrico de 100 ml., enjuagar el papel filtro con 10 ml de mezcla agua-etanol, llevar a volumen con la misma mezcla y agitar. Filtrar la solución a través de membrana tipo HVLP de 0.45 micras de diámetro de poro.

inyectar la solución estándar por duplicado o hasta que la diferencia de las áreas de los picos no sea mayor al 2 %. Continuar de la misma manera con la solución muestra. Al final deberá inyectarse la solución estándar para comprobar la estabilidad del sistema.

CONDICIONES DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO.

Fase móvil: solución de acetato de sodio 0.1 M pH 6 y acetonitrilo en una proporción 20:80

Columna: Ultrasphere clano : Waters de 15 cm de longitud por 3 micras de tamaño de partícula.

- Vel. flujo: 0.5 ml/mín.
- Presión: 500 psi
- Detección: 262 nm.
- Sensibilidad: 1.000 AUF
- Vol. de inyección: 20 µcl.

Condiciones del integrador:

- Vel. de carta (CHT SP): 0.3 cm/mín.
- Atenuación (ATT2): 2
- Amplitud del pico (PK WD): 0.16
- Área de rechazo 20000
- PK THRESH : 4

Integración por áreas.

Tiempo de retención : 6.0 min

7.4. VALIDACION DEL METODO ANALITICO

Linealidad del sistema :

Realizar una curva estándar de concentración contra respuesta utilizando un rango de concentraciones de 70, 80, 100, 110 y 120% de acuerdo a la cantidad etiquetada en el marbete para cloruro de benzalconio. Analizar por triplicado cada nivel de concentración, en base a una solución patrón concentrada.

Linealidad del método :

Realizar una curva de calibración graficando cantidad adicionada contra cantidad recuperada , utilizando un rango de concentraciones de 70, 80, 100, 110 y 120 % de acuerdo a lo etiquetado en el marbete para cloruro de benzalconio. Analizar el 100 % por sextuplicado y las demás concentraciones por triplicado utilizando muestras de placebo cargado a partir de una solución patrón concentrada.

Exactitud :

Tomar los resultados obtenidos en la linealidad del método pero expresados en porcentaje recuperado.

Reproducibilidad :

Analizar la formulación de la pomada por 2 analistas en 2 días diferentes , por triplicado al 100 % .

Especificidad :

Para determinar los posibles productos de degradación que interfieran con el método analítico, someter : placebo, formulación y activo a condiciones de degradación :

- Medio ácido: 0.5 ml de ácido clorhídrico + 5 ml de agua deionizada. pH = 1-2
- Medio básico: 0.5 ml de hidróxido de amonio + 5 ml de agua deionizada. pH = 11-12
- Oxidación: 0.5 ml de agua oxigenada (peróxido de hidrogeno) + 5 ml de agua deionizada
- Temperatura : Colocar muestras solas a 55 a 60 grados centígrados.
- Luz solar: Exponer muestras de c/u a luz solar aprox. de 15 a 20 días.

Para todas las condiciones (menos la solar) colocar en un vaso de precipitados de 150 ml la muestra y exponer a una temperatura de 60 grados centígrados en una estufa. para su posterior análisis de acuerdo al método establecido. Leer las muestras a 2 longitudes de onda de 262 y 254 nm.

8.- RESULTADOS

LINEALIDAD Y PRECISIÓN DEL SISTEMA.

Se determinó construyendo una curva de calibración de concentración contra respuesta medida, utilizando 5 concentraciones obtenidas de una solución stock, analizándose por triplicado cada uno de los niveles de concentración propuestos: 70, 80, 110, 120 % y por sextuplicado el 100 % de la concentración del activo en la solución final a analizar de acuerdo al método establecido.

