



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE**  
**MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**  
**“ZARAGOZA”**

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DE  
VALORACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS DE  
ALTA RESOLUCIÓN PARA DETERMINAR  
METRONIDAZOL EN TABLETAS.**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
**P R E S E N T A :**  
**MONICA ELIZABETH CONTRERAS VARGAS**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A DIOS:**

POR DEJARME DESPETAR CADA DÍA PARA SEGUIR LUCHANDO POR MIS SUEÑOS.

### **A MIS PADRES:**

POR HABERME DADO LA VIDA, POR SU AMOR Y APOYO INCONDICIONAL, POR DARME LA OPORTUNIDAD DE ESTUDIAR, POR LAS NOCHES DE DESVELO, POR SUS CONSEJOS Y REGAÑOS, YA QUE SIN ELLOS NO SERÍA QUIEN SOY. POR ESTAR SIEMPRE CUANDO LOS NECESITO, POR TODO LO QUE ME DAN, POR SER LOS MEJORES PADRES; LOS AMO.

### **A MIS HERMANAS ERICA, YOLANDA, PAOLA Y FERNANDA:**

POR SER MIS MEJORES AMIGAS, POR DARME SU CARIÑO, SU APOYO, SU ALEGRIA, SU COMPRENSIÓN. POR AYUDARME A SEGUIR ADELANTE; LAS QUIERO MUCHO.

### **A MI ESPOSO FERNANDO:**

POR SER TU, POR SER MI COMPLICE Y MI COMPAÑERO, POR TU AMOR, TU COMPRENSIÓN, TU TIEMPO, TU PACIENCIA, TU APOYO, POR ESTAR EN EL LUGAR Y EN EL MOMENTO ADECUADO, POR COMPARTIR TU VIDA CONMIGO, POR ENSEÑARME QUE SIEMPRE HAY ALGO MAS ALLÁ DE LO QUE SE VE A SIMPLE VISTA, POR INSPIRARME A SER UNA MEJOR PERSONA EN TODOS LOS SENTIDOS; TE AMO PROFUNDAMENTE.

### **A LA SRA. ALEJANDRA Y EL SR. ALBERTO:**

GRACIAS POR SU CARIÑO, SU APOYO Y SU COMPRENSIÓN. POR DEJARME SER SU AMIGA MÁS QUE SU NUERA.

### **A LORE Y A JOSÉ:**

GRACIAS POR SU CARIÑO Y APOYO. POR DARME LA OPORTUNIDAD DE SER SU AMIGA.

### **A PATY:**

GRACIAS POR SER MI AMIGA, POR TU TIEMPO, POR LOS CONOCIMIENTOS QUE COMPARTISTE CONMIGO, POR AYUDARME A ALCANZAR ESTA META TAN IMPORTANTE PARA MI, POR BRINDARME TU AMISTAD.

### **A LIDIA:**

GRACIAS POR SER MI AMIGA Y BRINDARME TU AMISTAD, TU APOYO Y CONFIANZA.

**A MIS COMPAÑEROS DE BEST:**

A LA QUÍMICA SILVIA NAVA POR EL APOYO TECNICO BRINDADO. ESPECIALMENTE A MONICA H., CRISTINA R., KARINA R., ALFREDO C., ALE Y., NORMA S. Y LETICIA G., POR BRINDARME SU AMISTAD Y SU APOYO.

**A MIS SINODALES:**

GRACIAS POR LAS OBSERVACIONES Y SUGERENCIAS HECHAS AL PRESENTE TRABAJO.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
1. INTRODUCCIÓN.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2. MARCO TEORICO.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.1. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.1.1. PRECISIÓN DEL SISTEMA.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.1.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.1.3. ESPECIFICIDAD.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.1.4. EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.1.5. LINEALIDAD DEL METODO.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.1.6. EXACTITUD DEL MÉTODO.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.1.7. ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.1.8. ROBUSTEZ.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.1.9. TOLERANCIA.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.2. CROMATOGRAFÍA.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.2.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.2.1.1. CROMATOGRAFÍA PLANA.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2.1.1.1. CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2.1.1.2. CROMATOGRAFÍA EN PAPEL.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2.1.1.2.1. CROMATOGRAFÍA DESCENDENTE.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2.1.1.2.2. CROMATOGRAFÍA ASCENDENTE.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2.3. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.2.3.1. CROMATOGRAFÍA DE ADSORCION EN COLUMNA.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2.3.2. CROMATOGRAFÍA DE PARTICIÓN EN COLUMNA.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2.3.3. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2.4. CROMATOGRAFIA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).;¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.	
2.2.4.1. EQUIPO.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.3 METRONIDAZOL.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.3.1 DESCRIPCIÓN.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.3.2. PROPIEDADES FÍSICAS.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.3.3. PROPIEDADES BIOLÓGICAS.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.3.3.1. ACCIÓN FARMACOLÓGICA.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.3.3.2. FARMACOCINÉTICA.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.3.3.2.1 ABSORCIÓN.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.3.3.2.2 DISTRIBUCIÓN.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.3.3.2.3 METABOLISMO.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.3.3.2.4 EXCRECIÓN.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
3. PROBLEMA RESUELTO.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
4. OBJETIVOS.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
5. MATERIALES.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
6. METODOLOGÍA.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
7. RESULTADOS.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
8. ANALISIS DE RESULTADOS.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
9. CONCLUSIONES.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
10. ANEXOS.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
11. BIBLIOGRAFIA.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

# RESUMEN

El método de producto terminado cambió de un análisis espectrofotométrico, desarrollado en el mismo laboratorio, al de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, motivo por el cual se tiene que validar dicho método con los nuevos requerimientos de Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 8ª Edición. Solo se realiza una validación para comprobar que puede ser utilizado como método rutinario para control de calidad.

En el presente trabajo se realizó la validación del método de valoración de metronidazol en tabletas, que aparece en la FEUM 8ª. Edición, para comprobar que puede ser determinado, sin que interfiera ninguno de los componentes de la formulación.

Para esto se evaluaron los diferentes parámetros que involucra una validación para métodos farmacopeicos, para producto terminado, fisicoquímico para cuantificar el analito, las cuales son: linealidad y precisión del sistema, linealidad y exactitud del método, reproducibilidad, especificidad para control de calidad, tolerancia y estabilidad de la muestra.

Con los resultados obtenidos de dichos parámetros se pudo determinar a que intervalo el método es lineal, reproducible y exacto, así como las variables que en un momento dado pueden afectar o no los resultados obtenidos en los análisis de rutina y saber que medidas se tomarán cuando esto suceda.

# 1. INTRODUCCIÓN.

Los métodos analíticos se dividen en dos principales categorías: farmacopeicos, que aparecen en alguna farmacopea como por ejemplo: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), United States Pharmacopoeia (USP), British Pharmacopoeia (BP), European Pharmacopoeia (EP), etc.; y los no farmacopeicos (que aparecen en artículos, aplicaciones técnicas, etc.) y que no están en ninguna farmacopea. También se dividen en varios grupos en función de su aplicación: métodos para producto a granel, producto terminado, materia prima e indicadores de estabilidad.

De acuerdo a la NOM-059 la definición de validación de un método analítico es un proceso por el cual queda establecido, por estudio de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. El método en cuestión es un método farmacopeico de producto terminado, fisicoquímico, para cuantificar el analito, es decir para uso de control de calidad, por lo cual se deben realizar las siguientes determinaciones: linealidad del sistema, precisión, especificidad, exactitud y reproducibilidad, linealidad del método, estabilidad analítica de la muestra y tolerancia. **(1) (4)**.

## 2. MARCO TEORICO.

### 2.1. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

La validación de métodos analíticos es parte fundamental del desarrollo de una nueva formulación y de la técnica de análisis de control de calidad de una forma farmacéutica, ya que es durante esta secuencia de pruebas y análisis, en donde el químico se da cuenta si el estudio, el cual esta siendo evaluado sistemáticamente, cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado.

De acuerdo a la Buenas Practicas tanto de Fabricación como de Laboratorio, es necesario que todos los métodos analíticos empleados estén validados.

Cuando se tiene interés en medir un componente en una muestra, es necesario contar con una metodología de medición (método analítico). Por ello las empresas, principalmente las farmacéuticas requieren de esta clase de metodologías, pudiendo utilizar metodologías farmacopeicas o bien, dedicar tiempo para su desarrollo, partiendo del hecho de que deben cumplir el atributo de confiabilidad. Es necesario llevar a cabo estudios experimentales que permitan demostrar la confiabilidad de lo que se está midiendo. Un proceso que permite cumplir este fin, es la validación.

Todo producto farmacéutico debe reunir atributos de identidad, pureza, concentración, potencia, inocuidad y disponibilidad para cumplir con los aspectos normativos oficiales e internos y no menos importantes, los éticos, por lo que si un método analítico no es confiable se corre el grave riesgo de afectar al usuario final.

Desde este enfoque, la validación de métodos analíticos es un sistema involucrado en los procesos de fabricación en el área de calidad de la empresa y bajo la filosofía de la Validación, las Autoridades Regulatorias verifican que las empresas sustenten estos sistemas con actividades documentadas, como se indica en la NOM-059 SSA1 numerales 5.6.3, 5.7.4, 9.11.3, 9.11.5 y 9.12.3 y en otros lineamientos regulatorios internacionales. **(1).**

El objetivo final de un dictamen de calidad, es la liberación o no liberación de un producto sobre la base de las especificaciones previamente establecidas. Esta decisión es tomada generalmente por el profesional farmacéutico, en gran medida está dada por los resultados obtenidos al aplicar uno o diversos métodos analíticos. La validación le proporciona, a quien aplica la metodología, una seguridad de la confiabilidad de dichos métodos y puede tomar la decisión final con certeza. La validación de métodos analíticos también impacta en otras áreas relacionadas a la calidad de un producto (estabilidad, limpieza de equipos, entre otras).

Un método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra. Un analito se define como un componente específico en una muestra a medir en un análisis; por lo que un método analítico mide un componente específico (analito) en una muestra y como todo proceso de medición, éste debe ser confiable para ser utilizado con un propósito definido. La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación deseada: es decir cumple con su propósito. **(1).**



Esta actividad puede ser justificada por los siguientes aspectos regulatorios:

**Reglamento de insumos para la salud.** Publicado en el Diario Oficial el 4 de febrero de 1998 referente a los establecimientos que se destinen a la fabricación de insumos (medicamentos, fármacos, materias primas y aditivos), establece lo siguiente:

ARTICULO	CONTENIDO
15	Los establecimientos que se destinen a la fabricación de insumos, llevarán el control analítico de estos. Dicho control deberá incluir:  III. La validación de las técnicas empleadas.

**Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993.** Buenas Prácticas de Fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos, establece los siguientes puntos referentes a la Validación de Métodos Analíticos.

NUMERAL	CONTENIDO
5.6	El encargado del área de producción se encargará de realizar las siguientes funciones, sin perjuicio de las obligaciones y responsabilidades que correspondan al responsable sanitario, conforme a la Ley General de Salud:
5.6.3	Que se lleven a cabo estudios de validación de los procesos de fabricación y de los sistemas involucrados.
5.7	El encargado del área de calidad se encargará de realizar las siguientes funciones, sin perjuicio de las obligaciones y responsabilidades que corresponden al responsable sanitario, conforme a la Ley General de Salud:
5.7.4	Que se lleven a cabo estudios de validación de los procesos de fabricación y de los sistemas involucrados.
9.11.3	Los métodos analíticos deben ser validados, de acuerdo con lo establecido en el apartado 9.12 “control del laboratorio analítico”.
9.12.3	Se debe contar con métodos de análisis validados para producto a granel, producto terminado y materia prima en caso de no aparecer en cualquier farmacopea internacional ni en la FEUM.

**Norma Oficial Mexicana NOM-164-SSA1 –1998,** Buenas Prácticas de Fabricación para fármacos.

NUMERAL	CONTENIDO

16.1	Los controles de laboratorio e inspecciones deben apoyarse en normas, PNO's o manuales que contengan las especificaciones para garantizar la confiabilidad de sus resultados. Tales controles deben incluir:
16.1.5	Validación de Métodos Analíticos utilizados por la empresa, no farmacopeicos o farmacopeicos que tengan desviaciones frente a la farmacopea de referencia.

**Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-1993, Estabilidad de medicamentos.**

NUMERAL	CONTENIDO
5.5	Cuando se cambie el método analítico durante el estudio de estabilidad, se debe demostrar que los métodos analíticos son equivalentes mediante el proceso de validación.
5.10.2	Información general, especificaciones y métodos analíticos:
5.10.2.3	Información de la linealidad, precisión, exactitud, reproducibilidad, repetibilidad y especificidad del método analítico indicativo de estabilidad.
6.	Fármacos  Para fines de registro de un medicamento con fármacos nuevos en México, el fabricante del medicamento debe presentar ante la Secretaría de salud estudios de estabilidad acelerada y/o a largo plazo de tres lotes del (los) fármaco(s) efectuados por le fabricante de los mismos, utilizando métodos analíticos validados.

Las regulaciones anteriores, determinan la obligación de validar métodos analíticos. Estas regulaciones podrían ser modificadas, por lo que es importante estar actualizadas.

Los métodos analíticos se clasifican bajo los siguientes criterios:

1). En función de su estado regulatorio en:

- a) Métodos farmacopeicos. Todos aquellos métodos que aparecen en

cualquier farmacopea (FEUM, USP, BP, EP, etc.).

- b) Métodos no farmacopeicos. Aquellos métodos no comprendidos en una farmacopea.

2). En función de su aplicación (NOM-059-SSA1 y NOM-073-SSA1) en:

- a) Métodos para producto a granel.
- b) Métodos para producto terminado.
- c) Métodos para materia prima.
- d) Métodos indicadores de estabilidad.

3). En función de la naturaleza de la respuesta analítica en:

- i. Métodos físico-químicos. Cuando la respuesta es de carácter físico (absorción de luz, emisión de luz, voltaje, etc.) o químico (consumo de iones-OH, consumo de un acomplexante, etc.).
- ii. Métodos biológicos. Cuando la respuesta es de carácter biológico (crecimiento de un microorganismo, protección, muerte, etc.).

4). En función de su propósito analítico en:

- a) Métodos para cuantificar el analito (contenido o potencia).
- b) Métodos para establecer la presencia del analito a un límite.
- c) Métodos para identificar el analito.

Esta última clasificación es la que se utiliza para establecer los parámetros de desempeño a estudiar en la validación del método analítico.

Cualquier método analítico puede estar constituido por técnicas de separación, extracción, etc., y por técnicas de medición (espectrofotometría, volumetría, colorimetría, potenciometría, etc.) que permiten medir la respuesta del analito en la muestra.

5). En función de la naturaleza del sistema de medición se clasifican en:

- a) Métodos en los cuales el instrumento de medición de la respuesta analítica, permite medir una señal de ruido (cromatógrafo de líquidos, cromatógrafo de gases, espectrofotómetros, etc.).
- b) Métodos en los cuales el instrumento de medición no permite medir una señal de ruido (buretas, medidor de halos, potenciómetros, etc.) **(1)**.

## PARÁMETROS DE DESEMPEÑO

En función de la aplicación analítica de un método, la siguiente tabla indica los parámetros de desempeño a estudiar.

PARÁMETRO DE DESEMPEÑO	CONTENIDO/ POTENCIA/ VALORACIÓN	PRUEBAS DE IMPUREZAS		IDENTIFICACIÓN
		CONTENIDO/ VALORACIÓN	LÍMITE	
PRECISIÓN/ ADECUABILIDAD DEL SISTEMA	SI	SI	SI	*
LINEALIDAD DEL SISTEMA	SI	SI	NO	NO
ESPECIFICIDAD <sup>1</sup>	SI <sup>3</sup>	SI	SI	SI
EXACTITUD Y REPETIBILIDAD	SI	SI	NO	NO
LINEALIDAD DEL MÉTODO	SI	SI	NO	NO
PRECISIÓN DEL MÉTODO O PRECISIÓN INTERMEDIA <sup>2</sup>	SI	SI	NO	NO
ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA	*	*	NO	NO
LÍMITE DE DETECCIÓN	NO	NO	SI	NO
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	NO	SI	NO	NO
ROBUSTEZ	*	*	*	NO
TOLERANCIA	*	*	*	NO

Tabla No. 1. Parámetros de desempeño. (1).

