



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

“Optimización y validación de un método analítico para
la determinación de ácido azelaico y compuestos
relacionados en una formulación farmacéutica mediante
cromatografía de gases capilar
(FID-GC)”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO

P R E S E N T A:

CARLOS EDUARDO CUANDO CERÓN



V N A M

ASESORES:

DRA. ALMA LUISA REVILLA VÁZQUEZ
M. en C. PABLO HERNÁNDEZ MATAMOROS

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
AV. PARRAL DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E



ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

"Optimización y validación de un método anítico para la determinación de ácido azelaico y compuestos relacionados en una formulación farmacéutica mediante cromatografía de gases capilar (FID-GC)"

que presenta el pasante: Carlos Eduardo Cuando Cerón
con número de cuenta: 40506451-5 para obtener el título de :
Ingeniero Químico

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 21 de octubre de 2009

| | | |
|------------------|--|--|
| PRESIDENTE | Dra. Guadalupe Pérez Caballero | |
| VOCAL | Q.F.B. Elia Granados Enríquez | |
| SECRETARIO | Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez | |
| PRIMER SUPLENTE | Dr. Ricardo Paramont Hernández García | |
| SEGUNDO SUPLENTE | Q.F.B. Martha Angélica Villegas Gonzalez | |

*Sonó la primera Palabra de Dios, allí donde no
había cielo ni tierra. Y se desprendió de su Piedra y
cayó al segundo tiempo y declaró su divinidad. Y se
estremeció toda la inmensidad de lo eterno. Y su
palabra fue una medida de gracia, un destello de
gracia y quebró y horadó la espalda de las
montañas. ¿Quién nació cuando bajó? Gran Padre,
Tú lo sabes. Nació su primer Principio y barrenó la
espalda de las montañas.*

*¿Quiénes nacieron allí? ¿Quiénes? Padre, Tú lo
sabes. Nació el que es tierno en el cielo.*

AGRADECIMIENTOS

A la máxima Casa de Estudios de nuestro país, la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación que recibí como profesionista.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, porque en sus aulas pasé gran parte de los mejores años de mi vida y porque en el transcurso de mi estancia en ella asimilé y superé demasiadas cosas.

Al proyecto PAPIIME PE 207606

A la Dra. Alma por la dedicación de su tiempo, sus conocimientos y su paciencia en la realización del presente trabajo.

Al MC Pablo Hernández por al apoyo durante clases y mi trabajo de tesis.

A la sección de Química Analítica por el apoyo, la formación y la confianza que me brindaron, gracias a la profra. Sonia Rincón Arce, MC José De Jesús, Dra. Gabby, QFB Angie y al profesor Enrique.

A los profesores del LEM, al Prof. Celestino, Dr. Pastor, IQ Ma. Elena, muchísimas gracias por los consejos, las bromas y los buenos momentos que pasaron con los IQ 32.

Al Ing. Draucin Jiménez

A mis amigos y compañeros de generación, que vivimos juntos la travesía de la carrera.

A Elsa, (¡¡¡¡juntos de principio a fin!!!!) gracias por ser una de las personas más importantes para mí, sabes que ¡te quiero mucho y que siempre vas a tener un lugar especial!, a Martín (al fin lo logramos!) te agradezco por ser mi amigo y por ubicarme las veces que fueron necesarias; a Monse (ma marie jajaja) que aunque llegaste un poco tarde con nosotros supiste ganarte toda mi confianza, a Salvador por la paciencia y la confianza (sabes que te quiero canijo); a Jorge, amigo sabes que te aprecio demasiado y agradezco mucho a la vida por haberte conocido, muchas gracias por estar ahí siempre; a Iván por paciente; a Izamara por los momentos de risa y diversión; a Alfred por siempre hacer la labor de robarme una sonrisa del rostro.

A Quetzal, Daniel, Nayeli, Violeta, el niño, porque en los últimos meses aprendí que son personas valiosas.

A Mary por mostrarme el camino para conocerme a mi mismo, muchas gracias.

A Esperanza por convertirse en una maestra, y enseñarme que SI es posible vivir de una manera diferente, que la única manera de librarse de cualquier atadura es viviendo en el PRESENTE.

Gracias a mi papá, por enseñarme que a pesar todo, la responsabilidad con el trabajo tiene gran importancia

A mi hermana, por permitirme ser un ejemplo a seguir

Agradezco de manera muy especial a mi mamá por ser un gran motor en mi formación personal y profesional, por inculcarme desde pequeño la inquietud por siempre querer saber más, por sembrar en mí la creencia en un poder superior, por enseñarme a amar a mi país y a ser un fiel partidario y defensor de la verdad.

Gracias madre por ser la primera maestra que tuve en la vida, por cultivar en mí la necesidad de encontrar ese algo, ese camino por el que ahora caminamos una vez más juntos, por haber sido a lo largo de las eras una persona muy especial.

Mamita, muchas gracias, por compartir conmigo esa hambre de saber, conocer y comprender el hecho de que la vida es una escuela y que es decisión personal el evolucionar de conciencia.

Al Triúnico, a la Causa Centro Primera, al Absoluto, a aquél que no depende del tiempo, del espacio ni de la eternidad; a mi Padre.

Gracias Señor, por que a través de la perfección de tus leyes he recibido TODAS tus bendiciones.

INDICE.

| | |
|--|----|
| Introducción | 5 |
| Capítulo 1. Objetivos | 6 |
| 1.1 Objetivo general..... | 6 |
| 1.2 Objetivos particulares..... | 6 |
| Capítulo 2. Marco teórico | 7 |
| 2.1 Ácido azelaico..... | 7 |
| 2.1.1 Características químicas..... | 7 |
| 2.1.2 Propiedades farmacodinámicas..... | 9 |
| 2.1.2 Propiedades farmacocinéticas..... | 9 |
| 2.1.3 Formulaciones comerciales en el mercado..... | 10 |
| Capítulo 3. Cromatografía de Gases (GC) | 11 |
| 3.1 Proceso de GC..... | 11 |
| 3.1.1 Tipos de GC..... | 11 |
| 3.2 Principios cromatográficos..... | 12 |
| 3.2.1 Tiempo de retención (t_r)..... | 12 |
| 3.2.2 Factor de capacidad (k)..... | 12 |
| 3.2.3 Factor de separación ($\alpha_{2/1}$)..... | 12 |
| 3.2.4 Resolución (R)..... | 13 |
| 3.2.5 Platos teóricos y altura equivalente (HEPT)..... | 14 |
| 3.3 Componentes de un cromatógrafo de gases..... | 15 |
| 3.3.1 Gas acarreador..... | 16 |
| 3.3.2 Puerto de inyección..... | 17 |
| 3.3.2.1 Inyección on column..... | 17 |
| 3.3.3 Columna..... | 18 |
| 3.3.4 Detectores de GC..... | 20 |
| 3.3.4.1 Ionización de flama (FID)..... | 21 |
| 3.3.5 Registrador y colector de datos..... | 22 |
| 3.4 Aplicaciones..... | 22 |
| Capítulo 4. Reacciones de derivatización | 23 |
| 4.1 Derivatización..... | 23 |
| 4.1.1 Sililación..... | 23 |
| 4.2 Propiedades del BSTFA..... | 24 |
| Capítulo 5. Validación de métodos analíticos | 25 |
| 5.1 Proceso de validación..... | 25 |
| 5.2 Parámetros de validación..... | 28 |
| 5.2.1 Exactitud..... | 28 |
| 5.2.2 Precisión..... | 28 |
| 5.2.2.1 Repetibilidad..... | 28 |
| 5.2.2.2 Precisión intermedia..... | 29 |
| 5.2.2.3 Reproducibilidad..... | 29 |
| 5.2.3 Especificidad..... | 29 |
| 5.2.3.1 Identificación..... | 29 |
| 5.2.3.2 Ensayo y prueba de límites..... | 30 |
| 5.2.4 Límite de detección..... | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 5.2.5 Límite de cuantificación..... | 31 |
| 5.2.6 Linealidad y alcance..... | 31 |
| 5.2.7 Robustez..... | 31 |
| Capítulo 6. Fase experimental | 32 |
| 6.1 Equipo de GC utilizado..... | 32 |
| 6.2 Optimización del método analítico..... | 33 |
| 6.2.1 Condiciones de reacción..... | 33 |
| 6.2.2 Condiciones cromatográficas..... | 34 |
| 6.4 Metodología experimental..... | 37 |
| 6.3.1 Procedimiento general..... | 37 |
| 6.3.1 Adecuabilidad del sistema..... | 38 |
| 6.3.2 Especificidad..... | 39 |
| 6.3.3 Precisión del sistema..... | 40 |
| 6.3.4 Linealidad del sistema..... | 41 |
| 6.3.5 Linealidad del método..... | 42 |
| 6.3.6 Exactitud y repetibilidad..... | 43 |
| 6.3.7 Precisión intermedia..... | 44 |
| 6.3.8 Muestras comerciales..... | 45 |
| Capítulo 7. Resultados y análisis de resultados | 46 |
| 7.1 Optimización de condiciones experimentales..... | 46 |
| 7.1.1 Estudio de ácidos carboxílicos como interferencia..... | 46 |
| 7.2 Adecuabilidad del sistema..... | 49 |
| 7.3 Especificidad..... | 50 |
| 7.4 Precisión del sistema..... | 52 |
| 7.5 Linealidad del sistema..... | 53 |
| 7.6 Exactitud y repetibilidad..... | 58 |
| 7.7 Linealidad del método..... | 59 |
| 7.8 Precisión intermedia..... | 62 |
| 7.9 Muestras comerciales..... | 63 |
| Capítulo 8. Conclusiones | 65 |
| Capítulo 9. Anexos | 66 |
| Capítulo 10. Bibliografía | 77 |

