



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

*Optimización de un método analítico para la cuantificación de  
dicloxacilina por HPLC empleando fase reversa*

T E S I S

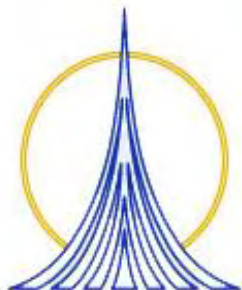
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

**LUIS ENRIQUE LIMA ESPINOZA**

DIRECTOR: QF. LUIS FERNANDO POOT LÓPEZ

ASESOR: DR. JUAN CARLOS VÁZQUEZ LIRA





Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Control Físicoquímico del Departamento de Control de Calidad de Farmacéutica Wandel, S.A. de C.V.

Agradecimientos:

A mis padres: Porque gracias a su cariño, guía y apoyo he llegado a realizar uno de los anhelos más grandes de mi vida, fruto de inmenso apoyo, amor y confianza que en mí se depositó y con los cuales he logrado terminar mis estudios profesionales que construyen el legado más grande que pudiera recibir y por lo cual les agradeceré eternamente.

A mis maestros: Como una muestra de mi cariño y agradecimiento por todo el apoyo brindado y porque hoy veo llegar a su fin una de las metas de mi vida, les agradezco la orientación que siempre me han otorgado. Gracias.

Al término de esta etapa de mi vida, quiero expresar un profundo agradecimiento a quienes con su ayuda, apoyo y comprensión me alentaron a lograr esta hermosa realidad.

“Haz lo que puedas y lo que quieras, con lo que tengas, estés donde estés.”  
***Theodore Roosevelt***

---

I. Índice	I
1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
2.1. Penicilinas	2
2.1.1. Historia	2
2.1.2. Conceptos	3
2.2. Dicloxacilina Sódica	7
2.2.1. Propiedades Fisicoquímicas	7
2.2.2. Descripción Física	8
2.2.3. Indicaciones terapéuticas	8
2.2.4. Farmacocinética y Farmacodinamia	8
2.2.5. Uso durante el embarazo y/o la lactancia	9
2.2.6. Reacciones secundarias y adversas	9
2.2.7. Interacciones medicamentosas y de otro género	9
2.2.8. Manifestaciones y manejo de la sobredosificación y/o la ingesta accidental	9
2.2.9. Presentaciones farmacéuticas	9
2.2.10. Dosis recomendadas	10
2.2.11. Recomendaciones de almacenamiento	10
2.3. Cromatografía líquida	11
2.3.1. Historia	11
2.3.2. Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC)	12
2.3.3. Clasificación de la cromatografía	13
2.3.4. Detectores en HPLC	16
2.3.5. Fase Móvil	19
2.3.6. Control del pH	22
2.3.7. Fase Estacionaria (Columnas Cromatográficas)	23
2.3.8. Efecto de la temperatura en HPLC	25
2.4. Validación de métodos analíticos	27
3. Planteamiento de problema	29
4. Objetivos	30
4.1. Objetivo general	30
4.2. Objetivos específicos	30
5. Hipótesis	31
6. Desarrollo experimental	32
6.1. Material	32
6.2. Equipo e Instrumentos	32
6.3. Principio Activo	32
6.4. Disolventes y Reactivos	33

6.5. Metodología experimental	34
6.5.1. Diagrama de flujo	34
6.5.2. Cronograma de actividades	35
6.6. Procedimiento	36
6.6.1. Investigación Bibliográfica	36
6.6.2. Identificación del Analito	36
6.6.3. Selección de Columna	38
6.6.4. Selección de fase móvil y pH	39
6.6.5. Concentración y Volumen de la Muestra	40
6.6.6. Comparación del método analítico desarrollado vs. el método farmacopéico	40
6.6.7. Validación del método analítico	41
7. Resultados y Análisis de resultados	42
8. Conclusiones	63
9. Referencias bibliográficas	64
10. Anexos	67
10.1. Miscibilidad de solventes utilizados para cromatografía	67

## 1. Introducción

La dicloxacilina es una penicilina resistente a la penicilinasa, en donde su uso se enfoca principalmente al tratamiento de las infecciones causadas por cepas susceptibles productoras de penicilinasa, en particular de *Staphylococcus aureus* o *epidermidis* resistentes a la penicilina G, para lo cual comparte el estatus de droga de primera elección con las otras penicilinas resistentes a la penicilinasa.

Junto a los argumentos farmacológicos y clínicos que abogan por el uso actual de las penicilinas que podríamos denominar clásicas, no se debe menospreciar el hecho de que este tipo de antibióticos suele tener un precio módico en comparación con los antimicrobianos más recientes, lo que incide favorablemente en la relación costo/beneficio tan importante para la economía de la salud. Dicho de otro modo, existen procesos infecciosos que podemos tratar adecuadamente sin incidir en forma negativa sobre el gasto farmacéutico.

Por otra parte, el desarrollo de técnicas analíticas más rápidas, eficaces y económicas es sin duda un reto que se debe basar en conocimientos y aplicaciones de equipos de tecnología que ayudarán a cubrir las necesidades para mantener un estricto control de calidad en la aceptación (identidad y valoración) de materias primas y en la fabricación de medicamentos (valoración y liberación de áreas de fabricación).

Es por eso, que a nivel producción también se hace necesaria la participación del análisis fisicoquímico para liberar un producto intermedio como una mezcla de polvos o quizás la liberación de áreas por análisis cuali-cuantitativo de trazas en donde un análisis microbiológico o yodométrico para penicilinas no serían factibles ni por el tiempo empleado ni por la sensibilidad que este tipo de análisis ofrecen respectivamente. El tiempo no productivo provocado por la espera de un resultado repercute directamente sobre las metas planeadas en cuanto a la cantidad de piezas/tiempo planeadas ya que se consume tiempo-personal y tiempo-áreas por que las políticas de calidad de la Empresa no permite la liberación de producto o áreas si no se encuentra debidamente aprobado por el Laboratorio de Control de Calidad.

Debido a que el análisis fisicoquímico utilizado para la Dicloxacilina es muy tardado, se tiene como finalidad de este proyecto optimizar un método analítico capaz de disminuir tiempos y costos de análisis notablemente a través de un análisis para Dicloxacilina por HPLC de elusión rápida que garantice la obtención de resultados confiables, que tengan siempre la misma validez, que pueda utilizarse en los equipos disponibles en el Laboratorio y que el tiempo de entrega de resultados sea el mínimo con el fin de evitar contratiempos y tiempos muertos elevados en producción.

## 2. Marco teórico

### 2.1 Penicilinas

#### 2.1.1 Historia

Desde hace milenios el hombre usaba empíricamente en el tratamiento de heridas y otras enfermedades, tierra y vegetales que son fuentes de mohos y bacterias productores de antibióticos y fue en el siglo antepasado varios investigadores hicieron notar la acción bactericida de diversos hongos.

En el año 1877, Pasteur y Joubert señalaron que los cultivos bacterianos se arruinaban con frecuencia por el crecimiento excesivo de hongos, y los microbiólogos pronto reconocieron que un microorganismo podía inhibir el crecimiento de otro por secreción de sustancias tóxicas. La mayor parte también eran tóxicas para animales de prueba y se les prestó poca atención. <sup>Bowman, 1984.</sup>

En 1928, Alexander Fleming, que trabajaba en el *St Mary's Hospital* de Londres, observó que una placa de cultivo en la que se cultivaban estafilococos se había contaminado con un hongo del género *Penicillium* y que el crecimiento bacteriano en las proximidades del hongo se había inhibido. Aisló el hongo en cultivo puro y demostró que producía una sustancia bacteriana, que denominó penicilina. Posteriormente, en 1940, Florey Chain y colaboradores de Oxford, extrajeron esta sustancia y analizaron sus efectos antibacterianos. Demostraron que tenía propiedades quimioterapéuticas potentes en ratones infectados y que no era tóxica. Sus notables efectos antibacterianos en seres humanos se comprobaron claramente en 1941. Se probó una pequeña cantidad de penicilina, que se extrajo a partir de cultivos crudos en los laboratorios de la *Dunn School of Pathology* de Oxford, en un policia que presentaba una septicemia por estafilococos y estreptococos con múltiples abscesos y osteomielitis con fístulas supurantes. Tenía muchos dolores y estaba gravemente enfermo, se disponía de sulfamidas, pero no habrían tenido efecto en presencia de pus. Se aplicaron inyecciones intravenosas de penicilina cada 3 horas. Después de cinco días, su situación había mejorado mucho; la temperatura era normal, comía bien y se apreció una evidente resolución de los abscesos. Además, no pareció haber efectos secundarios. Entonces se agotó el suministro de penicilina, su situación se deterioró de manera gradual y murió un mes después. Aunque no se logró salvar la vida del policia, ésta fue la primera confirmación del pronunciado efecto antibacteriano de penicilina por vía *sistémica* en seres humanos.

Generalmente no se sabe que Paine, un licenciado del *St Mary's* a quien Fleming había dado algunos mohos de penicilina, había utilizado penicilina tópica con éxito en cinco pacientes con infecciones oculares diez años antes. Las penicilinas son muy eficaces y se utilizan de manera generalizada. <sup>Rang, 2004.</sup>



## 2.1.2 Conceptos

A. **Clasificación:** Todas las penicilinas derivan del ácido 6-aminopenicilánico y contiene al anillo  $\beta$ -lactámico que es esencial para su actividad antibacterial.

La estructura básica de las penicilinas, como se señala en la figura 1, incluye un anillo tiazolidina (B) unido a otro anillo  $\beta$ -lactámico (A) que está unido a una cadena lateral (R). El propio núcleo de penicilina es el elemento estructural fundamental de actividad biológica; la transformación metabólica o la alteración química de esta parte de la molécula hacen que se pierda toda acción bacteriana importante.

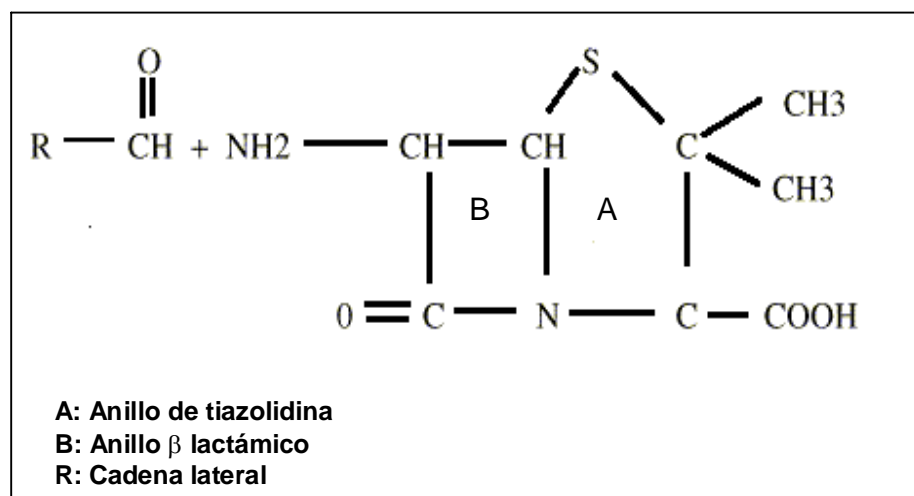


Figura 1. Estructura básica de las penicilinas.

La cadena lateral (R) es la que rige muchas de las características antibacterianas y farmacológicas de un tipo particular de penicilina. Se han producido penicilinas naturales con base en la composición química del medio de fermentación utilizado para el cultivo de *Penicillium*.

El descubrimiento de que el ácido 6-aminopenicilánico podía obtenerse de cultivos de *P. chrysogenum*, de los que se eliminaban los precursores de cadena laterales, permitió obtener penicilina semisintética. Pueden agregarse cadenas laterales que modifican la sensibilidad de los compuestos resultantes a enzimas ( $\beta$ -lactamasas) que inactivan y cambian la actividad antibacteriana y las propiedades farmacológicas del producto. El ácido 6-aminopenicilánico actualmente se produce en gran cantidad con el auxilio de una amidasa de *P. chrysogenum*; dicha enzima rompe la unión peptídica que une la cadena lateral de penicilina al ácido 6-aminopenicilánico.

Las penicilinas se pueden destruir por enzimas (amidasa y  $\beta$ -lactamasas [penicilinasas]). Los productos de esta degradación se muestran en la figura 2.

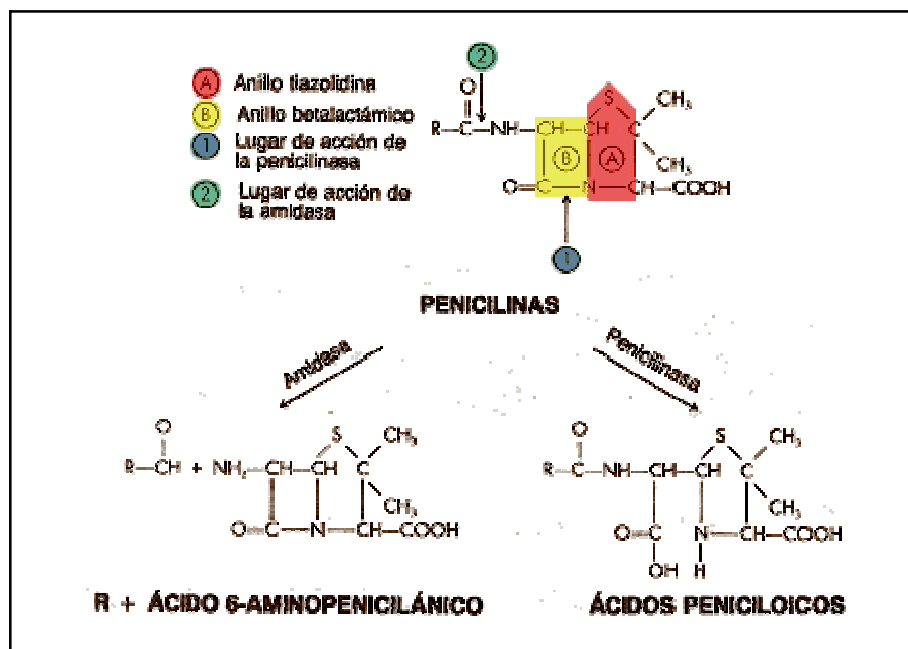


Figura 2. Rompimiento enzimático de las Penicilinas.

**B. Farmacocinética:** Las penicilinas varían en estabilidad a los ácidos y por tanto, en su biodisponibilidad por vía bucal. Como compuestos polares, no se metabolizan en forma extensa. Se excretan sin cambio en la orina por filtración glomerular y secreción tubular renal. La ampicilina se excreta en parte en la bilis. Las vidas medias plasmáticas de gran parte de las penicilinas varían de 0.5 a 1 horas. Las formas procaínica y benzatínica de la penicilina G se administran por vía intramuscular y tienen vidas medias prolongadas debido a que el medicamento activo pasa al torrente sanguíneo con suma lentitud. <sup>KAtzung, 1991.</sup>

**C. Mecanismo de Acción:** El mecanismo de acción de las penicilinas no ha sido completamente dilucidado. Sin embargo se sabe que ellas actúan mediante la inhibición en la síntesis de la pared celular de la bacteria y la activación de su sistema autolítico (autolisinas). La acción de las penicilinas necesita la presencia de una pared celular que contenga peptidoglicanos.

En la división activa de la bacteria, las penicilinas inhiben ciertas enzimas que crean reacción cruzada entre las cadenas peptídicas de la pared y de esta forma impiden el desarrollo de la estructura normal del peptidoglicano. Mediante este mecanismo se crea una pared celular defectuosa que no protege a la bacteria y fácilmente se produce la lisis celular del microorganismo por la alta presión osmótica de su interior.

En la pared celular existen unas enzimas bacterianas (transpeptidasa, carboxipeptidasa y endopeptidasa) que son llamadas proteínas ligadoras de penicilinas.

La habilidad para penetrar la pared celular y el grado de afinidad de estas proteínas determinan la actividad de la penicilina en la bacteria. Varias bacterias difieren en el tipo y concentración de sus proteínas ligadoras de penicilina y la permeabilidad de sus paredes celulares a los antibióticos. Esto determina la susceptibilidad de las diferentes bacterias a los antibióticos. Adicionalmente, se ha encontrado que las penicilinas activan el sistema endógeno autolítico de las bacterias, un proceso que inicia la lisis celular y muerte de la bacteria.

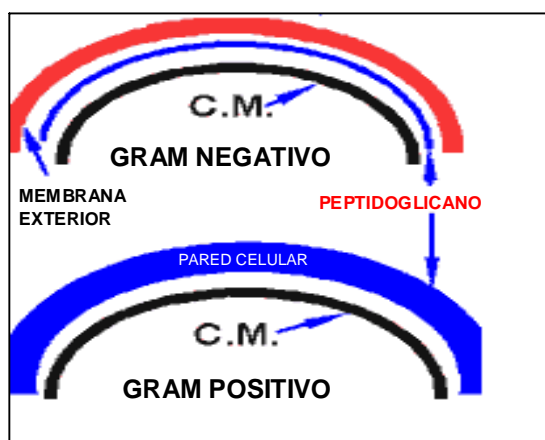


Fig. 3. Pared Celular de bacterias.

Las penicilinas son bactericidas solo si la célula se encuentra en crecimiento activo y sintetizando su pared celular.

**D. Penicilinas penicilinasa resistentes:** Después del suceso inicial de las penicilinas naturales en el tratamiento de infecciones estafilocócicas, la aparición de estafilococos productores de  $\beta$ -lactamasas a finales de los años 50's disminuyeron la efectividad de la penicilina G en un 80% de los casos presentados en los hospitales. Esta situación promovió el desarrollo de investigaciones que llevaron al desarrollo de penicilinas semisintéticas penicilinasa resistentes. <sup>Greenwood, 1995.</sup>

La resistencia bacteriana contra los  $\beta$ -lactámicos sigue en aumento con un ritmo impresionante. Entre los mecanismos de resistencia están no solamente la producción de  $\beta$ -lactamasa, sino alteraciones en las proteínas que se ligan a penicilina, y disminución de la penetración activa del antibiótico a la célula, así como de la salida activa de la misma. <sup>Godman, 1996.</sup> La información genética para la formación de  $\beta$ -lactamasas puede estar presente en cromosomas o en plásmidos resistentes. <sup>Mutschler, 1995.</sup>

El grupo de penicilinas penicilinasa resistentes poseen una cadena lateral acilica que inhibe la acción de la penicilinasa y por consiguiente previenen la apertura del anillo  $\beta$ -lactámico.

La meticilina fue la primera penicilina semisintética penicilinasa resistente que se introdujo para uso clínico, por vía parenteral. Este fármaco fue altamente eficaz contra infecciones estafilocócicas, pero se asoció a la ocurrencia de nefritis intersticial y su uso fue discontinuado. Posteriormente aparecieron la Oxacilina y la Nafcilina para uso parenteral, y dos drogas para uso oral: La Cloxacilina y la Dicloxacilina.

La oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina y floxacilina, todas ellas son análogas por eso se consideran juntas. Estos agentes son relativamente estables en medio ácido y por eso se utilizan por vía oral, además de la parenteral. Se absorben rápida e incompletamente (30-80 %) por el tracto gastrointestinal; aunque su absorción es más eficiente cuando se ingieren en ayunas. Se excretan rápidamente por el riñón y tienen significativa eliminación hepática. De este grupo la dicloxacilina es la más activa. Cuesta, 1988. Mensa, 1996. Zamora, 1990.

## 2.2 Dicloxacilina

Los antibióticos son otro pilar en que se basa el tratamiento de las infecciones de piel y tejidos blandos. Los derivados de la penicilina como dicloxacilina siguen siendo una magnífica opción para el tratamiento de las infecciones de piel y tejidos subcutáneos, como lo demuestra un estudio multicéntrico de 14 hospitales en tres continentes: Asia (Filipinas y Tailandia), América Latina (México, Perú, Chile y Venezuela) y Europa (Polonia, Hungría y Checoslovaquia), donde se usó un esquema de dicloxacilina obteniéndose excelentes resultados.

Se demostró que en las infecciones de piel y tejidos blandos donde los agentes etiológicos son *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* el uso de dicloxacilina prueba su eficiencia como antibiótico derivado de la penicilina. <sup>Svarch, 2002.</sup>

### 2.2.1 Propiedades Fisicoquímicas

#### A. Fórmula estructural:

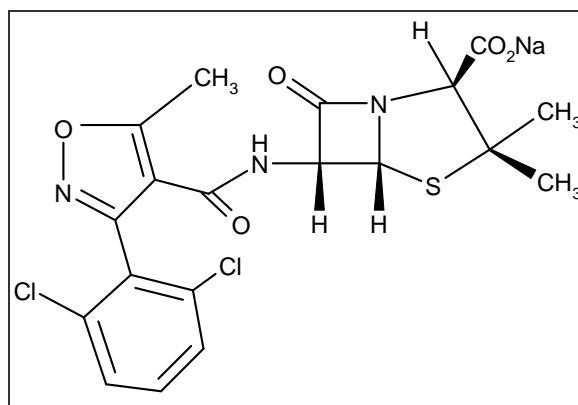
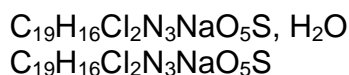


Fig. 4. Estructura de la Dicloxacilina sódica.

#### B. Fórmula condensada y peso molecular:



P.M: 510.32  
P.M: 492.31

#### C. Nombre químico:

6-[[[3-(2,6-Diclorofenil)-5-metil-4-isoxazolil]carbonil]amino]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxilato de sodio.

