

2ej.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores  
ZARAGOZA

## DESARROLLO Y VALIDACION DE LA METODOLOGIA ANALITICA PARA LA CUANTIFICACION DE CLONIXINATO DE LISINA EN DIFERENTES FORMAS FARMACEUTICAS

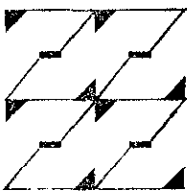
### T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

### HERIBERTO BAUTISTA MENDEZ

U N A M  
F E S  
Z A R A G O Z A



LO HUMANO EJE DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

257526



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis 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.

Jurado asignado:

Presidente. M. en C. GLORIA VELASQUEZ VAQUERO

Vocal: Q.F.B. GRACIELA AGUILAR GIL SAMANIEGO

Secretario: Q.F.B. FELIPE A PEREZ VEGA

Suplente: Q.F.B. MA CIRENIA SANDOVAL LOPEZ

Suplente: Q.F.B. LIDIA SANCHEZ ORTIZ

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Desarrollo de los Laboratorios Grossman S.A.

Director de tesis.


Q.F.B. GRACIELA AGUILAR GIL SAMANIEGO



---

Sustentante:

HERIBERTO BAUTISTA MENDEZ



---

A MIS PADRES

Por que sin su apoyo esto nunca hubiera sido posible.

A LUPITA Y JESUS ABRAHAM

Porque ellos son mi mayor motivación y a su lado se puede lograr cualquier meta.

A MIS HERMANOS

Por su ayuda incondicional en todos los momentos difciles de mi vida

A LAS Q F.B. GRACIELA AGUILAR, ROSALINDA MOTA Y AMPARO CHARVEL  
Por toda su ayuda, comprensión y enseñanzas durante toda mi trayectoria profesional.

AL PERSONAL DE LABORATORIOS GROSSMAN Y NYSCO DE MEXICO  
En especial a Alicia, Ramiro, Maria del Carmen, Dario, Adán, José, Miriam, Claudia y todos  
los que en su momento han formado parte de el equipo de trabajo y con quien he  
compartido muy buenos momento de mi vida.

AL INGENIERO ALFREDO GARZON  
Por su paciencia y constante motivación.

## INDICE

CAPITULO I.	INTRODUCCIÓN	5
1.1.	Objetivo	6
2.1.	Plantamiento del problema	6
2.1.	Hipotesis	7
CAPITULO II.	GENERALIDADES	
2.1.	Monografía del principio activo	7
2.1.1.	Nombre químico	7
2.1.2.	Fórmula empírica	7
2.1.3.	Fórmula estructural	7
2.1.4.	Aspecto	8
2.1.5.	Solubilidad	8
2.1.6.	Identificación	8
2.1.7.	pH de la solución	9
2.1.8.	Claridad y color de la solución	9
2.1.9.	Métodos de análisis	9
2.1.10.	Farmacodinamia y mecanismo de acción	9
2.1.11.	Farmacocinética	10
2.1.12.	Indicaciones	10
2.1.13.	Preparados, vía de administración y dosis	11

2.1.14.	Interacciones medicamentosas	11
2.2.	Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)	11
2.2.1.	Tipos de cromatografía	12
2.2.1.1.	Cromatografía Líquido-Líquido	12
2.2.1.2.	Cromatografía de fase enlazada	14
2.2.1.3.	Cromatografía Líquido-Sólido	15
2.2.1.4.	Cromatografía de par iónico	16
2.2.1.5.	Cromatografía de intercambio iónico	17
2.2.2.	Componentes del equipo	18
2.2.2.1.	Bomba de solventes de alta presión	19
2.2.2.2.	Inyectores	21
2.2.2.3.	Columnas	24
2.2.2.4.	Detectores	26
2.2.2.5.	Detector de arreglo de fotodiodos	33
2.2.3.	Fase móvil	36
2.2.4.	Aditivos y modificadores orgánicos	38
2.2.5.	Fuerza iónica y pH	39
2.2.6.	Terminología en CLAR	40
2.3.	Validación de métodos analíticos	42
2.3.1.	Definición de términos relacionados	42
2.3.2.	Determinaciones y criterios	44

CAPITULO III.	METODOLOGIA	
3.1.	Desarrollo del método	49
3.1.1.	Equipo	49
3.1.2.	Material	49
3.1.3.	Reactivos	49
3.1.4.	Selección de las condiciones cromatográficas	50
3.1.5.	Método analítico	51
3.2.	Validación del método	53
3.2.1.	Linearidad del sistema	53
3.2.2.	Precisión del sistema	53
3.2.3.	Especificidad del método	54
3.2.4.	Linearidad del método	54
3.2.5.	Exactitud del método	55
3.2.6.	Reproducibilidad	55
3.2.7.	Tolerancia del sistema	55
CAPITULO IV.	RESULTADOS	56
CAPITULO V.	ANÁLISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES	
5.1.	<i>Análisis de resultados</i>	77
5.2.	Conclusiones	78



## INTRODUCCION

Hoy en día uno de los principales objetivos de la industria farmacéutica es contar con un adecuado control de calidad para asegurar la calidad de los productos que fabrica y que cumplan con el fin para que fueron diseñados.

Es por esto que debemos controlar todos los parámetros involucrados en la fabricación de un medicamento, en donde una de las etapas más importantes es la validación de métodos analíticos para asegurar que el método que usamos es el adecuado para analizar el producto en sus diferentes etapas como son: análisis de materia prima, análisis de producto terminado y en el monitoreo de la estabilidad del producto.

La etapa de validación de métodos analíticos comprende una serie de pruebas sistemáticas para las cuales queda establecido de manera clara, objetiva y documentada, que el método de estudio reúne los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. De tal manera que el proceso de validación de un método en particular está basado en principios científicos y ha sido optimizado para propósitos de medición

El objetivo del presente trabajo fué desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para control de calidad e indicativo de estabilidad para determinar clonixinato de lisina en cápsulas, tabletas y solución inyectable por cromatografía de líquidos de alta resolución. Una vez terminado se procedió a validarlo por lo cual se determinó que el método

analítico desarrollado es Lineal, Exacto, Preciso, Reproducible, Específico y Tolerante.

Para determinar la especificidad se sometieron muestras de materia prima, placebo y producto terminado a diferentes condiciones de degradación y se analizaron de acuerdo al método analítico propuesto utilizando un detector de arreglo de fotodiodos. El método analítico fué capaz de cuantificar el principio activo sin interferencia de excipientes y/o productos de degradación.

#### 1.1. Objetivo

El objetivo del presente trabajo es desarrollar y validar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificar clonixinato de lisina en tabletas, cápsulas y solución inyectable, tanto para control de calidad como para el seguimiento de la estabilidad del producto.

#### 1.2. Planteamiento del problema

Debido a que al clonixinato de lisina es una molécula de reciente ingreso al arsenal farmacéutico, no se encuentra información compendiada para el análisis de producto, por lo que es importante desarrollar y validar una metodología analítica para la cuantificación de esta sustancia activa en diferentes formas farmacéuticas y así cumplir con las buenas practicas de manufactura.

### 1.3. Hipotesis

Considerando que el clonixinato de lisina es una molécula que presenta propiedades de absorción en la región ultravioleta y en base a sus propiedades fisicoquímicas es factible su análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa, por lo cual podremos desarrollar y validar la metodología analítica, demostrando que nuestro método es lineal, preciso, exacto y reproducible.

## GENERALIDADES

### 2.1. Monografía del principio activo <sup>(2, 17, 18 y 24)</sup>

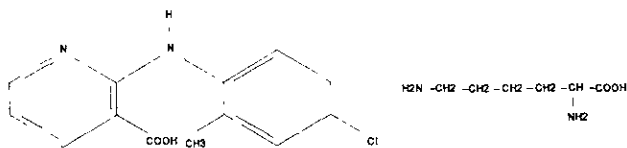
#### 2.1.1. Nombre químico.

2-(3-cloro-O-toluidino)piridin-3-Carboxilato de lisina

#### 2.1.2. Fórmula empírica.



#### 2.1.3. Fórmula estructural.



CLONIDINATO DE LISINA

### 1.3. Hipotesis

Considerando que el clonixinato de lisina es una molécula que presenta propiedades de absorción en la región ultravioleta y en base a sus propiedades fisicoquímicas es factible su análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa, por lo cual podremos desarrollar y validar la metodología analítica, demostrando que nuestro método es lineal, preciso, exacto y reproducible.

## GENERALIDADES

### 2.1. Monografía del principio activo (2, 17, 18 y 24)

#### 2.1.1. Nombre químico.

2-(3-cloro-O-toluidino)piridin-3-Carboxilato de lisina

#### 2.1.2. Fórmula empírica.



#### 2.1.3. Fórmula estructural.



#### 2.1.4. Aspecto

Polvo casi blanco, o crema pálido; de aspecto cristalino, olor ligero característico, muy irritante

#### 2.1.5. Solubilidad

Soluble en agua, metanol y soluciones alcalinas diluidas, ligeramente soluble en etanol; prácticamente insoluble en tolueno, cloroformo y acetona.

#### 2.1.6. Identificación

2.1.6.1. Espectrofotometría de infrarrojo (I.R.). El espectro de absorción I.R. de la muestra corresponde con el obtenido con la sustancia de referencia. Figura 1.

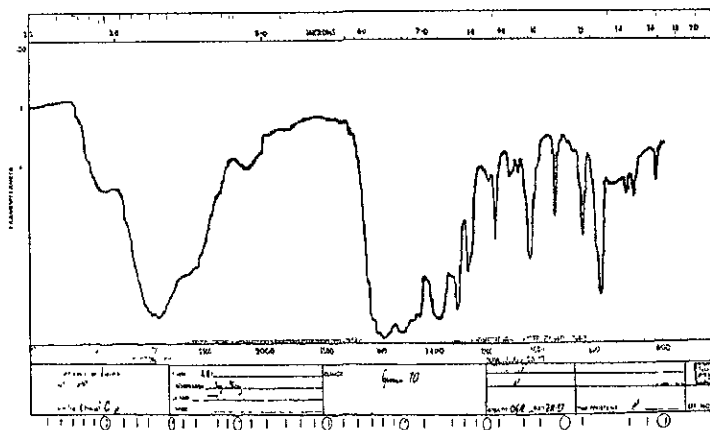


Figura 1. Espectro de absorción I.R. de clonixinato de lisina

2.1.6.2. Espectrofotometría U.V. El espectro de absorción U.V. de la muestra corresponde con el obtenido con la solución de referencia. Figura 2.

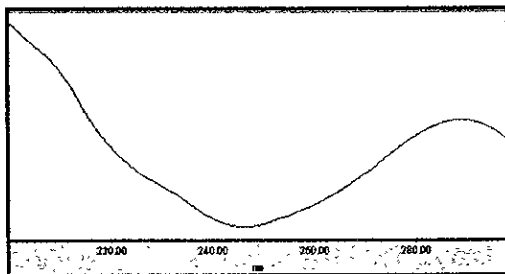


Figura 2. Espectro de absorción U.V. de clonixinato de lisina

2.1.6.3. Cromatografía de capa delgada (C.C.D). El Rf e intensidad de las manchas problema es igual al obtenido con la sustancia de referencia.

2.1.7. pH de la solución (1:10)

Entre 7.3 y 7.7

2.1.8. Claridad y color de la solución

La solución debe ser clara y menos opalescente que el control, la absorbancia a 430 nm debe ser no mayor de 0.150.

2.1.9. Métodos de análisis

El clonixinato de lisina al ser una molécula de reciente ingreso al arsenal farmacéutico, no se encuentra compendiado en la bibliografía oficial.

2.1.10. Farmacodinamia y mecanismo de acción. <sup>(2,4)</sup>

El clonixinato de lisina es un derivado sintético del ácido antranílico y está relacionado químicamente con el diclofenaco y los ácidos flufenámico y

mefenámico, actúa a través del mecanismo común a todos los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos inhibiendo la síntesis y acción tanto de la Prostaglandina GF<sub>2-alfa</sub> (PGF<sub>2-alfa</sub>), prostaglandina amplificadora del dolor a nivel periférico, como de la bradicinina productora de la hiperalgesia.

#### 2.1.11. Farmacocinética. <sup>(2,4)</sup>

El clonixinato de lisina se absorbe rápida y totalmente en el estómago, alcanzando concentraciones séricas máximas a la hora de su administración.

No se deposita en la mucosa gástrica, por ello tiene un mínimo índice ulcerogénico. Se distribuye ampliamente en todos los tejidos. no interfiere con la coagulación a nivel plaquetario, por lo que no altera el tiempo de sangrado. Es metabolizado parcialmente a nivel hepático y se elimina por la vía urinaria.

#### 2.1.12. Indicaciones <sup>(2)</sup>

El clonixinato de lisina está indicado como analgésico en padecimientos que cursen con dolor agudo o crónico, en las diferentes especialidades médicas:

Cirugía: Dolor postquirúrgico en intervenciones ginecológicas, ortopédicas, urológicas y de cirugía en general.

Traumatología y ortopedia: Dolor por traumatismos en general, luxaciones, esguinces, fracturas, mialgias, lumbilgias, miositis y neurilis.

Ginecología y urología: Disminorrea, mastalgia, anexitis, dolor postparto y postepisiotomía, uretritis, cistitis, prostatitis y urolitiasis.

Odontología y proctología: Odontalgias, dolor por hemorroides y cirugía proctológica.

Medicina general: Dolor reumático, gota, cefaleas, otalgias, sinusitis, neuritis y neuralgias.

Oncología: Cuadros dolorosos en pacientes con cáncer.

2.1.13. Preparados; vía de administración y dosis. <sup>(2)</sup>

Tabletas de 125 mg

Cápsulas de 125 mg

Solución inyectable en ampollas de 100 mg

2.1.14. Interacciones medicamentosas. <sup>(2)</sup>

Debido a que el clonixinato de lisina no altera la coagulación, no existe interacción con medicamentos anticoagulantes y no se requieren ajustes en las dosis.

2.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución (C.L.A.R.). <sup>(1,3,6,7,8)</sup>

La cromatografía de líquidos es una de las ramas más nuevas de la química analítica cuyo crecimiento ha sido muy rápido y su potencial es enorme. Se puede definir como una técnica que permite la separación, aislamiento y cuantificación de los diferentes componentes de una mezcla. La separación se fundamenta en la distribución entre dos fases, una móvil y una estacionaria, entre las cuales cada uno de los componentes de la mezcla es retenida selectivamente por la fase estacionaria.

La cromatografía de líquidos de alta resolución presenta muchas ventajas con respecto a otros métodos entre las que podemos numerar:



- Permite la separación, identificación y cuantificación de varios compuestos a la vez.
- Esta técnica puede separar compuestos de peso molecular entre 54 y 450,000 g/mol.
- Las cantidades a ser detectadas pueden variar de picogramos a nanogramos (escala analítica), de microgramos a miligramos (escala semipreparativa), a multigramos (escala preparativa).
- No es necesario que los compuestos sean volátiles o un tratamiento de derivatización.
- Las muestras acuosas pueden ser corridas después de una simple filtración.
- Compuestos con un amplio rango de polaridades pueden ser analizados en una corrida simple.
- Compuestos térmicamente lábiles pueden ser analizados.

## 2.2.1 Tipos de cromatografía <sup>(6, 7, 8)</sup>

### 2.2.1.1. Cromatografía Líquido-Líquido

En 1941 Martin y Synge describieron una nueva técnica de separación: la cromatografía líquido-líquido (CLL), llamada también cromatografía de partición, en la CLL las moléculas del soluto son distribuidas entre dos líquidos inmiscibles de acuerdo a sus solubilidades relativas, ver figura 3. Un líquido es la fase móvil (llamado el acarreador) y el otro líquido (fase estacionaria) es dispersado en un soporte inerte muy fino, este tipo de cromatografía presenta algunas ventajas:

- La fase estacionaria de las columnas puede ser fácilmente separado del soporte y éste puede ser recubierto por otra fase estacionaria muchas veces.
- Los poros de el soporte pueden ser completamente llenados con una fase estacionaria de baja viscosidad, dando un volumen máximo de fase estacionaria y permitiendo tamaños de muestra grandes con alta eficiencia en la columna.
- Un amplio rango de selectividad, resultante de un gran número de fases estacionarias disponibles (con la precaución de que las fases estacionaria y móvil deben ser inmiscibles).
- Gran reproducibilidad de columnas, debido a que el soporte de la columna por sí mismo no juega un papel importante en las características de la fase estacionaria.

El proceso de CLL puede ser comparado a la separación que se lleva a cabo en un embudo de separación.

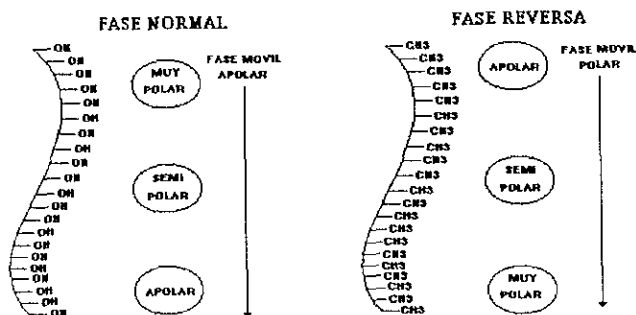


Figura 3. Mecanismo de separación en la cromatografía líquido-líquido

### 2.2.1.2. Cromatografía de fase enlazada

Este tipo de cromatografía es el más ampliamente usado y se caracteriza por contar con una fase estacionaria químicamente enlazada a un soporte inerte. En 1978 se reportó que en los laboratorios dos terceras partes del total de las técnicas por cromatografía de líquidos utilizaban la cromatografía de fase enlazada (CFE). En contraste con la CLL, la principal ventaja de los empaques de CFE es que estos son mas estables debido a que la fase estacionaria esta químicamente enlazada al soporte poroso y no puede ser removido o perdido durante su uso, además que no se requiere una presaturación de las dos fases como en CLL.

Una desventaja de la CFE es la pobre reproducibilidad de muchos empaques comerciales, además de que las fases estacionarias poliméricas ofrecen una menor eficiencia que las columnas para CLL.