\* PUEDE SER REQUERIDO DEPENDIENDO DE LA NATURALEZA DEL MÉTODO.

1. La falta de especificidad de un método analítico, puede ser compensada por otra alternativa analítica de soporte, como por ejemplo cromatografía de capa fina.
2. También es definido como un estudio de tolerancia.
3. Un método que es exacto y lineal, por definición es específico al placebo analítico o a los otros componentes de la muestra.

### 2.1.1. PRECISIÓN DEL SISTEMA.

#### 2.1.1.1. METODOLOGÍA.

Un analista debe preparar por lo menos un sextuplicado de soluciones a la concentración del analito que represente la concentración de la solución de referencia utilizada, o en ciertos casos, la concentración de la solución al 100% de la muestra procesada para su medición; preparadas por dilución o por pesadas independientes. Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones.

Calcular, S y CV de la respuesta analítica.

S=desviación estándar.

CV=coeficiente de variación.

Para los sistemas biológicos, se deben cumplir los criterios de validez inherentes al diseño del bioensayo.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN.

$CV \leq 1.5\%$  para métodos fisico-químicos.

$CV \leq 3 \%$  para métodos biológicos.

Valores superiores deben ser justificados.

Cualquier otro criterio de aceptación, debe ser justificado.

Fórmulas:

MEDIA ARITMÉTICA:

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

DESVIACIÓN ESTÁNDAR:

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

COEFICIENTE DE VARIACIÓN:

$$CV = \frac{s}{\bar{y}} * 100$$

n = número de determinaciones.

PROCEDIMIENTO PARA EL CÁLCULO:

1) Tabular los resultados:

Propiedad medida de la solución de referencia

Valor 1

Valor 2

Valor 3

Valor 4

Valor 5

Valor 6

2) Calcular  $\sum y$ ,  $\sum y^2$  y determinar n.

- 3) Calcular la media aritmética y la desviación estándar.
- 4) Calcular el coeficiente de variación. (1), (2).

## 2.1.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

### 2.1.2.1. METODOLOGÍA.

Un analista debe preparar por lo menos por triplicado 5 niveles de concentración (intervalo) de la solución de referencia ya sea por dilución (a partir de una misma solución concentrada) o por pesadas independientes (cuando no sea posible prepararlas por dilución). La concentración central debe ser igual a la que se prepara la solución de referencia en el método o en ciertos casos, la concentración que represente el 100% en la muestra procesada para su medición. El intervalo debe incluir la especificación para el caso de aquellos métodos utilizados para el contenido/potencia/valoración. Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de medición, reportar la relación concentración vs. respuesta analítica. Calcular el valor de la pendiente ( $b_1$ ), la ordenada al origen ( $b_0$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el intervalo de confianza para la pendiente (IC( $\beta_1$ )).

El intervalo está en función del propósito del método, y por lo general se expresa en porcentaje (%) de la concentración de la solución de referencia o en función del contenido del analito en la muestra procesada para su medición.

Para contenido/potencia/valoración se sugiere un mínimo de  $\pm 20\%$ .

Para contenido/valoración de impurezas desde un nivel apropiado hasta un 20% por arriba de la especificación.

Para métodos indicadores de estabilidad desde un nivel adecuado hasta un 120%.

Es crítico que el intervalo no excluya valores de concentración que potencialmente puedan dar lugar al contenido del analito en la muestra.

### 2.1.2.2. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

$$r^2 \geq 0.98$$

IC ( $\beta_1$ ), no debe incluir el cero.

Cualquier otro criterio de aceptación debe ser justificado.

Es conveniente trazar la gráfica de concentración (x) vs. la respuesta analítica (y), e incluir en ella la ecuación, la línea de ajuste y el coeficiente de determinación

Fórmulas

PENDIENTE:

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

n = número de mediciones (concentración-respuesta analítica)

ORDENADA AL ORIGEN

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION:

$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)} * 100$$

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA PENDIENTE

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$$

$$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$$

$t_{0.975, n-2}$  Referirse al anexo 7, para determinar el valor de la *t de Student*.

PROCEDIMIENTO PARA EL CÁLCULO:

5) Tabular los resultados en la siguiente tabla:

Propiedad medida de la solución de referencia (y)

CONCENTRACIÓN DEL ANALITO	RESPUESTA OBTENIDA	FACTOR (RESPUESTA OBTENIDA/CONCENTRACIÓN)
VALOR 1	VALOR 1	VALOR 1
VALOR 2	VALOR 2	VALOR 2
VALOR 3	VALOR 3	VALOR 3
VALOR 4	VALOR 4	VALOR 4
VALOR 5	VALOR 5	VALOR 5
VALOR 6	VALOR 6	VALOR 6
VALOR 7	VALOR 7	VALOR 7
VALOR 8	VALOR 8	VALOR 8
VALOR 9	VALOR 9	VALOR 9
VALOR 10	VALOR 10	VALOR 10
VALOR 11	VALOR 11	VALOR 11
VALOR 12	VALOR 12	VALOR 12
VALOR 13	VALOR 13	VALOR 13
VALOR 14	VALOR 14	VALOR 14
VALOR 15	VALOR 15	VALOR 15

- 6) Calcular  $\sum x$ ,  $\sum y$ ,  $\sum x^2$ ,  $\sum y^2$   $\sum xy$  y determinar n.
- 7) Calcular  $b_1$ ,  $b_0$  y  $r^2$ .
- 8) Calcular  $S_{y/x}$  y  $S_{b1}$ .
- 9) Determinar en el anexo 7  $t_{0.975, n-2}$  y calcular IC( $\beta_1$ ). (1), (2).

### 2.1.3. ESPECIFICIDAD.

#### 2.1.3.1. METODOLOGÍA.

Partiendo de la experiencia en el análisis de la muestra, se deben establecer las posibles sustancias interferentes y adicionar cantidades conocidas de éstas, solas o combinadas a la muestra y evaluar su respuesta al método, bajo las mismas condiciones de análisis.

Para métodos de identificación: se deben seleccionar sustancias que potencialmente interfieran en la determinación con base en la estructura molecular del analito, precursores, sustancias relacionadas, vías degradativas, etc.

Para métodos de contenido/potencia/valoración: Se deben analizar placebos del producto, como lo indica el método, muestras del producto, y cuando proceda:

- sustancias relacionadas;
- precursores;
- homólogos;

y una mezcla del producto con ellos o cualquiera de ellos.

Para métodos de contenido/valoración de impurezas: si se dispone de las impurezas se deben adicionar éstas al analito y/o a la muestra analítica en niveles que incluya la especificación. Analizar como lo indica el método. Cuando no se dispone de éstas, la muestra que contiene el analito debe someterse a condiciones que generen su inestabilidad química (luz, calor, humedad, hidrólisis ácido-básica y oxidación) y aplicar el método a la muestra resultante.

Para métodos de límite de impurezas: proceder a analizar las muestras individuales de la impureza (orgánicas, inorgánicas o solventes residuales), el producto (de pureza aceptable) y la mezcla de estos como lo indica el método.

Para métodos indicadores de estabilidad: en caso de contar con los productos de degradación, preparar muestras con placebo adicionado de éstos, el placebo adicionado de analito y de productos de degradación y analizar con el método.

Si no se cuenta con los posibles productos de degradación se pueden emplear, dependiendo de la naturaleza química del analito y si es posible, las siguientes condiciones para favorecer la inestabilidad del analito en la muestra:

- 1) Someter el analito, el placebo y la muestra en un horno de 70° C a 120° C o a 20° C por debajo del punto de fusión del analito de 2 a 4 semanas.
- 2) Exponer el analito, el placebo y muestra a la luz UV, fluorescente y/o humedad relativa, por un tiempo apropiado.



- 3) Hacer soluciones del analito, ajustando el pH de 1 a 2 y/o de 10 a 12 y someterlas a 60° C-80° C por un tiempo apropiado.
- 4) Para formas farmacéuticas líquidas o semisólidas, adicionar peróxido de hidrógeno para favorecer la oxidación del analito.

Estos estudios no se deben llevar a cabo para analitos que según la bibliografía, tengan propiedades reactivas que puedan dar lugar a condiciones inseguras al someter las muestras a las condiciones antes mencionadas.

El tiempo y las condiciones se seleccionan con el fin de degradar al analito a niveles entre el 15 y el 30%.

En el caso de métodos no selectivos, como por ejemplo los métodos que utilizan sistemas de medición volumétricos, la especificidad para los componentes de una muestra, es sustentada con los resultados de exactitud y linealidad del método, si el método cumple con los criterios de aceptación.

Cuando haya duda en la demostración de la especificidad de un método analítico, se sugiere que sea investigada por otra metodología de soporte.

#### 2.1.3.2. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

La respuesta del método únicamente debe ser debida al analito. **(1), (2).**

### **2.1.4. EXACTITUD DEL MÉTODO.**

#### 2.1.4.1. METODOLOGÍA.

A) Se conocen los componentes de la muestra y es posible preparar un placebo analítico.

Un analista debe preparar el placebo analítico con el tipo de componentes que generalmente están presentes en la muestra. A la cantidad de placebo analítico equivalente a una muestra analítica por sextuplicado, adicionarle la cantidad de analito (puede ser sustancia de referencia secundaria) correspondiente al 100% de éste en la muestra. Los placebos adicionados deben ser analizados por un mismo analista bajo las mismas condiciones, utilizando como referencia, la sustancia empleada en la adición al placebo analítico, Determinar la cantidad recuperada del analito.

B) No se conocen los componentes de la muestra

Un analista debe analizar la muestra con el método, para determinar el contenido del analito. El mismo analista debe preparar por lo menos 6 muestras adicionadas del analito, por ejemplo utilizando la mitad de la muestra analítica que originalmente requiere el método y adicionar el analito (puede ser una sustancia de referencia secundaria) hasta completar lo que represente el 100% de este en la muestra. Las muestras adicionadas deben ser analizadas por un mismo analista bajo las mismas condiciones utilizando como referencia la sustancia empleada en la adición de la muestra. Determinar la cantidad recuperada del analito.

Cuando no sea posible adicionar de manera directa el analito a la muestra, la adición puede ser llevada a cabo en alguna etapa del método. Se recomienda que la adición se lleve a cabo en las primeras etapas, para poder asegurar que las etapas posteriores no den lugar a resultados incorrectos. Por ejemplo, si una muestra se debe extraer, filtrar y diluir, es conveniente que la adición se lleve a cabo antes de extraer ya que si existiera algún problema con la extracción o con la filtración y el analito se adiciona al placebo analítico o la muestra hasta antes de diluir, puede dar lugar a resultados incorrectos.

Calcular el porcentaje de recobro de cada placebo analítico o muestra adicionada, al obtener el cociente de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada expresada en porcentaje.

Calcular el promedio aritmético ( $\bar{y}$ ), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional IC ( $\mu$ ) del porcentaje de recobro.

#### 2.1.4.2. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

El IC ( $\mu$ ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del por ciento de recobro se incluya en el intervalo:

98-102% si el método es cromatográfico,

98-102% si el método es volumétrico,

97-103% si el método es químico o espectrofotométrico,

95-105% si el método es microbiológico,

El CV del por ciento de recobro:

no debe ser mayor de 2% si el método es cromatográfico,

no mayor de 2% si el método es volumétrico,

no mayor de 3% si es químico o espectrofotométrico,

no mayor del 5% si es microbiológico,

no mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra.

Cualquier otro criterio de aceptación, debe ser justificado.

Fórmulas:

MEDIA ARITMÉTICA:

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

DESVIACIÓN ESTÁNDAR:

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

COEFICIENTE DE VARIACIÓN:

$$CV = \frac{s}{\bar{y}} * 100$$

n = número de determinaciones.

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA POBLACIONAL:

$$IC (\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

$t_{0.975, n-1}$  Referirse al anexo 7, para determinar el valor de la *t de Student*.  
n = número de recobros:

PROCEDIMIENTO PARA EL CÁLCULO:

1) Tabular los resultados en la siguiente tabla:

Cantidad adicionada-cantidad recuperada-% de recobro par aun método cromatográfico.

PLACEBO ANALITICO ADICIONADO	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% DE RECOBRO (y)
1	mg adicionados 1	mg recuperados 1	% 1
2	mg adicionados 2	mg recuperados 2	% 2
3	mg adicionados 3	mg recuperados 3	% 3
4	mg adicionados 4	mg recuperados 4	% 4
5	mg adicionados 5	mg recuperados 5	% 5
6	mg adicionados 6	mg recuperados 6	% 6

y = es el cociente porcentual de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada.

- 2) Calcular  $\sum y$ ,  $\sum y^2$  y determinar n.
- 3) Calcular la media aritmética y la desviación estándar.
- 4) Calcular el coeficiente de variación.
- 5) Determinar en el anexo 7  $t_{0.975, n-1}$  y calcular IC ( $\mu$ ). (1), (2).

## 2.1.5. LINEALIDAD DEL MÉTODO.

### 2.1.5.1. METODOLOGÍA.

A) Se conocen los componentes de la muestra y es posible preparar un placebo analítico.

Un analista debe preparar el placebo analítico con el tipo de componentes que generalmente están presentes en la muestra. A la cantidad de placebo analítico equivalente a una muestra analítica por triplicado, adicionarle la cantidad de analito (puede ser sustancia de referencia secundaria) correspondiente al 100% de este en la muestra. Seleccionar al menos dos niveles, superior e inferior de la cantidad del analito (intervalo) y preparar el placebo adicionado al menos por triplicado a cada nivel, manteniendo constante la cantidad de placebo analítico en los tres niveles. Los placebos adicionados deben ser analizados por un mismo analista bajo las mismas condiciones, utilizando como referencia, la sustancia empleada en la adición al placebo analítico, Determinar la cantidad recuperada del analito.

**B) No se conocen los componentes de la muestra**

Un analista debe analizar la muestra con el método, para determinar el contenido del analito. El mismo analista debe preparar por lo menos 3 muestras adicionadas del analito, por ejemplo utilizando la mitad de la muestra analítica que originalmente requiere el método y adicionar el analito (puede ser una sustancia de referencia secundaria) hasta completar lo que represente el 100% de este en la muestra. Seleccionar al menos dos niveles, superior e inferior de la cantidad del analito (intervalo) y preparar el placebo adicionado al menos por triplicado a cada nivel, manteniendo constante la cantidad de placebo analítico en los tres niveles. Las muestras adicionadas deben ser analizadas por un mismo analista bajo las mismas condiciones utilizando como referencia la sustancia empleada en la adición de la muestra. Determinar la cantidad recuperada del analito.

Cuando no sea posible adicionar de manera directa el analito a la muestra, la adición puede ser llevada a cabo en alguna etapa del método. Se recomienda que la adición se lleve a cabo en las primeras etapas, para poder asegurar que las etapas posteriores no den lugar a resultados incorrectos. Por ejemplo, si una muestra se debe extraer, filtrar y diluir, es conveniente que la adición se lleve cabo antes de extraer ya que si existiera algún problema con la extracción o con la filtración y el analito se adiciona al placebo analítico o la muestra hasta antes de diluir, puede dar lugar a resultados incorrectos.