#### D. Potencia:

Tiene una potencia equivalente a no menos de 850 µg/mg de dicloxacilina base.

- E. Funde con descomposición entre 222-225°C.
- F. Fácilmente soluble en agua. Soluble en metanol; poco soluble en butanol; ligeramente soluble en acetona y en los solventes orgánicos usuales.
- G.  $pK_a$  2.67
- H. pH: Entre 4.5 y 7.5 en una solución al 1%.

### 2.2.2 Descripción Física

Es un polvo cristalino de color blanco a blanco grisáceo con un olor débil característico.

### 2.2.3 Indicaciones Terapéuticas

La dicloxacilina ejerce su acción bactericida contra la mayoría de *Staphylococcus* y *Streptococcus*. Está indicado en: amigdalitis, faringitis, bronquitis, bronconeumonías, neumonías de focos múltiples, incluso en las complicaciones graves de éstas como empiemas, pnoneumotorax con o sin neumatoceles, y abscesos pulmonares producidos por *Staphylococcus aureus* incluyendo a los productores de penicilinas. También está indicado en una gran variedad de infecciones de piel y tejidos blandos como: impétigo, impétigo ampolloso, furunculosis, piodermatitis, celulitis, hidrosadenitis, síndrome de la piel escaldada (síndrome de Lyell y enfermedad de Ritter) y heridas infectadas por *Staphylococcus*. Asimismo, en artritis séptica, osteomielitis y piomiositis.

### 2.2.4 Farmacocinética y Farmacodinamia

La dicloxacilina es una penicilina semisintética que pertenece al grupo de las isoxazolilpenicilinas y es producto de una modificación en la cadena lateral del ácido 6-aminopenicilánico, al que se le acopla un radical isoxazolil con dos átomos de cloro, lo que le permite resistir la acción de las betalactamasas de las bacterias, en especial del género *Staphylococcus*. Ejerce su acción como todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, inhibiendo la síntesis de la pared celular. Por tal motivo su acción es bactericida contra los microorganismos susceptibles.

La dicloxacilina es la isoxazolilpenicilina que mejor absorción gástrica tiene, ya que ésta es máxima en ayunas, o bien una o dos horas después de los alimentos. Su unión a proteínas especialmente a la albúmina es del 90% a 96%. Después de la ingestión de una dosis oral única de 500 mg de dicloxacilina, las concentraciones séricas pico fluctúan entre 10 y 17 mcg/ml. Tal como sucede con otros derivados penicilínicos naturales o semisintéticos, las isoxazolilpenicilinas alcanzan CMI del orden del doble necesario en prácticamente todos los líquidos y tejidos del organismo como piel, hueso,

articulaciones, bilis, líquido pleural, sinovial y amniótico, con limitaciones importantes en líquido cefaloraquídeo y humor acuoso.

La dicloxacilina es excretada sin cambios principalmente por riñón, siendo el transporte tubular la vía más eficiente (90%). Tiene una vida media que fluctúa entre 0.6 a 0.8 horas. Otra vía de eliminación es por inactivación hepática y excreción biliar. En niños de dos a 16 años de edad la vida media sérica fue de 1.9 horas. La vida media de dicloxacilina es ligeramente más prolongada en pacientes con la función renal disminuida y ha sido reportada hasta de 1-2.2 horas en pacientes con deterioro renal severo.

#### 2.2.5 Uso durante el embarazo y/o la lactancia

Puede administrarse con precaución en pacientes con antecedentes alérgicos y/o asmáticos previa valoración del riesgo-beneficio para el paciente. Los estudios realizados han demostrado que carece de acción teratogénica; sin embargo la seguridad durante el embarazo no ha sido establecida. Al igual que otras penicilinas, se excreta a través de la leche materna; sin embargo puede utilizarse en recién nacidos aunado a un aminoglucósido en la sospecha de sepsis del recién nacido.

#### 2.2.6 Reacciones secundarias y adversas

Al igual que con todos los antibióticos, pueden presentarse reacciones alérgicas de diverso grado de severidad.

#### 2.2.7 Interacciones medicamentosas y de otro género

La acción bactericida de la dicloxacilina es antagonizada con la administración conjunta de tetraciclinas o cualquier otro bacteriostático, por lo que debe evitarse su administración simultánea.

#### 2.2.8 Manifestaciones y manejo de la sobredosificación y/o ingesta accidental

En caso de reacción anafiláctica se recomienda la aplicación de adrenalina al milésimo por vía intramuscular. Asimismo podrán utilizarse otros recursos como esteroides, antihistamínicos y otros.

#### 2.2.9 Presentaciones Farmacéuticas

A. Amifarin (Dicloxacilina) suspensión 125 mg/5 mL.

B. Amifarin (Dicloxacilina) suspensión 250 mg/5 mL.

C. Amifarin (Dicloxacilina) cápsulas 250 mg.

D. Amifarin (Dicloxacilina) cápsulas 500 mg.

#### 2.2.10 Dosis Recomendada

La dosis varia de acuerdo a la severidad de la infección, ya que en lesiones leves de piel puede ser de 50 a 100 mg/kg/día y en casos moderados a severos 100 a 200 mg/kg/día por vía intravenosa por cinco días y continuar con las mismas dosis por vía oral hasta completar diez o más días.

Niños: hasta 2 años, 1 cucharadita de Amifarin suspensión de 125 mg cada 6 horas por vía oral; >2 a 5 años, 1 cucharadita de Amifarin suspensión de 250 mg cada 6 horas por vía oral. Niños: Amifarin suspensión 125 mg: Hasta 2 años, 1 cucharadita cada 6 horas por vía oral. Amifarin suspensión 250 mg: >2 a 5 años, 1 cucharadita cada 6 horas por vía oral.

Amifarin cápsulas 250 mg: >5 a 12 años, 1 cápsula cada 6 horas por vía oral. Adultos y mayores de 12 años: Amifarin cápsulas 500 mg, 1- 2 cápsulas cada 6 horas por vía oral.

#### 2.2.11 Recomendaciones de Almacenamiento

Consérvese a temperatura ambiente a no más de 30°C. Hecha la mezcla (suspensión extemporánea) el producto se conserva dos semanas en refrigeración (2°C-8°C).



## 2.3 Cromatografía Líquida

### 2.3.1 Historia

Entre las técnicas más poderosas de que dispone el analista para la resolución de estas mezclas existe un grupo de métodos altamente eficaces denominados colectivamente *cromatografía*. La cromatografía comprende un grupo de métodos para separar mezclas moleculares que dependen de las afinidades diferenciales, de los solutos entre dos fases inmiscibles. Una de las fases es un lecho fijo de gran área superficial, mientras que la otra es un líquido, el cual se mueve a través de la superficie de la fase fija o sobre ella. Los componentes de la mezcla deben poseer dimensiones moleculares, lo que requiere que estén en solución o en el estado de vapor. La afinidad relativa de los solutos por cada una de las fases debe ser reversible para asegurar que ocurra transferencia de masa durante la separación cromatográfica.

La fase fija se denomina *fase estacionaria* y la otra *fase móvil*. La fase estacionaria puede ser un sólido poroso o finamente dividido, o un líquido que ha sido colocado en una capa delgada sobre un material de soporte inerte. Es necesario que las partículas de la fase estacionaria sean lo más pequeñas y homogéneas posible para proveer una gran superficie de modo que la adsorción y la desadsorción de los solutos ocurran con frecuencia.

En 1906, Michael Tswett publicó un trabajo completo sobre la cromatografía líquida, en donde explicó claramente la naturaleza del proceso y su apreciación acerca de su potencial, sin embargo, el método no fue adoptado ampliamente hasta después de muchos años de su publicación. También se le da a este autor el crédito de acuñar los términos *cromatografía* (escritura por color) para describir el proceso y *cromatograma* para referirse a la columna desarrollada, en donde, con solvente puro pudo separar pigmentos de hojas en siete bandas de colores.

En 1941, Martin y Synge, quienes no habían tenido éxito al usar la extracción por contracorriente para la separación de aminoácidos en muestras de lana, desarrollaron un proceso de cromatografía líquida en la cual utilizaron una columna empaquetada que contenía gel de sílice saturado en agua y una fase móvil de butanol-cloroformo. Estos autores perfeccionaron las técnicas experimentales y explicaron los aspectos teóricos del procedimiento tan detenidamente que en 1952 se les otorgó el Premio Nobel por este trabajo. Desde entonces, la cromatografía líquida se ha convertido en una de las técnicas más versátiles de las que dispone el analista debido a su sencillez y capacidad para obtener separaciones de alta resolución. Se pueden desarrollar separaciones basadas en características tan diversas como la polaridad de los solutos, su naturaleza iónica, su peso molecular, su capacidad de partición o su capacidad para formar complejos.

El término cromatografía líquida se usa en la actualidad para referirse a los métodos en los cuales la separación se produce dentro de una columna empaquetada. El material de empaque puede ser un sólido con capacidades adsorptivas o de exclusión o un soporte inerte revestido con una fase líquida. Se usa una fase líquida móvil como eluyente. Aunque las cromatografías en capa delgada y en papel utilizan una fase móvil líquida y una fase estacionaria sólida, difieren en que las separaciones tienen lugar en una superficie plana en vez de una columna. <sup>Remington, 2003.</sup>

### 2.3.2 Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento CLAR o de Alta Presión CLAP.

Aunque existen diferentes formas, la cromatografía líquida en columna puede realizarse utilizando dos métodos muy comunes:

- A. El procedimiento clásico desarrollado por Tswett, denominado *cromatografía de columna abierta*, en el cual se deja fluir la fase móvil a través de la columna empaquetada bajo la influencia de la gravedad o, a lo sumo, baja presión, por ejemplo 50 a 100 psi, o
- B. El procedimiento en el cual se fuerza la fase móvil a través de la columna empaquetada aplicando alta presión.

Este último procedimiento se denomina *cromatografía líquida de alto rendimiento* (HPLC, por sus siglas en inglés de High Performance Liquid Chromatography), debido a que se obtienen eficiencias extremadamente altas (tanto como 20,000 platos teóricos por metro) o *cromatografía líquida de alta presión* (High Pressure Liquid Chromatography), debido a las altas presiones requeridas (1,000 a 7,000 psi). La capacidad de separación de las columnas depende en gran medida del tamaño de las partículas, así como de la distribución del tamaño de las partículas en la columna. <sup>VillafuerteRobles, 2002.</sup> En la HPLC, el diámetro típico de partícula es de 5  $\mu\text{m}$  o menos, y como resultado las columnas son empaquetadas de manera más ajustada y desarrollan una gran caída de presión que necesitan bombear la fase móvil a través de la columna.

La HPLC como tal, fue desarrollada entre los años 60's y 70's. Hoy en día, es una técnica de separación ampliamente aceptada para el análisis y/o la purificación de muestras en una variedad de áreas incluyendo la farmacéutica, biotecnológica, ambiental, de polímeros e industrias alimenticias. Las aplicaciones de la HPLC son muy variadas, quizá mostrando un énfasis en el análisis de sustancias termolábiles o difíciles de volatilizar, las cuales no se podrían determinar por otros métodos como la cromatografía de gases. <sup>Villafuerte, 2002.</sup>

Un ejemplo claro de la gran utilidad de la HPLC dentro de la industria farmacéutica es el análisis cuali-cuantitativo de mezclas binarias de amoxicilina con clavulanato de potasio, flucloxacilina o dicloxacilina, en donde, por medios tradicionales como la espectrofotometría UV no es posible porque las bandas de absorción de estos

compuestos se superponen por la similitud de sus estructuras químicas. Más aún, la absorbancia de excipientes, sabores o algún otro principio activo en la forma farmacéutica pueden ocasionar problemas adicionales para el analista. <sup>Salem, 2002.</sup> Existen antecedentes de métodos cromatográficos que han sido utilizados como herramientas cuantitativas para la determinación de flucloxacilina y dicloxacilina. <sup>Nour-El-Dien, 2006.</sup>

Cabe mencionar que la HPLC disfruta de un seguro incremento en ventas de instrumental y publicaciones que describen aplicaciones nuevas e innovadoras. Algunas áreas de reciente crecimiento incluyen la miniaturización de los sistemas de HPLC, análisis de ácidos nucleicos, proteínas intactas y digeridas, análisis de carbohidratos y análisis quiral. <sup>Settle, 1997.</sup>

La HPLC puede presentar diferentes características o conceptos de separación como la adsorción, el reparto, los pares iónicos, el intercambio de iones y la exclusión de tamaños o cromatografía en gel. La asignación de un tipo de mecanismo de separación no siempre es posible, ya que regularmente participan varios mecanismos y la separación en donde uno principia y otro termina no es fácil de determinar.

Sus carencias en el desempeño (número de platos/tiempo) y eficiencia (número de platos) se ven parcialmente compensadas en algunos casos por la posibilidad de usar gradientes de elusión.

### 2.3.3 Clasificación de la Cromatografía

Los fenómenos que rigen el proceso de retención y separación son la adsorción y la absorción. El primero queda delimitado a la superficie interfacial, es decir se refiere a la fijación o retención de la sustancia entre la superficie de las dos fases; se relaciona con fuerzas químicas y físicas que dependen de la naturaleza de la sustancia adsorbida, temperatura, naturaleza del adsorbente y concentración. El segundo fenómeno determina la retención de una especie química por parte de una masa y depende de la tendencia que tiene ésta a formar una mezcla o reaccionar químicamente con la misma.

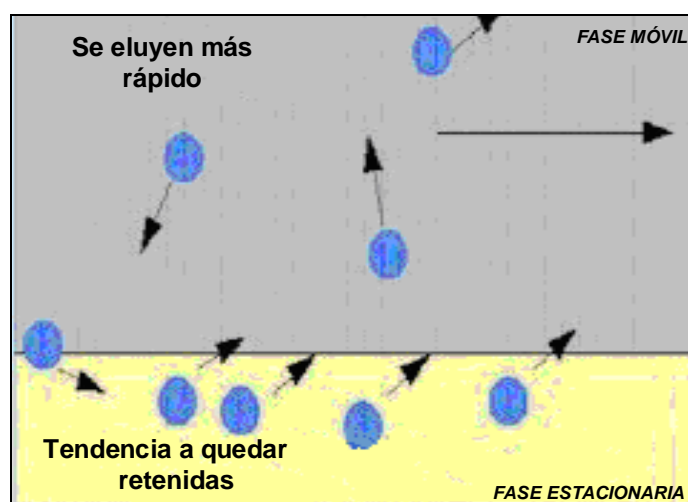


Fig. 5. Fenómenos de adsorción y absorción.

Los métodos cromatográficos se pueden clasificar de acuerdo con la naturaleza de las fases estacionaria y móvil. Si la fase estacionaria es un sólido, el proceso se denomina *cromatografía de adsorción*, mientras que si es un líquido, se le llama *cromatografía de partición*. La diferencia entre ambas puede atribuirse a la naturaleza de las fuerzas que influyen en la distribución de los solutos entre las dos fases.

En la *cromatografía de adsorción* la fase móvil que contienen los solutos disueltos pasa por encima de la superficie de la fase estacionaria. La retención de los componentes y su consiguiente separación dependen de la capacidad de los átomos que se encuentran en la superficie para remover los solutos de la fase móvil y adsorberlos temporalmente por medio de fuerzas electrostáticas. Si la fase móvil es un líquido el proceso se denomina *cromatografía líquido-sólido*, pero cuando la fase móvil es un gas, el método se llama *cromatografía gas-sólido*.

En la *cromatografía de partición*, un material sólido inerte, tal como el gel de sílice o la tierra de diatomeas sirven para sostener una capa delgada de líquido, la cual es la fase estacionaria efectiva. A medida que la fase móvil que contiene los solutos pasa muy cerca de esta fase líquida, se produce la retención y la separación a causa de la solubilidad relativa de los componentes analizados en los dos líquidos según lo determinan sus coeficientes de partición. Si la fase móvil es un líquido, esta *cromatografía* se denomina *cromatografía líquido-líquido* y si es un gas, el proceso se llama *cromatografía gas-líquido* (figura 6).

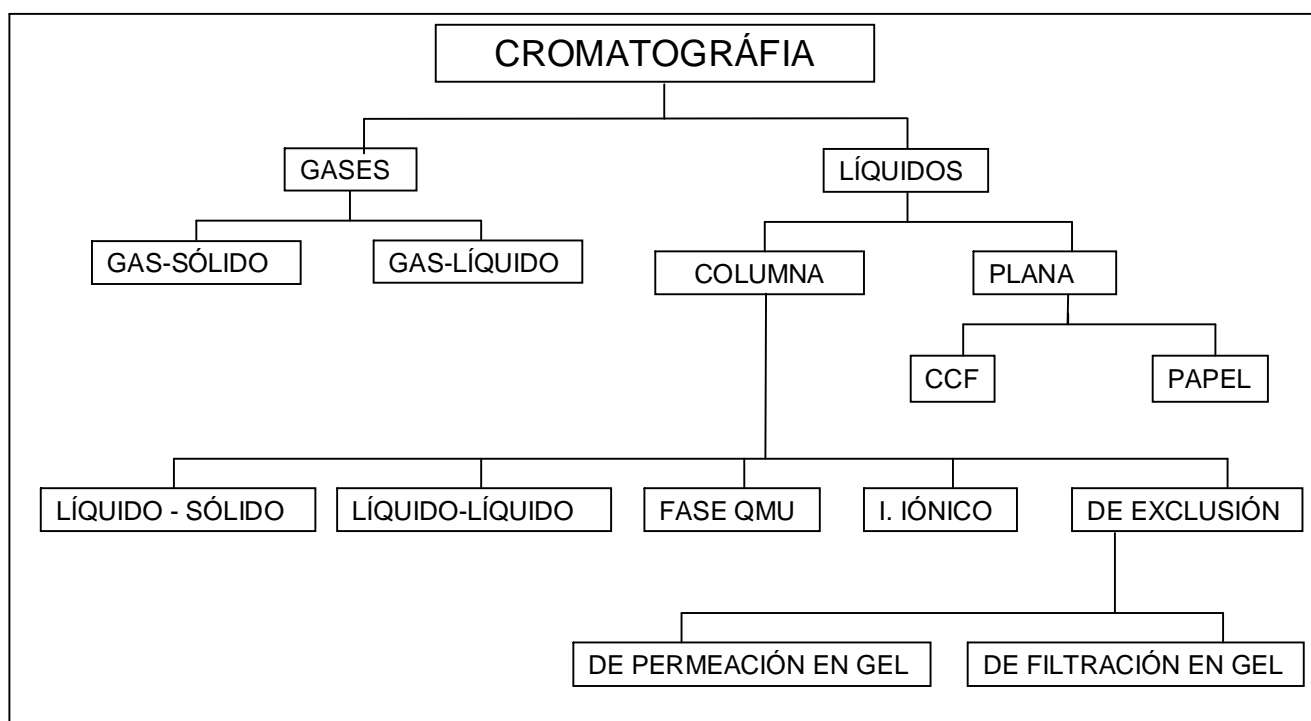


Fig. 6. Clasificación de la cromatografía según las características de la fase móvil y la fase estacionaria.

La siguiente clasificación involucra todas las características importantes que se toman en cuenta en la elección de la cromatografía a utilizar, además de las características propias de las moléculas que se van a analizar:

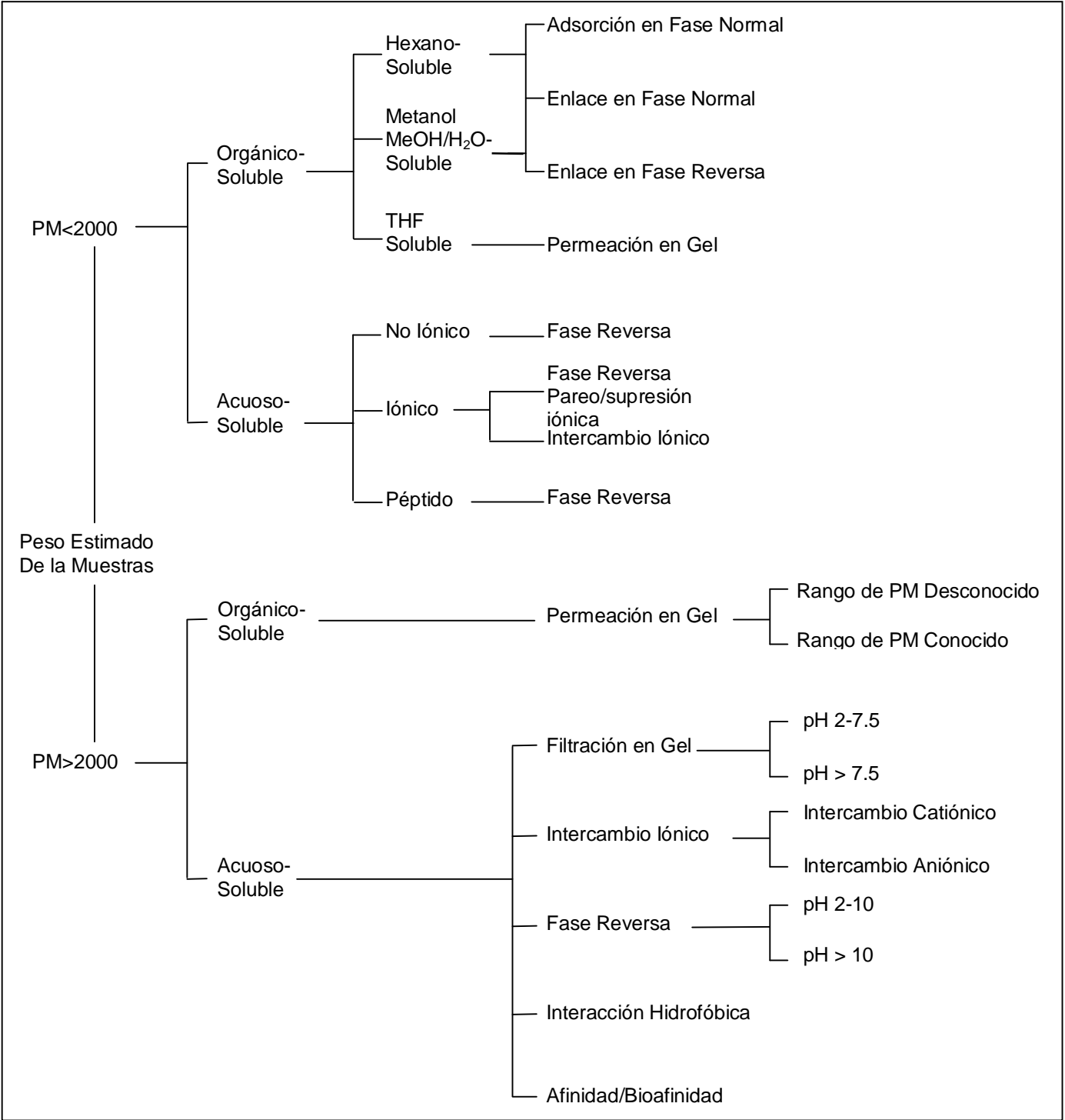


Fig. 7. clasificación de la cromatografía según las características de los solutos a analizar. Adaptado por Agilent Corp. de "Practical HPLC Methodology and Applications", Brian A. Bidlingmeyer, Jhon Wiley & Sons, Inc., New York, p 109.