Los resultados y los parámetros estadísticos evaluados se presentan a continuación:

CONCENTRACION (mcg / ml)	RESPUESTA (AREAS)
15.820	682560
15.820	670750
15.820	674370
18.080	787455
18.080	778330
18.080	766400
22.600	969630
22.600	948690 ¹
22.600	951440
22.600	962520
22.600	948680
22.600	968680
24.860	1057000
24.860	1061700
24.860	1065800
27.120	1129000
27.120	1165500
27.120	1145750

- INTERCEPTO (b) = 20786
- PENDIENTE (m) = 41570
- COEF. RELACION (r) = 0.9981
- COEF. DETERMINACION (r²) = 0.9962
- ERROR EST. REGR. (Syx) = 10405
- PEND. RELATIVA (PR) = 0.9776

-INTERVALO DE CONFIANZA PARA INTERCEPTO

20786 +/- 30025 -9239 A 50811

-PRUEBA DE HIPOTESIS PARA EL INTERCEPTO

t exp. = 1.4677 t tablas(16, 0.975) = 2.12

-PRECISION (REPETIBILIDAD) AL 100 %

N = 6
X = 956607
S = 8984
CV = 0.94 %

La gráfica se muestra en la figura No. 7

AREAS

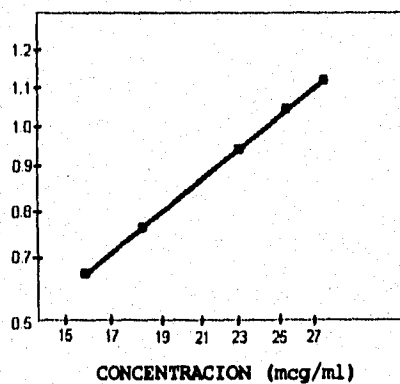


FIGURA 7 Linealidad del sistema para cloruro de bezalconio.

- LINEALIDAD Y PRECISION DEL METODO.

Se determinó construyendo una curva de calibración de cantidad adicionada contra cantidad recuperada, utilizando placebos adicionados de cantidades conocidas correspondientes a 70, 80, 100, 110 y 120 % de cloruro de benzalconio, haciendo el análisis por triplicado.

Para determinar la precisión del método al 100 % el análisis se determinó por sextuplicado de acuerdo al método desarrollado.

- EXACTITUD DEL METODO

Para evaluar la exactitud se utilizan los resultados de la linealidad del método expresados en % recuperado. Los resultados y parámetros estadísticos evaluados se presentan a continuación:

CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA	
	(mg)	(%)
6.090	6.052	99.38
6.090	6.090	100.00
6.090	6.145	100.90
6.315	6.342	100.43
6.315	6.398	101.31
6.315	6.300	99.76
6.760	6.724	99.47
6.760	6.732	99.59
6.760	6.830	101.04
6.670	6.759	99.99
6.670	6.790	100.44
6.670	6.707	99.22
6.990	6.992	100.03
6.990	6.981	99.87
6.990	7.016	100.37
7.210	7.177	99.54
7.210	7.370	102.22
7.210	7.191	99.74

- Exactitud y precisión del método analítico.

- REPETIBILIDAD AL 100 % (exactitud)

No. OBSERV. = 6
 MEDIA = 99.96 %
 DESV. ESTANDAR = 0.62
 COEF. DE VARIACION = 0.62 %

- REPETIBILIDAD DEL METODO

No. OBSERV. = 18
 MEDIA = 100.18 %
 DESV. ESTANDAR = 0.76
 COEF. DE VARIACION = 0.75 %

- INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA

100.18 +/- 0.3757 99.81 A 100.56 %

- PRUEBA DE HIPOTESIS PARA LA MEDIA

t exp. = 1.0257 t tablas(17, 0.975) = 2.1100

LINEALIDAD DEL METODO ANALITICO

- INTERCEPTO (b) = -0.0270
 - PENDIENTE (m) = 1.0059
 - COEF. RELACION (r) = 0.9910
 - COEF. DETERMINACION (r²) = 0.9822
 - ERROR EST. REGR. = (Syx) = 0.0548

- INTERVALO DE CONFIANZA PARA EL INTERCEPTO

-0.0270 +/- 0.481272
 -0.5082 A 0.4543

- PRUEBA DE HIPOTESIS PARA EL INTERCEPTO

t exp. = -0.1188 t tablas(16, 0.975) = 2.1200

-INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA PENDIENTE

1.00587 +/- 0.07393
 0.93193 A 1.07980

-PRUEBA DE HIPOTESIS PARA LA PENDIENTE

$t_{exp.} = 0.1682$ $t_{tablas}(16, 0.975) = 2.1200$

La gráfica se muestra en la figura 8.

mg. recuperados

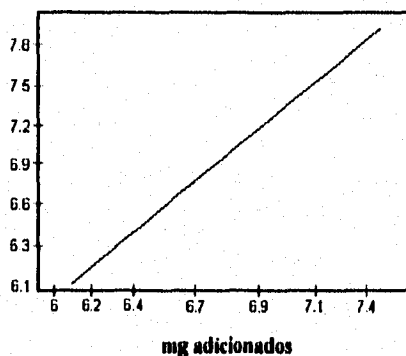


FIGURA 8. Linealidad del método para cloruro de benzalconio en una pomada.