El intervalo de la concentración del analito adicionado, depende del propósito del método y debe incluir la especificación. La siguiente tabla sugiere intervalos para el estudio de linealidad, en la cual la especificación se maneja como porcentaje; como por ejemplo el 100% puede representar 100mg/g de muestra, 10 ppm, 5 mg/mL, etc.

<b>PROPÓSITO</b>	<b>ESPECIFICACIÓN</b>	<b>INTERVALO MÍNIMO</b>
CONTENIDO/POTENCIA/ VALORACIÓN	LÍMITE INFERIOR(L <sub>i</sub> ) LÍMITE SUPERIOR (L <sub>s</sub> )	L <sub>i</sub> - 10% a L <sub>s</sub> + 10%
<b>EJEMPLO</b>		
VALORACIÓN	90-110%	80 A 120% Por lo tanto los niveles podrían ser 80, 100 y 120%
UNIFORMIDAD DE DOSIS	75-125%	60 A 140% Por lo tanto los niveles podrían ser 60, 100 y 140%
DISOLUCIÓN	Q = 75% En el caso conservador, de llegar a tercera etapa, ninguna unidad es menor a Q - 25%	40 A 130% Por lo tanto los niveles podrían ser 40, 100 y 130%
CONTENIDO/VALORACIÓN PARA PRUEBAS DE	LÍMITE SUPERIOR (L <sub>s</sub> )	L <sub>s</sub> - 20% A L <sub>s</sub> + 20%

IMPUREZAS		
<b>EJEMPLO</b>		
SUSTANCIAS RELACIONADAS	No debe contener más del 100%	80 A 120% Por lo tanto los niveles podrían ser 80, 100 y 120%

Tabla No. 2. Intervalos sugeridos para la concentración del analito adicionado. **(1)**.

Reportar la relación cantidad adicionada vs. cantidad recuperada. Utilizando el método de estimación por mínimos cuadrados, calcular el valor de la pendiente ( $b_1$ ), la ordenada al origen ( $b_0$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), el intervalo de confianza para la pendiente ( $IC(\beta_1)$ ), el intervalo de confianza para la ordenada al origen ( $IC(\beta_0)$ ) y el coeficiente de variación de regresión ( $CV_{y/x}$ ).

Calcular el porcentaje de recobro de cada placebo adicionado o muestra adicionada, al obtener el cociente de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada expresada en porcentaje. Calcular el promedio aritmético ( $\bar{y}$ ), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional IC ( $\mu$ ) del porcentaje de recobro.

#### 2.1.5.2. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN.

##### 2.1.5.2.1. CANTIDAD ADICIONADA VS CANTIDAD RECUPERADA:

$$r^2 \geq 0.98$$

El IC ( $\beta_1$ ) debe incluir la unidad.

El IC ( $\beta_0$ ) debe incluir el cero.

El  $CV_{y/x}$  del porcentaje de recobro,

no debe ser mayor de 2% si el método es cromatográfico,  
no mayor de 2% si el método es volumétrico,  
no mayor de 3% si es químico o espectrofotométrico,  
no mayor del 5% si es microbiológico,  
no mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra. **(1)**.

##### 2.1.5.2.2. PORCENTAJE DE RECOBRO:

El IC ( $\mu$ ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del por ciento de recobro se incluya en el intervalo:

98-102% si el método es cromatográfico,

98-102% si el método es volumétrico,

97-103% si el método es químico o espectrofotométrico,

95-105% si el método es microbiológico,

El CV del por ciento de recobro:

no debe ser mayor de 2% si el método es cromatográfico,

no mayor de 2% si el método es volumétrico,

no mayor de 3% si es químico o espectrofotométrico,

no mayor del 5% si es microbiológico,

no mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra.

Cualquier otro criterio de aceptación, debe ser justificado. **(1)**.

### 2.1.5.3. FÓRMULAS:

Es conveniente trazar la gráfica de la cantidad adicionada (x) vs. Cantidad recuperada (y), e incluir la ecuación, su línea y el coeficiente de determinación.

#### 2.1.5.3.1. CANTIDAD ADICIONADA VS CANTIDAD RECUPERADA.

PENDIENTE

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

n = numero de mediciones (cantidad adicionada – cantidad recuperada).

ORDENADA AL ORIGEN

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN

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

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA PENDIENTE

$$IC(\beta_1) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_0}$$

$$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$$

$t_{0.975, n-1}$  Referirse al anexo 7, para determinar el valor de la *t de Student*.

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA ORDENADA AL ORIGEN

$$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_0}$$

$$S_{b_0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x)^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

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

COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE REGRESIÓN

$$CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} \times 100$$

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

PROCEDIMIENTO PARA EL CÁLCULO:

1) Tabular los resultados en la siguiente tabla:

Cantidad adicionada (x) -cantidad recuperada (y) de un método cromatográfico.

PLACEBO ANALITICO ADICIONADO	x (mg/mL)	y (mg/mL)
1	mg adicionados 1	mg recuperados 1
2	mg adicionados 2	mg recuperados 2
3	mg adicionados 3	mg recuperados 3
4	mg adicionados 4	mg recuperados 4
5	mg adicionados 5	mg recuperados 5
6	mg adicionados 6	mg recuperados 6
7	mg adicionados 7	mg recuperados 7
8	mg adicionados 8	mg recuperados 8
9	mg adicionados 9	mg recuperados 9
10	mg adicionados 10	mg recuperados 10
11	mg adicionados 11	mg recuperados 11
12	mg adicionados 12	mg recuperados 12
13	mg adicionados 13	mg recuperados 13
14	mg adicionados 14	mg recuperados 14
15	mg adicionados 15	mg recuperados 15

- 2) Calcular  $\sum x$ ,  $\sum y$ ,  $\sum x^2$ ,  $\sum y^2$ ,  $\sum xy$ , y determinar n.
- 3) Calcular  $b_1$ ,  $b_0$  y  $r^2$ .
- 4) Calcular  $S_{x/y}$  y  $S_{b1}$
- 5) Determinar en el anexo 7  $t_{0.975, n-1}$  y calcular IC ( $\beta_1$ ).
- 6) Calcular  $\bar{x}$  y IC ( $\beta_0$ )
- 7) Calcular  $CV_{y/x}$ .

### 2.1.5.3.2. PORCENTAJE DE RECOBRO.

MEDIA ARITMÉTICA:

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

DESVIACIÓN ESTÁNDAR:

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

COEFICIENTE DE VARIACIÓN:

$$CV = \frac{s}{\bar{y}} * 100$$

n = número de determinaciones.

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA POBLACIONAL:

$$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

$t_{0.975, n-1}$  Referirse al anexo 7, para determinar el valor de la *t de Student*.  
n = numero de recobros.

PROCEDIMIENTO PARA EL CÁLCULO:

- 1) Tabular los resultados en la siguiente tabla:  
Cantidad adicionada -cantidad recuperada - % de recobro de un método cromatográfico.

PLACEBO ANALITICO ADICIONADO	CANTIDAD RECUPERADA (mg/ml)	CANTIDAD ADICIONADA (mg/mL)	% DE RECOBRO (y)
1	mg adicionados 2	mg recuperados 1	% 1
2	mg adicionados 2	mg recuperados 2	% 2
3	mg adicionados 3	mg recuperados 3	% 3
4	mg adicionados 4	mg recuperados 4	% 4
5	mg adicionados 5	mg recuperados 5	% 5
6	mg adicionados 6	mg recuperados 6	% 6
7	mg adicionados 7	mg recuperados 7	% 7
8	mg adicionados 8	mg recuperados 8	% 8
9	mg adicionados 9	mg recuperados 9	% 9
10	mg adicionados 10	mg recuperados 10	% 10
11	mg adicionados 11	mg recuperados 11	% 11
12	mg adicionados 12	mg recuperados 12	% 12
13	mg adicionados 13	mg recuperados 13	% 13
14	mg adicionados 14	mg recuperados 14	% 14
15	mg adicionados 15	mg recuperados 156	% 15

- 2) Calcular  $\sum y$ ,  $\sum y^2$  y determinar n.
- 3) Calcular  $\bar{x}$  y S.
- 4) Calcular  $S_{x/y}$  y  $S_{b1}$



- 5) Calcular el CV
- 6) Determinar en el anexo 7  $t_{0.975, n-1}$  y calcular IC ( $\mu$ ). (1), (2).

### 2.1.6. REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO.

#### 2.1.6.1. METODOLOGÍA.

Analizar por triplicado una muestra homogénea del producto que tenga un nivel cercano o igual al 100% (en el caso de contenido/potencia/valoración) o una muestra homogénea cuyo contenido este incluido en el intervalo lineal de concentración de linealidad de método (para el caso de impurezas), en dos días diferentes y por dos analistas diferentes. Utilizar de preferencia la misma sustancia de referencia y los mismos instrumentos y/o equipos. Reportar el contenido/potencia/valoración del analito de todas las muestras.

Calcular la media aritmética ( $\bar{y}$ ), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) del contenido/potencia/valoración, empleando todos los resultados obtenidos.

#### 2.1.6.2. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN.

CV  $\leq$  2% para métodos cromatográficos y volumétricos.

CV  $\leq$  3% para métodos químicos espectrofotométricos.

CV  $\leq$  5% para métodos biológicos.

No mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra.

Valores superiores deben ser justificados.

#### 2.1.6.3. FÓRMULAS.

MEDIA ARITMÉTICA:

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

DESVIACIÓN ESTÁNDAR:

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

COEFICIENTE DE VARIACIÓN:

$$CV = \frac{s}{\bar{y}} * 100$$

n = número de determinaciones.

#### 2.1.6.4. PROCEDIMIENTO PARA EL CÁLCULO.

- 1) Tabular los resultados en la siguiente tabla:

	ANALISTA
--	----------

		1	2
D	1	VALOR 1	VALOR 1
		VALOR 2	VALOR 2
		VALOR 3	VALOR 3
I	2	VALOR 1	VALOR 1
		VALOR 2	VALOR 2
		VALOR 3	VALOR 3

- 2) Calcular  $\sum y$ ,  $\sum y^2$  y determinar n.
- 3) Calcular  $\bar{x}$  y S.
- 4) Calcular  $S_{x/y}$  y  $S_{b1}$
- 5) Calcular el CV. **(1), (2).**

## 2.1.7. ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA.

### 2.1.7.1. METODOLOGÍA.

El analista debe establecer la etapa de análisis en el cual se desea evaluar la estabilidad, además de determinar si en dicha etapa es posible fraccionar (muestras dependientes) o no (muestras independientes) y las condiciones de almacenaje.

Para determinar la estabilidad analítica de muestras dependientes, el analista debe procesar hasta la etapa preestablecida por lo menos por triplicado una muestra homogénea. Fraccionar cada una de las preparaciones de acuerdo a las condiciones de almacenaje de interés. Terminar el análisis de una de las fracciones de cada preparación (contenido/potencia/valoración inicial). Proseguir el análisis de cada una de las fracciones al término de cada condición de almacenaje, utilizando una solución de referencia recientemente preparada, si el método contempla el uso de una solución de referencia. Reportar el contenido/potencia/valoración de cada fracción.

Para determinar la estabilidad de la muestra analítica de muestras independientes, a partir de una muestra homogénea el analista debe analizar por triplicado (contenido/potencia/valoración inicial). Simultáneamente y de la misma muestra, procesar el número de muestras necesarias para cada condición de almacenaje hasta la etapa preestablecida (preparaciones) al menos por triplicado. Proseguir el análisis de cada una de las preparaciones al término de cada condición de almacenaje, utilizando una solución de referencia recientemente preparada, si el método contempla una solución de referencia. Reportar el contenido/potencia/valoración de cada preparación.

Calcular la media aritmética del análisis inicial ( $\bar{y}_0$ ) y de cada condición de almacenaje ( $\bar{y}_i$ ). Calcular la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto del análisis inicial ( $|di|$ ).

### 2.1.7.2. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN.

$|di| \leq 2\%$  para métodos cromatográficos y volumétricos.

$|di| \leq 3\%$  para métodos químicos espectrofotométricos.

$|di| \leq 5\%$  para métodos biológicos.

No mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra.

Cualquier otro criterio de aceptación, debe ser justificado.

### 2.1.7.3. FÓRMULAS.

#### MEDIA ARITMÉTICA DEL ANÁLISIS INICIAL

$$\bar{y}_0 = \frac{\sum y_0}{n_0}$$

$n_0$  = número de muestras del análisis inicial.

#### MEDIA ARITMÉTICA DEL ANÁLISIS DE CADA CONDICIÓN DE ALMACENAJE.

$$\bar{y}_i = \frac{\sum y_i}{n_i}$$

$n_i$  = número de muestras del análisis de la i-esima condición de almacenaje.

#### DIFERENCIA ABSOLUTA DE LA MEDIA ARITMÉTICA DE CADA CONDICIÓN DE ALMACENAJE RESPECTO DE LA MEDIA ARITMÉTICA DEL ANÁLISIS INICIAL

$$|di| = |\bar{y}_i - \bar{y}_0|$$

### 2.1.7.4. PROCEDIMIENTO PARA EL CÁLCULO.

1) Tabular los resultados en la siguiente tabla:

MUESTRA	INICIAL ( $y_0$ )	VARIABLE PREDETERMINADA		
		CONDICIÓN ( $y_1$ )	CONDICIÓN ( $y_2$ )	CONDICIÓN ( $y_3$ )
1	VALOR 1	VALOR 1	VALOR 1	VALOR 1
2	VALOR 2	VALOR 2	VALOR 2	VALOR 2
3	VALOR 3	VALOR 3	VALOR 3	VALOR 3

2) Calcular  $\sum y_0, \sum y_1, \sum y_2, \sum y_3$  y determinar  $n_0, n_1, n_2, n_3$ .

3) Calcular  $\bar{y}_0, \bar{y}_1, \bar{y}_2$  y  $\bar{y}_3$ .

4) Calcular  $|di|$ . (1).

### 2.1.8. ROBUSTEZ

#### 2.1.8.1. METODOLOGÍA.

Se deben establecer aquellos factores instrumentales (temperatura de la columna, presión de la columna, velocidad de flujo, etc.) y/o factores no instrumentales (pH de la fase móvil, volúmenes de solventes orgánicos para una extracción, etc.), relacionados al propio método, que se consideren críticos. En cada condición de operación distinta; así como a la

condición normal, analizar la misma muestra por lo menos por triplicado. Reportar el contenido/potencia/valoración del analito para las muestras de condición normal de operación y para la(s) muestra(s) de la(s) otra(s) condición(es) de operación, expresada(s) como por ciento.

Calcular la media aritmética de la condición normal de operación ( $\bar{y}_0$ ) y de cada condición de operación diferente a la condición normal ( $\bar{y}_i$ ). Calcular la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto a la condición normal ( $|di|$ ).

#### 2.1.8.2. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN.

$|di| \leq 2\%$  para métodos cromatográficos y volumétricos.

$|di| \leq 3\%$  para métodos químicos espectrofotométricos.

$|di| \leq 5\%$  para métodos biológicos.

No mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra.

Cualquier otro criterio de aceptación, debe ser justificado.

#### 2.1.8.3. FORMULAS.

##### MEDIA ARITMÉTICA DE LA CONDICIÓN NORMAL DE OPERACIÓN

$$\bar{y}_0 = \frac{\sum y_0}{n_0}$$

$n_0$  = número de muestras de la condición normal de operación.

##### MEDIA ARITMÉTICA DEL ANÁLISIS DE CADA CONDICIÓN DE OPERACIÓN DIFERENTE A LA CONDICIÓN NORMAL.

$$\bar{y}_i = \frac{\sum y_i}{n_i}$$

$n_i$  = número de muestras del análisis de la i-esima condición de operación.

