



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO  
INDICADOR DE ESTABILIDAD PARA MALEATO DE  
TRIMEBUTINA EN SOLUCION INYECTABLE

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A

OLIVIA HERNANDEZ HERNANDEZ

278/15





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 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: PROFA. ISaura LUISA CARRERA GARCIA

VOCAL: PROFA. GEORGINA MARGARITA MAYA RUIZ

SECRETARIO: PROFA. CONSUELO ARELLANO BORJAS

1ER SUPLENTE.: PROF. JUAN MANUEL RODRIGUEZ

2DO SUPLENTE.: PROFA. MA. DE LOS DOLORES CAMPOS ECHEVERRIA


SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

CENTRO A.F. DE ESTUDIOS TECNOLÓGICOS, S.A.

ASESOR DE TESIS:

  
\_\_\_\_\_  
Q.F.B. ISaura LUISA CARRERA GARCIA

SUPERVISOR TECNICO:

  
\_\_\_\_\_  
Q.F.B. MYRIAM CORTES FUENTES

SUSTENTANTE:

  
\_\_\_\_\_  
OLIVIA HERNANDEZ HERNANDEZ

DEDICATORIA.

NADIE NOS PERTENECE,  
SALVO EN EL RECUERDO.

-JOHN UPDIKE.

CON ESPECIAL CARÍÑO A LA MEMORIA DE LUZ.

A TI MAMA PORQUE ESTO MAS QUE UN LOGRO MIO ES UN LOGRO TUYO.

A MI PADRE, A DOLORES Y A CARLOS POR SU CARIÑO.

A MI TIA LUCIA POR SU APOYO EN LOS TIEMPOS DIFÍCILES.

AGREDECIMIENTOS.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO Y ESPECIALMENTE A LA FACULTAD DE QUIMICA.

AL CENTRO A.F. DE ESTUDIOS TECNOLÓGICOS POR BRINDARME LA OPORTUNIDAD Y EL APOYO PARA RELIZAR EL PRESENTE TRABAJO.

A LA PROFESORA ISAURA CARRERA POR IMPULSARME A SEGUIR ADELANTE.

A MYRIAM CORTES POR SU ENSEÑANZA, APOYO Y POR EL TIEMPO DEDICADO A ESTE PROYECTO.

A LETICIA HOSHIKO, IVAN FRANCISCO GAYTAN Y LORENA MARTINEZ QUIENES FUERON LOS SEGUNDOS ANALISTAS EN CADA UNO DE LOS METODOS VALIDADOS EN ESTA TESIS POR SU APOYO, PACIENCIA Y AMISTAD PERO SOBRE TODO A LETI POR SU APOYO INCONDICIONAL.

A NORMA ELENA, FABIAN, ZOE, JUAN CARLOS Y ANA MARIA POR SUS ENSEÑANZAS Y SU AMISTAD.

A VERONICA, BEATRIZ Y JAVIER QUIENES FUERON UN GRAN APOYO EN LOS MOMENTOS DIFÍCILES.

## INDICE.

	PAGINA
1. INTRODUCCION.	1
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	1
1.2. OBJETIVOS GENERALES.	2
1.2.1. OBJETIVOS PARTICULARES.	2
1.3. HIPOTESIS.	3
2. ANTECEDENTES.	4
2.1. MONOGRAFIA DEL FARMACO.	4
2.2. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.	10
2.3. CRITERIOS DE VALIDACION.	26
3. PARTE EXPERIMENTAL.	35
3.1. EQUIPOS, MATERIAL, REACTIVOS, SUSTANCIA DE REFERENCIA, MATERIA PRIMA Y FORMULACIONES.	35
3.2. ESTABLECIMIENTO DE LA SUSTANCIA DE REFERENCIA SECUNDARIA DE MALEATO DE TRIMEBUTINA A PARTIR DE UNA MATERIA PRIMA.	37
3.2.1. VALIDACION DEL METODO POTENCIOMETRICO PARA VALORAR MALEATO DE TRIMEBUTINA MATERIA PRIMA.	37
3.2.1.1. LINEALIDAD.	38
3.2.1.2. EXACTITUD DEL METODO.	39
3.2.1.3. PRECISION.	39
3.2.1.3.1. REPETIBILIDAD.	39
3.2.1.3.2. PRECISION INTERMEDIA.	39
3.2.1.4. INTERVALO.	39
3.2.1.5. ROBUSTEZ.	40
3.2.1.5.1. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.	40

3.2.2. VALIDACION DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA VALORAR MALEATO DE TRIMEBUTINA MATERIA PRIMA.	41
3.2.2.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA.	41
3.2.2.2. PRECISION DEL SISTEMA.	42
3.2.2.3. EXACTITUD DEL METODO.	42
3.2.2.4. PRECISION.	42
3.2.2.4.1. REPETIBILIDAD.	42
3.2.2.4.2. PRECISION INTERMEDIA.	43
3.2.2.5. INTERVALO.	43
3.2.2.6. ROBUSTEZ.	43
3.2.2.6.1. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.	43
3.3. DESARROLLO DEL METODO POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION PARA CUANTIFICAR AL MALEATO DE TRIMEBUTINA EN SOLUCION INYECTABLE.	44
3.4. VALIDACION DEL METODO POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION PARA CUANTIFICAR AL MALEATO DE TRIMEBUTINA EN SOLUCION INYECTABLE.	61
3.4.1. ESPECIFICIDAD.	61
3.4.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA.	62
3.4.3. PRECISIÓN DEL SISTEMA.	62
3.4.4. LINEALIDAD DEL METODO.	62
3.4.5. EXACTITUD DEL METODO.	63
3.4.6. PRECISION.	63
3.4.6.1. REPETIBILIDAD.	63
3.4.6.2. PRECISION INTERMEDIA.	63
3.4.7. INTERVALO.	63
3.4.8. ROBUSTEZ.	63
3.4.8.1. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.	63
3.4.8.2. TOLERANCIA DEL SISTEMA.	64



4. RESULTADOS Y DISCUSION.	66
4.1. VALIDACION DEL METODO POTENCIOMETRICO PARA VALORAR AL MALEATO DE TRIMEBUTINA MATERIA PRIMA.	66
4.1.1. LINEALIDAD.	66
4.1.2. EXACTITUD DEL METODO.	70
4.1.3. PRECISION.	71
4.1.3.1. REPETIBILIDAD.	71
4.1.3.2. PRECISION INTERMEDIA.	72
4.1.4. INTERVALO.	73
4.1.5. ROBUSTEZ.	73
4.1.5.1. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.	73
4.2. VALIDACION DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA VALORAR AL MALEATO DE TRIMEBUTINA MATERIA PRIMA.	75
4.2.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA.	75
4.2.2. PRECISION DEL SISTEMA.	82
4.2.3. EXACTITUD DEL METODO.	83
4.2.4. PRECISION.	84
4.2.4.1. REPETIBILIDAD.	84
4.2.4.2. PRECISION INTERMEDIA.	85
4.2.5. INTERVALO.	86
4.2.6. ROBUSTEZ.	87
4.2.6.1. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.	87
4.3. PROPUESTA DE MONOGRAFIA PARA MALEATO DE TRIMEBUTINA MATERIA PRIMA.	88
4.4. VALIDACION DEL METODO POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION PARA CUANTIFICAR AL MALEATO DE TRIMEBUTINA EN SOLUCION INYECTABLE.	94
4.4.1. ESPECIFICIDAD.	94
4.4.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA.	106
4.4.3. PRECISION DEL SISTEMA.	109
4.4.4. LINEALIDAD DEL METODO.	110
4.4.5. EXACTITUD DEL METODO.	113

	<b>PAGINA</b>
4.4.6. PRECISION.	114
4.4.6.1. REPETIBILIDAD.	114
4.4.6.2. PRECISION INTERMEDIA.	114
4.4.7. INTERVALO.	115
4.4.8. ROBUSTEZ.	116
4.4.8.1. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.	116
4.4.8.2. TOLERANCIA DEL SISTEMA.	117
5. CONCLUSIONES.	119
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	121

# CAPITULO I

## INTRODUCCION.

### 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Un aspecto fundamental durante la producción y el control de los medicamentos es la utilización de métodos analíticos, procesos y sistemas validados.

La importancia actual de la validación de métodos analíticos se debe a la necesidad que existe de asegurar que los análisis que se realizan a los medicamentos durante la producción, el control y los estudios de estabilidad provean resultados confiables.

Cuando se registra un medicamento con fármacos nuevos o se realizan modificaciones a las condiciones de registro, debe realizarse un estudio de estabilidad el cual asegura que un medicamento contenido en un envase de determinado material durante el tiempo de almacenamiento y uso, mantiene las características físicas, químicas, microbiológicas, y biológicas dentro de los límites establecidos.

Por lo tanto los métodos analíticos para evaluar los productos farmacéuticos durante estudios de estabilidad deben ser específicos para el principio activo en presencia de los componentes de la formulación, impurezas, sustancias relacionadas provenientes de la síntesis del fármaco y productos de degradación del principio activo bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

La finalidad de este trabajo es desarrollar y validar un método específico, exacto y preciso para cuantificar Maleato de Trimebutina en solución inyectable en producto en proceso, producto terminado y durante estudios de estabilidad.

Debido a que el Maleato de Trimebutina no es una materia prima farmacopéica, es necesario establecer un estándar de referencia con el cual se suministren datos exactos, por lo que se hace necesario validar los métodos para valorarlo y proponer la monografía y de esta manera se contará con un método que permitirá caracterizar al compuesto de interés y asegurar su identidad, potencia, calidad y pureza.

## 1.2. OBJETIVOS GENERALES:

- Proponer la monografía de Maleato de Trimebutina materia prima y establecer una Sustancia de Referencia Secundaria de este compuesto.
- Desarrollar y validar un método analítico para el control de producto en proceso, producto terminado y durante estudios de estabilidad por cromatografía de líquidos de alta resolución para Maleato de Trimebutina en solución inyectable.

### 1.2.1. OBJETIVOS PARTICULARES:

- Validar el método potenciométrico y espectrofotométrico para valorar Maleato de Trimebutina materia prima para establecer la Sustancia de Referencia Secundaria.
- Desarrollar la monografía de Maleato de Trimebutina, con el propósito de contar con la metodología que permita caracterizar a la materia prima y asegurar su identidad, potencia, calidad y pureza.
- Desarrollar un método analítico para la cuantificación de Maleato de Trimebutina en solución inyectable.
- Retar la especificidad del método analítico desarrollado y realizar los cambios necesarios a las condiciones cromatográficas.
- Llevar a cabo la validación del método propuesto evaluando: linealidad del sistema, precisión del sistema, especificidad del método, exactitud del método, linealidad del método, precisión del método, estabilidad de la solución de la muestra y tolerancia del sistema.

### 1.3 HIPOTESIS.

Al validar los métodos analíticos para valorar al Maleato de Trimebutina materia prima, se podrá demostrar que estos métodos satisfacen los requisitos para ser utilizados en la valoración de la misma y permitirán proponer una monografía de este compuesto. Se contará con un método que permita caracterizarla y asegurar su identidad, potencia, calidad y pureza con el propósito de utilizarla como Sustancia de Referencia Secundaria.

Al validar el método analítico desarrollado para cuantificar al Maleato de Trimebutina en una solución inyectable, se podrá demostrar que éste método satisface los requisitos para ser utilizado en la valoración del principio activo en producto en proceso, producto terminado y durante estudios de estabilidad.

## CAPITULO II

### ANTECEDENTES.

#### 2.1. MONOGRAFIA DEL FARMACO. (1, 2, 3)

**NOMBRE GENERICO:** MALEATO DE TRIMEBUTINA.

**NOMBRES QUIMICOS:**

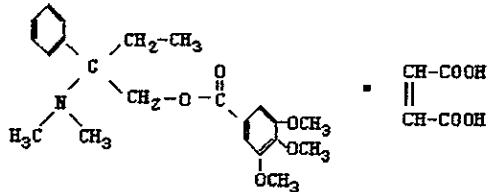
- 1) 3,4,5-Trimetoxibenzóico ácido 2-(dimetilamino)-2-fenilbutil éster maléico.
- 2) Monomaleato del ácido 2-dimetilamino-2-fenilbutil-3,4,5-trimetoxibenzoato.

**NOMBRES COMERCIALES:** Cerekinon, Debridat, Digerent, Foldox, Modulase, Modulon, Polibutin, Spabucol, Trimedat.

**COMBINADA CON OTROS FARMACOS:** Debridat enzimático, Debrum.

**FORMULA CONDENSADA:**  $C_{22}H_{29}NO_5 \cdot C_4H_4O_4$  TRIMEBUTINA MALEATO.

**FORMULA DESARROLLADA:**



**MASA MOLECULAR:** TRIMEBUTINA MALEATO: 503.5

**APARIENCIA:** Polvo blanco cristalino, sin olor y sabor ligeramente amargo.

**SOLUBILIDAD:** Soluble en metanol, en agua, en cloroformo y en etanol. Prácticamente insoluble en éter.

**PUNTO DE FUSION (1):** 105-106 °C (recristalizado de agua).

**FARMACOLOGIA: (4, 5, 6, 7).**

Trimebutina es un normorregulador del tono y la motilidad gastrointestinal.

Favorecedor específico de una adecuada recuperación postoperatoria del tránsito intestinal. Indicado particularmente en la prevención y tratamiento del íleon paralítico, de la sintomatología en el tratamiento postoperatorio de la cirugía abdominal: hipo, náuseas, vómito, distensión, espasmo, constipación y dolor abdominal, disminuye la acumulación de líquidos y gases en el intestino evitando al máximo la aparición de fenómenos dolorosos, induce una pronta expulsión de gases.

La trimebutina en solución inyectable realiza sus efectos espasmolíticos, musculotrópicos gracias a que posee una estructura química análoga a la acetilcolina, por lo que tiene un efecto regulador de la musculatura lisa y actúa por competencia de sustrato a nivel de tracto digestivo. Principalmente actúa aislando fibras de las centrales nerviosas perturbadas permitiendo que la acetilcolina y la adrenalina actúen en la periferia.

Se obtienen niveles hemáticos máximos en 1 y 2 horas. La eliminación es rápida, principalmente por vía urinaria: 70 % aproximadamente en 24 horas.

Posee una elevada tolerancia clínica, hemática y renal.

## METODOS ANALITICOS.

### a) CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (9):

Pesar 10 mg de la sustancia y disolver en 5 ml de metanol (2 mg/mL), aplicar de 2 a 3  $\mu$ l de la solución en una placa de gel de sílice de alta eficiencia F 250 (Merck) 20 x 10 cm y eluir con cualquiera de los sistemas cromatográficos siguientes:

SISTEMA	MEZCLA DE ELUENTES (V/V)	Rf
I	acetato de etilo-metanol-amoniaco al 30 % (85:10:5)	0.88
II	ciclohexano-tolueno-dimetilamina (65:25:10)	0.54
III	acetato de etilo-cloroformo (50:50)	0.52
IV	acetona*	0.82

\*Rociar previamente la placa con una solución de hidróxido de potasio metanólica 0.1 M y dejar secar.

Detección de la muestra:

Rociar la placa con una solución de ácido sulfúrico al 10 %, enseguida rociar el reactivo de Dragendorff y finalmente rociar con una solución de iodoplatinato acidificada.

### b) ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (10):

La cuantificación de Maleato de Trimebutina en plasma utiliza las siguientes condiciones:

COLUMNA: Acero inoxidable 250 mm de largo x 4.6 mm de diámetro interno.

EMPAQUE: PARTISIL Octadecilsilano (ODS)-2 y 10  $\mu$ m de tamaño de partícula.

FASE MOVIL: Metanol:Reactivo cromatográfico de Par Iónico (Pic-A) acuoso 0.005M (85:15).

VELOCIDAD DE FLUJO: 2.00 mL/min.

DETECTOR: UV 265 nm.

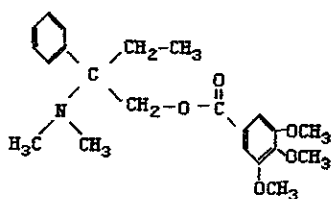
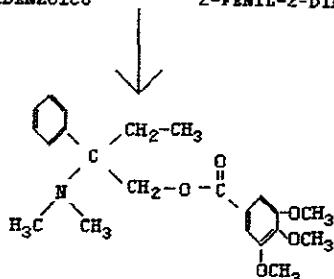
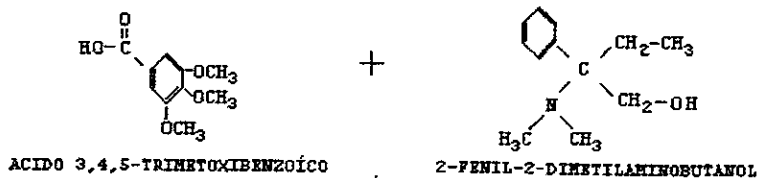
VOLUMEN DE INYECCION: 20  $\mu$ l.

SUSTANCIA DE REFERENCIA INTERNA (SRI): Clorhidrato de Procaína.

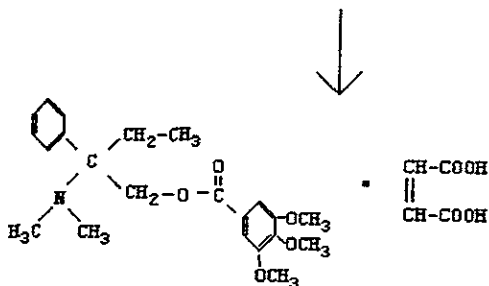
SUSTANCIA DE REFERENCIA SECUNDARIA: Maleato de Trimebutina.



SINTESIS: (8)



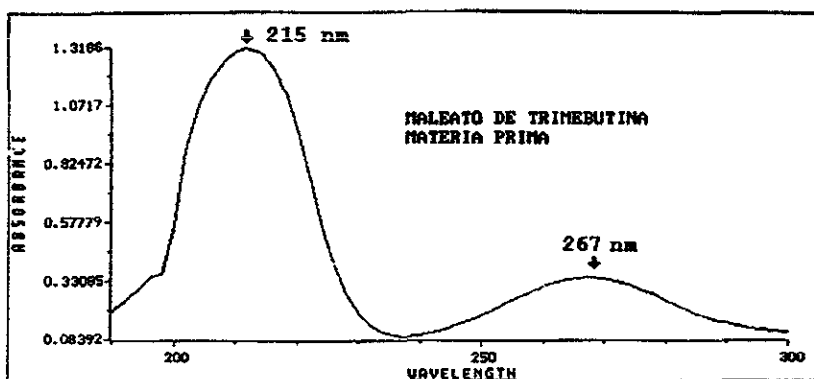
2-DIMETILAMINO-2-FENILBUTIL-3,4,5-TRIMETOXIBENZOATO      ACIDO MALBICO



MONOMALEATO DEL ACIDO 2-DIMETILAMINO-2-FENILBUTIL-3,4,5-TRIMETOXIBENZOATO

ESPECTRO U.V. (OBTENIDO EXPERIMENTALMENTE).

Sample Name : MALEATO DE TRIMEBUTINA Function : Absorbance  
Solvent Name : HCL 0.1 N Wavelength Range: 190 to 300 nm  
Concentration : 20.0 Integration Time: 1 s  
Units :  $\mu\text{g/mL}$  Std Deviation : Off



El espectro U.V. de la muestra de Maleato de Trimebutina Materia Prima en una concentración de 20  $\mu\text{g/mL}$  en HCL 0.1 N exhibe los mismos máximos que una preparación similar de Maleato de Trimebutina Sustancia de Referencia.

NOTA: EL ESPECTRO U.V. SE REALIZO EXPERIMENTALMENTE DADO QUE NO SE ENCONTRO REPORTADO EN LA BIBLIOGRAFIA.



## 2.2. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION. (14,15,16,17,18)

La cromatografía es un método analítico mediante el cual los componentes de una mezcla se distribuyen entre dos fases, una móvil y la otra estacionaria. La fase móvil puede ser un líquido o un gas. La fase estacionaria, contenida en un soporte cromatográfico, puede ser un sólido o un líquido (incluido en un sólido o en un gel). La clasificación de los métodos cromatográficos se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.

TIPO DE CROMATOGRAFIA	FASE MOVIL	FASE ESTACIONARIA	TECNICA	PRINCIPIO
GAS-LIQUIDO	GAS	LIQUIDO	GASES	PARTICION
LIQUIDO-SOLIDO	LIQUIDO	SOLIDO	COLUMNA PAPEL CAPA FINA	ADSORCIÓN EXCLUSIÓN INTERCAMBIO IONICO
LIQUIDO-LIQUIDO	LIQUIDO	LIQUIDO	COLUMNA PAPEL CAPA FINA	REPARTO
GAS-SOLIDO	GAS	SOLIDO	GASES	ADSORCION

### INSTRUMENTACION.

Los componentes de un sistema para cromatografía de líquidos de alta resolución se muestran en la Figura 1.

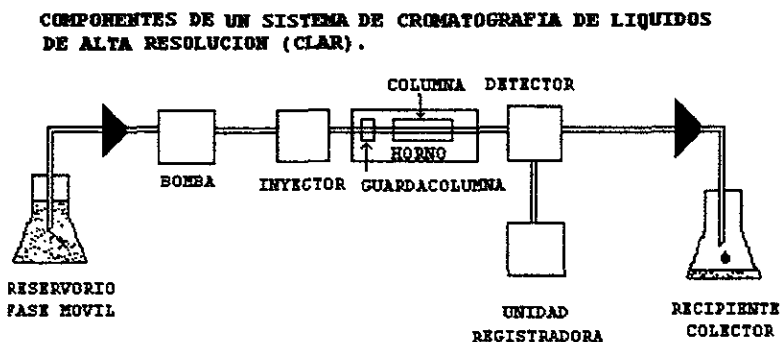


Figura 1. Esquema de los componentes de un sistema CLAR.

1. **RESERVORIO DE LA FASE MOVIL.** El reservorio es el recipiente que contiene la fase móvil, puede emplearse como reservorio cualquier frasco de laboratorio de buena calidad (de vidrio o polímero resistente), con una tapa adecuada para prevenir el ingreso de partículas ambientales al sistema.

2. **TUBERIAS.** La fase móvil empleada en CLAR debe circular por tuberías que conectan el reservorio de disolvente con la bomba, la bomba con el inyector, éste con el detector y eventualmente con un colector de fracciones o válvula de distribución. Estas tuberías deberán ser inertes de acuerdo a su ubicación en el sistema cromatográfico, resistentes a altas presiones y de un diámetro adecuado.

3. **UNIONES.** Las uniones permiten conectar las tuberías a los distintos componentes del sistema cromatográfico. Las uniones deben ser inertes a las fases móviles y muestras, deben cerrar herméticamente, no deben contribuir en forma notable al ensanchamiento de banda extracolumna por la presencia de volúmenes muertos.

4. **BOMBA.** Las bombas CLAR impulsan la fase móvil del reservorio del disolvente hacia el inyector, y desde allí hacia la columna.

Básicamente existen dos tipos de bombas: las de pistón (bombas reciprocantes) y las de desplazamiento continuo (bombas jeringa). Las primeras son las de uso más difundido, son muy versátiles y fáciles de adaptar a la rutina del laboratorio.

Las bombas están construidas de materiales muy resistentes tanto al ataque químico como al desgaste mecánico. Los componentes en contacto con los disolventes son de acero inoxidable, zafiro, rubí y teflón. En general el acero inoxidable se utiliza como "cuerpo" de toda bomba, para la construcción de tuberías, conectores y cabezales de los pistones.

Habitualmente los pistones están contruidos de zafiro y las válvulas de retención por una pequeña esfera de rubí que se apoya en un asiento de zafiro y una malla de acero inoxidable que retiene la esfera en sus movimientos.

Las bombas CLAR tienen las siguientes características: los equipos convencionales operan con flujos entre 0.1 y 10.0 mL/min y trabajan con presiones de hasta 6000 psi. La exactitud en la medición del flujo puede determinarse midiendo el volumen de líquido entregado en un intervalo de tiempo preestablecido,

la exactitud del flujo incide directamente en la exactitud de los tiempos de retención de las sustancias a cuantificar. El ruido se refiere a las variaciones denominadas pulsaciones que presentan las bombas del tipo recíprocante, y que conducen a variaciones en el caudal de disolvente entregado, en intervalos cortos de tiempo.

**5. SISTEMAS DE GRADIENTES.** En CLAR se puede variar la composición de la fase móvil. Esta variación puede seguir un perfil lineal, cóncavo, convexo o una mezcla de estos perfiles en un mismo cromatograma.

**6. INYECTORES.** El inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal de fase móvil a través del sistema. El inyector debe ser fácil de operar, debe ser inerte al ataque químico y capaz de soportar altas presiones, debe ser preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida en el sistema, debe inyectar la muestra en forma de un paquete "compacto" con el propósito de obtener una máxima eficiencia en la separación.

Los inyectores CLAR son válvulas que orientan el caudal hacia la columna, pasando o no según sea su posición, a través de un serpentín en el cual se introduce la solución a inyectar. Las válvulas pueden accionarse manualmente o automáticamente.

Las válvulas de inyección de seis vías, pueden accionarse eléctrica o neumáticamente y se utilizan en la construcción de inyectores automáticos. Los inyectores automáticos deben contener, además de la válvula de inyección y del mecanismo que permite su llenado, un dispositivo para colocar las muestras a inyectar, en general un carrusel que aloja viales donde se coloca las muestras.