-REPRODUCIBILIDAD

El análisis se determinó por triplicado, por dos analistas, en dos días diferentes, utilizando producto terminado para su evaluación, los resultados se muestran en la siguiente tabla:

DIA	ANALISTA 1	ANALISTA 2
1	98.93	98.92
	102.56	100.95
	98.64	99.06
2	100.81	100.95
	99.76	101.31
	100.99	99.98

RESULTADO PROMEDIO = 100.23 %
 DESVIACION ESTANDAR = 1.15
 COEFICIENTE DE VARIACION = 1.15 %

TABLA DE ANDEVA

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	MEDIA DE CUADRADOS	F (cal)	F (0.95)
DIA	1.802	1	1.802	5.572	161.45
ANALISTA	0.015	1	0.015	0.048	161.45
INTERACCION	0.323	1	0.323	0.187	5.32
ERROR	13.863	8	1.733		
TOTAL	16.004	11			

ESPECIFICIDAD

Para comprobar la especificidad del método analítico se sometieron muestras a diferentes condiciones de degradación, las cuales se presentan en la siguiente tabla:

Los resultados de las muestras degradadas evaluadas a dos diferentes longitudes de onda se muestran a continuación:

DESCRIPCION	CONDICION	TIEMPO
Materia prima	Temp. 55 °C	48 horas
	HCl / 55 °C	48 horas
	NH ₄ OH / 55 °C	48 horas
	Peróxido 55 °C	48 horas
	Luz solar	720 horas
Formulación	Temp. 55 °C	48 horas
	HCl / 55 °C	48 horas
	NH ₄ OH / 55 °C	48 horas
	Peróxido 55 °C	48 horas
	Luz solar	720 horas
Placebo	Temp. 55 °C	48 horas
	HCl / 55 °C	48 horas
	NH ₄ OH / 55 °C	48 horas
	Peróxido 55 °C	48 horas
	Luz solar	720 horas

Los resultados de las muestras degradadas evaluadas a dos diferentes longitudes de onda se muestran a continuación:

CONDICION		Long. 262 (Area)	Long. 254 (Area)	RELACION DE AREA
P.A.	Luz	824126	641780	1.284
	Temp.	849782	662030	1.283
	HCl	888880	713040	1.246
	NH ₄	833730	673960	1.237
	H ₂ O ₂	808155	644880	1.253
MTRA.	Luz	967728	799760	1.225
	Temp.	833957	681320	1.224
	HCl	1012873	830090	1.220
	NH ₄	758992	609850	1.244
	H ₂ O ₂	764167	597860	1.228

C.V.=1.975

APARIENCIA

Las muestras expuestas a degradación de oxidación y medio básico sufrieron cambio físico tomando de color blanco a café oscuro. Las demás muestras no presentaron cambio alguno. En la figuras 9 y 10 se muestran los cromatogramas de las muestras sometidas a degradación:

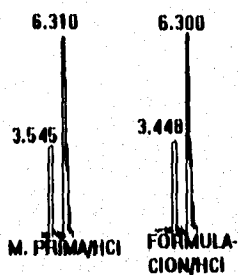


FIGURA 9. Cromatogramas de muestras sometidas a degradación en medio ácido.

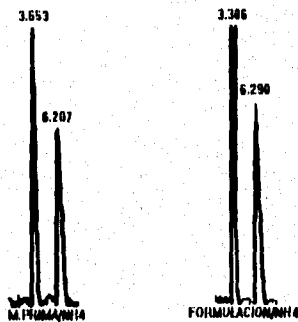


FIGURA 10. Cromatogramas de muestras sometidas a degradación en medio básico.