##### DIFERENCIA ABSOLUTA DE LA MEDIA ARITMÉTICA DE CADA CONDICIÓN RESPECTO DE LA MEDIA ARITMÉTICA DE LA CONDICIÓN NORMAL.

$$|di| = |\bar{y}_i - \bar{y}_0|$$

#### 2.1.8.4. PROCEDIMIENTO PARA EL CÁLCULO.

5) Tabular los resultados en la siguiente tabla:

	CONDICION	
	NORMAL	
	1	2

MUESTRA	(y <sub>0</sub> )	(y <sub>1</sub> )	(y <sub>2</sub> )
1	Valor 1	Valor 1	Valor 1
2	Valor 2	Valor 2	Valor 2
3	Valor 3	Valor 3	Valor 3

6) Calcular  $\sum y_0, \sum y_1, \sum y_2$  y determinar  $n_0, n_1, n_2$ .

7) Calcular  $\bar{y}_0, \bar{y}_1, \bar{y}_2$ .

8) Calcular  $|di|$ . (1).

### 2.1.9. TOLERANCIA.

#### 2.1.9.1. METODOLOGÍA.

Se deben establecer aquellos factores ajenos al método como diferentes equipos, lotes de reactivos, columnas, etc., que se puedan presentar al reproducir el método en otras condiciones de uso. Fijar por lo menos 2 condiciones de uso y analizar una misma muestra por lo menos por triplicado a cada condición. Reportar el contenido/potencia/valoración del analito en todas las muestras.

Calcular la media aritmética ( $\bar{y}$ ), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) del contenido/potencia/valoración.

#### 2.1.9.2. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN.

CV  $\leq$  2% para métodos cromatográficos y volumétricos.

CV  $\leq$  3% para métodos químicos espectrofotométricos.

CV  $\leq$  5% para métodos biológicos.

No mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra.

Cualquier otro criterio de aceptación, debe ser justificado.

#### 2.1.9.3. FÓRMULAS.

MEDIA ARITMÉTICA:

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

DESVIACIÓN ESTANDAR:

$$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

COEFICIENTE DE VARIACIÓN:

$$CV = \frac{s}{y} * 100$$

n = número de muestras de contenido/potencia/valoración.

#### 2.1.9.4. PROCEDIMIENTO PARA EL CÁLCULO.

1) Tabular los resultados en la siguiente tabla:

MUESTRA	ANALISIS 1	ANALISIS 2
Valor 1	Valor 1	Valor 1
Valor 2	Valor 2	Valor 2
Valor 3	Valor 3	Valor 3

- 2) Calcular  $\sum y$ ,  $\sum y^2$  y determinar n.
- 3) Calcular  $\bar{x}$  y S.
- 4) Calcular CV. **(1)**.

## 2.2. CROMATOGRAFÍA.

La cromatografía es una técnica desarrollada a principios del siglo XX, que permite la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla. El nombre cromatografía (*kromos*: color, *graphos*: descripción) se debe a que las primeras separaciones se llevaron a cabo con pigmentos de plantas, en los cuales se observaban como bandas coloridas. En general, la cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil (gas o líquido), y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido. De acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas y a los mecanismos de separación, la cromatografía se divide en:

### CROMATOGRAFÍA DE GASES

Mecanismo de separación	Tipo de muestra
Gas- Líquido (partición)	Fase de vapor
	Líquida
Gas-Sólido (adsorción)	Fase de vapor
	Líquida

### CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

Cromatografía plana	Cromatografía en columna
Cromatografía en capa delgada (adsorción)	Cromatografía Líquido – Sólido (adsorción)
	Cromatografía Líquido – Sólido (partición)
Cromatografía en papel (partición)	Cromatografía de intercambio iónico
	Cromatografía de exclusión

(3), (4).

#### 2.2.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA.

### **2.2.1.1. CROMATOGRAFÍA PLANA.**

#### **2.2.1.1.1. CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA.**

Esta técnica es una forma de cromatografía de absorción que consiste en un adsorbente sólido (fase estacionaria), distribuido uniformemente sobre una superficie plana, generalmente hojas de aluminio o placas de vidrio. Este adsorbente presenta cierta capilaridad dada por las partículas finamente divididas y que permite que la fase móvil pase entre las partículas del adsorbente.

La separación ocurre cuando uno de los componentes de la mezcla es retenido en mayor grado por la fase estacionaria que los otros componentes. La fase estacionaria puede modificarse de acuerdo a las necesidades de separación aunque el factor más importante para que esta se lleve en forma adecuada es la fase móvil elegida.

El movimiento de cada sustancia en un determinado sistema es característico y puede ser un dato valioso en la identificación de ella. Esta característica se conoce con el nombre de  $R_f$  (relación de frentes) y representa la distancia recorrida por el compuesto, con relación a la distancia recorrida por la fase móvil por lo que sus valores siempre oscilarán entre 0 y 1. (3), (4).

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por un compuesto desde el origen}}{\text{Distancia recorrida por el frente de la fase móvil}}$$

No todas las sustancias pueden observarse, por lo que en muchas ocasiones es necesario observar la placa de cromatografía después de someterla a procesos de “revelado” dependiendo estos de las características químicas del compuesto por analizar o bien observar dicha placas bajo una fuente de luz ultravioleta.

#### **2.2.1.1.2. CROMATOGRAFÍA EN PAPEL.**

En la cromatografía en papel, el adsorbente es una hoja de papel de textura y espesor adecuados. La separación cromatográfica puede efectuarse mediante la acción de una sola fase líquida en un proceso análogo a la cromatografía de absorción en columna. Dado que el componente hidrófilo de la fase líquida realizada por las fibras del papel pueden considerarse como fase estacionaria, un mecanismo de partición puede contribuir significativamente a la separación.

Como alternativa, se puede usar un sistema de dos fases. El papel se impregna con una de las fases, que permanecerá como fase estacionaria (generalmente la fase más polar en el caso de papeles no modificados). El cromatograma se desarrolla al pasar lentamente la otra fase (móvil) sobre la hoja. El desarrollo puede ser ascendente, en cuyo caso el disolvente se desplaza hacia arriba por el papel mediante fuerzas de capilaridad, o descendente, en cuyo caso el flujo del disolvente se ve ayudado por la fuerza de gravedad.

Se han registrado diferencias en el valor de  $R_f$  cuando los cromatogramas se desarrollan en dirección de las fibras del papel (dirección de máquina) en comparación con los desarrollados en ángulos rectos con respecto a las fibras; por lo tanto la orientación de las fibras del papel con respecto al flujo del disolvente se debe mantener constante en una serie de cromatogramas. (Por lo general el fabricante indica la dirección de máquina en los paquetes de papel para cromatografía). (3).

#### **2.2.1.1.2.1. CROMATOGRAFÍA DESCENDENTE.**



En la cromatografía descendente, la fase móvil fluye hacia abajo en la hoja cromatográfica.

La tapa de la cámara de desarrollo tiene un orificio central aproximadamente de 1.5 cm. De diámetro cerrado por un tapón. En la parte superior de la cámara esta colocado un recipiente para el disolvente, provisto de un dispositivo, generalmente una varilla de vidrio, para sostener el papel. A ambos lados del recipiente se colocan dos varillas de vidrio en forma paralela y ligeramente arriba de los bordes superiores del recipiente de manera que sostengan el papel sin que este entre en contacto con las paredes del tanque.

Se utiliza una cantidad suficiente del disolvente especificado en la monografía, para formar una capa de 2.5 cm. En el fondo. La cámara se cierra y se mantiene a una temperatura de 20°C a 25° C durante 24 horas previas al desarrollo cromatográfico y mientras dure dicho proceso.

Se traza con un lápiz una línea fina en el papel a una distancia del extremo tal que, al colocarlo en la varilla del recipiente, la línea quede paralela y unos centímetros por debajo de la varilla. La solución del producto en estudio se aplica sobre esta línea; la mancha no debe exceder de 1 cm. De diámetro y se deja secar al aire. El papel ya preparado se introduce en la cámara, se cierra y se deja en reposo durante hora y media para que se sature. Al cabo de este tiempo se introduce por el orificio de la tapa, suficiente fase móvil en el recipiente para el disolvente; se tapa y se efectúa el desarrollo durante la distancia o tiempo descritos en la monografía, protegiendo la cámara de la luz directa durante el proceso. El papel se saca y se deja secar al aire. El método de cuantificación que se describe en la monografía. (3).

#### **2.2.1.1.2.2. CROMATOGRAFÍA ASCENDENTE.**

La parte superior del tanque tiene un dispositivo desde el cual se suspende el papel para cromatografía, que permita que este descienda sin abrir la cámara. En el fondo hay una cubeta conteniendo la fase móvil hasta la cual se hará descender el papel.

Se emplea una cantidad suficiente de la fase móvil elegida de manera que se forme una capa de 2.5 cm. en la cubeta y si es necesario, se puede poner otro disolvente entre la cubeta y las paredes de la cámara. Esta se cierra y se mantienen entre 20° C a 25° C durante 24 h previas al desarrollo cromatográfico.

La muestra se aplica de la misma manera que se describió en la cromatografía descendente pero en este caso, el extremo aplicado se introduce en la cámara, se tapa y se deja saturar durante una hora y media. Al cabo de este tiempo, el papel se hace descender hasta la fase móvil y se deja, para el desarrollo, durante el tiempo o distancia descrita en la monografía, protegiendo de la luz directa. Se saca el papel y se deja secar al aire. El método de cuantificación se describe en la monografía. (3).

### **2.2.3. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA.**

#### **2.2.3.1. CROMATOGRAFÍA DE ADSORCION EN COLUMNA.**

El soporte sólido o adsorbente, (alúmina activada, celulosa en polvo o sílica) se introduce en forma de polvo seco o de pasta en un tubo de vidrio, de plástico o de otro material

adecuado, procurando generar una masa uniforme y compacta, libre de fracturas y/o burbujas; dicho tubo debe poseer un orificio inferior estrecho (generalmente protegido por un disco de vidrio poroso) para dar salida a la fase móvil.

Preparación de la columna. En la parte superior se vierte una solución de la sustancia sometida a cromatografía y se deja que penetre el adsorbente; inmediatamente después, se introduce el disolvente, que constituye la fase móvil y se le deja fluir hacia abajo por acción de la gravedad o aplicando una presión positiva; durante todo el desarrollo de la cromatografía no debe dejarse que la parte superior de la columna se seque.

La solución eluida se vigila de una manera continua (por ejemplo, con una celda de absorción ultravioleta por la que pasa), o periódica, por ejemplo, recogiendo fracciones cada cierto tiempo o cuando la elución alcanza cierto volumen o peso, y examinando después cada fracción para investigar el componente separado. (3).

### 2.2.3.2. CROMATOGRAFÍA DE PARTICIÓN EN COLUMNA.

En este tipo de cromatografía, una fase estacionaria líquida, inmisible con la fase móvil, es adsorbida en la superficie adsorbente sólida. La cromatografía se lleva a cabo del mismo modo que la cromatografía de absorción en columna, teniendo cuidado de saturar la fase móvil con la fase estacionaria antes de ser usada para la elución. (3).

**2.2.3.2.1. Cromatografía de fase normal.** Generalmente el adsorbente sólido usado en la cromatografía de partición y la fase estacionaria adsorbida en él, son más polares con respecto a la fase móvil. El adsorbente más usado en estos casos es una tierra silícica o alumina inactiva, con partículas de diámetro y tamaño de poro adecuados para que pueda fluir fácilmente la fase móvil. (3).

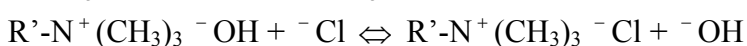
**2.2.3.2.2. Cromatografía de fase reversa.** Es aquella en la que el adsorbente polar se transforma en no polar por silanización u otros medios (tratamiento con parafinas) y la fase fija adsorbida es menos polar que la fase móvil.

En estos sistemas de partición, el grado de separación de un compuesto está regido por su coeficiente de distribución entre las dos fases líquidas y en los compuestos que se disocian, por el pH de la fase más polar.

La elución selectiva se realiza por interacción diferencial de los componentes de la mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil; esta última formada por una solución reguladora de pH y algún solvente orgánico miscible en agua, como etanol y/o acetonitrilo. (3).

### 2.2.3.3. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.

Se puede considerar como una forma especial de cromatografía en la que la fase sólida contiene material cambiador de iones, generalmente llamado resina de intercambio iónico. El intercambio reversible del ión presente en la solución con el contraión del polímero resinoso, celulosa modificada o soporte del gel de sílice; este intercambio se aprecia claramente en los siguientes ejemplos de una resina catiónica y una aniónica:



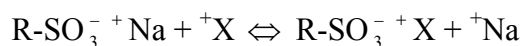
La elección de las resinas, fuertes o débiles, de tipo aniónico o catiónico, dependerá en gran parte del pH en el cual deba realizarse el intercambio y de que cationes o aniones haya que intercambiar. Sin embargo, las resinas fuertemente ácidas o básicas se prestan a la mayoría de las aplicaciones analíticas. Su capacidad específica varía desde 2 milimoles por gramo hasta 5 milimoles por gramo. En la práctica se emplea un gran exceso (200 a 300 por ciento) de resina sobre la cantidad estequiométrica calculada.

El coeficiente de selectividad indica la preferencia con que una resina de intercambio iónico fija dos o más iones de una solución. En general, la resina fijará de preferencia iones bivalentes (o multivalentes) que iones monovalentes y, ante iones de la misma valencia, fijará preferentemente los más pesados. (3).

#### 2.2.4. CROMATOGRAFIA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).

Esta técnica conocida también como Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (CLAP). El éxito de la aplicación de la CLAR para un compuesto dado depende de la combinación correcta de las condiciones de operación, es decir: la preparación de la muestra, el tipo de la columna, la fase móvil, el tipo de detección, el algoritmo de integración, etc. La migración diferencial en la CLAR es resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil en el orden en que emergieron, hacia un detector donde se registra una respuesta proporcional a su cantidad, sus concentraciones y su tiempo de retención en la columna. El cromatograma resultante muestra cada compuesto que sale de la columna en forma de picos simétricos con un tiempo de retención característico por lo que este tiempo puede emplearse para identificar el compuesto. Este tiempo de retención ( $t_r$ ) se mide desde el momento de la inyección hasta el momento en que aparece el máximo del pico en el cromatograma.

Los mecanismos o procesos de separación que dan como resultado la retención de las moléculas de una muestra por parte de la fase estacionaria dan lugar a los diferentes métodos de cromatografía líquida; esto es: líquido-líquido o de partición, que consta de una fase estacionaria líquida de composición diferente a la de la fase móvil e inmiscibles. Las moléculas de la muestra se distribuyen entre ambas fases como sucedería en una extracción líquido-líquido. La cromatografía líquido-sólido o de absorción incluye partículas de gran área superficial donde las moléculas son atraídas, y por lo tanto, retenidas. La cromatografía de intercambio iónico, en la cual la fase estacionaria contiene grupos iónicos fijos como  $-\text{SO}_3^-$ , junto con iones de carga opuesta (contraión). Estos últimos están presentes en la fase móvil en forma de sales. De esta manera las moléculas de muestras iónicas son retenidas en la columna por el intercambio iónico, como lo muestra el siguiente ejemplo:



Por último, la cromatografía de exclusión molecular, en la cual el empaque es un material poroso donde el tamaño del poro está bien definido. De esta manera, las moléculas que son demasiado grandes para el poro eluyen entre las partículas y salen rápidamente de la columna, mientras que las que son pequeñas penetran en los poros aumentando su recorrido y prolongando su tiempo de elución. Este tipo de cromatografía es muy empleado para separar compuestos por su tamaño molecular. La separación entre dos picos, o *resolución*, depende tanto de la *selectividad* como de la *eficiencia* Cromatográfica.

La selectividad es una función de la retención que la molécula tiene a lo largo del proceso de separación, y está reflejado por el *factor de capacidad* ( $k'$ ). (3).

$$k' = \frac{t}{t_0} - 1 \quad \text{o} \quad k' = \frac{t - t_0}{t_0}$$

Ecuación No.