Existen otros dos métodos de cromatografía, en los cuales la fase estacionaria es un sólido, que se clasifican de manera diferente de la cromatografía líquido-sólido y la cromatografía gas-sólido debido a la naturaleza exclusiva de sus procesos de separación. Éstas son la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía por exclusión de tamaño.

En la cromatografía de intercambio iónico la fase estacionaria está constituida por una matriz polimérica sobre cuya superficie se han unido químicamente grupos funcionales iónicos, por ejemplo, ácidos carboxílicos o aminas cuaternarias. A medida que la fase móvil pasa por la superficie, los solutos iónicos son retenidos mediante la formación de uniones químicas electrostáticas con los grupos funcionales. Las fases móviles utilizadas en este tipo de cromatografía siempre son líquidas.

En la cromatografía por exclusión de tamaño, la fase estacionaria es una sustancia polimérica que contienen numerosos poros de dimensiones moleculares. Los solutos cuyo tamaño molecular es lo bastante pequeño dejan la fase móvil para difundir dentro de los poros. Las moléculas más grandes que no penetran en los poros permanecen en la fase móvil y no son retenidas. Este método es muy adecuado para la separación de mezclas en las cuales los solutos varían considerablemente de tamaño molecular. La fase móvil en este tipo de cromatografía puede ser líquida o gaseosa.

La clasificación dada anteriormente para los diversos tipos de cromatografía puede ser engañosa por su simplicidad. Excepto en casos aislados, la cromatografía de adsorción pura o la de partición ocurren rara vez.

En los últimos años se han publicado métodos cromatográficos por HPLC de fase reversa sobre columna C18 con detección UV a 220 nm, 254 nm y hasta 323 nm para la separación, detección y cuantificación de distintas penicilinas, compuestos de degradación e impurezas con una gran sensibilidad, sin embargo, estos métodos tienen las desventajas de tener corridas analíticas de hasta 50 minutos. Sorensen, 1999. Tsuji, 1978. Ghosh, 1992.

#### 2.3.4 Detectores en HPLC

El punto débil de la HPLC es la falta de un método de detección simple, sensible y universal, equivalente al FID (detector de ionización de flama) en la cromatografía de gases y en la cromatografía de fluidos supercríticos. El propósito de los detectores en un sistema HPLC es identificar la presencia de ciertos componentes de interés en el eluyente. Dentro del detector el analito sufre algunas interacciones fisicoquímicas, por las cuales el analito es reconocido. Estas interacciones son a menudo de naturaleza óptica, los ejemplos son dados por la medida de la absorbancia UV o fluorescencia del eluyente. Hay otras posibilidades como reacciones electroquímicas, espectrometría de masas acoplada a HPLC. Estos modos de detección han sido usados con todos los tipos de

cromatografía analítica incluyendo hasta las técnicas de microcolumna tales como la electroforesis capilar.

El detector esta provisto de una señal eléctrica de salida la cual es proporcional a la cantidad de analito que se encuentra en ese momento en el detector. Esta señal es entonces procesada por un integrador, la cual es usada para la cuantificación del analito presente.

Los detectores pueden ser clasificados en dos grandes categorías:

A.- Detectores de propiedades de masa

Los detectores de propiedades de masa responden por algún cambio en ciertas propiedades físicas en el eluente de HPLC donde esta propiedad es común en la fase móvil y en el analito. Esta magnitud es alterada por la presencia del analito y es donde surge la detección y cuantificación. Un ejemplo es el detector de índice de refracción.

B.- Detectores de propiedades del soluto.

Los detectores de propiedades del soluto responden a ciertas propiedades únicas del analito, tales como la fluorescencia o actividad electroquímica, con pequeña o sin contribución de la fase móvil.

Hay un número de características las cuales son generalmente deseables en los detectores de HPLC. En algunas ocasiones uno de los requisitos más importantes es que el detector sea altamente sensible, por ejemplo que sea capaz de detectar pequeñas cantidades de analito. Una segunda propiedad la cual puede ser muy útil es la capacidad de tener selectividad de ciertos componentes y no de otros. Relacionado a la selectividad es la insensibilidad a cambios en la fase móvil, permitiendo el uso de elusión por gradiente.

Lo más reciente en detección de HPLC, refiriéndose en la selectividad se ha visto con el uso de espectrometría de masas (MS) y por algunas aplicaciones esto puede ser visto como el método de detección ideal. Sin embargo, más consideraciones vanas tales como el tamaño de la instrumentación y su accesibilidad queda limitada debido al costo que representa el acoplamiento de masas a la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC-MS).<sup>Takeba, 1998. Meyer, 1998.</sup>

Tomando en cuenta estas prácticas incómodas, el detector real conectado al sistema HPLC usualmente llega a ser un dispositivo útil y sus características de desempeño deben ser tomadas en cuenta durante el desarrollo de algunos métodos analíticos.

La falta de selectividad en la detección puede requerir el desarrollo de un método extra para resolver completamente la falta o interferencia de un pico, o la falta de sensibilidad puede forzar la inclusión de un paso de extracción o la modificación de la concentración de la muestra en un método analítico hasta alcanzar los niveles detectables del analito.

Una lista de los detectores más utilizados en HPLC es dado en la Tabla 1, en donde se muestran algunas de sus propiedades

**Tabla 1.** Propiedades de algunos detectores en HPLC

Propiedad Detector	Sensibilidad	Selectividad	Rango de aplicación	Caracteriza al soluto?	Gradiente de elusión?	Costo relativo
UV-Vis	**	**	***	*	**	*
UV-Vis Espectrofotométrico	**	***	***	**	**	**
Fluorescencia	***	***	*	**	**	*_**
Índice de Refracción	*	*	**	*	No	*_**
Electroquímico (amperométrico)	***	***	*	**	*	*_**
Espectrometría de Masas	*_**	***	**	***	*_**	***

\*Bajo/Pobre; \*\*Moderado; \*\*\*Alto/Bueno

En HPLC se pueden utilizar reacciones de derivación antes o después de la separación (se prefiere antes), para aumentar la respuesta de un detector a un determinado compuesto, o para disminuir la polaridad de una amina, por ejemplo. Las reacciones de derivación más utilizadas en HPLC se dirigen a la obtención de derivados fluorescentes, siendo de menor importancia las que pretenden producir cromóforos detectables al UV. También los isómeros ópticos pueden derivarse para formar diastereoisómeros, que pueden separarse en columnas convencionales no quirales. Avendaño, 1993.

La sensibilidad de un método de separación depende de su capacidad de carga y de la naturaleza de los detectores disponibles. Esta sensibilidad es superior en HPLC en comparación con otros métodos que sólo trabajan en forma miniaturizada. Cabe aclarar que para el análisis farmacéutico es más importante la sensibilidad a la concentración y no a la masa. De la misma manera, en la detección por absorbancia y por fluorescencia es también la sensibilidad a la concentración y no a la cantidad mínima detectable que es relevante. Villafuerte, 2002.

En la HPLC, los detectores más populares, aparte del índice de refracción, que es poco sensible, es el detector de absorbancia UV, debido a la combinación de factores como:

- A.- Es el adecuado para fármacos que poseen grupos cromóforos con gran absorción (también se utilizan para derivados que posean estas características) que puedan ser de longitud de onda fija, más sensibles y estables, o variable.



- B.- Aunque la sensibilidad no es muy buena comparada con otros tipos de detectores (por ejemplo de fluorescencia o electroquímica), la sensibilidad es adecuada para la mayoría de análisis por HPLC.
- C.- La simplicidad de su diseño y economía significa que los detectores de absorbancia por UV no son generalmente caros en comparación con otros equipos de detección.
- D.- En la mayoría de los casos, cuando un sistema general de HPLC es adquirido, un detector de absorbancia por UV es parte del sistema.

Los detectores de fluorescencia permiten determinar menores concentraciones, pero requieren que los fármacos posean fluorescencia natural o se deriven con los reactivos adecuados. Los detectores electroquímicos, que son muy sensibles, como requieren disolventes o mezclas de disolventes suficientemente polares, están restringidos a la cromatografía en fase reversa.

### 2.3.5 Fase Móvil

La retención neta de un analito es igual a la suma del tiempo gastado en la fase móvil  $t_o$ , y al tiempo gastado en la fase estacionaria,  $t_s$ :

$$t_r = t_s + t_o$$

La retención neta de un analito es una función de las interacciones del soluto-fase estacionaria, soluto-fase móvil e interacciones fase móvil-fase estacionaria que contribuyen a la retención. Si todas estas interacciones con la fase estacionaria son constantes, entonces la retención y la selectividad son solamente funciones de la composición de la fase móvil. Una fase móvil sencilla generalmente puede ser compuesta de una mezcla de dos solventes: un solvente débil A y un solvente fuerte B. por ejemplo, un eluente típico en fase reversa puede consistir de una mezcla de agua, el solvente débil en un sistema de fase reversa, y un modificador fuerte orgánico tal como metanol o acetonitrilo. De manera similar, un eluente en fase normal, típicamente consiste de una mezcla de un solvente débil como *n*-heptano y un modificador fuerte tal como cloroformo o etil acetato.

Otros factores deberán ser tomados en cuenta en la elección de la fase móvil, incluyendo la viscosidad, punto de ebullición (el cual puede ser determinado en el rango de temperaturas de elusión utilizados), y compatibilidad con el sistema de detección.

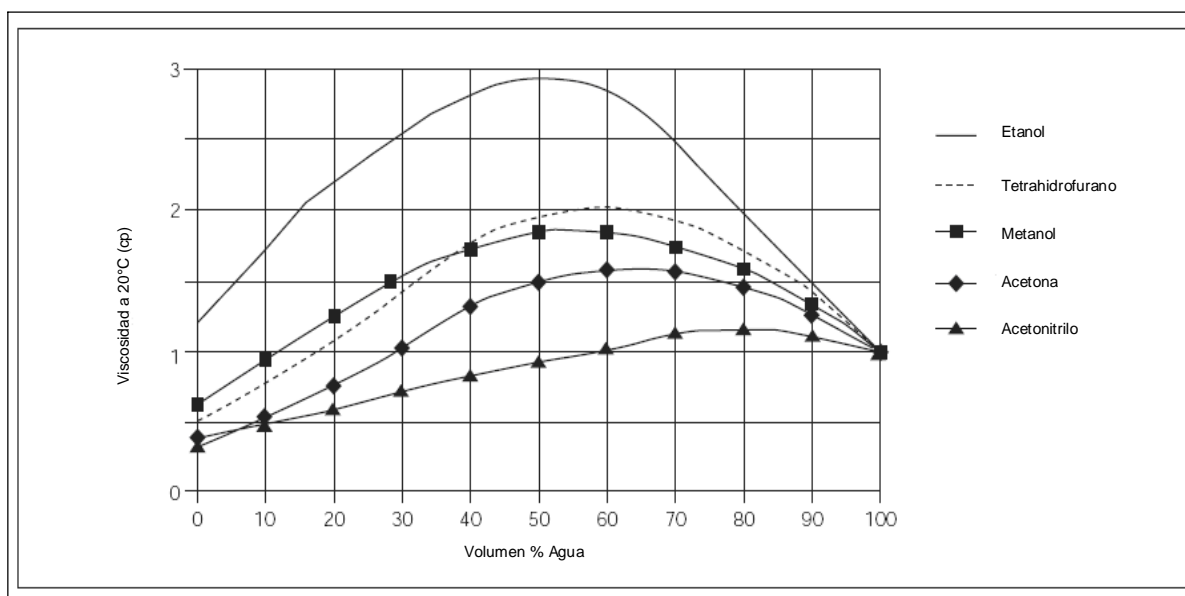


Fig. 8. Viscosidad de diferentes solventes puros y mezclas.

Para que un solvente pueda utilizarse como componente de una fase móvil deben tomarse en cuenta las siguientes características:

- A. Que sea disponible comercialmente
- B. Precio
- C. Pureza y Estabilidad. En la actualidad contamos con productos de grado cromatográfico. Bajo contenido de impurezas
- D. Que sea capaz de disolver la muestra
- E. Miscible con otros solventes para formar mezclas útiles
- F. No degradar o disolver la fase estacionaria
- G. Tener baja viscosidad para reducir las caídas de presión
- H. Ser compatible con el detector utilizado. Transparencia óptica (cuando se usan detectores UV).

Como en todas las técnicas analíticas, los pequeños problemas a la larga pueden llegar a tener un mayor impacto en la exactitud y durabilidad del sistema. Aun con la evolución de los cromatógrafos líquidos en la era de la computadora, hay problemas que ésta no puede resolver.

Todos los disolventes de grado cromatográfico, son filtrados cuidadosamente antes de ponerse a la venta, sin embargo, pueden acumular partículas en suspensión que pueden perjudicar a los componentes del sistema HPLC. Estas partículas en suspensión pueden venir de varias fuentes, incluso de la exposición al polvo en el aire durante el trasvase al depósito para solvente, la exposición a partículas del aire durante el almacenamiento del solvente en el depósito, la degradación lenta del recipiente, o de condensación y polimerización del solvente.

Las partículas pueden ocasionar costosos daños a la bomba HPLC, a las precolumnas, y en general causar desgaste del sistema de HPLC. Los fabricantes de los instrumentos tienen en cuenta este problema y recomiendan que se filtre y desgasifique los disolventes HPLC antes de usarlos.

En el instante que se abre una nueva botella de disolvente grado HPLC se expone el interior de este a la atmósfera y empieza a acumular gases disueltos. El oxígeno disuelto que constituye el 21% de la atmósfera puede producir mayor interferencia en los detectores de fluorescencia y electroquímicos. El nitrógeno disuelto es el otro componente de la atmósfera que puede producir burbujas en la columna de HPLC y cuando el disolvente entra al detector produce picos falsos y desviaciones de la línea base. El dióxido de carbono disuelto generalmente es la causa de los cambios de pH en la fase móvil.

Hay tres métodos comunes que se utilizan hoy para la filtración previa de los disolventes grado HPLC:

- A. Filtro a la entrada del disolvente,
- B. Filtración al vacío
- C. Filtración en línea

También existen cuatro métodos comúnmente usados para desgasificar disolventes grado HPLC:

- A. Sonicación
- B. Burbujear Helio
- C. Degasificación electrónica en la línea del flujo
- D. Degasificación al vacío en línea.

### 2.3.6 Control del pH.

En HPLC de fase reversa, la retención de los analitos es relacionada con su hidrofobicidad. Entre más hidrófobico es el analito, más tiempo será retenido. Cuando un analito es ionizado y llega a ser menos hidrófobico, entonces su retención decrece. Los ácidos pierden un protón y son ionizados cuando el pH se incrementa, las bases ganan un protón y son ionizados cuando el pH disminuye. Es por esto que, cuando se trata de separar mezclas por HPLC de fase reversa que contienen ácidos y/o bases, se vuelve necesario el control del pH de la fase móvil usando un amortiguador apropiado para conseguir resultados reproducibles.

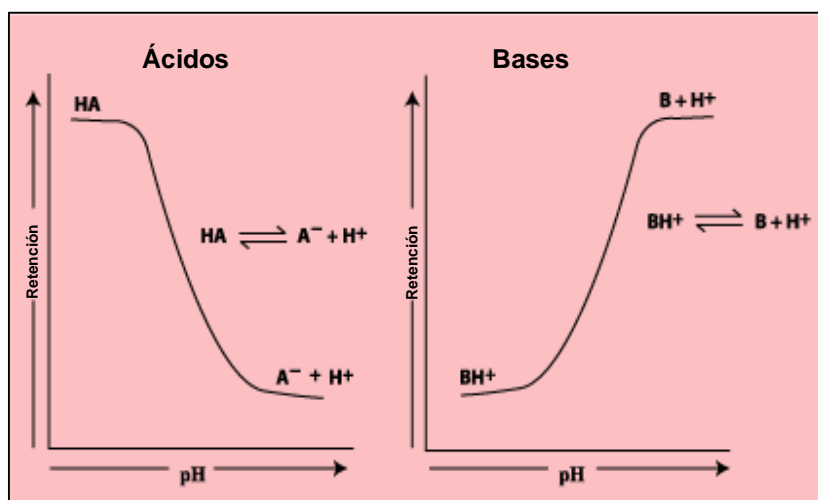


Fig. 9. El efecto del pH en la retención de ácidos y bases.

Para métodos más robustos, es recomendable que las separaciones se desarrollen en una fase móvil con un pH en donde la retención de los analitos sea poco afectada por cambios en el pH. Cuando se separan bases, por ejemplo, fases móviles con un amortiguador ácido usualmente muestran mejor reproducibilidad que fases móviles con amortiguadores neutros.

En ocasiones se desarrollan métodos en HPLC de fase reversa usando amortiguadores que tienen poca o ninguna capacidad reguladora en un pH específico de la fase móvil. Por ejemplo, los métodos que especifican un amortiguador de fosfatos en el rango de 4 a 6, o un amortiguador de acetatos en el rango de 6 a 7 son, desafortunadamente no comunes.

Estos amortiguadores no son solo inusuales en esos rangos de pH, sino que además complican la preparación de la fase móvil innecesariamente y dan al analista la falsa sensación de control en la reproducibilidad de la separación. La capacidad reguladora óptima ocurre cuando el pH es cercano al pKa del amortiguador.

La concentración del amortiguador sobre la fase móvil usualmente tiene poco efecto sobre la retención en HPLC de fase reversa, mientras más alta es la concentración del amortiguador mayor será el control del pH. Una concentración del amortiguador en el rango de 20 a 50 mM es adecuada para la mayoría de las aplicaciones en fase reversa.

### 2.3.7 Fase Estacionaria (columnas cromatográficas)

La columna es el lugar en donde todas las acciones cromatográficas pasan, sin embargo su importancia no es tomada en cuenta. La característica más importante de la columna y que influencia directamente a los resultados es su tamaño. Generalmente las columnas analíticas (las cuales son usualmente hechas de acero inoxidable) están entre 2.5 y 25 cm de longitud y tiene un diámetro interno de pocos milímetros, que va desde 1.0, 2.1, 3.0, 4.6 hasta 7.0 mm.

La longitud óptima de la columna que es requerida para una particular separación es dictaminada por el número de platos teóricos necesarios para dar una resolución deseable. Si la columna es muy pequeña, entonces claramente la columna no tendrá suficiente "capacidad de resolución" para llevar a cabo la separación y si esta es muy larga el tiempo de análisis será muy largo. Las longitudes de columnas más comunes utilizados en HPLC son de 5, 10, 15 y 25 cm,

La mayoría de las columnas analíticas de HPLC tienen diámetros internos (ID) de alrededor de 5 mm, la mayoría son de 4.6 mm. Este diámetro no surge por casualidad, cuando un soluto es inyectado dentro de la columna se extiende axialmente (en dirección perpendicular al flujo) a la cama de la columna. Si se extiende bastante lejos en esa dirección, alcanzara la pared interior de la columna. En esta región incluso las columnas mejor empacadas tendrán algunas irregularidades en su empaque, las cuales pueden contribuir al ensanchamiento a la banda cromatográfica, y además una reducción en la eficiencia. Esa región de empaque irregular puede ser reducida, inicialmente por el uso de columnas con superficies internas pulidas, pero nunca pueden ser eliminadas completamente. Partículas más pequeñas darán una región irregular más pequeña en la pared de la columna, pero esta operación afectara directamente a la presión del sistema. La teoría de la cromatografía predice que un soluto inyectado hasta 10 cm de la columna empacada con partículas de 5  $\mu\text{m}$ , tendrá una banda con un diámetro axial de 2.5 mm al final de la columna.