Las fases estacionarias polares (por ejemplo sílica) con fases móviles no polares (por ejemplo hexano) son usados para separaciones de fase normal. Muestras de moderada a fuerte polaridad normalmente son bien separadas en los empaques polares.

La CFE de fase inversa normalmente involucra una fase estacionaria relativamente no polar (por ejemplo octadecilsilano) en conjunción con fases móviles muy polares (por ejemplo metanol, agua), ver figura 4; se utiliza ampliamente en la separación de solutos poco polares. Los empaques de CFE pueden ser usados para separar especies iónicas vía cromatografía de par iónico.

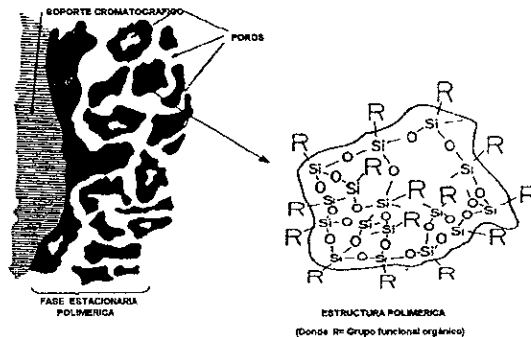


Figura 4. Representación de la estructura polimérica en la cromatografía de fase enlazada

### 2.2.1.3. Cromatografía Líquido-sólido

Este tipo de cromatografía es el más antiguo de todos, en su forma clásica se llamó cromatografía de columna abierta y fue desarrollada por Tswett al principio de siglo. Es también llamada cromatografía de adsorción, como fase estacionaria se utilizan partículas con una gran tensión superficial que adsorbe moléculas de soluto, la separación se base en repetidas etapas de adsorción y desorción de la muestra, ver figura 5; normalmente se utilizan sólidos polares como sílica gel, alúmina o vidrio poroso. la fase móvil es no polar como cloroformo, heptano u octano, este tipo de cromatografía es preferentemente utilizado como etapa preparativa ya que permite un tamaño de muestra muy grande y es más barato que los otros tipos de cromatografía. Muestras que se

disuelven muy pobremente en agua o solventes orgánicos miscibles con agua son muy bien separados con esta técnica.

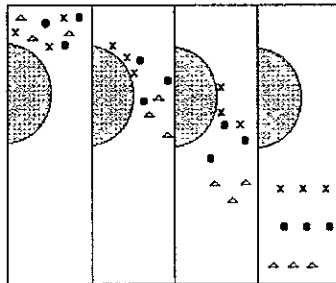


Figura 5. Representación del mecanismo de separación en la cromatografía sólido-líquido

#### 2.2.1.4. Cromatografía de par iónico

La gran popularidad alcanzada por la cromatografía de par iónico (CPI) se debe principalmente a las limitaciones de la cromatografía de intercambio iónico y a la dificultad para manejar algunas muestras por otros métodos, como son: compuestos muy polares, con ionización múltiple o fuertemente básicos.

La fase estacionaria en CPI puede consistir de un empaque de los utilizados normalmente en CFE o los utilizados en cromatografía de fase normal. La fase móvil consiste de un buffer acuoso ( más un modificador orgánico como metanol o acetonitrilo) y un contra-ion de carga opuesta a la de la molécula de la muestra. Ver ecuación 1.

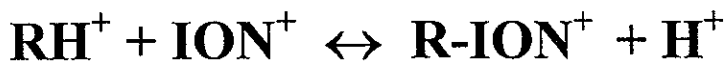


Ecuación 1. representación del mecanismo de reacción en la cromatografía de par iónico

#### 2.2.1.5. Cromatografía de intercambio iónico.

La cromatografía de intercambio iónico (CII) fué el primero de los métodos de cromatografía a ser usado ampliamente bajo las condiciones modernas de cromatografía de líquidos, se realizó automatizado, los primeros datos de CII datan de 1960 con una rutina para análisis de aminoácidos y después se aplico ampliamente a muestras en fluidos biológicos.

En la CII se utiliza una fase estacionaria que puede intercambiar cationes o aniones con la fase móvil, esta fase debe tener una carga contraria a la de la muestra, ver ecuación 2; cuanto mayor es 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 modificar el pH y la polaridad de la fase móvil. Generalmente se utilizan resinas poliméricas , las cuales se clasifican en aniónicas y catiónicas. Cada tipo de material puede subdividirse en intercambiadores fuertes o débiles.



Ecuación 2. Representación de la reacción de la cromatografía de intercambio iónico

### 2.2.2 Componentes del equipo. <sup>(7,8)</sup>

El más simple equipo de Cromatografía de líquidos de Alta Resolución (CLAR) consta de los siguientes componentes (ver figura 6) o módulos:

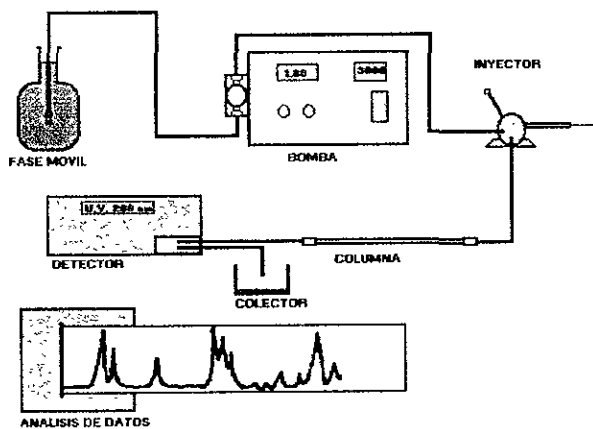


Figura 6. Partes fundamentales de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución

### 2.2.2.1. Bomba de solventes de alta presión<sup>(8)</sup>

La función de los sistemas de bombeo es proveer fase móvil a la columna de forma constante y reproducible, las características más importantes con las cuales debe contar un sistema de bombeo de solventes para CLAR son:

Reproducibilidad

Velocidad de flujo constante

Presión media adecuada

En general los sistemas de bombeo se pueden dividir en dos grupos; de presión constante y de flujo constante (o de desplazamiento constante).

Bombas de presión constante, probablemente la forma más sencilla de una bomba de presión constante consiste en un tubo de acero inoxidable en forma de espiral con fase móvil en su interior, al cual en un extremo se le coloca una columna y en el otro extremo se coloca una fuente de gas. Cuando el suministro de gas se acciona, el gas desplaza a la fase móvil forzándola por el sistema.

Existen otras bombas de presión constante en donde el pistón se encuentra entre el gas y la fase móvil. en general las bombas de presión constante tienen las siguientes características.

- Cámara de fase móvil de volumen limitado.
- Para una presión constante de la bomba, la velocidad de flujo del sistema varía con cambio en la composición de la fase móvil en la temperatura, viscosidad, resistencia generada por la columna (filtros obstruidos), entre otros factores.



- Generalmente son más sencillas en su construcción por lo tanto son menos caras y es más fácil darles servicio.

#### Bombas de flujo constante

Estas se pueden subdividir en 2 tipos: de cámara reducida (tipo jeringa) y con cámara de volumen infinito (tipo recíproco). La forma más simple de una bomba de flujo constante, consiste en un pistón accionado por un tornillo; si el tornillo se mueve a una velocidad constante, el desplazamiento del pistón será constante y una vez que el sistema alcanza la presión de operación, la velocidad del flujo será también constante.

Todos los tipos de bombas mencionadas hasta el momento dan flujos libres de pulsaciones debido a su acción de tipo jeringa, las bombas con cámara de volumen infinito o recíproco están diseñadas para trabajar con uno o varios pistones. Debido a que el empaque de las columnas en la actualidad son partículas de pequeño diámetro y éstas ofrecen una alta resistencia al paso de solventes a través de ellas, se requieren bombas de alta presión, las cuales deben trabajar a presiones de arriba de 5000 psi. Los sistemas de bombeo modernos utilizan para su construcción materiales resistentes al ataque químico, como son el acero inoxidable y el teflón, los sellos generalmente son fabricados de teflón relleno de grafito para soportar el ataque químico de todos los solventes utilizados en cromatografía.

Debido a su funcionamiento satisfactorio las bombas más generalmente usadas en la actualidad son las reciprocantes (ver figura 7), estas bombas usan cámaras

de volúmenes pequeños (35 - 400  $\mu\text{L}$ ) con pistones recíprocos o diafragmas flexibles para conducir el flujo de solvente contra la presión de la columna. Existen diferentes tipos de bombas recíprocos en el mercado, incluyendo bombas con una, dos y tres cabezas, con mecanismos de conducción especial

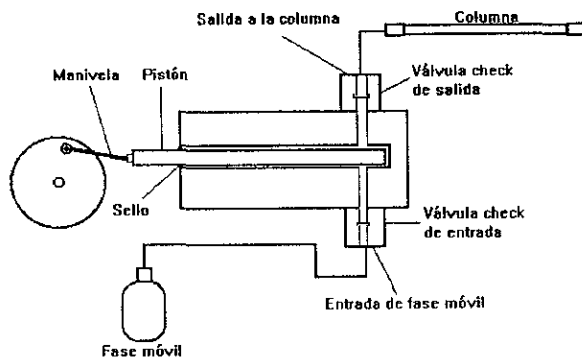


Figura 7. Mecanismo del pistón de una bomba recíproca

para reducir la pulsación del flujo de la fase móvil o algunos aditamentos para mejorar la precisión de liberación.

#### 2.2.2.2. Inyectores.<sup>(8)</sup>

Uno de los factores más importantes en la obtención de buenos resultados en una técnica por cromatografía de líquidos, es una adecuada introducción de la muestra en la columna, la mejor manera de hacerlo es realizando la inyección en la forma más compacta posible para de esa forma obtener los picos más finos y simétricos. Existen dos métodos principales para introducir la muestra en una columna de CLAR; éstos son por medio de una válvula de inyección o por métodos de detención de flujo. Los métodos de detención de flujo requieren que el flujo de la fase móvil hacia la columna sea detenido o desviado mientras la

muestra es introducida en la columna, luego se reinicia el flujo y el proceso de separación comienza.

El método más común de introducir la muestra es usando una válvula de inyección; el “loop” de la muestra se saca del flujo cambiando la válvula a la posición de carga. En esta posición el flujo de la fase móvil pasa a través de la válvula directamente a la columna. ahora es cuando se introduce la muestra a l “loop” de la válvula, usando una jeringa. El “loop” se puede llenar parcial o totalmente , pero si se requiere precisión se recomienda llenarlo totalmente. cuando se cambia la válvula con la muestra a la posición de inyectar, la fase móvil viaja a través del “loop” y lleva la muestra a la entrada de la columna. El flujo de la columna solo se interrumpió momentáneamente por el cambio de posición de la válvula.

En la actualidad la inyección de la muestra se puede hacer en forma automática. Primordialmente, los inyectores automáticos consisten de una válvula de inyección automática, un sistema de llenado de la válvula y un control electrónico que sirve para controlar funciones tales como: tiempos de inyección, tiempos de corrida, velocidades de llenado, número de inyecciones por muestra, volumen de inyección, identificación de muestra, inicio de inyección para el registro, lavado de válvula y jeringa, así como la operación de programadores de gradientes o controladores del sistema.

Existen principalmente tres métodos por medio de los cuales los inyectores automáticos llenan la válvula de inyección:

Desplazamiento positivo

Succión

Con jeringa

Si se utiliza el método de desplazamiento positivo es necesario sellar el vial que contiene la muestra . Cuando se lleva a cabo la carga de la muestra, una aguja doble pasa a través del sello y el aire penetra por una de los conductos de la aguja . este aire presuriza el vial y obliga a la muestra a salir por el segundo conducto de la aguja hacia la válvula. Cuando la introducción de la muestra se hace por succión se utiliza ya sea un sistema de vacío o una jeringa de mayor volumen y los viales que contienen la muestra generalmente no están sellados.

El tercer método de introducción utiliza una jeringa normal de CLAR. La jeringa es automática y generalmente puede ajustarse para dar varios volúmenes, sin cambiar ya sea la jeringa o el “loop” de la válvula (ver figura 8). Los viales de la muestra pueden estar sellados o abiertos para este método de introducción. La aguja de la jeringa entra al vial de la muestra. luego la jeringa carga la muestra en la válvula de inyección, de la misma manera como si la válvula se usara en forma manual; finalmente la válvula es accionada y la muestra se introduce en la columna.

Los sistemas de inyección automática obviamente permiten una operación sin atención pero también tienen un beneficio adicional. estos inyectores eliminan algunos de los errores que se presentan en el análisis cuantitativo, ocasionados por el manejo manual de los sistemas de inyección.

El inyector debe resistir altas presiones, ser reproducible, tener un volumen pequeño y sus cavidades deben ser fácilmente limpiadas por la fase móvil.

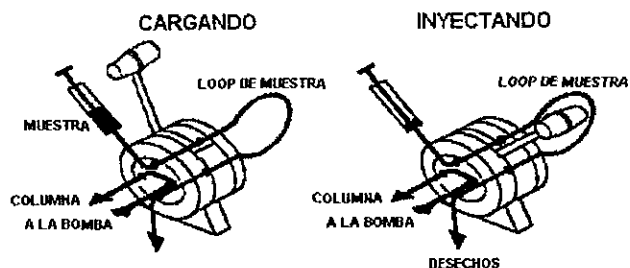


Figura 8. Inyector manual en las etapa de carga e inyección

### 2.2.2.3. Columnas. <sup>(8,10)</sup>

La columna cromatográfica es el corazón de todo sistema cromatográfico, es aquí donde se lleva a cabo la separación de los componentes de la muestra. La columna se compone de un tubo, generalmente de acero inoxidable el cual está empacado con pequeñas partículas sólidas llamadas material de empaque o resinas, dependiendo de la molécula a separar y la complejidad de la muestra será el soporte a utilizar.

El material de empaque se compone de partículas de tamaño muy reducido y de diámetro constante. En cromatografía de líquidos se dispone de gel de sílice en forma de partículas completamente porosas o de bolas de vidrio esféricas que están recubiertas por una capa delgada de gel de sílice distribuida irregularmente. La superficie de gel de sílice de cualquier tipo está recubierta

por grupos Si-OH y Si-O-Si que pueden interaccionar con las moléculas de la muestra. Los grupos hidroxilo son los más importantes, de los cuales, existen dos tipos: los libres y los reactivos; estos últimos constituyen agentes enlazantes muy fuertes que pueden adsorber los compuestos polares, tales como el agua, provocando una adsorción permanente con las partículas de la sílica. Esta actividad suele ser responsable del ensanchamiento de los picos, así como de la falta de reproducibilidad de los resultados. Los hidroxilos reactivos pueden desactivarse por adición de agua o de un alcohol o por medio de reacciones químicas.

El relleno idealmente debe producir la máxima resolución en el menor tiempo, debe tener la máxima capacidad de muestra, ser fácilmente empacable, producir pequeñas caídas de presión y ser barato. Las partículas son de materiales porosos que sirven propiamente como fases estacionarias, o bien de soportes para las mismas. La variedad y la naturaleza de fases estacionarias es amplia y su utilidad está en función de la separación a la que se pretende aplicar.

Existen en el mercado una gran variedad de empaques disponibles para realizar todas las formas de cromatografía moderna, aunque el tipo de cromatografía y la columna a usar va a depender del tipo de separación que se desee realizar y de la complejidad de la muestra a analizar.

En general las columnas para CLAR tienen una gran duración y cabe esperar una larga vida útil, a menos que se utilicen en condiciones intrínsecamente

destruictivas, como con eluyentes extremadamente ácidos o básicos o bien con inyecciones continuas de muestras crudas o biológicas sucias.

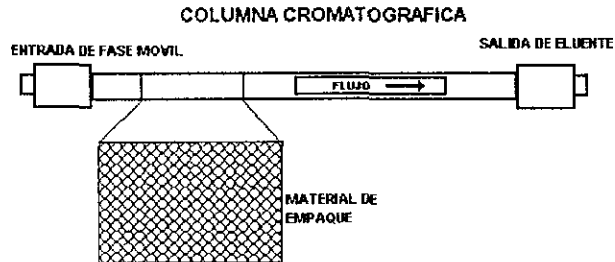


Figura 9. Representación de una columna empacada

#### 2.2.2.4. Detectores <sup>(6, 7, 8, 11)</sup>

El detector es una de las partes más importantes de un equipo de cromatografía de líquidos, este equipo se utiliza para el monitoreo de la salida de la columna, el equipo ideal debe cumplir con las siguientes características:

- Alta sensibilidad
- Respuesta a todos los componentes de la muestra
- Amplio rango de linealidad
- No ser afectado por cambio en la temperatura, ni velocidad de flujo de la fase móvil
- Responder independientemente de la fase móvil

- No contribuir a ensanchamiento de banda extracolumna
- De fácil operación y adquisición
- Tener una respuesta que se incremente con la cantidad de soluto
- Ser no destructivo del soluto
- Proveer información cualitativa del pico detectado
- Tener una fácil respuesta

*En la actualidad no se cuenta con un detector que cumpla perfectamente con todas las características citadas anteriormente, aunque los detectores permiten un amplio rango de aplicaciones. En caso de que los componentes de una mezcla presenten una gran diferencia en sus propiedades físicas puede ser necesario utilizar dos o más detectores en línea para asegurar que cada componente de interés está siendo adecuadamente medido.*

Actualmente los detectores más usados en la industria farmacéutica son los detectores de ultravioleta (U.V.) ya que muchos compuestos tienen uno o más enlaces dobles o con electrones no enlazados y no compartidos que absorben luz ultravioleta. Las ventajas que este tipo de equipo presentan son: bajo costo, alta sensibilidad, así como la insensibilidad a cambios de temperatura, velocidad de flujo y composición de la fase móvil.

Los detectores de U.V. operan bajo el principio de la ley de Lambert-Beer y existen tanto de longitud de onda fija como de longitud de onda variable.