1

La *selectividad* de una columna, también referida como *retención relativa* o *separación entre picos* ( $\alpha$ ), es la relación entre los *factores de capacidad* ( $k'$ ) de dos picos adyacentes:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad \text{o} \quad \alpha = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0}$$

Ecuación No.

2

Por su parte, la *eficiencia* es un indicador del ensanchamiento de un pico durante su separación, y esta reflejada por el número de platos teóricos ( $N$ ) de la columna en donde se realiza el proceso cromatográfico:

$$N = 16 \left( \frac{t}{W} \right)^2$$

Ecuación

No.3

Por lo anterior, la *resolución* ( $R$ ) puede expresarse en términos de selectividad y eficiencia de la siguiente manera:

$$R = \frac{N}{4} (\alpha - 1) \left( \frac{k}{1+k} \right)$$

Ecuación No.

4

En donde  $k$  es el promedio de  $k'_1$  y  $k'_2$ .

Esta ecuación permite controlar la resolución ( $R$ ) variando el factor de selectividad ( $\alpha$ ), la eficiencia de la columna ( $N$ ), o bien el factor de capacidad ( $k'$ ).

El factor de separación se varía modificando la composición de la fase móvil (pH y proporción orgánica/acuosa) y/o la estacionaria (longitud de cadena alifática o grupos sustituyentes). La eficiencia se varía con cambios en la longitud de la columna, en la velocidad de flujo del disolvente y tamaño de partícula, y el factor de capacidad se modificaron cambios en la fuerza elutropica del disolvente. El uso de integradores evita los errores en la medición de las áreas. Estos integradores registran las señales e imprimen el área de los picos en forma numérica. Como en la cromatografía de gases, en esta técnica es conveniente también la adición de una referencia interna que minimiza errores de inyección, medición o proceso de la muestra. Dicha sustancia debe, de preferencia, ser químicamente similar al activo o activos de interés, pero con un tiempo de retención diferente a el (ellos), esto (estos) para que su comportamiento en el proceso de separación y detección no presente grandes variaciones. Esta sustancia debe especificarse en la monografía y su área debe relacionarse al área de los picos de la muestra obteniendo así un área relativa constante que no se ve afectada por variaciones en el proceso de preparación de la muestra o del volumen de inyectado de la misma. (3).

#### 2.2.4.1. EQUIPO.

Esencialmente un cromatógrafo de líquidos consta de las siguientes partes:

a) **Sistema de Bombeo.** Tiene por objeto impulsar la fase móvil a través de la columna y debe cumplir ciertas especificaciones como reproducibilidad y precisión, manteniendo un flujo laminar y de velocidad constante.

Existen básicamente dos tipos de sistemas de bombeo y cada uno tiene sus ventajas y desventajas. Estos tipos son:

**Bombas de flujo constante.**- Mantienen una velocidad de flujo de la fase móvil constante. Entre estas se encuentran las “bombas reciprocantes”, que funcionan a base de pistones en número par, los cuales impulsan el disolvente que entra a las cámaras con una capacidad de volumen pequeña; estas bombas pueden generar pulsaciones de la fase móvil que producen perturbaciones en la línea base; las pulsaciones se corrigen mediante dispositivos especiales.

Otro tipo de bombas de flujo constante son las bombas de desplazamiento positivo que pueden tener dos formas: como jeringa o como amplificador hidráulico. La primera es parecida a una jeringa cuyo embolo actúa mediante una espiral que empuja el disolvente y en la segunda amplifica la presión del disolvente mediante un sistema hidráulico. Este tipo de bomba reduce las pulsaciones del disolvente.

**Bombas de presión constante.**- Estas tienen la desventaja de que es necesario mantener la viscosidad del disolvente, la temperatura de la columna y la presión constantes. La ventaja es que si estos parámetros se mantienen, se controlan totalmente las pulsaciones. La forma más sencilla de estas bombas emplea presión de gas inerte para presurizar el disolvente. El problema es que parte del gas se disuelve en el disolvente y esto forma burbujas en el sistema. Otro sistema para estas bombas emplea un amplificador neumático que reduce el efecto del gas utilizando un pistón, reduciendo de esta manera el contacto del disolvente con el gas comprimido.

Estos normalmente son sistemas isocráticos, es decir, que mantienen constante la proporción de los disolventes en la fase móvil, sin embargo, estos sistemas generalmente no son aplicables a separaciones en mezclas de solutos con valores muy variables de  $k'$ , en donde es necesario utilizar sistemas de elución con gradiente. Estos sistemas utilizan dos bombas que son programables para modificar, en forma lineal o exponencial (gradiente cóncavo o convexo), las proporciones iniciales de los disolventes. En estos casos los disolventes que componen la fase móvil se encuentran separados y alimentando cada uno a su respectiva bomba.

Los disolventes se mezclan en la proporción deseada en una cámara que se encuentra antes de la columna. El inconveniente del gradiente es que su uso es muy difícil con ciertos detectores como los refractómetros.

b) **Sistemas de Inyección.** Un factor muy importante para obtener una buena resolución en la separación es la adecuada introducción de la muestra en el sistema. La manera ideal de introducir o inyectar la muestra es en forma de “paquete” pequeño ya que esto ayuda en la obtención de picos simétricos y angostos.

Existen varios mecanismos de inyección. El más sencillo consiste en introducir la muestra mediante una jeringa; esta tiene que atravesar un *septo* y soportar la presión del sistema, la precisión del volumen de inyección depende de la jeringa empleada y de la persona que realiza el llenado de la misma y la inyección de la muestra.

Un segundo y mejor consiste en inyectoros con *asas* intercambiables de volumen fijo, las cuales pueden llenarse con un exceso de muestra; estos dispositivos desvían el flujo del disolvente mientras se introduce la muestra reanudándolo posteriormente a través del inyector y arrastrando un volumen constante de muestra. Estos sistemas son más precisos,

pero se tienen que estar cambiando cuando es necesario inyectar volúmenes diferentes en una corrida analítica.

Un tercer sistema que minimiza errores en la introducción de la muestra consiste en un inyector automático. Este dispositivo ayuda a mantener la reproducibilidad entre inyecciones y elimina el error en la medición del volumen por inyectar mediante el uso de un mecanismo servo-regulado. Con estos sistemas se pueden inyectar volúmenes diferentes a lo largo de una corrida, con alto grado de precisión y exactitud.

*c) Detector.* Puede ser de dos tipos: *Tipo 1.*- aquellos que miden alguna propiedad de la fase móvil, y *Tipo 2.*- aquellos que miden alguna propiedad del analito.

La selección del detector estará basada en las propiedades del o los solutos que se deseen analizar. Los detectores más empleados son:

*Tipo 1:*

Detector de índice de Refracción

Detector de Conductividad eléctrica.

*Tipo 2:*

Detector de luz UV/VIS (longitud fija o arreglo de diodos)

Detector de Radiactividad (con controlador *alfa, beta o gamma*)

Detector de fluorescencia (fijos o con monocromador de excitación y de emisión)

Detector Electroquímico (Amperométricos y Coulométricos)

Espectrómetro de masas (sencillo o en “tandem”)

Los detectores tipo 1 son completamente inespecíficos y detectan variaciones en la propiedad en particular (refracción o conductancia) de la fase móvil, y cualquier cambio de la fase producido por viscosidad, temperatura o luz puede alterar el comportamiento del detector.

Los detectores del tipo 2 son muy específicos y miden alguna propiedad intrínseca de la molécula a medir.

*d) Columna.* Se considera a la columna como la parte fundamental de la cromatografía ya que es en esta, donde se va a llevar a cabo la separación. El material de empaque seleccionado dependerá básicamente de la separación que se desee hacer y las características serán mencionadas posteriormente.

Las dimensiones de una columna dependerán también del tipo de separación que se desee hacer. Si el objeto de la separación es aislar sustancias de una mezcla, se emplean columnas preparativas en las que las partículas del empaque son de dimensiones mayores que en las columnas analíticas y tanto la longitud como el diámetro interno son mayores ya que deben tener la capacidad de contener cantidades elevadas de la muestra. Las más comunes son las fabricadas con acero inoxidable aunque también las hay de vidrio. La longitud puede ser de 10cm a 1m. Al aumentar la longitud aumenta el número de platos teóricos y por lo tanto, se obtiene una mayor resolución aunque en ocasiones es más importante el tipo de empaque y el tamaño de partícula de éste, ya que al elevar el área de superficie del empaque, se aumenta la interacción del soluto con la fase estacionaria.

La eficiencia de las columnas se ha elevado con dispositivos y técnicas de empaque que mejoran el contacto del soluto con la fase estacionaria en su paso en la fase móvil. Uno de estos sistemas consiste en la compresión radial de una columna hecha de un material flexible disminuyendo así los espacios vacíos que quedan entre la pared de la columna y las partículas.

Por lo que respecta a las columnas analíticas y su relleno, este puede ser a base de partículas de una cerámica inorgánica (sílica o alumina) o un polímero orgánico (poliestireno-divinilbenceno o metacrilatos). Se debe considerar la influencia de la geometría de la partícula en el empacamiento de la columna y por tanto en la eficiencia de la separación (partícula irregular o esférica). Se debe considerar también la porosidad de la partícula y la influencia que el tamaño del poro puede tener, sobre todo en separaciones fundamentales en la diferencia de pesos moleculares. Se considera que el tamaño promedio de un poro de partículas de sílica para aplicaciones analíticas es de  $100\text{Å} \pm 20\text{Å}$ . Aunado al tamaño de poro esta la cantidad de poros que cada partícula presenta, lo cual le va a dar cierto grado de rigidez (poco porosa será mecánicamente muy resistente; muy porosa presentara mayor superficie de separación pero será más frágil). Una sílica con un volumen de poro específico de 1 ml/g se considera un material promedio.

Otro parámetro importante asociado a la partícula es su tamaño; generalmente partículas de gran tamaño se emplean en cromatografía preparativa, en tanto que partículas pequeñas se emplean en separaciones muy rápidas. Los tamaños de partícula disponibles comercialmente son:

>10  $\mu\text{m}$ , para técnicas preparativas.

10  $\mu\text{m}$ , cromatografía semi-preparativa.

5  $\mu\text{m}$ , es el tamaño mas común en técnicas analíticas.

3  $\mu\text{m}$ , para separaciones muy rápidas.

En el caso de los materiales empleados en la fase reversa, se debe considerar también la densidad de cadenas alifáticas unidas a la sílica base, de grupos silanoles libres y si estos han tenido un tratamiento posterior para desactivarlos.

Las dimensiones de las columnas analíticas van de los 30mm a los 300mm de longitud, y de los 0.5mm a los 4.6mm de diámetro.

Otra manera de mejorar la eficiencia y resolución es el empleo de hornos que mantienen una temperatura constante a lo largo de la columna. Cuando se tienen valores de  $k'$  muy semejantes entre dos o mas analitos, es conveniente el empleo de temperatura para lograr buenas separaciones.

e) **Registrador de señales.** Al emerger un compuesto ya separado en la columna y pasar por el detector, la señal que provoca en este debe ser registrada por un *graficador*, un *integrador* o un *sistema computarizado* de procesamiento de datos.

En el caso del *graficador* es necesario ajustar la velocidad de la carta y la ganancia de la señal para obtener un cromatograma adecuado, y calcular manualmente la intensidad de la respuesta generada por cada pico. El método más sencillo de medición es mediante la altura de los picos desde la línea base hasta el máximo del pico, aunque es deseable tener una línea base estable para obtener la máxima precisión. Otros métodos de medición involucran el cálculo del área bajo el pico. Dicha área puede calcularse de muy diversas maneras: si el pico es simétrico puede medirse el área por triangulación prolongando los lados hasta la línea base midiendo el ancho y la altura del pico. Otra forma es utilizando un planímetro o bien, recortando y pesando el área obtenida.

El uso de integradores electrónicos evita los errores en la medición de las áreas. Estos integradores registran las señales e imprimen el área de los picos en forma numérica.

Por ultimo, el empleo de una computadora y el software adecuado puede facilitar el procesamiento de los datos, desde el algoritmo empleado para la integración, hasta la construcción de curva de calibración y cuantificación de los picos. Dichos programas deben cumplir con ciertos criterios de aseguramiento de la calidad. (3).

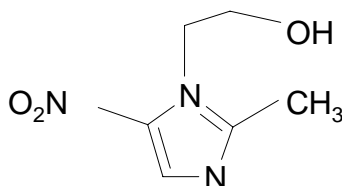
## 2.3. METRONIDAZOL

### 2.3.1. DESCRIPCIÓN.

#### 2.3.1.1. Nombre, fórmula y peso molecular.

El metronidazol es también el 2-Metil-5-nitroimidazol-1-etanol; 1-(2-hidroxiethyl)-2-metil-5-nitroimidazol; 1-(β-etilol)-2-metil-5-nitro-3-azapirrol. (9),(10).

Fórmula desarrollada:



Fórmula condensada  
C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

Peso Molecular  
171.15 g/mol

#### 2.3.1.2. Apariencia.

Polvo cristalino inodoro, de color blanco a amarillo pálido. (9).

### 2.3.2. PROPIEDADES FÍSICAS

#### 2.3.2.1. PUNTO DE FUSIÓN.

Está entre 158-160° C. (10).

#### 2.3.2.2. SOLUBILIDAD.

SOLVENTE	mg/100ml
Agua a 20° C	10.5
Metanol	32.5
Etanol	15.4
Dimetilformamida	ligeramente
Cloroformo	< 0.05
Ácidos diluidos	soluble
Éter	< 0.05
Heptano	< 0.01

Tabla 3. Solubilidad del metronidazol. (9), (10).

### 2.3.3. PROPIEDADES BIOLÓGICAS.

#### 2.3.3.1. ACCIÓN FARMACOLÓGICA.

Tiene actividad antiprotozoaria y antibacteriana, está indicado para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos identificados como sensibles: amebiasis, trichomoniasis urogenital, vaginitis no específica, giardiasis.



Indicado en el tratamiento curativo de infecciones médico-quirúrgicas causadas por bacterias anaerobias sensibles.

Tratamiento preventivo de infecciones causadas por bacterias anaerobias sensibles en pacientes quirúrgicos de alto riesgo para este tipo de infecciones.

Tratamiento curativo o profiláctico de seguimiento después de regímenes parenterales para infecciones causadas por bacterias anaerobias sensibles. **(11)**.

### **2.3.3.2. FARMACOCINÉTICA.**

#### **2.3.3.2.1 ABSORCIÓN.**

Después de la administración oral, el metronidazol es rápidamente absorbido; en la primera hora se absorbe como mínimo el 80%. Las concentraciones séricas máximas obtenidas después de su administración oral son similares a aquellas obtenidas después de la administración intravenosa de dosis equivalentes. La biodisponibilidad oral es de 100%. La administración con alimentos no afecta significativamente la absorción del metronidazol. **(11)**.

#### **2.3.3.2.2 DISTRIBUCIÓN.**

El promedio de las concentraciones séricas máximas de 10 µg/mL. se alcanzan aproximadamente 1 hora después de la administración de una dosis de 500mg. La vida media plasmática es de 8 a 10 horas. Menos del 20% del metronidazol circulante se une a proteínas plasmáticas.

El volumen aparente de distribución es alto: alrededor de 40 L. El metronidazol es amplia y rápidamente distribuido en la mayoría de los tejidos y líquidos corporales, con concentraciones cercanas a los niveles séricos en los pulmones, riñones, hígado, piel, bilis, líquido cefalorraquídeo, saliva, líquido seminal, y secreciones vaginales. Cruza la barrera placentaria y es excretado en la leche materna. **(11)**.