Tabla I. Abreviaturas empleadas

| | |
|----------------------------------|---|
| BSTFA | N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida |
| C10 | Ácido sebácico |
| C7 | Ácido pimélico |
| C8 | Ácido subérico |
| C9 | Ácido azelaico |
| CE | Electroforesis capilar |
| FID | Detector de Ionización de Flama |
| GC | Cromatografía de Gases |
| GSC | Cromatografía Gas - Sólido |
| GSL | Cromatografía Gas - Líquido |
| HEPT | Altura equivalente de plato teórico |
| HPLC | Cromatografía Líquida de Alta Resolución |
| k | Factor de capacidad |
| R | Resolución entre picos |
| SCOT | Columna Capilar de Soporte Recubierto |
| TMCS | Trimetil Cloro Silano |
| t_r | Tiempo de retención |
| WCOT | Columna Capilar de Pared Recubierta |
| $\alpha_{2/1}$ | Factor de separación |

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha encontrado que el ácido azelaico en concentraciones del 15 al 20 %p/p inhibe y contrarresta el melasma y el acné; estudios recientes mostraron una recuperación hasta de un 81.9%. A partir de 1989 el ácido azelaico es utilizado para el tratamiento del acné en algunos países.

Actualmente la formulación farmacéutica es un producto de patente y solo es manufacturado y distribuido por los Laboratorios Darier y Bayer Shering Pharma en el mercado nacional, por lo que al abrirse su elaboración al mercado, habrá la necesidad de una técnica analítica para su cuantificación.

Una técnica analítica que permite la caracterización y cuantificación de este principio activo es la cromatografía de gases capilar con detección de ionización de flama (GC-FID), llevando previamente a cabo una reacción de derivatización con BSTFA.

En el presente trabajo se llevó a cabo la optimización y la validación de un método analítico por cromatografía de gases capilar para determinar ácido azelaico. Este método permitirá realizar el control de calidad de muestras farmacéuticas de una manera económica, eficiente, confiable y rápida.

La validación se llevó a cabo con base en los criterios establecidos en la guía del Colegio Nacional de Validación. Se determinó que el método cumple con todos los criterios de validación establecidos, lo cual, asegura la confiabilidad del mismo para el análisis de la formulación farmacéutica que contenga el activo de estudio.

Capítulo 1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo general.

- Optimizar y validar un método cromatográfico que permita la separación y cuantificación de ácido azelaico y compuestos homólogos en una formulación farmacéutica mediante cromatografía de gases capilar (FID-GC).

1.2. Objetivos particulares

- Optimizar las condiciones de reacción para la derivatización de ácido azelaico.
- Establecer las condiciones cromatográficas óptimas para la separación y cuantificación de ácido azelaico.
- Verificar que las condiciones óptimas propuestas cumplan con los propósitos prácticos de medición de ácido azelaico en formulaciones farmacéuticas.
- Validar el método analítico con los parámetros estadísticos de desempeño, como son: reproducibilidad, especificidad, adecuabilidad, precisión, exactitud, linealidad del método y linealidad del sistema de acuerdo con lo establecido en la Guía de Validación de Métodos Analíticos.
- Analizar las muestras comerciales de ácido azelaico existentes en el mercado nacional.

Capítulo 2. MARCO TEÓRICO

2.1 Ácido azelaico

2.1.1 Propiedades químicas

El ácido azelaico es un ácido dicarboxílico saturado. Según sus características químicas, es ácido 1,7-heptanodicarboxílico, con la fórmula molecular $C_9H_{16}O_4$, una masa molar de 188.22 g/mol, y la siguiente fórmula estructural (figura 1):

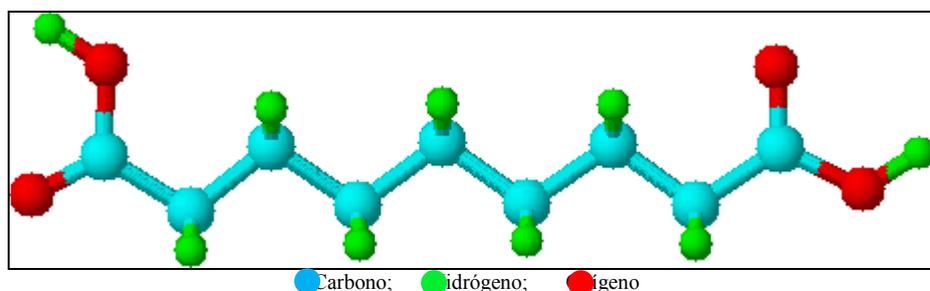


Figura 1. Estructura química del ácido nonanodioico (ácido azelaico)

El ácido azelaico puede ser obtenido por la oxidación del ácido oleico (presente en la naturaleza en los granos de cereales) por dos métodos:

1. Oxidación con ácido nítrico (HNO_3) [1]
2. Oxidación con permanganato de potasio ($KMNO_4$) [2]

El creciente interés que existe sobre las propiedades biológicas y las aplicaciones terapéuticas de esta sustancia se inició a partir de los estudios realizados por Nazzaro sobre los lípidos de la superficie cutánea y la patogenia de la hipocromia de la pitiriasis versicolor.

El ácido azelaico se utilizó por primera vez en 1977 para usos dermatológicos en el tratamiento de los trastornos de la hiperpigmentación, a partir de que el fármaco demostró ser, *in vitro*, un inhibidor competitivo de la tirosinasa, la enzima fundamental en la melanogénesis [3].

Se observó que pacientes con melasma y acné coexistentes, presentaban una mejoría tanto del acné como del trastorno de la pigmentación cuando recibieron tratamiento tópico con ácido azelaico. Ello dio origen a proponer estudios clínicos sobre la utilidad y el efecto del ácido en el tratamiento del acné y de la rosácea. El ácido azelaico demostró no ser tóxico para la piel normal, además, de ejercer una acción terapéutica beneficiosa en desórdenes cutáneos de distintas etiologías.

Estudios recientes mostraron una recuperación en el melasma y el acné hasta de un 81.9% en la muestra de la población que se tomó para verificar el efecto de este principio activo, A partir de 1989 el ácido azelaico es utilizado para el tratamiento del acné vulgar en algunos países [4].

Al ser un producto con un alto potencial comercial debido a su uso dermatológico, la industria farmacéutica requiere de métodos sencillos y confiables para la determinación de este principio activo, con diversas finalidades como son: control de síntesis de ácido, control de materia prima, control de procesos de producción, verificación del contenido de producto, liberación del producto al mercado, etc. En la literatura se encuentran reportados diferentes técnicas analíticas para su caracterización y cuantificación, entre los que destacan:

- Valoraciones potenciométricas de ácidos carboxílicos
- Análisis de ácido azelaico por HPLC con detección de fluorescencia [5]
- Detección y cuantificación de ácidos carboxílicos por CE [6]
- Determinación y cuantificación de ácidos dicarboxílicos cromatografía de gases capilar [7]

Una técnica relativamente sencilla, económica y confiable es la cromatografía de gases; en un trabajo de laboratorio previo se reporta el desarrollo de un método analítico para el análisis de ácido azelaico y compuestos homólogos, mediante cromatografía de gases, llevando a cabo una derivatización previa con el reactivo BSTFA [7]; sin embargo, solo se reportan las condiciones de reacción y cromatográficas de separación del ácido azelaico sin definir parámetros de validación. Es por ello que el validar el método es el principal objetivo de esta tesis.

2.1.2 Propiedades farmacodinámicas

Se supone que la eficacia terapéutica del ácido azelaico en el acné se basa en la acción antimicrobiana y en un efecto directo sobre la hiperqueratosis folicular; clínicamente, se observa una reducción significativa de la densidad de colonización por *Propionibacterium acnes* y una reducción significativa de la fracción de ácidos grasos libres en los lípidos de la superficie de la piel.