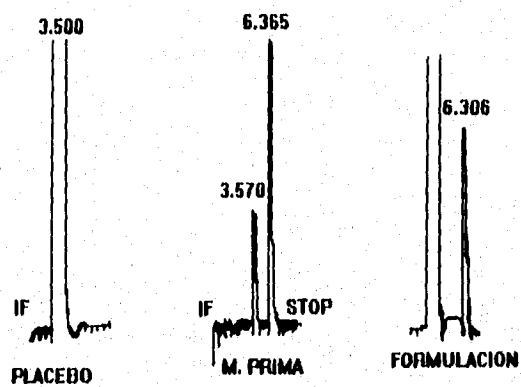


FIGURA 11. Cronatogramas correspondientes a placebo, materia prima y formulación en condiciones normales.

9.- ANALISIS DE RESULTADOS

Linealidad del sistema.

Para determinar la linealidad del sistema se construyó gráfica de concentración contra respuesta, apreciando en los resultados que se obtuvo un coeficiente de correlación y de determinación cerca de la unidad estos dos parámetros, por otro lado el intervalo de confianza para el intercepto incluye el cero y con la prueba de hipótesis se confirma al ser menor la t calculada a la t de tablas, encontrándose una relación altamente significativa en donde el modelo lineal se representa de manera correcta.

Para la repetibilidad al 100 % observamos un coeficiente de variación menor al 2 % lo que nos indica que no existe gran variabilidad en los datos obtenidos dado que al observar los resultados los valores se aproximan entre sí, no existiendo gran dispersión entre ellos.

Linealidad del método.

Esta fue realizada graficando cantidad adicionada contra cantidad recuperada y en los resultados se aprecia que el valor para el intercepto se aproxima a cero, así como el intervalo de confianza incluye al cero, confirmándose con la prueba de hipótesis al obtener una t calculada menor a la t de tablas, por otro lado el coeficiente de correlación y el de determinación se aproximan a la unidad igual que para la pendiente, incluyendo en el intervalo de confianza a la unidad, y a su prueba de hipótesis aceptable, siendo que en el método existe una relación altamente significativa de cantidad adicionada y cantidad recuperada, presentándose el modelo lineal de manera correcta.

Analizando la precisión del método obtenemos un coeficiente de variación menor al 2 % indicando que no hay gran variabilidad en los datos cumpliendo con los criterios de precisión.

Reproducibilidad.

Se llevó a cabo por 2 analistas, en 2 días diferentes; el analista no presenta efecto sobre la valoración y no existe efecto en los días para un analista, así como para la interacción, teniendo un coeficiente de variación menor al 2 %.

Especificidad.

Para determinar la especificidad del método analítico se sometieron muestras a diferentes condiciones de degradación, al observar los cromatogramas se tienen productos de degradación en medio básico y en medio oxidativo, sin embargo el método es capaz de separar el compuesto de interés, observándose también en su apariencia un cambio de coloración, las muestras analizadas se llevaron a cabo a dos longitudes de onda de 262 y 254 nm encontrando que la relación de áreas es semejante lo que asegura que el pico en el cromatograma solo le corresponde a el cloruro de benzalconio, teniendo un coeficiente de variación total de relación de áreas menor al 2 % especificado para CLAR.

10.- CONCLUSION

El método analítico desarrollado para determinar cloruro de benzalconio cumple con los criterios de validación para un método, resultando ser lineal, exacto y específico en la formulación de una pomada, por lo que el método es confiable para utilizarse en el laboratorio de control de calidad y para monitorar la concentración del activo en estudios de estabilidad.

11. - RECOMENDACIONES

Se recomienda que el método analítico desarrollado sea trabajado de acuerdo a las condiciones que se establecieron para el método, ya que la cantidad a cuantificar es muy pequeña presente en la pomada o ungüento.

ANEXO No. 1

CRITERIOS DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS (7)(8)(9)

En esta parte se describen los criterios para evaluar la linealidad del sistema, exactitud, linealidad y precisión del método. con estos parámetros se determina del método analítico su exactitud y variabilidad. para saber si este es confiable o no, desde el punto de vista estadístico.

LINEALIDAD DEL SISTEMA

La linealidad del sistema de medición consiste en la relación que se establece, entre la cantidad de activo y una propiedad biológica, física o química, mediante una recta.

Experimentalmente se determina preparando una curva de calibración a partir de una misma solución patrón, utilizando cuando menos 3 diferentes niveles de concentración y haciendo el análisis por triplicado para cada concentración.

Ahora bien, el intervalo de concentraciones a analizar dependerá del propósito del método y siempre debe de incluir el 100 % de activo establecido para el método analítico.