Últimamente se ha mejorado la tecnología para empaquetar las columnas, lo que ha permitido fabricar columnas de menor ID, longitud total y tamaño de partícula empacada.

El uso de estas últimas columnas tiene ventajas cuando nos referimos a la técnica de HPLC analítica. Por ejemplo: tienen una alta sensibilidad (hasta 100 veces más), son más rápidas y, al usar menos cantidad de solventes, son también más económicas (hasta 100 veces menos de solvente).

Las columnas pueden ser tan estrechas como 1 mm (generalmente llamadas columnas microbore). También hay columnas capilares de silica fundida (320  $\mu\text{m}$ ; d.i.). Sin embargo, el uso de estas columnas exige la utilización de un equipamiento especial designado o modificado para manejar muy pequeños volúmenes.

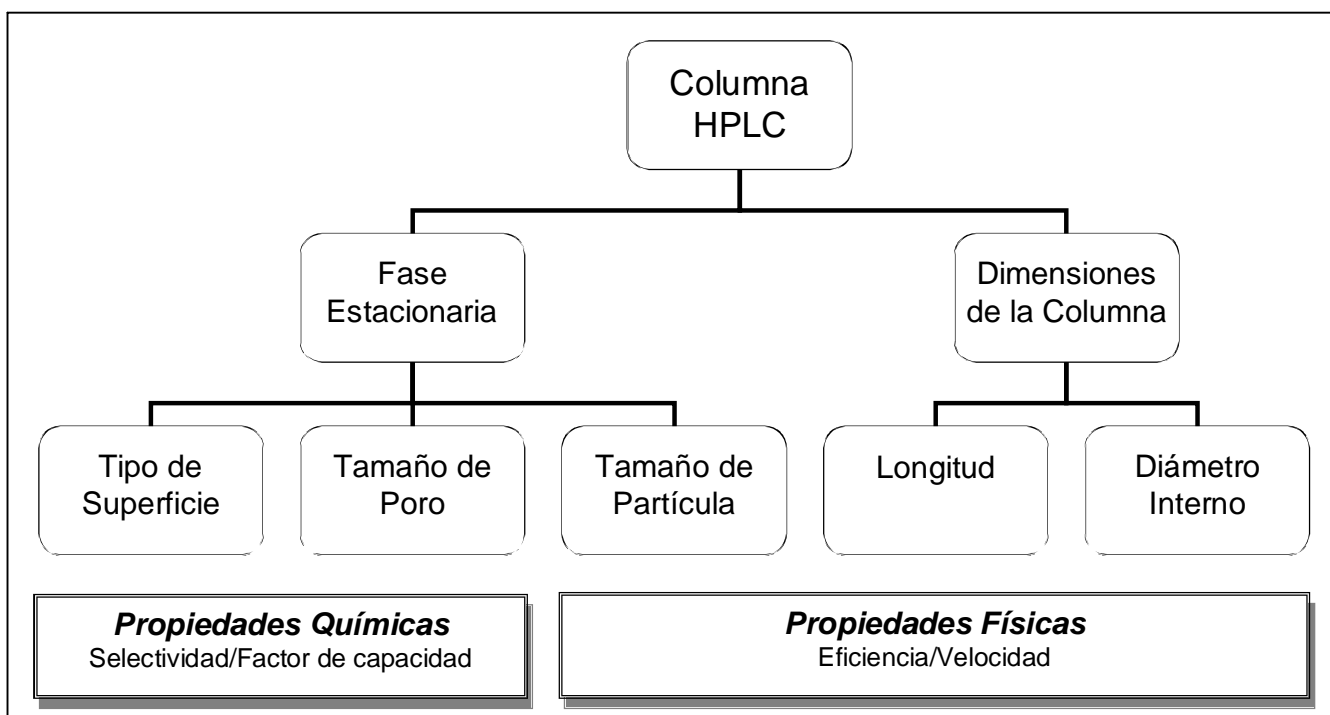


Fig. 9. Características de las columnas para HPLC según sus propiedades físicas y químicas.

El tamaño estándar de partículas del empaque de una columna utilizada para HPLC es de 5  $\mu\text{m}$ . Si se requiere mayor velocidad de elusión (más rápido que 5 minutos/corrida), minimizar el ensanchamiento de banda y por ello el desarrollo de la eficiencia de la columna, el empaque deberá usar partículas de diámetro pequeño para el empaque de la columna y puede ser con partículas de 1.5  $\mu\text{m}$ , 1.8  $\mu\text{m}$ , 3.0  $\mu\text{m}$  o 3.5  $\mu\text{m}$  en columnas más cortas. Esto presenta un problema en el cual hay dificultades técnicas en producir partículas de diámetro pequeño que tengan un tamaño razonablemente uniforme.

A finales de los años 70's las columnas de HPLC fueron a menudo empacadas con partículas de 10  $\mu\text{m}$  (o incluso 20 $\mu\text{m}$ ). Actualmente, la mayoría de separaciones por HPLC son llevadas a cabo con materiales de empaque de 5  $\mu\text{m}$  y 3  $\mu\text{m}$  de diámetro. Tamaños de partícula tan pequeñas como 1  $\mu\text{m}$  pueden ser usadas, aunque su aplicación es un poco más especializada y el rango normal de tamaño de partículas usadas en aplicaciones analíticas con columnas convencionales es entre 3  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$ .

Cuando el tamaño de partícula disminuye, la presión requerida para mantener cualquier velocidad de flujo dado se incrementa. Con columnas convencionales y con los tamaños de partícula mencionados anteriormente, las presiones de operación varían de aproximadamente de 250 psi a 5000 psi dependiendo de factores tales como la viscosidad de la fase móvil y la velocidad de flujo. Esto hace que además de la demanda del empaque de la columna debe ser capaz de resistir las presiones de operación sin un daño estructural.

Además de los requisitos para la producción de partículas pequeñas, uniformes, porosas y rígidas, una fase estacionaria para HPLC debe ser fácilmente disponible en una forma pura y debe ser químicamente resistente a los disolventes usados como fases móviles (idealmente debería ser estable a todos los valores de pH). Como es a menudo encontrar en HPLC, no hay materiales únicos los cuales cumplan con todos los criterios, pero una variedad de soportes son usados, cada uno con sus ventajas y desventajas.

El material comúnmente más usado para el empaque de columnas para HPLC es la sílice. Puede ser usada sin modificación o derivada químicamente en los grupos silanoles, permitiendo que la superficie química sea alterada para obtener diferentes modos de cromatografía.

Preparada comúnmente por la hidrólisis ácida del silicato de sodio seguida por la emulsificación de una mezcla de alcohol-agua y una subsecuente condensación para obtener un gel sólido de sílice. Esta es entonces lavada y secada para usarse como empaque en las columnas para HPLC. Las condiciones exactas bajo las cuales este procedimiento es llevado a cabo (pH, catálisis, temperatura) afectaran las propiedades del material resultante.

### 2.3.8 Efecto de la temperatura en HPLC

El tiempo de retención de un compuesto depende no solamente del tipo de fase estacionaria, sino también de la temperatura de la columna. Por esta razón es importante considerar la importancia de la temperatura en la separación por HPLC.

El resultado general de un aumento en temperatura es disminuir los tiempos de la retención de todos los picos en el cromatograma según lo mostrado en la figura 10.

Esto se acompaña a menudo por una cierta disminución en la resolución de la muestra apenas como en el caso de aumentar fuerza solvente. <sup>Lough, 1995.</sup> En otros casos, los picos dentro del cromatograma pueden cambiar sus posiciones relativas mientras que se varía la temperatura, y ésta conduce a alteraciones más complejas en la separación, en donde los tiempos de retención disminuyen y en ocasiones los equilibrios involucrados modifican y determinan el orden de elusión.

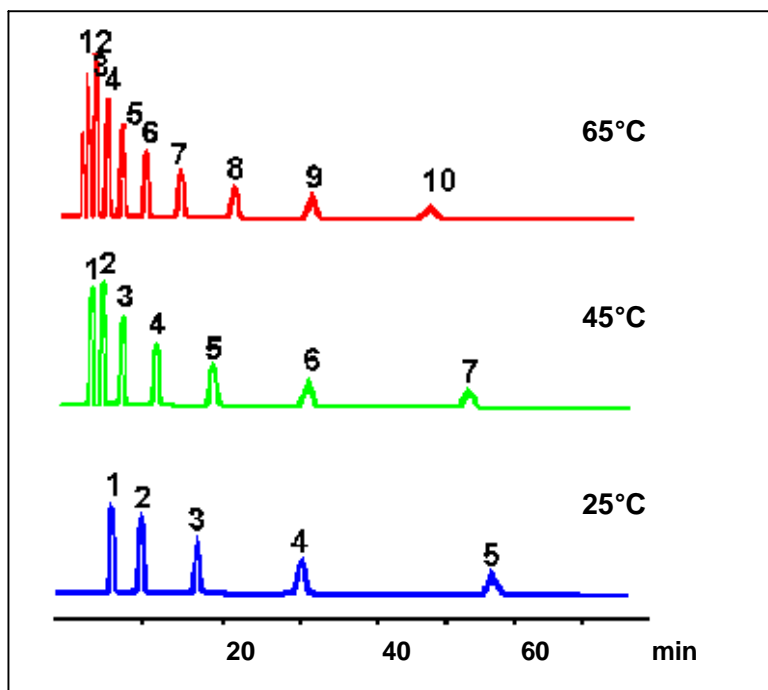


Fig. 10. Efecto de la temperatura en los tiempos de retención.

Debido a estos efectos relacionados a la temperatura, es ventajoso llevar a cabo una constante de la temperatura de la columna, mientras que la temperatura del cuarto cambia. Es decir, manteniendo constante la temperatura de la columna es más probable mantener la misma separación de forma cotidiana, y dentro de un día. Si la separación es apenas adecuada en temperaturas más bajas, puede no ser aceptable en temperaturas más altas.



## 2.4 Validación de Métodos Analíticos

Históricamente, los primeros métodos de control de la calidad se basaron en el juicio o inspección; esta forma de control tuvo serias limitaciones ya que los errores se detectaban cuando no tenían solución. Surge entonces, para superar esta limitación, la inspección de desafío, que constituyó una variante mejorada de la anterior, en la cual el control del producto final generaba datos que se utilizaban para mejorar el proceso, además, de decidir si se aceptaba, se rechazaba o se reprocesaba este producto. La implementación de esta forma de control de la calidad tuvo gran aceptación a nivel mundial, lo que jugó un papel fundamental en el desarrollo de la producción a gran escala. A pesar de ello la inspección de los productos de forma individual resultaba costosa y no permitía realizar pronósticos de las futuras producciones.

Con la incorporación de la estadística al control de la calidad por Walter Shewhart se mejoró la eficacia en la evaluación de los productos. El objetivo era el seguimiento de un proceso, así como la eliminación de las causas de desempeño no satisfactorio en las fases del ciclo de la calidad con el fin de obtener mejores resultados económicos.

Cualquier producto farmacéutico debe reunir atributos de identidad, pureza, concentración, potencia, inocuidad y disponibilidad para cumplir con los aspectos normativos oficiales e internos, por lo que si un método analítico, que finalmente es el medidor de las características críticas de calidad del producto, no es confiable, se corre el grave riesgo de afectar al usuario final que es el paciente.

La validación del método analítico es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada; es decir cumple con su propósito.

En el control interno de la calidad de los ensayos se mantienen los principios generales del control de calidad, con gran aplicación de los análisis estadísticos aplicados, frecuentemente, a gráficos de control de los ensayos que están dirigidos, fundamentalmente, a evaluar la precisión y exactitud del método analítico, constituyendo el control de la calidad, las técnicas y actividades de carácter operativo utilizadas para satisfacer los requisitos para la calidad.

Se define el término exactitud como la estrecha relación que existe entre la media aritmética obtenida de varios resultados analíticos en el procedimiento en estudio y el valor real o valor de referencia aceptado; la cual está influenciada por errores sistemáticos como: la utilización de equipos de medición no adecuados, una calidad de reactivos incorrecta, no utilizar el método analítico apropiado, etc. A su vez, esta misma norma, describe a la precisión de un método como el grado de concordancia de los datos obtenidos para una muestra procesada varias veces, la que está limitada por errores aleatorios como los errores instrumentales, individuales, entre otros.

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

**Tabla 2.** Parámetros de desempeño según la aplicación analítica del método.

PARÁMETRO DE DESEMPEÑO	CONTENIDO/ POTENCIA/ VALORACIÓN	PRUEBA DE IMPUREZAS		IDENTIFICACIÓN
		CONTENIDO/ VALORACIÓN	LIMITE	
Precisión/Adecuabilidad del Sistema	Si	Si	SI	+
Linealidad del Sistema	Si	Si	No	No
Especificidad	Si	Si	Si	SI
Exactitud y Repetibilidad	Si	Si	No	No
Linealidad del Método	Si	Si	No	No
Precisión del Método o Precisión Intermedia	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

+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 muestras.

Para garantizar estos parámetros resulta imprescindible el control interno de los ensayos, pues a pesar de que se mantengan todas las medidas establecidas para la obtención de un resultado correcto, la posibilidad del error siempre está presente y hay que estar preparado para detectarlo cuando ocurra, siendo esto posible, sólo, cuando se mantiene un riguroso control.

Los controles internos son aquellos que se utilizan primariamente dentro de un laboratorio o en laboratorios cooperativos, para garantizar la veracidad de un resultado, estos dependen del tipo de ensayo. Para establecerlos es necesario contar con todas las medidas organizativas y de aseguramiento de la calidad que plantean las Buenas Prácticas que contempla, como elementos de primer orden, tener todas las técnicas validadas y contar con muestras controles y/o materiales de referencia bien caracterizados. En ellos, los indicadores de estabilidad y homogeneidad son imprescindibles; además, deben ser reproducibles y tener una composición similar a la de las muestras y similar matriz, el uso de estos materiales permite demostrar que el método analítico ofrece estabilidad en los resultados obtenidos. <sup>Travieso, 2003.</sup> Existe un destacable desarrollo de criterios establecidos para ser usados en validaciones en lo referente a mediciones que utilizan las técnicas cromatográficas. Sin embargo el desarrollo de un nuevo producto y/o método analítico involucra, la mayoría de las veces, el uso de otras técnicas de medición distintas a la citada para cuyos casos se dificulta obtener criterios de referencia. <sup>Rosso, 2002.</sup>

### 3 Planteamiento del Problema

Las formulaciones farmacéuticas modernas son mezclas complejas que incluyen, además de uno o más principios activos (sustancias con actividad farmacológica), una gran cantidad de excipientes y/o vehículos tales como diluyentes, viscosantes, colorantes, saborizantes, etc. El Químico analista debe ser capaz de separar estas mezclas en sus componentes individuales para realizar un análisis cuantitativo confiable. En la fabricación también deben de controlarse igualmente la calidad de las materias primas, de los productos intermedios y de los productos terminados. Lo anterior recalca la importancia de proveer de resultados rápidos y confiables, en donde el método de cuantificación es un punto crítico.

El desarrollo de técnicas analíticas capaces de optimizar tiempos y costos en el análisis de medicamentos es una problemática que un método de cuantificación adecuado debe de minimizar con el fin de asegurar el aprovechamiento de los recursos del Laboratorio de Control Físicoquímico.

## 4 Objetivos

### 4.1 Objetivo General

Optimizar un método analítico por HPLC para la cuantificación de Dicloxacilina materia prima, producto intermedio y terminado, el cual deberá cumplir con las especificaciones internas del laboratorio y las especificaciones establecidas en los parámetros de desempeño de la validación del método.

### 4.2 Objetivos Específicos

4.2.1 Disminuir el tiempo total de análisis de Dicloxacilina, tanto para materia prima como para producto intermedio y terminado.

4.2.2 Establecer Límites y Especificaciones de Adecuabilidad del Sistema que el Método Analítico deberá de cumplir.

4.2.3 Validar los Métodos Analíticos para la Valoración y la Cuantificación de Dicloxacilina en la prueba de Disolución con el fin de asegurar la confiabilidad del método.

5 Hipótesis

Con una selección adecuada de las condiciones cromatográficas del Método Analítico propuesto puede proveer resultados adecuados para la cuantificación de Dicloxacilina como materia prima así como producto intermedio y terminado, el Método Analítico optimizado cumplirá con los parámetros de desempeño que involucra la validación del método además, de lograr una disminución considerable de los tiempos y costos de análisis.

## 6 Desarrollo Experimental

## 6.1 Materiales

<b>Cantidad</b>	<b>Descripción</b>	<b>Capacidad</b>	<b>Marca</b>
05	Matraz volumétrico	50 mL	Pyrex
40	Matraz volumétrico	100 mL	Pyrex
01	Matraz volumétrico	200 mL	Pyrex
10	Jeringas de plástico	10 mL	Terumo
Suficientes	Membranas de nylon	0.45 $\mu\text{m}$	Millipore
Suficientes	Filtros de jeringa	0.45 $\mu\text{m}$	Millipore

## 6.2 Equipos e Instrumentos

<b>Descripción</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>
Cromatografo de Liquidos de Alta Resolución	Dionex	Summit
-Bomba	Dionex	P680
-Rack de Solventes	Dionex	SOR-100
-Inyector de muestras automatizado	Dionex	ASI-100
-Compartimiento de columnas con termostato	Dionex	TCC-100
-Detector UV con Detector de Arreglo de Diodos	Dionex	D680U
Balanza Analítica	Ohaus	Explorer
Equipo de Filtración	PALL	-
Sonicador	Wiggen	-

## 6.3 Principio Activo

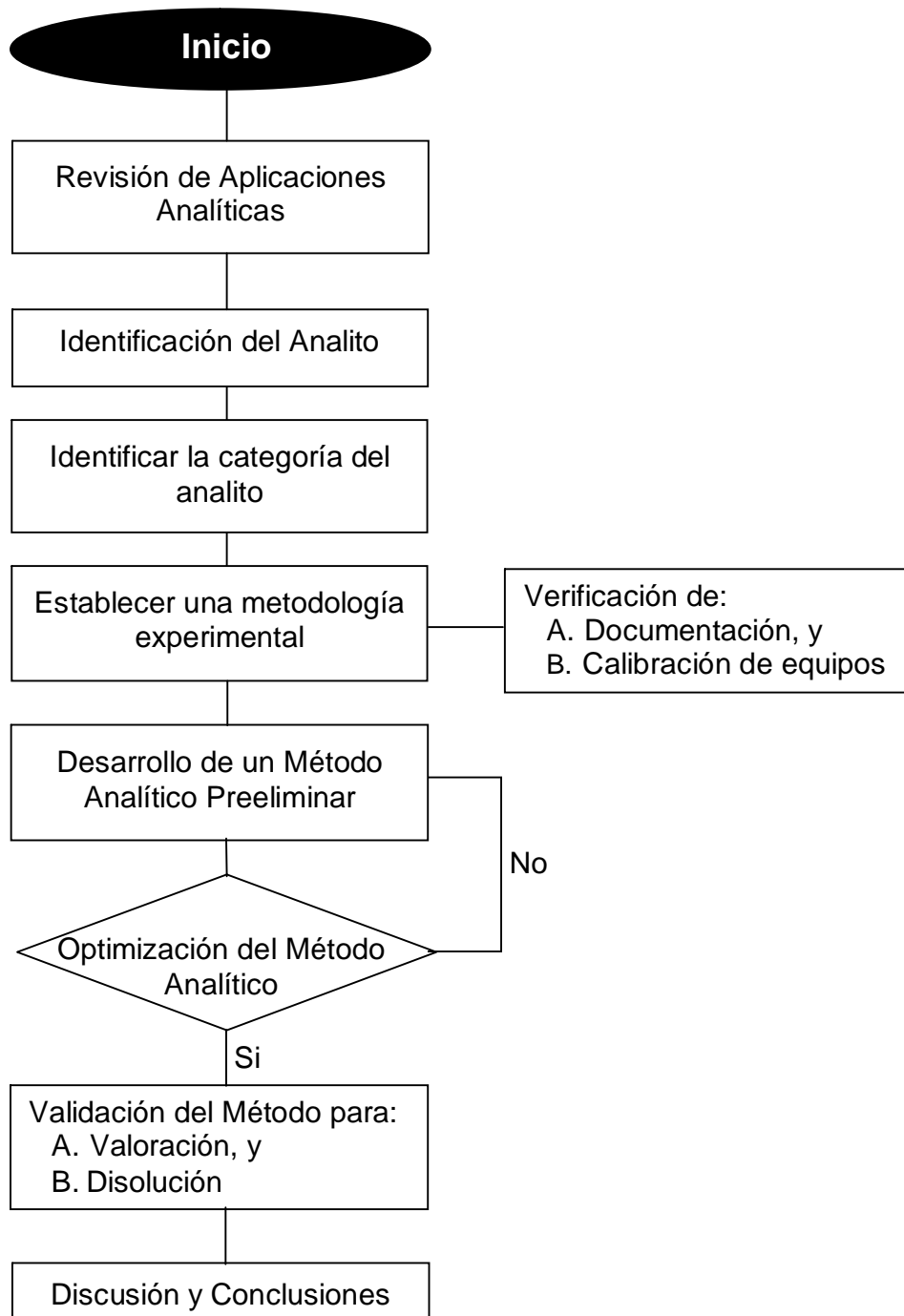
<b>Descripción</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Grado</b>
Dicloxacilina Sódica	Fersinsa G.B.	USP

## 6.4 Disolventes y Reactivos

<b>Descripción</b>	<b>Marca</b>	<b>Grado</b>
Agua	J. T: Baker	HPLC
Acetonitrilo	J.T. Baker	HPLC
Metanol	J.T. Baker	HPLC
Fosfato monobásico de potasio	J.T. Baker	Reactivo
Ácido fósfórico	J.T. Baker	Reactivo

6.5 Metodología experimental

6.5.1 Diagrama de Flujo





## 6.5.2 Cronograma de Actividades

<b>Tiempo (semanas)</b>	<b>1<sup>a</sup></b>	<b>2<sup>a</sup></b>	<b>3<sup>a</sup></b>	<b>4<sup>a</sup></b>	<b>5<sup>a</sup></b>	<b>6<sup>a</sup></b>	<b>7<sup>a</sup></b>
<b>Actividad</b>							
Revisión Bibliográfica							
Selección de Columna							
Selección Fase Móvil							
Tratamiento de las Muestras							
Optimización del Método							
Comparación y Determinación costo-beneficio del método							
Validación de Método Analítico para la Valoración <sup>1</sup>							
Validación del Método Analítico para la Disolución <sup>2</sup>							
Análisis de Resultados							
Conclusiones							

<sup>1</sup>Validación del Método analítico para la Valoración de Dicloxacilina cápsulas.