**7. COLUMNA.** La separación en cromatografía líquida se lleva a cabo mediante interacciones entre la muestra y la fase estacionaria.

La fase estacionaria puede ser un sólido poroso del tipo de los usados en la cromatografía de adsorción, intercambio iónico y exclusión.

Los métodos cromatográficos comúnmente usados pueden dividirse en los siguientes grupos :

**1. Intercambio iónico:** La separación se basa en la carga de los grupos funcionales, intercambio aniónico para muestras con ion negativo ( $X^-$ ) o intercambio catiónico para muestras con ion positivo ( $X^+$ ).

**2. Afinidad de par iónico:** La separación se basa en la interacción química específica con las especies de interés; la técnica más común es por fase reversa usando un amortiguador y añadiendo un contra-ión de carga contraria a la muestra y la separación es influenciada por el pH, la fuerza iónica, la temperatura, la concentración y el tipo de disolvente(s) orgánico.

**3. Cromatografía de exclusión molecular:** Esta modalidad emplea materiales de porosidad controlada, que funciona como un filtro o tamiz y clasifica las moléculas de la muestra según un orden decreciente de tamaño molecular.

Las moléculas que son muy grandes para los poros del empaque poroso de la columna eluyen primero, las moléculas pequeñas que entran a los poros eluyen después, las velocidades de elución del resto dependen de su tamaño relativo.

**4. Cromatografía de fase normal:** La cromatografía de fase normal es una técnica cromatográfica que usa solventes orgánicos para la fase móvil y la fase estacionaria es de carácter polar.

Aquí, los compuestos menos polares eluyen más rápidamente que los más polares.

**5. Cromatografía en fase reversa:** En la cromatografía de fase reversa la partícula base de sílica gel se modifica químicamente para reemplazar sus grupos funcionales activos, los silanoles, de características polares, por determinados grupos funcionales: octadecilsilano, octasilano, fenilo, ciano, amino, etc. (Figura 2).

En la preparación de fases enlazadas, así como en el recubrimiento por fases líquidas no enlazadas, se utilizan dos tipos de partículas soporte. En el primer tipo, las partículas son totalmente porosas, mientras en el segundo existe un núcleo sólido recubierto por una delgada capa porosa. A este último se le denomina soporte pelicular.

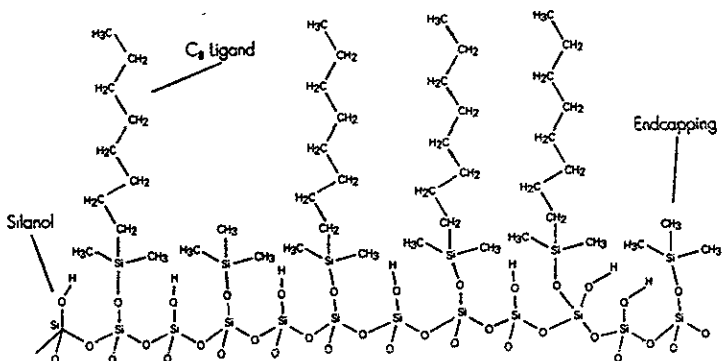


Figura 2. Superficie de una partícula típica de fase reversa.

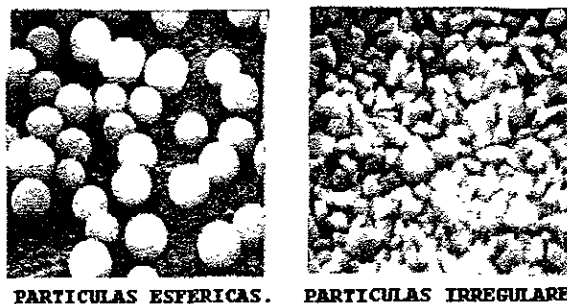


Figura 3. Partículas de soporte de forma regular e irregular.

Las partículas de soporte totalmente poroso son, en general, de gel de sílice de gran superficie, y se dispone de ellas en una gran variedad de tamaño de partícula. Los soportes peliculares están formados por un núcleo sólido, generalmente bolas de vidrio, recubiertos por una fina capa porosa, normalmente de sílice. Estos soportes peliculares son de forma más regular, con lo cual las columnas puede rellenarse fácilmente con dicho material y pueden trabajar a presiones bajas. Sin embargo se dispone de ellos únicamente en tamaños relativamente grandes, por lo tanto las columnas son tan eficaces como las de partícula pequeña, de relleno totalmente poroso, que se han desarrollado recientemente (Figura 3).



El tamaño de partícula es muy importante, ya que la fase móvil y la muestra disuelta no se difunde con facilidad, con lo cual las partículas de relleno han de ser tan pequeñas como sea posible en la práctica, con el fin de aproximarse a la condición ideal, en la que la muestra se pone en contacto con la máxima cantidad de superficie de relleno. Existe, sin embargo, un límite inferior de tipo práctico. Aproximadamente por debajo de unos 3  $\mu\text{m}$  de diámetro, las partículas empiezan a empaquetarse de manera tan compacta, que el líquido no puede bombearse con facilidad a lo largo de la columna. La mayoría de las columnas comerciales contienen rellenos con partículas cuyo tamaño promedio es de 5-15  $\mu\text{m}$  en tanto que muchos rellenos peliculares presentan tamaños de 37-42  $\mu\text{m}$ .

En fase reversa, la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es polar. Este cambio de polaridad de fase resulta en un cambio en el orden de elución de los componentes de las muestras en estudio.

La difusión de la fase reversa se debe a un factor clave: la sílica gel es un material higroscópico. El agua adsorbida, forma capas simples o múltiples alrededor de la partícula y llega a tapar sus poros; es responsable de la pérdida de actividad de la fase estacionaria en fase normal, o al menos, conduce a mecanismos mixtos de retención; por una parte, fenómenos de adsorción debidos a los silanoles superficiales de la fase estacionaria y por otra parte, a mecanismos de partición entre la fase móvil y el agua retenida sobre la fase estacionaria.

En este caso, el mecanismo de separación no será debido a un proceso de adsorción puro, sino una mezcla de adsorción partición.

**8. DETECTORES.** El detector ideal debe reunir ciertas características como son: tener amplio rango dinámico de respuesta, poseer una respuesta lineal, no contribuir al ensanchamiento de banda extracolumnar, responder a todos los solutos, tener sensibilidad apropiada, no afectarse por cambios de temperatura, poseer una buena relación señal/ruido, no destruir la muestra, tener una constante de tiempo baja, lo cual indica la velocidad con que el detector responde a un cambio instantáneo de la concentración del compuesto de interés.

Los detectores pueden clasificarse en generales y selectivos. Los detectores generales miden el cambio de algunas propiedades físicas de la fase móvil que contiene el compuesto de interés en comparación con la misma fase móvil pura. Los detectores de

índice de refracción y el de conductividad son ejemplos de detectores generales, los detectores selectivos son aquellos sensibles a algunas propiedades del soluto, por ejemplo el detector UV, que produce una señal proporcional a la absorbancia del soluto a una longitud de onda dada.

#### DETECTOR UV.

Los detectores UV poseen buena sensibilidad y rango lineal, y permiten detectar compuestos de interés en el orden de nanogramos. No son destructivos y pueden emplearse con gradientes de disolventes, con la única limitación de que éstos no absorban en la longitud de onda de trabajo. En general permiten cambiar el volumen de su celda, típicamente con volúmenes de 1 a 12  $\mu$ l.

Son detectores muy poco sensibles a los cambios de flujo y temperatura.

Los detectores de arreglo de fotodiodos proporcionan información espectral.

En los dispositivos convencionales, la red de difracción se ubica antes de la celda, la que recibe luz monocromática seleccionada por la red. En los detectores de arreglo de fotodiodos se emplea un sistema óptico invertido: la celda se ilumina con luz no monocromada y la luz emergente de la celda llega a la red de difracción y allí es dispersada hacia el elemento fotosensible. En lugar de una fotocélula se emplea un conjunto de fotocélulas o fotodiodos montados en un chip de silicio. De esta forma se consigue medir no solo la luz transmitida a una longitud de onda, sino todo el espectro de absorción.

La Figura 4 ilustra el camino que recorre la luz por el arreglo óptico de un detector de arreglo de fotodiodos Waters 996.

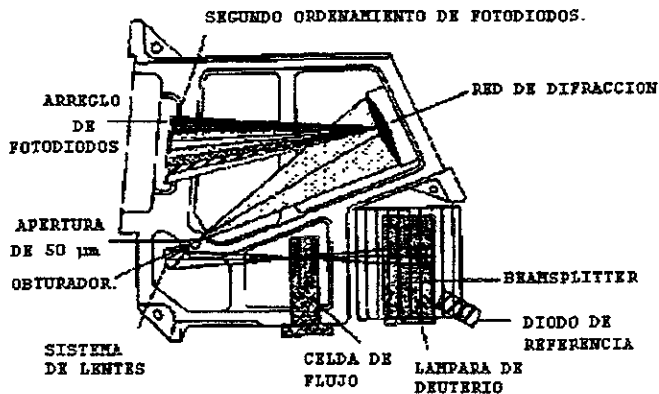


Figura 4. Arreglo óptico del camino que sigue la luz en un detector de arreglo de fotodiodos.

Los componentes de un detector de arreglo de fotodiodos son:

- Sistema de lentes: Enfoca la luz emitida que se origina en la lámpara de deuterio por la emisión del haz de luz a la celda de flujo.
- Beamsplitter y diodo de referencia: Un Beamsplitter refleja parte de la luz al diodo de referencia. El diodo de referencia mide la intensidad de la luz emitida por la lámpara. El detector utiliza estas mediciones para mantener constante la potencia de la lámpara.
- Celda de Flujo: El haz de luz policromática pasa por la celda de flujo que contiene al eluyente y a la muestra. Este arreglo de componentes ópticos, con la celda de flujo que se encuentra entre la lámpara y la red de difracción, es comúnmente llamado "lentes invertidos".
- Sistema de lentes: El sistema de lentes enfoca la luz de la celda de flujo a la entrada de la porción espectrográfica de los lentes. El espejo define el haz de luz enfocado sobre el espejo espectroográfico.
- Apertura: El tamaño de apertura controla la longitud de onda, resolución e intensidad de la luz proveniente de los fotodiodos. El ancho de la apertura estándar es de 50  $\mu\text{m}$ .
- Obturador: El obturador evita que la luz alcance al arreglo de fotodiodos excepto durante el muestreo y la calibración.

- Red de difracción: Dispersa la luz en bandas de longitud de onda y enfoca estas bandas de longitud de onda sobre el plano del arreglo de fotodiodos.
- Segundo ordenamiento de fotodiodos: El filtro del segundo ordenamiento de fotodiodos sobre el borde superior del arreglo de diodos reduce la contribución a las longitudes de onda de ultravioleta de altas longitudes de onda.
- Arreglo de fotodiodos: Consiste de 512 diodos arreglados linealmente. El ancho del diodo y el espaciamiento entre los diodos proporciona una resolución de la longitud de onda de 1.2 nm.

El software del procesador de datos utiliza los espectros de absorbancia UV/VISIBLE obtenidos del detector de arreglo de fotodiodos y los procesa para llevar a cabo la prueba de pureza del pico y la comparación de espectros.

Cada pico cromatográfico tiene un único espectro UV que puede ser comparado con un estándar de referencia para la identificación del pico. Además se puede asegurar la pureza del pico por la comparación del espectro UV a lo largo de todo el ancho del pico.

La técnica de contraste espectral cuantifica la diferencia en la forma de los espectros convirtiéndolos en vectores y comparándolos, determinando la significancia que hay en la diferencia entre dos espectros, tomando en cuenta el ruido del instrumento y la contribución del disolvente.

**9. SISTEMA DE PROCESAMIENTO DE DATOS.** El resultado de un ensayo cromatográfico es la obtención de fracciones separadas de los componentes de la muestra y la de un cromatograma, de cuya interpretación puede extraerse conclusiones. Este registro y la eventual manipulación se obtienen a partir de la señal proveniente del detector por medio de un sistema de toma y procesamiento de datos.

La señal del detector es siempre analógica y puede ser utilizada tal cual por un registrador gráfico, por un integrador, o digitalizada, para que pueda ser interpretada y procesada por una computadora.

Como resultado del análisis cromatográfico se obtienen dos productos: un gráfico, el cromatograma, que relaciona la concentración de soluto en función del tiempo (de elución) y un eluido o eluato, el fluido proveniente de la columna que al recolectarse en forma secuencial o escalonada, contiene la fase móvil e, idealmente, los componentes de la muestra separados.

## NOMENCLATURA Y CALCULOS.

El cromatograma comienza en el momento en que la solución en ensayo es inyectada. La Figura 5 representa un cromatograma típico de elución de dos sustancias donde  $t_1$  y  $t_2$  son los tiempos de retención de las sustancias 1 y 2;  $h$  y  $h/2$  son específicamente la altura total y la mitad de la altura del pico 1;  $W_h/2$  es el ancho del pico a la mitad de la altura y  $W_1$  Y  $W_2$  son los anchos de las bases de los picos 1 y 2 respectivamente.

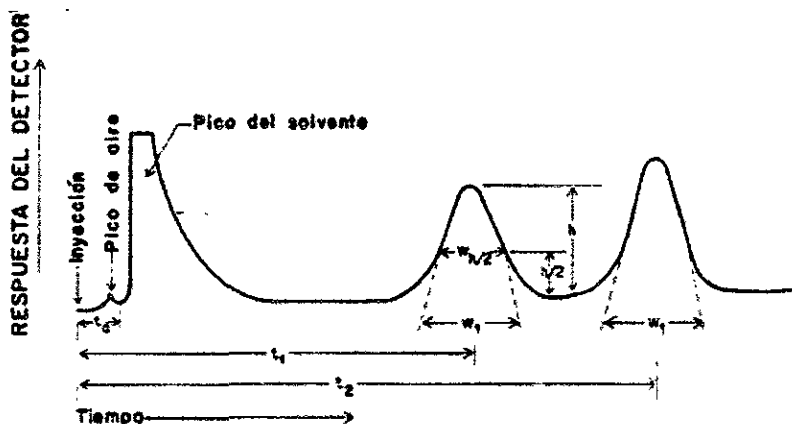


Figura 5. Cromatograma típico de elución de dos sustancias.

- Volumen muerto ( $V_0$ ):** Es el volumen total de disolvente entre el punto de inyección y el de detección, exceptuando el correspondiente a las partículas de la fase estacionaria. Comprende al volumen que la fase móvil puede ocupar entre las partículas, entre las partículas y la pared de la columna, en el interior de las tuberías, uniones, etc.
- Línea base:** Es la porción del cromatograma donde sólo se aprecia la elución de la fase móvil, sin señal debida al soluto.
- Tiempo de retención ( $t_n$ ):** Es el tiempo medido entre la inyección y la elución de la concentración máxima del soluto enésimo (máxima señal). La distancia entre este máximo de la señal y la línea base es la altura del pico ( $h_n$ ) en cuestión.

-**Tiempo muerto ( $t_0$ ):** Es el tiempo que tarda en eluirse un compuesto no retenido por el sistema cromatográfico.

-**Tiempo de retención relativo ( $t'_n$ ):** Dado que el volumen extracolumnar depende de varios factores ajenos a la separación misma, es frecuente expresar el tiempo de retención neto de un pico determinado como la diferencia entre su tiempo de retención y el tiempo muerto en lugar del tiempo de retención absoluto.

$$t'_n = t_n - t_0$$

En ambos casos, el producto del tiempo de retención y el flujo (F) darán el volumen de retención

$$V_n = t_n (\text{min}) F (\text{mL} \cdot \text{min}^{-1})$$

-**Velocidad Lineal (u):** Como la velocidad a la cual la fase móvil se desplaza a través de la columna no es solo función del flujo sino también de la sección interna de la misma, la comparación de métodos que emplean columnas de diferente diámetro interno hace preferible la expresión de la velocidad lineal en lugar del flujo. Si L es la longitud de la columna expresada en cm y  $t_0$  el tiempo muerto en segundos, la velocidad lineal en cm/segundos puede calcularse como:

$$u = \frac{L}{t_0}$$

-**Factor de capacidad ( $k'$ ):** Es el cociente entre el número de moles de soluto en la fase estacionaria y el número de moles de soluto en la fase móvil y está relacionado con el coeficiente de distribución entre ambas fases.

$$k' = \frac{\text{NUMERO DE MOLES DE SOLUTO EN LA FASE ESTACIONARIA}}{\text{NUMERO DE MOLES DE SOLUTO EN LA FASE MOVIL}}$$

Puede demostrarse que  $k'$  es proporcional al tiempo de retención de soluto y se calcula para el pico  $n$ ésimo como:

$$k' = \frac{t_n - t_0}{t_0}$$

$$k' = \frac{V_n - V_0}{V_0}$$

La medición de  $k'$  es una operación muy frecuente, ya que su valor se emplea tanto para evaluar la retención como para ajustar la separación. Así el valor de  $k'$  se regula entre 2 y 10 para mezclas de pocos componentes, o entre 0.5 y 20 si fuera necesario en el cromatograma para alojar un gran número de picos.

**-Factor de selectividad:** Es el cociente entre los factores de capacidad de un par de picos. Si no existe separación, el factor de selectividad es igual a la unidad y su valor aumenta cuando aumenta la separación.

El factor de selectividad depende de la afinidad del soluto a la fase móvil y a la columna.

$$\alpha = \frac{k'_1}{k'_2}$$

**-Resolución (R):** La resolución, se calcula para cada par de picos adyacente como:

$$R = \frac{(t_2 - t_1)}{1/2(w_2 + w_1)}$$

Donde  $t_2$  y  $t_1$  corresponden a los tiempos de retención de los picos 2 y 1,  $w_2$  y  $w_1$  a los anchos de pico medidos en su base.

**-Ancho de pico (w):**

En general el ancho de pico suele tomarse:

- 1) Al 60.7 % de la altura del pico ( $w_1$ ). En este lugar se encuentran los puntos de inflexión y en una distribución normal, la sección horizontal de la curva corresponde a dos desviaciones estándar (ver Figura 6).
- 2) Al 50 % de la altura del pico ( $w_h$ ).
- 3) En la base del pico ( $w_{tan}$ ). Este valor se obtiene prolongando la línea base por debajo del pico y midiendo el segmento de esta línea delimitado por la extrapolación de las ramas ascendente y descendente del pico (Figura 6).

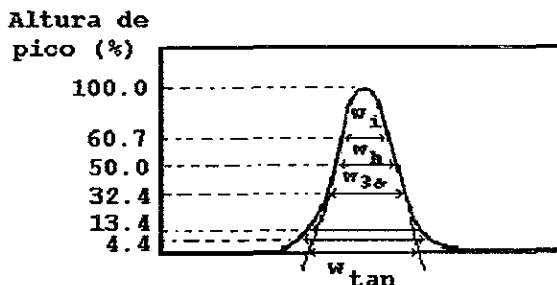


Figura 6. Anchos de pico empleados para el cálculo de N.

**-Platos Teóricos (N).** Para explicar el fenómeno de separación, se compara la cromatografía de partición líquido líquido con un proceso de distribución en contracorriente, donde la extracción en las dos fases se repite varias veces en forma encadenada. La diferencia fundamental reside en que en la cromatografía, el proceso es continuo. Sin embargo, la columna puede dividirse en cortes o rodajas imaginarias donde se consigue un equilibrio transitorio, antes de que la fase móvil avance hacia el siguiente segmento. Cada corte se llama plato y su espesor se llama altura equivalente del plato teórico (H). Para una columna de longitud L, con N platos teóricos, la altura del plato resulta:

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



El número de platos teóricos, puede calcularse en función del ancho de pico como:

$$N = 16 \left( \frac{t_n}{w_{tan}} \right)^2$$

Donde  $t_n$  es el tiempo de retención del pico enésimo y  $w_{tan}$  su ancho, medido sobre la línea base y expresado en unidades de tiempo.

La eficiencia suele medirse en varias ocasiones por ejemplo: para comparar materiales y métodos bajo las mismas condiciones experimentales, para optimizar un método analítico, para controlar que un método continúe siendo idóneo, para controlar el estado de una columna a lo largo de su vida útil.

**-Asimetría (As):** La asimetría (tailing) es una de las formas más comunes de alejamiento de la curva gaussiana y su medición es importante puesto que puede llevar, de acuerdo a su magnitud, a errores considerables de cuantificación, e incluso a oscurecer picos adyacentes. Las formulas empleadas con mayor frecuencia son:

$$As_{5\%} = \frac{b'}{a'} \quad As_{10\%} = \frac{b}{a}$$

Donde  $a$  y  $b$  (Figura 7) son las medidas entre la línea que une el máximo del pico con la línea base y los extremos anteriores y posterior del pico, tomados al 10 % de su altura. Por otra parte  $a'$  y  $b'$  son los mismos parámetros al 5 % de dicha altura.

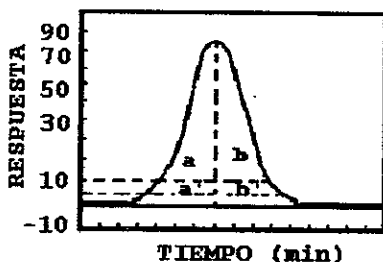


Figura 7. Representación de un pico y las zonas de medición de asimetría.

## ENSANCHAMIENTO DE BANDA INTRACOLUMNAR.

La eficiencia de la columna se mide, por su número de platos teóricos (N), o bien por la altura equivalente a un plato teórico (H).

La primera ecuación de H, fue postulada por Van Deemter en donde las contribuciones al ensanchamiento de banda dentro de una columna cromatográfica son:

- Difusión de Remolino: En una columna rellena con partículas de la fase estacionaria, el soluto encontrará diversos caminos, los cuales serán impulsados a recorrer por la fase móvil. Este fenómeno es conocido como Difusión de Remolino y su contribución al ensanchamiento de banda está dado por el diámetro de la partícula y por una constante que depende del relleno y de la calidad de su empaquetamiento en la columna.

- Difusión longitudinal: Si un soluto se abandona en un líquido, sus moléculas difundirán en todas direcciones hasta que su concentración sea uniforme en todo el seno del líquido.

La contribución de este efecto al ensanchamiento es una función inversa a la velocidad lineal de la fase móvil y directa respecto del coeficiente de difusión del soluto en el solvente y de la constante que evalúe el espacio ocupado por la fase móvil y su geometría.

- Transferencia de masa fuera del equilibrio: A medida que el soluto se desplaza a través de la columna sus moléculas se transfieren, por un proceso reversible, desde la fase móvil hacia la fase estacionaria y desde ésta nuevamente hacia la fase móvil.

Las moléculas de soluto se retienen en la fase estacionaria y son luego devueltas a la fase móvil en un tiempo finito.

Las moléculas de soluto próximos a la superficie serán devueltas a la fase móvil más rápidamente que las moléculas que difundieron profundamente, lo que dará lugar a un ensanchamiento de la banda original.

La combinación de los efectos antes mencionados da lugar a la expresión de la ecuación de Van Deemter que relaciona estos efectos con la velocidad lineal de flujo (u) y la altura del plato (H):

$$H=A+B/u+Cu$$

Donde la magnitud A se relaciona con la difusión de remolino, B con la difusión longitudinal y C con la transferencia de masa fuera del equilibrio.

De la ecuación de Van Deemter puede extraerse varias conclusiones. Se deduce que H será menor, lo que equivale a mayor N en las siguientes condiciones: cuanto menor sea el diámetro de partícula, cuanto menor sea la viscosidad de la fase móvil, a mayor temperatura, cuanto mejor sea el empaquetamiento del relleno y cuanto menor sea el espesor de la fase estacionaria fija al soporte de relleno.

#### ENSANCHAMIENTO DE BANDA EXTRACOLUMNAR.

Varios componentes del equipo cromatográfico son responsables de un ensanchamiento adicional, lo que lleva a la pérdida de eficiencia.

Los procesos de ensanchamiento de banda extracolumnar pueden medirse en función de la varianza del pico y son producidos por tres fuentes de dispersión:

- El volumen de los componentes entre el inyector y la celda, excluida la columna cromatográfica (las tuberías, uniones, detector e inyector).
- El volumen de inyección.
- La constante de tiempo del detector (la velocidad a la cual éste responde a los cambios instantáneos de la concentración del compuesto de interés).

### 2.3. CRITERIOS DE VALIDACION. (18,24).

#### METODO ANALITICO.

El método analítico es el camino que se debe seguir para realizar el análisis. Este debe describir en detalle los pasos necesarios para realizar cada prueba analítica. Esto podría incluir: la preparación de la muestra y del estándar de referencia, la preparación de los reactivos, uso de aparatos, generación de curvas de calibración, uso de la fórmula para el cálculo, etc.

La validación del método se define 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.

Los métodos deben ser diseñados y validados para su uso. Los métodos deben ser reproducibles cuando son usados por otro analista, sobre otro equipo equivalente, otros días o localización.

La discusión de la validación de los métodos esta dirigida a tres de las categorías más comunes de métodos analíticos. La clasificación de los métodos analíticos se indica en la Tabla 2.

Los requisitos para la validación de cada categoría se indican en la Tabla 3.

Tabla 2. Clasificación de los Métodos Analíticos.