In vitro e in vivo, el ácido azelaico inhibe la proliferación de los queratinocitos y normaliza la alteración de los procesos de diferenciación epidérmica terminal en el acné. En el modelo de oreja de conejo, el ácido azelaico acelera la comedólisis de los comedones inducidos por tetradecano.

Se desconoce el mecanismo por medio del cual el ácido azelaico interfiere con los procesos patogénicos en la rosácea. Diversas investigaciones in vitro e in vivo señalan que el ácido azelaico puede ejercer un efecto antiinflamatorio al reducir la formación de especies reactivas de oxígeno proinflamatorias.

2.1.3 Propiedades farmacocinéticas

El ácido azelaico penetra en todas las capas de la piel humana después de la aplicación tópica. La penetración es más rápida en la piel lesionada que en la intacta. Después de una aplicación tópica única de 1 g de ácido azelaico (5-7g de crema o gel) se absorbe percutáneamente un total de 3.6% de la dosis aplicada. Investigaciones clínicas realizadas en pacientes con acné señalaron tasas de absorción de ácido azelaico similares a partir de crema y gel.

Una parte del ácido azelaico absorbido a través de la piel se elimina de forma no modificada por la orina. El resto se cataboliza por beta-oxidación en ácidos dicarboxílicos de cadenas más cortas (C7, C5) que también se han detectado en la orina [8,9].

2.1.4 Formulación de ácido azelaico en el mercado nacional

Las formulaciones de ácido azelaico en el mercado nacional son las que se muestran en la tabla.

Tabla 1. Productos comerciales actuales en el mercado nacional que contienen ácido azelaico

| Nombre Comercial | Forma farmacéutica | Vía de admin. | Dosis | Laboratorio |
|-------------------------|---------------------------|----------------------|--------------|--------------------|
| Cutacelan | Crema | Tópica | 20% | Shering Pharma |
| Finacea | Gel | Tópica | 15% | Shering Pharma |
| Lab Darier | Crema | Tópica | 20% | Darier |

Actualmente no existe un producto farmacéutico genérico, y sólo es distribuido como producto de patente.

Capítulo 3. CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)

3.1 *Proceso de GC*

Es una técnica analítica física de separación, en la cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases. La separación se basa en la velocidad de desplazamiento diferencial de los mismos que se establece al ser arrastrados por una fase móvil (gas acarreador) a través de un lecho cromatográfico que contiene la fase estacionaria. [10]

3.1.1 *Tipos de GC*

Existen dos tipos de cromatografía de gases (GC): la cromatografía gas-sólido (GSC) y la cromatografía gas-líquido (GLC), siendo esta última la que se utiliza más ampliamente, y que se puede llamar simplemente cromatografía de gases (GC). La GLC utiliza como fase estacionaria moléculas de líquido inmovilizadas sobre la superficie de un sólido inerte. [11]

La GC es la técnica cromatográfica que ofrece mejor poder de resolución para compuestos orgánicos. Las características que deben cumplir los analitos a separar por GC son:

1. Presión de vapor relativamente alta (punto de ebullición $<250^{\circ}\text{C}$)
2. Estabilidad térmica (no presentar descomposición antes de evaporarse) [11,12]

3.2 Principios cromatográficos.

3.2.1 Tiempo de retención (t_r)

Se refiere al tiempo en que la máxima cantidad del analito de estudio es detectado y refleja señal, desde que es inyectado desde el inicio de la columna hasta el detector (min).

3.2.2 Factor de capacidad (k')

Es un parámetro de tiempo y caracteriza con más propiedad a un soluto y se define como la relación entre el tiempo de retención ajustado y el tiempo muerto.

$$k = \frac{(t_r - t_0)}{t_0}$$

Donde:

k = Factor de capacidad

t_r = Tiempo de retención del analito

t_0 = Tiempo muerto

3.2.3 Factor de separación (α)

Es un parámetro definitorio de cuán selectiva es la separación de dos analitos, se define como la relación entre sus tiempos de retención ajustados o más bien entre sus factores de capacidad:

$$\alpha_{2/1} = \frac{k_2}{k_1}$$

Donde:

k_1 = Factor de capacidad del analito 1

k_2 = Factor de capacidad del analito 2

α = Factor de separación

3.2.4 Resolución

Es la capacidad para separar dos sustancias, no solo teniendo en cuenta la separación entre picos, sino también los anchos de pico. Es más útil y definitivo que el factor de separación.

Se define como la relación entre la distancia que separa a dos picos y la media aritmética de los anchos de picos:

$$R = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{W_1 + W_2}$$

Donde:

R = Resolución

t_{r1} = Tiempo de retención del analito 1

t_{r2} = Tiempo de retención del analito 2

W_1 = Ancho del pico gaussiano del analito 1

W_2 = Ancho del pico gaussiano del analito 2

Para que exista una resolución prácticamente total el valor de R debe ser igual o mayor a 1.5

3.2.5 Platos teóricos de la columna y altura equivalente de platos teóricos (HEPT)

La eficiencia en GC depende del ancho de los picos y del espacio de tiempo de retención entre los picos. La eficacia es el parámetro que cuantifica la preferencia por las bandas angostas, y ésta es análoga a la destilación, en donde se habla de platos teóricos, en GC una columna cromatográfica está constituida por una serie de platos que contiene una fase estacionaria. Supone que el volumen de fase estacionaria en cada plato es constante; que el volumen de fase móvil es constante de plato a plato; que en cada plato las dos fases están en equilibrio.

Esto se expresa por la siguiente ecuación:

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

Donde:

t_r = Tiempo de retención (min)

W = Ancho del pico gaussiano del analito.

El HEPT se refiere a la relación del número de platos teóricos con respecto a la longitud de la columna y se expresa:

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

Donde:

N = Número de platos teóricos

L = Longitud de la columna (m)

Estos parámetros en GC son los que marcan la pauta para definir si la técnica cromatográfica es eficiente para llevar a cabo un análisis cualitativo y cuantitativo [11, 13].

3.3 Componentes de un Cromatógrafo.

Un equipo de GC se compone básicamente de:

- Suministro de gas acarreador
- Controlador de flujo del gas acarreador
- Puerto de inyección
- Columna
- Horno de la columna
- Detector
- Registrador de datos
- Sistema de recopilación de datos

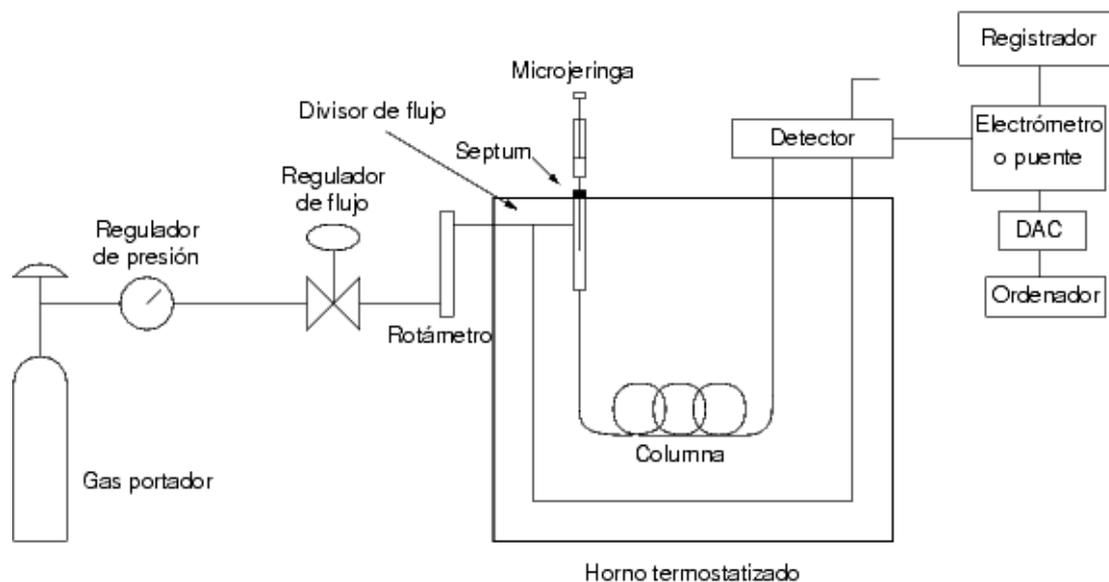


Figura 2. Diagrama de un cromatógrafo de gases [14].

3.3.1 Gas acarreador.

Es la fase móvil en GC, su única función es arrastrar a los analitos desde el puerto de inyección hasta el detector, a través de la columna, donde se lleva a cabo la separación.