#### **2.3.3.2.3 METABOLISMO.**

El metronidazol es metabolizado principalmente en el hígado. Se forman dos metabolitos esenciales:

- El primero que es el principal es el metabolito alcohol: su potencia antibiótica contra bacterias anaerobias es aproximadamente 30% de la potencia del fármaco precursor. Tiene una vida media de eliminación de alrededor de 11 horas.
- El segundo es el metabolito ácido se encuentra en niveles muy bajos y posee actividad bactericida que equivale aproximadamente al 15% de la potencia del metronidazol. **(11)**.

#### **2.3.3.2.4 EXCRECIÓN.**

Las concentraciones en hígado son altas y en el colon bajas. La excreción fecal es baja. La principal ruta de eliminación del metronidazol y sus metabolitos es la vía urinaria. **(11)**.

### **3. PROBLEMA RESUELTO.**

La Secretaría de Salud es el organismo encargado de regular a la industria farmacéutica, entre otras instituciones dedicadas a la salud, en años anteriores no era necesario validar los métodos analíticos que se encontraban en las farmacopeas pero en la actualidad ya es necesario que todos los métodos incluso los farmacopeicos se encuentren validados para cumplir con la NOM-059 SSA1. Para este caso el método de valoración del metronidazol en tabletas de 500 mg no era farmacopeico, solo se contaba con un método desarrollado y validado por la empresa, pero ahora que apareció la monografía del mismo en la FEUM 8ª Edición, se hizo necesario actualizar y validar este método para cuantificar el metronidazol en tabletas de 500 mg y así tener la certeza de que dicho método puede ser utilizado por el departamento de control de calidad para sus análisis de rutina.

Se cuenta con un método validado de producto terminado para cumplir con la NOM-059-SSA1 y las Buenas Prácticas de Manufactura. Se actualizó la metodología interna de valoración de metronidazol 500 mg tabletas, al método que aparece en FEUM 8ª Edición. Se proporcionó a control de calidad un método preciso, reproducible, específico y exacto, para evaluar el contenido del principio activo en las tabletas de metronidazol 500 mg.

## **4. OBJETIVOS.**

### **4.2.1 OBJETIVO GENERAL:**

Contar con un método validado de producto terminado para cumplir con la NOM-059-SSA y las Buenas Prácticas de Manufactura.

### **4.3 OBJETIVOS PARTICULARES:**

4.3.1 Actualizar la metodología interna que se tiene para la valoración de metronidazol 500 mg tabletas, al método que aparece en FEUM 8ª. Edición.

4.3.2 Proporcionar a control de calidad un método preciso, reproducible, específico y exacto para evaluar el contenido de principio activo en las tabletas de metronidazol 500 mg.

## 5. MATERIALES.

### MATERIAL

- Bureta Kimax de 10mL de capacidad.
- Matraz volumétrico Kimax de 100mL.
- Matraces volumétricos Kimax de 25mL.
- Pipetas volumétricas Pyrex de 5mL.
- Viales Waters de 2mL de capacidad.
- Membranas de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  de porosidad marca millipore.
- Papel whatman No. 1.
- Columna Beckman C<sub>18</sub> de 250 x 4.6mm.

### EQUIPOS E INSTRUMENTOS

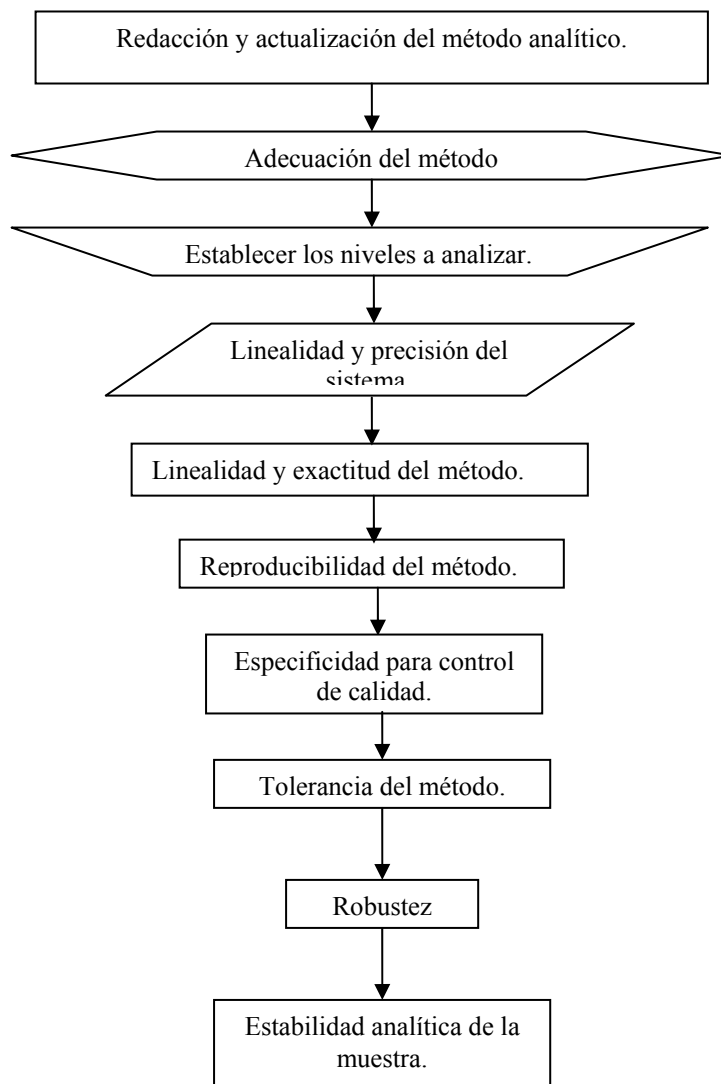
- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Waters modelo Alliance 2487/2690 con detector UV-Visible.
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución modelo HP 1100.
- Balanza analítica Metler Toledo modelo AS505.
- Baño de ultrasonido marca fishers.

### REACTIVOS

- Metronidazol materia prima lote W-217919.
- Sustancia de referencia primaria Cosufar lote 18B6 pureza 99.8%.
- Tabletas de metronidazol de 500mg, lote: 05013.
- Placebo de metronidazol lote: 04102
- Ácido clorhídrico grado reactivo J. T. Baker
- Metanol J. T. Baker grado HPLC.
- Agua J. T. Baker grado HPLC.

# 6. METODOLOGÍA.

## 6.1. DIAGRAMA DE FLUJO



## 6.2. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

**6.2.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA.** Se preparó una solución stock pesando 250.18mg de metronidazol materia prima, la cual tiene un ensayo de 100.14%, y se pasaron a un matraz volumétrico de 100 mL se disolvieron y llevaron a

volumen con ácido clorhídrico metanólico 0.1N. Esta solución tiene una concentración de 2.5053mg/mL. De esta se tomaron, con ayuda de la bureta de vidrio, las siguientes alícuotas por triplicado: 4.50, 4.75, 5.00, 5.25, 5.50 mL y se pasaron a matraces volumétricos de 25 mL, llevándose a volumen con fase móvil. Posteriormente se filtraron por una membrana de nylon de 0.45  $\mu$ m, para ser pasadas a viales e inyectadas en el cromatógrafo.

**6.2.2. PRECISIÓN DEL SISTEMA.** De la solución stock anteriormente mencionada se tomaron por sextuplicado alícuotas de 5.00 mL y se pasaron a matraces volumétricos de 25 mL, llevándose a volumen con fase móvil filtrándose por una membrana de nylon de 0.45  $\mu$ m, para ser pasadas a viales y posteriormente inyectarse en el cromatógrafo.

**6.2.3. LINEALIDAD DEL MÉTODO.** Se realizaron por separado placebos cargados, pesando por triplicado las siguientes cantidades de metronidazol: 225.0 mg, 237.5 mg, 250.0 mg, 262.5 mg, 275.0 mg, y 183.51 mg de placebo, pasándolos por separado a matraces volumétricos de 25 mL, se adicionaron 30 mL de ácido clorhídrico metanólico 0.1N, se sonicó 15 minutos, se llevó a volumen con el mismo solvente y se mezcló. Se filtró a través de papel whatman No.1, se desecharon los primeros mililitros. Se pasaron alícuotas de 5 mL a matraces volumétricos de 100 mL y se llevaron a volumen con fase móvil, mezclando. Posteriormente se filtraron por una membrana de nylon de 0.45  $\mu$ m, para ser pasadas a viales y posteriormente inyectarse en el cromatógrafo.

**6.2.4. EXACTITUD DEL MÉTODO.** Se pesaron por sextuplicado 250.0 mg de metronidazol y 183.51 mg de placebo, pasándolos por separado a matraces volumétricos de 25 mL, adicionando 30 mL de ácido clorhídrico metanólico 0.1N, sonicando 15 minutos, llevando a volumen con el mismo solvente y mezclando. Filtrando a través de papel whatman No.1, desechando los primeros mililitros. Se pasaron alícuotas de 5 mL a matraces volumétricos de 100 mL y se llevaron a volumen con fase móvil, y se mezcló. Posteriormente se filtró cada muestra por una membrana de nylon de 0.45  $\mu$ m, para ser pasadas a viales y posteriormente inyectarse en el cromatógrafo.

**6.2.5. REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO.** Para esta prueba se analizaron 3 muestras del lote 05013 con dos analistas diferentes en dos días diferentes, bajo las mismas condiciones de equipo, reactivos, muestras, etc. Cada uno de los analistas realizó lo siguiente: pesó el polvo obtenido de las tabletas del lote 05013, equivalente a 500 mg de metronidazol, pasándolo a matraces volumétricos de 25mL adicionando 30 mL de ácido clorhídrico metanólico 0.1N, sonicando 15 minutos llevando a volumen con el mismo solvente y se mezcló. Se filtró a través de papel whatman No.1, se desecharon los primeros mililitros. Se pasaron alícuotas de 5 ml a matraces volumétricos de 100 mL y se llevaron a volumen con fase móvil, se mezcló. Posteriormente se filtró cada una de las muestras por una membrana de nylon de 0.45  $\mu$ m, para ser pasadas a viales y posteriormente inyectarse en el cromatógrafo.

**6.2.6. ESPECIFICIDAD PARA CONTROL DE CALIDAD.** Para esta prueba se preparó: la materia prima, muestra y placebo como lo indica la metodología en

la parte de la reproducibilidad, para corroborar que los excipientes no interfieren con la cuantificación del metronidazol.

- 6.2.7. TOLERANCIA.** Se prepararon las muestras como se indica en la reproducibilidad y se realizó un cambio de cromatógrafo de un Waters Alliance 2690 a un HP 1100.
- 6.2.8. ROBUSTEZ.** Se realizó un cambio de solvente, se utilizó metanol en lugar de ácido clorhídrico metanólico 0.1N.
- 6.2.9. ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA.** Se prepararon tres muestras pesando el polvo equivalente a 500 mg de metronidazol, se pasó a matraces volumétricos de 25 mL se adicionaron 30 mL de ácido clorhídrico metanólico 0.1N, se sonicó durante 15 minutos llevando a volumen con el mismo solvente y se mezcló. Se filtró a través de papel whatman No.1, se desecharon los primeros mililitros. Se pasaron alícuotas de 5 mL a matraces volumétricos de 100 mL, se llevaron a volumen con fase móvil y se mezclaron. Posteriormente se filtraron por una membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$ , para ser pasadas a viales y posteriormente inyectarse en el cromatógrafo. Luego de ser analizadas el día de su preparación, se guardaron partes iguales de las mismas tanto en refrigeración como en temperatura ambiente, y se analizaron a las 24 y a las 48 horas después de su preparación.

## 7. RESULTADOS.

### 7.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA:

Tabular los resultados en la siguiente tabla:

Concentración (x) – Área obtenida de la solución de referencia (y)

NIVEL %	CONCENTRACIÓN DE METRONIDAZOL (µg/mL)	RESPUESTA OBTENIDA (AREA)	FACTOR (AREA/CONCENTRACIÓN)
90-1	450.95	3098493	6871034.48
90-2	450.95	3136398	6955050.36
90-3	450.95	3076285	6821787.34
95-1	475.01	3284706	6900497.89
95-2	475.01	3355117	6975729.50
95-3	475.01	3320517	7048417.05
100-1	501.06	3526678	6975729.50
100-2	501.06	3552373	7038434.52
100-3	501.06	3490638	7089715.80
105-1	526.11	3702071	6966507.01
105-2	526.11	3765614	6846611.93
105-3	526.11	3760818	6958274.89
110-1	551.17	3879600	6971714.72
110-2	551.17	3874952	6975982.00
110-3	551.17	3879745	6857675.49

Tabla No. 4. Resultados de la linealidad el sistema.

$$\sum x = 7512.9$$

$$\sum y = 52704005.0$$

$$\sum x^2 = 3781894.9$$

$$\sum y^2 = 18636238360000$$

$$\sum xy = 265446087480$$

$$n = 15$$

$$b_1 = 7836.1$$

$$b_0 = -411206.6$$

$$r^2 = 1.0$$

$$S_{y/x} = 34944.1$$

$$S_{b1} = 263.6$$

$$t_{0.975, 13} = 2.160$$

$$IC (\beta_1) = 7288.4 - 8383.9$$

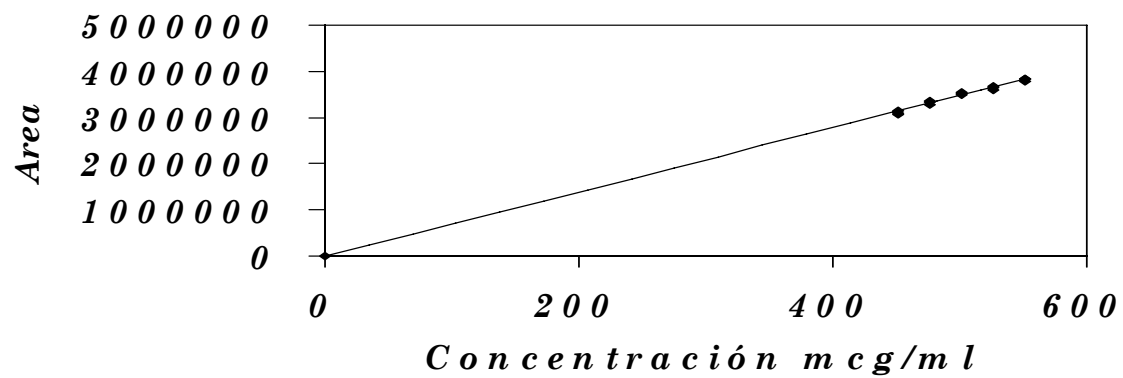
CRITERIO DE ACEPTACIÓN: EL INTERVALO DE CONFIANZA NO DEBE INCLUIR EL CERO.

RESULTADO: EL INTERVALO DE CONFIANZA NO INCLUYE EL CERO.



# *LINEALIDAD DEL SISTEMA*

## *METRONIDAZOL TABLETAS*



Gráfica No. 1: *LINEALIDAD DEL SISTEMA*



## 7.2. PRECISIÓN DEL SISTEMA.

Tabular los resultados en la siguiente tabla:

ÁREA DE METRONIDAZOL (y) concentración 501.06 µg/mL

<i>INYECCIÓN</i>	<i>ÁREA</i>
1	3526678
2	3552373
3	3490638
4	3471156
5	3480137
6	3472778

Tabla No. 5. Resultados de la precisión del sistema.

$$\sum y_i = 20997060.0$$

$$\sum y_i^2 = 7.348511681 \times 10^{13}$$

$$CV = \frac{20997060.0}{7.348511681 \times 10^{13}} * 100 = 0.96\%$$

	<i>Calculado</i>	<i>Criterio de aceptación</i>
% C. V.	0.96%	%C. V. ≤ 1.5%.

El CV no excede el 1.5%.