CATEGORIA	APLICACIÓN.
I	CUANTIFICACION DE COMPONENTES EN PRODUCTOS FARMACEUTICOS TERMINADOS.
II	DETERMINACION DE IMPUREZAS O PRODUCTOS DE DEGRADACION EN PRODUCTO TERMINADO, INCLUYENDO PRUEBAS LIMITE Y ENSAYOS CUANTITATIVOS.
III	DETERMINACION DE LAS CARACTERISTICAS DE COMPORTAMIENTO DEL PRODUCTO (DISOLUCION O LIBERACION DE UN FARMACO).

Tabla 3. Requisitos para la validación de cada categoría.

C A T E G O R I A				
REQUISITOS	I	II		III
		CUANTITATIVO	PRUEBA LIMITE	
EXACTITUD	SI	SI	*	*
PRECISION	SI	SI	NO	SI
ESPECIFICIDAD	SI	SI	SI	*
LIMITE DE DETECCION	NO	NO	SI	*
LIMITE DE CUANTIFICACION	NO	SI	NO	*
LINEALIDAD	SI	SI	NO	*
INTERVALO	SI	SI	*	*
TOLERANCIA	SI	SI	SI	SI

\* Puede requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específicamente.

Los métodos que se validaran en esta tesis corresponden a la clasificación I de la USP.

Las características típicas de validación que deben considerarse para un método analítico para la cuantificación de componentes en productos farmacéuticos terminados son:

### EXACTITUD

La exactitud de un método analítico expresa la concordancia que existe entre el valor que es aceptado como un valor verdadero convencional o un valor de referencia aceptado y el valor encontrado. Se expresa como el por ciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

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

**Criterio:**

El porcentaje recuperado y el coeficiente de variación deberán estar de acuerdo con la Tabla 4.

Tabla 4. Porcentaje de recobro y coeficiente de variación para los métodos analíticos.

METODO	PORCENTAJE DE RECOBRO	C.V.
CROMATOGRAFICOS	98.0 - 102.0 %	≤ 2.0 %
TITRIMETRICOS	98.0 - 102.0 %	≤ 2.0 %
ESPECTROFOTOMETRICOS	97.0 - 103.0 %	≤ 3.0 %
MICROBIOLOGICOS	95.0 - 105.0%	≤ 5.0 %

**PRECISION**

La precisión de un método analítico expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestras de una misma muestra homogénea bajo las condiciones prescritas. Precisión puede ser considerada a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

REPETIBILIDAD

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

La repetibilidad debe ser evaluada usando un mínimo de 6 determinaciones al 100% de la concentración probada.

**Criterio:**

El porcentaje recuperado y el C.V. deberán de estar de acuerdo con la Tabla 4.

### PRECISION INTERMEDIA

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

La extensión de la precisión intermedia se establece dependiendo de las circunstancias bajo las cuales el procedimiento se intenta usar. El analista debe establecer los efectos de variaciones típicas a ser estudiadas, incluyendo días, análisis, equipos, etc. No es necesario estudiar estos efectos individualmente se puede utilizar un diseño experimental (matriz).

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

#### **Criterio:**

El coeficiente de variación global para los dos analistas en los 2 días debe cumplir con el criterio de la Tabla 5.

Tabla 5. Coeficiente de Variación para los Métodos Analíticos.

<b>METODO</b>	<b>C.V.</b>
<b>CROMATOGRAFICOS</b>	$\leq 2.0 \%$
<b>ESPECTROFOTOMETRICOS</b>	$\leq 3.0 \%$
<b>MICROBIOLOGICOS</b>	$\leq 5.0 \%$

### REPRODUCIBILIDAD

Expresa la precisión entre laboratorios (estudios colaboratorio, aplicado usualmente para estandarización de la metodología).

## **ESPECIFICIDAD**

Especificidad es la capacidad de evaluar inequívocamente el compuesto de interés en presencia de componentes que podrían esperarse que estuvieran presentes. Típicamente este puede incluir impurezas, productos de degradación, excipientes, etc.

Si los productos de degradación no están disponibles, la especificidad puede demostrarse por comparación de los resultados de muestras que contienen productos de degradación.

Las pruebas de pureza de picos son útiles para demostrar que el pico cromatográfico del compuesto de interés no es atribuible a más de un componente (por ejemplo arreglo de diodos, espectroscopia de masas).

Con el método propuesto:

1. Analizar placebos del producto.
2. Identificar la(s) respuesta(s) del(los) activo(s), y si procede, de los excipientes y/o de otras sustancias presentes.

### **Criterio:**

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

## **LINEALIDAD.**

La linealidad de un sistema o un método analítico es su 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 intervalo determinado.

### LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Se determina, construyendo una curva de calibración (concentración vs respuesta medida) utilizando cuando menos 5 diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo análisis cuando menos por duplicado para cada dilución.

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



**Criterio:**

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

r :  $\geq 0.99$

r<sup>2</sup>:  $\geq 0.98$

PRECISION 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.:  $\leq 1.5\%$

LINEALIDAD DEL METODO.

La linealidad del método se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos 3 diferentes cantidades de la sustancia de interés (placebos cargados), cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado.

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

**Criterio:**

Se lleva cabo un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, tomando como variable independiente (X) a la cantidad adicionada y como variable dependiente (Y) a la cantidad recuperada y los criterios son los siguientes:

Coefficiente de determinación mayor a 0.98, la pendiente no debe ser significativamente diferente a uno y la ordenada al origen no debe ser significativamente diferente a cero.

El promedio del porcentaje cuantificado y los coeficientes de variación a cada nivel y los globales en todo el intervalo de la linealidad deben de estar de acuerdo a la Tabla 4.

## **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.

Para los ensayos de principio activo o producto terminado el rango es de 80-120 % de la concentración probada. Para uniformidad de contenido se debe cubrir un mínimo del 70-130 % de la concentración probada a menos que se tenga un rango más amplio, dependiendo de la naturaleza de la forma de dosificación.

## **TOLERANCIA.**

Es la medición de la capacidad del método de permanecer sin ser afectado por pequeñas, pero deliberadas variaciones en parámetros del mismo y proporciona información de esta confiabilidad durante el uso normal.

La evaluación de la tolerancia debe considerarse durante la fase de desarrollo y depende del tipo de procedimiento bajo estudio.

Si las mediciones son susceptibles a variaciones en condiciones analíticas, las condiciones analíticas deben ser controladas adecuadamente o las precauciones deben estar incluidas en el procedimiento. Una consecuencia de la evaluación de la tolerancia debe ser una serie de parámetros confiables (por ejemplo prueba de resolución) que se establecen para asegurar que la validez del método analítico se mantiene cuando se usa.

En caso de CLAR las variaciones típicas son:

- Diferentes columnas (diferentes lotes y/o proveedores).
- Temperatura.
- Velocidad de flujo.

## **Criterio:**

La diferencia del promedio del porcentaje cuantificado obtenido de las tres muestras analizadas con cada una de las condiciones, respecto al promedio del porcentaje cuantificado de las tres muestras analizadas con las condiciones originales no debe ser mayor al 2.0 %.

Los productos de degradación no deberán presentar respuesta en el área cromatográfica del Maleato de Trimebutina.

## ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

Se debe evaluar la estabilidad de la solución de la muestra después de su preparación de acuerdo al método probado ya que muchos laboratorios utilizan automuestreadores con corridas por toda la noche y la muestra podría estar en solución por horas en el laboratorio antes de que la prueba se complete.

Esto es importante para los fármacos que pueden experimentar degradación por hidrólisis, fotólisis o adhesión al vidrio.

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

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

La determinación debe ser efectuada por un mismo analista.

### **Criterio:**

La muestra es estable si el Intervalo de Confianza al 95 % para la diferencia de la media de las muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto no exceda los siguientes porcentajes:

<b>METODO</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>CROMATOGRAFICOS</b>	$\pm 2$
<b>TITRIMETRICOS</b>	$\pm 2$
<b>ESPECTROFOTOMETRICOS</b>	$\pm 3$
<b>MICROBIOLOGICOS</b>	$\pm 5$

## ADECUACION DEL SISTEMA.

Es una parte integral del método analítico. La prueba se basa en el concepto de que el equipo, la parte electrónica, las operaciones analíticas y las muestras por analizar constituyen un sistema integral que puede ser evaluado como tal. En la adecuación del sistema los parámetros que deben establecerse para un procedimiento particular dependen del tipo de método por validar.

La sensibilidad o precisión es medida por cinco inyecciones de una muestra homogénea (18) e indica el desempeño del instrumento CLAR bajo las condiciones cromatográficas y el día probado. La información es dada como parte de los datos de validación y como adecuación del sistema.

La especificación es: el coeficiente de variación debe ser  $\leq$  2.0 %.

Esto asume que el cromatógrafo no funcionará mal después de la prueba de adecuación del sistema.

Se debe tener en mente que la adecuación del sistema no considera las variaciones debidas a la manufactura del producto farmacéutico y la preparación de la muestra.

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL.

3.1. EQUIPOS, MATERIAL, REACTIVOS, SUSTANCIA DE REFERENCIA, MATERIA PRIMA Y FORMULACIONES.

EQUIPOS.

NOMBRE	MARCA	MODELOS
AUTOMUESTREADOR	WATERS	717 Y 717 Plus
BOMBA PARA HPLC	WATERS	515, 510 Y 60F
DETECTOR ARREGLO DIODOS	WATERS	996
DETECTOR DE ABSORBANCIA DUAL	WATERS	2487
DETECTOR DE ABSORBANCIA	WATERS	440 Y 486
INTEGRADOR	WATERS	745
SISTEMA CONTROLADOR	WATERS	600 Y 600E
PROGRAMA DE PROCESAMIENTO DE DATOS	MILLENIUM VERSION 2.15.01	-----
COLUMNA CROMATOGRÁFICA ULTRASPHERE ODS DE 4.6 mm D.I * 250 mm DE LONGITUD.	BECKMAN	-----
COLUMNA CROMATOGRÁFICA ULTRASPHERE ODS DE dp 5 µ de 4.6 mm D.I * 250 mm DE LONGITUD.	BECKMAN	-----
COLUMNA CROMATOGRÁFICA µBONDAPACK ODS DE dp 5 µ de 3.9 mm D.I * 300 mm	BECKMAN	-----
COLUMNA CROMATOGRÁFICA µBONDAPACK ODS DE dp 5 µ de 3.9 mm D.I * 150 mm	BECKMAN	-----
COLUMNA CROMATOGRÁFICA SPHERISORB ODS dp 5 µm de 4.6 *150 mm	BECKMAN	-----
COLUMNA CROMATOGRÁFICA SYMETRYSHIELD ODS dp 5 µm de 3.9 * 150 mm RP <sub>18</sub>	BECKMAN	-----
BALANZA ANALITICA.	METTLER.	AE260
HORNO DE VACÍO.	PRECISION	19
HORNO	FISHER SCIENTIFIC	838F
REFRIGERADOR	NIETO	REB300
PIPETA AUTOMÁTICA.	EPENDORF	-----
CÁMARA DE LUZ ULTRAVIOLETA.	-----	-----
TITULADOR AUTOMATICO.	METTLER.	-----
ELECTRODO DE VIDRIO COMBINADO.	BECKMAN	-----
ESPECTROFOTOMETRO.	HEWLETT PACKARD	8452A
BAÑO DE ULTRASONIDO	COLE-PALMER	8851

MATERIAL.

- Equipo de filtración Millipore.
- Membranas de filtración Millipore tipo HVLP de 0.45 µm de tamaño de poro.
- Micropipeta Eppendorf Repeater Pipette 4780.
- Matraces volumétricos de 1000 mL, 100 mL, 50 mL, 25 mL y 10 mL
- Vasos de 100 mL

REACTIVOS, SUSTANCIA DE REFERENCIA, MATERIA PRIMA.Y FORMULACIONES.

REACTIVO	GRADO	MARCA	LOTE
Acetonitrilo	HPLC	Caledon	28892
Acido Clorhídrico	RA	J.T.Baker	L08456
Hidróxido de sodio	RA	J.T.Baker	M29C65
Peróxido de Hidrógeno al 30 %	RA	Merck	K24864410820
Fosfato de potasio monobásico	RA	J.T.Baker	L03466
Acido Ortofosfórico	RA	Merck	K23841773715
Agua	HPLC	-----	-----
Acido Acetico Glacial	RA	J.T. BAKER	K01480
Acido Perclórico 0.1 N	SV	J.T. BAKER	M46C00
Bifalato de Potasio	RA	J.T. BAKER	D18084
Etanol	RA	J.T. BAKER	7019KTCV

- **SUSTANCIA DE REFERENCIA:** SUSTANCIA DE REFERENCIA SECUNDARIA DE MALEATO DE TRIMEBUTINA.
- **MATERIA PRIMA :** MALEATO DE TRIMEBUTINA LOTE: 62878 A-2-1
- **FORMULACIONES:**

FORMULACIÓN PLACEBO: VEHÍCULO DE SOLUCIÓN DE MALEATO DE TRIMEBUTINA. LOTE: D990088.

FORMULACIÓN: SOLUCIÓN INYECTABLE DE MALEATO DE TRIMEBUTINA.  
LOTE: 144

### 3.2. ESTABLECIMIENTO DE LA SUSTANCIA DE REFERENCIA SECUNDARIA DE MALEATO DE TRIMEBUTINA A PARTIR DE UNA MATERIA PRIMA.

#### 3.2.1. VALIDACION DEL METODO POTENCIOMETRICO PARA VALORAR MALEATO DE TRIMEBUTINA MATERIA PRIMA.

El método analítico potenciométrico para valorar Maleato de Trimebutina Materia Prima es un método no farmacopéico por lo que fué necesario validarlo, con el propósito de contar con una Sustancia de Referencia Secundaria plenamente identificada y de pureza conocida.

El fundamento del método potenciométrico se basa en una reacción de neutralización ácido-base en un medio no acuoso, empleando como disolvente ácido acético glacial y como solución valorante a la solución valorada (S.V.) de ácido perclórico 0.1 N.

La cuantificación se obtuvo por medio de la detección del punto de equivalencia potenciométricamente ocupando un titulador automático. Con los resultados obtenidos se calculó la primera y segunda derivada.

En las Figuras 8 y 9 se ejemplifican los métodos que se utilizaron para determinar el punto de equivalencia de las valoraciones potenciométricas.

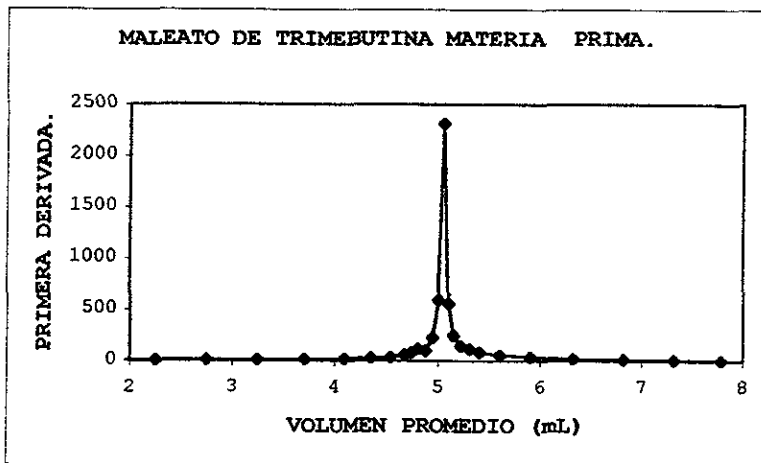


Figura 8. Curva de la Primera Derivada de una titulación potenciométrica de Maleato de Trimebutina valorada con S.V. de ácido perclórico 0.1 N.

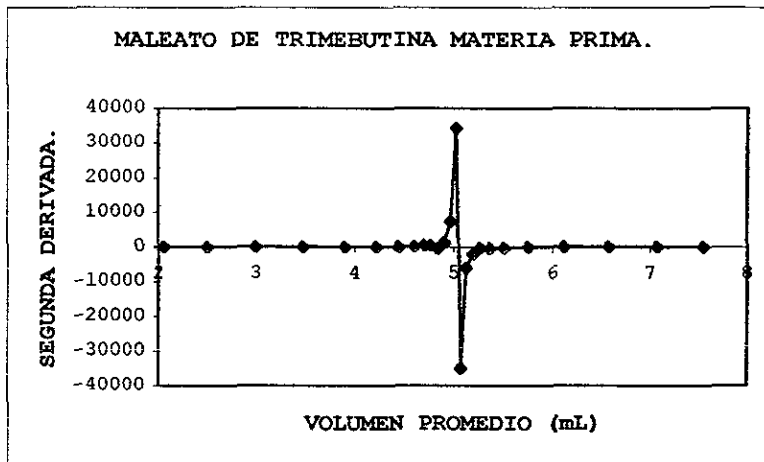


Figura 9. Curva de la Segunda Derivada de una titulación potenciométrica de Maleato de Trimebutina valorada con S.V. de ácido perclórico 0.1 N.

En la validación del método analítico se evaluó lo siguiente: linealidad, exactitud del método, repetibilidad, precisión intermedia, intervalo y estabilidad de la muestra.

#### 3.2.1.1. LINEALIDAD.

La linealidad se evaluó a través del análisis de muestras independientes de Maleato de Trimebutina Materia Prima a los niveles del 80 %, 90 %, 100 %, 110 % y 120 % de la cantidad teórica. En la técnica se manejó 0.25 g como el 100 % de Maleato de Trimebutina. Se evaluaron 3 réplicas para cada nivel.

Con los datos obtenidos se llevó a cabo un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, tomando como variable independiente (X) a los g adicionados y como variable dependiente (Y) a los g cuantificados y se calculó lo siguiente: ordenada al origen, pendiente, el coeficiente de correlación, el coeficiente de determinación y su respectiva gráfica.

Además se determinó número de datos, promedio, desviación estándar y el coeficiente de variación de todas las concentraciones probadas, así como al porcentaje cuantificado para el total de las muestras y para cada nivel; con estos resultados se determinó el



promedio, desviación estándar, coeficiente de variación e intervalo de confianza al 95 %.

#### 3.2.1.2. EXACTITUD DEL METODO.

Se prepararon 6 muestras de Materia Prima a una cantidad igual al 100 % de Maleato de Trimebutina (0.25 g), provenientes de pesadas independientes.

Se calculó el porcentaje cuantificado de las seis muestras analizadas, se obtuvo el número de datos, promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y el intervalo de confianza al 95% del porcentaje cuantificado.

Como el método potenciométrico es un método absoluto, es necesario realizar la comparación de este método con el método espectrofotométrico, el cual es un método no absoluto; esta comparación se realiza para asegurar que los g adicionados corresponde a los g cuantificados en el método potenciométrico, por lo que en la exactitud del método se hace la comparación de los dos métodos, quedando como un requisito para cumplir con la exactitud en ambos métodos.

#### 3.2.1.3. PRECISION.

##### 3.2.1.3.1. REPETIBILIDAD.

Se evaluó por medio del coeficiente de variación del porcentaje cuantificado de las muestras de exactitud .

##### 3.2.1.3.2. PRECISION INTERMEDIA.

Se evaluó a través del análisis por triplicado de una muestra homogénea de materia prima, por dos analistas en dos días diferentes. Con el porcentaje cuantificado de Maleato de Trimebutina en las muestras, se obtuvo el coeficiente de variación global y el intervalo de confianza al 95%, y se realizó un análisis de varianza utilizando un diseño anidado.

##### 3.2.1.4. INTERVALO.

El intervalo se evalúa con los resultados de exactitud, linealidad y precisión.

### 3.2.1.5. ROBUSTEZ.

#### 3.2.1.5.1. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

Se evaluó la estabilidad de las muestras a través del análisis de muestras independientes de Maleato de Trimebutina, las cuales se prepararon por triplicado y estas muestras se almacenaron en las siguientes condiciones:

- a) Ciclos normales de luz y oscuridad a temperatura ambiente
- b) Oscuridad a temperatura ambiente
- c) Refrigeración

Las muestras se analizaron a las 0, 24 y 48 horas de haber sido preparadas.

Se determinó el porcentaje cuantificado de Maleato de Trimebutina de las muestras almacenadas a las diferentes condiciones. Se obtuvo el promedio del porcentaje cuantificado de las tres muestras a tiempo cero y se comparó con el promedio del porcentaje cuantificado de las tres muestras almacenadas a las diferentes condiciones.

### 3.2.2. VALIDACION DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA VALORAR MALEATO DE TRIMEBUTINA MATERIA PRIMA.

El método analítico espectrofotométrico para valorar Maleato de Trimebutina Materia Prima es un método no farmacopéico por lo que fué necesario validarlo, con el propósito de contar con un patrón de referencia secundario plenamente identificado y de pureza conocida.

El método espectrofotométrico se basa en la cuantificación de la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 270 nm, empleando como disolvente etanol.

La cuantificación se realizó al comparar la absorbancia de las muestras a la longitud de onda antes mencionada, con la absorbancia de una sustancia de referencia secundaria a la misma concentración de las muestras.

En la validación del método analítico se evaluó lo siguiente: linealidad del sistema, precisión del sistema, exactitud del método, repetibilidad, precisión intermedia, intervalo y estabilidad de la muestra.

#### 3.2.2.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

La linealidad se evaluó al determinar la relación que existe entre la concentración y la respuesta en una curva constituida por cinco niveles de concentración, con tres replicas para cada nivel, provenientes de pesadas independientes en el intervalo de 16.0 µg/mL a 24.0 µg/mL de Maleato de Trimebutina.

Con los datos obtenidos se llevó a cabo un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, tomando como variable independiente (X) a la concentración y como variable dependiente (Y) a la absorbancia y se calculó: la ordenada al origen, la pendiente, el coeficiente de correlación, el coeficiente de determinación y su respectiva gráfica.

Se obtuvo el número de datos, el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación del factor respuesta (respuesta/concentración) de todas las concentraciones probadas.

Con los datos obtenidos se realizó otro análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, tomando como variable independiente (X) a los mg adicionados y como variable dependiente (Y) a los mg cuantificados, y se calculó: la ordenada al origen, la pendiente, el coeficiente de correlación, el coeficiente de determinación y su respectiva gráfica.

Además se determinó número de datos, promedio, desviación estándar y el coeficiente de variación de todas las concentraciones probadas. Se calculó el porcentaje cuantificado para el total de las muestras y para cada nivel y se determinó el promedio, desviación estándar, coeficiente de variación e intervalo de confianza al 95 %.

El segundo análisis de regresión lineal tomando como variable independiente (X) a los mg adicionados y como variable dependiente (Y) a los mg cuantificados se realizó con el propósito de evaluar la linealidad del método y demostrar que la cuantificación se puede realizar de manera puntual y que no es necesario realizarla por medio de una curva de calibración.

#### **3.2.2.2. PRECISION DEL SISTEMA.**

La precisión del sistema se evaluó al leer seis veces una solución de Maleato de Trimebutina al 100 % de la concentración teórica (20.0 µg/mL).

Con las absorbancia de las 6 lecturas de la solución, se obtuvo el número de datos, promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

#### **3.2.2.3. EXACTITUD DEL METODO.**

Se prepararon 6 muestras de Materia Prima a una concentración igual al 100 % de Maleato de Trimebutina (20.0 µg/mL), provenientes de pesadas independientes.

Se calculó el porcentaje cuantificado de las seis muestras analizadas, se obtuvo el número de datos, promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y el intervalo de confianza al 95% del porcentaje cuantificado.

Por otra parte se comparó el porcentaje cuantificado por el método espectrofotométrico con el porcentaje cuantificado por el método potenciométrico.

#### **3.2.2.4. PRECISION.**

##### **3.2.2.4.1. REPETIBILIDAD.**

Se evaluó por medio del coeficiente de variación del porcentaje cuantificado de las muestras de exactitud.

#### 3.2.2.4.2. PRECISION INTERMEDIA.

Se evaluó a través del análisis por triplicado de una muestra homogénea de la materia prima, por dos analistas en dos días diferentes. Con el porcentaje cuantificado de Maleato de Trimebutina en las muestras, se obtuvo el coeficiente de variación global y el intervalo de confianza al 95%.

#### 3.2.2.5. INTERVALO.

El intervalo se evalúa con los resultados de exactitud, linealidad y precisión.

#### 3.2.2.6. ROBUSTEZ.

##### 3.2.2.6.1. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

Se determinó analizando tres muestras a la misma concentración inmediatamente después de su preparación y volviéndolas a analizar a las 24 y 48 horas almacenadas en las siguientes condiciones :

- a) Ciclos normales de luz y oscuridad a temperatura ambiente
- b) Oscuridad a temperatura ambiente
- c) Refrigeración

Las muestras se analizaron utilizando una Solución de Referencia recién preparada en cada tiempo de análisis.

Se determinó el porcentaje cuantificado de Maleato de Trimebutina de las muestras almacenadas a las diferentes condiciones. Se obtuvo el promedio del porcentaje cuantificado de las tres muestras a tiempo cero y se comparó con el promedio del porcentaje cuantificado de las tres muestras almacenadas a las diferentes condiciones.

### 3.3. DESARROLLO DEL METODO POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

Se desarrolló un método analítico con el cual se pudiese analizar al Maleato de Trimebutina en solución inyectable como producto en proceso, producto terminado y durante estudios de estabilidad.

Se decidió desarrollar un método por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución ya que presenta la ventaja de que se trata de un método sensible, así como al contar con un detector de arreglo de fotodiodos, es posible determinar si el método es selectivo para el compuesto de interés en presencia de los excipientes y de los productos de degradación, con certeza y rapidez.