CRITERIOS

- a) La relación entre la concentración y la propiedad medida debe ser altamente significativa $r = 0,99$
- b) La ordenada al origen de la regresión lineal simple, debe ser estadísticamente igual a cero $b = 0$.
- c) El coeficiente de determinación de la relación lineal simple, debe ser mayor a 0,98 y/o la falta de ajuste a la relación lineal simple, no debe ser estadísticamente significativa.

Para los criterios anteriores se realiza lo siguiente:

1) Tabular los resultados en base al siguiente formato:

Nivel de concentración de la solución patrón (X)	propiedad medida (Y)
X1	Y11, Y12, ..., Y1r
X2	Y21, Y22, ..., Y2r
⋮	⋮
Xi	Yi1, Yi2, ..., Yir

Donde i = número de diluciones.

r = número de replicaciones (propiedad medida) de cada concentración.

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

2) Cálculos preliminares

$$\sum X = r(X_1 + X_2 + \dots + X_i)$$

$$\sum Y = Y_{11} + Y_{12} + \dots + Y_{1r} + Y_{21} + Y_{22} + \dots + Y_{2r} + Y_{i1} + Y_{i2} + \dots + Y_{ir}$$

$$\sum X^2 = r(X_1^2 + X_2^2 + \dots + X_i^2)$$

$$\sum Y^2 = Y_{11}^2 + Y_{12}^2 + \dots + Y_{1r}^2 + Y_{21}^2 + Y_{22}^2 + \dots + Y_{2r}^2 + Y_{i1}^2 + Y_{i2}^2 + \dots + Y_{ir}^2$$

$$\sum XY = X_1(Y_{11} + Y_{12} + \dots + Y_{1r}) + X_2(Y_{21} + Y_{22} + \dots + Y_{2r}) + \dots + X_i(Y_{i1} + Y_{i2} + \dots + Y_{ir})$$

3) Cálculos finales

$$m = \frac{r(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{r(\sum X^2) - (\sum X)^2}$$

$$b = \frac{Y - n(\sum X)}{r}$$

$$r^2 = \frac{r[\sum XY] - (\sum X)(\sum Y)}{r(\sum X^2) - (\sum X)^2 \cdot r(\sum Y^2) - (\sum Y)^2}$$

Intervalo de confianza para el intercepto (b) :

$$b \pm t(0.95, n-2)(SY/X) = \left[\frac{\sum X^2}{r(\sum (X_i - X)^2)} \right]^{1/2}$$

$$SY/X = \left[\frac{\sum Y^2 - (b)(\sum Y) - n(\sum XY)}{r} \right]^{1/2}$$

$$SY/X = \left[\frac{r}{(r)-2} \right]^{1/2}$$

$t_{0.95\%}(n-2)$ es la "t" de student determinada a partir de tablas a un 95 % de significancia.

$$\sum (X_i - \bar{X})^2 = \sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}$$

Error estándar relativo (E.S.R.)

$$E.S.R. = \frac{SY / X}{\bar{Y}} \quad \text{Este valor debe ser menor a 0.03.}$$

PRECISION DEL SISTEMA

La precisión del sistema se define como la concordancia relativa entre mediciones repetidas independientes, de una misma propiedad bajo las mismas condiciones (repetibilidad).

La precisión del sistema se determina por análisis por sextuplicado de una misma solución de referencia correspondiente al 100 % establecido en la linealidad del sistema.

CRITERIOS

El coeficiente de variación debe ser menor o igual a 1.5 % para

este criterio se realiza lo siguiente:

1) Tabular los resultados

$$Y_1 + Y_2 + Y_3 \dots Y_n$$

2) Cálculos preliminares

$$\sum Y = Y_1 + Y_2 + Y_3 + \dots Y_n$$

$$\sum Y^2 = Y_1^2 + Y_2^2 + Y_3^2 + \dots Y_n^2$$

$$\bar{Y} = \frac{\sum Y}{n}$$

Donde $n = n$

Desviación estándar (DE):

$$DE = \frac{n(Y^2) - (\bar{Y})^2}{n(n-1)}$$

3) Cálculos finales

Coefficiente de variación (CV):

$$CV = \frac{DE}{\bar{Y}} \times 100$$

3.- LINEALIDAD DEL METODO

La linealidad del método de medición es la relación que se establece entre la cantidad de fármaco recuperado y el valor real de la cantidad de fármaco adicionado.