Los detectores de longitud de onda fija tienen generalmente como fuente de luz una lámpara de mercurio, zinc o cadmio y se pueden obtener longitudes de onda



de 254, 280 y 313 nm entre otras por medio de filtros. Este tipo de lámparas tienen la ventaja de una fuente de luz muy intensa y niveles de ruido muy bajos, aun cuando las longitudes de onda no coincidan con el máximo de absorción de los solutos.

Los detectores más usados actualmente son los de longitud de onda variable, permiten la selección de longitud de onda de 190 a 600 nm. Estos detectores usan como fuente de luz una lámpara de deuterio.

La luz de la lámpara se enfoca en la entrada de la abertura de un monocromador, por medio de lentes apropiados la luz incide en la rejilla, donde se dispersa en diferentes longitudes de onda. Por la posición de esta rejilla se elige la longitud de onda que pasa a través de la celda de referencia y de muestra por medio de un haz de luz dividido, con lo cual se forman dos haces separados de igual intensidad, que se enfocan sobre las celdas de flujo duales por medio de un lente de cuarzo. La ventaja de estos detectores es un amplio rango de longitudes de onda, la capacidad de variar tales longitudes de onda sin cambiar los filtros de la lámpara y la posibilidad de operar a longitudes de onda inferiores a 254 nm, aunque los niveles de ruido son mayores que en los detectores de longitud de onda variable.

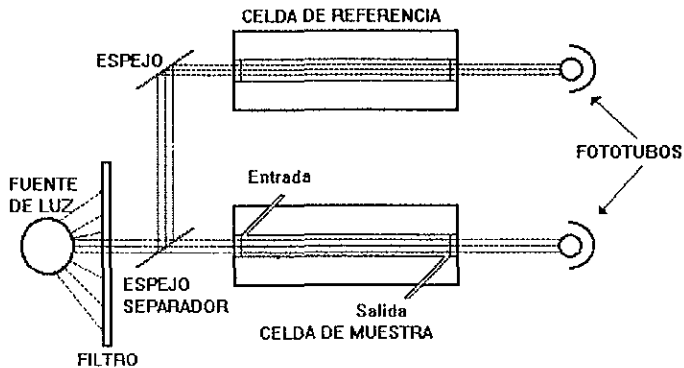


Figura 10. Diagrama esquemático de un detector de ultravioleta

Detectores de índice de refracción. Este es el segundo tipo de detectores más ampliamente usados, este equipo monitorea las diferencias en índice de refracción entre fase móvil de referencia pura y la que sale de la columna (ver figura 11). este tipo de detector responde a todos los compuestos de una mezcla, siempre y cuando estos presenten una diferencia en el índice de refracción con respecto a la fase móvil. Su estabilidad es buena, pero es sensible a los cambios de temperatura y de flujo. La señal que genera puede ser positiva o negativa dependiendo si el índice de refracción de la sustancia detectada es mayor o menor que el de la fase móvil.

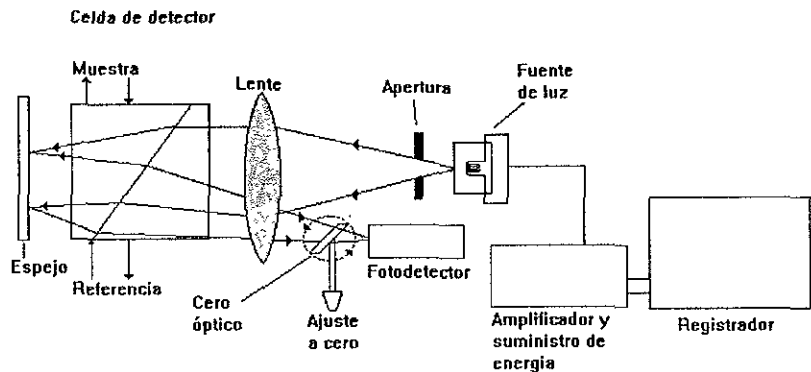


Figura 11. Detector de índice de refracción

**Detector de fluorescencia.** El detector de fluorescencia es muy sensible y selectivo para solutos fluorescentes debido a su capacidad de medir la energía emitida por ciertos solutos excitados por radiación U.V., también se pueden preparar derivados fluorescentes de sustancias que no lo son y ser detectadas con este equipo, esto se puede realizar con sustancias que por sensibilidad no pueden ser detectadas con otro tipo de equipo. La principal área de aplicación de este tipo de detectores es en el análisis de muestras biológicas, farmacéuticas, alimentos, combustibles fósiles y pruebas ambientales. Existen dos diseños: los fluorómetros que utilizan filtros para seleccionar la radiación de excitación y la de emisión y los espectrofluorómetros que emplean monocromadores.

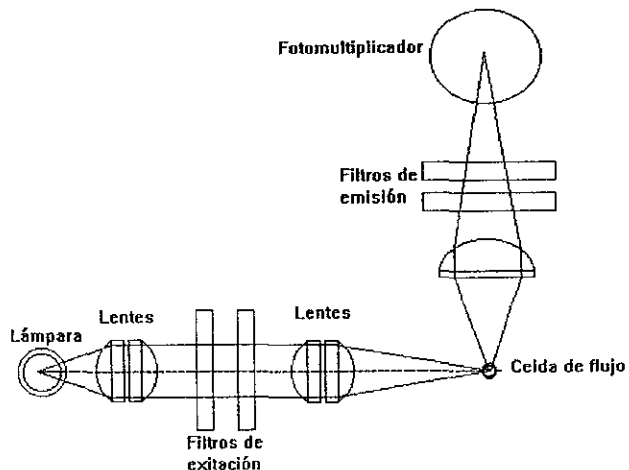


Figura 12. Detector de fluorescencia

Detector electroquímico. La mayoría de los compuestos electroreducibles o electrooxidables pueden ser detectados en la salida de una columna a muy baja concentración por medio de una medición electroquímica selectiva. Con este equipo puede ser medida la corriente entre dos electrodos (ver figura 13), uno polarizable y otro de referencia como una función del voltaje aplicado. Debido a que un voltaje constante es impuesto normalmente entre dos electrodos, los detectores electroquímicos pueden ser muy precisos y sensibles hasta el orden de picomoles si son bien controladas las condiciones cromatográficas.

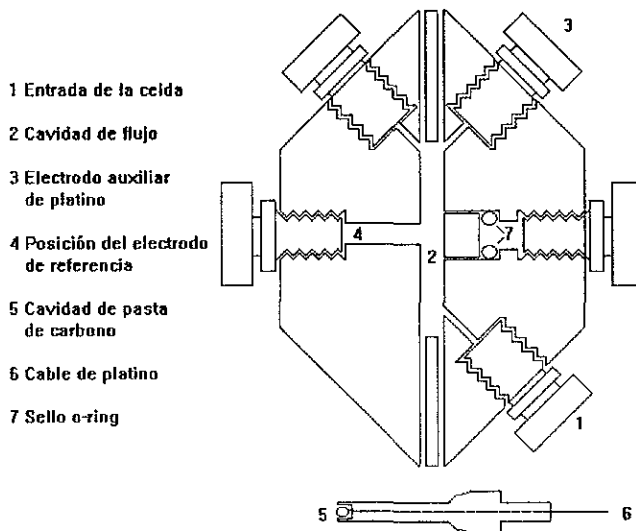


Figura 13. Detector electroquímico

Detector de infrarrojo. La absorción infrarroja puede ser usada tanto para detección general como selectiva en cromatografía de líquidos. Los compuestos orgánicos absorben energía a diferentes longitudes de onda del espectro infrarrojo debido a la presencia de grupos funcionales específicos a los cuales responde este detector. Estos detectores resultan útiles cuando el compuesto no es detectado en U.V.-visible o por los detectores de índice de refracción o bien, cuando el analista desea determinar la distribución de grupos funcionales.

El detector infrarrojo está limitado a fases móviles que son transparentes a la absorción a la longitud de onda utilizada, una particular ventaja de este detector es que este exhibe una operación estable con una celda calentada a temperatura

elevada (por encima de 150°C), haciéndolo el detector preferido para separaciones a alta temperatura de macromoléculas sintéticas.

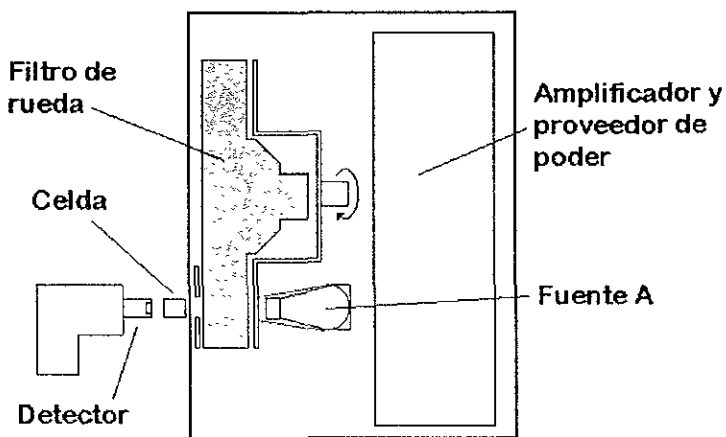


Figura 14. Detector de infrarrojo

2.2.2.5. Detector de arreglo de fotodiodos (DAF). El detector de arreglo de fotodiodos es un espectrofotómetro U.V.-visible basado en un arreglo lineal de fotodiodos, en el cual se transmite luz de una lámpara de deuterio, ésta luz pasa a través de un lente y un obturador hacia la celda de flujo, la luz transmitida se enfoca a una rejilla de difracción donde se separa en el espectro de 190 a 800 nm con una resolución óptica de 1.2 nm e incide en el arreglo de fotodiodos. La relación entre la cantidad de energía a una longitud de onda particular que llega al fotodiodo y la concentración de la muestra está descrita por la ley de Lambert-Beer.

Este instrumento permite el monitoreo espectral de las sustancias que van eluyendo de la columna, además de que permite calcular la pureza de los picos obtenidos, así como extraer cromatogramas en todo el rango de adquisición al cual el equipo fue seleccionado. El DAF consta de diferentes partes como son:

- Fuente de luz. Está compuesta por una lámpara de deuterio con un filtro de banda de paso que reduce las líneas de emisión de deuterio, y un filtro de segundo orden que reduce los efectos de la rejilla.

- Celda de muestra. Tiene una longitud de recorrido de 10 mm, un volumen de 5  $\mu\text{L}$  y resiste una presión máxima de 1000 psi., la luz policromática pasa a través de la celda de flujo conteniendo fase móvil y muestra. Este arreglo de componentes ópticos con la celda de flujo entre la lámpara y el prisma es comúnmente llamado óptica inversa.

- Obturador. Permite el paso de la luz durante la adquisición de datos, y cierra para provocar oscuridad en la prueba de corrección de la señal de recarga por efecto del propio sistema, abre y cierra en un tiempo específico.

- Rejilla de difracción. Separa el haz de luz en longitudes de onda que van de 190 a 800 nm. La rejilla cóncava holográfica empleada minimiza la generación de luz extraviada.

- Arreglo de fotodiodos. Conjunto de 512 diodos que reciben la señal proveniente de la rejilla de difracción. Cada fotodiodo produce una señal análoga a la cantidad de energía recibida, durante el tiempo de análisis los canales se abren en secuencia permitiendo que las señales del DAF sean

recibidas, para posterior procesamiento de datos, el último canal se cierra al final del tiempo de análisis terminando el barrido espectral.

- Circuito amplificador. La descarga de cada fotodiodo se convierte en una señal diferencial de potencial, a través de un amplificador. Un circuito mantiene los datos hasta que estos son enviados a través de un convertidor análogo-digital, a la memoria de la computadora como una señal digital.

- Computadora. recibe la señal de salida por recarga de los fotodiodos y calcula la absorbancia a cada longitud de onda de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$A = -\log(P/P_o) = -\log(S_n - D_n) / (R_n - D_n)$$

Donde:

P = Luz transmitida

P<sub>o</sub> = Luz incidente

S = Señal obtenida durante el análisis

D = Señal obtenida durante la prueba de recarga por efecto del sistema

R = Señal obtenida durante la prueba con la fase móvil

n = Canal o número de fotodiodos (1, 2, 3 . . . 512)

P/P<sub>o</sub> = T (transmitancia)

S - D = P (D, señal obtenida en la oscuridad)

R - D = P<sub>o</sub> (R, luz transmitida por el disolvente)

Los datos cromatográficos y los espectros son adquiridos y guardados en la memoria.



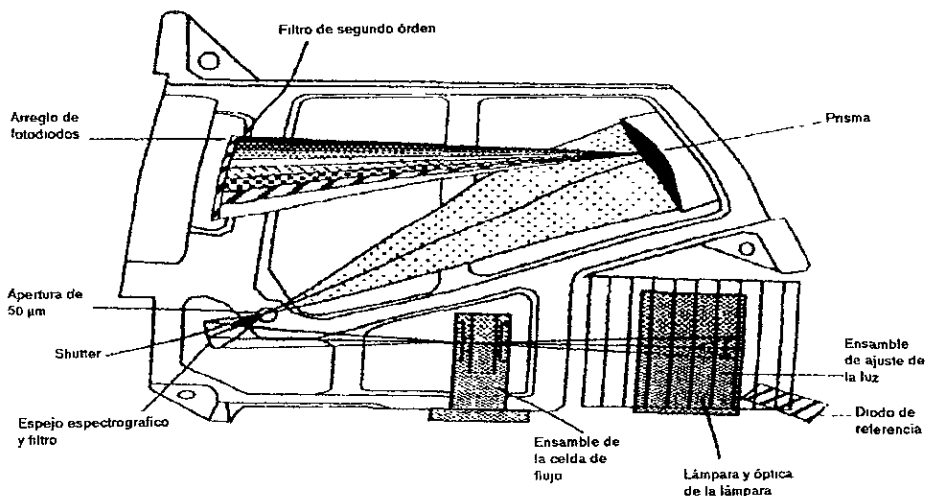


Figura 15. Detector de arreglo de fotodiodos

Sistema registrador de datos.

Después de que la señal es enviada, esta es capturada por la computadora y almacenada en el disco duro, estos datos pueden ser recuperados posteriormente para su análisis e impresión y borrados cuando ya no sean necesarios.

### 2.2.3. Fase móvil<sup>(6,7,8)</sup>

La fase móvil es uno de los componentes del sistema cromatográfico más importantes ya que de ésta depende la separación de los componentes de la mezcla en conjunción con la fase estacionaria y ligeras modificaciones en la composición, pH y temperatura pueden afectar notablemente el comportamiento

del sistema cromatográfico, las características que debe presentar la fase móvil son:

Disolver la muestra.

No degradar o disolver la fase estacionaria.

Tener baja viscosidad.

Ser compatible con el tipo de detector utilizado.

Tener una polaridad adecuada para permitir una retención y resolución conveniente de la muestra en la columna.

No tener partículas extrañas ni burbujas de aire.

La muestra debe presentar compatibilidad con la fase móvil para ser transportada a través de la columna y evitar precipitación y con esto dañar al sistema y por lo tanto perder resolución o aumentar la presión hasta volver el sistema inoperante.

La fase móvil generalmente se compone de solventes de la más alta pureza, pero se deben tener especiales cuidados como son:

- Filtrar todos los solventes a utilizar a través de membrana con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$
- Preparar las fases móviles en un intervalo de trabajo de pH compatible con la columna ( generalmente las columnas vienen acompañadas de información técnica que nos puede ayudar a evitar daño a las mismas).

- Degasificar los solventes o fases móviles a utilizar por medio de agitación y vacío o bien con ultrasonido (un frasco de 4 litros de solvente requiere aproximadamente 20 minutos de ultrasonido para ser degasificado).
- Verificar la caducidad de las fases móviles, además de observar el aspecto de ellas, no se deben utilizar en caso de que presenten precipitación u opalescencia, pues esto puede tapar las tuberías o dañar la columna.

#### 2.2.4. Aditivos y modificadores orgánicos<sup>(8)</sup>

La composición de la fase móvil es uno de los factores más importantes en la obtención de un cromatograma adecuado, con la fase móvil se trata de minimizar la acción de los grupos Si-OH residuales de la fase estacionaria de la columna. Cuando se presentan ~~problemas~~ en el desarrollo de un método analítico por CLAR y estos son debido a la forma de picos o a la resolución entre picos se recurre a los aditivos o a los modificadores orgánicos, generalmente se utilizan sales como son los fosfatos, acetatos, formiatos y trifluoroacetatos, de sodio o potasio, generalmente se usan para controlar el valor de pH y son preferidas las que dan un intervalo de control amplio, estas sales pueden ser adicionadas a la fase móvil en diferentes concentraciones, para lograr afinar picos, o bien tener una separación que con mezcla de solventes es casi imposible lograr. Algunas veces se utilizan soluciones diluidas de ácidos como son el fosfórico y acético, para forzar el equilibrio de ionización de una molécula y así lograr un pico bien definido. Los modificadores amino son utilizados en fase inversa con el propósito de mejorar la simetría de algunos

picos cromatográficos. La trietilamina se utiliza en concentraciones de aproximadamente 5 mM, el carbonato de amonio al 0.1%, las sales de tetraalquilamonio y varios iones orgánicos se utilizan para el mismo efecto. Las aminas y otros compuestos de carácter básico adicionados a la fase móvil, se asocian con los grupos silanoles (Si-OH) libres de la fase estacionaria, disminuyendo la interacción de éstos con los compuestos de la muestra.

#### 2.2.5. Fuerza iónica y pH<sup>(7,8)</sup>

Una de las variables más difíciles de predecir es la fuerza iónica, ya que el comportamiento en un sistema cromatográfico va a depender de diferentes interacciones entre las especies iónicas, probablemente el factor más importante a considerar es la constante de ionización del soluto, ya que, en el caso de un ácido débil, al aumentar la fuerza iónica la disociación es mayor, siendo más pronunciado el efecto cuando el pH de la fase móvil está cercano al pKa del ácido débil.

Al aumentar la fuerza iónica la solubilidad de los compuestos se ve afectada por el fenómeno de competencia de la sal por la fase acuosa, se da también una disminución de la repulsión electrostática entre las moléculas ionizadas y un aumento en la tensión superficial de la fase acuosa, así, se esperaría que al aumentar la fuerza iónica en fase inversa, la retención de los compuestos sería mayor, sin embargo este efecto no siempre se obtiene.