Se decidió utilizar la cromatografía en fase reversa ya que presenta las siguientes ventajas: el componente predominante de la fase móvil es agua, el modificador orgánico de la fase móvil es el metanol, el orden de elución es predecible (en función de la hidrofobicidad del compuesto de interés). Se necesita poco tiempo para el equilibrio del sistema luego de un cambio de fase móvil.

Al inició del desarrollo se probó un sistema cromatográfico reportado previamente (33):

FASE MÓVIL: Solución reguladora de fosfatos 0.025 M: metanol  
(16:84) pH= 7.0

COLUMNA:  $\mu$ Bondapack C<sub>18</sub> de 3.9 \* 300 mm

DETECTOR:UV.

LONGITUD DE ONDA: 254 nm.

FLUJO: 1.5 mL/min.

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20  $\mu$ L

El cromatograma obtenido se muestra en la Figura 10.

Con el propósito de mejorar la eficiencia es decir obtener picos más angostos y un mejor tiempo de retención del compuesto de interés, con las condiciones cromatográficas antes mencionadas se probaron diferentes columnas, con las siguientes condiciones cromatográficas:

FASE MÓVIL: Solución reguladora de fosfatos 0.025 M : metanol  
(16:84) pH= 7.0

DETECTOR:UV.

LONGITUD DE ONDA: 254 nm.

FLUJO: 1.5 mL/min.

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20  $\mu$ L

Las columnas probadas fueron:

-Columna ULTRASPHERE dp 5  $\mu\text{m}$  de 4.6 mm \* 250 mm  $\text{C}_{18}$ . (Figura 11)

-Columna  $\mu\text{BONDAPACK}$   $\text{C}_{18}$  dp 10  $\mu\text{m}$  de 3.9 \* 300 mm  $\text{C}_{18}$ .  
(Figura 12)

-Columna  $\mu\text{BONDAPACK}$   $\text{C}_{18}$  dp 10  $\mu\text{m}$  de 3.9 \* 150 mm  $\text{C}_{18}$ .  
(Figura 13)

-Columna SPHERISORB dp 5  $\mu\text{m}$  de 4.6 \* 150 mm  $\text{C}_{18}$  (Figura 14)

-Columna SYMETRYSHIELD dp 5  $\mu\text{m}$  3.9 \* 150 mm  $\text{RP}_{18}$  (Figura 15)

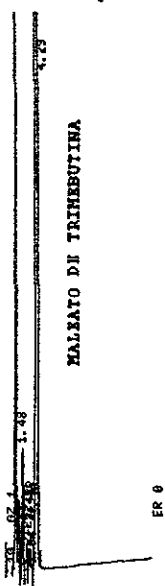


Figura 10. Cromatograma de Maleato de Trimebutina obtenido con las siguientes condiciones cromatográficas:

FASE MÓVIL: Solución reguladora de fosfatos 0.025 M: metanol (16:84)  
pH= 7.0

COLUMNA:  $\mu$ Bondapack C<sub>18</sub> dp 10  $\mu$ m de 3.9 \* 300 mm

DETECTOR:UV.

LONGITUD DE ONDA: 254 nm.

FLUJO: 1.5 mL/min.

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20  $\mu$ L

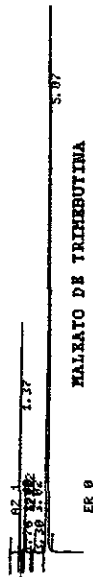


Figura 11. Cromatograma de Maleato de Trimebutina obtenido con las siguientes condiciones cromatográficas:

FASE MÓVIL: Solución reguladora de fosfatos 0.025 M: metanol (16:84)  
pH= 7.0

COLUMNA: Columna ULTRASPHERE dp 5  $\mu$ m de 4.6 mm \* 250 mm C<sub>18</sub>

DETECTOR:UV.

LONGITUD DE ONDA: 254 nm.

FLUJO: 1.5 mL/min.

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20  $\mu$ L



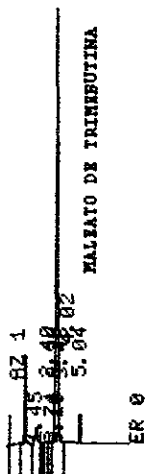


Figura 12. Cromatograma de Maleato de Trimebutina obtenido con las siguientes condiciones cromatográficas:

FASE MÓVIL: Solución reguladora de fosfatos 0.025 M: metanol (16:84)  
pH= 7.0

COLUMNA:  $\mu$ Bondapack C<sub>18</sub> dp 10  $\mu$ m de 3.9 \* 300 mm

DETECTOR:UV.

LONGITUD DE ONDA: 254 nm.

FLUJO: 1.5 mL/min.

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20  $\mu$ L

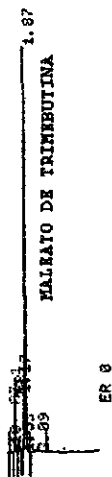


Figura 13. Cromatograma de Maleato de Trimebutina obtenido con las siguientes condiciones cromatográficas:

FASE MÓVIL: Solución reguladora de fosfatos 0.025 M: metanol (16:84)  
pH= 7.0

COLUMNA:  $\mu$ Bondapack C<sub>18</sub> dp 10  $\mu$ m de 3.9 \* 150 mm

DETECTOR:UV.

LONGITUD DE ONDA: 254 nm.

FLUJO: 1.5 mL/min.

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20  $\mu$ L

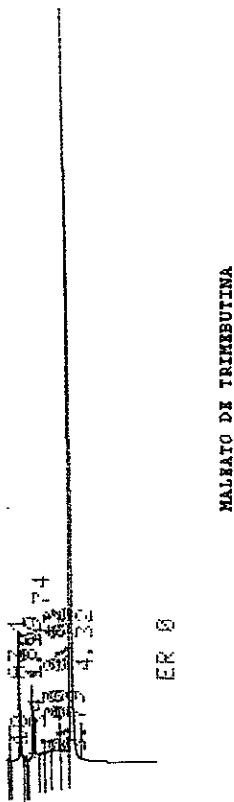


Figura 14. Cromatograma de Maleato de Trimebutina obtenido con las siguientes condiciones cromatográficas:

FASE MÓVIL: Solución reguladora de fosfatos 0.025 M: metanol (16:84)\*

pH= 7.0

COLUMNA: SPHERISORB dp 5 µm de 4.6 \*150 mm C<sub>18</sub>

DETECTOR:UV.

LONGITUD DE ONDA: 254 nm.

FLUJO: 1.5 mL/min.

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL

\* preparación reciente.

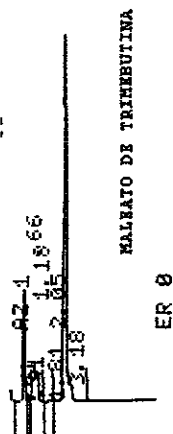


Figura 15. Cromatograma de Maleato de Trimebutina obtenido con las siguientes condiciones cromatográficas:

FASE MÓVIL: Solución reguladora de fosfatos 0.025 M: metanol (16:84)

pH= 7.0

COLUMNA: SYMETRYSHIELD dp 5 µm de 3.9 \* 150 mm RP<sub>18</sub>

DETECTOR: UV.

LONGITUD DE ONDA: 254 nm.

FLUJO: 1.5 mL/min.

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL

Al comparar los resultados obtenidos con cada columna se observa que las columnas de menor longitud presentan un tiempo de retención pequeño para el compuesto de interés dado que su eficiencia es menor.

Con la columna  $\mu$ BONDAPACK C<sub>18</sub> DE 3.9 \* 150 mm, por ejemplo se observa un tiempo de retención muy corto y se explica por el hecho de su longitud; esta columna también presenta un tamaño de partícula de 10  $\mu$ m y son partículas irregulares, de tal manera que no se tiene una buena eficiencia para el compuesto de interés (Figura 13).

Algo semejante se puede apreciar con las siguientes columnas:  $\mu$ BONDAPACK C<sub>18</sub> DE 3.9 \* 300 mm (Figura 12), SPHERISORB dp 5  $\mu$ m de 4.6 \* 150 mm C<sub>18</sub> (Figura 14), SYMETRYSHIELD dp 5  $\mu$ m 3.9 \* 150 mm RP<sub>18</sub> (Figura 15), en donde se observa que cuando se trabaja con una columna con partículas regulares y cuando se tiene una longitud mayor en la columna, los tiempos de retención para el compuesto de interés se mejoran, ya que la eficiencia de la columna es mayor.

Se concluyó que la columna ULTRASPHERE dp 5  $\mu$ m de 4.6 mm \* 250 mm, cuyos resultados se ilustran en la Figura 11, presenta ventajas en la separación con respecto a las otras columnas probadas, ya que tiene un tamaño de partícula pequeño (5  $\mu$ m), las partículas son de forma regular por lo que la eficiencia que se obtiene es mayor.

Una vez que se seleccionó el sistema cromatográfico, se probaron diferentes sustancias con el propósito de encontrar un estándar interno, el cual se buscó en función de los siguientes criterios: 1) Sustancias similares en estructura al compuesto de interés, 2) Sustancias que presenten un comportamiento cromatográfico similar al del Maleato de Trimebutina.

Se probaron diferentes compuestos para ser utilizados como estándar interno, dentro de los cuales se eligió al Clorhidrato de Ciproheptadina cuya estructura se muestra en la Figura 16, que con el sistema cromatográfico probado presenta un tiempo de retención de aproximadamente de 10 minutos (Figura 17), presentándose una buena resolución con el compuesto de interés, y que absorbe significativamente a 254 nm.

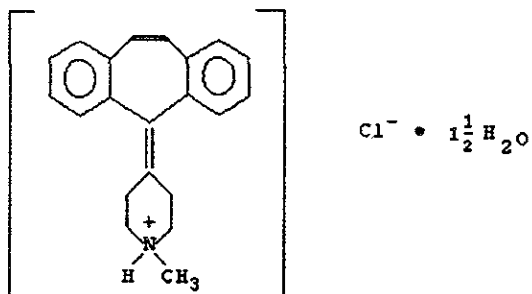


Figura 16. Estructura de Clorhidrato de Ciproheptadina.

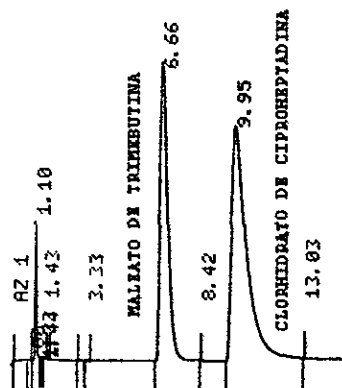


Figura 17. Cromatograma de Maleato de Trimebutina y de Clorhidrato de Ciproheptadina probado como estándar interno, obtenido con las siguientes condiciones cromatográficas:

FASE MÓVIL: Solución reguladora de fosfatos 0.025 M: metanol (16:84)

pH= 7.0

COLUMNA: Columna ULTRASPHERE dp 5  $\mu\text{m}$  de 4.6 mm \* 250 mm  $\text{C}_{18}$

DETECTOR:UV.

LONGITUD DE ONDA: 254 nm.

FLUJO: 1.5 mL/min.

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20  $\mu\text{L}$

Se decidió que el Clorhidrato de Ciproheptadina sería una buena elección, dado que éste presenta un tiempo de retención mayor que el del compuesto de interés, además se esperaba que los productos de degradación de Maleato de Trimebutina presentaran tiempos de retención menores a éste ya que se esperaba que estos fueran más polares que el Maleato de Trimebutina, lo cual aseguraría de alguna manera que el estándar interno no interferiría con los productos de degradación.

Dado que el pico de Clorhidrato de Ciproheptadina obtenido no era muy simétrico, se probaron diferentes sistemas cromatográficos variando la composición de la fase móvil, así como la velocidad de flujo con el propósito de reducir el ensanchamiento.

Por otra parte la muestra de Maleato de Trimebutina se disolvía y aforaba con una mezcla de metanol acidulado (0.1 N con HCl) con agua 50:50, sin embargo para simplificar el procesamiento de la muestra se probó disolver la muestra solamente en metanol y se observaron cambios en el tiempo de retención del compuesto de interés, por el efecto del disolvente. Se decidió disolver y aforar la muestra en la fase móvil.

Además con el propósito de reducir el ensanchamiento en el pico del Clorhidrato de Ciproheptadina se decidió cambiar el pH de la fase móvil, debido a que se trabaja con una separación en fase reversa, los grupos silanoles de la columna que no llegaron a silanizarse dan lugar a mecanismos mixtos de retención por lo que para favorecer un mecanismo de partición en la separación se decidió trabajar a pH de 3.0.

De esta forma se llegó a las siguientes condiciones cromatográficas:

FASE MÓVIL: Solución reguladora de fosfatos 0.025 M : metanol (68:32) pH=3.0

COLUMNA: ULTRASPHERE dp 5  $\mu$ m DE 4.6 mm \* 250 mm C<sub>18</sub>.

DETECTOR:UV.

LONGITUD DE ONDA: 254 nm.

FLUJO: 1.5 mL/min.

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20  $\mu$ L

En la Figura 18 se presenta el cromatograma con las condiciones ya descritas.

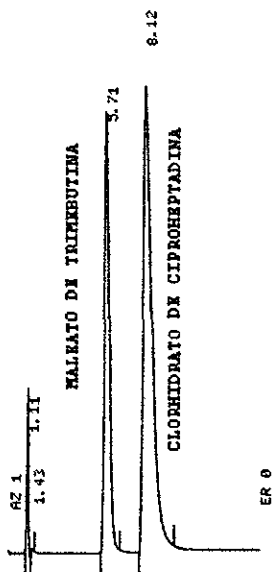


Figura 18. Cromatograma de Maleato de Trimebutina y Clorhidrato de Ciproheptadina (estándar interno) con las modificaciones de pH de la fase móvil con las siguientes condiciones cromatográficas:

FASE MÓVIL: Solución reguladora de fosfatos 0.025 M : metanol (68:32) pH=3.0

COLUMNA: ULTRASPHERE dp 5  $\mu$ m DE 4.6 mm \* 250 mm C<sub>18</sub>.

DETECTOR:UV.

LONGITUD DE ONDA: 254 nm.

FLUJO: 1.5 mL/min.

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20  $\mu$ L

Con el propósito de mejorar las condiciones cromatográficas, disminuyendo el tiempo de retención del Maleato de Trimebutina así como ver si era posible reducir el ensanchamiento del Maleato de trimebutina se probaron las siguientes condiciones:

FASE MÓVIL: Solución reguladora de fosfatos 0.025 M : metanol (45:55) pH=3.0

COLUMNA: ULTRASPHERE dp 5  $\mu$ m DE 4.6 mm \* 250 mm C<sub>18</sub>.

DETECTOR:UV.

LONGITUD DE ONDA: 254 nm.

FLUJO: 1.5 mL/min.

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20  $\mu$ L

Con las condiciones anteriores se mejoró la forma de los picos de los compuestos de interés. En la Figura 19 se presenta el cromatograma con las condiciones antes descritas.

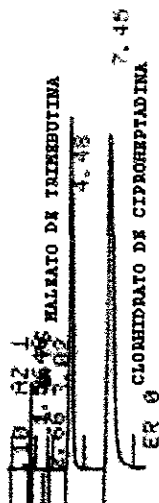


Figura 19. Cromatograma de Maleato de Trimebutina con Clorhidrato de Ciproheptadina (estándar interno) con las siguientes condiciones cromatográficas:

FASE MÓVIL: Solución reguladora de fosfatos 0.025 M : metanol (45:55)

pH=3.0

COLUMNA: ULTRASPHERE dp 5  $\mu$ m DE 4.6 mm \* 250 mm C<sub>18</sub>.

DETECTOR:UV.

LONGITUD DE ONDA: 254 nm.

FLUJO: 1.5 mL/min.

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20  $\mu$ L

Con estas condiciones cromatográficas se retó la especificidad sometiendo al Maleato de Trimebutina a las condiciones de degradación que se establecen en la Tabla 6, sin embargo se observó que las muestras bajo condiciones básicas no se resolvían del producto de degradación (Figura 20).

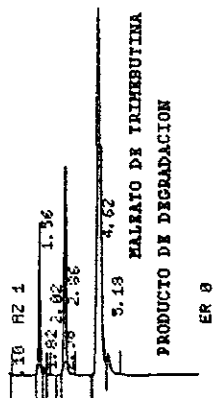


Figura 20. Cromatograma de Maleato de Trimebutina degradado en condiciones básicas, con las siguientes condiciones cromatográficas:  
 FASE MÓVIL: Solución reguladora de fosfatos 0.025 M : metanol (45:55)  
 pH=3.0  
 COLUMNA: ULTRASPHERE dp 5  $\mu$ m DE 4.6 mm \* 250 mm C<sub>18</sub>.  
 DETECTOR:UV.  
 LONGITUD DE ONDA: 254 nm.  
 FLUJO: 1.5 mL/min.  
 VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20  $\mu$ L

Se observó que con las condiciones de degradación probadas las muestras no se degradaron en el porcentaje esperado, el cual debe estar entre el 10-30 %, por lo que se siguió buscando las condiciones de degradación apropiadas.

Tabla 6. Condiciones de Degradación para Maleato de Trimebutina.

CONDICION DE DEGRADACION	PREPARACION DE LA MUESTRA.
BASICA.	500 $\mu$ L de NaOH 0.2 N, a 80 °C durante 30 minutos.
ACIDA.	3.0 $\mu$ L de HCl 2 N, a 80 °C durante 5 horas.
OXIDACION CON PEROXIDO.	500 $\mu$ L de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30 % v/v, a 80 °C durante 2 horas.
LUZ U.V.	Luz Ultravioleta (4 días).



Se realizaron cambios a la composición de la fase móvil con el propósito de mejorar la resolución del compuesto de interés con sus productos de degradación.

Se cambio el metanol por acetonitrilo ya que este nos proporciona otra selectividad y por otra parte se aumento el flujo con el propósito de disminuir el tiempo de corrida de las muestras.

Finalmente se llegó a las siguientes condiciones cromatográficas:

FASE MÓVIL: Solución reguladora de fosfatos 0.025 M : Acetonitrilo (68:32) pH=3.0.

COLUMNA: ULTRASPHERE dp 5  $\mu$ m DE 4.6 mm \* 250 mm C<sub>18</sub>.

DETECTOR:UV.

LONGITUD DE ONDA: 254 nm.

FLUJO: 2.0 mL/min.

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20  $\mu$ L

El cromatograma de Maleato de Trimebutina y de Clorhidrato de Ciproheptadina con las condiciones cromatográficas mencionadas se muestra en la Figura 21.

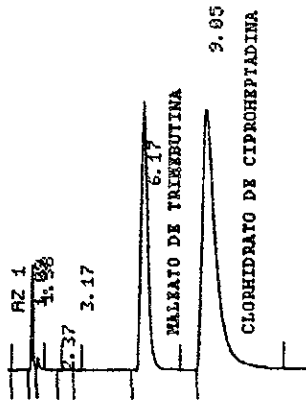


Figura 21. Maleato de Trimebutina y Clorhidrato de Ciproheptadina con las siguientes condiciones cromatográficas:

FASE MÓVIL: Solución reguladora de fosfatos 0.025 M : Acetonitrilo (68:32) pH=3.0

COLUMNA: ULTRASPHERE dp 5  $\mu$ m DE 4.6 mm \* 250 mm C<sub>18</sub>.

DETECTOR:UV.

LONGITUD DE ONDA: 254 nm.

FLUJO: 2.0 mL/min.

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20  $\mu$ L

Una vez que se encontró el sistema cromatográfico adecuado, se procedió a degradar al principio activo, el placebo y el placebo adionado.

Las muestras del principio activo y los placebos adionados sometidas a las condiciones de degradación se diluyeron para llegar a una concentración final de 0.2 mg/mL de Maleato de Trimebutina.

En la Tabla 7 se muestran las condiciones y los tiempos a los cuales se sometieron a degradación las diferentes muestras. Se modificaron las condiciones de degradación propuestas inicialmente ya que no se obtenía el porcentaje degradado del 10-30%.

Tabla 7. Condiciones de Degradación para Maleato de Trimebutina.

CONDICION DE DEGRADACION	PREPARACION DE LA MUESTRA.
BASICA.	500 µL de NaOH 0.2 N, a 37 °C durante 1 hora 45 minutos.
ACIDA.	1.0 mL de HCl Conc. , a 80 °C durante 14 horas.
OXIDACION CON PEROXIDO.	500 µL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30 % v/v, a 80 °C durante 2 horas.
LUZ U.V.	Luz Ultravioleta (10 días).

Con las muestras degradadas con las condiciones de la Tabla 7, se retó la especificidad del método comprobándose que el método es específico como se muestra en la Figura 22, en donde se muestra el cromatograma de Maleato de Trimebutina degradada en condiciones básicas.

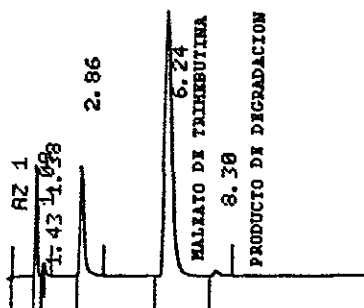


Figura 22. Cromatograma de Maleato de Trimebutina degradada bajo condiciones básicas con las siguientes condiciones cromatográficas:

FASE MÓVIL: Solución reguladora de fosfatos 0.025 M :

Acetonitrilo (68:32)pH=3.0

COLUMNA: ULTRASPHERE dp 5 µm DE 4.6 mm \* 250 mm C<sub>18</sub>.

DETECTOR:UV.

LONGITUD DE ONDA: 254 nm.

FLUJO: 2.0 mL/min.

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL

Con estas condiciones, el sistema cromatográfico es específico a los productos de degradación de Maleato de Trimebutina.

Sólo se ilustra el cromatograma en las condiciones básicas dado que en esta condición fue donde el producto de degradación presentaba problemas de resolución con el compuesto de interés.

Por otra parte se probó el método analítico con la formulación de la solución inyectable y se encontró que era específico para el Maleato de Trimebutina en presencia de los excipientes, como se muestra en la Figura 23.

En la Figura 24 se ilustra el cromatograma del placebo no adicionado con el propósito de comprobar que no existe ninguna señal debajo de la señal de interés.

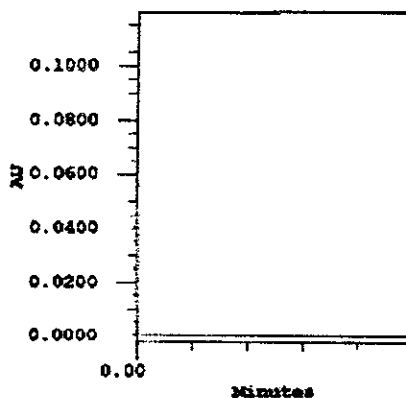
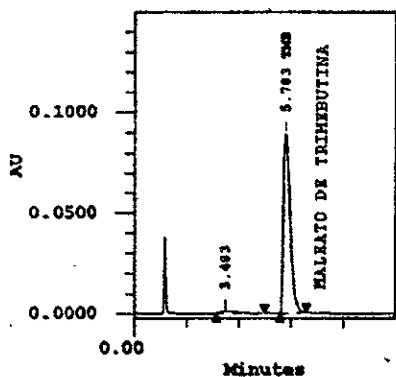


Figura 23. Cromatograma de Maleato de Trimebutina solución Inyectable con las siguientes condiciones cromatográficas:

FASE MÓVIL: Solución reguladora de fosfatos 0.025 M ;  
Acetonitrilo (68:32) pH=3.0  
COLUMNA: ULTRASPHERE dp 5  $\mu$ m DE 4.6 mm \* 250 mm C<sub>18</sub>.  
DETECTOR:UV.  
LONGITUD DE ONDA: 254 nm.  
FLUJO: 2.0 mL/min.  
VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20  $\mu$ L

Figura 24. Cromatograma de Placebo no adicionado con las siguientes condiciones cromatográficas:

FASE MÓVIL: Solución reguladora de fosfatos 0.025 M ;  
Acetonitrilo (68:32) pH=3.0  
COLUMNA: ULTRASPHERE dp 5  $\mu$ m DE 4.6 mm \* 250 mm C<sub>18</sub>.  
DETECTOR:UV.  
LONGITUD DE ONDA: 254 nm.  
FLUJO: 2.0 mL/min.  
VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20  $\mu$ L

En las condiciones cromatográficas propuestas el tiempo de retención del Clorhidrato de Ciproheptadina variaba; se pensó que una solución para controlar el tiempo de retención sería controlar la temperatura, lo cual complicaba el sistema cromatográfico propuesto. Por otra parte, el ensanchamiento que presentaba el pico de Clorhidrato de Ciproheptadina no se pudo arreglar con las modificaciones que se hicieron a la fase móvil.

Para corregir el ensanchamiento del pico del Clorhidrato de Ciproheptadina era necesario hacer mas complicado el sistema cromatográfico o cambiar el tipo de cromatografía empleada.

Debido a que el procesamiento de las muestras es muy sencillo, ya que las muestras se disuelven en la fase móvil, y se utiliza un inyector automático, se tomó la decisión de mantener este sistema cromatográfico lo más sencillo posible por lo cual se decidió realizar la cuantificación con el uso de un estándar externo.