<sup>2</sup>Validación del Método analítico para la prueba de Disolución de Dicloxacilina cápsulas.

## 6.6 Procedimiento

### 6.6.1 Investigación Bibliográfica

Realizar una investigación bibliográfica para determinar las aplicaciones cromatográficas más comunes para el análisis de Dicloxacilina.

### 6.6.2 Identificación del Analito.

Realizar el análisis como se describe a continuación conforme a FEUM 8ª ed.:

#### **A. Método Analítico de Dicloxacilina Sódica Materia Prima.**

##### **I. SUSTANCIA DE REFERENCIA**

###### **1.1 Dicloxacilina de sodio.**

No secar antes de su uso, determinar el contenido de agua.

##### **II. DESCRIPCIÓN**

###### **2.1 Cumple.**

Polvo cristalino blanco o blanco grisáceo.

##### **III. SOLUBILIDAD**

###### **3.1 Cumple.**

Fácilmente soluble en agua.

##### **IV. IDENTIDAD**

###### **4.1 A) IR. Positiva.**

El espectro IR de una dispersión de la muestra en bromuro de potasio, corresponde con el obtenido con una preparación similar de la SRef de dicloxacilina de sodio.

###### **4.2 B) Sodio. Positiva.**

Carbonizar 100 mg de la muestra: una solución 1 en 20 del residuo en ácido acético da positiva a las pruebas de sodio.

##### **V. pH**

###### **5.1 Entre 4.5 y 7.5.**

Determinar en una solución acuosa que contenga 10 mg/mL de la muestra.

##### **VI. AGUA**

###### **6.1 El contenido de agua es entre el 3.0 por ciento y 5.0 por ciento.**

Determinar por Titulación Directa.

##### **VII. CRISTALINIDAD**

###### **7.1 Cumple.**

Es cristalina conforme al MGA0231, Método I.

## VIII. VALORACIÓN

### 8.1 CLAR. Tiene una potencia equivalente a no menos de 850 µg/mg de dicloxacilina base.

#### 8.1.1 Disolvente:

Pasar 5.44 g de fosfato monobásico de potasio a un matraz volumétrico de 2000 mL y disolver con agua, llevar al volumen y ajustar el pH a  $5.0 \pm 0.1$ , con hidróxido de potasio 8N.

#### 8.1.2 Fase Móvil:

Disolvente:acetonitrilo (1500:500). Hacer los ajustes si es necesario de acuerdo a la verificación del sistema.

#### 8.1.3 Preparación de referencia:

Disolver una cantidad de la SRef dicloxacilina de sodio en el disolvente, para obtener una solución que contenga 1.1 mg/mL. Nota: utilizar inmediatamente o refrigerar, utilizar el mismo día de preparación.

#### 8.1.4 Preparación de la muestra.

Pasar 230 mg de la muestra a un matraz volumétrico de 200 mL y llevar a volumen con el disolvente y mezclar. Agitar con ayuda de un agitador magnético durante 5 minutos para asegurarse de completa disolución. Nota: utilizar inmediatamente o refrigerar, utilizar el mismo día de preparación.

#### 8.1.5 Condiciones del equipo.

Cromatógrafo de líquidos equipado con un detector a 225 nm. Columna de 4.6 mm x 25 cm, empacada con L1. Velocidad de flujo de 2 mL/min.

#### 8.1.6 Verificación del sistema:

Inyectar la preparación de referencia y registrar los picos respuesta como se indica en el procedimiento. El factor de capacidad,  $K'$ , para la dicloxacilina es entre 4 y 11, la eficiencia de la columna no es menor de 700 platos teóricos, el factor de coe para el pico del analito no es menor de 2. El coeficiente de variación para la replica de inyecciones no es más del 2.0 por ciento. Nota: utilizar las áreas que indican los picos respuesta.

#### 8.1.7 Procedimiento:

Inyectar por separado volúmenes iguales de 10 µL de la preparación de referencia y de la preparación de la muestra, registrar los cromatogramas y medir los picos respuesta mayores. Calcular la cantidad de dicloxacilina en microgramos por miligramos de muestra, con la siguiente fórmula:

$$\% \text{Dicloxacilina} = \frac{A_{mtra}}{A_{std}} \times \frac{W_{std}}{W_{mtra}} \times FD \times PQ_{std}$$

En donde:

$A_m$  = área bajo el pico obtenido en el cromatograma con la preparación de la muestra

$A_{ref}$  = área bajo el pico obtenido en el cromatograma con la preparación de referencia

$W_{std}$  = Peso en miligramos de la SRef de dicloxacilina

$W_{mtra}$  = Peso en miligramos de la muestra

FD = Factor de dilución utilizado

PQ = Potencia química de la SRef de dicloxacilina

6.6.3 Selección de Columna

A. Hacer una propuesta de la columna a utilizar de acuerdo a la revisión de aplicaciones analíticas, a la fase a utilizar de acuerdo a la clasificación del analito, fase estacionaria y parámetros a cubrir con el método analítico a desarrollar.

B. Realizar la elección completando el siguiente cuadro:

<b>Tabla para la selección de columnas</b>												
Objetivos del Método	Selección más común (Adecuada para la mayoría de las aplicaciones)	Alta eficiencia	Alta capacidad	Baja presión	Alta Carga de Muestra	Adecuado para PM>2000	Alta Estabilidad	Alta Sensibilidad	Análisis Rápido	Bajo Consumo de Fase Móvil	Estabilidad a pH extremos	Equilibración Rápida
<b>Tamaño de partícula</b>												
Pequeña $\leq 3 \mu\text{m}$												
Mediana $5 \mu\text{m}$	*											
Grande $10 \mu\text{m}$												
<b>Longitud de la columna</b>												
Corta $\leq 50 \text{ mm}$												
Media $150 \text{ mm}$	*											
Larga $300 \text{ mm}$												
<b>Diámetro Interior</b>												
Estrecho ( $2.1 \text{ mm}$ )												
Medio ( $4.6 \text{ mm}$ )	*											
Amplio ( $22.5 \text{ mm}$ )												
<b>Área superficial</b>												
Bajo ( $200 \text{ m}^2/\text{g}$ )	*											
Alto ( $300 \text{ m}^2/\text{g}$ )												
<b>Tamaño de poro</b>												
Pequeño ( $60 \text{ \AA}$ )												
Mediano ( $100 \text{ \AA}$ )	*											
Grande ( $300 \text{ \AA}$ )												
<b>Contenido de carbono</b>												
Bajo ( $3 \%$ )												
Medio ( $10 \%$ )	*											
Alto ( $20 \%$ )												
<b>Tipo de enlace</b>												
Monomérico	*											
Polimérico												
<b>Forma de la Partícula</b>												
Esférica	*											
Irregular												

C. Describir detalladamente las características de la columna elegida.

#### 6.6.4 Selección de Fase Móvil y pH

A. En base a revisión de las aplicaciones analíticas encontradas, seleccionar un disolvente adecuado en base a:

1. Viscosidad,
2. Miscibilidad en agua,
3. Punto de ebullición,
4. Accesibilidad,
5. Longitud de Onda de Corte al UV (Cutoff),
6. Índice de polaridad

B. En base a la revisión bibliográfica y a las características fisicoquímicas de Dicloxacilina determinar el amortiguador, la concentración, y pH's posibles. Generalmente se inicia con una unidad de pH abajo y una arriba del pKa. Si es necesario modificar el pH seleccionado.

La solución amortiguadora debe mostrar una transparencia al uv a la longitud de onda a determinar y estos deberán tener una capacidad iónica aceptable. La solución amortiguadora deberá ser filtrada a través de membranas de 0.45  $\mu\text{m}$  con una unidad de vacío antes de su uso. Si se requiere, deberá de ser almacenado a 4°C para minimizar el crecimiento bacteriano, de preferencia las soluciones amortiguadoras utilizadas deberán prepararse el mismo día de uso.

C. La solución amortiguadora y el disolvente seleccionado deberán ser desgasificados por sonicación.

D. Con la fase móvil elegida, establecer el tiempo de retención de Dicloxacilina inyectando 10  $\mu\text{L}$  de una solución de 0.50 mg/mL en la columna seleccionada por medio de una corrida isocrática. Iniciar con una proporción 50:50 (Sol. Amortiguadora:Modificador orgánico), acondicionar la columna, realizar pruebas y observar los efectos del amortiguador sobre el pico de Dicloxacilina así como del soluto no retenido (inyectar 1  $\mu\text{L}$  de acetona al 1%).

E. Si es necesario disminuir o incrementar la proporción de la parte orgánica según las características obtenidas del primer pico obtenido. La determinación de Dicloxacilina deberá auxiliarse de un barrido espectral por medio del detector de arreglo de diodos. Determinar la pureza del pico y la longitud de onda de lectura por medio del análisis del espectro obtenido.

F. Verificar si las proporciones de la fase móvil (Sol. Amortiguadora:Modificador orgánico) son las adecuadas comparando el pico obtenido vs el soluto no retenido (inyectar 1  $\mu\text{L}$  de acetona al 1%). El tiempo de retención del pico obtenido de dicloxacilina no debe ser menor al pico obtenido del soluto no retenido.

G. Con los resultados anteriores determinar la fase móvil más adecuada y fijar el tiempo total de la corrida analítica.

H. Si es necesario, proponer diferentes condiciones cromatográficas.

#### 6.6.5 Concentración y volumen de la muestra

A. Preparar soluciones de Dicloxacilina a 0.5 mg/mL y si es necesario a 1.0 mg/mL y 0.1 mg/mL. Inyectar al cromatógrafo muestras de 10  $\mu$ L y si se requiere también a 5 $\mu$ L 3  $\mu$ L y 1  $\mu$ L.

B. Determinar la altura del pico, área bajo la curva, factor de capacidad y eficiencia de la columna (platos teóricos).

C. Comparando los parámetros anteriores determinar a que concentración debe prepararse la muestra y el volumen que debe inyectarse al cromatógrafo para evitar problemas de detección o saturación de la columna con la muestra.

D. Establecer Pruebas y Especificaciones de Adecuabilidad del Sistema que el Método Analítico deberá de cumplir.

E. Inyectar 6 ocasiones una muestra de Dicloxacilina con las características del método cromatográfico seleccionado a fin de comprobar el cumplimiento de Adecuabilidad del Sistema.

#### 6.6.6 Comparación del Método Desarrollado vs. El Método Farmacopéico

A. Con el método analítico propuesto realizar la valoración de una muestra de materia prima y compara los resultados obtenidos contra el método de análisis que presenta la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. De igual manera realizar la liberación de área (especificaciones internas) a través del análisis de trazas.

<b>Tabla de Comparación para los Métodos Analíticos</b>							
Análisis	Inyecciones	Tiempo de Corrida (min)	mL/min	Costo por mL de FM	mL gastados	Costo total de Análisis (\$)	Tiempo total de análisis (min)
Valoración (Método Propuesto)							
Valoración (Método Farmacopéico)							
Monitoreo de Trazas (Método Propuesto)							
Monitoreo de Trazas (Método Farmacopéico)							

B. Realizar una comparación de tiempos de análisis, gasto de disolventes y costo aproximado del análisis realizado (evaluar solo el precio de los reactivos utilizados).

#### 6.6.7 Validación del método analítico

A. Elaborar Protocolos de Validación para Valoración de Dicloxacilina cápsulas y Disolución de Dicloxacilina cápsulas tomando en cuenta el método analítico propuesto para que se evalúen parámetros de desempeño para la validación de las técnicas analíticas de acuerdo a los requerimientos y procedimientos internos de Farmacéutica Wandel, S.A. de C.V.

## 7. Resultados y Análisis de Resultados

## 7.1 Identificación del analito

Materia Prima: <i>Dicloxacilina Sódica Compactada</i>	No. de Lote: <i>F569963</i>
Fecha de Ingreso: <i>18 Oct 07</i>	Fecha de Análisis: <i>19 Oct 07</i>
Fabricante: <i>Fersinsa GB</i>	Proveedor: <i>Indukern de México</i>

Determinación	Especificación	Resultado
Descripción	Polvo cristalino blanco o blanco grisáceo	Cumple
Solubilidad	Fácilmente soluble en agua	Cumple
Identidad a) IR b) Sodio	a) Positiva b) Positiva	a) Positiva b) Positiva
pH	Entre 4.5 y 7.5	5.86
Agua	El contenido de agua es entre el 3.0 por ciento y 5.0 por ciento	3.63 %
Cristalinidad	Es cristalina	Cumple
Valoración	Tiene una potencia equivalente a no menos de 850 µg/mg de dicloxacilina base.	991.28 µg/mg b.h. 995.30 µg/mg b.s.

Ref.; Documentación Interna de Farmacéutica Wandel S.A. de C.V.



## 7.2 Selección de columna

<b>Tabla para la selección de columnas</b>												
Objetivos del Método	Selección más común (Adecuada para la mayoría de las aplicaciones)	Alta eficiencia	Alta capacidad	Baja presión	Alta Carga de Muestra	Adecuado para PM > 2000	Alta Estabilidad	Alta Sensibilidad	Análisis Rápido	Bajo Consumo de Fase Móvil	Estabilidad a pH extremos	Equilibración Rápida
<b>Tamaño de partícula</b>												
Pequeña $\leq 3 \mu\text{m}$		✓										
Mediana $5 \mu\text{m}$	*											
Grande $10 \mu\text{m}$												
<b>Longitud de la columna</b>												
Corta $\leq 50 \text{ mm}$									✓	✓		✓
Media $150 \text{ mm}$	*											
Larga $300 \text{ mm}$												
<b>Diámetro Interior</b>												
Estrecho ( $2.1 \text{ mm}$ )												
Medio ( $4.6 \text{ mm}$ )	*			✓						✓		
Amplio ( $22.5 \text{ mm}$ )												
<b>Área superficial</b>												
Bajo ( $200 \text{ m}^2/\text{g}$ )	*											✓
Alto ( $300 \text{ m}^2/\text{g}$ )												
<b>Tamaño de poro</b>												
Pequeño ( $60 \text{ \AA}$ )												
Mediano ( $100 \text{ \AA}$ )	✓ *											
Grande ( $300 \text{ \AA}$ )												
<b>Carga de carbono</b>												
Bajo ( $3 \%$ )												
Medio ( $10 \%$ )	✓ *								✓			
Alto ( $20 \%$ )												
<b>Tipo de enlace</b>												
Monomérico	✓ *											
Polimérico												
<b>Forma de la Partícula</b>												
Esférica	*	✓										✓
Irregular												

\* Recomendado para aplicaciones estándar.

✓ Características del método a optimizar.

Como punto de partida en la optimización de métodos por HPLC, el tamaño de partícula y la longitud de la columna pueden ser reducidos para acortar el tiempo de análisis.

Para obtener un análisis rápido, se busca minimizar el tiempo de retención o el tiempo desde que se inyecta la muestra hasta que el último pico de interés eluye; esto se puede conseguir aumentando el flujo, disminuyendo la longitud de la columna, o ambos. Para compensar la pérdida de eficiencia con columnas cortas se utilizan

tamaños de partícula más pequeños. Esta forma de conseguir la optimización del método tendrá como resultado un incremento en la presión de operación del equipo.

Como parte de selección de la columna se presenta lo siguiente:

*Área superficial.* El área superficial es determinada por el tamaño de poro. El tamaño de poro y el área superficial son inversamente proporcionales. Un material de empaque con un tamaño de poro pequeño tiene una gran área superficial y viceversa. Los materiales con una gran área superficial ofrecen una gran capacidad y largos tiempos de retención para el analito. Los empaques con baja área superficial ofrecen una equilibración rápida y son a menudo usados para moléculas de altos pesos moleculares.

*Tamaño de poro.* El tamaño de poro del material de empaque representa el tamaño promedio de los poros que tiene cada partícula. El tamaño del analito deberá ser considerado cuando se elija el tamaño de poro apropiado del material de empaque. El peso molecular de un analito puede ser usado para estimar el tamaño de la molécula. Como una regla general, un tamaño de poro de 100 Å a 60 Å deberá ser usada para analitos con un peso molecular a 3 000.

*Contenido de carbono.* La carga de carbono es una medida de la cantidad de la fase de enlace atada a la superficie del empaque. Las altas cargas de carbono proveen de una columna con una gran capacidad y resolución. Contenidos bajos de carbono producen poca retención del soluto y por ende, análisis más rápidos.

*Forma de Partícula.* La mayoría de los nuevos métodos en HPLC son desempeñados sobre partículas de forma esférica o esferoideal. Las partículas esféricas proveen una alta eficiencia, una mejor estabilidad en la columna y menor presión en comparación con las partículas de forma irregular. Estas últimas son usualmente usadas en aplicaciones de cromatografía preparativa a gran escala por su alta área superficial, capacidad y bajo costo. Grace Vydac, 2004.

Teniendo en cuenta los requerimientos mencionados, se selecciona una columna Dionex, Acclaim 120<sup>®</sup> de 2.1 x 50 mm empacada con C18 y un tamaño de partícula de 3 µm de forma esférica.



### 7.3 Selección de Fase Móvil y corridas experimentales

Con la finalidad de disminuir la retención de Dicloxacilina, esta debe ser ionizada durante la corrida cromatográfica para que sea menos hidrófoba disminuyendo el tiempo de retención, y para lograr esto se necesita un pH bajo ya que las bases ganan un protón y son ionizados cuando el pH disminuye. Lo anterior no presenta mayor complicación debido al valor de pKa que posee la Dicloxacilina, la cual es de 2.67.

Una de las soluciones amortiguadoras más usadas en HPLC de fase reversa para un pH bajo son los fosfatos (ajustado con ácido fosfórico), como se muestra en la Tabla 3. La solución amortiguadora propuesta es a un pH de 3.0 con una concentración media de 30 mM (comúnmente usado de 20 a 50 mM). Esta solución presenta una buena capacidad de amortiguación ya que el pKa es de 2.1 y además presenta una *Longitud de onda de máxima absorción* (Cutoff) adecuado para la lectura de Dicloxacilina que es de 225 nm.

**Tabla 3.** Amortiguadores usados comúnmente en HPLC de fase reversa.

Buffer	pKa	Rango	UV Cutoff (nm)
Fosfato	2.1	1.1 – 3.1	200
	7.2	6.2 – 8.2	
	12.3	11.3 – 13.3	
Acetato	4.8	3.8 – 5.8	210
Citrato	3.1	2.1 – 4.1	230
	4.7	3.5 – 5.7	
	5.4	4.4 – 6.4	
Tris Base (THAM)	8.3	7.3 – 9.3	205
Trietilamina* (TEA)	11.0	10.0-12.0	200
Pyrrolidina	11.3	10.3-12.3	200
*Solvente Volátil			

Mac-Mod, 2007.

Los disolventes más utilizados como modificadores orgánicos para cromatografía en fase reversa por que son muy accesibles para el químico analista son Metanol y Acetonitrilo, los cuales tienen las siguientes propiedades:

**Tabla 4.** Propiedades de disolventes comúnmente utilizados en HPLC de fase reversa

Solvente	Indice de Polaridad	UV Cutoff (nm)	Indice de Refracción	Viscosidad (cP, a 20°C)	Punto de ebullición (°C)	Solubilidad en Agua (P/P%)
Acetonitrilo	5.8	190	1.344	0.37	82	Miscible
Metanol	5.1	210	1.329	0.60	64	Miscible
Tetrahidrofurano	4.0	215	1.407	0.55	66	Miscible
Agua	10.2	190	1.000	1.00	100	-

Teniendo en cuenta que la reducción del tamaño de partícula aumenta la presión del sistema, el modificador orgánico seleccionado es Acetonitrilo ya que el metanol presenta una mayor viscosidad solo y en cualquier proporción de una mezcla con agua (Fig. 8); además, el Acetonitrilo es un disolvente con mayor fuerza de elusión que el metanol en HPLC de fase reversa. La Fig. 11, muestra la diferencia de la fuerza de disolvente, por ejemplo, un 50 % de Acetonitrilo en una fase móvil, debe compensarse con cerca de 62% de metanol para igualar la fuerza del disolvente.