El gas debe contar con las siguientes características:

- Químicamente inerte
- No debe interactuar con la columna ni con los componentes de la mezcla
- Alta pureza
- No debe interferir en la señal del detector

La resolución cromatográfica depende del gas acarreador, debido a que este influye en la eficacia de la columna, puesto que, la HEPT está afectada por la difusividad del soluto en la fase móvil.

El nitrógeno como gas acarreador resulta ser la mejor opción si es usado el detector de ionización de flama FID al ser más barato que los demás gases y no interfiere con la columna, los analitos ni el detector [11,12].

3.3.2 Puerto de inyección

Se puede utilizar cualquier tipo de muestra (sólida, líquida o gaseosa) siempre que éste sea estable y no origine una sobrecarga en la columna ni en el detector. La técnica de introducción de la muestra depende de:

1. Su estado físico
2. Rango de concentraciones de los analitos a separar
3. Condiciones cromatográficas

Las muestras líquidas son las más empleadas siendo las jeringas de inyección la mejor opción siendo los volúmenes de 1 y 10 μL las más comunes.

3.3.2.1 Inyección on column

En este tipo de inyección la muestra se deposita directamente en la columna sin que exista una cámara de vaporización previa. Las jeringas deben tener un diámetro de la aguja suficientemente pequeño para que ésta penetre en la columna. La aguja se introduce a través de un septum, dentro de la columna [11, 12, 13].

3.3.3 Columna.

Es el elemento esencial del cromatógrafo, debido a que es en la columna donde se llevan los procesos físico-químicos de separación (volatilidad – solubilidad).

Las columnas más utilizadas actualmente son las capilares o abiertas, las columnas capilares son de dos tipos básicos: las de pared recubierta (WCOT) y las de soporte recubierto (SCOT). Las WCOT son simplemente tubos capilares donde la pared interna se ha recubierto con una finísima capa de fase estacionaria. Las columnas SCOT tienen en su parte interna una fina capa de material adsorbente como el empleado en las columnas de relleno (tierra de diatomeas) donde se ha adherido la fase estacionaria. Por orden de eficacia, en primer lugar están las WCOT, luego las SCOT y por último las columnas de relleno.

Las columnas WCOT se fabrican a partir de sílice fundida, en el mismo proceso de obtención del tubo se recubre con una capa de poliimida, de esta forma la columna puede enrollarse con un diámetro de unos pocos centímetros.

Corte de sección de una columna capilar de sílice fundida

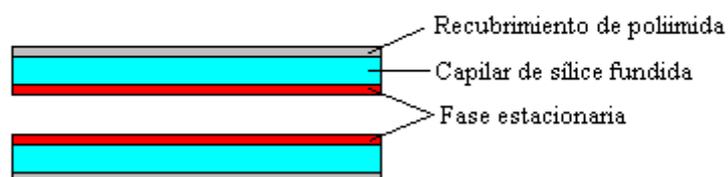


Figura 3. Estructura de una columna capilar en GC.

Las propiedades necesarias para una fase estacionaria líquida inmovilizada son:

1. Características de reparto (factor de capacidad κ' y factor de selectividad α) adecuados al analito.
2. Baja volatilidad, el punto de ebullición de la fase estacionaria debe ser al menos 100°C mayor que la máxima temperatura alcanzada en el horno.
3. Baja reactividad.

4. Estabilidad térmica, para evitar su descomposición durante la elución [11, 13, 14].

Tabla 2. Fases estacionarias para GC en columnas capilares.

| Fases | Temperatura máxima (°C) |
|--|--------------------------------|
| No polares: | |
| Escualeno | 150 |
| 100% metilpolisiloxano | 300 |
| 5% fenil 95% metilpolisiloxano | 300 |
| Moderadamente polares: | |
| 14% cianopropilfenil 86% metilpolisiloxano | 300 |
| 50% fenil 50% metilpolisiloxano | 225 |
| Fenilsiloxano carborano | 370 |
| Polares: | |
| 50% cianopropil 50% metilpolisiloxano | 275 |
| 50% trifluoropropil 50% metilpolisiloxano | 250 |
| Glicol de polietileno | 225 |
| Altamente polares: | |
| 70% cianopropilpolsilfenilenosiloxano | 250 |
| Poli(dietilenglicol succinato) | 200 |

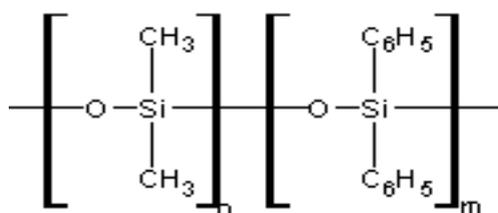


Figura 4. Estructura química de la fase estacionaria de la columna 5% fenil/95% metilpolisiloxano

3.3.4 Detector.

El detector es la parte del cromatógrafo que se encarga de convertir una propiedad física (diferencia de potencial), no medible directamente, en una señal elaborable y por medio de ésta determinar cuándo ha salido el analito por el final de la columna. Su fundamento es medir de forma continua una propiedad física o química del gas, realizando dos funciones:

- a) Indicar el momento exacto en que pasa un soluto definiendo los tiempos de retención para su análisis cualitativo.
- b) Originar una señal proporcional a la cantidad de soluto que pasa a través de él para su cuantificación.

Tabla 3. Tipos de detectores en GC

| Detector | Tipo | Gases soporte | Selectividad | Límite de detección | Intervalo lineal |
|-----------------------|---------------|---------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| Ionización de flama | Flujo másico | H ₂ y aire | Compuestos orgánicos | 10 ⁻¹² | 10 ⁶ – 10 ⁷ |
| Conductividad térmica | Concentración | Referencia | Universal | 10 ⁻⁵ – 10 ⁻⁶ | 10 ³ – 10 ⁴ |
| Captura electrónica | Concentración | CH ₄ +Ar | Haluros, nitratos, organometálicos | 10 ⁻¹⁴ | 10 ² – 10 ³ |
| Fotométrico de llama | Flujo másico | H ₂ y aire | S, P, As, Ge, B, Se | 10 ⁻¹³ | 10 ² |
| Nitrógeno-fósforo | Flujo másico | H ₂ y aire | N, P | 10 ⁻⁸ – 10 ⁻¹⁴ | 10 ⁵ – 10 ⁷ |
| Fotoionización | Concentración | H ₂ y Ar | Alifáticos, aromáticos, etc. | 10 ⁻⁸ – 10 ⁻¹² | 10 ⁵ |
| Hall | Flujo másico | H ₂ , O ₂ | X ⁻ , N, S | 10 ⁻¹¹ | 10 ⁵ |

3.3.4.1 Detector de Ionización de flama (FID)

Se basa en la relación entre la conductividad eléctrica y la concentración de partículas cargadas existentes en el mismo; funciona mediante la pirolisis del efluente en una llama de hidrógeno/aire, cuando pasan componentes separados por el detector, éstos reaccionan en la llama para producir cationes en la corriente del efluente. Estos iones se inducen mediante un campo eléctrico al colector. Esta diferencia de potencial será amplificada para que se produzca la respuesta.

Características:

- a) Realiza medidas absolutas
- b) Detector prácticamente universal
- c) Destruye la muestra
- d) Responde a la velocidad del flujo del soluto [11, 12, 13]

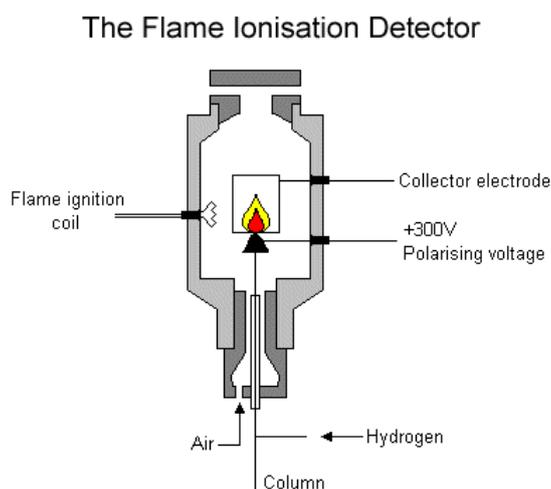


Figura 5. Detector por Ionización de Flama (FID) [14]

3.3.5 Registrador y colector de datos

El registro de la respuesta que produce el detector, es amplificado por dispositivos electrónicos.

Actualmente es poco común encontrar colectores de datos como integradores, ahora el uso de computadoras resulta más conveniente y más rápido para la obtención de los datos para el análisis cualitativo y cuantitativo.