Finalmente el método analítico quedó de la siguiente manera:

Velocidad de flujo:	2 mL/min.
Velocidad de carta:	Ajustada para dar tamaño de pico adecuado
Volumen de Inyección:	20 µL
Detección:	UV a 254 nm
Tiempo de respuesta del detector:	0.5 seg.
Atenuación del integrador:	Ajustada para dar tamaño de pico que abarque del 50 al 80 % de la carta.
Modo de Integración:	Areas.
Respuesta:	Area de Maleato de Trimebutina.
Columna:	Ultrasphere ODS de 25 cm de longitud x 4.6 mm de diámetro interno rellena de partículas de 5 µm
Fase móvil:	Solución reguladora de fosfatos 0.025 M :Acetonitrilo (68:32) pH= 3.0

La preparación de la muestra y de la sustancia de referencia es la siguiente:

PREPARACION DE LA SOLUCION DE REFERENCIA.

Transferir 25 mg de Maleato de Trimebutina Sustancia de Referencia, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 25 mL, disolver y llevar a volumen con fase móvil y mezclar.

Transferir 2.0 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar a volumen con fase móvil. Concentración aproximada de 0.2 mg/mL de Maleato de Trimebutina.

PREPARACION DE LA MUESTRA.

El marbete de la solución inyectable del Maleato de Trimebutina es de 10 mg/mL.

Mezclar el contenido de 10 ampolletas de la solución inyectable o tomar el volumen equivalente de solución a granel y agitar. Transferir una alícuota de 5.0 mL a un un matraz de 25 mL, disolver y llevar a volumen con la fase móvil. Mezclar.

Transferir 1.0 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar a volumen con fase móvil.

### 3.4. VALIDACION DEL METODO POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION PARA MALEATO DE TRIMEBUTINA EN SOLUCION INYECTABLE.

Una vez que se desarrolló el método cromatográfico para valorar al Maleato de Trimebutina en solución inyectable se realizó la validación del método probándose lo siguiente:

#### 3.4.1. ESPECIFICIDAD.

La especificidad fue evaluada al demostrar que no había interferencia de los componentes de la formulación y los productos de degradación, en la cuantificación del Maleato de Trimebutina.

Además se probó para el caso del placebo degradado y sin degradar, que no hubiera interferencia en el tiempo de retención del compuesto de interés.

Se analizaron en el sistema cromatográfico muestras por duplicado de materia prima de Maleato de Trimebutina, formulación (placebos adicionados) y placebo, sometidas a condiciones de degradación ácidas, básicas, oxidación y luz ultravioleta (como se indica en la Tabla 7), así como también muestras placebo y formulación sin degradar. Para el caso de materia prima y formulación, se registraron las señales producidas a una longitud de onda de 254 nm y se determinó el porcentaje degradado.

Las muestras se analizaron utilizando un detector de arreglo de fotodiodos, haciéndose un análisis espectral de los compuestos de 200 a 300 nm, de tal manera que se pudiera analizar el pico del compuesto de interés y de los productos de degradación en tres dimensiones: Absorbancia, tiempo y longitud de onda, con esto se podrá asegurar que detrás del pico de interés no se encuentra oculto algún producto de degradación, lo cual no sería posible llevar a cabo en condiciones normales de detección a una sola longitud de onda, ya que su absorbancia a la longitud de onda de trabajo sería aditiva al compuesto que se cuantifica, lo cual invalidaría la especificidad del método.

Por otra parte se realizó un análisis espectral el cual consiste en tomar partes del pico de interés en el intervalo de tiempo en el cual el pico comienza y termina de eluir, hacia el eje de las longitudes de onda, de tal manera que se toman secciones del pico donde cada una presenta un espectro UV en el intervalo de longitudes de onda al cual se hizo el barrido; si el pico es de un compuesto puro la superposición de cada uno de los espectros es completa. Además se comparó el espectro del pico de interés contra el espectro de la sustancia de referencia con el propósito de definir la identidad del pico, en una prueba llamada comparación de

pureza la cual compara los espectros obtenidos en el máximo de absorción del pico de un compuesto desconocido, con el espectro del estándar analizado a las mismas condiciones para identificar el compuesto.

Para el caso del placebo degradado y sin degradar, se verificó que no hubiera interferencias al tiempo de retención del compuesto de interés.

#### 3.4.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Se evaluó la linealidad al determinar la relación que existe entre la respuesta y la concentración en una curva constituida por cinco niveles de concentración, con tres replicas para cada nivel, provenientes de pesadas independientes en el intervalo de 100 µg/mL a 300 µg/mL de Maleato de Trimebutina.

Con los datos obtenidos se llevó a cabo un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, tomando como variable independiente (X) a la concentración y como variable dependiente (Y) a la respuesta y se calculó lo siguiente: ordenada al origen, pendiente, el coeficiente de determinación, y su respectiva gráfica.

Además se determinó número de datos, promedio, desviación estándar y el coeficiente de variación del factor respuesta (respuesta/concentración) de todas las concentraciones probadas.

#### 3.4.3. PRECISION DEL SISTEMA.

La precisión del sistema se evaluó al inyectar cinco veces una solución de Maleato de Trimebutina al 100 % de la concentración teórica.

Con las respuestas de las 5 inyecciones de la solución, se obtuvo el número de datos, promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

#### 3.4.4. LINEALIDAD DEL METODO.

La linealidad del método se determinó a través del análisis de muestras independientes de placebo adicionado a los niveles del 50, 100 y 150 % de Maleato de Trimebutina de la concentración teórica en el producto y con los datos obtenidos se evaluó lo siguiente: con los datos de mg adicionados (X) y mg cuantificados (Y) se realizó un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, se obtuvo la pendiente, la ordenada al origen, el coeficiente de determinación y su respectiva gráfica.



Además se calculó el porcentaje cuantificado para el total de las muestras y para cada nivel, se le determinó el promedio, desviación estándar, coeficiente de variación (C.V.) e intervalo de confianza al 95 %.

#### **3.4.5. EXACTITUD DEL METODO.**

Se prepararon 6 muestras de placebos adicionados a una concentración igual al 100 % de la concentración teórica en el producto, provenientes de pesadas independientes.

Se calculó el porcentaje cuantificado y el intervalo de confianza al 95% del porcentaje cuantificado.

#### **3.4.6. PRECISION.**

##### **3.4.6.1. REPETIBILIDAD.**

Se evaluó por medio del coeficiente de variación del porcentaje cuantificado de las muestras de exactitud.

##### **3.4.6.2. PRECISION INTERMEDIA.**

Se evaluó a través del análisis por triplicado de una muestra homogénea del producto, por dos analistas en dos días diferentes. Con el porcentaje cuantificado de Maleato de Trimebutina en las muestras, se obtuvo el coeficiente de variación global y el intervalo de confianza al 95%, y se realizó un análisis de varianza utilizando un diseño anidado.

#### **3.4.7. INTERVALO.**

El intervalo se evalúa con los resultados de exactitud, linealidad y precisión.

#### **3.4.8. ROBUSTEZ.**

##### **3.4.8.1. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.**

Las muestras procesadas en la precisión intermedia del analista 1, del día 1, se almacenaron en las siguientes condiciones:

- a) Ciclos normales de luz y oscuridad a temperatura ambiente
- b) Oscuridad a temperatura ambiente
- c) Refrigeración

Las muestras se analizaron a las 0, 24, 48 y 72 horas después de haber sido preparadas, utilizando una Solución de Referencia recién preparada en cada tiempo de análisis.

Se determinó el porcentaje cuantificado de Maleato de Trimebutina de las muestras almacenadas a las diferentes condiciones. Se obtuvo el promedio del porcentaje cuantificado de las tres muestras a tiempo cero y se comparó con el promedio del porcentaje cuantificado de las tres muestras almacenadas a las diferentes condiciones.

### 3.4.8.2. TOLERANCIA DEL SISTEMA.

Se prepararon tres réplicas de una muestra de solución inyectable de Maleato de Trimebutina y muestras degradadas de placebo adicionado sometidas a degradación con ácido clorhídrico e hidróxido de sodio, y se analizaron bajo las condiciones establecidas en la Tabla 8.

Se realizaron pequeñas modificaciones en las fases móviles, para determinar que tanto podría afectar pequeñas variaciones en su preparación, debidas al error normal del analista en los resultados de la cuantificación de las muestras, así como también para probar que el cambio en el lote de la columna cromatográfica no afecta los resultados de la cuantificación de las muestras.

Tabla 8. Condiciones para la Evaluación de la Tolerancia.

FASE MOVIL	pH	No. DE CONDICION
Solución Reguladora de Fosfatos: Acetonitrilo 68:32	3.0	1*
Solución Reguladora de Fosfatos: Acetonitrilo 65:35	3.0	2
Solución Reguladora de Fosfatos: Acetonitrilo 70:30	3.0	3
Solución Reguladora de Fosfatos: Acetonitrilo 68:32	2.5	4
Solución Reguladora de Fosfatos: Acetonitrilo 68:32	3.5	5
Solución Reguladora de Fosfatos: Acetonitrilo 68:32	3.0	6**

\* Condiciones originales.

\*\* Para esta condición se cambió la columna empleándose una columna de las mismas características de la columna original pero de otro lote.

Se obtuvo el promedio del porcentaje cuantificado de las tres muestras en cada condición y se comparó con el promedio de las mismas muestras analizadas en las condiciones originales.

Por otro lado, con las muestras sometidas a degradación, se verificó que no presentan señales que interfieran con el tiempo de retención del compuesto de interés, por lo que la detección se realizó en un equipo con detector de arreglo de fotodiodos; las muestras se leyeron en un rango de 200 a 300 nm, y se verificó que se cumpliera con la adecuación del sistema.

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1. VALIDACION DEL METODO POTENCIOMETRICO PARA VALORAR  
MALEATO DE TRIMEBUTINA MATERIA PRIMA.

4.1.1. LINEALIDAD DEL METODO POTENCIOMETRICO PARA  
VALORAR MALEATO DE TRIMEBUTINA MATERIA PRIMA.

Tabla 9. g Adicionados vs g Cuantificados de Maleato de Trimebutina.

NIVEL %	g DE MALEATO DE TRIMEBUTINA. ADICIONADOS.	g DE MALEATO DE TRIMEBUTINA. CUANTIFICADOS.	PORCENTAJE CUANTIFICADO.
80	0.2000	0.1994	99.7
80	0.2000	0.1992	99.6
80	0.2000	0.1991	99.6
90	0.2250	0.2239	99.5
90	0.2250	0.2236	99.4
100	0.2500	0.2487	99.5
100	0.2500	0.2488	99.5
100	0.2500	0.2488	99.5
110	0.2750	0.2737	99.5
110	0.2750	0.2737	99.5
110	0.2750	0.2737	99.5
120	0.3000	0.2986	99.5
120	0.3000	0.2986	99.5
120	0.3000	0.2990	99.7

NOTA: Para el nivel del 90% solo se incluyen dos muestras debido a fallas en la preparación de la tercera réplica.

Tabla 10. Análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados.

ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL POR MÍNIMOS CUADRADOS.	
PENDIENTE =	0.9957
ORDENADA AL ORIGEN=	-0.0001
r=	0.9999
r <sup>2</sup> =	0.9999
ERROR ESTANDAR DE REGRESION=	0.0002
PROMEDIO DE X=	0.2518
PROMEDIO DE Y=	0.2506
PENDIENTE RELATIVA=	1.0002
ORDENADA AL ORIGEN RELATIVA=	-0.0002
ERROR ESTANDAR DE REGRESION RELATIVO=	0.0007
LIMITE SUPERIOR DEL INTERVALO DE CONFIANZA AL 95 % DE LA ORDENADA=	-0.0008
LIMITE INFERIOR DEL INTERVALO DE CONFIANZA AL 95 % DE LA ORDENADA=	0.0007

Tabla 11. Intervalo de confianza al 95 % del porcentaje cuantificado.

NIVEL	NUMERO DATOS	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR	INTERVALO DE CONFIANZA	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
GLOBAL	14	99.5	0.1	0.0128	99.5	99.6
80 %	3	99.6	0.1	0.0266	99.6	99.6
90 %	2	99.5	0.1	0.0353	99.4	99.5
100%	3	99.5	0.0	0.0112	99.5	99.5
110 %	3	99.5	0.0	0.0064	99.5	99.5
120 %	3	99.6	0.1	0.0270	99.6	99.6

En la Tabla 9 se presentan los datos con los que se realizó el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados utilizando como variable independiente (X) a los gramos adicionados y como variable dependiente (Y) a los gramos cuantificados. En la Tabla 10 se presentan los resultados del análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, en la Tabla 11 se presenta el intervalo de confianza al 95 % del porcentaje cuantificado.

La Figura 23 muestra la gráfica de esta relación, donde se observa que existe una relación lineal entre los gramos cuantificados respecto a los gramos adicionados.

Según los resultados obtenidos se obtiene una pendiente relativa cercana a 1, así como una ordenada al origen relativa cercana a cero, por otra parte, se obtuvo con un intervalo de confianza al 95 % para la ordenada al origen, el límite inferior y superior, encontrándose que incluyen al cero, por lo que se puede concluir que la ordenada al origen no es significativamente diferente a cero.

Se obtiene un coeficiente de correlación mayor a 0.99, un coeficiente de determinación mayor a 0.98 lo que significa que hay una relación entre la cantidad adicionada y la cantidad cuantificada, que se representa por una línea recta.

El promedio del porcentaje cuantificado global y para cada nivel, se encuentra entre 97.0 y 103.0 %, con un intervalo de confianza al 95 %, y el coeficiente de variación es menor 3.0%.

Con base en los resultados obtenidos se dice que el método potenciométrico es lineal.

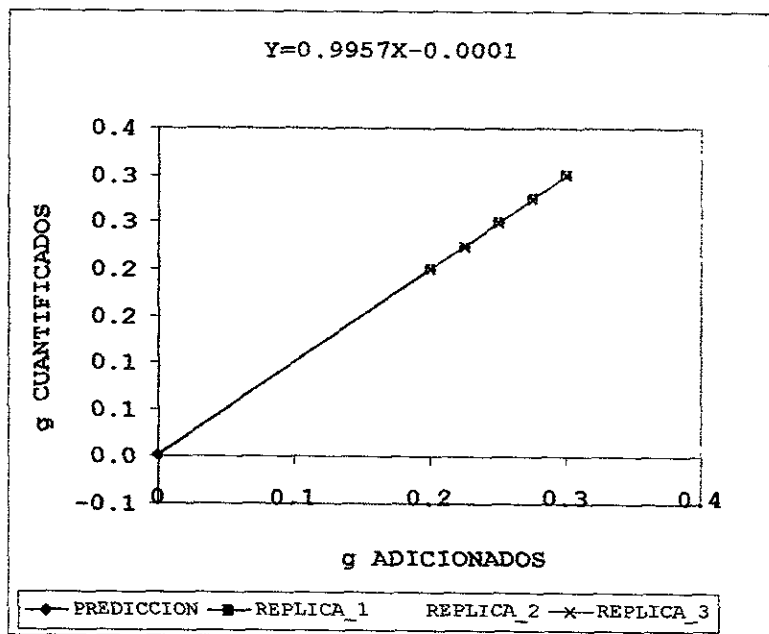


Figura 23. Gráfica de linealidad del método potenciométrico (g ADICIONADOS VS g CUANTIFICADOS)

4.1.2. EXACTITUD DEL METODO POTENCIOMETRICO PARA VALORAR MALEATO DE TRIMEBUTINA MATERIA PRIMA.

Tabla 12. Exactitud y Repetibilidad del método potenciométrico para valorar Maleato de Trimebutina materia prima.

NIVEL %	% CUANTIFICADO.
100.0	100.1
100.0	99.6
100.0	99.6
100.0	100.0
100.0	99.6
100.0	99.6
No. DE DATOS:	6
PROMEDIO:	99.8
D.E.:	0.2
C.V.:	0.2
INTERVALO DE CONFIANZA AL 95 % :	PROMEDIO +/-0.0603
LIMITE SUPERIOR:	99.9
LIMITE INFERIOR:	99.7

Tabla 13. Diferencia del porcentaje cuantificado por el método potenciométrico con respecto al método espectrofotométrico.

METODO POTENCIOMETRICO CON RESPECTO AL PORCENTAJE CUANTIFICADO POR EL METODO ESPECTROFOTOMETRICO.	
PORCENTAJE CUANTIFICADO POR EL METODO POTENCIOMETRICO:	99.8
PORCENTAJE CUANTIFICADO POR EL METODO ESPECTROFOTOMETRICO:	100.1
DIFERENCIA DEL PORCENTAJE CUANTIFICADO:	-0.3



En la tabla 12 se presentan los resultados del porcentaje cuantificado en las seis réplicas realizadas, en la misma Tabla se presenta el promedio de Maleato de Trimebutina cuantificado con un intervalo de confianza al 95 %, en la Tabla 13 se presenta la diferencia del porcentaje cuantificado por el método espectrofotométrico y potenciométrico.

De acuerdo con los resultados anteriores el promedio del porcentaje cuantificado se encuentra entre 97.0 y 103.0 %.

El porcentaje cuantificado obtenido potenciométricamente, no difiere en más del 3.0 % con respecto al porcentaje cuantificado obtenido por espectrofotometría.

Por lo tanto podemos decir que el método es exacto.

#### **4.1.3. PRECISION DEL METODO POTENCIOMETRICO PARA VALORAR MALEATO DE TRIMEBUTINA MATERIA PRIMA.**

##### **4.1.3.1. REPETIBILIDAD DEL METODO POTENCIOMETRICO PARA VALORAR MALEATO DE TRIMEBUTINA MATERIA PRIMA.**

La precisión (Repetibilidad) se evaluó al determinar el coeficiente de variación de los porcentajes cuantificados para Maleato de Trimebutina en la prueba de exactitud. El coeficiente de variación fue menor al 3.0 %, como se puede observar en la Tabla 12, lo cual indica que el método cumplió con los criterios establecidos para Repetibilidad.

4.1.3.2. PRECISION INTERMEDIA DEL METODO POTENCIOMETRICO PARA VALORAR MALEATO DE TRIMEBUTINA MATERIA PRIMA.

Tabla 14. Precisión Intermedia del método potenciométrico para valorar Maleato de Trimebutina materia prima.

PORCENTAJE CUANTIFICADO		
ANALISTA/DIA	1	2
1	99.5	99.6
	99.5	99.7
	99.6	99.7
2	99.9	99.7
	99.6	99.5
	99.7	99.6
DATOS ESTADISTICOS GLOBALES DEL ANALISIS DE PRECISION INTERMEDIA DEL % CUANTIFICADO.		
n=	12	
PROMEDIO=	99.6	
D.E.=	0.1	
C.V.=	0.1	

Tabla 15. Análisis de varianza para precisión intermedia. Efecto del día anidado en analista del método potenciométrico para valorar Maleato de Trimebutina materia prima.

ORIGEN DE LAS VARIACIONES	SUMA DE CUADRADOS	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS	F CALCULADA	PROBABILIDAD (P)
ANALISTA	0.00000000	0.00000000	0.00	1.0000
DIA	0.06666667	0.03333333	3.33	0.0885
INTERACCION DENTRO DEL GRUPO	0.00000000	0.00000000	0.00	1.0000

DADO QUE P ES MAYOR A 0.05 NO EXISTE EVIDENCIA DE QUE LAS FUENTES DE VARIACION TENGAN EFECTO SIGNIFICATIVO.

En la Tabla 14 se observa el coeficiente de variación global obtenido en el análisis de Maleato de Trimebutina por los dos analistas en los dos días, y se aprecia que la variación global no es mayor al 3.0 %.

Adicionalmente se realizó un análisis estadístico con el cual se demostró que no hay diferencia entre el promedio del porcentaje cuantificado entre cada analista, ni entre cada día como se puede observar en la Tabla 15.

Por lo tanto se puede concluir que el método es reproducible entre diferentes analistas y diferentes días.

**4.1.4. INTERVALO DEL METODO POTENCIOMETRICO PARA VALORAR MALEATO DE TRIMEBUTINA MATERIA PRIMA.**

De acuerdo a los resultados obtenidos, se dice que el método es lineal, exacto y preciso en el intervalo de 80.0 a 120.0 % de la cantidad de Maleato de Trimebutina que se indica en el método, ya que se cumple con los criterios de exactitud, linealidad y precisión.

**4.1.5. ROBUSTEZ DEL METODO POTENCIOMETRICO PARA VALORAR MALEATO DE TRIMEBUTINA MATERIA PRIMA.**

**4.1.5.1. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA DEL METODO POTENCIOMETRICO PARA VALORAR MALEATO DE TRIMEBUTINA MATERIA PRIMA.**

Tabla 16. Robustez: Estabilidad de la muestra del método potenciométrico para valorar Maleato de Trimebutina materia prima.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (HORAS)	NUMERO DE DATOS	PROMEDIO	D.E.	C.V.	DIFERENCIA (%) *
REFRIGERACION	0	3	99.5	0.1	0.1	
	24	3	99.6	0.1	0.1	0.1
	48	3	99.7	0.4	0.4	0.2
OBSCURIDAD	0	3	99.5	0.1	0.1	
	24	3	99.6	0.1	0.1	0.1
	48	3	99.6	0.0	0.0	0.1
LUZ Y OBSCURIDAD	0	3	99.5	0.1	0.1	
	24	3	99.6	0.1	0.1	0.1
	48	3	99.6	0.0	0.0	0.1

\*DIFERENCIA (%) = DIFERENCIA DE LOS PORCENTAJES CUANTIFICADOS CON RESPECTO AL ANALISIS INICIAL.

La Tabla 16 muestra el promedio de los porcentajes cuantificados de Maleato de Trimebutina de las muestras analizadas a las diferentes condiciones y tiempos de almacenamiento, así como la diferencia entre el promedio del porcentaje cuantificado de Maleato de Trimebutina de las muestras almacenadas a diferentes condiciones con respecto al análisis inicial, observándose que las diferencias de los porcentajes cuantificados de las muestras almacenadas en refrigeración, a temperatura ambiente en ciclos normales de luz y oscuridad, y protegidas de la luz son menores al 3.0 %; lo anterior indica que las muestras procesadas de Maleato de Trimebutina materia prima son estables hasta 48 horas en las condiciones mencionadas.

4.2.VALIDACION DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA VALORAR  
MALEATO DE TRIMEBUTINA MATERIA PRIMA.

4.2.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA DEL METODO  
ESPECTROFOTOMETRICO PARA VALORAR MALEATO DE  
TRIMEBUTINA MATERIA PRIMA.

Tabla 17. Respuesta de Maleato de Trimebutina a diferentes  
concentraciones.

NIVEL %	CONCENTRACION DE MALEATO DE TRIMEBUTINA (µg/mL)	RESPUESTA (ABSORBANCIA)	FACTOR RESPUESTA.
80	16.0	0.36250	0.02266
	16.0	0.35701	0.02231
	16.0	0.35855	0.02241
90	18.0	0.40747	0.02264
	18.0	0.40823	0.02268
	18.0	0.40604	0.02256
100	20.0	0.45900	0.02295
	20.0	0.44757	0.02238
	20.0	0.45233	0.02262
110	22.0	0.49284	0.02240
	22.0	0.49681	0.02258
	22.0	0.49718	0.02260
120	24.0	0.53688	0.02240
	24.0	0.54921	0.02258
	24.0	0.54231	0.02260
FACTOR RESPUESTA:			
No.DE DATOS:	15		
PROMEDIO:	0.02258		
D.E.:	0.00018		
C.V.:	0.80908		

Tabla 18. Análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados.

ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL POR MÍNIMOS CUADRADOS.	
PENDIENTE =	0.02276
ORDENADA AL ORIGEN=	0.00366
r=	0.99845
r <sup>2</sup> =	0.99690
ERROR ESTANDAR DE REGRESION=	0.00386
PROMEDIO DE X=	20
PROMEDIO DE Y=	0.45160
PENDIENTE RELATIVA=	1.00811
ORDENADA AL ORIGEN RELATIVA=	-0.00811
ERROR ESTANDAR DE REGRESION RELATIVO=	0.00854
LIMITE SUPERIOR DEL INTERVALO DE CONFIANZA AL 95 % DE LA ORDENADA=	0.011701
LIMITE INFERIOR DEL INTERVALO DE CONFIANZA AL 95 % DE LA ORDENADA=	-0.019024

En la Tabla 17 se presentan los datos con los que se realizó el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados utilizando como variable independiente (X) a la concentración de Maleato de Trimebutina y como variable dependiente (Y) a la respuesta (absorbancia). En la Tabla 18 se presentan los resultados del análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados.

En la Figura 24 se muestra la gráfica de esta relación, donde se observa que existe una relación lineal entre la respuesta obtenida respecto a la concentración adicionada.

De acuerdo con los resultados se obtiene una pendiente relativa cercana a 1, así como una ordenada al origen relativa cercana a cero, por otra parte, se obtuvo con un intervalo de confianza al 95 % para la ordenada al origen, el cual incluye al cero, por lo que se puede concluir que la ordenada al origen no es significativamente diferente a cero.

Se obtiene un coeficiente de correlación mayor a 0.99, un coeficiente de determinación mayor a 0.98, y el coeficiente de variación del factor respuesta es menor a 3.0 %.

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que el sistema cumple con los criterios establecidos para la linealidad en un intervalo de 16.0 a 24.0 µg/mL.