El pH es un factor muy importante para establecer el equilibrio de ionización de los compuestos iónicos. Por las ecuaciones que representan la disociación de

ácidos y bases se han determinado valores de pH, estos valores han sido referidos a soluciones acuosas, mientras que en cromatografía líquida, y en particular en fase inversa, la mezcla de disolventes es lo más común, estas mezclas de disolventes orgánicos con agua no proveen un valor de pH que sea evaluado con exactitud, sin embargo se hace una aproximación al valor deseado. La dependencia del tiempo de retención con el valor de pH se hace más evidente cuando la fase móvil es una mezcla de disolventes orgánicos y acuosos, ya que cambios en la proporción de disolvente orgánico influyen en el grado de ionización del compuesto. Cuando el pH de la fase móvil es cercano al pKa de la sustancia a analizar, los cambios en la retención y la selectividad por efecto del pH son más drásticos.

Como la forma ionizada es menos retenida en CLAR en fase inversa que la forma neutra, el efecto del equilibrio de protonación en el proceso de retención puede controlarse mejor manteniendo el pH de la fase móvil en cierto valor, utilizando solución reguladora, por efecto de supresión de la ionización del compuesto.

#### 2.2.6. Terminología en CLAR <sup>(1, 3, 8, 25)</sup>

- Tiempo muerto ( $T_0$ ). Es el tiempo necesario para eluir una muestra no retenida por el sistema y se determina midiendo el tiempo de retención de la fase móvil misma, en su viaje a través de la columna.

- Tiempo de retención ( $T_r$ ). Es el tiempo que la muestra permanece dentro de la columna, y se mide desde el momento en que la muestra se introduce en el sistema, hasta el momento en que se obtiene el punto máximo de la señal o pico. el tiempo de retención es característico de la muestra, la columna, la fase móvil y la temperatura. Por lo general se emplea como medida de tipo cualitativo y se expresa en unidades de tiempo.
- Número de platos teóricos ( $N$ ). Un plato teórico, es el equilibrio de distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria, y se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$N = 16 (T_r/W_b)^2$$

Donde  $W_b$  es el ancho de la base del pico cromatográfico.

El número de platos teóricos es una medida de la eficiencia de la columna; así que cuando mayor sea el número de platos teóricos, mayor será la eficiencia de la columna.

- Factor de capacidad ( $K'$ ). Es la medida de la capacidad para retener un soluto en la columna y se calcula con la siguiente expresión:

$$K' = (T_r - T_o) / T_o$$

Si  $K'$  es bajo, los componentes son eluidos rápido y si  $K'$  es alto los componentes son eluidos más lentamente. Un valor óptimo para  $K'$  es entre 2 y 5, pero se aceptan valores entre 1 y 10.

- Selectividad ( $\alpha$ ). Describe la posición relativa de dos picos adyacentes y es definido como:

$$\alpha = K_2' / K_1'$$

Donde  $K_2'$  es el factor de capacidad del compuesto eluido en último término, si es igual a 1, entonces no hay separación.

- Resolución (R). Es una medida cuantitativa del grado de separación obtenido entre dos compuestos.

$$R = 2(\text{Tr}_2 - \text{Tr}_1) / (W_{b2} - W_{b1})$$

Donde un valor de 1.5 o mayor representa una separación basal de dos picos.

### 2.3. Validación de métodos analíticos. <sup>(5, 9, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22, 23)</sup>

La industria farmacéutica está especialmente interesada en la validación de métodos analíticos debido al gran incremento de nuevos productos que tienen que ver con la salud y que requieren de métodos de análisis apropiados.

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir, debe probarse para determinar su efectividad. La validación generalmente incluye una evaluación de la precisión, linealidad, exactitud y especificidad, y proporciona una medida del comportamiento del método.

La validación del método 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 estadísticos.

#### 2.3.1. Definición de términos relacionados <sup>(5)</sup>

##### 2.3.1.1. Linearidad.

Es la habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son *proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un rango determinado.*

#### 2.3.1.2. Intervalo.

El intervalo de un método analítico está definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles de concentración superior e inferior de la sustancia (incluyendo estos niveles), en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

#### 2.3.1.3. Exactitud.

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

#### 2.3.1.4. Precisión.

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos 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.*



#### 2.3.1.5. Límite de detección.

Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

#### 2.3.1.6. Límite de cuantificación.

Es la menor concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.

#### 2.3.1.7. 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.

#### 2.3.1.8. Tolerancia.

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 condiciones ambientales, lotes de reactivos, columnas, modificaciones al sistema de elución, tipos de empaque (soporte, fase estacionaria, fabricante, etc.).

### 2.3.2. Determinaciones y criterios

#### 2.3.2.1. Linearidad del sistema.

Se determina construyendo una curva de calibración de concentración contra respuesta medida, utilizando cuando menos 5 niveles de concentración con 5 diluciones preparadas a partir de una misma solución stock y haciendo análisis

por lo menos por duplicado para cada dilución incluyendo la concentración seleccionada como 100%. El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método.

Los parámetros estadísticos para evaluar la linealidad son el coeficiente de correlación ( $r$ ), determinación ( $r^2$ ) y el coeficiente de variación (C.V.), calculado con el cociente de la propiedad medida entre la concentración a partir de la solución patrón.

Criterio:  $r \geq 0.99$      $r^2 \geq 0.98$     C.V.  $\leq 1.5\%$

#### 2.3.2.2. Precisión del sistema

Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema.

Criterio: C.V.  $\leq 1.5\%$

#### 2.3.2.3. Linealidad del método

Se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos 3 diferentes cantidades de la sustancia de interés, (placebos adicionados), cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado.

las concentraciones de los placebos adicionados 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 (o sean igual a éste), incluyendo siempre al 100%. La amplitud del estudio dependerá del uso y aplicaciones del método analítico.

Criterio: Curva     $m \approx 1$      $b \approx 0$      $r^2 \geq 0.98$

Recobros 98% - 102% C.V.  $\leq$  2%

Los porcentos recuperados y los C.V. a cada nivel y los globales de todo el intervalo de la linearidad deben cumplir con el criterio establecido.

#### 2.3.2.4. Exactitud del método

Se determina a partir de placebos adicionados al 100% de la sustancia de interés, (placebos adicionados), cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por sextuplicado utilizando el método propuesto.

Criterio: Recobros 98% - 102% C.V.  $\leq$  2%

#### 2.3.2.5. Reproducibilidad

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

Criterio: C.V.  $\leq$  2% (del total de análisis)

#### 2.3.2.6. Especificidad.

Analizar placebo, producto y materia prima con el método analítico propuesto, en caso de contar con los productos de degradación, preparar muestras con placebo añadido de éstos y la sustancia de interés y analizar con el método propuesto.

Si no se cuenta con los productos de degradación, es necesario degradar la muestra bajo diferentes condiciones, de preferencia forzadas. 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. Existen diferentes métodos, pero el método a usar dependerá de la naturaleza o las propiedades fisicoquímicas del compuesto a degradar.

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, además se debe demostrar que los picos son puros (existen dos formas de demostrarlo, con la homogeneidad espectral y el ángulo de pureza, en donde este debe ser menor al umbral de pureza) . Es válido ajustar las condiciones de operación (composición de fase móvil, volumen de inyección etc.) para obtener la máxima resolución.

3.1. Desarrollo del método

3.1.1. Equipo

Baño de ultrasonido Branson

Bomba Waters modelo 600E

Inyector automático Waters modelo 700

Detector de arreglo de fotodiodos Waters modelo 996

Computadora Dell 486

Impresora Hewlett Packard modelo 560C

Bomba de vacío Millipore

Balanza analítica Mettler modelo AM100

Membranas de filtración tipo FHUP y HVWP de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro

3.1.2. Material

Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 mL

Pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 mL

Matraces volumétricos de 25, 50, 100 y 1000 mL

Matraz Kitasato de 1000 mL

3.1.3. Reactivos

Clonixinato de lisina, sustancia de referencia o estándar de trabajo

Fosfato de potasio dibásico monohidratado, grado reactivo

Metanol, grado CLAR

Agua, grado Milli-Q

#### 3.1.4. Selección de las condiciones cromatográficas

El primer paso para el desarrollo del método analítico, fué realizar una revisión bibliográfica exhaustiva para contar con la mayor cantidad de información analítica disponible con respecto al clonixinato de lisina, así como los métodos de análisis disponibles en la bibliografía, encontrándonos con el problema de que al ser el clonixinato de lisina un principio activo de reciente ingreso al arsenal farmacéutico y además estar protegido por una patente internacional, ésta información era casi imposible de conseguir, además de que por las razones citadas anteriormente no se cuenta con métodos de análisis compendiados en los cuales nos podamos apoyar para el análisis de los productos problema, así que *se decidió realizar el desarrollo del método analítico con la asesoría del laboratorio propietario de la patente.*

En base a que el clonixinato de lisina es una sal de un ácido débil y sus propiedades fisicoquímicas como son la solubilidad, pKa y polaridad, se decidió desarrollar el método analítico por fase inversa.

Se probaron diferentes fases móviles, en las cuales se modificó la proporción acuoso-orgánico, tipo y concentración de sal para dar fuerza iónica a la fase móvil y diferentes tipos de solventes orgánicos hasta obtener la mejor forma de pico. Posteriormente se analizaron placebos y productos de las formas farmacéuticas problema, para verificar especificidad del método analítico y así dar por concluido el desarrollo del método analítico.

La sustancia de referencia utilizada en el desarrollo y validación del método analítico fue proporcionada por el laboratorio propietario de la patente y en base a ésta se estandarizó la materia prima.

### 3.1.5. Método analítico

El método analítico desarrollado para cuantificar clonixinato de lisina en cápsulas, solución inyectable y tabletas es el siguiente:

#### 3.1.5.1. Condiciones cromatográficas:

Fase móvil: Metanol : Solución 0.02 M de  $K_2HPO_4$  pH 6 [ 60: 40 ]

Columna: Cartucho Radialpak  $\mu$ -Bondapak C18 10 cm x 8 mm de d.i.

Detector: U.V. a 254 nm, 0.1 U.A.

Volumen de inyección: 10  $\mu$ L

Temperatura: ambiente

Velocidad de flujo: 2 mL/min

#### 3.1.5.2. Preparación de la solución estándar

Pesar con exactitud alrededor de 25 mg de clonixinato de lisina, sustancia de referencia o estándar de trabajo, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y llevar a volumen con fase móvil. Transferir una alícuota de 5 mL a un matraz volumétrico de 25 mL y llevar a volumen con fase móvil. Solución R. Concentración  $\pm$  50 mcg/mL.

#### 3.1.5.3. Preparación de la solución problema de Cápsulas (125 mg/cápsula).

Pesar 20 cápsulas y determinar el peso promedio, mezclar el polvo de las cápsulas. Pesar, por duplicado, una cantidad de polvo equivalente a 62.5 mg de

clonixinato de lisina y transferir a matraces volumétricos de 25 mL. Añadir 15 mL de fase móvil y agitar las muestras en baño de ultrasonido por 5 minutos. Llevar cada solución al volumen con fase móvil, mezclar bien y filtrar las soluciones a través de papel Whatman No. 42. Soluciones G1 y G2.

Transferir, con pipeta volumétrica 2 mL de las soluciones G1 y G2 a matraces volumétricos de 100 mL. Llevar cada solución al volumen con fase móvil y mezclar bien. Soluciones C1 y C2.

3.1.5.4. Preparación de la solución problema de Inyectable (100 mg/2 mL).

Tomar, por duplicado y con pipeta volumétrica, una alícuota de 1 mL y transferir a matraces volumétricos de 50 mL. Llevar cada solución al volumen con fase móvil y mezclar bien. Soluciones E1 y E2.

Transferir, con pipeta volumétrica 5 mL de las soluciones E1 y E2 a matraces volumétricos de 100 mL. Llevar cada solución al volumen con fase móvil y mezclar bien. Soluciones I1 e I2.

3.1.5.5. Preparación de la solución problema de Tabletas (125 mg/tableta).

Pesar 20 tabletas y determinar el peso promedio, pulverizar con ayuda de un mortero y mezclar el polvo. Pesar, por duplicado, una cantidad de polvo equivalente a 62.5 mg de clonixinato de lisina y transferir a matraces volumétricos de 25 mL. Añadir 15 mL de fase móvil y agitar las muestras en baño de ultrasonido por 5 minutos. Llevar cada solución al volumen con fase móvil, mezclar bien y filtrar las soluciones a través de papel Whatman No. 42. Soluciones Q1 y Q2.



Transferir, con pipeta volumétrica 2 mL de las soluciones Q1 y Q2 a matraces volumétricos de 100 mL. Llevar cada solución al volumen con fase móvil y mezclar bien. Soluciones T1 y T2.

#### 3.1.5.6. Procedimiento

- Equilibrar el aparato a las condiciones de operación hasta tener una línea base estable.
- Hacer inyecciones por duplicado de las soluciones de referencia y las soluciones problema.
- Después de concluir el análisis, lavar la bomba y la columna con 100 mL de agua filtrada y degasificada y con 50 mL de una mezcla de agua-metanol (40:60), filtrada y degasificada.

#### 3.2. Validación del método

Para la validación del método analítico se evaluaron los siguientes parámetros:

##### 3.2.1. Linealidad del sistema

El comportamiento lineal del clonixinato de lisina se probó analizando con el método propuesto, a partir de una solución patrón, soluciones estándar de 50, 75, 100, 125 y 150% del nivel de análisis por duplicado. La linealidad del sistema se determinó graficando la concentración de las soluciones contra la respuesta obtenida (gráfica No. 1). Los resultados y criterios de aceptación se muestran en la tabla 1.

##### 3.2.2. Precisión del sistema

La precisión del sistema se probó haciendo 6 inyecciones de solución estándar al 100% del nivel de análisis. Los resultados y los criterios de aceptación se muestran en la tabla No. 2.

### 3.2.3. Especificidad del método

Para demostrar que el método es indicativo de estabilidad se sometieron muestras de producto, placebo y materia prima a degradar bajo las siguientes condiciones:

Medio acuoso

Medio oxidativo

Medio ácido

Medio básico

Además de colocarse a temperatura de 45°C para acelerar la reacción de degradación.

Los resultados más importantes se pueden ver en la tabla No. 3 y los anexos 13 al 24.

### 3.2.4. Linearidad del método

La linearidad del método se probó analizando placebos de clonixinato de lisina solución inyectable, cápsulas y tabletas (productos sin clonixinato de lisina), a los que se les adiciono clonixinato de lisina en un 75, 100 y 125% del nivel de análisis. Los resultados obtenidos y los criterios de aceptación se muestran en las tablas 4, 5 y 6 y las gráficas 2, 3 y 4.

### 3.2.5. Exactitud del método

Esta determinación se realizó mediante el análisis por sextuplicado de placebos de clonixinato de lisina inyectable, cápsulas y tabletas (producto sin clonixinato de lisina) a los que se les adicionó clonixinato de lisina al 100% del nivel de análisis. Los resultados y los criterios de aceptación se muestran en las tablas 7, 8 y 9.

### 3.2.6. Reproducibilidad

La reproducibilidad del método se probó analizando muestras de clonixinato de lisina solución inyectable, cápsulas y tabletas, analizándose por triplicado por dos analistas en dos diferentes días. En las tablas 10, 11 y 12 se muestran los resultados, las tablas de análisis de varianza y los criterios de aceptación.

### 3.2.7. Tolerancia del método

Se realizó comparando los resultados iniciales de tres muestras después de modificar la proporción (orgánico- acuoso) de la fase móvil un 5% hacia arriba y un 5% hacia abajo. Los resultados y criterios de aceptación se muestran en las tablas 13, 14 y 15.

## CAPITULO V. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

### 5.1. Análisis de resultados

- El método analítico desarrollado en este trabajo presenta grandes ventajas, ya que la preparación de muestras, fase móvil y la realización del análisis son muy rápidos y los reactivos que utiliza son de uso común en un laboratorio de análisis moderno.
- El pico obtenido en el cromatograma es simétrico y bien definido y permite a la vez la *identificación de clonixinato de lisina*.
- El método analítico es reproducible para las tres formas farmacéuticas y no presenta efecto tanto de analista como de día, ésto se demuestra con las tablas de análisis de varianza.
- El método demostró ser específico para clonixinato de lisina, además de que se obtuvieron picos puros, lo cual se pudo comprobar al realizar el estudio de especificidad con un detector de arreglo de fotodiodos.
- El método al ser específico puede ser utilizado para el seguimiento de la estabilidad del producto.

- El método analítico es tolerante a ligeros cambios en la proporción de fase móvil para tabletas y cápsulas no así para la solución inyectable, ya que como puede verse en el cromatograma 12 el excipiente que se encuentra en condiciones normales de análisis a la izquierda del pico de clonixinato de lisina coeluye con éste al utilizar la fase móvil 65:35. Para tabletas y cápsulas las pequeñas modificaciones que se presentan, las cuales pueden ser debidas a evaporación del componente orgánico de la fase móvil no modifican sustancialmente los parámetros cromatográficos.

## 5.2. Conclusiones

- Se desarrolló un método por Cromatografía de líquidos de alta resolución fase inversa para la cuantificación de clonixinato de lisina en solución inyectable, cápsulas y tabletas.

- El método desarrollado es lineal, preciso, exacto y reproducible en el intervalo probado, por lo que se considera validado, ya que los límites para calificar estos parámetros se encuentran dentro de los límites establecidos.

- El método analítico puede ser usado tanto en el control de calidad del producto como en el monitoreo de la estabilidad del producto

- El método es tolerante a ligeros cambios en la proporción de la fase móvil, con las precauciones para la muestra de inyectable citadas anteriormente.
- El método presenta una gran sensibilidad.
- La desventaja de usar este método por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es el alto costo de la instrumentación y el mantenimiento que el equipo requiere, sin embargo la inversión es redituable a largo plazo.