Esta linealidad se determina experimentalmente con placebo cargados, cada uno de manera independiente, se preparan 6 diferentes niveles de concentración por sextuplicado cada uno.

El intervalo de concentraciones a analizar dependerá del propósito del método y debe de llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

CRITERIOS:

- a) La relación lineal simple de cantidad adicionada contra cantidad recuperada, debe ser altamente significativa, r mayor o igual a 0.99.
- b) La ordenada al origen de la relación lineal de la cantidad adicionada contra cantidad recuperada, debe ser estadísticamente igual a cero, $b = 0$.
- c) La pendiente de la relación lineal de la cantidad adicionada contra cantidad recuperada, debe ser estadísticamente igual a $m=1$.
- d) La desviación estándar de regresión y la desviación estándar del error puro, debe de cumplir con los requisitos establecidos para el principio de medición y/o para la utilización del método de medición.

Para los criterios anteriores se realiza lo siguiente :

- 1.- Tabular los resultados con base al siguiente formato :

CANTIDAD ADICIONADA	CANTIDAD RECUPERADA	TOTAL
(X)	(Y)	(Y)

- 2.- Calcular la suma de la cantidad adicionada (X), suma de cuadrados de la cantidad adicionada (X), suma de la cantidad recuperada (Y), la suma de cuadrados de la cantidad recuperada (Y), suma de producto de la cantidad adicionada por la cantidad recuperada (XY) (los cálculos preliminares se realizan igual que para la linealidad del sistema),

La suma de cuadrados totales (Y) y determinar el número de cantidades adicionadas (t), el número de repeticiones por la cantidad adicionada (r) y el número de pares ordenados (n).

$$n = rt$$

3.- Calcular el valor de la pendiente (m) y el valor de la ordenada al origen (b):

$$m = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2}$$

$$b = \frac{\sum Y - m(\sum X)}{n}$$

Construir la tabla del análisis de varianza.

4.- Calcular la suma de cuadrados de regresión (SCr) y la suma de cuadrados del error de regresión ($SCer$):

$$SCr = n(\sum XY) + b(\sum Y) - \left(\frac{(\sum Y)^2}{n} \right)$$

$$SCer = \sum Y^2 - m(\sum XY) - b(\sum Y)$$

5.- Calcular la suma de cuadrados del error puro (SCep) y la suma de cuadrados de la falta de ajuste (SCfa):

$$SC_{ep} = \sum Y^2 - \left(\frac{(\sum Y)^2}{n} \right)$$

$$SC_{fa} = SC_{er} - SC_{ep}$$

Tabla de análisis de varianza

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
REGRESION	1	SCr	SCr	$F_1 = \frac{SCr}{MCer}$
ERROR DE REGRESION	N-2	SCer	$MCer = \frac{SCer}{gl\ er}$	$F_f = \frac{MCF}{MCep}$
FALTA DE AJUSTE	(n-2)-(r-1)	SCfa	$MCfa = \frac{SCfa}{gl\ f}$	
ERROR PURO	1 (r-1)	SCep	$MCep = \frac{SCep}{gl\ ep}$	

6.- Determinar en la tabla de distribución F los valores para F

(glr, gler; al 0.01) y F (glf, gler; al 0.05).

7.- Establecer la decisión en base a la siguiente regla:

- a) Si F_r es mayor o igual a $F(glr, gler; al 0.01)$, existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.
- b) Si F_r es menor a $F(glr, gler; al 0.01)$, no existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.
- c) Si F_f es mayor o igual a $F(glf, glep; al 0.05)$, existe falta de ajuste a la relación lineal simple.
- d) Si F_f es menor a $F(glf, glep; al 0.05)$, no existe falta de ajuste a la relación lineal simple.