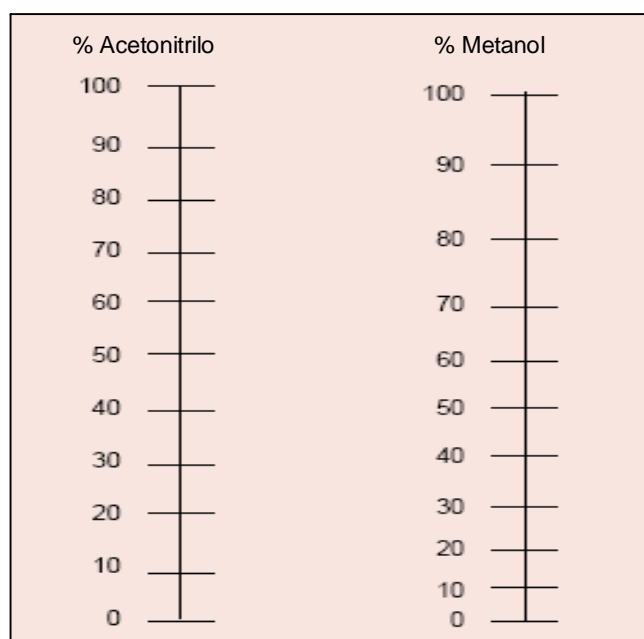


Fig. 11. Nomograma comparativo de fuerza de disolventes en Fase Reversa. Mac-Mod, 2007.

Para iniciar corridas analíticas de prueba se determina utilizar solución amortiguadora de fosfatos a pH 3.0 con Acetonitrilo como modificador orgánico a una proporción de 50:50, con un flujo inicial de 0.5 mL/min ya que el diámetro y longitud de la columna seleccionada son menores a la del método original. La temperatura de inicio será una temperatura controlada a 25°C.

Con una fase móvil Amortiguador:ACN (50:50) a un flujo de 0.5 mL/min se obtiene el siguiente cromatograma (fig. 12), en donde se obtiene un factor de capacidad demasiado bajo (0.82) por lo que es necesario modificar las proporciones de la fase móvil.

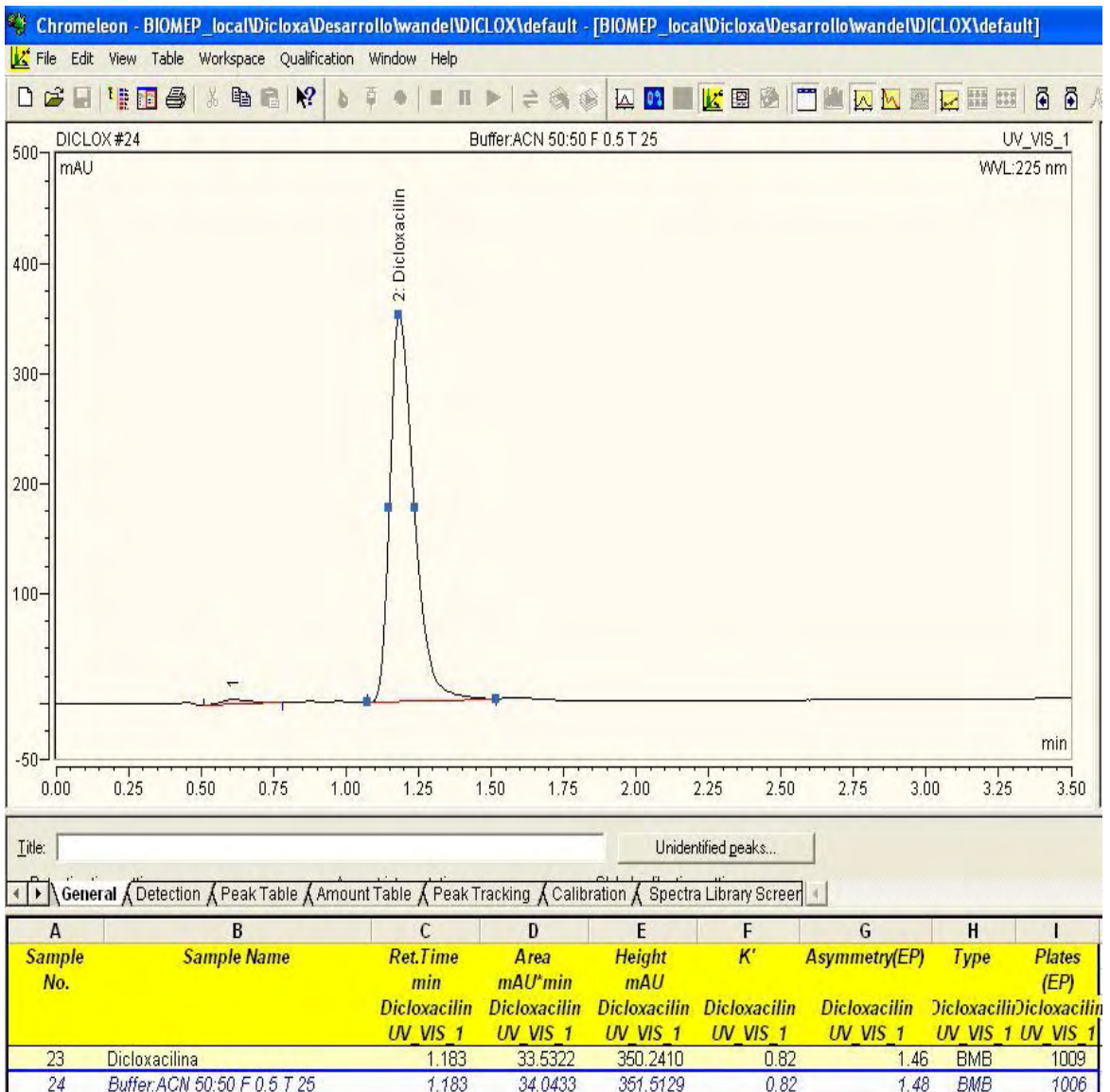


Fig. 12. Cromatograma con Amortiguador 50:ACN 50 y flujo 0.5 mL/min.

Los valores de  $K'$  se determinaron teniendo un tiempo muerto de 0.650 minutos a un flujo de 0.50 mL/min.

Con una fase móvil Amortiguador pH 3.0:ACN (55:45) a un flujo de 0.5 mL/min se obtiene el siguiente cromatograma (fig. 13), en donde se obtiene un factor de capacidad de 1.45, el cual todavía es menor al requerido por lo que es necesario disminuir la fuerza de elusión de la fase móvil.

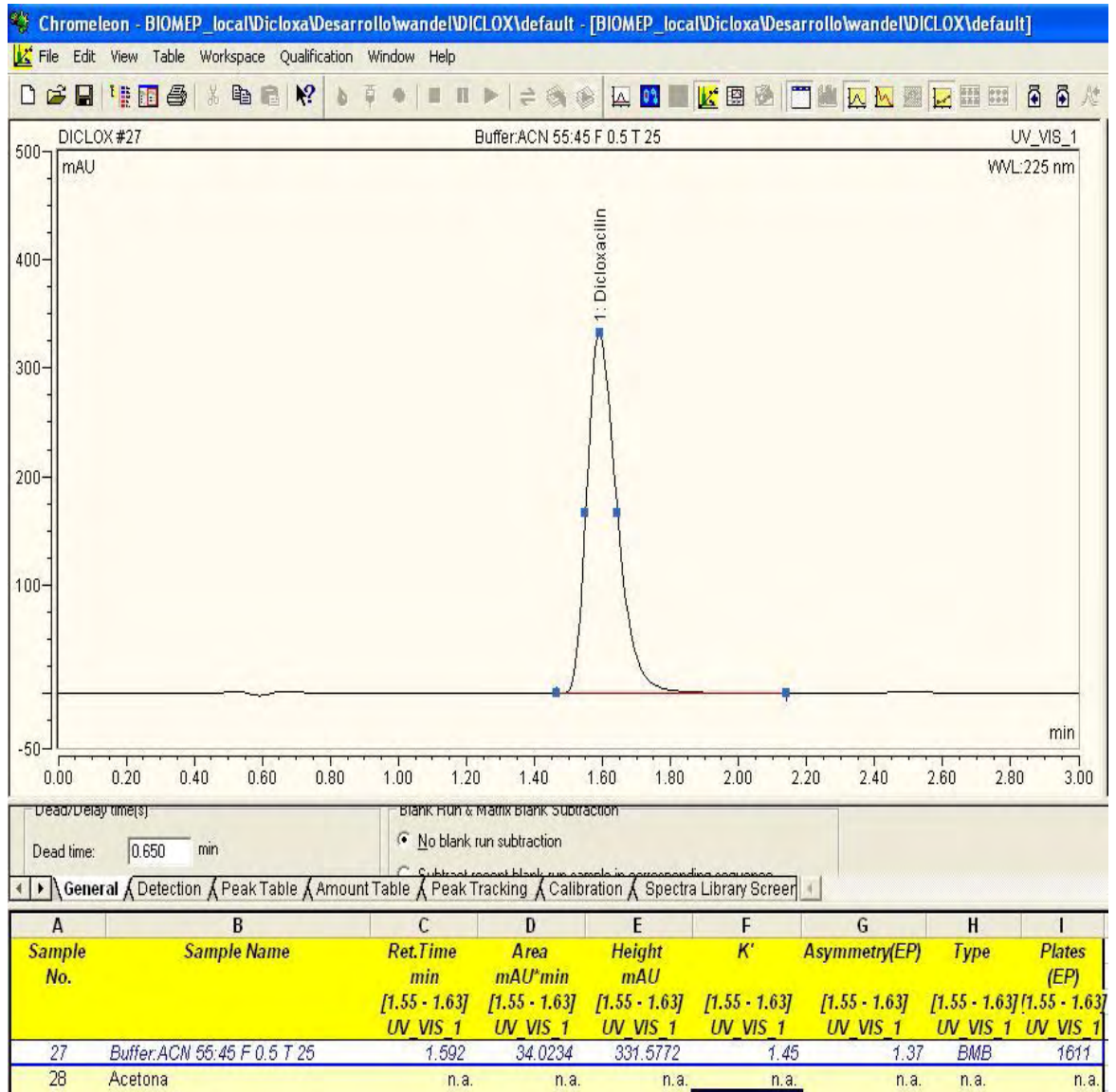


Fig. 13. Cromatograma con Amortiguador 55:ACN 45 y flujo 0.5 mL/min.

Con una fase móvil Amortiguador pH 3.0:ACN (60:40) a un flujo de 0.5 mL/min se obtiene el siguiente cromatograma (fig. 14), en donde se obtiene un factor de capacidad de 2.61. Aunque el factor de capacidad ya es el adecuado, el tiempo de corrida analítica es de 3.5 minutos por lo que será necesario modificar el flujo para disminuir el tiempo de análisis.

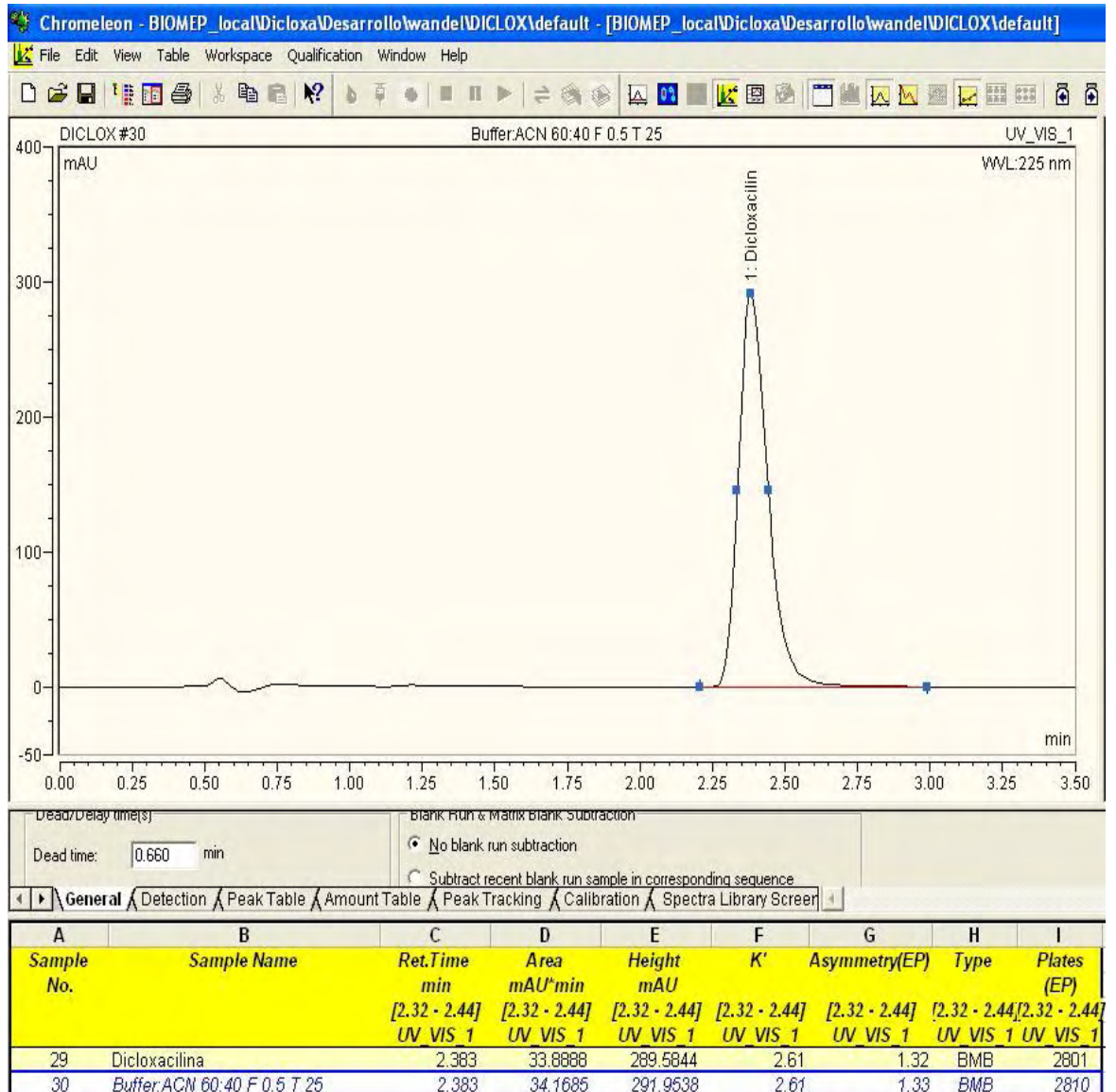


Fig. 14. Cromatograma con Amortiguador 60:ACN 40 y flujo 0.5 mL/min.



Con una fase móvil Amortiguador pH 3.0:ACN (58:42) a un flujo de 0.6 mL/min se obtiene el siguiente cromatograma (fig. 15).

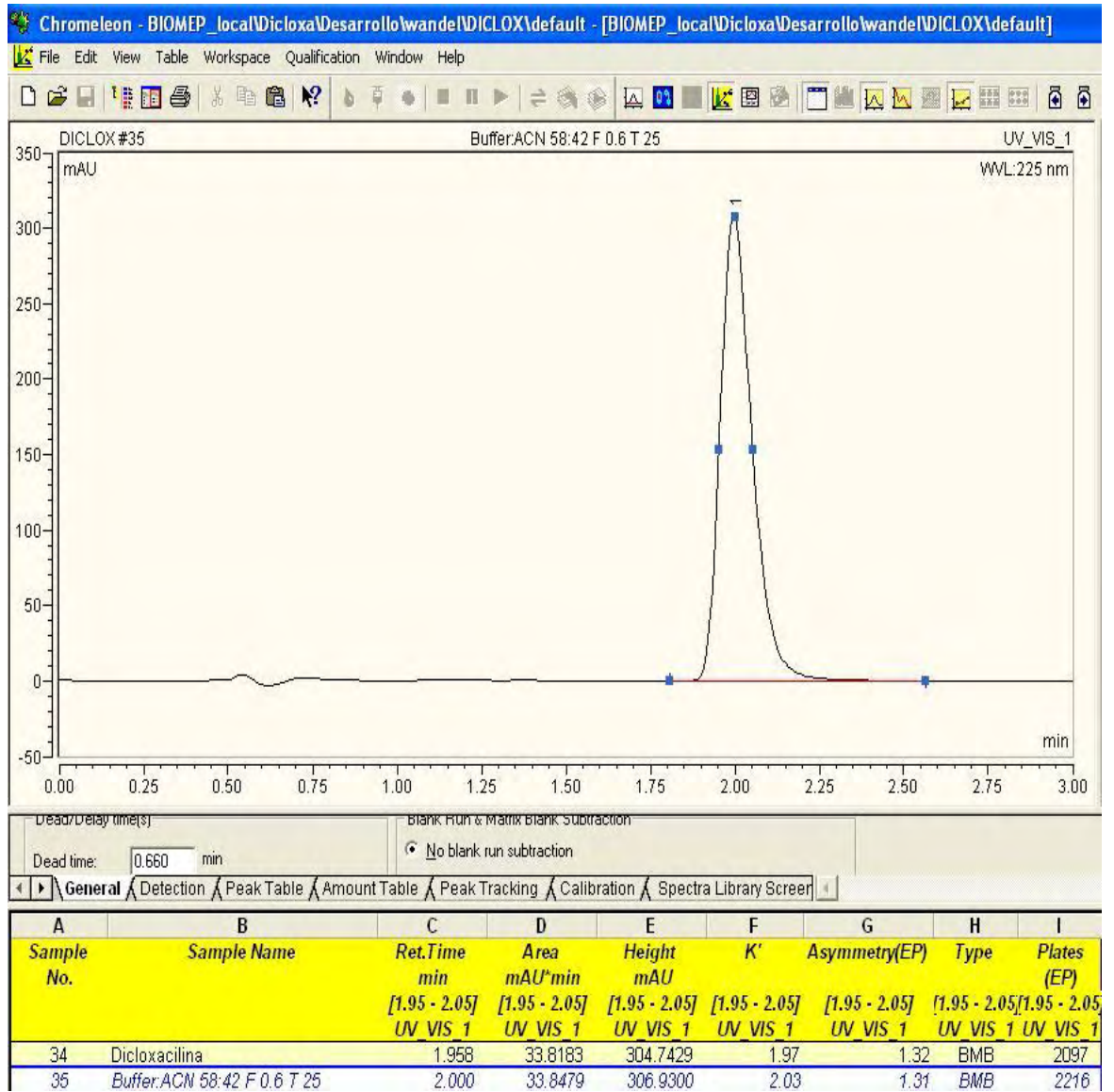


Fig. 15. Cromatograma con Amortiguador 58:ACN 42 y flujo 0.6 mL/min.

El factor de capacidad obtenido es de 2.03, la asimetría del pico es de 1.31 y el tiempo de corrida analítica es de 3.0 minutos, por lo anterior puede modificarse el flujo para disminuir el tiempo de análisis. Además, puede modificarse la fase móvil de tal manera que la asimetría del pico mejore y ayude aumentando los platos teóricos.



Lo anterior puede mejorarse disminuyendo el coleo del pico; una causa común del coleo en los picos en HPLC de fase reversa es la retención secundaria que ocurre cuando una interacción iónica toma lugar entre un soluto cargado positivamente (amina) y un silanol sobre la superficie de la sílica de la fase estacionaria. Para corregir este problema es posible agregar una amina competitiva a la fase móvil (Fig. 16). La trietilamina (TEA) es comúnmente añadida a la fase móvil para este propósito ya que interactúa fuertemente con los grupos silanoles e inhibe la interacción de estos con las aminas de la muestra. Regularmente se añade de 5 a 10 mM de TEA.

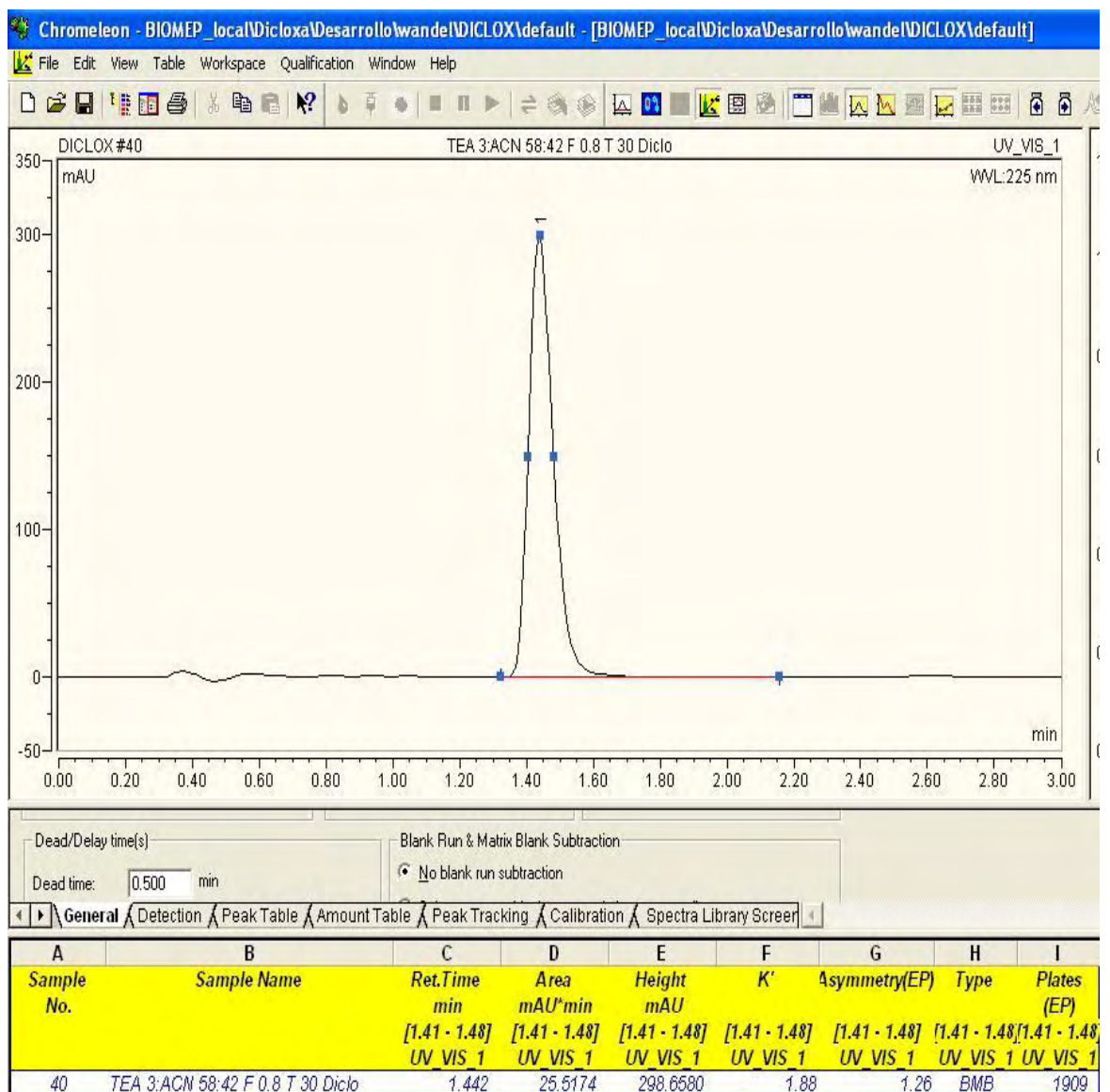


Fig. 16. Cromatograma con Amortiguador/TEA 58:ACN 42, flujo 0.8 mL/min y temperatura de 30°C.