## LINEARIDAD DEL SISTEMA

TABLA No. 1

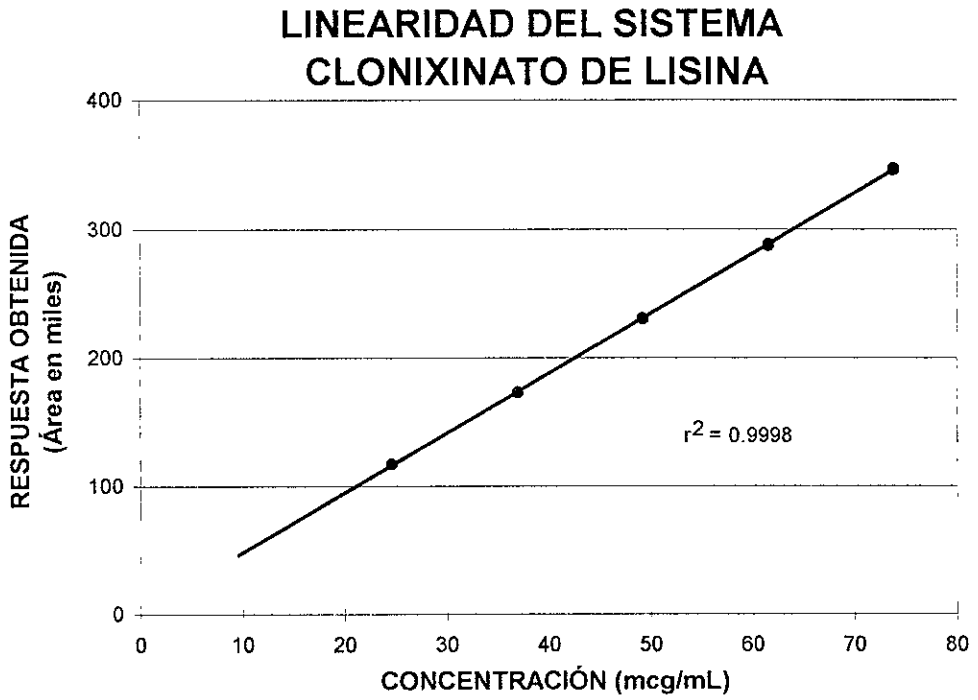
NIVEL	CONCENTRACION (C)	RESPUESTA (R)	FACTOR (R/C)
50%	0,024627	116740,0679	4740328,42
	0,024627	116843,4224	4744525,21
75%	0,036941	172729,2238	4675813,43
	0,036941	172829,6576	4678532,19
100%	0,049255	229973,6536	4669041,79
	0,049255	230628,8876	4682344,69
125%	0,061569	288159,5390	4680285,13
	0,061569	287135,5310	4663653,20
150%	0,073882	347275,4358	4700406,54
	0,073882	345681,9650	4678838,76

Correlación: 0,9999492    Determinación 0,9996985    C V = 0,6087%

### CRITERIOS DE ACEPTACION PARA LINEARIDAD DEL SISTEMA

Correlación	> 0.99
C V	< 1.5%

GRAFICA No. 1





## PRECISIÓN DEL SISTEMA

TABLA No. 2

Muestra	Respuesta
1	235089,4318
2	234187,7623
3	232279,2213
4	233995,5969
5	233792,9411
6	233253,3402

C.V. = 0,40384217 %

CRITERIOS DE ACEPTACION PARA PRECISION DEL SISTEMA

C.V. < 1.5%

TABLA No. 3

ESPECIFICIDAD

Condición de degradación	Inyectable		Tabletas		Cápsulas	
	Angulo de pureza	Umbral de pureza	Angulo de pureza	Umbral de pureza	Angulo de pureza	Umbral de pureza
Hidróxido de amonio a pH 12/45°/24horas	0.05	1.08	0.08	1.05	0.06	1.06
Peróxido de hidrógeno/45°C/ 24 horas	0.06	1.05	0.05	1.05	0.42	1.05
Agua a 45°/24 horas	0.05	1.05	0.06	1.05	0.40	1.04
Acido clorhídrico a pH 2/45°C/24 horas	0.05	1.05	0.05	1.04	0.05	1.05

LINEARIDAD DEL MÉTODO (SOLUCIÓN INYECTABLE)

TABLA No. 4

NIVEL	ADICIONADO (mg)	RECUPERADO (mg)	%RECOBRO
75%	0,036941	0,03739	101,21545
	0,036941	0,03729	100,94475
	0,036941	0,03698	100,10557
100%	0,049255	0,04990	101,30951
	0,049255	0,04954	100,57862
	0,049255	0,04981	101,12679
125%	0,061569	0,06235	101,26882
	0,061569	0,06257	101,62615
	0,061569	0,06245	101,43124

DATOS DE CORRELACION		DATOS DE RECOBROS	
Ordenada=	-0,00066376	Media=	101,0674
Pendiente=	1,024722719	D estandar=	0,4675
Correlación=	0,999894562	C variación=	0,4625%
Determinación=	0,9997891		

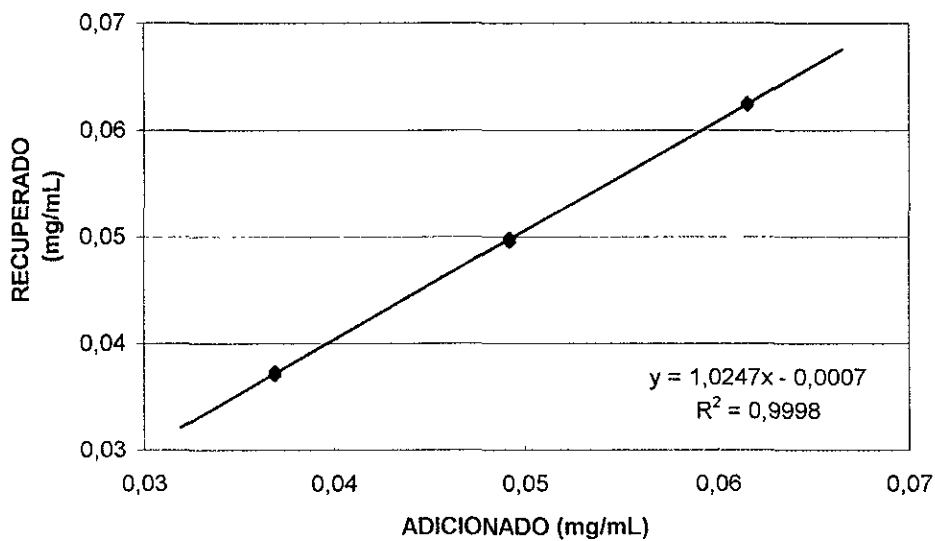
CRITERIOS DE ACEPTACION PARA LINEARIDAD DEL METODO

Ordenada	aprox. 0	Determinación	> 0,98	Pendiente	aprox 1
C variación	< 2%			% de Recobro	98 - 102%

LINEARIDAD DEL MÉTODO (SOLUCIÓN INYECTABLE)

GRAFICA No. 2

**LINEARIDAD DEL METODO SOLUCION INYECTABLE**



LINEARIDAD DEL METODO (CAPSULAS)

TABLA No. 5

NIVEL	ADICIONADO (mg)	RECUPERADO (mg)	%RECOBRO
75%	0,03738	0,037104	99,26164
	0,03738	0,037197	99,51043
	0,03738	0,037567	100,50027
100%	0,04984	0,049739	99,79735
	0,04984	0,050090	100,50161
	0,04984	0,050008	100,33708
125%	0,06230	0,062024	99,55698
	0,06230	0,062006	99,52809
	0,06230	0,063177	101,40770

DATOS DE CORRELACION		DATOS DE RECOBROS	
Ordenada=	-0,000346889	Media=	100,0446
Pendiente=	1,007744783	D. estandar=	0,6914
Correlación=	0,999415066	C. variación=	0,6911%
Determinación=	0,9988305		

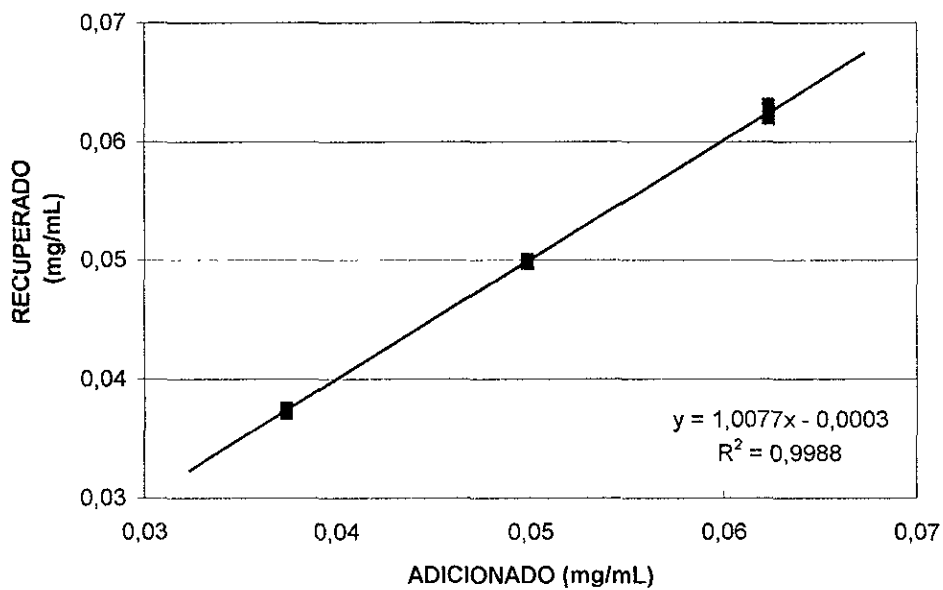
CRITERIOS DE ACEPTACION PARA LINEARIDAD DEL METODO

Ordenada	aprox. 0	Pendiente	aprox 1
		Determinación.	> 0,98
C. variación	< 2%	% de Recobro:	98 - 102%

LINEARIDAD DEL METODO (CAPSULAS)

GRAFICA No. 3

**LINEARIDAD DEL METODO CAPSULAS**



LINEARIDAD DEL MÉTODO (TABLETAS)

TABLA No. 6

NIVEL	ADICIONADO (mg)	RECUPERADO (mg)	%RECOBRO
75%	0,03728	0,03758	100,80472
	0,03728	0,03756	100,75107
	0,03728	0,03746	100,48283
100%	0,04971	0,04980	100,18105
	0,04971	0,04974	100,06035
	0,04971	0,04980	100,18105
125%	0,06213	0,06222	100,14486
	0,06213	0,06233	100,32191
	0,06213	0,06220	100,11267

DATOS DE CORRELACION		DATOS DE RECOBROS	
Ordenada=	0,000414543	Media=	100,3378
Pendiente=	0,994633214	D. estandar=	0,2793
Correlación=	0,999973987	C. variación=	0,2784%
Determinación=	0,9999480		

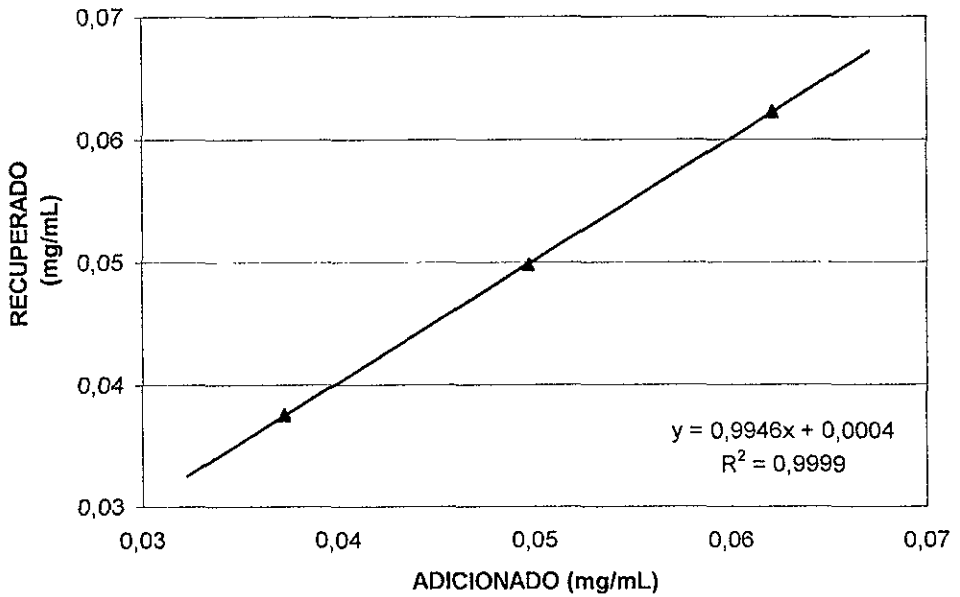
CRITERIOS DE ACEPTACION PARA LINEARIDAD DEL METODO

Ordenada	aprox 0	Determinación	> 0,98	Pendiente	aprox 1
C. variación	< 2%			% de Recobro:	98 - 102%

LINEARIDAD DEL MÉTODO (TABLETAS)

GRAFICA No. 4

**LINEARIDAD DEL METODO TABLETAS**





EXACTITUD DEL MÉTODO (SOLUCION INYECTABLE)

TABLA No. 7

Muestra	% de Recobro
1	99,0493%
2	100,1235%
3	99,4837%
4	98,1679%
5	100,4684%
6	99,1091%
Media = 99,400 % C.V. : 0,8293 %	

CRITERIOS DE ACEPTACION PARA EXACTITUD AL 100%

Media: 98 - 102%	C.V. < 2%
------------------	-----------

EXACTITUD DEL MÉTODO (CÁPSULAS)

TABLA No. 8

Muestra	% de Recobro
1	99,2487%
2	98,1295%
3	98,1301%
4	99,8360%
5	98,8557%
6	98,9054%

Media = 98,851 % C V. : 0,6667 %

CRITERIOS DE ACEPTACION PARA EXACTITUD AL 100%

Media: 98 - 102%	C V. < 2%
------------------	-----------

EXACTITUD DEL MÉTODO (TABLETAS)

TABLA No. 9

Muestra	% de Recobro
1	99,8474%
2	100,0640%
3	100,1866%
4	99,6712%
5	100,5216%
6	99,4419%
Media = 99,955 % C.V. : 0,3854 %	

CRITERIOS DE ACEPTACION PARA EXACTITUD AL 100%

Media: 98 -- 102%	C.V. < 2%
-------------------	-----------

REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO (SOLUCIÓN INYECTABLE)

TABLA No. 10

		ANALISTA	
		1	2
D I A	1	93,958	95,682
		95,769	94,135
		95,001	94,785
	2	94,756	95,613
		95,494	95,643
		95,843	95,179
Media=		95,15%	C V.= 0,6710%

CRITERIO DE ACEPTACION PARA REPRODUCIBILIDAD

C.V. < 2%
-----------

TABLA DE ANADEVA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada	F <sub>0.05</sub>
Analista	1	0,0039	0,0039	0,01	38,51
Dia	2	0,8705	0,4353	0,96	6,06
Error	8	3,6101	0,4513	—	

REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO (CÁPSULAS)

TABLA No. 11

		ANALISTA	
		1	2
D I A	1	97,647	97,628
		97,604	98,851
		97,602	97,863
2	97,770	97,451	
	97,188	99,470	
	97,171	97,507	
Media=		97,81%	C.V.= 0,690%

CRITERIO DE ACEPTACION PARA REPRODUCIBILIDAD

C.V. < 2%
-----------

TABLA DE ANADEVA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada	F <sub>0.05</sub>
Analista	1	1,1957	1,1957	26,99	38,51
Dia	2	0,0886	0,0443	0,10	6,06
Error	8	3,7206	0,4651	—	

REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO (TABLETAS)

TABLA No. 12

		ANALISTA	
		1	2
D I A	1	100,32	102,12
		102,07	101,97
		101,41	101,15
	2	101,42	102,15
		101,12	101,03
		102,09	102,24
Media=		101,59%	C.V.= 0,597%

CRITERIO DE ACEPTACION PARA REPRODUCIBILIDAD

C.V. < 2%
-----------

TABLA DE ANADEVA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada	F <sub>0.05</sub>
Analista	1	0,4144	0,4144	6,89	38,51
Dia	2	0,1202	0,0601	0,14	6,06
Error	8	3,5095	0,4387	---	

TOLERANCIA DEL MÉTODO (SOLUCIÓN INYECTABLE)

TABLA No. 13

Fase móvil (Metanol:Buffer)	Tiempo de retención	Resolución	Factor de coleo	Número de platos	Contenido
60:40	3.01	2.63	1.14	2812	96.96%
65:35	2.47	-	0.98	2900	100.78%
55:45	3.85	4.81	1.08	2590	95.25%

Media=	97,66%
C.V.=	2.90%

CRITERIO DE ACEPTACIÓN  
C.V. < 2%

TOLERANCIA DEL MÉTODO (CÁPSULAS)

TABLA No. 14

Fase móvil (Metanol:Buffer)	Tiempo de retención	Factor de coleo	Número de platos	Contenido
60:40	3.01	1.09	2789	100.87%
65:35	2.47	1.21	2881	100.77%
55:45	3.85	1.14	2604	99.34%

Media= 100.33%

C.V.= 0.85%

CRITERIO DE ACEPTACIÓN  
C.V. < 2%



TOLERANCIA DEL MÉTODO (TABLETAS)

TABLA No. 15

Fase móvil (Metanol:Buffer)	Tiempo de retención	Factor de coleo	Número de platos	Contenido
60:40	3.02	1.19	2740	103.09%
65:35	2.47	1.20	2907	103.55%
55:45	3.86	1.08	2590	101.69%

Media=	102.78%
C.V.=	0.94%

CRITERIO DE ACEPTACIÓN C.V. < 2%
-------------------------------------

## CAPITULO VI. BIBLIOGRAFÍA

1. British Pharmacopoeia 1995.Vol. II. A101
2. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas PLM, Editorial PLM S.A. de C.V. México 1995, pp 773.
3. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 6a. Ed, 1994, pp 101-112.
4. Goodman G.A. and Guilman A. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 6a Ed; Editorial Médica Panamericana, 1984.
5. Validación de Métodos Analíticos  
Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos
6. Munson J., Pharmaceutical Analysis; Modern Methods. Parte B, Vol. II; 1st Ed, 1984, p 15.
7. Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica. Perkin Elmer, 1a. Ed, 1981, pp 37-61.
8. Snyder L.R. and Kirkland, Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2a. Ed. Jonh, Wiley and sons. Inc. New York U.S.A., 1979. pp 2-12, 90-124, 130-139, 147-152.
9. The United States Pharmacopoeia USP XXIII [1225] Validation of compendial methods, pp 1982-1984.
10. Waters Chromatography Division, Analytical columns and cartridges; Care and use instructions, revisión 2, 1996, 2-1 a 2-2.
11. Millipore Co. Waters 996; Photodiode Array Detector, Operators Manual, USA, 1992.