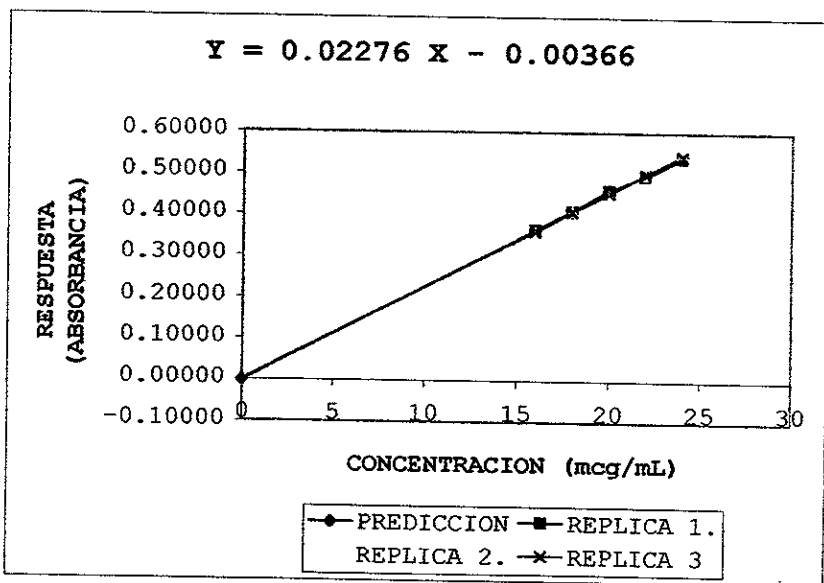


Figura 24. Gráfica de linealidad del sistema del Método Espectrofotométrico (concentración vs respuesta).

Tabla 19. Linealidad del método: mg cuantificados y porcentaje cuantificado de Maleato de Trimebutina en cada nivel.

NIVEL %	mg ADICIONADOS	mg CUANTIFICADOS	% CUANTIFICADO
80	16.0	15.9	99.4
	16.0	15.7	98.1
	16.0	15.8	98.8
90	18.0	17.9	99.4
	18.0	18.0	100.0
	18.0	17.9	99.4
100	20.0	20.2	101.0
	20.0	19.7	98.5
	20.0	19.9	99.5
110	22.0	21.7	98.6
	22.0	21.9	99.5
	22.0	21.9	99.5
120	24.0	23.6	98.3
	24.0	24.2	100.8
	24.0	23.9	99.6
PORCENTAJE CUANTIFICADO:			
No. DE DATOS:	15		
PROMEDIO:	99.4		
D. E.:	0.8		
C. V.:	0.8		



Tabla 20. Análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados.

ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL POR MÍNIMOS CUADRADOS.	
PENDIENTE =	1.00500
ORDENADA AL ORIGEN =	-0.22000
r =	0.99835
r <sup>2</sup> =	0.99670
ERROR ESTANDAR DE REGRESION =	0.17563
PROMEDIO DE X =	20.0
PROMEDIO DE Y =	19.8800
PENDIENTE RELATIVA =	1.01107
ORDENADA AL ORIGEN RELATIVA =	-0.01107
ERROR ESTANDAR DE REGRESION RELATIVO =	0.00883
LIMITE SUPERIOR DEL INTERVALO DE CONFIANZA AL 95 % DE LA ORDENADA=	0.47962
LIMITE INFERIOR DEL INTERVALO DE CONFIANZA AL 95 % DE LA ORDENADA=	-0.91962

Tabla 21. Intervalo de confianza al 95 % del porcentaje cuantificado.

NIVEL	NUMERO DATOS	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR	INTERVALO DE CONFIANZA	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
GLOBAL	15	99.4	0.8	0.1	99.3	99.5
80 %	3	98.8	0.8	0.3	98.5	99.1
90 %	3	99.6	0.3	0.1	99.5	99.7
100%	3	99.7	1.3	0.5	99.2	100.2
110 %	3	99.2	0.5	0.2	99.0	99.4
120 %	3	99.6	1.3	0.5	99.1	100.1

Los resultados de la linealidad del método espectrofotométrico se muestran en la Tabla 19 donde se presentan los datos con los que se realizó el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados utilizando como variable independiente (X) a los mg de Maleato de Trimebutina adicionados y como variable dependiente a los mg cuantificados (Y), en la Tabla 20 se presentan los resultados del análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, en la Tabla 21 se presentan los resultados del porcentaje cuantificado con un intervalo de confianza al 95 %.

En la Figura 25 se muestra la gráfica de esta relación, donde se observa que existe un comportamiento lineal entre los mg adicionados y los mg cuantificados.

Se obtiene una pendiente relativa cercana a 1, así como una ordenada al origen relativa cercana a cero; por otra parte, se obtuvo con un intervalo de confianza al 95 % para la ordenada al origen el límite inferior y superior, encontrándose que incluyen al cero, por lo que se puede concluir que la ordenada al origen no es significativamente diferente a cero.

Se observa un coeficiente de correlación mayor a 0.99, un coeficiente de determinación mayor a 0.98 lo que significa que hay una relación entre la cantidad adicionada y la cantidad cuantificada, que se representa por una línea recta.

El promedio del porcentaje cuantificado global y para cada nivel, se encuentra entre 97.0 y 103.0 %, con un intervalo de confianza al 95 %, y el coeficiente de variación es menor 3.0%. En base a los resultados obtenidos se dice que el método es lineal.

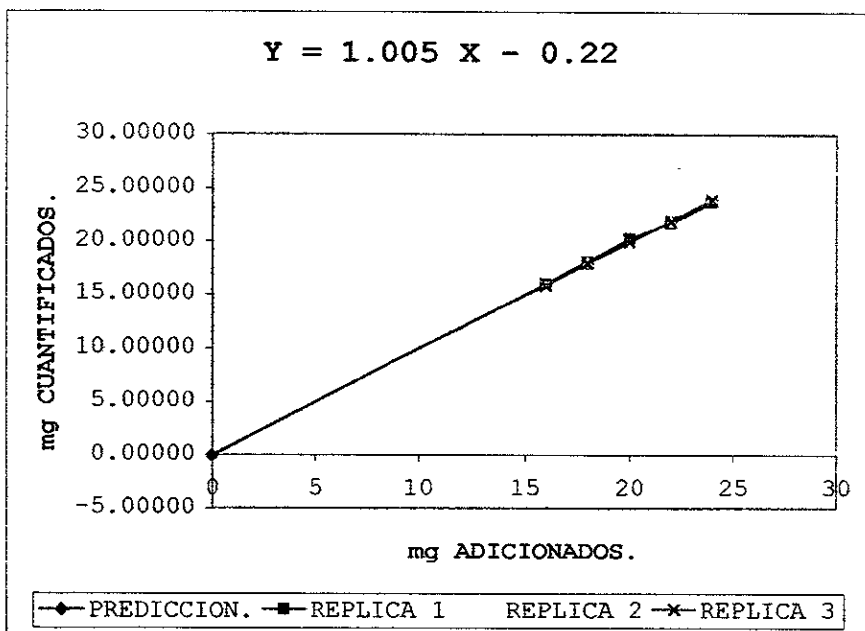


Figura 25. Gráfica de linealidad del método espectrofotométrico (mg adicionados vs mg cuantificados).

4.2.2. PRECISION DEL SISTEMA DEL METODO  
 ESPECTROFOTOMETRICO PARA VALORAR MALEATO DE  
 TRIMEBUTINA MATERIA PRIMA.

Tabla 22. Precisión del Sistema del método espectrofotométrico para valorar Maleato de Trimebutina materia prima.

REPLICA	CONCENTRACION DE MALEATO DE TRIMEBUTINA ( $\mu\text{g/mL}$ )	RESPUESTA
1	20.0	0.43355
2	20.0	0.43355
3	20.0	0.43324
4	20.0	0.43321
5	20.0	0.43332
6	20.0	0.43297
No.DE DATOS: 6		
PROMEDIO: 0.43331		
D.E.: 0.00022		
C.V.: 0.05116		

Los resultados de la precisión del sistema se presentan en la Tabla 22, se observa que el coeficiente de variación de las 6 lecturas de la solución al 100% es menor 1.5 %, lo cual significa que el sistema es preciso.

4.2.3. EXACTITUD DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA VALORAR MALEATO DE TRIMEBUTINA MATERIA PRIMA.

Tabla 23. Exactitud del método y Repetibilidad del método espectrofotométrico para valorar Maleato de Trimebutina materia prima.

NIVEL %	% CUANTIFICADO
100.0	100.1
100.0	100.6
100.0	99.9
100.0	100.9
100.0	99.2
100.0	99.6
No. DE DATOS:	6
PROMEDIO:	100.1
D.E.:	0.6
C.V.:	0.6
INTERVALO DE CONFIANZA AL 95 %:	PROMEDIO +/-0.2
LIMITE SUPERIOR	100.3
LIMITE INFERIOR	99.9

Tabla 24. Diferencia el porcentaje cuantificado por el método potenciométrico con respecto al método espectrofotométrico.

DIFERENCIA DEL PORCENTAJE CUANTIFICADO POR EL METODO POTENCIOMETRICO CON RESPECTO AL PORCENTAJE CUANTIFICADO POR EL METODO ESPECTROFOTOMETRICO.	
PORCENTAJE CUANTIFICADO POR EL METODO POTENCIOMETRICO:	99.8
PORCENTAJE CUANTIFICADO POR EL METODO ESPECTROFOTOMETRICO:	100.1
DIFERENCIA DEL PORCENTAJE CUANTIFICADO:	-0.3

En la tabla 23 se presentan los resultados de la exactitud del método; en el se presentan los resultados del porcentaje cuantificado en las seis réplicas realizadas y se presenta el intervalo de confianza al 95 % para el promedio de Maleato de Trimebutina, en la Tabla 24 se presenta la diferencia del porcentaje cuantificado por el método espectrofotométrico y potenciométrico.

De acuerdo con los resultados obtenidos se encontró que el promedio del porcentaje cuantificado se encuentra entre 97.0 y 103.0 %, para el porcentaje global y para cada nivel probado con un intervalo de confianza al 95 %.

El porcentaje cuantificado, obtenido potenciométricamente no difiere en más del 3.0 % con respecto al porcentaje cuantificado obtenido por espectrofotometría.

Por lo tanto el método analítico probado es exacto.

#### 4.2.4      PRECISION DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA VALORAR MALEATO DE TRIMEBUTINA MATERIA PRIMA

##### 4.2.4.1.   REPETIBILIDAD DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA VALORAR MALEATO DE TRIMEBUTINA MATERIA PRIMA.

Los resultados de la repetibilidad se presentan en la Tabla 23 en donde se observa que el coeficiente de variación del porcentaje cuantificado de las seis réplicas es menor al 3 %.

Por lo tanto el método analítico probado es repetible.

4.2.4.2.PRECISION INTERMEDIA DEL METODO  
ESPECTROFOTOMETRICO PARA VALORAR  
MALEATO DE TRIMEBUTINA MATERIA  
PRIMA.

Tabla 25. Precisión intermedia del método espectrofotométrico para valorar Maleato de Trimebutina materia prima.

PORCENTAJE CUANTIFICADO		
ANALISTA/DIA	1	2
1	99.5	101.4
	100.2	100.3
	99.6	99.7
2	100.4	99.1
	101.6	100.0
	101.2	100.8
DATOS ESTADISTICOS GLOBALES DEL ANALISIS DE PRECISION INTERMEDIA DEL % CUANTIFICADO.		
n=	12	
PROMEDIO=	100.3	
D.E.=	0.8	
C.V.=	0.8	

Tabla 26. Análisis de varianza para precisión intermedia.  
Efecto del día anidado en analista del método  
espectrofotométrico para valorar Maleato de  
Trimebutina materia prima.

ORIGEN DE LAS VARIACIONES	SUMA DE CUADRADOS	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS	F CALCULADA	PROBABILIDAD (P)
ANALISTA	0.480000	0.48000	0.97	0.3540
DIA	2.550000	1.275000	2.57	0.1373
INTERACCION DENTRO DEL GRUPO	0.480000	0.480000	0.38	0.6020

DADO QUE P ES MAYOR A 0.05 NO EXISTE EVIDENCIA DE QUE LAS FUENTES DE VARIACION TENGAN EFECTO SIGNIFICATIVO.

En la Tabla 25 se observa el coeficiente de variación global obtenido en el análisis de Maleato de Trimebutina por los dos analistas en los dos días, y se observa que la variación global no es mayor al 3.0 %.

Adicionalmente se realizó un análisis estadístico con el cual se demostró que no hay diferencia significativa entre el promedio del porcentaje cuantificado entre cada analista, ni entre cada día como se puede observar en la Tabla 26.

Por lo tanto se puede concluir que el método es reproducible entre diferentes analistas y diferentes días.

#### 4.2.5. INTERVALO DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA VALORAR MALEATO DE TRIMEBUTINA MATERIA PRIMA.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se dice que el método es lineal, exacto y preciso en el intervalo de 80.0 a 120.0 % de la concentración de Maleato de Trimebutina que se indica en el método, ya que se cumple con los criterios de exactitud, linealidad y precisión.



4.2.6. ROBUSTEZ DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA VALORAR MALEATO DE TRIMEBUTINA MATERIA PRIMA.

4.2.6.1. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA VALORAR MALEATO DE TRIMEBUTINA MATERIA PRIMA.

Tabla 27. Robustez: Estabilidad de la muestra.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (HORAS)	NUMERO DE DATOS	PROMEDIO	D.E.	C.V.	DIFERENCIA (%)*
REFRIGERACION	0	3	99.7	0.4	0.4	
	24	3	100.8	1.2	1.2	1.1
	48	3	100.2	0.5	0.5	0.5
OBSCURIDAD	0	3	99.7	0.4	0.4	
	24	3	99.9	1.1	1.1	0.2
	48	3	101.0	1.4	1.4	1.3
LUZ Y OBSCURIDAD	0	3	99.7	0.4	0.4	
	24	3	100.1	0.5	0.5	0.4
	48	3	101.2	1.4	1.4	1.7

\*DIFERENCIA (%) = DIFERENCIA DE LOS PORCENTAJES CUANTIFICADOS CON RESPECTO AL ANALISIS INICIAL.

En la Tabla 27 se muestra el promedio de los porcentajes cuantificados de Maleato de Trimebutina de las muestras analizadas a las diferentes condiciones y tiempos de almacenamiento, así como la diferencia entre el promedio del porcentaje cuantificado de Maleato de Trimebutina de las muestras almacenadas a diferentes condiciones con respecto al análisis inicial observándose que las diferencias de los porcentajes cuantificados de las muestras almacenadas en refrigeración, a temperatura ambiente en ciclos normales de luz y oscuridad, y protegidas de la luz son menores al 3.0 %; lo que indica que el Maleato de Trimebutina es estable hasta 48 horas en las condiciones mencionadas.

#### 4.3. PROPUESTA DE MONOGRAFIA DE MALEATO DE TRIMEBUTINA MATERIA PRIMA.

Los métodos validados son lineales en el intervalo de concentración y de cantidad de muestra probados, son exactos, precisos y reproducibles.

Estos métodos sirven para cuantificar al Maleato de Trimebutina Materia prima y fue necesario realizar la comparación de los dos métodos con el propósito de asegurar la validez de los resultados obtenidos por el método potenciométrico.

Se validaron los dos métodos analíticos para cuantificar al Maleato de Trimebutina materia prima con el propósito de contar con una sustancia de referencia, para utilizarla en el desarrollo y la validación del método analítico para valorar a este compuesto en una solución inyectable.

La validación del método para cuantificar al Maleato de Trimebutina en solución inyectable por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución se realizó empleando una sustancia de referencia analizada con los métodos potenciométrico y espectrofotométrico descritos anteriormente.

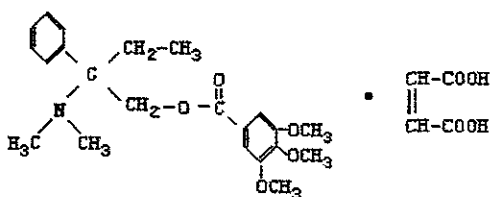
Los criterios de aceptación, lo cual se hace de acuerdo a las especificaciones dadas por el proveedor(34). Las pruebas físicas y químicas así como las especificaciones que deben realizarse para demostrar la identidad y pureza de la materia prima se reportan en la Tabla 28.

Tabla 28. Especificaciones para Maleato de Trimebutina materia prima.

DETERMINACION	LIMITES
DESCRIPCION	POLVO CRISTALINO BLANCO INODORO, LIBRE DE MATERIA EXTRAÑA.
MATERIA EXTRAÑA	NO MAS DE 3 PUNTOS NEGROS VISIBLES.
SOLUBILIDAD	SOLUBLE EN METANOL, EN AGUA, EN CLOROFORMO, EN ALCOHOL Y PRACTICAMENTE INSOLUBLE EN ETER.
IDENTIFICACION :	
a) OBTENCION DEL ACIDO 3,4,5-TRIMETOXIBENZÓICO	FORMA UN PRECIPITADO BLANCO
b) ESPECTRO DE ABSORCIÓN I.R.	SIMILAR A LA SUSTANCIA DE REFERENCIA.
c) ESPECTRO DE ABSORCION U.V.	SIMILAR A LA SUSTANCIA DE REFERENCIA.
CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.	SIMILAR A LA SUSTANCIA DE REFERENCIA.
INTERVALO DE FUSION (34)	130° - 135°
pH	3.6 A 4.5
PERDIDA AL SECADO	NO MAS DEL 1.0 %
RESIDUO A LA IGNICION	NO MAS DEL 0.1 %
VALORACION :	
a) ESPECTROFOTOMETRICA	NO MENOS DEL 98.5 % CALCULADO EN BASE ANHIDRA
b) TITULACION ACIDO-BASE	NO MENOS DE 98.5 % CALCULADA EN BASE ANHIDRA.

PROPUESTA DE MONOGRAFIA PARA MALEATO DE TRIMEBUTINA MATERIA PRIMA.

MALEATO DE TRIMEBUTINA



$C_{22}H_{29}NO_5 \cdot C_4H_4O_4$

MASA MOLECULAR: 503.5

3,4,5-Trimetoxibenzóico ácido 2-(dimetilamino)-2-fenilbutil éster maléico.

Contiene no menos del 98.5 % calculado sobre base anhidra.

**SUSTANCIA DE REFERENCIA.** Maleato de Trimebutina. Secar 3 horas al vacío a 60 °C.

**DESCRIPCION.** Polvo cristalino blanco, inodoro, libre de materia extraña.

**MATERIA EXTRAÑA.** Disolver aproximadamente 2.5 g de muestra exactamente pesados en 50 mL de metanol, filtrar a través de papel filtro Whatman No. 2, secar el papel al aire y examinarlo. No se debe observar más de 3 puntos negros.

**SOLUBILIDAD.** Soluble en metanol, en agua, en cloroformo y en alcohol. Prácticamente insolubilidad éter.

## ENSAYOS DE IDENTIDAD.

A. Disolver 100 mg de la muestra en 10 mL de alcohol, agregar 1 mL de hidróxido de sodio al 30 % y calentar a reflujo durante 15 minutos.

Enfriar y acidificar con ácido clorhídrico. Se debe formar un precipitado blanco de ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico.

B. El espectro IR de la muestra en una dispersión de Bromuro de Potasio, debe exhibir máximos a la misma longitud de onda que una preparación similar de Maleato de Trimebutina Sustancia de Referencia. Picos característicos:

2500-2700  $\text{cm}^{-1}$  (amina terciaria).

1750  $\text{cm}^{-1}$  (C=O, éster)

700  $\text{cm}^{-1}$  (anillo aromático monosustituido)

758  $\text{cm}^{-1}$  (anillo aromático tetrasustituido).

C. El espectro de absorción al U.V. de una solución de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en ácido clorhídrico 0.1 N, debe presentar un máximo a 267 nm, comparable con una preparación similar de Maleato de Trimebutina Sustancia de Referencia.

D. Cromatografía en capa fina.

Emplear placas de silica gel GF 254 (Merck), espesor 0.25 mm.

Eluente: Cloroformo-acetona (93:7).

Revelador: Lámpara U.V.

Solución a examinar: Solución acuosa al 2.0%.

Cantidad de solución: 20  $\mu\text{L}$ .

Efectuar la cromatografía según el método general. Eluir en paralelo hasta que el frente de solvente haya recorrido las tres cuartas partes de la placa, sacar la placa de la cámara y evaporar al aire en campana de extracción.

Observar la placa bajo luz ultravioleta, debe aparecer una mancha con  $R_f$  similar a la Sustancia de Referencia.

Rociar la placa con reactivo de Dragendorff. La mancha de la Sustancia de Referencia y de la muestra se tiñen de color naranja. En el punto de aplicación queda el ácido maleico.

**TEMPERATURA DE FUSION.** MGA 0471 (19). 130-135 °C (34).

Seguir el procedimiento para sustancias Clase 1 A.

**pH.** MGA 0701 (19). Entre 3.6 a 4.5. Determinarlo en una solución acuosa al 1.0 %.

**PERDIDA AL SECADO.** MGA 0671 (19). No más de 1.0 %. Seguir el procedimiento utilizando 1 g de muestra. Secar 3 horas al vacío a 60 °C.

**RESIDUO DE LA IGNICION.** MGA 0751 (19). No más de 0.1 %.

**VALORACION.**

**A. POTENCIOMETRICO.** MGA 0991 (19).

Pesar aproximadamente con exactitud 250 mg de muestra seca, transferirlos a un vaso de 100 mL, agregar 50 mL de ácido acético glacial. Disolver y titular con ácido perclórico 0.1 N S.V., determinar potenciometricamente el punto final de equivalencia. Determinar un blanco en las mismas condiciones y hacer las correcciones necesarias. Cada mililitro de ácido perclórico 0.1 N es equivalente a 50.35 mg de Maleato de Trimebutina.

**B. ESPECTROFOTOMETRICA.**

SOLUCION DE REFERENCIA.

Pesar por duplicado y con exactitud, aproximadamente 20 mg de Maleato de Trimebutina Sustancia de Referencia. Transferirlos a un matraz volumétrico de 100 mL, disolverlo y llevar a volumen con alcohol y mezclar bien. Transferir 10.0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con alcohol y mezclar. (concentración aproximada 20 µg/mL).

SOLUCION DE LA MUESTRA.

Preparar por duplicado de manera similar a la preparación de la solución de referencia. Determinar la absorbancia de las soluciones de referencia y muestra a 270 nm, usando alcohol como blanco.

CALCULOS.

$$\frac{A_m}{A_s} \cdot \frac{P_s}{P_m} \cdot 100 = \% \text{ de Maleato de Trimebutina en la muestra.}$$

$A_m$  = Absorbancia de la muestra.

$A_s$  = Absorbancia de la Sustancia de Referencia.

$P_s$  = Peso de la Sustancia de Referencia en mg.

$P_m$  = Peso de la muestra en mg.

**CONSERVACION.** En recipientes cerrados.

4.4. VALIDACION DEL METODO POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

4.4.1. ESPECIFICIDAD DEL METODO POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

Tabla 29. Especificidad: Porcentaje degradado de las muestras sometidas a degradación.

MUESTRA	AGENTE DEGRADANTE	REPLICA	% DEGRADADO
MATERIA PRIMA	ACIDO (H)	1	20.4
		2	20.3
	BASE (N)	1	17.4
		2	16.9
	OXIDACION (O)	1	15.5
		2	10.4
	LUZ UV (UV)	1	6.5
		2	8.4
FORMULACION	ACIDO (H)	1	12.9
		2	27.6
	BASE (N)	1	17.2
		2	17.7
	OXIDACION (O)	1	9.9
		2	7.2
	LUZ UV (UV)	1	10.6
		2	11.0
PLACEBO	ACIDO (H)	1	NO PRESENTA SEÑAL
		2	NO PRESENTA SEÑAL
	BASE (N)	1	NO PRESENTA SEÑAL
		2	NO PRESENTA SEÑAL
	OXIDACION (O)	1	NO PRESENTA SEÑAL
		2	NO PRESENTA SEÑAL
	LUZ UV (UV)	1	NO PRESENTA SEÑAL
		2	NO PRESENTA SEÑAL



Para evaluar la especificidad se sometieron a las condiciones de degradación que se indican en la Tabla 7, muestras de materia prima, placebo y placebo adicionado.

En la Tabla 29 se presentan los porcentajes degradados de las muestras de Maleato de Trimebutina sometidas a dichas condiciones. En las Figuras 26, 27, 28 y 29 se muestran los espectros en tres dimensiones, en las Figuras 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 se presentan los cromatogramas e índices espectrales, en las Figuras 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 y 45 se presenta la comparación de pureza y el contraste espectral de las muestras de placebo adicionado.

Se ilustran solamente los placebos adicionados ya que en estos se presenta la mayor probabilidad de que se diera la interferencia de los productos de degradación con el Maleato de Trimebutina, las muestras de materia prima son muy parecidas a las del placebo adicionado, por otra parte los placebos no presentaron señal.

Con el espectro en tres dimensiones (absorbancia, tiempo y longitud de onda) se pudo analizar el pico del Maleato de Trimebutina y de los productos de degradación.

Con el análisis del índice espectral se demostró que el pico de Maleato de Trimebutina consiste únicamente de un componente, es decir que no hay coelución de algún producto de degradación al inicio y al final del pico.

Se realizó también la comparación de pureza en la cual se compararon los espectros obtenidos en el máximo de absorción del pico de las muestras con el estándar de referencia analizado a las mismas condiciones, para identificar al compuesto, no se detectó la presencia de picos que pudieran coeluir perfectamente con el Maleato de Trimebutina.

Se realizó la técnica de contraste espectral con el cual se determinó la significancia que hay en la diferencia entre el pico de Maleato de Trimebutina en las muestras degradadas y la Sustancia de Referencia analizadas a las mismas condiciones.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el placebo no presenta respuesta que interfieran con la respuesta del Maleato de Trimebutina.