Con la fase móvil propuesta (Amortiguador TEA pH 3.0:ACN 58:42) con un flujo de 0.8 mL/min, a una temperatura de 30°C disminuye el tiempo de retención y la asimetría del pico; sin embargo, el factor de capacidad también es afectado. Por esta razón se modifica nuevamente la fase móvil ahora a una proporción de 60:40 Amortiguador TEA pH 3.0:ACN y se aumenta la temperatura para incrementar la eficiencia cromatográfica, obteniendo el siguiente cromatograma (Fig. 17).

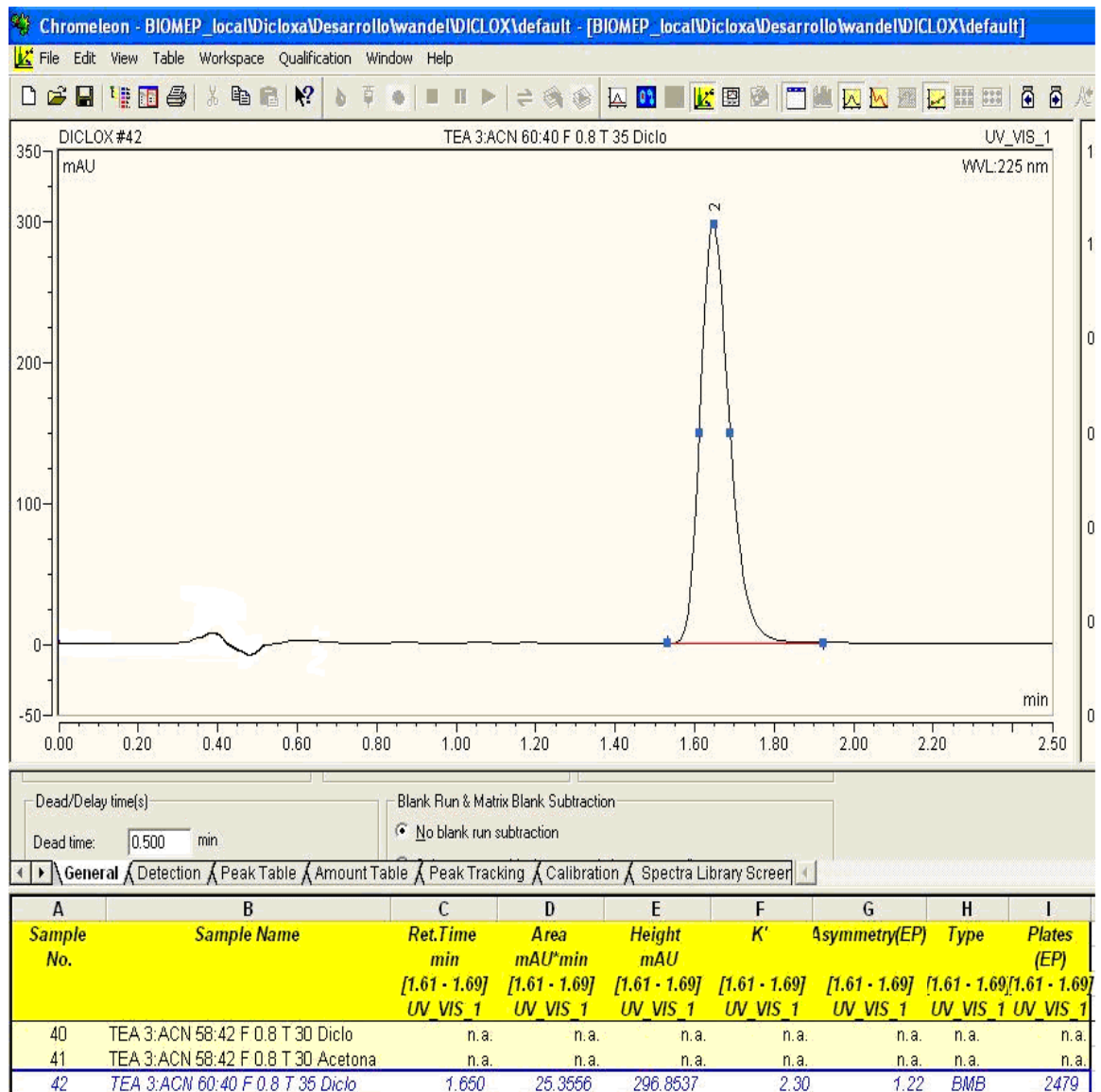


Fig. 17. Cromatograma con Amortiguador/TEA 60:ACN 40, flujo 0.8 mL/min y una temperatura de 35°C.

Con las condiciones antes descritas se observa un factor de capacidad de 2.30, el cual es adecuado teniendo en cuenta que los valores recomendados son de 2 a 10. De igual manera la asimetría, cuyo valor ideal es de 1, fue afectada de manera positiva ya que de un valor inicial de 1.48 se disminuyó hasta 1.22, así como los platos teóricos ya que aumentaron 1006 a 2479 en un tiempo de corrida analítica total de 2.50 minutos.

Para obtener el factor de capacidad fue necesario determinar el tiempo muerto o soluto no retenido, el cual se determinó inyectando 1 µL de acetona al 1%. El cromatograma obtenido es el que se muestra en la Fig. 18.

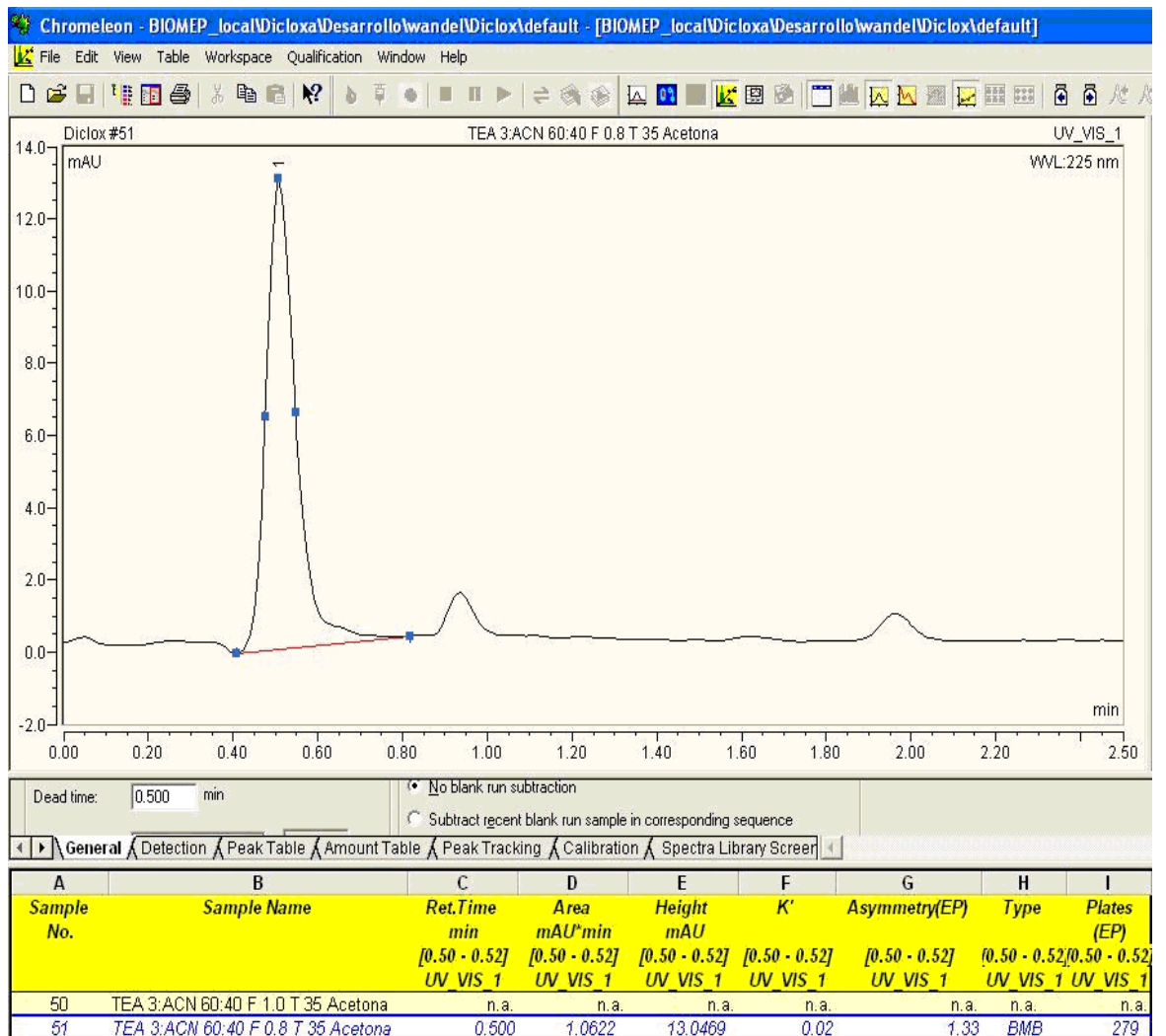


Fig. 18. Cromatograma de soluto no retenido, Acetona.

Se determinó el tiempo de soluto no retenido en 0.5 minutos, con este valor de tiempo muerto se calcula el factor de capacidad del pico de Dicloxacilina.

Con los resultados anteriores se determinan las condiciones cromatográficas quedando de la siguiente manera:

***Diluyente.***

Disolver 1.7011 g de fosfato monobásico de potasio en 500 mL de agua grado cromatográfico añadiendo 0.70 mL de trietilamina, ajustar el pH a  $3.0 \pm 0.05$  con ácido fosfórico. Preparar solo la cantidad necesaria para el análisis requerido.

***Fase móvil.***

Diluyente: Acetonitrilo (60:40). Filtrar con membrana de nylon de  $0.45 \mu\text{m}$  de diámetro de poro y desgasificar con sonicación.

***Condiciones del equipo.***

Detector de luz UV, a una longitud de onda de 225 nm; columna Acclaim 120<sup>®</sup> de 2.1 x 50 mm empacada con L1 y tamaño de partícula de  $3 \mu\text{m}$ . El compartimiento de la columna tendrá una temperatura controlada de 35°C. La eficiencia de la columna es no menos de 1500 platos teóricos, el factor de coe no más de 2.0, la desviación estándar relativa del área bajo la curva entre inyecciones es no mayor de 2.0 % y la desviación estándar relativa del tiempo de retención absoluta entre inyecciones es no mayor de 1.0 %. El flujo de la fase móvil será de 0.8 mL/min y un tiempo total de corrida analítica de 2,5 minutos.

***Preparación de referencia.***

Pesar y transferir el equivalente a 12.5 mg de Dicloxacilina del estándar secundario de Dicloxacilina sódica a un matraz volumétrico de 25 mL, disolver con 15 mL de agua purificada, sonicar durante 3 minutos, llevar al aforo con el mismo disolvente y mezclar. Filtrar con filtro de jeringa con membrana de nylon de  $0.45 \mu\text{m}$  de diámetro de poro (Millipore Millex HN). La solución así preparada contiene 0.50 mg/mL de Dicloxacilina.

***Preparación de la muestra.***

De la muestra tomar el equivalente a 50 mg de Dicloxacilina y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir con 75 mL de agua purificada y agitar. Llevar al aforo con el mismo disolvente y mezclar. Filtrar con filtro de jeringa con membrana de nylon de  $0.45 \mu\text{m}$  de diámetro de poro (Millipore Millex HN). La solución así preparada contiene 0.50 mg/mL de Dicloxacilina.

Utilizando estas condiciones cromatográficas se observa que el equipo no es forzado y se encuentra en condiciones normales de operación como se observa en la fig. 19 donde se muestra la presión real del sistema durante el análisis de Dicloxacilina; en la fig. 20 se muestra la intensidad de la Lámpara UV a la longitud de onda de trabajo y en la fig. 21 la temperatura de trabajo.



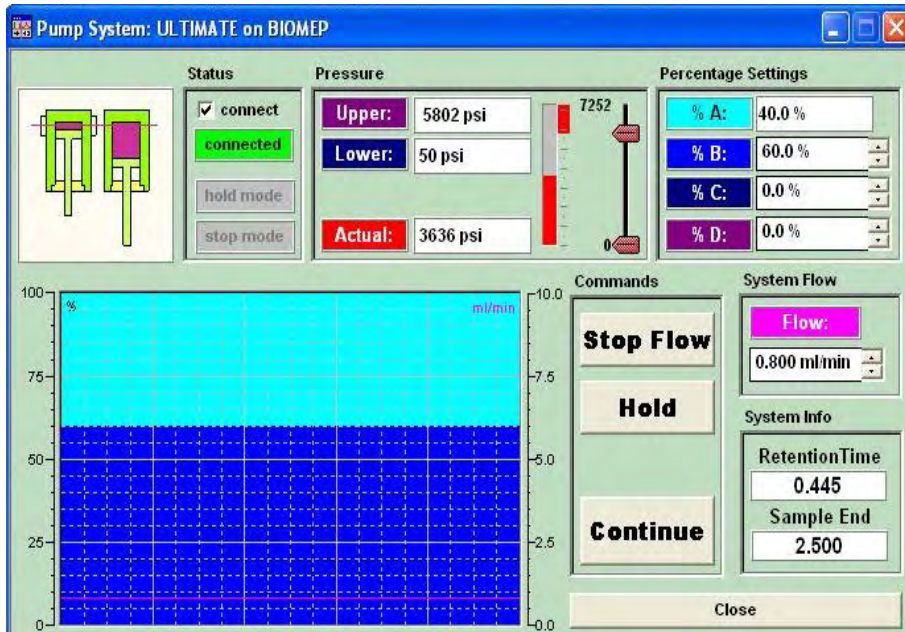


Fig. 19. Presión del sistema HPLC.

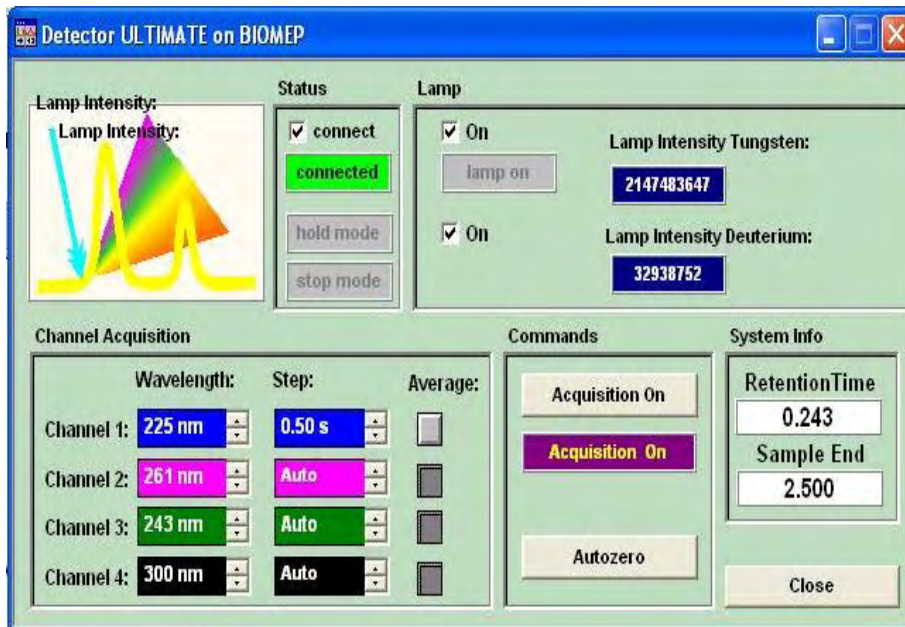


Fig. 20. Condiciones de trabajo del detector.

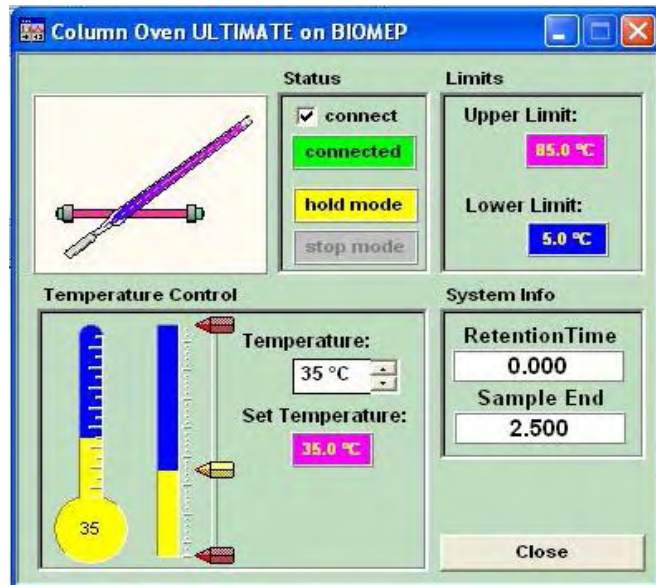


Fig. 21 Temperatura controlada a 35°C.

Teniendo en cuenta que se cumplen los requerimiento cromatográficos y que el equipo trabaja de manera normal, no es necesario modificar las condiciones cromatográficas.

Para determinar que el cromatograma no es afectado por el sistema cromatográfico se utiliza el *Índice de Pureza de Pico* (Peak Purity index), que proporciona el sistema a través del detector de arreglo de diodos disponible en el cromatógrafo de líquidos Dionex.

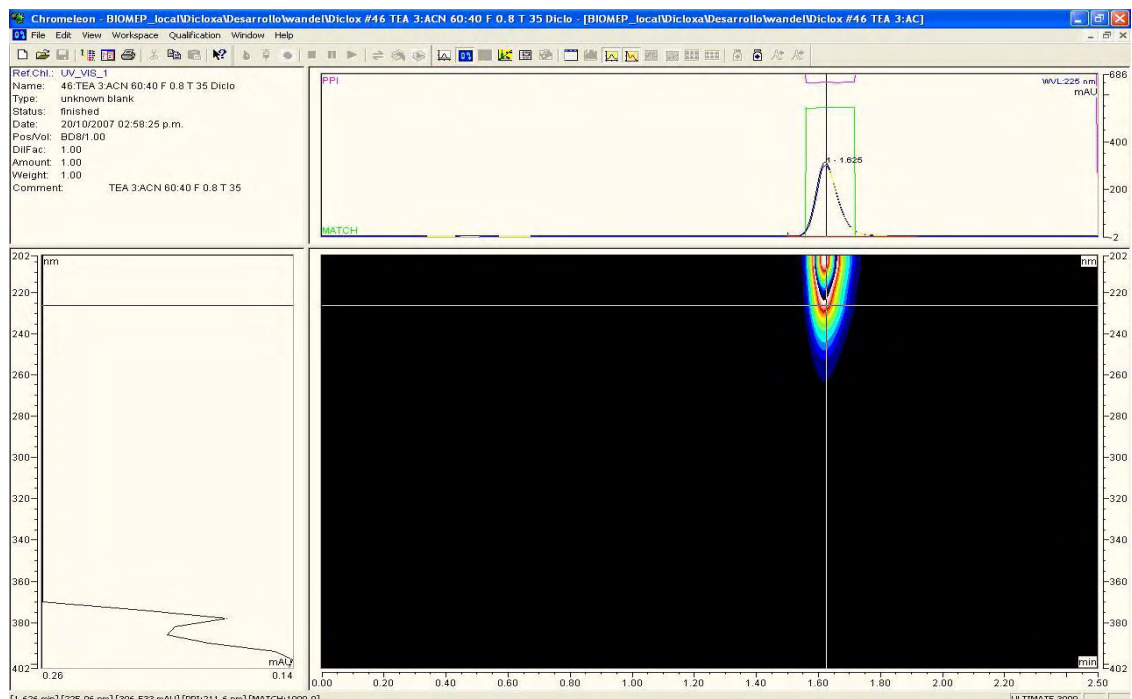


Fig. 22. Análisis espectral de Dicloxacilina.