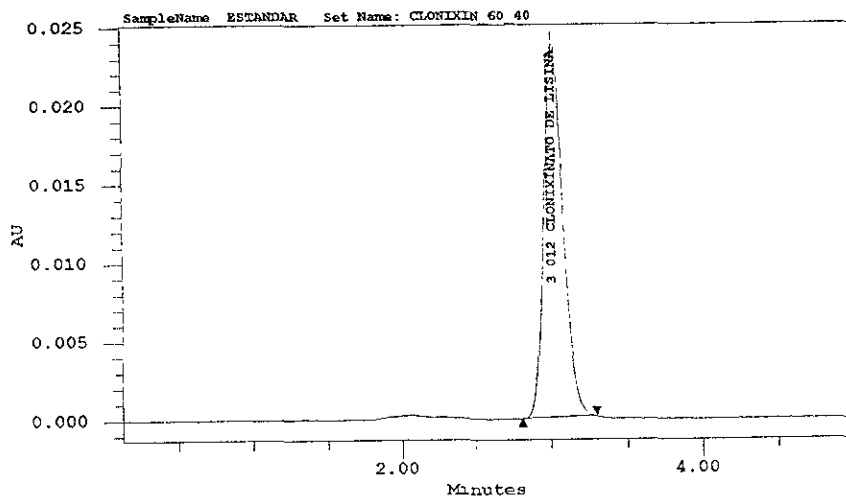
12. Waters Chromatography Division, PDA Software User`s guide, USA, 1994, pp 4-22 a 5-33.
13. Lual “Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos”, Pharma News, 4 (7) p.32 (1993).
14. Lual “Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos”, Pharma News, 4 (9) p.24 (1993).
15. Lual “Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos”, Pharma News, 4 (10) p.16 (1993).
16. Wernimont G., Spendley W., Use of statistics to develop and evaluate analytical methods, Association of Official Analytical Chemists, U.S.A., 1987.
17. Bujan A., Gancedo H. “Estudio clínico de un analgésico diferente: El clonixinato de lisina”, El día médico 47 (22) pp.820-821, Argentina, 1975.

18. Katchen B., Buxbaum S., Ning J., "Disposition of clonixin [2-(3-chloro-o-toluidino) nicotinic acid] in humans". The Journal of Pharmaceuticals and Experimental Therapeutics. 187 (1), pp 152-157, U.S.A., 1973.
19. Hokanson G., "A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development, part I: The initial method validation process", Pharmaceutical Tecnology, 18(9) pp. 118-130, U.S.A., 1994.
20. Hokanson G., "A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development, part II: Changes ant the need for additional validation", Pharmaceutical Tecnology, 18(10) pp. 92-100, U.S.A., 1994.
21. Johnson J., Buskirk G., "Analytical method validation", Journal of Validation Technology, 2(2) pp. 88-105, U.S.A., 1996.
22. United States, Guidelines for submitting samples and analytical data for method validation, Interpharm, Ref. USSADMV, U.S.A.
23. Berry I., Nash R., Pharmaceutical Process Validation, vol 57, Dekker, U.S.A., 1993.

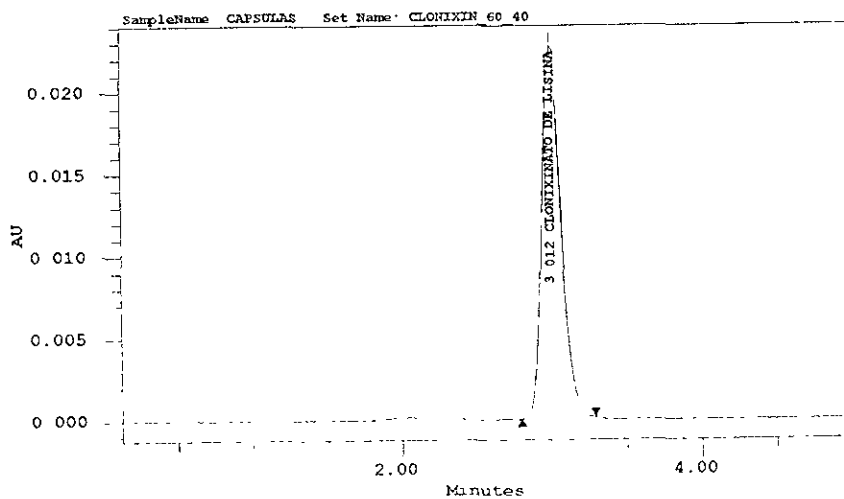
24. Firac, clonixinato de lisina; Monografía Técnica, Laboratorios Grossman, México, 1995.
  
25. Waters Chromatography Division, System Suitability User's guide, USA, 1992, pp A-1 a A-16.

## VII. ANEXOS

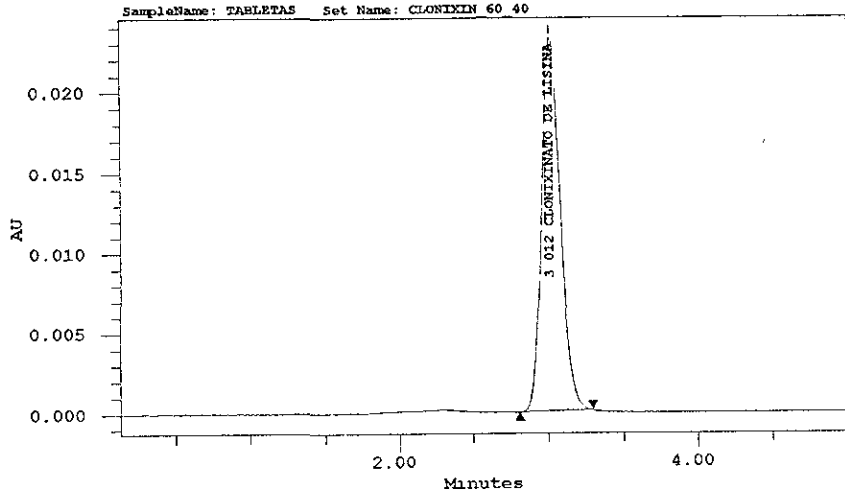
### 1. Cromatograma de la solución estándar



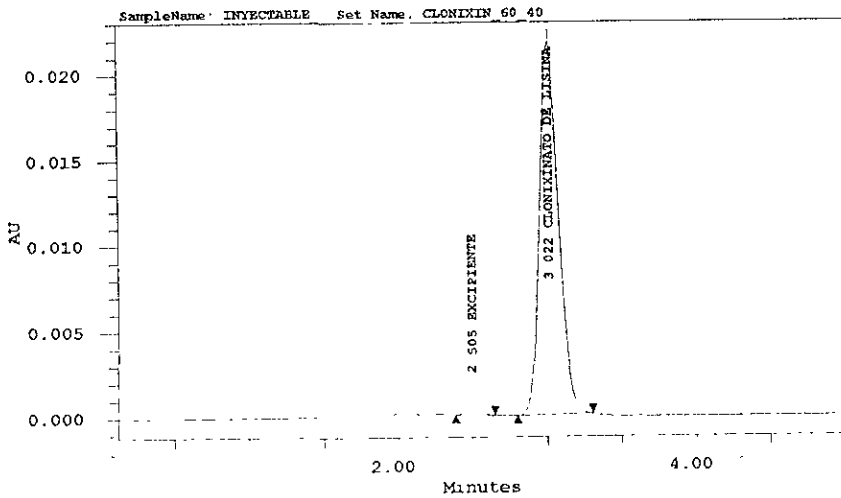
### 2. Cromatograma de solución muestra de cápsulas



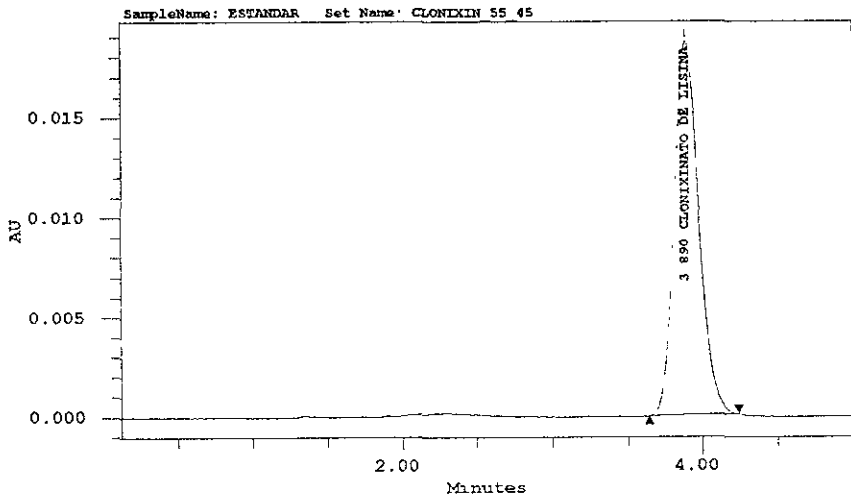
### 3. Cromatograma de solución muestra de Tabletas



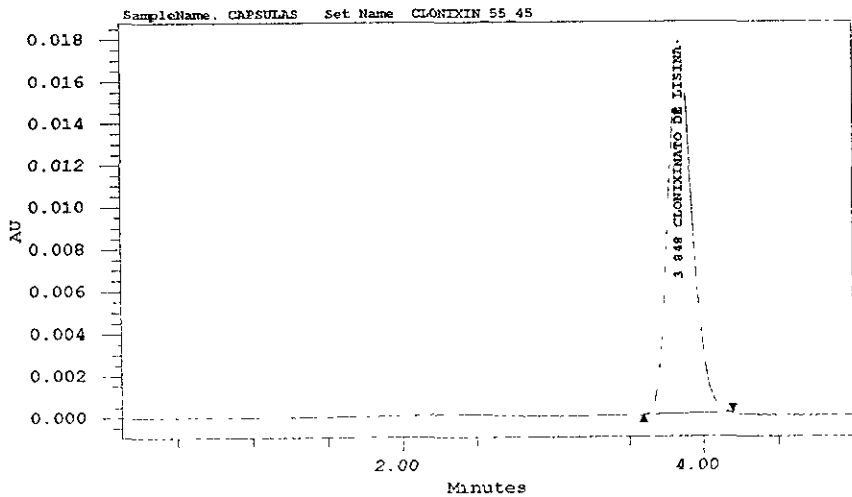
### 4. Cromatograma de la solución muestra de inyectable



5. Cromatograma de la solución estándar (fase móvil 55:45)

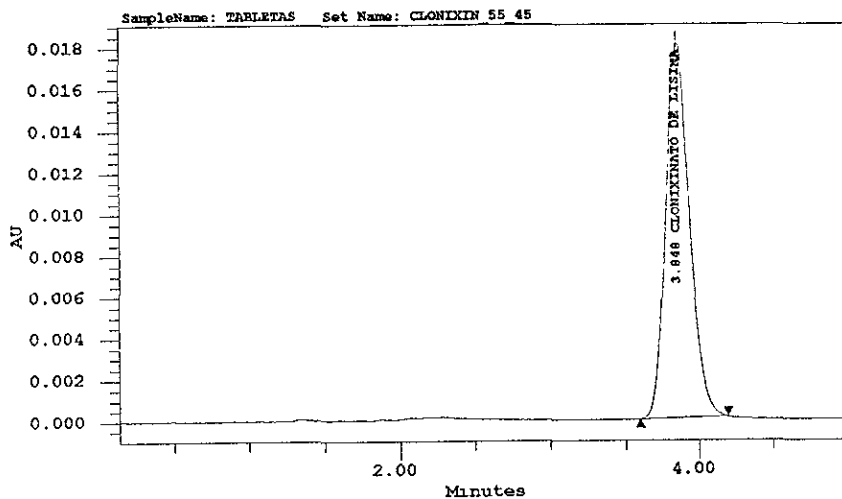


6. Cromatograma de la solución muestra de cápsulas (fase móvil 55:45)

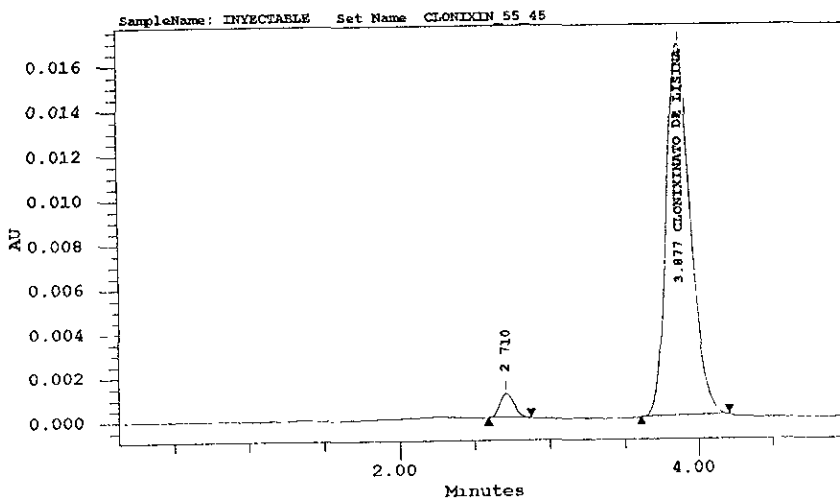




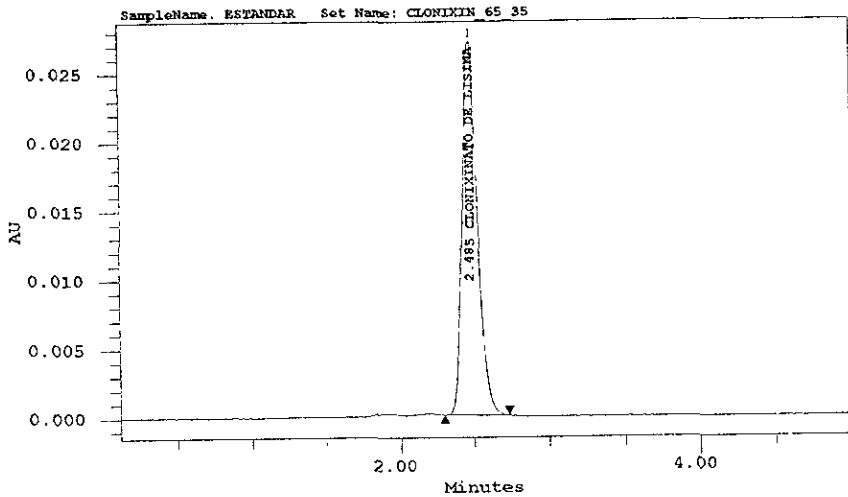
7. Cromatograma de la solución muestra de tabletas (fase móvil 55:45)



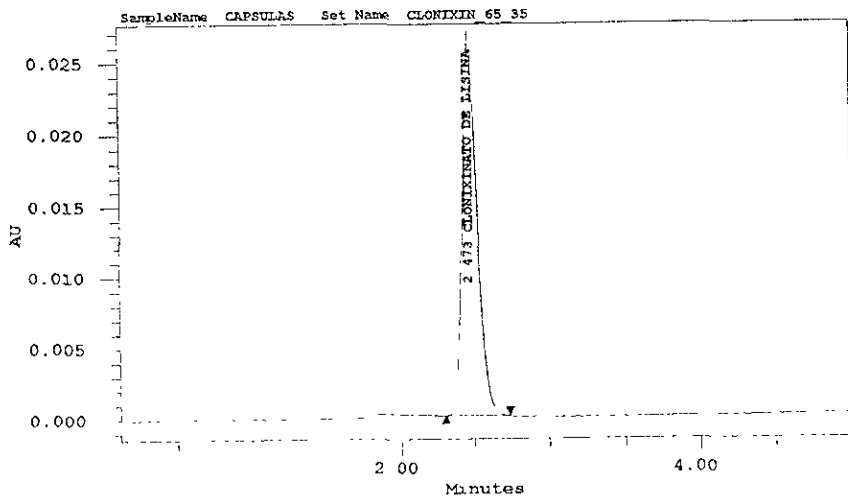
8. Cromatograma de la solución muestra de inyectable (fase móvil 55:45)



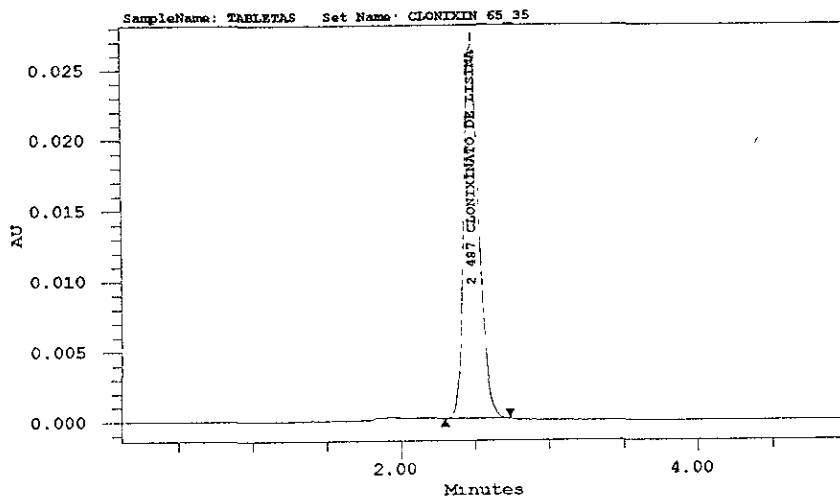
9. Cromatograma de la solución estándar (fase móvil 65:35)