Estos aparatos calculan el tiempo de retención, el área bajo el pico, la altura del pico, la resolución, el factor de capacidad. [13]

3.5 Aplicaciones de GC

La GC tiene dos importantes campos de aplicación. Por una parte su capacidad para separar mezclas orgánicas complejas, compuestos organometálicos y sistemas bioquímicos. Su otra aplicación es como método para determinar cuantitativa y cualitativamente los componentes de la muestra. Para el análisis cualitativo se suele emplear el tiempo de retención, que es único para cada compuesto dadas unas determinadas condiciones (mismo gas portador, rampa de temperatura y flujo), o el volumen de retención. En aplicaciones cuantitativas, integrando las áreas de cada compuesto o midiendo su altura, con los calibrados adecuados, se obtiene la concentración o cantidad presente de cada analito.

Capítulo 4. REACCIONES DE DERIVATIZACIÓN

4.1 Derivatización

Debido a que el ácido azelaico no presenta una volatilidad alta, es necesario realizar una reacción de derivatización previamente, para que el analito se convierta en un compuesto más volátil.

Normalmente las reacciones de derivatización se efectúan en sistemas pre-columna, cambiando las características de los solutos (específicamente su volatilidad), es por eso que en muchos de los casos la técnica de derivatización se utiliza para transformar grupos funcionales protónicos en grupos no polares y con suficiente estabilidad térmica y alta volatilidad.

4.1.1 Reacción de sililación.

Este tipo de reacción es de tipo discontinuo y se lleva a cabo al sustituir un hidrógeno activo en un grupo funcional por un grupo trimetilsililo ($-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), con esto las características que obtiene el analito son [13, 15, 16]:

1. Reducción en la polaridad
2. No hay puentes de hidrógeno que puedan formarse
3. Aumenta la volatilidad y estabilidad térmica
4. No permite las interacciones indeseables con la columna (adsorción irreversible)

Uno de los reactivos para la efectuar la reacción de derivatización es el BSTFA 1% TMCS.

Capítulo 5. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

5.1 Proceso de validación

La química analítica, ciencia que es teórica y práctica, se utiliza en un amplio número de laboratorios en diversas áreas; los métodos de análisis son diariamente desarrollados, mejorados, validados, estudiados y aplicados [18].

Un método analítico es la descripción de la secuencia de actividades, recursos, materiales y parámetros que se deben cumplir, para que se pueda completar el análisis de un componente específico de una muestra y su validación es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación deseada, es decir, cumple con su propósito [19].

Para los métodos de validación las especificaciones están listadas en la Farmacopea y pueden ser referidas como los ocho pasos del método de validación.

El alcance de la validación va a depender del propósito del método [18, 20]. Pruebas compendiales y procedimientos de ensayo, varían significativamente en el tipo de método analítico usado, y el tipo de información requerida para la validación de un método analítico dado va a depender de la naturaleza del método [21]. Consecuentemente, las pruebas más comunes y los procedimientos de ensayo han sido divididos dependiendo del organismo, aunque existen pequeñas diferencias entre su clasificación.

En la tabla 4 se mencionan los parámetros que se toman en cuenta para la validación.

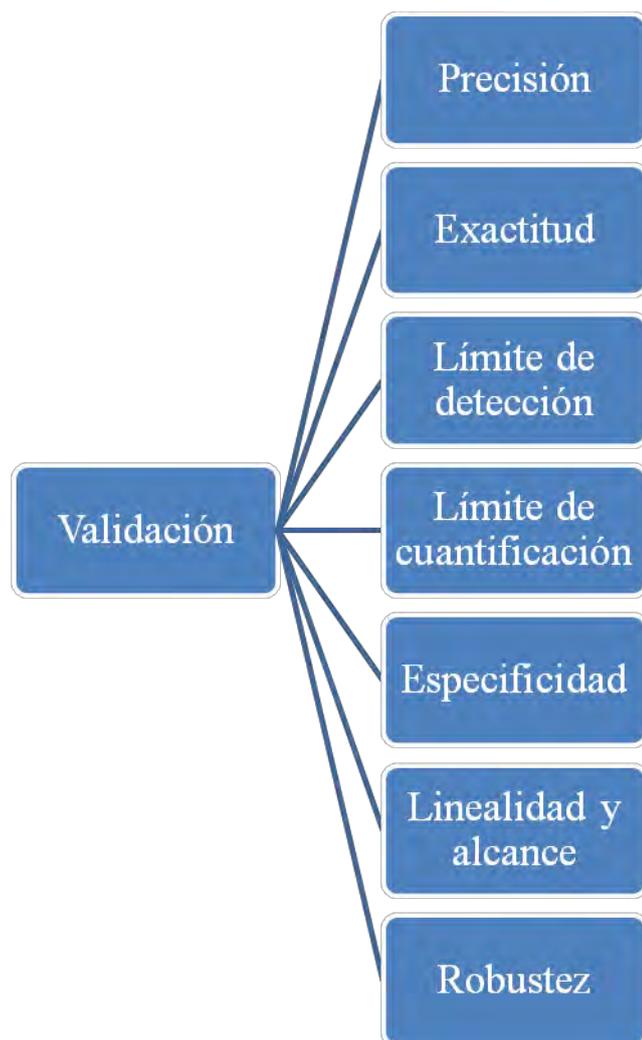


Fig. 7. Los ocho parámetros del método de validación de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

Tabla 4. Características de validación del ICH¹ de acuerdo al tipo de procedimiento analítico

| Parámetro | Identificación | Prueba para impurezas | | Ensayo |
|--------------------------|----------------|-----------------------|--------|--------|
| | | Cuantitativa | Límite | |
| Exactitud | - | + | - | + |
| Precisión | - | + | - | + |
| Repetibilidad | - | + | - | + |
| Precisión intermedia | - | + | - | + |
| Especificidad | + | + | + | + |
| Límite de detección | - | - | + | - |
| Límite de cuantificación | - | + | - | - |
| Linealidad | - | + | - | + |
| Rango | - | + | - | + |
| Robustez | - | + | - | + |

Nota: - Este parámetro no es evaluado; + Este parámetro se evalúa

¹ Conferencia Internacional de Armonización (por sus siglas en inglés). Su propósito es hacer recomendaciones para garantizar una interpretación y aplicación de guías técnicas más amplia para el registro de un producto y reducir el duplicado de pruebas durante el desarrollo de nuevos medicamentos.

5.2 Parámetros de Validación.

5.2.1 Exactitud.

Es la medida de cuán veraz es un método analítico, o la cercanía que existe entre el valor medido y el valor aceptado. La exactitud es medida como el porcentaje del analito recuperado por ensayo; las medidas se obtienen por comparación de resultados con un estándar. La exactitud se puede estimar de la siguiente forma:

$$\%recuperado = \frac{\text{cantidad recuperada}}{\text{cantidad adicionada}} * 100$$

5.2.2 Precisión.

Se refiere al grado de repetibilidad de un método analítico bajo operaciones normales y es expresado como el porcentaje relativo de la desviación estándar para un número estadístico significativo de muestras. La precisión es generalmente investigada en tres niveles:

- 5.2.2.1 *Repetibilidad.* Es una medida de la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo de tiempo corto. Esta es referida algunas veces como precisión intraensayos. Hay dos opciones permitidas por la ICH para esta prueba:
 - Un mínimo de 9 determinaciones cubriendo el rango específico para el procedimiento (por ejemplo, 3 concentraciones/ 3 réplicas).
 - Un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración de la prueba.

- 5.2.2.2 *Precisión intermedia*. Es definida como la variación dentro del mismo laboratorio. En buena medida la precisión intermedia va a depender de las circunstancias bajo las cuales el procedimiento es previsto a ser usado. Algunos parámetros que son investigados incluyen la variación de día a día, de analista a analista y la variación del equipo. La ICH recomienda reportar la desviación estándar, el coeficiente de variación y el intervalo de confianza de los datos.

- 5.2.2.3 *Reproducibilidad*. Mide la precisión entre laboratorios como en estudios de colaboración. Este parámetro debería ser considerado en la estandarización de un procedimiento analítico (por ejemplo, en la inclusión de procedimientos en farmacopeas y transferencia de métodos entre laboratorios).

5.2.3 *Especificidad*.

Es la capacidad del método analítico de obtener respuesta con exactitud y de manera específica al analito de interés en presencia de otros componentes. Es una medida del grado de interferencia de aquellas sustancias como excipientes, impurezas y productos de degradación. La especificidad es medida por la resolución, número de platos teóricos (referido a métodos donde la respuesta es un pico gaussiano).

La especificidad ha sido dividida en dos categorías separadas:

- 5.2.3.1 *Identificación*. La especificidad es demostrada por la habilidad para discriminar entre compuestos de estructuras relacionadas íntimamente, las cuales parecen estar presentes. La otra propuesta es por comparación de resultados con un material de referencia conocido.

- *Ensayo y Prueba de límites.* Para el ensayo y prueba de límites, la especificidad puede ser demostrada por la resolución de los componentes, para los métodos cromatográficos por ejemplo, en los cromatogramas obtenidos deben de estar apropiadamente etiquetados los componentes individuales de la muestra. (Para técnicas de separación, esto significa que hay una resolución > 1.5 entre el analito de interés y los interferentes).