### 7.3. LINEALIDAD DEL MÉTODO.

NIVEL (%)	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	POR CIENTO DE RECOBRO	% C.V.
90-1	225.00	228.01	101.58	0.66
90-2	224.70	226.82	100.94	
90-3	224.80	225.34	100.24	
95-1	237.20	240.01	101.18	0.22
95-2	238.70	241.22	101.06	
95-3	238.00	239.78	100.75	
100-1	250.50	254.64	101.65	0.10
100-2	250.90	255.42	101.80	
100-3	250.60	255.23	101.85	
105-1	262.90	267.09	101.58	1.07
105-2	262.70	262.39	99.88	
105-3	262.60	261.36	99.60	
110-1	275.30	276.22	100.33	0.78
110-2	275.00	279.21	101.53	
110-3	275.00	280.00	101.82	

	OBTENIDO	CRITERIO DE ACEPTACION
Pendiente (m)	1.0	$m \approx 1$
Intercepto (b)	-0.6	$b = 0$
Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	1.0	$\leq 0.98$
Por ciento de recobro	101.0%	$\approx 100\%$
% C. V. Global	0.7%	%C. V. $\geq 2.0\%$

Tabla No. 6. Resultados de la linealidad del método.

#### CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

LA PENDIENTE DEBE SER APROXIMADAMENTE 1.0.

EL INTERCEPTO DEBE SER APROXIMADAMENTE 0.0.

EL COEFICIENTE DE DETERMINACION DEBE SER MAYOR A 0.98.

EL PROMEDIO DEL PORCIENTO DE RECOBRO DEBE SER APROXIMADAMENTE 100%.

EL COEFICIENTE DE VARIACION GLOBAL DEBE SER MENOR AL 2.0%.

#### RESULTADOS:

LA PENDIENTE ES 1.0.

EL INTERCEPTO ES APROXIMADAMENTE 0.0.

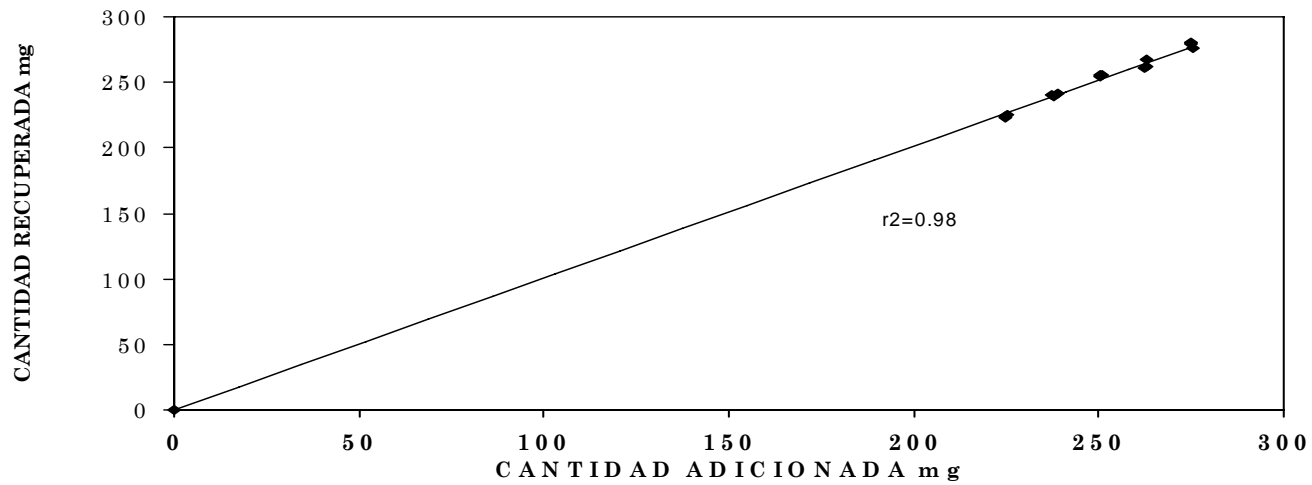
EL COEFICIENTE DE DETERMINACION ES MAYOR A 0.98.

EL PROMEDIO DEL PORCIENTO DE RECOBRO ES APROXIMADAMENTE 100%.

EL COEFICIENTE DE VARIACION GLOBAL ES MENOR AL 2.0%.

# *LINEALIDAD DEL METODO*

## *METRONIDAZOL TABLETAS*



Gráfica No. 2: *LINEALIDAD DEL METODO*

#### 7.4. EXACTITUD DEL MÉTODO.

CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	POR CIENTO DE RECOBRO
250.50	254.64	101.65
250.90	255.42	101.80
250.60	255.23	101.85
249.90	253.79	101.56
250.90	254.70	101.51
251.30	255.60	101.73

	Obtenido	Criterio de aceptación
% C. V.	0.1%	%C. V. ≤ 2.0%
Por ciento de recobro	101.7%	98.0 – 102.0%

Tabla No. 7. Resultados de la exactitud del método.

$$IC (\mu) = 101.4 - 102.0$$

#### 7.5. REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO.

		ANALISTA		TOTAL FILA	MEDIA FILA
		1	2		
D	1	99.49	99.55	199.04	99.52
		99.35	99.84	199.19	99.60
		101.04	99.69	200.73	100.37
I A	2	98.66	98.06	196.72	98.36
		98.21	98.74	196.95	98.48
		98.21	98.50	196.71	98.36
TOTAL COLUMNA		594.96	594.38	TOTAL FINAL	1189.34
MEDIA COLUMNA		99.16	99.06	MEDIA FINAL	99.12

	Obtenido	Criterio de aceptación
% Coeficiente de variación	0.88%	C. V. ≤ 2.0 %

Tabla No. 8. Resultados de la reproducibilidad del método.

##### 7.5.1. ANALISIS DE VARIANZA DE LA REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO.

Variación de las filas con respecto a la media global:

$$V_R = 2[(99.52-99.12)^2 + (99.60-99.12)^2 + (100.37-99.12)^2 + (98.36-99.12)^2 + (98.48-99.12)^2 + (98.36-99.12)^2] = 7.04$$

Variación de las medias de la columna respecto a la media global:

$$V_C = 6[(99.16-99.12)^2 + (99.06-99.12)^2] = 0.0312$$

Variación total:

$$V = (99.49-99.12)^2 + (99.5-99.12)^2 + (101.04-99.12)^2 + (99.55-99.12)^2 + (99.84-99.12)^2 + (99.69-99.12)^2 + (98.66-99.12)^2 + (98.21-99.12)^2 + (98.21-99.12)^2 + (98.06-99.12)^2 + (98.74-99.12)^2 + 98.50-99.12)^2 = 8.42$$

Variación aleatoria:

$$V_E = V - V_R - V_C = 8.42-7.04-0.0312 = 1.35$$

VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F
$V_R = 7.04$	1	$S^2_R = 7.04$	$7.04/0.027 = 26.07$ CON 1 Y 5 GL
$V_C = 0.0312$	5	$S^2_C = 0.00624$	$0.00624/0.027 = 0.231$ CON 5 Y 5 GL
$V_E = 1.35$	5	$S^2_E = 0.27$	
$V = 8.42$	11		

Tabla No. 9. Análisis de varianza de la reproducibilidad del método.

$F_{0.95, 1/5} = 6.61$ , con  $26.07 > 6.61$ , se rechaza la hipótesis de que todos los tratamientos son iguales, es decir, hay una diferencia significativa en los resultados debido al día del análisis.

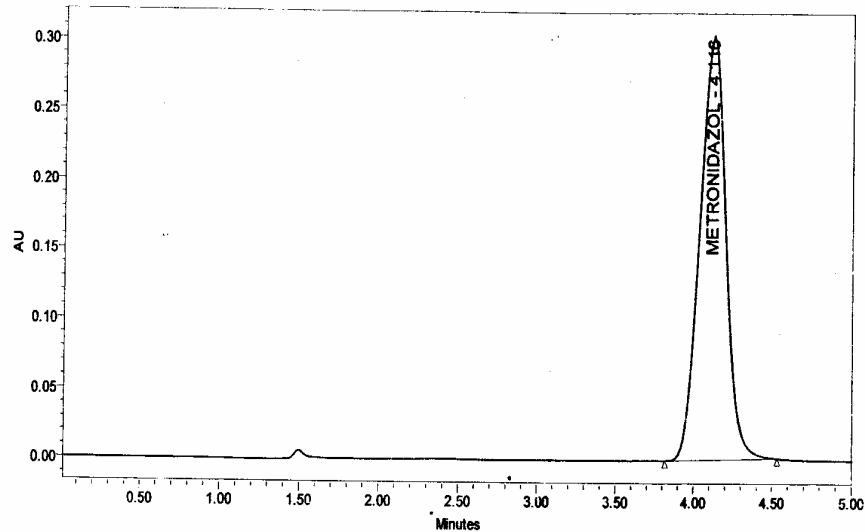
$F_{0.95, 5/5} = 5.05$ , como F es menor a 1 concluimos que no hay diferencia significativa en los resultados debido a los analistas.

## 7.6. ESPECIFICIDAD PARA CONTROL DE CALIDAD.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN: Ninguno de los componentes de la fórmula debe interferir en la cuantificación del Principio Activo.

RESULTADO: Ningún componente de la fórmula interfiere con la cuantificación del principio activo. (Ver gráfica3).

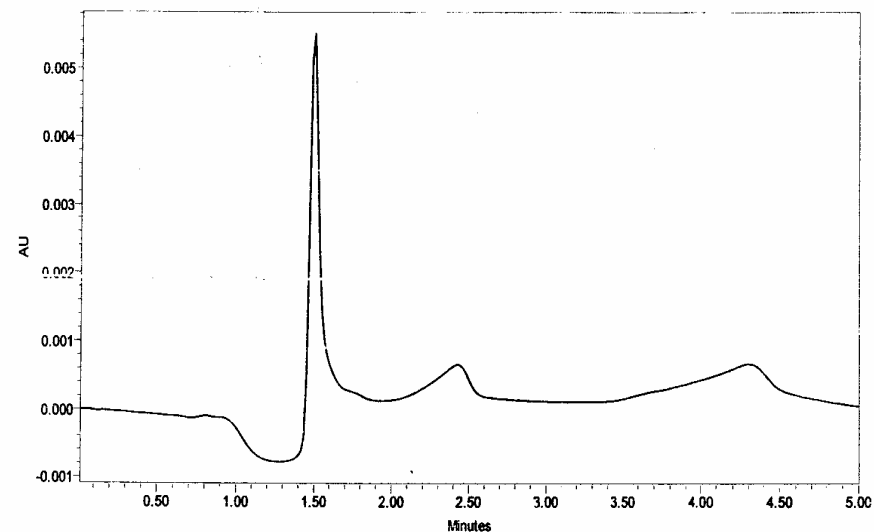
Sample Name: MUESTRA TABS 500  
 Sample Type: Unknown  
 Vial: 5  
 Injection #: 1  
 Injection Volume: 10.00 ul  
 Run Time: 5.0 Minutes  
 Sample Set Name: ESPECIFICIDADCC\_QS  
 Acquired By: MECV  
 Date Acquired: 14/01/2005 11:06:54 a.m  
 Acq. Method Set: METRONIDAZOL\_MS  
 Date Processed: 14/01/2005 11:12:07 a.m  
 Processing Method: METRONIDAZOL\_MP  
 Channel Name: 2487Channel 1  
 Proc. Chnl. Descr.:



Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1 METRONIDAZOL	4.116	3477530	100.00	303925

Cromatograma de la muestra

Sample Name: PLACEBO TABS 500  
 Sample Type: Unknown  
 Vial: 2  
 Injection #: 1  
 Injection Volume: 10.00 ul  
 Run Time: 5.0 Minutes  
 Sample Set Name: ESPECIFICIDADCC\_QS  
 Acquired By: MECV  
 Date Acquired: 14/01/2005 10:43:24 a.m  
 Acq. Method Set: METRONIDAZOL\_MS  
 Date Processed: 14/01/2005 10:48:36 a.m  
 Processing Method: METRONIDAZOL\_MP  
 Channel Name: 2487Channel 1  
 Proc. Chnl. Descr.:



Peak Name	RT
1 METRONIDAZOL	4.078

Cromatograma del placebo.

Gráfica No. 3. Especificidad para control de calidad.



### 7.7. ROBUSTEZ DEL MÉTODO.

	ROBUSTEZ	
MUESTRA	INICIAL	CAMBIO DE SOLVENTE
	% OBTENIDO	% OBTENIDO
1	99.49	96.32
2	99.35	96.53
PROMEDIO	99.42	96.43
%CV		1.8
	$\sum y_0 = 298.26$	$\sum y_1 = 289.28$
	$n_0 = 3$	$n_1 = 3$
	$\bar{y}_0 = 99.42$	$\bar{y}_1 = 96.43$

Tabla No. 10. Resultados de la robustez del método.

$$|di| = |96.43 - 99.42| = 2.99.$$

CRITERIO DE ACEPTACIÓN: LA DIFERENCIA ABSOLUTA DE LA MEDIA ARITMÉTICA A CADA CONDICIÓN CON RESPECTO A LA NORMAL DEBE SER MENOR A 2.0%.

RESULTADO: LA DIFERENCIA ABSOLUTA DE LA MEDIA ARITMÉTICA A CADA CONDICIÓN CON RESPECTO A LA NORMAL ES MAYOR A 2.0%.

### 7.8. TOLERANCIA DEL MÉTODO.

	TOLERANCIA AL CAMBIO DE EQUIPO
MUESTRA	% OBTENIDO
1	98.66
2	98.21
3	98.44
$\bar{y} =$	98.44
S =	0.23
C. V. =	0.23

Tabla No. 11. Resultados de la tolerancia del método.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN: EL COEFICIENTE DE VARIACIÓN DEBE SER MENOR A 2.0%.

RESULTADO: EL COEFICIENTE DE VARIACION ES MENOR A 2.0%.

## 7.8 ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA.

MUESTRA	INICIAL	TEMPERATURA AMBIENTE		REFRIGERACIÓN	
		24 HORAS	48 HORAS	24 HORAS	48 HORAS
1	98.66	97.46	98.24	98.23	100.36
2	98.21	97.57	98.19	98.34	99.37
3	98.21	97.60	98.15	97.37	100.06
<b>PROMEDIO</b>	<b>98.36</b>	<b>97.54</b>	<b>98.19</b>	<b>97.98</b>	<b>99.93</b>
$ d_i  =  y_i - y_o $					
d1		1.20	0.42	0.43	1.70
d2		0.64	0.02	0.13	1.16
d3		0.61	0.06	0.84	1.85
<b>PROMEDIO</b>		<b>0.82</b>	<b>0.17</b>	<b>0.47</b>	<b>1.57</b>

Tabla No. 12. Estabilidad analítica de la muestra.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

EL VALOR DE  $|d_i|$  DEBE SER MENOR AL 2.0%.

RESULTADO:

LOS PROMEDIOS DE LOS VALORES DE  $|d_i|$  DE LAS CUATRO CONDICIONES SON MENORES AL 2.0%.

## 8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Con los resultados obtenidos durante la validación y de acuerdo a los criterios de aceptación establecidos, se observa que el método es lineal en el intervalo analizado, preciso, reproducible y exacto al 100%.

Como puede observarse en la tabla 1, de la linealidad del sistema, el coeficiente de variación global y el coeficiente de determinación  $r^2$  y el intervalo de confianza que no incluye el cero, están dentro del criterio de aceptación por lo tanto el sistema es lineal, estos resultados se pueden corroborar en la gráfica No. 1. Así mismo en la precisión del sistema se obtiene un coeficiente de variación de 0.96%, lo cual quiere decir que el sistema es preciso.