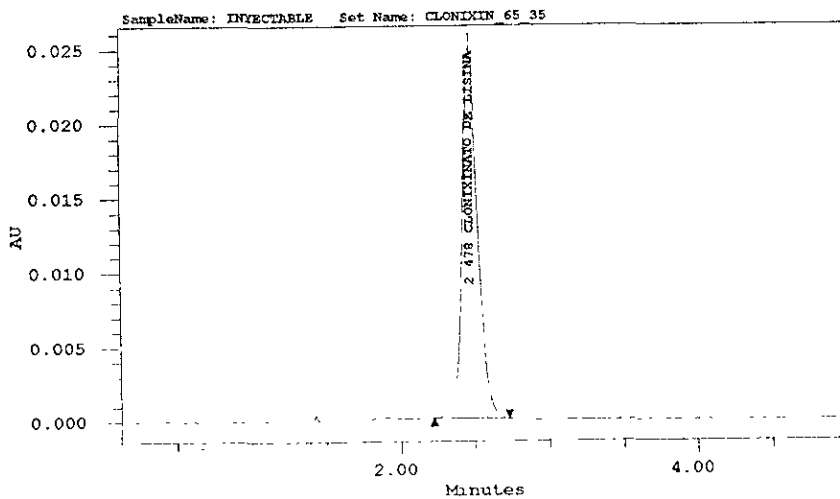
10. Cromatograma de la solución muestra de cápsulas (fase móvil 65:35)



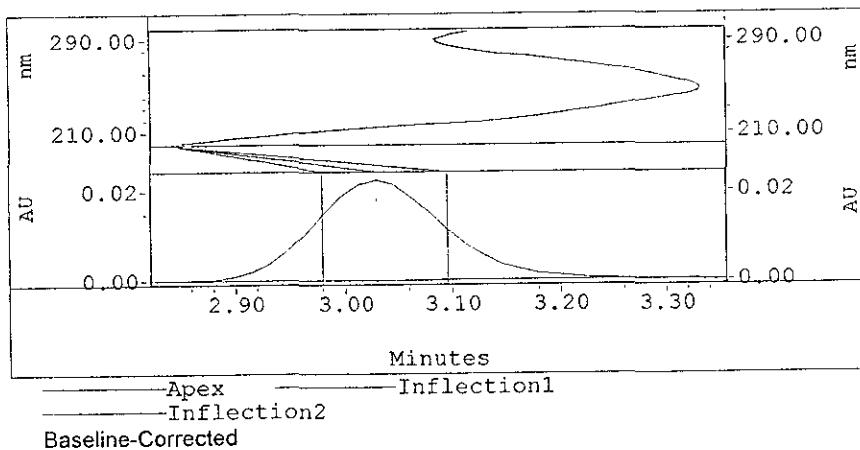
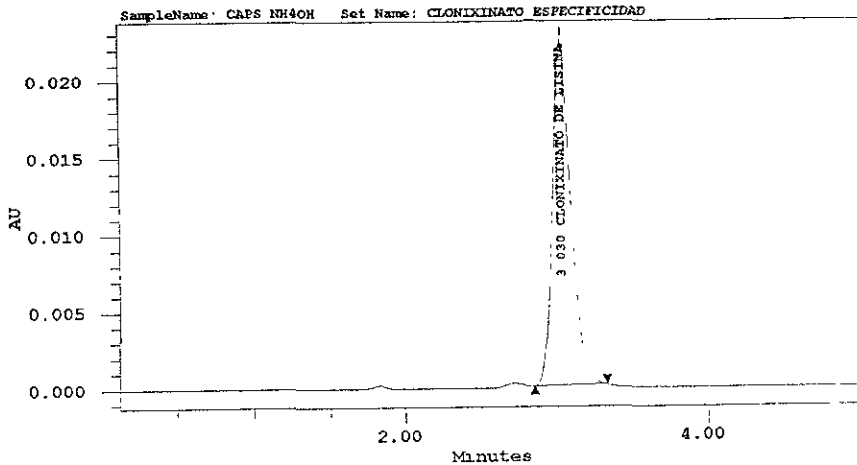
11. Cromatograma de la solución muestra de tabletas (fase móvil 65:35)



12. Cromatograma de la solución muestra de inyectable (fase móvil 65:35)



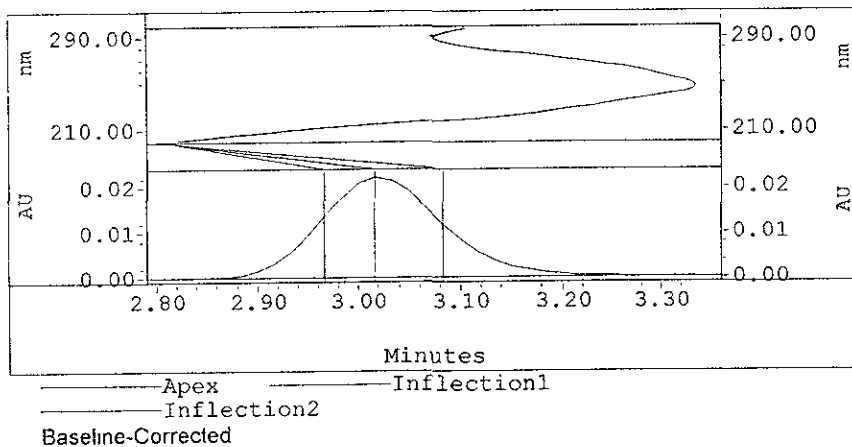
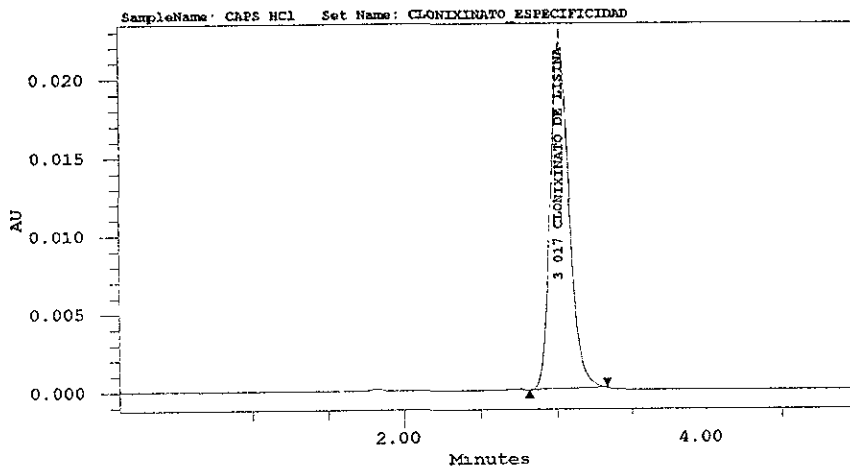
13. Cromatograma, análisis espectral y análisis de pureza de pico de la muestra de cápsulas tratada con hidróxido de amonio



SYSTEM SUITABILITY

#	Name	Ret Time (min)	ISI Tailing	ISI Target	Peak Rate	Purity Threshold
1	CLONIXINATO DE LISINA	3.030	1.140	1.000	0.000	1.000

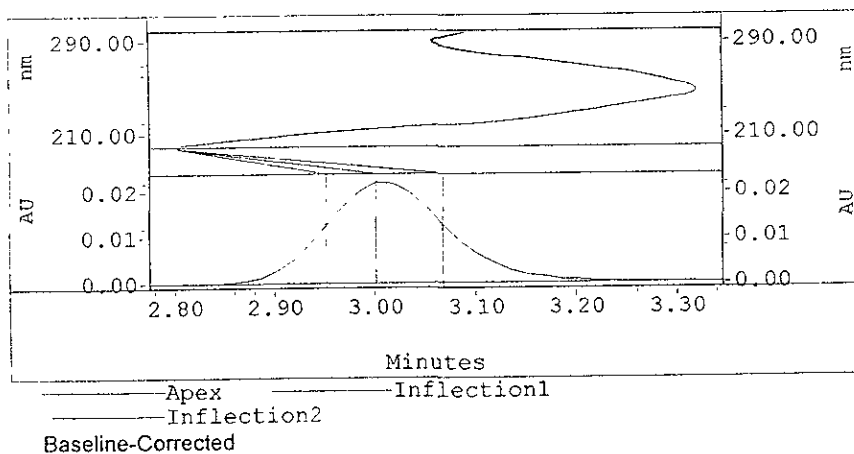
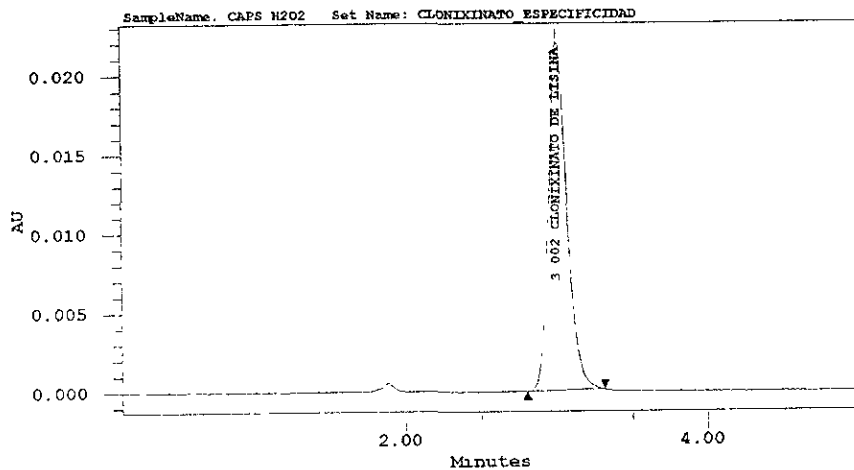
14. Cromatograma, análisis espectral y análisis de pureza de pico de la muestra de cápsulas tratada con ácido clorhídrico.



SYSTEM SUITABILITY

#	Name	Ret Time (min)	USP Tailing	USP Targret	Purity Angle	Purity Threshold
1	CLONIXINATO DE LISINA	3.017	1.175	2693	0.046	1.050

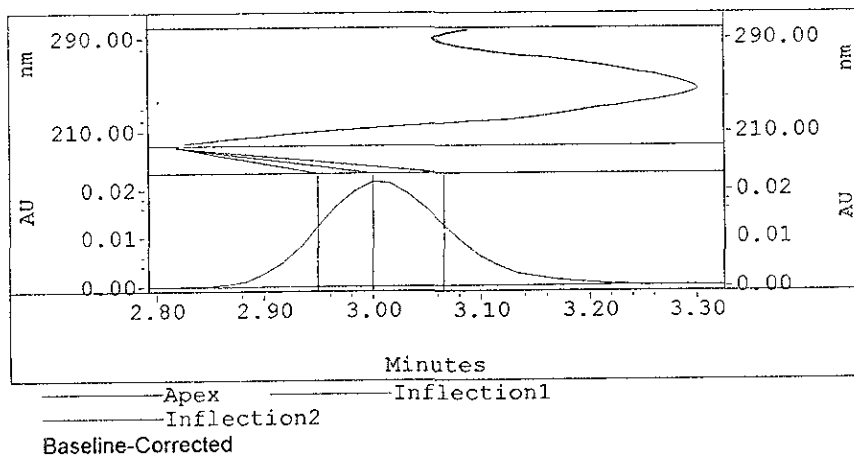
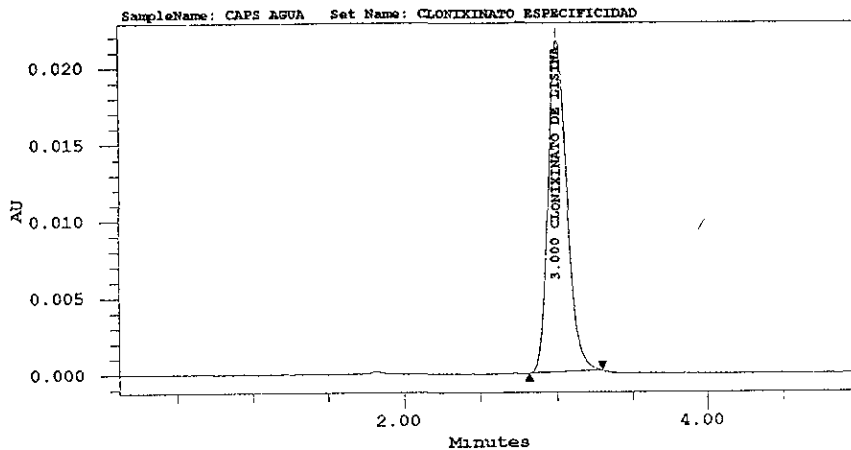
15. Cromatograma, análisis espectral y análisis de pureza de pico de la muestra de cápsulas tratada con peróxido de hidrógeno



SYSTEM SUITABILITY

#	Name	Peak Time	Peak Wavelength	St. Tangent	Purity Angle	Purity Threshold
1	CLONEXINATO DE LISINA	3.062	296	0.992	0.367	1.050

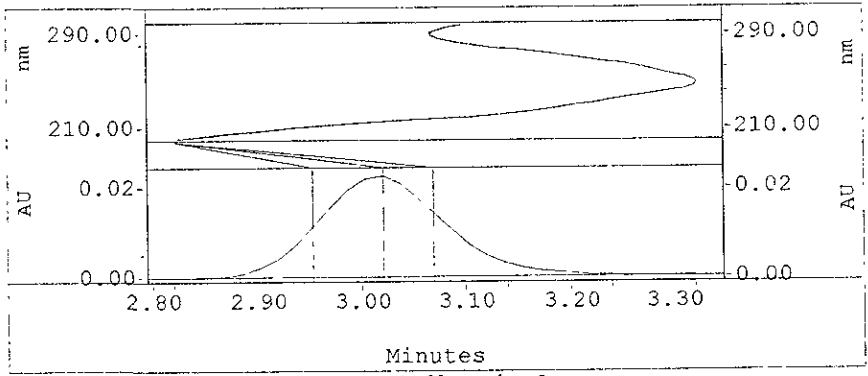
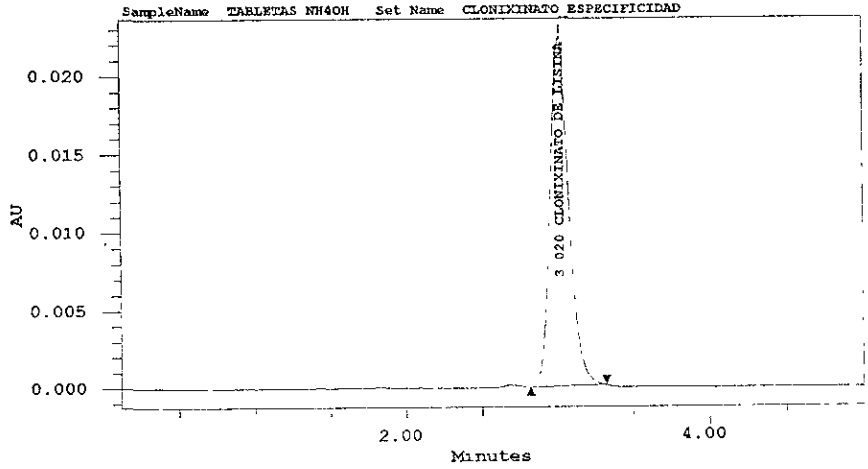
16. Cromatograma, análisis espectral y análisis de pureza de pico de la muestra de cápsulas tratada con agua



SYSTEM SUITABILITY

#	Name	Ret Time (min)	USP Tailing	USP Tangent	Purity Area%	Purity Threshold
1	CLONIDINATO DE LISINA	3.000	1.209	2877	0.397	1.003

17. Cromatograma, análisis espectral y análisis de pureza de pico de la muestra de tabletas tratada con hidróxido de amonio



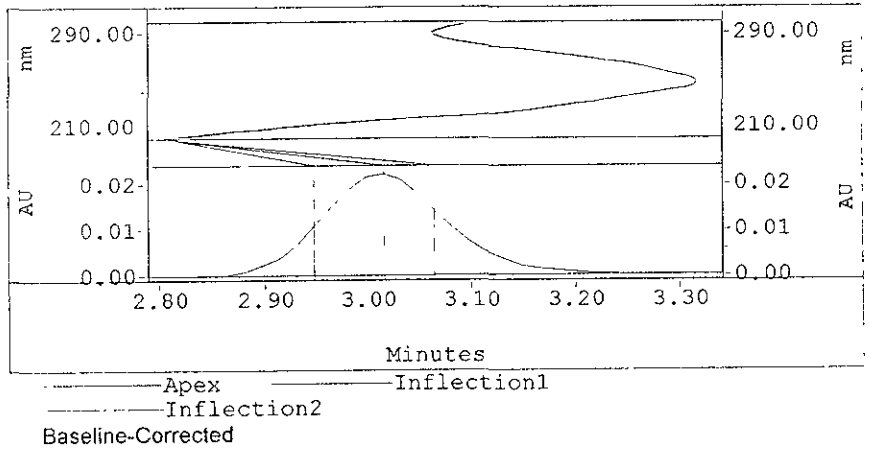
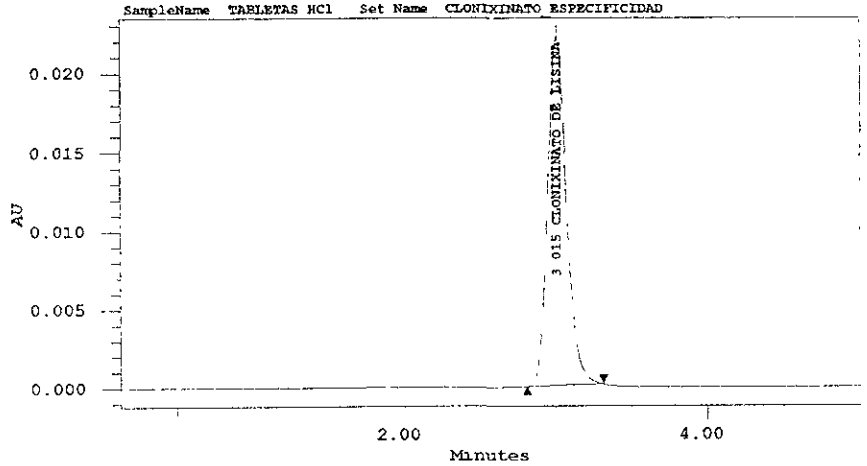
Apex  
 Inflection1  
 Inflection2  
 Baseline-Corrected