Los placebos adicionados no presentan respuesta que interfiera con la respuesta del Maleato de Trimebutina.

Los productos de degradación del Maleato de Trimebutina no interfieren con el compuesto de interés, así como la señal de Maleato de Trimebutina en las muestras degradadas es pura.

ESPECTRO EN TRES DIMENSIONES DE LAS MUESTRAS DE PLACEBOS ADICIONADOS DEGRADADAS.

FIGURA 26. PLACEBO ADICIONADO DEGRADADO EN CONDICIONES ACIDAS.

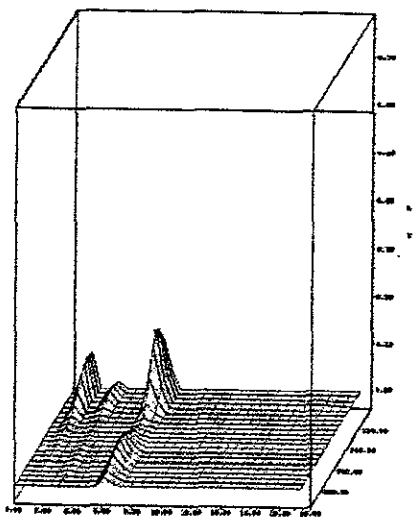


FIGURA 27. PLACEBO ADICIONADO DEGRADADO EN CONDICIONES BASICAS.

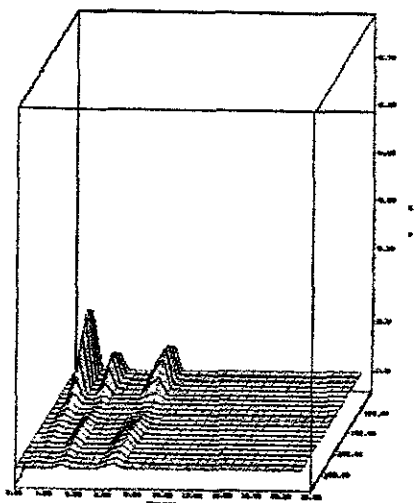


FIGURA 28. PLACEBO ADICIONADO DEGRADADO CONDICIONES OXIDACION.

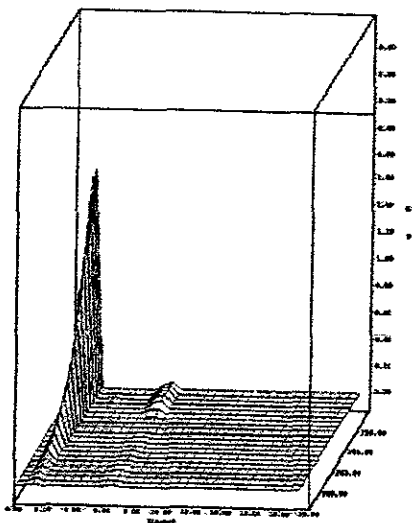
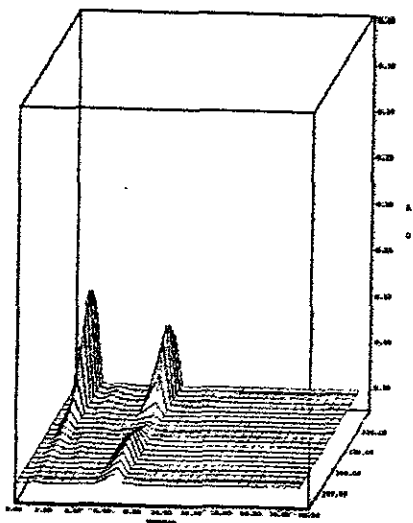


FIGURA 29. PLACEBO ADICIONADO DEGRADADO EN CONDICIONES LUZ ULTRAVIOLETA.



CROMATOGRAMAS E INDICE ESPECTRAL DE LAS MUESTRAS DE PLACEBOS ADICIONADOS DEGRADADAS.

FIGURA 30. CROMATOGRAMA DEL PLACEBO ADICIONADO DEGRADADO EN CONDICIONES ACIDAS.

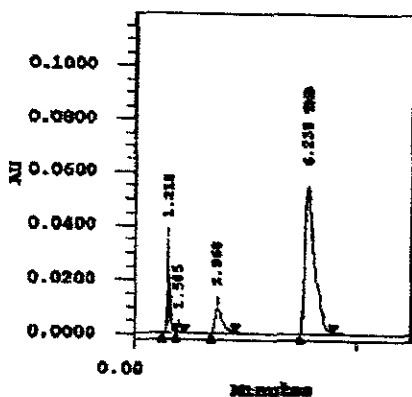


FIGURA 31. INDICE ESPECTRAL DEL PLACEBO ADICIONADO DEGRADADO EN CONDICIONES ACIDAS.

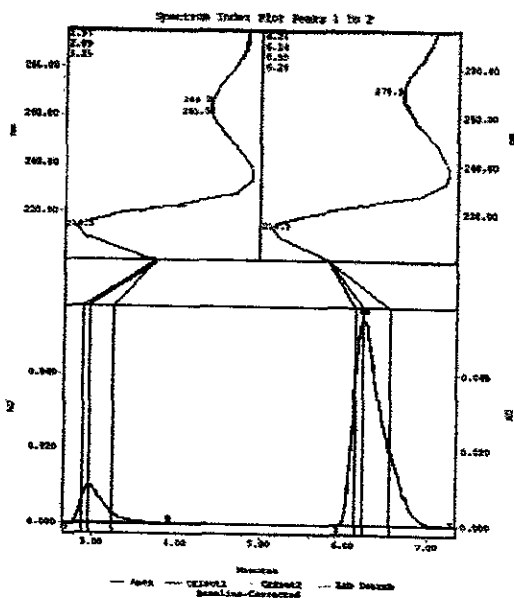


FIGURA 32. CROMATOGRAMA DEL PLACEBO ADICIONADO DEGRADADO EN CONDICIONES BASICAS.

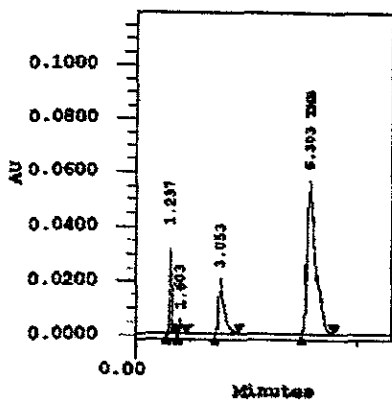


FIGURA 33. INDICE ESPECTRAL DEL PLACEBO ADICIONADO DEGRADADO EN CONDICIONES BASICAS.

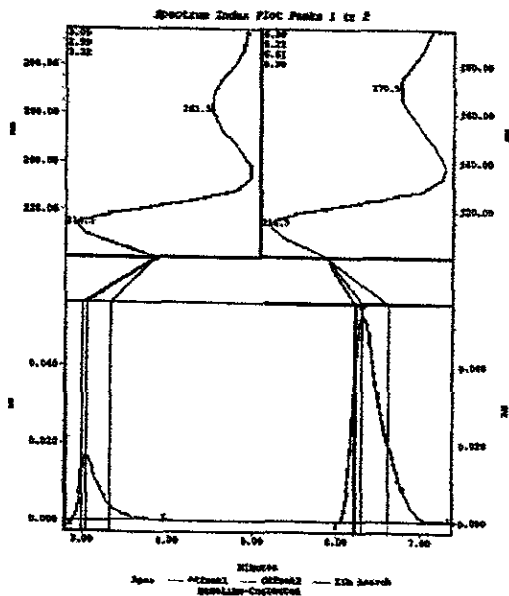


FIGURA 34. CROMATOGRAMA DEL PLACEBO ADICIONADO DEGRADADO EN CONDICIONES DE OXIDACION.

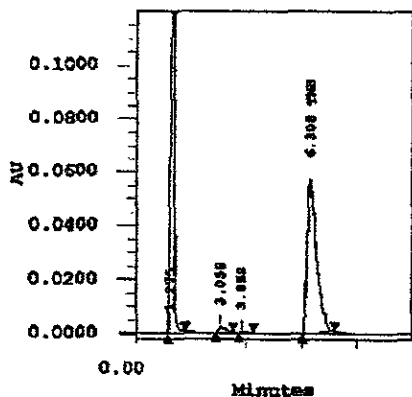


FIGURA 35. INDICE ESPECTRAL DEL PLACEBO ADICIONADO DEGRADADO EN CONDICIONES DE OXIDACION.

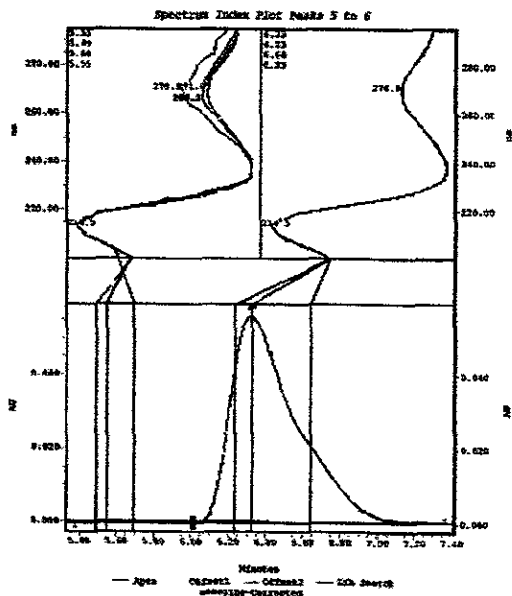


FIGURA 36. CROMATOGRAMA DEL PLACEBO ADICIONADO DEGRADADO EN CONDICIONES DE LUZ ULTRAVIOLETA.

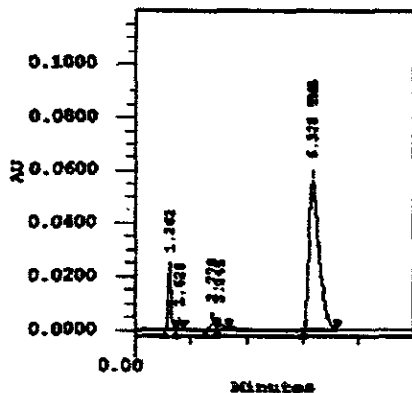
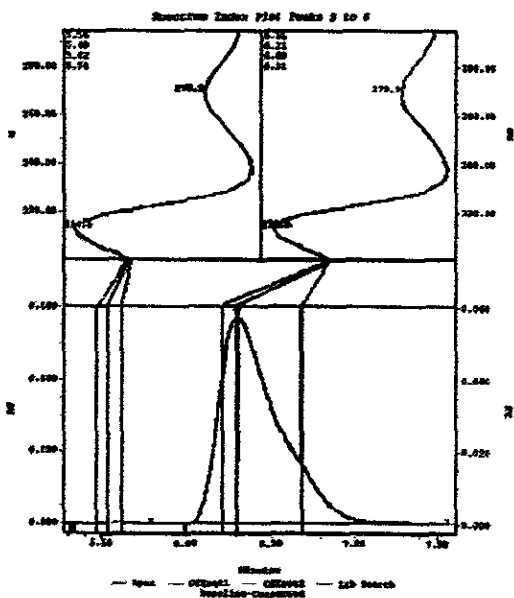


FIGURA 37. INDICE ESPECTRAL DEL PLACEBO ADICIONADO DEGRADADO EN CONDICIONES DE LUZ ULTRAVIOLETA.



CONTRASTE ESPECTRAL Y COMPARACION DE PUREZA DE LAS MUESTRAS DE PLACEBOS ADICIONADOS DEGRADADAS.

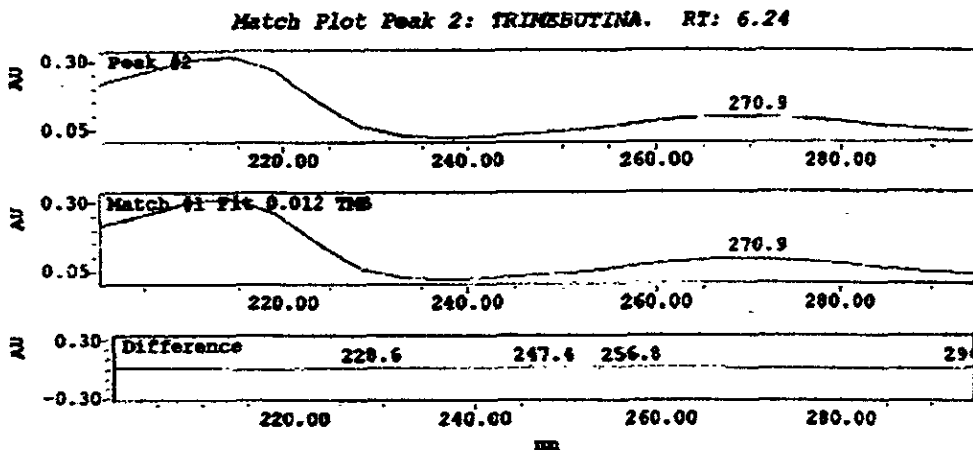


FIGURA 39. COMPARACION DE PUREZA DEL PLACEBO ADICIONADO DEGRADADO EN CONDICIONES ACIDAS.

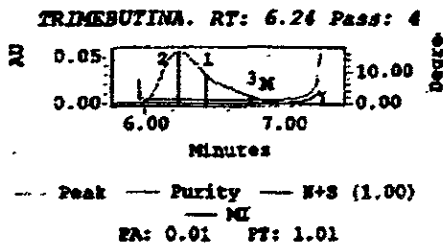
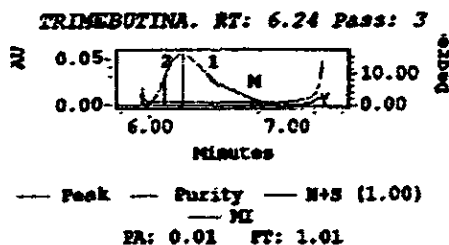
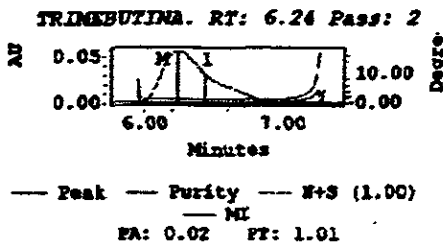
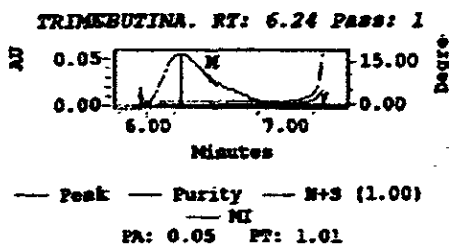




FIGURA 40. CONTRASTE ESPECTRAL DEL PLACEBO ADICIONADO DEGRADADO EN CONDICIONES BASICAS.

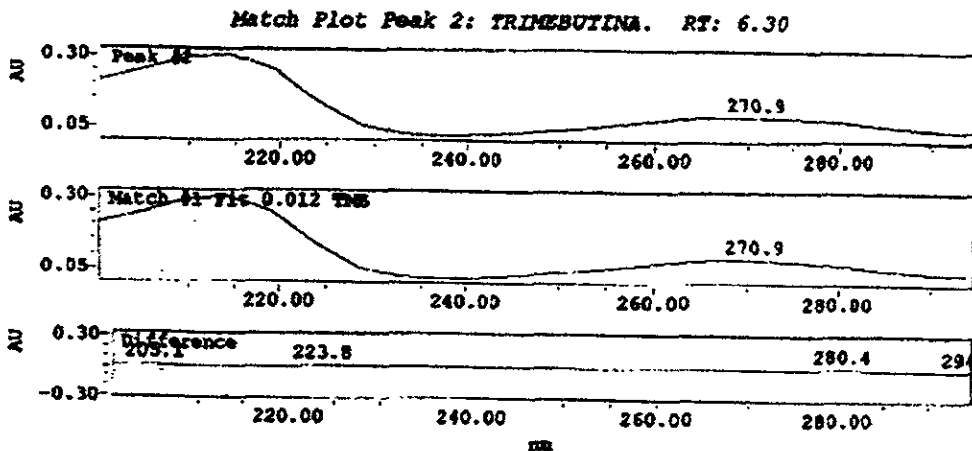


FIGURA 41. COMPARACION DE PUREZA DEL PLACEBO ADICIONADO DEGRADADO EN CONDICIONES BASICAS.

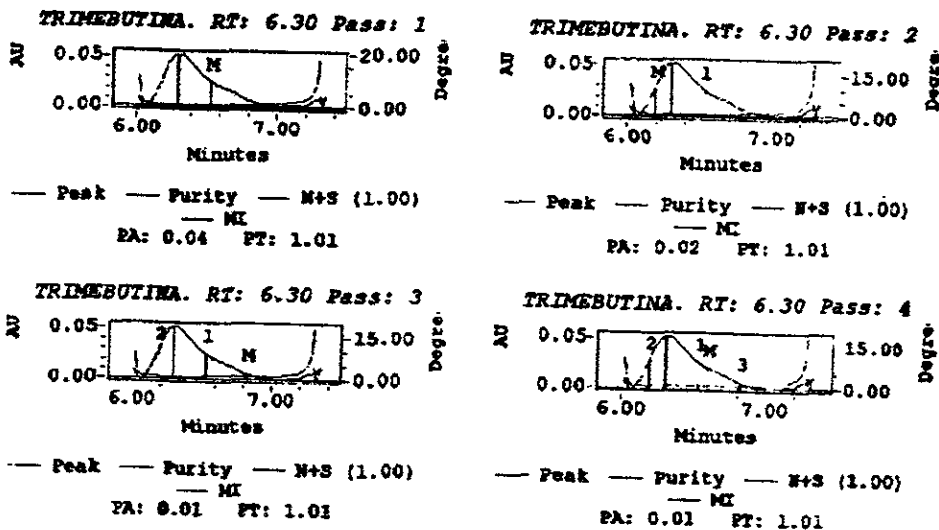


FIGURA 42. CONTRASTE ESPECTRAL DEL PLACEBO ADICIONADO DEGRADADO EN CONDICIONES DE OXIDACION.

Match Plot Peak 6: TRIMEBUTINA. RT: 6.31

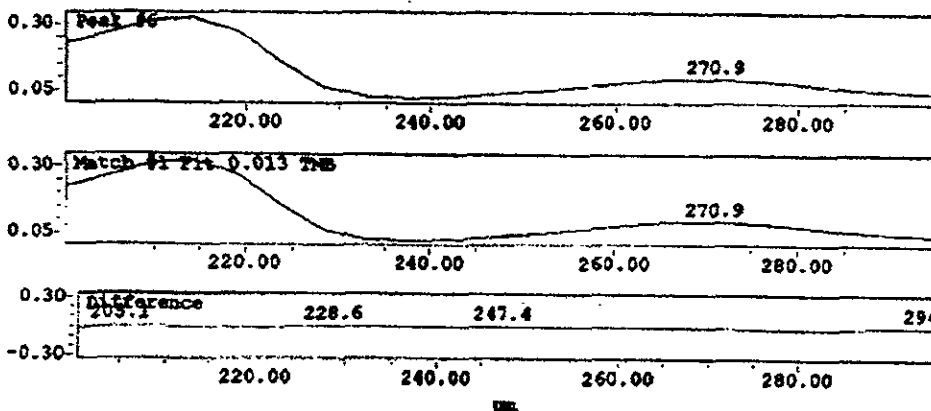


FIGURA 43. COMPARACION DE PUREZA DEL PLACEBO ADICIONADO DEGRADADO EN CONDICIONES DE OXIDACION.

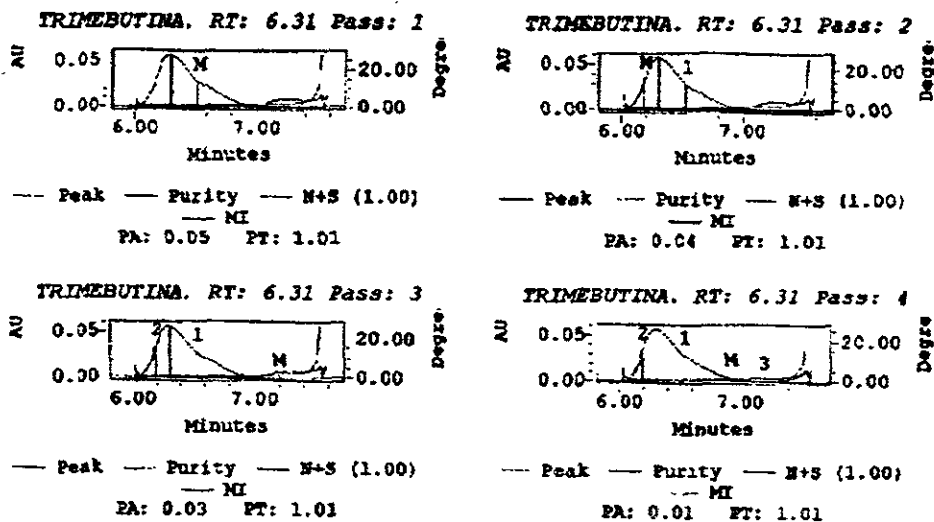


FIGURA 44. CONTRASTE ESPECTRAL DEL PLACEBO ADICIONADO DEGRADADO EN CONDICIONES DE LUZ ULTRAVIOLETA.

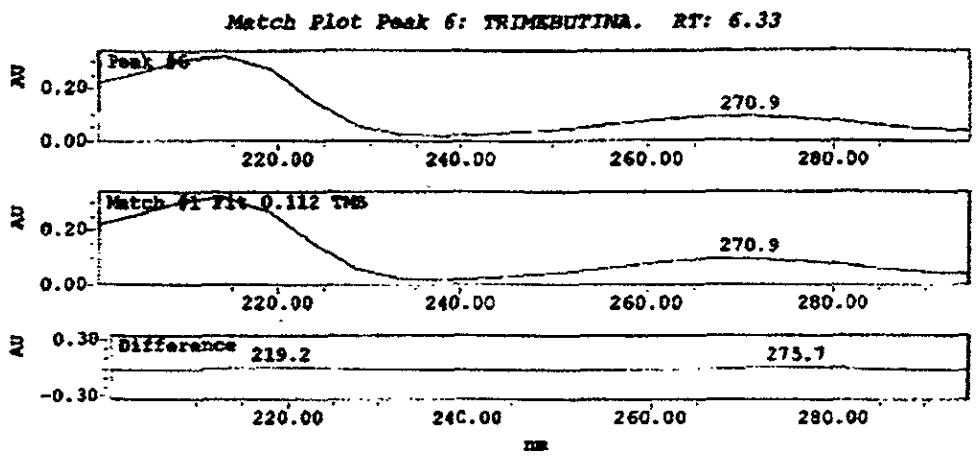
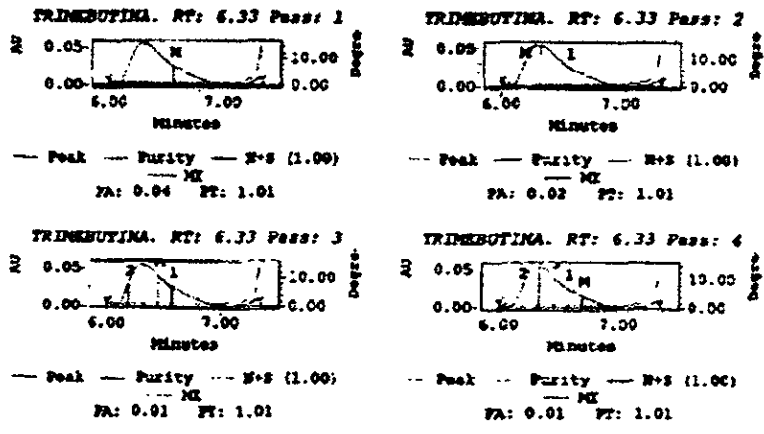


FIGURA 45. COMPARACION DE PUREZA DEL PLACEBO ADICIONADO DEGRADADO EN CONDICIONES DE LUZ ULTRAVIOLETA.



4.4.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA DEL METODO CLAR PARA VALORAR AL MALEATO DE TRIMEBUTINA EN SOLUCION INYECTABLE.

Tabla 30. Respuesta de Maleato de Trimebutina a diferentes concentraciones.

NIVEL %	CONCENTRACION MALEATO DE TRIMEBUTINA (mg/mL)	RESPUESTA (AREA)	FACTOR RESPUESTA.
50	0.1000	763500	7635000.0
	0.1000	764910	7649100.0
	0.1000	766407	7664070.0
75	0.1500	1148396	7655973.3
	0.1500	1149619	7664126.7
	0.1500	1161736	7744906.7
100	0.2000	1537716	7688580.0
	0.2000	1539304	7696520.0
	0.2000	1533140	7665700.0
125	0.2500	1917205	7668820.0
	0.2500	1921082	7684328.0
	0.2500	1923033	7692132.0
150	0.3000	2301506	7671686.7
	0.3000	2305860	7686200.0
	0.3000	2320896	7736320.0
FACTOR RESPUESTA:			
No.DE DATOS:		15	
PROMEDIO:		7680230.9	
D.E.:		29756.5	
C.V.:		0.4	

Tabla 31. Análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados.

ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL POR MÍNIMOS CUADRADOS.	
PENDIENTE =	7712.3060
ORDENADA AL ORIGEN=	-5507.2000
r=	0.99996
r <sup>2</sup> =	0.99991
ERROR ESTANDAR DE REGRESION=	5471.8357
PROMEDIO DE X=	200
PROMEDIO DE Y=	1536954.0
PENDIENTE RELATIVA=	1.0036
ORDENADA AL ORIGEN RELATIVA=	-0.0036
ERROR ESTANDAR DE REGRESION RELATIVO=	0.0036
LIMITE SUPERIOR DEL INTERVALO DE CONFIANZA AL 95 % DE LA ORDENADA=	3649.4
LIMITE INFERIOR DEL INTERVALO DE CONFIANZA AL 95 % DE LA ORDENADA=	-14663.8

Los resultados de linealidad del sistema se muestran en la Tabla 30 en ella se presentan los datos con los que se realizó el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados utilizando como variable independiente (X) la concentración de Maleato de Trimebutina y como variable dependiente (Y) a la respuesta (área).

En la Tabla 31 se presentan los resultados del análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados.

En la Figura 46 se muestra la gráfica de esta relación, donde se observa que existe una relación lineal entre la concentración adicionada respecto a la respuesta obtenida.

De acuerdo con los resultados se obtiene una pendiente relativa cercana a 1, así como una ordenada al origen relativa cercana a cero, por otra parte, se obtuvo con un intervalo de confianza al 95 % para la ordenada al origen, encontrándose que incluye al cero, por lo que se puede concluir que la ordenada al origen no es significativamente diferente a cero.

Se obtiene un coeficiente de correlación mayor a 0.99, un coeficiente de determinación mayor a 0.98, y el coeficiente de variación del factor respuesta es menor a 2.0 % lo que significa que hay una relación entre la cantidad adicionada y la respuesta obtenida, que se representa por una línea recta.

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que el sistema cumple con los criterios establecidos para la linealidad en un intervalo de 100.0 a 300.0 µg/mL.

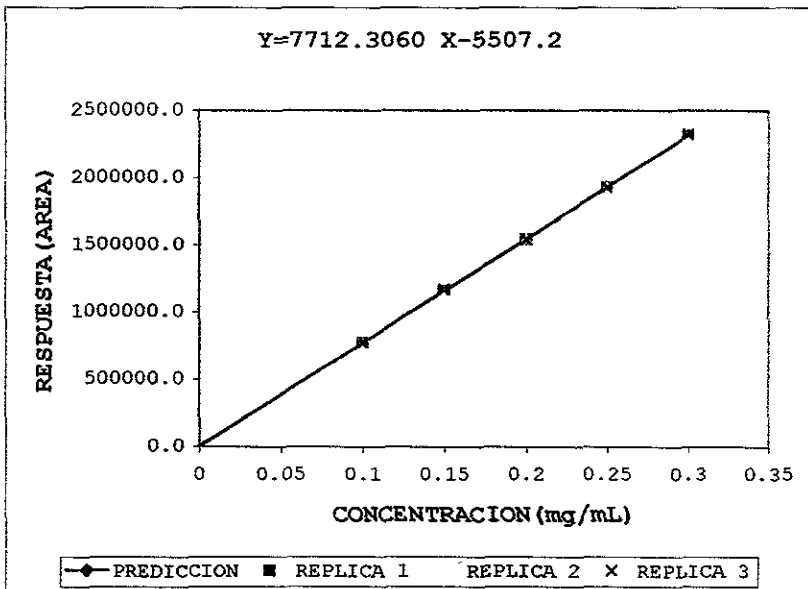


Figura 46. Gráfica de linealidad del sistema (concentración vs respuesta).

4.4.3. PRECISION DEL SISTEMA DEL METODO CLAR PARA VALORAR AL MALEATO DE TRIMEBUTINA EN SOLUCION INYECTABLE.

Tabla 32. Precisión del sistema del método CLAR para valorar al Maleato de Trimebutina en solución inyectable.

REPLICA	CONCENTRACION DE MALEATO DE TRIMEBUTINA (mg/mL)	RESPUESTA
1	0.2000	1543643
2	0.2000	1534304
3	0.2000	1539047
4	0.2000	1536734
5	0.2000	1541156
No.DE DATOS: 5		
PROMEDIO: 1538977		
D.E.: 3653.5		
C.V.: 0.2		

En la tabla 32 se presentan los resultados de la precisión del sistema donde se observa que el coeficiente de variación de las 5 inyecciones de la solución al 100% es menor a 1.5 %.

De acuerdo con los resultados anteriores se cumple con la precisión del sistema.

4.4.4. LINEALIDAD DEL METODO CLAR PARA VALORAR AL MALEATO DE TRIMEBUTINA EN SOLUCION INYECTABLE.

Tabla 33. mg cuantificados y porcentaje cuantificado de Maleato de Trimebutina en cada nivel.

NIVEL %	mg ADICIONADOS	mg CUANTIFICADOS	% CUANTIFICADO
50	25.0	25.2	100.8
	25.0	25.3	101.2
	25.0	25.3	101.2
100	50.0	50.1	100.2
	50.0	49.8	99.6
	50.0	50.2	100.4
150	75.0	75.3	100.4
	75.0	74.7	99.6
	75.0	75.2	100.3
PORCENTAJE CUANTIFICADO:			
No. DE DATOS:		9	
PROMEDIO:		100.4	
D. E.:		0.6	
C. V.:		0.6	

Tabla 34. Análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados.

ANALISIS DE REGRESION LINEAL POR MINIMOS CUADRADOS.	
PENDIENTE =	0.9966
ORDENADA AL ORIGEN=	0.2966
r=	0.99995
r <sup>2</sup> =	0.99991
ERROR ESTANDAR DE REGRESION=	0.2245
PROMEDIO DE X=	50.0000
PROMEDIO DE Y=	50.1248
PENDIENTE RELATIVA=	0.9941
ORDENADA AL ORIGEN RELATIVA=	0.0059
ERROR ESTANDAR DE REGRESION RELATIVO=	0.0045
LIMITE SUPERIOR DEL INTERVALO DE CONFIANZA AL 95 % DE LA ORDENADA=	0.7648094
LIMITE INFERIOR DEL INTERVALO DE CONFIANZA AL 95 % DE LA ORDENADA=	-0.171603



Tabla 35. Intervalo de confianza al 95 % para el promedio del porcentaje cuantificado.

NIVEL	NUMERO DATOS	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR	INTERVALO DE CONFIANZA	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
GLOBAL	9	100.4	0.6	0.1	100.3	100.5
50%	3	101.1	0.2	0.1	101.0	101.2
100	3	100.1	0.4	0.2	99.9	100.2
150%	3	100.1	0.4	0.2	99.9	100.3

En la Tabla 33 se presentan los datos con los que se realizó el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados utilizando como variable independiente (X) a la concentración de Maleato de Trimebutina y como variable dependiente (Y) a la respuesta (área), en la Tabla 34 se presentan los resultados del análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados y en la Tabla 35 se presenta el promedio de los porcentajes cuantificados con un intervalo de confianza al 95 %.

En la Figura 47 se muestra la gráfica de esta relación, donde se observa que existe una relación lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad cuantificada.

De acuerdo con los resultados obtenidos se observa que el coeficiente de determinación es mayor a 0.98, la pendiente no es significativamente diferente a uno y la ordenada al origen no es significativamente diferente a cero.

El promedio del porcentaje cuantificado se encuentra entre 98.0 y 102.0 % con un intervalo de confianza del 95 %, y el coeficiente de variación es menor al 2.0%.

De acuerdo con los resultados obtenidos se cumple con la linealidad del método.

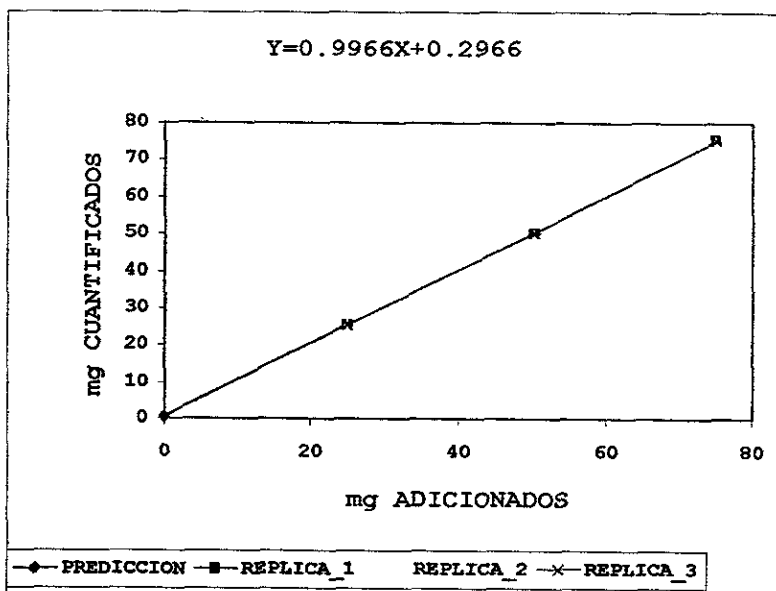


Figura 47. Gráfica de linealidad del método  
(mg adicionados vs mg cuantificados)

4.4.5. EXACTITUD DEL METODO CLAR PARA VALORAR AL  
MALEATO DE TRIMEBUTINA EN SOLUCION INYECTABLE.

Tabla 36. Exactitud y Repetibilidad del método CLAR para valorar al Maleato de Trimebutina en solución inyectable.

NIVEL %	% CUANTIFICADO.
100.0	101.7
100.0	100.3
100.0	100.6
100.0	102.0
100.0	101.0
100.0	101.0
No. DE DATOS:	6
PROMEDIO:	101.1
D.E.:	0.6
C.V.:	0.6
INTERVALO DE CONFIANZA AL 95 %:	PROMEDIO +/-0.2
LIMITE SUPERIOR:	101.3
LIMITE INFERIOR:	100.9

En la Tabla 36 se presentan los resultados del porcentaje cuantificado en las seis réplicas analizadas y se presenta también el intervalo de confianza al 95 % para el promedio de Maleato de Trimebutina cuantificado con un intervalo de confianza al 95 %.

De acuerdo con los resultados obtenidos se encontró que el promedio del porcentaje cuantificado se encuentra entre 98.0 y 102.0 %, así como el porcentaje global con un intervalo de confianza al 95 % se encuentra dentro de este intervalo.

En base a los resultados se cumple con la exactitud del método.

4.4.6. PRECISION DEL METODO CLAR PARA VALORAR AL MALEATO DE TRIMEBUTINA EN SOLUCION INYECTABLE.

4.4.6.1. REPETIBILIDAD DEL METODO CLAR PARA VALORAR AL MALEATO DE TRIMEBUTINA EN SOLUCION INYECTABLE.

Los resultados de la repetibilidad se presentan en la Tabla 36, en donde se puede observar que el coeficiente de variación del porcentaje cuantificado de las 6 réplicas es menor al 2.0 %, por lo que se puede decir que el método es repetible.

4.4.6.2. PRECISION INTERMEDIA DEL METODO CLAR PARA VALORAR AL MALEATO DE TRIMEBUTINA EN SOLUCION INYECTABLE.

Tabla 37. Precisión intermedia del método CLAR para valorar al Maleato de Trimebutina en solución inyectable.

PORCENTAJE CUANTIFICADO		
ANALISTA/DIA	1	2
1	100.7	100.3
	101.2	100.7
	100.9	101.0
2	100.6	100.8
	100.9	100.1
	101.1	100.3
DATOS ESTADISTICOS GLOBALES DEL ANALISIS DE PRECISION INTERMEDIA DEL % CUANTIFICADO.		
n=	12	
PROMEDIO=	100.7	
D.E.=	0.3	
C.V.=	0.3	

Tabla 38. Análisis de varianza para precisión intermedia. efecto del día anidado en analista.

ORIGEN DE LAS VARIACIONES	SUMA DE CUADRADOS	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS	F CALCULADA	PROBABILIDAD (P)
ANALISTA	0.08333	0.08333	0.88	0.3764
DIA	0.43333	0.21667	2.28	0.1645
INTERACCION DENTRO DEL GRUPO	0.08333	0.08333	0.38	0.5984

DADO QUE P ES MAYOR A 0.05 NO EXISTE EVIDENCIA DE QUE LAS FUENTES DE VARIACION TENGAN EFECTO SIGNIFICATIVO.

En la Tabla 37 se observa el coeficiente de variación global obtenido en el análisis de Maleato de Trimebutina por los dos analistas en los dos días, y se aprecia que la variación global no es mayor al 2.0 %.

Adicionalmente se realizó un análisis estadístico con el cual se demostró que no hay diferencia significativa entre el promedio del porcentaje cuantificado entre cada analista, ni entre cada día como se puede observar en la Tabla 38.

Por lo tanto se puede concluir que el método es reproducible entre diferentes analistas y diferentes días.

#### 4.4.7. INTERVALO DEL METODO CLAR PARA VALORAR AL MALEATO DE TRIMEBUTINA EN SOLUCION INYECTABLE.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se dice que el método es lineal, exacto y preciso en el intervalo de 50.0 a 150.0 % de la concentración de Maleato de Trimebutina que se indica en el método, ya que se cumple con los criterios de exactitud, linealidad y precisión.

4.4.8. ROBUSTEZ DEL METODO CLAR PARA VALORAR AL  
MALEATO DE TRIMEBUTINA EN SOLUCION INYECTABLE.

4.4.8.1. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA DEL METODO  
CLAR PARA VALORAR AL MALEATO DE  
TRIMEBUTINA EN SOLUCION INYECTABLE.

Tabla 39. Robustez: Estabilidad de la muestra del método CLAR para valorar al Maleato de Trimebutina en solución inyectable.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (HORAS)	NUMERO DE DATOS	PROMEDIO	D.E.	C.V.	DIFERENCIA (%) *
REFRIGERACION	0	3	100.9	0.3	0.3	
	24	3	100.3	0.1	0.1	0.6
	48	3	99.4	0.1	0.1	1.5
	72		101.8	0.8	0.8	-0.8
OBSCURIDAD	0	3	100.9	0.3	0.3	
	24	3	100.9	0.2	0.2	0.0
	48	3	102.0	0.9	0.9	-1.1
	72		102.4	0.9	0.9	-1.5
LUZ Y OBSCURIDAD	0	3	100.9	0.3	0.3	
	24	3	101.2	0.2	0.2	-0.3
	48	3	101.8	1.8	1.8	-0.8
	72		104.9	2.1	2.0	-3.9

\*DIFERENCIA (%) = DIFERENCIA DE LOS PORCENTAJES CUANTIFICADOS CON RESPECTO AL ANALISIS INICIAL.

En la Tabla 39 se muestran el promedio de los porcentajes cuantificados de Maleato de Trimebutina de las muestras analizadas a las diferentes condiciones y tiempos de almacenamiento, así como la diferencia entre el promedio del porcentaje cuantificado de Maleato de Trimebutina de las muestras almacenadas a diferentes condiciones con respecto al análisis inicial, observándose que las diferencias de los porcentajes cuantificados de las muestras almacenadas en refrigeración y protegidas de la luz son menores al 2.0 %; lo que indica que el Maleato de Trimebutina es estable hasta 72 horas en las condiciones antes mencionadas. Sin embargo, las muestras almacenadas a temperatura ambiente en ciclos normales de luz y oscuridad son estables sólo 48 horas ya que la diferencia

entre el promedio del porcentaje cuantificado de Maleato de Trimebutina de estas muestras con respecto al análisis inicial es menor al 2.0 %, mientras que a las 72 horas, es mayor al 2.0 %.

**4.4.8.2. TOLERANCIA DEL SISTEMA DEL METODO  
CLAR PARA VALORAR AL MALEATO DE  
TRIMEBUTINA EN SOLUCION INYECTABLE.**

Tabla 40. Robustez: Tolerancia del sistema del método CLAR para valorar al Maleato de Trimebutina en solución inyectable.

CONDICION	MUESTRA	PORCENTAJE CUANTIFICADO	NUMERO DE DATOS	PROMEDIO	D.E.	C.V.	DIFERENCIA (%) *
C1	M1	100.9	3	101.0	0.5	0.5	
	M2	100.6					
	M3	101.6					
C2	M1	101.0	3	100.5	1.2	1.2	0.5
	M2	101.3					
	M3	99.1					
C3	M1	101.8	3	101.0	1.0	1.0	0.0
	M2	101.4					
	M3	99.9					
C4	M1	101.5	3	101.0	0.4	0.4	0.0
	M2	100.8					
	M3	100.7					
C5	M1	101.0	3	100.3	0.7	0.7	0.7
	M2	99.6					
	M3	100.3					
C6	M1	101.5	3	102.4	-0.8	0.7	-1.4
	M2	102.9					
	M3	102.7					

Tabla 41. Parámetros cromatográficos obtenidos en promedio para cada condición probada en la tolerancia del sistema.

CONDICION	COLEO	K'	N
1	2.0	5.0	1712.5
2	2.0	3.2	1831.8
3	2.2	6.2	1820.8
4	2.2	4.6	1811.3
5	2.2	4.9	1678.4
6	2.1	5.9	1814.8

\*Estos datos se obtuvieron de la solución de la sustancia de referencia que se emplea para conocer la adecuación del sistema.

Los porcentajes cuantificados de Maleato de Trimebutina en las muestras analizadas variando ligeramente la composición de la fase móvil y en el cambio de columna se presentan en la Tabla 40.

Se observa también que para todas las condiciones de análisis, el coeficiente de variación de las tres muestras analizadas es menor al 2.0 % y la diferencia del promedio de los porcentajes cuantificados con respecto a el promedio de los porcentajes cuantificados a las condiciones iniciales es menor al 2.0 %.

También se observó que los productos de degradación que se obtuvieron cuando las muestras se sometieron a las diferentes condiciones de degradación, no interfirieron con la cuantificación del Maleato de Trimebutina, en las diferentes condiciones analizadas.

Por otra parte se observa en la Tabla 41 los parámetros cromatográficos obtenidos en promedio para cada condición probada, estos resultados nos permiten determinar bajo que condiciones la columna cromatográfica es eficiente para este método; con estos resultados se puede concluir que el sistema cromatográfico es adecuado siempre y cuando se presente un coleo de aproximadamente 2, el número de platos teóricos se encuentre entre 1678 y 1831, la K' se encuentra entre 3.2 y 6.2.

En base a los resultados obtenidos se dice que método tolera pequeñas variaciones en la composición de la fase móvil y cambios en el lote de la columna.



## CAPITULO V

### 5. CONCLUSIONES.

Se validaron los métodos potenciométrico y espectrofotométrico para valorar el Maleato de Trimebutina materia prima con el propósito de contar con un método que permita caracterizarlo y asegurar su identidad, potencia, calidad y pureza con el objeto de utilizarlo como sustancia de referencia secundario.

Los métodos validados para valorar al Maleato de Trimebutina materia prima son lineales en el intervalo de concentración y de cantidad de muestras probadas, son exactos, precisos y reproducibles.

Las muestras procesadas de Maleato de Trimebutina materia prima en los dos métodos son estables por 48 horas en las condiciones de refrigeración, protegidos de la luz y ciclos normales de luz y oscuridad.

Se propone la monografía de Maleato de Trimebutina materia prima, la cual se desarrolló en base a los resultados obtenidos y de acuerdo a las especificaciones proporcionadas por el proveedor.

Se desarrolló un método indicador de estabilidad por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en fase reversa para cuantificar Maleato de Trimebutina en solución inyectable.

El método desarrollado para cuantificar Maleato de Trimebutina en solución inyectable es específico ya que se probó que puede separar al Maleato de Trimebutina de los productos de degradación y de los excipientes.

El método desarrollado para cuantificar Maleato de Trimebutina en solución inyectable es sencillo de realizar, utiliza pocos reactivos, y no requiere del uso de estándar interno, lo que lo hace un buen método para usarse de manera rutinaria.

En base a los resultados obtenidos en la validación del método para cuantificar Maleato de Trimebutina en solución inyectable, se concluye que es lineal en el intervalo de 50 a 150 % de la concentración esperada del Maleato de Trimebutina, es exacto, preciso y reproducible.

Las muestras de Maleato de Trimebutina en solución inyectable una vez preparadas, son estables hasta 72 horas en las condiciones de refrigeración y protegidas de la luz, y son estables hasta 48 horas en las condiciones de ciclos normales de luz y oscuridad a temperatura ambiente.

El método para cuantificar Maleato de Trimebutina en solución inyectable, tolera pequeñas variaciones en la composición de la fase móvil y cambios en el lote de la columna.

## CAPITULO VI.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Windholz, M., The Merck Index, 20<sup>a</sup>.ed., Merck & Co.Inc., Rahway, NJ U.S.A., 1996.p.1652-1653.
2. Reynolds, E.F. Martindale. The Extra Pharmacopoeia, 30<sup>a</sup> ed., The Pharmaceutical Press, London, 1993. p.1423-1424.
3. J.Elks and C.R. Granellin. Chemical Data, Structure and Bibliographies. Chapman and Hall. Great Britain. 1990. p.1246.
4. Guía Profesional De Medicamentos. 4<sup>a</sup>. ed.El Manual Moderno. México. 1994. p.805-806.
5. Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la terapéutica. 8<sup>a</sup> ed., Médica Panamericana. México., 1991. p.879-905.
6. Rosentein, Emilio. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, 44<sup>a</sup> ed., Ed. P.L.M., México, D.F., 1998. p.1209-1211.
7. Igawa, O., Kotake H., et. al., Effects of trimebutine maleate on electrical activities of isolated mammalian cardiac preparations. Journal Pharm. Pharmacol. 41, 311-315, (1989).
8. Roux, C.P. and Torossian, D. Preparation of amino alcohols and their esters, Chemical Abstracts. 1107, 15777-15778, (1964).
9. Musumarra, G. and Guiseppa, C., Identification of drugs by principal components analysis of standardized thin-layer chromatographic data in four eluents systems, Journal of chromatographic. 1350, 151-168, (1985).
10. Astier, A. and A.M. Deutsch. Quantitative high-performance liquid chromatographic determination of antiespasmotic trimebutine in human plasma, Journal of Chromatography. 1224, 149-155, (1981).
11. Ayres H. Gilbert. Análisis Químico Cuantitativo. Segunda Edición. Ed.Harla. México. 1980.p.463-475, 522-537.

12. Watty B., Margarita. Química Analítica. Alhambra Mexicana. México. 1982.p.116-127, 217-241, 408-413, 428-458.
13. Skoog D.A., West D.M. Análisis Instrumental. Segunda Edición. Mc Graw Hill.México.1989. p 178-213, 561-583.
14. Quattrocchi,O.A.,Abelaira,S.I.,Laba,R.F.Introducción a HPLC. Ed. Buenos Aires.1992.p.10-37,90-123.
15. Snyder,Lloyr R.,Josheph,L.G.and Joseph J. Kirkland, Practical HPLC methods development, Ed.John Wiley and sons,U.S.A.1988.p.16-81.- ,173-183.
16. R.W.Yost, L.S.Ettre, R.D.Conlon. Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica. Ed.PERKIN-ELMER. 1980. USA. p.32-96.
17. Vickey,Thomas M, Liquid Chromatography Detectors, Ed. Marcel Dekker Inc., New York, USA, 1983, P.23-125.
18. The United Stated Pharmacopeia.Twenty-third Edition (USA 23). The United States Pharmacopeia. Convention, Inc.Rockville,M.D. USA. p.1773-1777, 1982-1984.
19. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 6ª Ed. México.1994.p.101-112.
20. Waters. PDA Software User's Guide. Millennium Chromatography Manager. Waters Corporation. USA. p.8-1 a 8-10. 1994.
21. Alfredson,T. And Sheehen,T.Recent developments in multichannel, photodiode-array,optical LC Detection. Journal of chromatographic Science. 124,473-482,(1986).
22. Wieland Gerhard, Cabrera Karin, Eymann Wolfgang.A Proposal for a Universal Column Quality Certificate for HPLC Columns. LC-GC. 15 (2),98-105,(1997).
23. Kirkland, J.J.Practical Method Development Strategy for Reversed-Phase HPLC of Ionizable Compounds. LC-GC.14 (6), 486-500,(1996).

24. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.  
Requisitos Mínimos para la validación de Métodos Analíticos.  
México. 1994.p.1-71.
25. International Conference on Harmonization  
Text on Validation of Analytical Procedures. October,1994.
26. International Conference on Harmonization  
Validation of Analytical Procedures. ,March,1995.
27. Center for Drug Evaluation and Research. Validation Of  
Chromatographic Methods. November,1994.
28. Green Mark, J. A Practical Guide to Analytical Method  
Validation. Analytical Chemistry News & Features. May.  
305 A - 309 A. (1996).
29. Krull Ira, Swartz Michael.Introduction:National and  
International Guidelines. LC-GC. 15 (6).534-538. (1997).
30. Cardone, Mario J., Methods Validation revisete:A chemometric  
approach, Pharmaceutical Research. 17 (2),154-164 (1990).
31. Dobesis Eileen, Submitting HPLC methods to the compendial and  
regulatory agencies, Pharmaceutical Technology, 124-135,1982.
32. Christensen B. Howard. Estadística Paso a Paso. Ed. Trillas.  
México. 1997. p.309-356.
33. González Sánchez Francisco Javier. Tesis Profesional:  
Optimización y Validación de un Método Analítico para Estudios  
de Estabilidad por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución  
para Maleato de Trimebutina en comprimidos.UNAM. México. 1994.
34. Especificaciones para el Maleato de Trimebutina Materia Prima.  
Proveedor: Refarmed Chemicals Ltd. Switzerland.