La especificidad en un método es determinada por la comparación de los resultados de la prueba de análisis de muestras conteniendo impurezas, productos de degradación, o ingredientes de un placebo, con aquellos obtenidos del análisis de muestras sin impurezas, productos de degradación o placebo. Para el propósito de un método indicador de estabilidad, los picos de la degradación necesitan estar resueltos de los excipientes. Sin embargo, estos no necesitan estar resueltos uno de otro.

5.2.4 Límite de detección.

Se define como la más baja concentración de un analito en una muestra que puede ser detectado, aunque no necesariamente tenga que ser cuantificable. El límite de detección puede ser calculado basado en la desviación estándar (SD) de la respuesta y la pendiente (S) de la curva de calibración

$$LD = 3.3 \frac{S}{SD}$$

5.2.5 Límite de cuantificación.

Es la mínima concentración del analito en una muestra que puede ser determinada con una aceptable precisión y exactitud bajo las condiciones operacionales del método. Al igual que el LD puede ser calculado con base a la curva de calibración del analito:

$$LD = 10 \frac{S}{SD}$$

5.2.6 Linealidad y alcance

La linealidad es la capacidad del método para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del analito en un intervalo dado. Es generalmente reportada como la varianza de la pendiente de una regresión lineal.

El alcance es el intervalo entre los niveles más altos y más bajos del analito que han sido demostrados para ser determinados con precisión, exactitud, y linealidad usando el método.

5.2.7 Robustez.

Se le llama robustez a la capacidad de un método para no verse afectado por variaciones deliberadas en parámetros del método; la robustez del método es evaluada variando el pH, la fuerza iónica, la temperatura y determinando el efecto [18,19].

Capítulo 6. FASE EXPERIMENTAL

6.1 Equipo de GC utilizado

El cromatógrafo utilizado fue el que se encuentra en el laboratorio L-113 de la sección de química analítica de esta facultad, modelo Buck Scientific 910.

Dimensiones:

- 45.7x35.5x33cm
- El horno admite alcanzar una temperatura hasta de 450° C
- El sistema de ventilación permite que el horno retorne a la temperatura ambiente en menos de 5 minutos
- La exactitud de la temperatura del horno es $\pm 0.1^\circ \text{C}$ a 400° C
- Los controladores del equipo son electrónicos (presión de los gases y límite de temperatura)
- Detector de ionización de flama (FID)



Figura 8. Fotografía del cromatógrafo de gases modelo Buck Scientific 910

6.2 Optimización del método cromatográfico.

La optimización del método analítico, condiciones de reacción y cromatográficas se llevó a cabo para disminuir la cantidad de reactivos y el tiempo de análisis del C9.

6.2.1 Condiciones de reacción

Condiciones de reacción previas

- Disolver el ácido azelaico (C9, estándar o comercial) en piridina y aforar a un volumen de 5 mL
- Disolver el ácido succínico(EI) en piridina y aforar a un volumen de 5 mL
- Tomar las alícuotas correspondientes de C9, EI, BSTFA y depositarlas en el vial de reacción
- Tapar con cinta teflón y llevar el(los) vial(es) de reacción al horno a 90° C por 45 min
- A cada sistema se le extrae el contenido total con la ayuda de una pipeta pasteur y se lleva a un aforo de 2 ml de piridina.

Condiciones de reacción óptimas y válidas

- Disolver el ácido azelaico (C9 estándar o comercial) en piridina y aforar a un volumen de 5 mL
- Disolver el EI en piridina y aforar a un volumen de 5 mL
- Tomar las alícuotas correspondientes de C9, EI, BSTFA y piridina y depositarlas en el vial de reacción(volumen total: 1mL)
- Tapar con cinta teflón y llevar el(los) vial(es) de reacción al horno a 90° C por 45 min

6.2.2 Condiciones cromatográficas

Condiciones cromatográficas previas:

- Presión H₂: 21 psi
- Presión Aire: 5 psi
- Presión N₂: 5 psi
- Volumen de inyección: 1µL (manual)
- Inyector: On column
- Programa de temperatura: 100° C por 2 minutos, con una rampa de 10°C/min hasta 300° C por 5 min
- Detector: Ionización de flama (FID)
- Temperatura del detector 300° C

Condiciones cromatográficas óptimas y válidas:

- Presión H₂: 21 psi
- Presión Aire: 7 psi
- Presión N₂: 7 psi
- Flujo del gas acarreador (N₂): 13.3 mL/min
- Volumen de inyección: 1µL (manual)
- Inyector: On column
- Programa de temperatura: 100° C por 2 minutos, con una rampa de 10°C/min hasta 250° C
- Detector: Ionización de flama (FID)
- Temperatura del detector 300° C



Figura 9. Programa de temperatura empleada para la separación.

Validación del método analítico

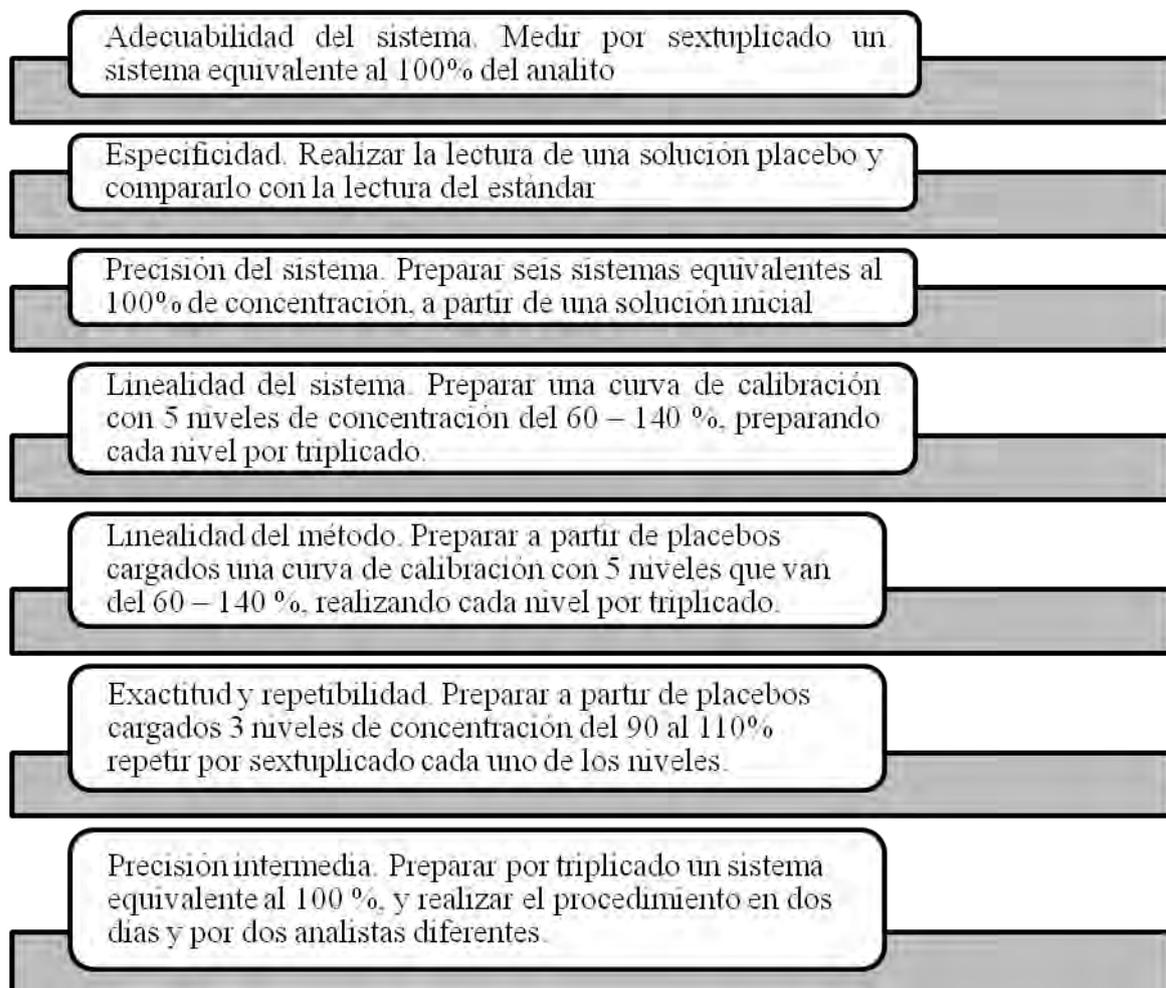


Figura 10. Validación del método analítico

6.3 Metodología experimental

6.3.1 Procedimiento general

El reactivo analítico que será el estándar interno (EI) es el ácido succínico, y el reactivo a separar y cuantificar es decir el estándar externo es el ácido azelaico (C9)