En la tabla No. 6 se presentan los resultados de la linealidad del método, aquí se determinaron los siguientes parámetros: la pendiente (m), el intercepto (b), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), el promedio del por ciento de recobro y el coeficiente de variación global,; observándose que los datos están dentro de los criterios de aceptación para cada uno de ellos, por lo tanto el método es lineal en el intervalo analizado. Esto se puede observar en la gráfica No. 2. En la tabla No 7 se muestra la exactitud del mismo en el cual el resultado esta dentro de criterio de aceptación, por lo tanto el método es exacto al 100%.

La tabla No. 8 muestra los resultados de la reproducibilidad, la cual se realizó por dos analistas diferentes en dos días diferentes, bajo las mismas condiciones de laboratorio. Aquí el coeficiente de variación esta dentro del criterio de aceptación, por lo tanto el método es reproducible.

En la prueba de especificidad para control de calidad, (gráfica No. 3), los componentes de la fórmula no interfieren en la cuantificación del principio activo, ya que como se puede observar los cromatogramas, el placebo no presenta ninguna respuesta al tiempo de retención del metronidazol que pueda interferir en su cuantificación.

En la tabla No. 10 se pueden observar los resultados de la prueba de robustez la diferencia absoluta entre los valores es mayor a dos y por lo tanto al aplicar el método no se puede hacer un cambio de solvente, lo cual puede deberse a la baja solubilidad del metronidazol en metanol.

En la tabla No. 11 pueden observarse los resultados de la tolerancia y dado que el coeficiente de variación es menor a 2.0 se concluye que el método es tolerante a un cambio de cromatógrafo, es decir puede ser analizado en cualquiera de los dos tipos de cromatográficos.

Como puede observarse en la tabla No. 12 se muestran los resultados de la prueba de estabilidad analítica de la muestra, con los cuales se determina el tiempo en que éstas son estables para ser analizadas. Las muestras son estables a temperatura ambiente y en refrigeración y pueden ser analizadas, hasta 48 horas después de su preparación.

## **9. CONCLUSIONES.**

Se cuenta con un método validado de producto terminado para cumplir con la NOM-059-SSA y las Buenas Prácticas de Manufactura. Se actualizó la metodología interna de valoración de metronidazol 500 mg tabletas, al método que aparece en FEUM 8ª. Edición. Se proporcionó a control de calidad un método preciso, exacto, específico y reproducible para evaluar el contenido de metronidazol en tabletas de metronidazol 500 mg.

Finalmente se sugiere revalidar el método después de 3 años de su uso, o antes si se cambia la formulación de las tabletas o la FEUM proporciona algún otro método.

# 10. ANEXOS

## 10.1 ANEXO 1

### INDICE DE TABLAS.

	PAG.
TABLA No. 1 PARÁMETROS DE DESEMPEÑO	10
TABLA No. 2 INTERVALOS SUGERIDOS DEL ANALITO ADICIONADO	19
TABLA No. 3 SOLUBILIDAD DEL METRONIDAZOL	40
TABLA No. 4 LINEALIDAD DEL SISTEMA	48
TABLA No. 5 PRECISIÓN DEL SISTEMA	51
TABLA No. 6 LINEALIDAD DEL MÉTODO	52
TABLA No. 7 EXACTITUD DEL MÉTODO	54
TABLA No. 8 REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO	54
TABLA No. 9 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REPRODUCIBILIDAD	55
TABLA No. 10 ROBUSTEZ DEL MÉTODO	57
TABLA No. 11 TOLERANCIA DEL MÉTODO	57
TABLA No. 12 ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA	58

## 10.2 ANEXO 2

### INDICE DE GRÁFICAS.

	PAG.
GRÁFICA No. 1	
LINEALIDAD DEL SISTEMA	49
GRÁFICA No. 2	
LINEALIDAD DEL METODO	53
GRÁFICA No. 3	
ESPECIFICIDAD PARA CONTROL DE CALIDAD	56

## 10.3 ANEXO 3

### DEFINICIONES.

**Analito.** Componente específico de una muestra, a medir en un análisis.

**Calibración.** Conjunto de operaciones que determinan, bajo condiciones especificadas, la relación entre los valores indicados por un instrumento o sistema de medición, o los valores representados por una medición material y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia.

**Documentación.** Conjunto de información que sustenta una actividad realizada.

**Especificaciones.** Descripción del material, sustancia o producto, que incluye la definición de sus propiedades y características, con las tolerancias de variación de los parámetros de calidad.

**Especificidad.** Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito y no a otros componentes de la muestra.

**Exactitud.** Concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia.

**Estabilidad analítica de la muestra.** Propiedad de una muestra, preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

**Intervalo.** Concentraciones incluidas entre la concentración superior e inferior del analito (incluyendo éstas), para las cuales se ha demostrado que el método analítico es preciso, exacto y lineal.

**Linealidad.** Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado.

**Metodología de prueba.** Procedimiento o grupo de procedimientos, para determinar si un producto o materia prima cumple con las especificaciones establecidas.

**Método analítico.** Descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra.

**Método analítico desarrollado internamente.** Método desarrollado por el propio laboratorio.

**Método indicativo de estabilidad.** Método cuantitativo capaz de detectar variaciones en las propiedades del material evaluado, debidas a las condiciones de almacenaje.

**Método analítico oficial.** Método que aparece en la literatura oficial reconocida.

Método analítico no oficial. Método que no aparece en la literatura oficial reconocida.

**Muestra.** Porción del material a evaluar.

**Muestra analítica.** Porción del material a evaluar de acuerdo al método analítico.

**Muestra adicionada.** Porción representativa del material a evaluar, a la que se le adicionan cantidades conocidas del analito.

**Placebo analítico.** Muestra que contiene todos los componentes de un producto a excepción del analito.

**Placebo adicionado.** Muestra de un placebo analítico al cual se le adiciona una cantidad conocida de analito.

**Precisión.** Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia.

**Recobro.** Cantidad del analito determinada en el placebo adicionado o muestra adicionada, empleando el método analítico.

**Repetibilidad.** Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método.

**Reproducibilidad.** Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios.

**Revalidación.** Comprobación de que el método analítico mantiene su desempeño cuando existen cambios en la composición del producto, en el método analítico, o cambios críticos en los procesos de fabricación.

**Robustez.** Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método.

**Sustancia de referencia.** Sustancia de uniformidad reconocida destinada a utilizarse en comprobaciones analíticas físicas, químicas o microbiológicas en el transcurso de las cuales sus propiedades se comparan con la sustancia en evaluación.

**Sustancia de referencia primaria.** Sustancia que es designada o reconocida por tener la más alta calidad metrológica, cuyas propiedades se aceptan sin referencia a otras sustancias.

**Sustancia de referencia secundaria.** Sustancia cuyas propiedades se asignan por comparación con una sustancia de referencia primaria, o bien, cuando es certificada mediante un procedimiento científicamente reconocido.

**Tolerancia.** Reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación como pueden ser equipos, columnas. La robustez y la tolerancia son conceptos diferentes, ya que el primero se refiere a la influencia de factores internos del método, mientras que la tolerancia, se refiere a factores externos al método.

**Validación del método analítico.** Proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.



## 10.4 ANEXO 4

TABLA ESTADÍSTICA DE LA DISTRIBUCIÓN  $t$  DE STUDENT

GRADOS DE LIBERTAD	$t_{0.975}$	GRADOS DE LIBERTAD	$t_{0.975}$	GRADOS DE LIBERTAD	$t_{0.975}$
1	12.706	26	2.056	51	2.008
2	4.303	27	2.052	52	2.007
3	3.182	28	2.048	53	2.006
4	2.776	29	2.045	54	2.005
5	2.571	30	2.042	55	2.004
6	2.447	31	2.040	56	2.003
7	2.365	32	2.037	57	2.002
8	2.306	33	2.035	58	2.002
9	2.262	34	2.032	59	2.001
10	2.228	35	2.030	60	2.000
11	2.201	36	2.028	61	2.000
12	2.179	37	2.026	62	1.999
13	2.160	38	2.024	63	1.998
14	2.145	39	2.023	64	1.998
15	2.131	40	2.021	65	1.997
16	2.120	41	2.020	66	1.997
17	2.110	42	2.018	67	1.996
18	2.101	43	2.017	68	1.995
19	2.093	44	2.015	69	1.995
20	2.086	45	2.014	70	1.994
21	2.080	46	2.013	71	1.994
22	2.074	47	2.012	72	1.993
23	2.069	48	2.011	73	1.993
24	2.064	49	2.010	74	1.993
25	2.060	50	2.009	75	1.992

Los grados de libertad (gl) se fijan con base a la fórmula indicada en el subíndice de la  $t$  de Student.

# 11. BIBLIOGRAFÍA.

- 1) COLEGIO DE QUÍMICOS FARMACÉUTICOS BIÓLOGOS, “GUÍA DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS”, 8 – 11, 17 – 32, 57 – 70, 2002.
- 2) PROCEDIMIENTO DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS, PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN No. 300 – 015.
- 3) FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS, 8ª Ed. MEXICO, 21 – 31, 37 – 43, 367 – 383, 1883-1885, 2004.
- 4) FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA, 29ª Ed., 2872 – 2879, 2006.
- 5) NORMA OFICIAL MEXICANA NOM - 059 – SSA – 1 – 1993, “BUENAS PRÁCTICAS DE FABRICACIÓN PARA ESTABLECIMIENTOS DE LA INDUSTRIA QUÍMICO FARMACÉUTICA DEDICADOS A LA FABRICACIÓN DE MEDICAMENTOS”.
- 6) THE MERCK INDEX, 13ª. Ed., 1097, 2001.
- 7) NORMA OFICIAL MEXICANA NOM - 073 – SSA1 – 1993, “ESTABILIDAD DE MEDICAMENTOS”.
- 8) FLOREY KLAUS, “ANALYTICAL PROFILES OF DRUG SUBSTANCES AND EXCIPIENTS”, 7 (13): 327-344, 1989.
- 9) PLM, “DICCIONARIO DE ESPECIALIDADES FARMACEUTICAS”, 50ª Ed., 3328 – 3331, 2006.
- 10) REGLAMENTO DE INSUMOS PARA LA SALUD, 1998.
- 11) NORMA OFICIAL MEXICANA NOM – 164 – SSA1 – 1998, “BUENAS PRÁCTICAS DE FABRICACIÓN PARA ESTABLECIMIENTOS DE LA INDUSTRIA QUÍMICO FARMACEUTICA DEDICADOS A LA FABRICACIÓN DE FÁRMACOS”.
- 12) SPIEGEL M. R, “ESTADÍSTICA”, Mc GRAW HILL, 2ª. Ed., 375 – 410, 1998.
- 13) SORENSEN L. K., HANSEN H., “DETERMINATION OF METRONIDAZOLE AND HYDROMETRONIDAZOLE IN TROUT BY A HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD”, FOOD ADDIT CONTAM., MAR 17 (3):197-203, 2000.

- 14) VEGA E, DABBENE V, NASSETTA M, SOLA N, "VALIDATION OF A REVERSED-PHASE LC METHOD FOR QUANTITATIVE ANALYSIS OF INTRAVENOUS ADMIXTURES OF CIPROFLOXACIN AND METRONIDAZOLE", J. PHARM BIOMED ANAL., DEC 21(5):1003-9, 1999.
- 15) BERGANT, ARNOLD E, WITHANDER L., "COMPARASION OF METRONIDAZOLE ASSAY BY MICROBIOLOGICAL AND CHEMICAL METHODS", METHODS FIND EXP CLIN PHARMACOL, APR 2(3):145-150, 1980.
- 16) POLZER J, GOWIK P, "VALIDATION OF A METHOD FOR THE DETECTION AND CONFIRMATION OF NITROIMIDAZOLES AND CORRESPONDING HYDROXY METABOLITES IN TURKEY AND SWINE MUSCLE BY MEANS OF GAS CHROMATOGRAPHY-NEGATIVE ION CHEMICAL IONIZATION MASS SPECTROMETRY", J CHROMATOGR B BIOMED SCI APPL., SEP 15; 761 (1):47-60, 2001.
- 17) LINDBERG R, JARNHEIMER PA, OLSEN B, JOHANSSON M, TYSKLIND M, "DETERMINATION OF ANTIBIOTIC SUBSTANCES IN HOSPITAL SEWAGE WATER USING SOLID PHASE EXTRACTION AND LIQUID CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY AND GROUP ANALOGUE INTERNAL STANDARDS", CHMOSPHERE, DEC 57 (10):1479-1488, 2004.
- 18) DO NASCIMENTO TG, OLIVIERA EDE J, MACEDO RO, "SIMULTANEOUS DETERMINATION OF RANITIDINE AND METRONIDAZOLE IN HUMAN PLASMA USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH DIODE ARRAY DETECTION", J PHARM BIOMED ANAL., APR 1; 37(4):777-783, 2005.
- 19) BEMPONG DK, MANNING RG, MIRZA T, BHATTACHARYYA L., "A STABILITY-INDICATING HPLC ASSAY FOR METRONIDAZOLE BENZOATE", J PHARM BIOMED ANAL., JUL 15; 38(4): 776-780, 2005.
- 20) MISHAL A, SOBER D, "STABILITY INDICATING REVERSED-PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF METRONIDAZOLE BENZOATE AND DILOXANIDE FUROATE AS BULK DRUG AND IN SUSPENSION DOSAGE FORM", J PHARM BIOMED ANAL., SEP 15; 39(3-4):819-823, 2005.
- 21) BARATIERI SC, BARBOSA JM, FREITAS MP, MARTINS JA, "MULTIVARIATE ANALYSIS OF NYSTATIN AND METRONIDAZOLE IN A SEMISOLID MATRIX BY MEANS OF DIFFUSE REFLECTANCE NIR SPECTROSCOPY AND LPS REGRESSION", J PHARM BIOMED ANAL., AUG 12; 37 8(5):459-465, 2005.

- 22) NAGARAJA P, SUNITHA KR, VASANTHA RA, YATHIRAJAN HS, "SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF METRONIDAZOLE AND TINIDAZOLE IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS", J PHARM BIOMED ANAL, MAY 15; 28(3-4); 527-535, 2002.
- 23) WALLILY AF, ABDINE HH, RAZAK OA, ZAMEL S, "SPECTROPHOTOMETRIC AND HPLC DETERMINATION OF SECNIDAZOLE IN PHARMACEUTICAL TABLETS", J PHARM BIOMED ANAL, JUL 22(6):887-897, 2000.
- 24) SANYAL AK, "RAPID AND SELECTIVE METHOD OF QUANTITATION OF METRONIDAZOLE IN PHARMACEUTICALS", J ASSOC OFF ANAL CHEM, JUL-AUG; 71(4):849-851, 1988.
- 25) BEMPONG DK, MANNING RG, MIRZA T, BHATTACHARYYA L, "A STABILITY-INDICATING HPLC ASSAY FOR METRONIDAZOLE BENZOATE", J PHARM BIOMED ANAL, JUL 15; 38 (4):776-780, 2005.
- 26) BAKSHI M, SINGH S, "ICH GUIDANCE IN PRACTICE: ESTABLISHMENT OF INHERENT STABILITY OF SECNIDAZOLE AND DEVELOPMENT OF A VALIDATED STABILITY-INDICATING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC ASSAY METHOD", J PHARM BIOMED ANAL, NOV 19; 36(4):769-775, 2004.
- 27) SHEN J, YHANG Y, ZHANG S, DING S, XIANG X, "DETERMINATION OF NITROIMIDAZOLES AND THEIR METABOLITES IN SWINE TISSUES BY LIQUID CHROMATOGRAPHY", J AOAC INT, MAY-JUN; 86(3): 505-509, 2003.
- 28) AKAY C, OZKAN SA, SENTURK Z, CEVHEROGHU S, "SIMULTANEOUS DETERMINATION OF METRONIDAZOLE AND MICONAZOLE IN PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS BY RP-HPLC", FARMACO, NOV; 57(11):953-957, 2002.