8.- Calcular el coeficiente de determinación (R):

$$R^2 = \left[\frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2 \quad n(\sum Y^2) - (\sum Y)^2} \right]$$

9.- Construcción del intervalo de confianza para la ordenada al origen:

- a) Calcular la desviación estándar de regresión (SY.X):

$$SY.X = \left(\frac{SCer}{glr} \right)^{1/2}$$

- b) Calcular la desviación estándar de la ordenada al origen (sb):

$$sb = SY.X = \left(\frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{\frac{(\sum X^2) - (\sum X)^2}{n}} \right)^{1/2}$$

- c) Determinar en la tabla de distribución "t" de student, el valor para t (n-2,0.975).
 d) Calcular el intervalo de confianza para la ordenada al origen (ICb):

$$ICb = b \pm t_{n-2, 0.975} \cdot (S_b)$$

10.- Construcción del intervalo de confianza para la pendiente :

- a) Calcular la desviación estándar de la pendiente (Sm):

$$S_m = SY.X = \left(\frac{1}{(\sum X^2) - \frac{(\sum X)^2}{n}} \right)$$

- b) Calcular el intervalo de confianza para la pendiente (ICm):

$$ICm = m \pm t_{n-2, 0.975} (S_m)$$

EXACTITUD

La exactitud es la concordancia absoluta entre el valor de una propiedad medida experimentalmente (estimador) y su valor real de referencia (parámetro).

Para determinar la exactitud del método, se puede tomar los datos de la linealidad del método de cantidad recuperada y pasarlos a porcentaje recuperado.

CRITERIOS

- a) El intervalo de confianza para la media debe de incluir el 100 %
 b) El coeficiente de variación total debe ser menor al 2 %

Para estos criterios se realiza lo siguiente:

- 1.- Tabular los resultados de porcentaje recuperado (Y).
- 2.- Calcular la suma de porcentaje recuperado ($\sum Y$) y determinar el número de recobros (n) así como la suma de cuadrados del porcentaje recuperado ($\sum Y^2$).
- 3.- Calcular la media aritmética (Y) y la desviación estándar (DE) del porcentaje recuperado.

$$\bar{Y} = \frac{\sum Y}{n}$$

$$DE = \left(\frac{n(\sum Y^2) - (\sum Y)^2}{n(n-1)} \right)^{1/2}$$

- 4.- Determinar en la tabla de distribución "t" de student el valor de $t_{n-1, 0.975}$.
- 5.- Calcular el intervalo de confianza para la media del porcentaje recuperado:

$$IC = \bar{Y} \pm t_{n-1, 0.975} \frac{DE}{n}$$

- 6.- Calcular el coeficiente de variación total (CV):

$$CV = \frac{DE}{\bar{Y}} \times 100 \times 100$$

ESPECIFICIDAD

La especificidad determina si el método analítico es específico con los productos de degradación del activo o componentes de la formulación es decir se confirma si el método es capaz de solamente cuantificar al producto de interés.

Si no se cuenta con los productos de degradación se somete a que el producto se degrade. Se sugiere que la degradación sea tal que la concentración del activo de interés esté disminuido en un 10 a 30%, esto se logra sometiendo el activo, así como el placebo y formulación, a condiciones de degradación. Las condiciones de degradación se establecen de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas del activo y de la formulación misma.

Una vez que se tienen productos de degradación de ser posible habrá que separarlos por CLAR.

CRITERIOS

Verificar que cada producto de degradación se encuentre separado del activo. Para métodos por CLAR es muy importante cumplir con este criterio, ya que a partir de esta información se elige el compuesto de referencia interna.

REPRODUCIBILIDAD

Determina el grado de reproducibilidad al hacer mediciones repetidas independientes.

La reproducibilidad se determina por lo menos con 2 analistas en 2 días diferentes, analizando muestras por triplicado. Se debe de trabajar de manera independiente las muestras del producto cercana al 100 % de la concentración estimada.

CRITERIOS

- a) El coeficiente de variación total debe ser menor a 2 %.
- b) La reproducibilidad entre analistas y la reproducibilidad entre día-analista debe satisfacer los requisitos establecidos al construir una tabla del análisis de varianza.