1. Solución 1 (EI).
 - a. Pesar con exactitud en un vaso de precipitados de 5 mL, 40 mg de ácido succínico (EI)
 - b. Diluir con piridina y aforar en un volumen de 5 mL
 - c. La concentración del EI es 8 mg/mL
2. Solución 2 (C9).
 - a. Pesar ácido azelaico (si es estándar se pesan 20 mg; si es formulación tópica se pesan de 125 a 150 mg) en un vaso de precipitados de 20 mL
 - b. Diluir con aproximadamente 2 mL de piridina.
 - c. Aforar en un matraz volumétrico de 5 mL, con piridina; a fin de tener una concentración de 4mg/mL
3. Solución 3
 - a. Con una micropipeta tomar 200 μ L de la solución 1 y colocarlos en un vial
 - b. Con una micropipeta tomar de 100 a 200 μ L de la solución 2 y colocarlos en el mismo vial que la solución 1
 - c. Con una micropipeta tomar 250 μ L de BSTFA y 350 μ L de piridina y colocarlos en el vial
4. Tapar el vial con cinta teflón y se lleva al horno a 90° C por 45 min
5. Inyectar en el cromatógrafo de gases

6.3.2 Adecuabilidad del sistema

1. Solución 1 (EI)
 - a. Pesar con exactitud en un vaso de precipitados de 5 mL, 40 mg de ácido succínico (EI)
 - b. Diluir con piridina y aforar en un volumen de 5 mL
 - c. La concentración del EI es 8 mg/mL
2. Solución 2 (C9)
 - a. Pesar exactitud en un vaso de precipitados de 5 mL, 20 mg de ácido azelaico (C9)
 - b. Diluir con piridina y aforar en un volumen de 5 mL
 - c. La concentración de C9 es 4 mg/mL
3. Solución 3
 - a. Con una micropipeta tomar 200 μ L de la solución 1 y colocarlos en un vial
 - b. Con una micropipeta tomar 200 μ L de la solución 2 y colocarlos en el mismo vial que la solución 1
 - c. Con una micropipeta tomar 250 μ L de BSTFA y 350 μ L de piridina y colocarlos en el vial
4. Tapar el vial con cinta teflón y se lleva al horno a 90° C por 45 min
5. Inyectar por sextuplicado en el cromatógrafo de gases

Tabla 5. Preparación de soluciones para evaluar la adecuabilidad del sistema

| Sistema | EI (μ L) | C9 (μ L) | BSTFA (μ L) | Piridina (μ L) | Vol. total (mL) | Conc (mg/mL) |
|---------|---------------|---------------|------------------|---------------------|-----------------|--------------|
| 1 | 200 | 200 | 250 | 350 | 1 | 0.8 |

6.3.3 Especificidad

1. Solución 1 (EI)
 - a. Pesar con exactitud en un vaso de precipitados de 5 mL, 40 mg de ácido succínico (EI)
 - b. Diluir con piridina y aforar en un volumen de 5 mL
 - c. La concentración del EI es 8 mg/mL
2. Solución 2
 - a. Preparar 5 ml de una solución que contenga los mismos componentes¹ que en la formulación original y en la misma proporción, a excepción del ácido azelaico
 - b. Pesar con exactitud en un vaso de precipitados de 5 mL 125 mg de placebo
 - c. Diluir con piridina y aforar en un volumen de 5 mL
3. Solución 3
 - a. Con una micropipeta tomar 160 μ L de la solución 1 y colocarlos en un vial
 - b. Con una micropipeta tomar 200 μ L de la solución 2 y colocarlos en el mismo vial que la solución 1
 - c. Con una micropipeta tomar 250 μ L de BSTFA y 590 μ L de piridina y colocarlos en el vial
4. Tapar el vial con cinta teflón y se lleva al horno a 90° C por 45 min
5. Inyectar en el cromatógrafo de gases

Tabla 6. Preparación de soluciones para evaluar la especificidad del sistema

| Sistema | EI (μ L) | Placebo (μ L) | BSTFA (μ L) | Piridina (μ L) | Vol. total (mL) |
|---------|---------------|--------------------|------------------|---------------------|-----------------|
| 1 | 200 | 160 | 250 | 590 | 1 |

¹ Nota. El placebo fue proporcionado por los laboratorios Darier y los excipientes que contiene son: Lecitina, triglicéridos (de cadena media), polisorbato 80, propilenglicol, carbómero 980, hidróxido de sodio, sal disódica de EDTA, agua purificada, ácido benzoico (E-210)

6.3.4 Precisión del sistema

1. Solución 1 (EI)
 - a. Pesar con exactitud en un vaso de precipitados de 5 mL, 40 mg de ácido succínico
 - b. Diluir con piridina y aforar en un volumen de 5 mL
 - c. La concentración del EI es 8 mg/mL
2. Solución 2 (C9)
 - a. Pesar exactitud en un vaso de precipitados de 5 mL, 20 mg de ácido azelaico
 - b. Diluir con piridina y aforar en un volumen de 5 mL
 - c. La concentración de C9 es 4 mg/mL
3. Solución 3
 - a. Con una micropipeta tomar 200 μ L de la solución 1 y colocarlos en un vial
 - b. Con una micropipeta tomar 200 μ L de la solución 2 y colocarlos en el mismo vial que la solución 1
 - c. Con una micropipeta tomar 250 μ L de BSTFA y 350 μ L de piridina y colocarlos en el vial
4. Realizar por sextuplicado del paso 3
5. Tapar los viales con cinta teflón y se llevan al horno a 90° C por 45 min
6. Inyectar en el cromatógrafo de gases

Tabla 7. Preparación de soluciones para evaluar la precisión del sistema

| Sistema | EI (μ L) | C9 (μ L) | BSTFA (μ L) | Piridina (μ L) | Vol. total (mL) | Conc (mg/mL) |
|---------|---------------|---------------|------------------|---------------------|-----------------|--------------|
| 1 | 200 | 200 | 250 | 350 | 1 | 0.8 |
| 2 | 200 | 200 | 250 | 350 | 1 | 0.8 |
| 3 | 200 | 200 | 250 | 350 | 1 | 0.8 |
| 4 | 200 | 200 | 250 | 350 | 1 | 0.8 |
| 5 | 200 | 200 | 250 | 350 | 1 | 0.8 |
| 6 | 200 | 200 | 250 | 350 | 1 | 0.8 |

6.3.5 Linealidad del sistema

1. Solución 1 (EI)
 - a. Pesar con exactitud en un vaso de precipitados de 5 mL 40 mg de ácido succínico
 - b. Diluir con piridina y aforar en un volumen de 5 mL, la concentración del EI es 8 mg/mL
2. Solución 2 (C9)
 - a. Pesar exactitud en un vaso de precipitados de 5 mL 20 mg de ácido azelaico (*estándar*)
 - b. Diluir con piridina y aforar en un volumen de 5 mL, la concentración de C9 es 4 mg/mL
3. Con una micropipeta tomar 100 μ L de la solución 1 y colocarlos en un vial *sist1*
4. Con una micropipeta tomar 150 μ L de la solución 1 y colocarlos en un vial *sist2*
5. Con una micropipeta tomar 200 μ L de la solución 1 y colocarlos en un vial *sist3*
6. Con una micropipeta tomar 250 μ L de la solución 1 y colocarlos en un vial *sist4*
7. Con una micropipeta tomar 300 μ L de la solución 1 y colocarlos en un vial *sist5*
8. A cada sistema (1-5) agregar con una micropipeta 200 μ L de la solución 2
9. Con una micropipeta tomar 250 μ L de BSTFA y 350 μ L de piridina y colocarlos en el vial y agregarlos en los viales de los sistemas (1-5)
10. Tapar los viales con cinta teflón y se llevan al horno a 90° C por 45 min
11. Medir los cinco sistemas por triplicado en el cromatógrafo de gases

Tabla 8. Preparación de soluciones para evaluar la linealidad del sistema

| Sistema | EI (μ L) | C9 (μ L) | BSTFA (μ L) | Piridina (μ L) | Vol. total (mL) | Conc (mg/mL) |
|---------|---------------|---------------|------------------|---------------------|-----------------|--------------|
| 1 | 100 | 200 | 250 | 450 | 1 | 0.4 |
| 2 | 150 | 200 | 250 | 400 | 1 | 0.6 |
| 3 | 200 | 200 | 250 | 350 | 1 | 0.8 |
| 4 | 250 | 200 | 250 | 300 | 1 | 1.0 |
| 5 | 300 | 200 | 250 | 250 | 1 | 1.2 |