Para optimizar el método en cuanto a la cantidad de muestra inyectada, se preparó una solución de Dicloxacilina con una concentración de 0.5 mg/mL y se inyectó una muestra de 10  $\mu$ L obteniendo un área de 25.4133, una asimetría de 1.23 y una cuenta de 2467 platos teóricos. Seguido de esta muestra se inyectó otra de 5  $\mu$ L obteniendo un área de 12.4836, una asimetría de 1.32 y una cuenta de platos teóricos menor a la inyección anterior, 2320 (Fig. 23).

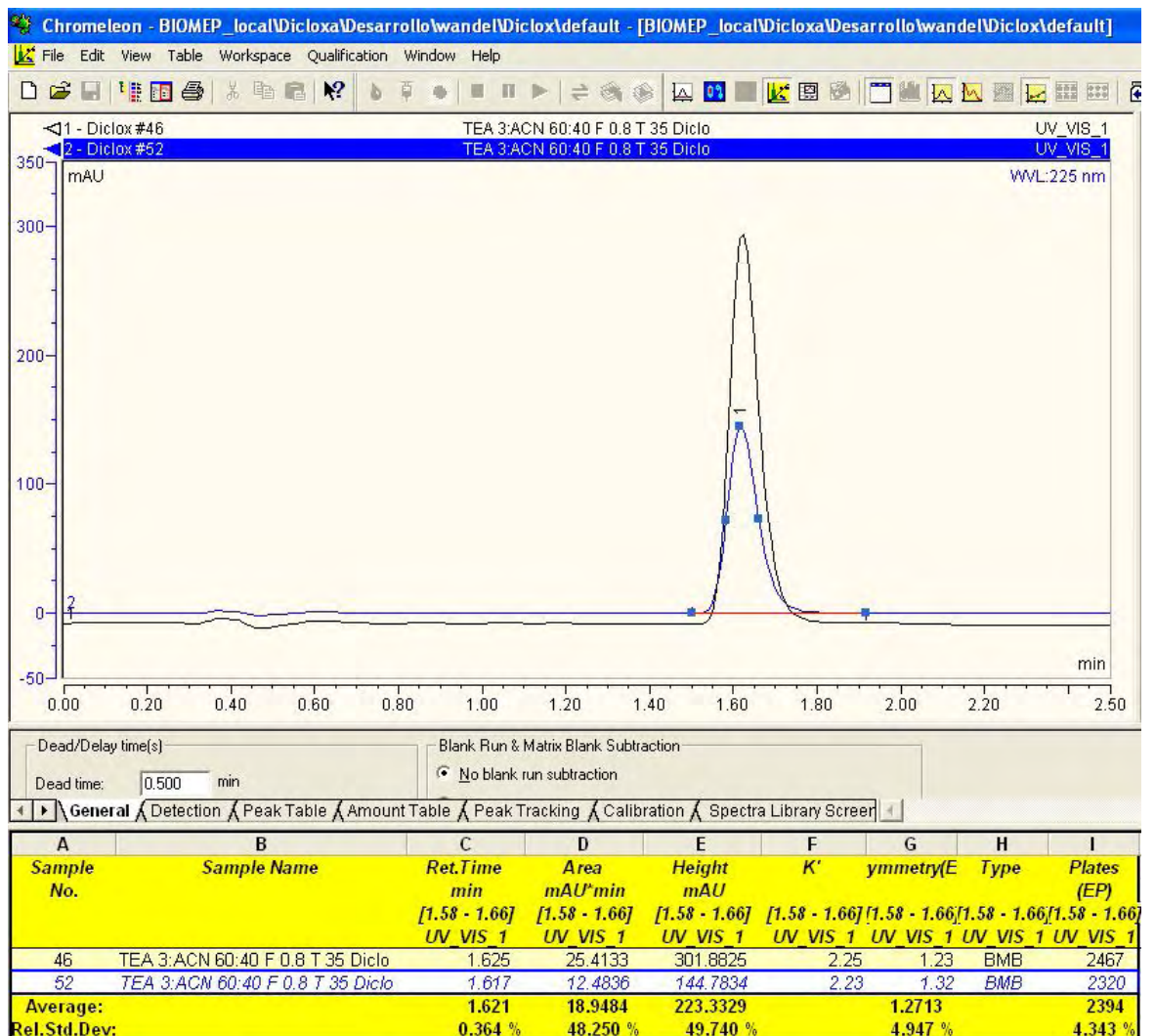


Fig. 23. Inyecciones de Dicloxacilina de 5 y 10  $\mu$ L.

Teniendo en cuenta la sensibilidad del equipo, un área cerca de 25 con una altura de 300 mAU resulta adecuada para llevar a cabo un análisis. Con los resultados obtenidos inyectando 5  $\mu$ L el pico se deforma un poco y la eficiencia se reduce; si se inyectaran 10  $\mu$ L de una muestra más concentrada (1 mg/mL) puede ocurrir una sobrecarga de la muestra en la columna que resulta en un frente del pico puntiagudo o un coleo excesivo.

Con los resultados anteriores se determina utilizar el método con estándares y muestras a una concentración de 0.5 mg/mL, inyectando al cromatógrafo 10 µL.

Una vez establecido el método analítico para la valoración de Dicloxacilina, se establecen las especificaciones que se deben cumplir en Adecuabilidad del sistema (Tabla 5).

**Tabla 5.** Especificaciones para Adecuabilidad del Sistema de Dicloxacilina.

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
Platos Teóricos	No menor a 2000
Tiempo de retención relativo	1.6 minutos
Asimetría	No mayor a 1.50
Factor de Capacidad K'	No menor a 2.00
DER en Área	Menor a 2.00
DER en tiempo de retención	Menor a 1.00

A continuación se hace una comparación de las metodologías analíticas, tanto de la indicada por la FEUM como la descripción final del método que ha sido optimizado.

**Tabla 6.** Comparación de las Metodologías Analíticas.

<b>Descripción</b>	<b>FEUM</b>	<b>Método optimizado</b>
<b><i>Fase Móvil</i></b>	Amortiguador:ACN 150:50	Amortiguador-TEA:ACN 60:40
<b><i>pH de la Fase Móvil</i></b>	5.00	3.00
<b><i>Preparación de muestras (Concentración de uso)</i></b>	1.10 mg/mL	0.50 mg/mL
<b><i>Longitud de onda del detector</i></b>	225 nm	225 nm
<b><i>Velocidad de Flujo</i></b>	2.00 mL/min	0.80 mL/min
<b><i>Tamaño de Columna</i></b>	4.6 mm x 250 mm	2.1 mm x 50 mm
<b><i>Material de empaque</i></b>	Octadecilsilano	Octadecilsilano
<b><i>Tamaño de partícula</i></b>	5 µm	3 µm
<b><i>Volumen de inyección</i></b>	10 µL	10 µL
<b><i>Tiempo de corrida analítica</i></b>	12.0 min	2.50 min



#### 7.4 Comparación del Método Desarrollado vs. El Método Farmacopéico

Teniendo como ejemplo el análisis de un producto (Inyección de 5 estándares y 3 muestras) y un monitoreo de trazas por HPLC (hisopeo del área de mezclado que son 8 puntos) tendríamos con el método farmacopéico un tiempo de análisis de 192 minutos y un costo total de \$ 46.82, mientras que con el método propuesto se tendría un tiempo de análisis de 40 minutos y un costo total de \$ 4.08; esto significa un ahorro de casi el 80% en tiempo y un 90% en el costo total (Tabla 7).

**Tabla 7.** Comparativo de tiempo y costos en el análisis de Dicloxacilina.

<b>Tabla de Comparación para los Métodos Analíticos</b>							
Análisis	Inyecciones	Tiempo de Corrida (min)	mL/min	Costo por mL de FM	mL gastados	Costo total de Análisis (\$)	Tiempo total de análisis (min)
Valoración (Método Propuesto)	08	2.5	0.8	0.06+0.0675 0.1275	16	2.04	20
Valoración (Método Farmacopéico)	08	12.0	2.0	0.0844+0.0375 0.1219	192	23.41	96
Monitoreo de Trazas (Método Propuesto)	08	2.5	0.8	0.06+0.0675 0.1275	16	2.04	20
Monitoreo de Trazas (Método Farmacopéico)	08	12.0	2.0	0.0844+0.0375 0.1219	192	23.41	96

Fase Móvil (FM).

#### 7.5 Validación del método analítico

El método analítico fue validado para la Valoración de Dicloxacilina cápsulas de 250 mg y 500 mg, además de la prueba de disolución de Dicloxacilina cápsulas.

Los protocolos se establecieron conforme a los requerimientos de la empresa, así como los resultados y el reporte mismo. Aquí solo se presentan los dictámenes de cada una de las validaciones efectuadas.

Se muestran las especificaciones y resultados obtenidos de las validaciones en cada uno de los Dictámenes en las Figuras 24, 25 y 26.

La tolerancia del método se llevo a cabo teniendo como factor ajeno al método el uso de diferentes equipos. Los resultados muestran que el método no es afectado por el uso de un cromatógrafo diferente.

<b>DICTAMEN DE</b>
<b>VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR CLAR PARA LA VALORACIÓN DE DICLOXACILINA EN CÁPSULAS DE 250 mg Y 500 mg</b>

**METODO ANALÍTICO PARA LA VALORACIÓN DE DICLOXACILINA CÁPSULAS DE 250 mg Y 500 mg**

**I. DICTAMEN**

Cumple con lo especificado ( ✓ )  
 No cumple con lo especificado (   )

**II. RESULTADOS**

ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
<b>Especificidad</b>	
La respuesta del método únicamente debe ser debida a Dicloxacilina	La respuesta analítica es de Dicloxacilina
<b>Linealidad del sistema</b>	
$r^2 \geq 0.980$ IC( $\beta$ ) no incluye el 0	0.9967 136.565, 146.323
<b>Precisión del sistema</b>	
CV $\leq$ 1.50 %	1.30 %
<b>Linealidad del Método</b>	
CV $\leq$ 2.0% IC( $\mu$ ) incluye el valor de 100%	0.63 % 99.730 < 100 > 100.347
<b>Precisión y Reproducibilidad del Método</b>	
C.V. $\leq$ 2.00 %	0.83 %
<b>Exactitud y Repetibilidad del Método</b>	
CV $\leq$ 2.00 % IC( $\mu$ ) incluye el valor de 100%	0.79 99.215 < 100 > 100.870
<b>Estabilidad Analítica de la Muestra</b>	
$ d_i  \leq 2.00$ %	d <sub>1</sub>   = 1.07 %  d <sub>2</sub>   = 1.13 %  d <sub>3</sub>   = 1.20 %
<b>Tolerancia del método</b>	
CV $\leq$ 2.00 %	0.73 %

**II. CONCLUSIONES**

El Método Analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) desarrollado para cuantificar Dicloxacilina como forma farmacéutica Cápsulas es: **Específico, Lineal, Preciso, Reproducible, Confiable y presenta Tolerancia a equipos**; por lo que queda validado para las condiciones establecidas.

Fig. 24. Dictamen de la Validación para la Valoración de Dicloxacilina cápsulas.

<b>DICTAMEN DE</b>
<b>VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR CLAR DE LA PRUEBA DE DISOLUCIÓN DE DICLOXACILINA EN CÁPSULAS DE 250 mg</b>

**METODO ANALÍTICO PARA LA PRUEBA DE DISOLUCIÓN DE DICLOXACILINA CÁPSULAS DE 250 mg**

**I. DICTAMEN**

Cumple con lo especificado (  )  
 No cumple con lo especificado (  )

**II. RESULTADOS**

ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
<b>Especificidad</b>	
La respuesta del método únicamente debe ser debida a Dicloxacilina	La respuesta analítica es de Dicloxacilina
<b>Linealidad del sistema</b>	
$r^2 \geq 0.980$ IC( $\beta$ ) no incluye el 0	0.9998 147.491, 153.010
<b>Precisión del sistema</b>	
CV $\leq$ 1.50 %	0.95 %
<b>Linealidad del Método</b>	
CV $\leq$ 2.0% IC( $\mu$ ) incluye el valor de 100%	1.15 % 98.876 < 100 > 100.033
<b>Precisión y Reproducibilidad del Método</b>	
C.V. $\leq$ 6.00 %	1.15 %
<b>Exactitud y Repetibilidad del Método</b>	
CV $\leq$ 2.00 % IC( $\mu$ ) incluye el valor de 100%	0.79 99.405 < 100 > 101.411
<b>Estabilidad Analítica de la Muestra</b>	
$ d_i  \leq 2.00$ %	d <sub>1</sub>   = 0.47 %  d <sub>2</sub>   = 1.40 %  d <sub>3</sub>   = 1.58 %
<b>Tolerancia del método</b>	
CV $\leq$ 2.00 %	0.96 %

**II. CONCLUSIONES**

El Método Analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) desarrollado para cuantificar Dicloxacilina cápsulas de 250 mg en la prueba de Disolución es: **Específico, Lineal, Preciso, Reproducible, Confiable y presenta Tolerancia a equipos**; por lo que queda validado para las condiciones establecidas.

Fig. 25. Dictamen de la Validación para la Prueba de Disolución de Dicloxacilina cápsulas de 250 mg.

<b>DICTAMEN DE</b>
<b>VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR CLAR DE LA PRUEBA DE DISOLUCIÓN DE DICLOXACILINA EN CÁPSULAS DE 500 mg</b>

<b>METODO ANALÍTICO PARA LA PRUEBA DE DISOLUCIÓN DE DICLOXACILINA CÁPSULAS DE 500 mg</b>	
<b>I. DICTAMEN</b>	
Cumple con lo especificado	( <input checked="" type="checkbox"/> )
No cumple con lo especificado	(    )
<b>II. RESULTADOS</b>	
<b>ESPECIFICACIÓN</b>	<b>RESULTADO</b>
<b>Especificidad</b>	
La respuesta del método únicamente debe ser debida a Dicloxacilina	La respuesta analítica es de Dicloxacilina
<b>Linealidad del sistema</b>	
$r^2 \geq 0.980$ IC( $\beta$ ) no incluye el 0	0.9996 148.214, 152.851
<b>Precisión del sistema</b>	
CV $\leq$ 1.50 %	1.03 %
<b>Linealidad del Método</b>	
CV $\leq$ 2.0% IC( $\mu$ ) incluye el valor de 100%	0.87 % 98.532 < 100 > 100.124
<b>Precisión y Reproducibilidad del Método</b>	
C.V. $\leq$ 6.00 %	1.36 %
<b>Exactitud y Repetibilidad del Método</b>	
CV $\leq$ 2.00 % IC( $\mu$ ) incluye el valor de 100%	0.57 99.185 < 100 > 101.007
<b>Estabilidad Analítica de la Muestra</b>	
$ d_i  \leq 2.00$ %	d <sub>1</sub>   = 0.27 %  d <sub>2</sub>   = 1.05 %  d <sub>3</sub>   = 1.22 %
<b>Tolerancia del método</b>	
CV $\leq$ 2.00 %	0.68 %
<b>II. CONCLUSIONES</b>	
El Método Analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) desarrollado para cuantificar Dicloxacilina cápsulas de 500 mg en la prueba de Disolución es: <b>Específico, Lineal, Preciso, Reproducible, Confiable y presenta Tolerancia a equipos</b> ; por lo que queda validado para las condiciones establecidas.	

Fig. 26. Dictamen de la Validación para la Prueba de Disolución de Dicloxacilina cápsulas de 500 mg.

## 8. Conclusiones

En este trabajo se obtiene a través de la experimentación una forma más rápida de analizar Dicloxacilina, la cual es totalmente compatible con un equipo de HPLC convencional; es decir, que no es necesario ni limitante al uso de columnas con tecnología de micro partículas para reducir drásticamente el tiempo y costo de un análisis, ni tampoco se tuvo que invertir en bombas que proveen de una alta presión de trabajo o detectores especializados que no son disponibles en instrumentación estándar de HPLC. El método propuesto utiliza una columna empacada con una fase estacionaria de alta eficiencia en donde las partículas de 3  $\mu\text{m}$  son recomendadas para minimizar el tiempo de análisis manteniendo una eficiencia aceptable. Este tamaño de partículas también son recomendadas para aplicaciones con un flujo lineal alto porque su eficiencia es menos afectada de manera adversa por flujos altos.

El método analítico optimizado impacta de manera benéfica al Laboratorio de Control de Calidad ya que el equipo de HPLC tendrá un 80% menos de tiempo ocupado incrementando el número muestras que pueden ser analizadas diariamente y esto provoca de manera directa un ahorro económico del 90%.

9. Referencias Bibliográficas

- 9.1 Bowman W. C. *Farmacología: Bases bioquímicas y patológicas. Aplicaciones clínicas*. Nueva Editorial Interamericana. México; 1984. pp. 34.23-34.33.
- 9.2 Rang H. P. *Farmacología*. 5<sup>ta</sup> ed. Elsevier. España; 2004. pp. 639-643.
- 9.3 Goodman and Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Vol. II. Mc Graw-Hill. México; 1996. pp. 1141-1171.
- 9.4 Katzung B. G. *Farmacología*. El manual moderno. México: 1991. pp. 319-327.
- 9.5 Greenwood D. *Antimicrobial chemotherapy*. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford University Press Inc. USA: 1995. pp. 1-31.
- 9.6 Mutschler E. *Drug actions: Basic principles and therapeutic aspects*. 6<sup>th</sup> ed. Medpharm Scientific Publishers. Germany: 1995. pp. 519-527.
- 9.7 Cuesta R. *Antimicrobianos betalactámicos, Manual de farmacología*. Vol. II. Editorial Pueblo y Educación. La Habana: 1988. pp. 63-66.
- 9.8 Mensa J, Gateil J.. *Guía de terapéutica antimicrobiana*. 6 ed. Masson. Barcelona: 1996. pp. 2-14.
- 9.9 Zamora R, Cordies S, Galhardo M. *Las penicilinas*. Acta Méd 1990; 4-2 (1990) 213-23.
- 9.10 Svarch G. A. *Infección de piel y tejidos blandos*. Rev Mex Puer Ped 9-53 (2002):157-161.
- 9.11 Lozano V. D. *Penicilinas*. Acta Méd 1998; 8 (1): 23-39.
- 9.12 Villafuerte Robles L. *Estabilidad de Medicamentos*. Instituto Politécnico Nacional. México: 2002. pp. 353-366.
- 9.13 Gennaro Alfonso R. *Remington Farmacia*. 20<sup>a</sup> ed. Médica Panamericana. Buenos Aires: 2003. pp. 687-717.
- 9.14 Salem H., Saleh G.A.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002) 1205-1213.
- 9.15 Nour El-Dien F.A., Mohamed G.; *Spectrochimica Acta Part A*. 64 (2006) 210-215.
- 9.16 Settle F. *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry*. Prentice Hall. USA: 1997. pp. 147-164.

- 9.17 Avendaño López M. C. *Introducción a la química farmacéutica*. McGraw-Hill Interamericana. España: 1993. pp. 843-860.
- 9.18 Takeba K., Fujinama K.; *J. Chromatogr. A.* 812 (1998) 205-211.
- 9.19 Sorensen L., Snor L.; *J. Chromatogr. B.* 734 (1999) 307-318.
- 9.20 Tsuji Kiyoshi. *GLC and HPLC, Determination of therapeutic agents*. Part 2. Marcel Dekker, Inc. USA: 1978. pp. 773-780.
- 9.21 Ghosh Mantu K. *HPLC Methods on drugs analysis*. Springer Verlag. USA: 1992. pp. 155-157.
- 9.22 Meyer R. V. *Practical High Performance Liquid Chromatography*. John Wiley and Sons Ltd. Germany: 1998. pp 109-166.
- 9.23 Lough W. J. *High Performance Liquid Chromatography: Fundamental principles and practice*. Chapman and Hall. Great Britain: 1995. pp. 38-43, 132-143.
- 9.24 Technical Report: Preparing Buffered Mobile Phases for Reversed Phase HPLC. Number 02091 TR. MAC-MOD Analytical Inc. On line < <http://www.mac-mod.com/>> April 13, 2007.
- 9.25 YMC: *HPLC Columns applications notebook*. Waters Corporation. USA: 2003.
- 9.26 Travieso N.M. *Control interno de la calidad de los métodos analíticos*. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. Cuba: 2003.
- 9.27 Rosso A. *Criterios de validación en métodos analíticos instrumentales para industria farmacéutica*. CEQUIPE: 2002.
- 9.28 FEUM 8ª ed. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. Secretaría de Salud. México: 2004.
- 9.29 USP 24, *The United States Pharmacopeia-NF 19*, USA: 2000.
- 9.30 Text on Validation of Analytical Procedures, International Conference on Harmonization. September: 1993.
- 9.31 Reviewer guidance validation of chromatographic methods. Center for drug evaluation and research. November: 1994.
- 9.32 *Guía de Validación de Métodos Analíticos*. Edit. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. México: 2002.

9.33 Technical Report: Using Bonded Phase Selectivity to Optimize High Throughput HPLC Separations. Number PB03051. MAC-MOD Analytical Inc. On line <  
<http://www.mac-mod.com/>> April 13, 2007.

9.34 *Properties of HPLC columns*. Grace Vydac. USA: 2004.