SYSTEM SUITABILITY

#	Name	Set Name	Test Method	QC Target	Quality Score	Pass/Fail
1	CLONIXINATO DE LISINA	TABLETAS NH4OH	CLONIXINATO ESPECIFICIDAD	100%	100%	Pass



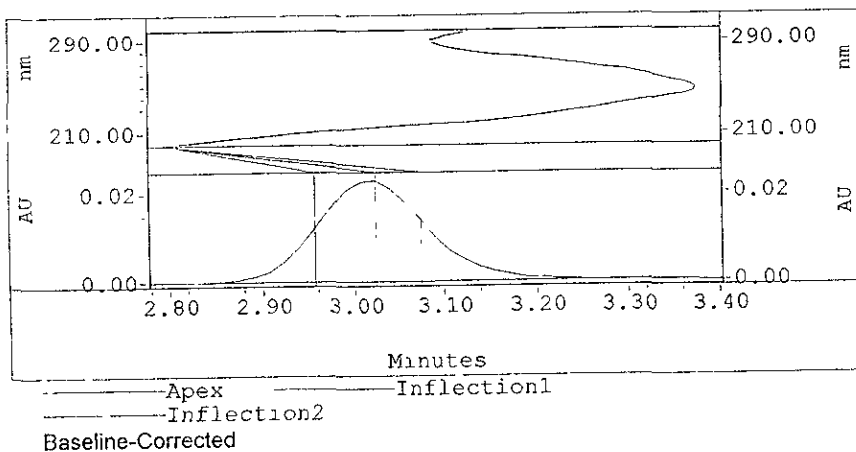
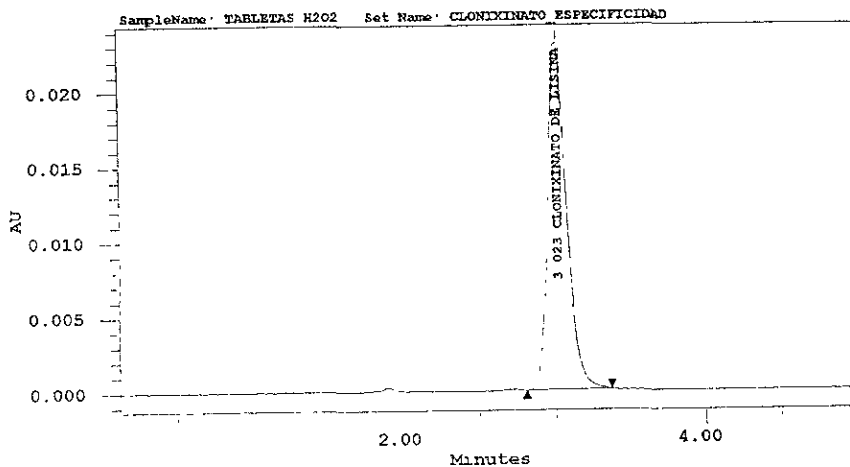
18. Cromatograma, análisis espectral y análisis de pureza de pico de la muestra de tabletas tratada con ácido clorhídrico.



SYSTEM SUITABILITY

#	Name	Net Area	Net Weighted	Net Weighted	Area %	Height	Threshold
1	CLONIXINAC DE LASIMA	0.015	0.015	0.015	100.00	0.015	0.005

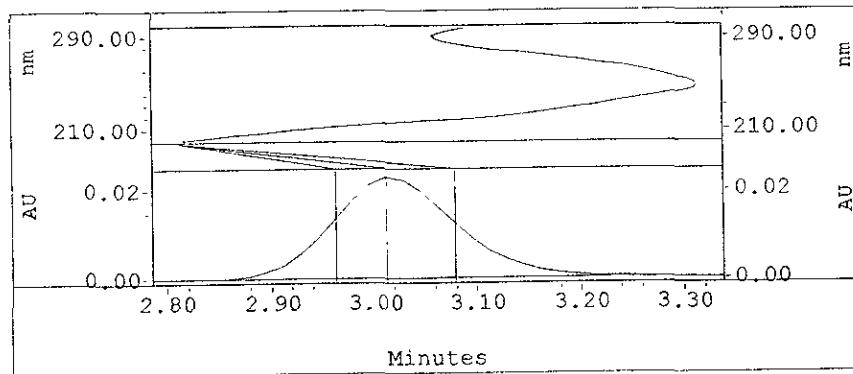
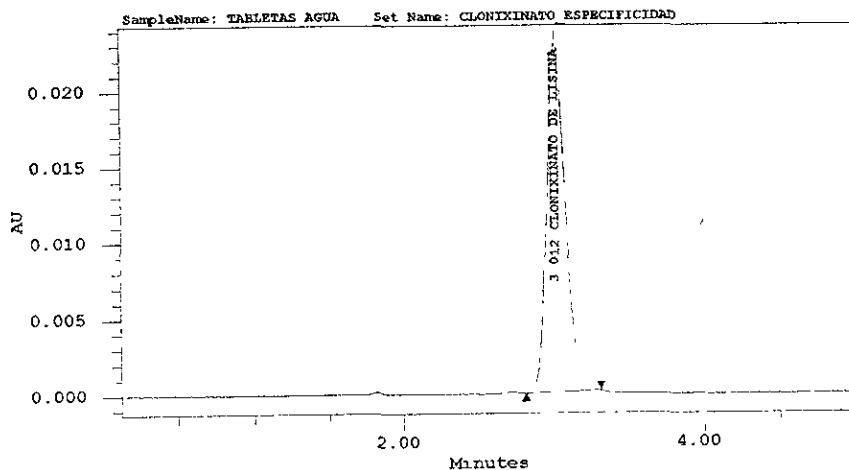
19. Cromatograma, análisis espectral y análisis de pureza de pico de la muestra de tabletas tratada con peróxido de hidrogeno.



SYSTEM SUITABILITY

S	Name	Ret. Time (min)	Area	Height	Width	Purity Threshold
1	CLONIDINATO DE LISINA	3.023	1000	1000	0.10	0.999

20. Cromatograma, análisis espectral y análisis de pureza de pico de la muestra de tabletas tratada con agua.

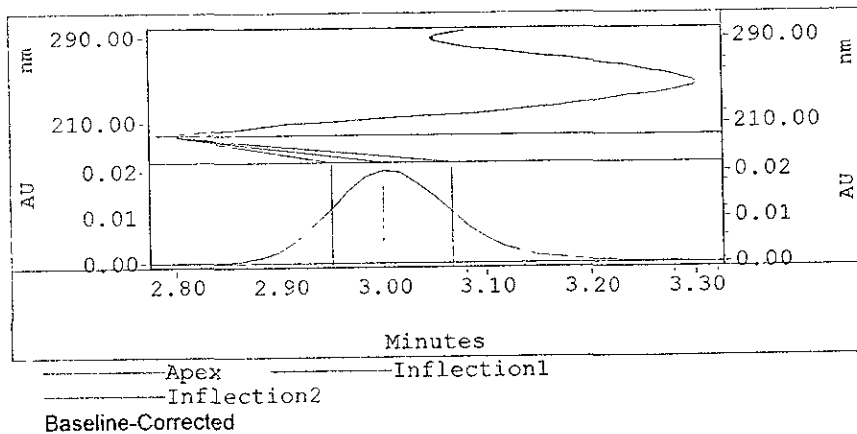
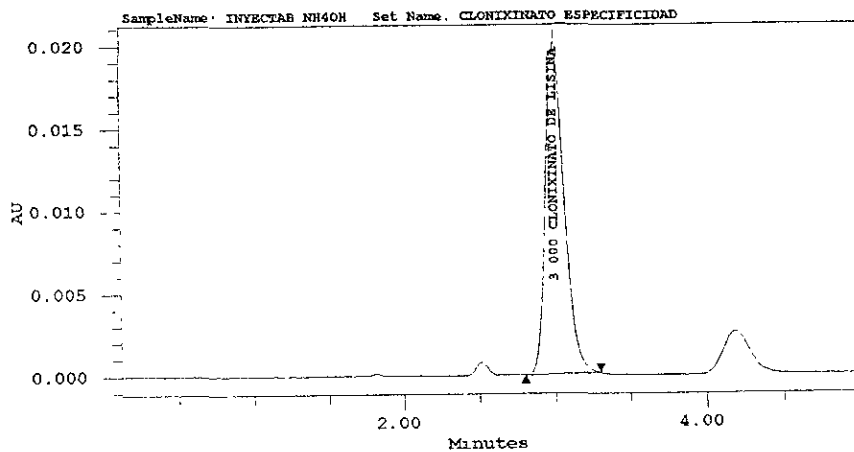


— Apex — Inflection1  
 — Inflection2  
 Baseline-Corrected

SYSTEM SUITABILITY

#	Name	Ret. time (min)	USP $\Delta$ (min)	USP $\Delta$ (min)	Width (min)	Height (AU)
1	CLONIXINATO DE LISINA	3.012	0.010	0.010	0.050	1.013

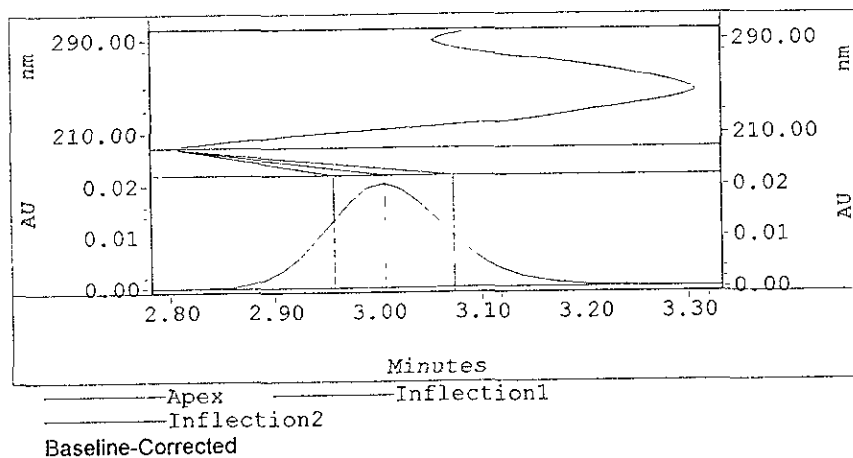
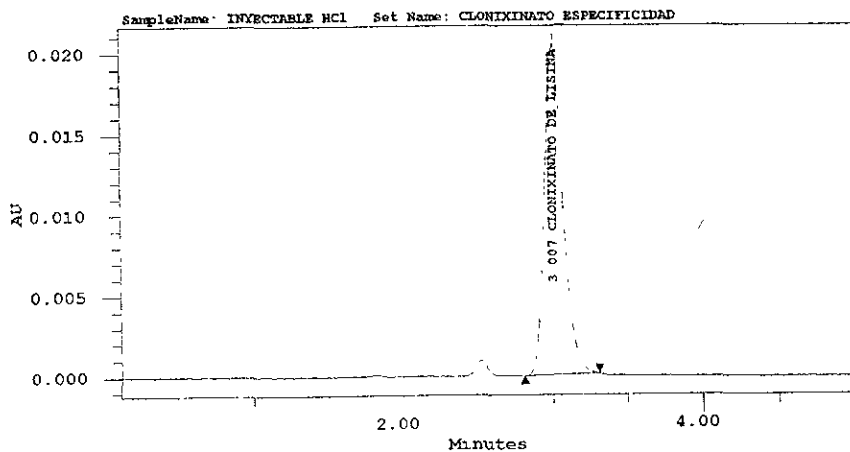
21. Cromatograma, análisis espectral y análisis de pureza de pico de la muestra de inyectable tratada con hidróxido de amonio.



SYSTEM SUITABILITY

#	NAME	Ret. Time (min)	USF Coefficient	USF Tolerance	Purity (Area %)	Purity Threshold
1	CLONIXINATO DE LISINA	3.000	1.000	0.004	100.0	1.000

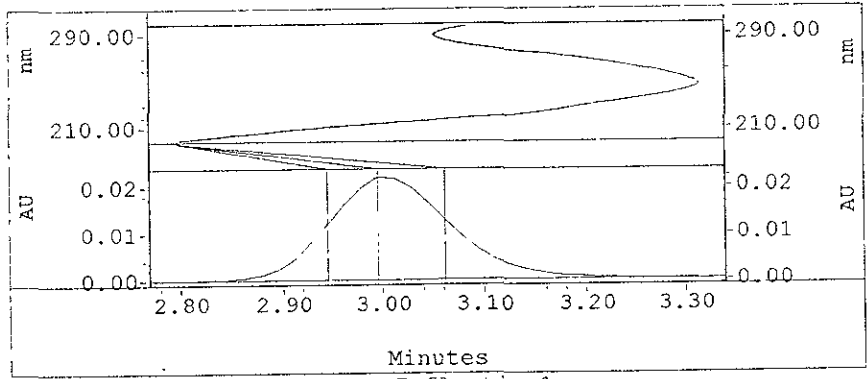
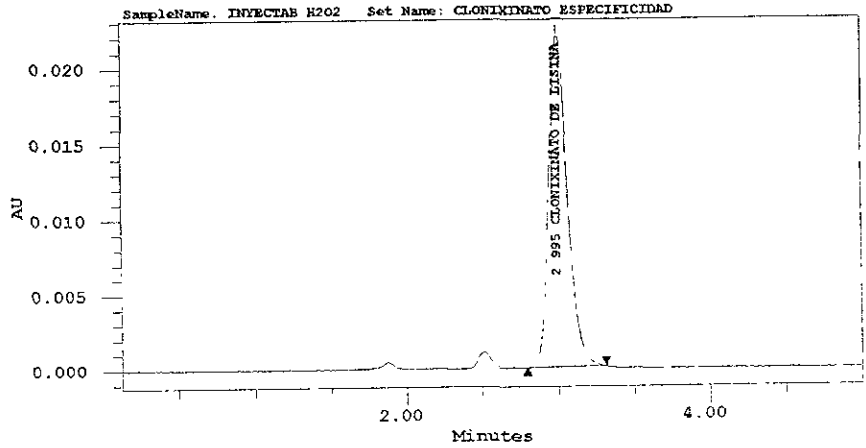
22. Cromatograma, análisis espectral y análisis de pureza de pico de la muestra de inyectable tratada con ácido clorhídrico



SYSTEM SUITABILITY

#	Name	Ret. Time (min)	USF Tailing	USF Tolerant	Purity Analyze	Purity Threshold
1	CLONIDINATO DE LISINA	3.007	1.14	0.93	0.050	1.05

23. Cromatograma, análisis espectral y análisis de pureza de pico de la muestra de inyectable tratada con peróxido de hidrógeno.

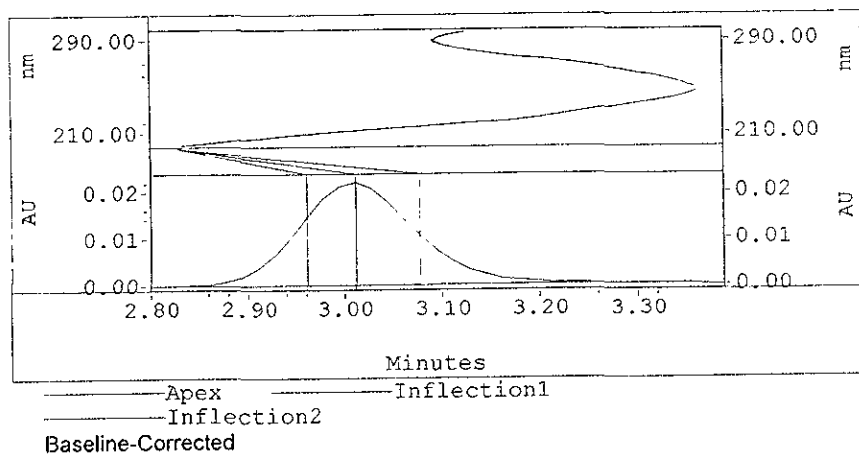
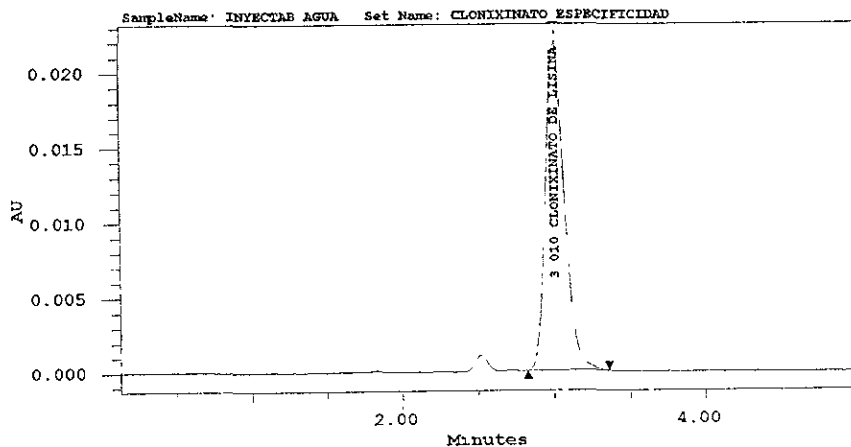


Apex Inflection1  
 Inflection2  
 Baseline-Corrected

SYSTEM SUITABILITY

#	Name	Ret. Time (min)	USF Tailing	USF Symmetry	Purity %	Purity Threshold
1	CLONIDINATO DE LORAZINA	2.995	1.024	1.00	100%	100%

24. Cromatograma, análisis espectral y análisis de pureza de pico de la muestra de inyectable tratada con agua.



SYSTEM SUITABILITY

#	Name	Ret Time (min)	Std Dev (min)	US Tangent	Purity Angle	Purity Threshold
1	CLONIXINATO DE LISINA	3.010	0.141	0.970	0.600	0.950