Para los criterios anteriores se realiza lo siguiente:

1.- Tabular los resultados en base al siguiente formato :

	ANALISTA	
	1	2
DIA 1

DIA 2

2.- Calcular la suma de las combinaciones: Analista-día (Y_{ij}), suma para cada analista ($Y_{i.}$), la suma total de los datos ($Y_{..}$) y la suma de cada dato elevado al cuadrado ($\sum\sum\sum Y_{ijk}^2$).

$$Y_{ij} = Y_{ij1} + Y_{ij2} + Y_{ij3}$$

$$Y_{i.} = \sum Y_{i1} + Y_{i2}$$

$$Y_{..} = Y_{1.} + Y_{2.}$$

$$\begin{aligned} (\sum\sum\sum Y_{ijk}^2) = & (Y_{111})^2 + (Y_{112})^2 + (Y_{113})^2 + (Y_{121})^2 + (Y_{122})^2 + (Y_{123})^2 + (Y_{211})^2 + (Y_{212})^2 + \\ & (Y_{213})^2 + (Y_{221})^2 + (Y_{222})^2 + (Y_{223})^2 \end{aligned}$$

3.- Calcular la suma de cuadrados del analista:

$$SCa = \frac{(\sum Y_{i.})^2}{d(r)} - \frac{(Y_{..})^2}{d(r)a}$$

Donde :

r = Número de replicaciones

d = Número de días

a = Número de analistas

4.- Calcular la suma de cuadrados del día anidado en el analista (SCd):

$$SCd = \frac{(\sum \sum Y_{ij}^2)}{r} - \frac{(\sum Y_{i.}^2)}{d(r)}$$

5.- Calcular la suma de cuadrados del error (SCe) :

$$SCe = (\sum \sum \sum Y_{ij}) - \frac{(\sum \sum Y_{ij}^2)}{r}$$

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	Fcal
ANALISTA	$gla = a - 1$	SCa	$MCa = SCa / gla$	MCa
				----- Fa = MCd
DIA	$gld = (d-1)a$	SCd	$MCD = SCd / gld$	MCd
				----- Fd = MCE
ERROR	$gle = (r-1)ad$	SCe	$MCE = SCe / gle$	

6.- Se establecen decisiones:

- Si Fa es mayor o igual a $F(gla, gld; 0,05)$, el método analítico no es reproducible por los analistas.
- Si fa es menor a $F(gla, gld; 0,05)$, el método analítico es reproducible por los analistas.
- Si fd es menor a $F(gld, gle; 0,05)$ el método es reproducible en distintos días por un analista.
- Si es lo contrario el método no es reproducible en distintos días por un analista.

7.- Calcular el coeficiente de variación total (CV):

$$CV = \frac{DE}{\bar{Y}} \times 100 \times 100$$

$$\bar{Y} = \frac{(\sum \sum \sum Y_i)_k}{n}$$

$$DE = \left(\frac{n(\sum \sum \sum Y_{ijk}^2) - (\sum \sum \sum Y_{ijk})^2}{n(n-1)} \right)^{1/2}$$

$$n = u(d)r$$

NOTA: Los cálculos y resultados para la validación del método analítico fueron realizados por medio de un programa estadístico elaborado en Lab. Columbia S.A. de C.V.

12.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Munson W. Pharmaceutical analysis, modern methods parte b. volumen 11, fifth edition, 1986.
- 2.- N.A. Parris. Instrumental liquid chromatography, a practical manual on high-performance liquid chromatographic methods. volumen 27 second edition. 1984.
- 3.- Snyder L.R. Introduction to modern liquid chromatography, second edition, 1979.
- 4.- Perkin-Elmer, Introducción a la cromatografía líquida práctica, primera edición 1981.
- 5.- Waters Chromatography división, Waters sourcebook for chromatography columns and supplies, 1985.
- 6.- USP (Pharmacopeia National Formulary) XXII, 1990.
- 7.- Curso de validación de métodos analíticos, impartido en el centro consultorio y servicios en estadística biomédica y farmacéutica. 1989.
- 8.- Castañeda, P.; Giral, C., Validación de métodos analíticos, Folleto Asociación Farmacéutica Mexicana. 1990.
- 9.- Ostle B. Estadística aplicada, Octava reimpresión. 1983.
- 10.- García a. ; Castillo, Cromatografía líquida de alta resolución. ed. Limusa. México 1988.
- 11.- Disolventes para HPLC. Leasca S.A. de C.V.
- 12.- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 5a edición. 1988.

- 13.- Procedimiento de validación de métodos analíticos de Laboratorios Columbia S.A de C.V.
- 14.- Validación de métodos analíticos. Dirección general de control de insumos para la salud. S.S.A. 1987.
- 15.- Andrizzi S. ; Quattrocchi O. ; Introducción a la HPLC, Aplicación y práctica, edición por Merck de México, 1990.
- 16.- Liquid Chromatography School, Waters Associates. section solvents.