6.4.6 Linealidad del método

1. Solución 1 (EI)
 - a. Pesar con exactitud en un vaso de precipitados de 5 mL 40 mg de ácido succínico
 - b. Diluir con piridina y aforar en un volumen de 5 mL, la concentración del EI es 8 mg/mL
2. Solución 2
 - a. Pesar con exactitud en un vaso de precipitados de 5 mL 125 mg de placebo
 - b. Agregar al vaso de precipitados anterior 25 mg de estándar de C9
 - c. Diluir con piridina y aforar en un volumen de 5 mL
3. Con una micropipeta tomar 130 μ L de la solución 2 y colocarlos en un vial *sist1*
4. Con una micropipeta tomar 145 μ L de la solución 2 y colocarlos en un vial *sist2*
5. Con una micropipeta tomar 160 μ L de la solución 2 y colocarlos en un vial *sist3*
6. Con una micropipeta tomar 175 μ L de la solución 2 y colocarlos en un vial *sist4*
7. Con una micropipeta tomar 190 μ L de la solución 2 y colocarlos en un vial *sist5*
8. A cada sistema (1-5) agregar con una micropipeta 200 μ L de la solución 1
9. Con una micropipeta tomar 250 μ L de BSTFA y 350 μ L de piridina y colocarlos en el vial y agregarlos en los viales de los sistemas (1-5)
10. Tapar los viales con cinta teflón y se llevan al horno a 90° C por 45 min
11. Inyectar los cinco sistemas por triplicado en el cromatógrafo de gases

Tabla 9. Preparación de soluciones para evaluar la linealidad del método

| Sistema | EI (μ L) | Placebo cargado (μ L) | BSTFA (μ L) | Piridina (μ L) | Vol. total (mL) | Conc (mg/mL) | % |
|---------|---------------|----------------------------|------------------|---------------------|-----------------|--------------|---------|
| 1 | 200 | 130 | 250 | 420 | 1 | 0.650 | 81.25 |
| 2 | 200 | 145 | 250 | 405 | 1 | 0.725 | 90.625 |
| 3 | 200 | 160 | 250 | 390 | 1 | 0.800 | 100 |
| 4 | 200 | 175 | 250 | 375 | 1 | 0.875 | 109.375 |
| 5 | 200 | 190 | 250 | 360 | 1 | 0.95 | 119.75 |

6.4.7 Exactitud y repetibilidad

1. Solución 1 (EI)
 - a. Pesar con exactitud en un vaso de precipitados de 5 mL 40 mg de ácido succínico
 - b. Diluir con piridina y aforar en un volumen de 5 mL, la concentración del EI es 8 mg/mL
2. Solución 2 (C9)
 - a. Pesar con exactitud en un vaso de precipitados de 5 mL 125 mg de placebo
 - b. Agregar al vaso de precipitados anterior 25 mg de estándar de C9
 - c. Diluir con piridina y aforar en un volumen de 5 mL
3. Con una micropipeta tomar 145 μ L de la solución 2 y colocarlos en un vial *sist1*
4. Con una micropipeta tomar 160 μ L de la solución 2 y colocarlos en un vial *sist2*
5. Con una micropipeta tomar 175 μ L de la solución 2 y colocarlos en un vial *sist3*
6. A cada sistema (1-3) agregar con una micropipeta 200 μ L de la solución 1
7. Con una micropipeta tomar 250 μ L de BSTFA y 350 μ L de piridina y colocarlos en el vial y agregarlos en los viales de los sistemas (1-3)
8. Tapar los viales con cinta teflón y se llevan al horno a 90° C por 45 min
9. Medir los tres sistemas por sextuplicado en el cromatógrafo de gases

Tabla 10. Preparación de soluciones para evaluar la exactitud y repetibilidad del sistema

| Sistema | EI (μ L) | Placebo cargado (μ L) | BSTFA (μ L) | Piridina (μ L) | Vol. total (mL) | Conc (mg/mL) | % |
|---------|---------------|----------------------------|------------------|---------------------|-----------------|--------------|---------|
| 1 | 200 | 145 | 250 | 405 | 1 | 0.725 | 90.625 |
| 2 | 200 | 160 | 250 | 390 | 1 | 0.8 | 100 |
| 3 | 200 | 175 | 250 | 375 | 1 | 0.875 | 109.375 |

6.4.8 Precisión intermedia

1. Solución 1 (EI)
 - a. Pesar con exactitud en un vaso de precipitados de 5 mL 40 mg de ácido succínico
 - b. Diluir con piridina y aforar en un volumen de 5 mL, la concentración del EI es 8 mg/mL
2. Solución 2 (C9)
 - a. Pesar con exactitud en un vaso de precipitados de 5 mL 125 mg de placebo
 - b. Agregar al vaso de precipitados anterior 25 mg de estándar de C9
 - c. Diluir con piridina y aforar en un volumen de 5 mL
3. Con una micropipeta tomar 160 μ L de la solución 2 y colocarlos en un vial *sist1*
4. Con una micropipeta tomar 160 μ L de la solución 2 y colocarlos en un vial *sist2*
5. Con una micropipeta tomar 160 μ L de la solución 2 y colocarlos en un vial *sist3*
6. A cada sistema (1-3) agregar con una micropipeta 200 μ L de la solución 1
7. Con una micropipeta tomar 250 μ L de BSTFA y 350 μ L de piridina y colocarlos en el vial y agregarlos en los viales de los sistemas (1-3)
8. Tapar los viales con cinta teflón y se llevan al horno a 90° C por 45 min
9. Inyectar los tres sistemas por triplicado en el cromatógrafo de gases en dos días distintos y por dos diferentes analistas

Tabla 11. Preparación de soluciones para evaluar la precisión intermedia

| Sistema | EI (μ L) | Placebo cargado (μ L) | BSTFA (μ L) | Piridina (μ L) | Vol. total (mL) | Conc (mg/mL) | % |
|---------|---------------|----------------------------|------------------|---------------------|-----------------|--------------|-----|
| 1 | 200 | 160 | 250 | 390 | 1 | 0.8 | 100 |
| 2 | 200 | 160 | 250 | 390 | 1 | 0.8 | 100 |
| 3 | 200 | 160 | 250 | 390 | 1 | 0.8 | 100 |

6.4.9 Muestras comerciales

1. Solución A.
 - a. Pesar con exactitud 125 mg de muestra comercial en un vaso de precipitados de 10 ml
 - b. Diluir con piridina y aforar en un matraz volumétrico de 5 mL
2. Solución B
 - a. Pesar con exactitud 40 mg de EI en un vaso de precipitados de 10 mL
 - b. Diluir con piridina y aforar en un matraz volumétrico de 5 mL
3. Solución C
 - a. En un vial de reacción tomar 160 μ L de soln. A con una micropipeta
 - b. Tomar 200 μ L de soln. B con una micropipeta y colocarlos junto la soln. C
 - c. Agregar a la soln. C 250 μ L de BSTFA
 - d. Agregar a la soln C 390 μ L de piridina
4. Tapar el vial con cinta teflón y colocarlo en el horno a 90° C por 45 min.
5. Inyectar por triplicado en el cromatógrafo (1 μ L)

Tabla 12. Preparación de solución C para evaluar las muestras comerciales

| EI (μ L) | C9 (μ L) | BSTFA (μ L) | Piridina (μ L) | Vol. total (mL) |
|------------------|------------------|---------------------|------------------------|--------------------|
| 200 | 160 | 250 | 390 | 1 |



Capítulo 7. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

7.1 Optimización de condiciones experimentales

La optimización de las condiciones de reacción consistió en la reducción de la cantidad por reactivos, evitando un segundo aforo como previamente se realizaba [7], disminuyendo así el error por pérdida de materia.

Por otro lado, se optimizaron las condiciones cromatográficas aumentando la presión de N₂ de 5 a 7 psi y con un programa de temperatura de 100° C por 2 min con una rampa de 10°C/min hasta 250° C disminuye el tiempo de análisis.

| | Original | Óptimo |
|------------------|----------|--------|
| T análisis (min) | 30 | 20 |

7.1.1 Estudio de ácidos carboxílicos como interferencia o producto de degradación.

Se analizó el cromatograma de la mezcla de estándares de ácidos dicarboxílicos derivatizados (C7 – C10) en su forma de trimetilsilil (figura 11), así como los cromatogramas de las muestras farmacéuticas comerciales a analizar y se obtuvieron los siguientes resultados en los tiempos de retención:

Tabla 13. Tiempos de retención promedio de los estándares de ácidos dicarboxílicos derivatizados

| Derivado de ácido | Tiempo de retención promedio(min) |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| Succínico (C4) ¹ | 7.866 |
| Pimélico (C7) | 11.900 |
| Subérico (C8) | 13.100 |
| Azelaico (C9) | 14.133 |
| Sebásico (C10) | 15,416 |

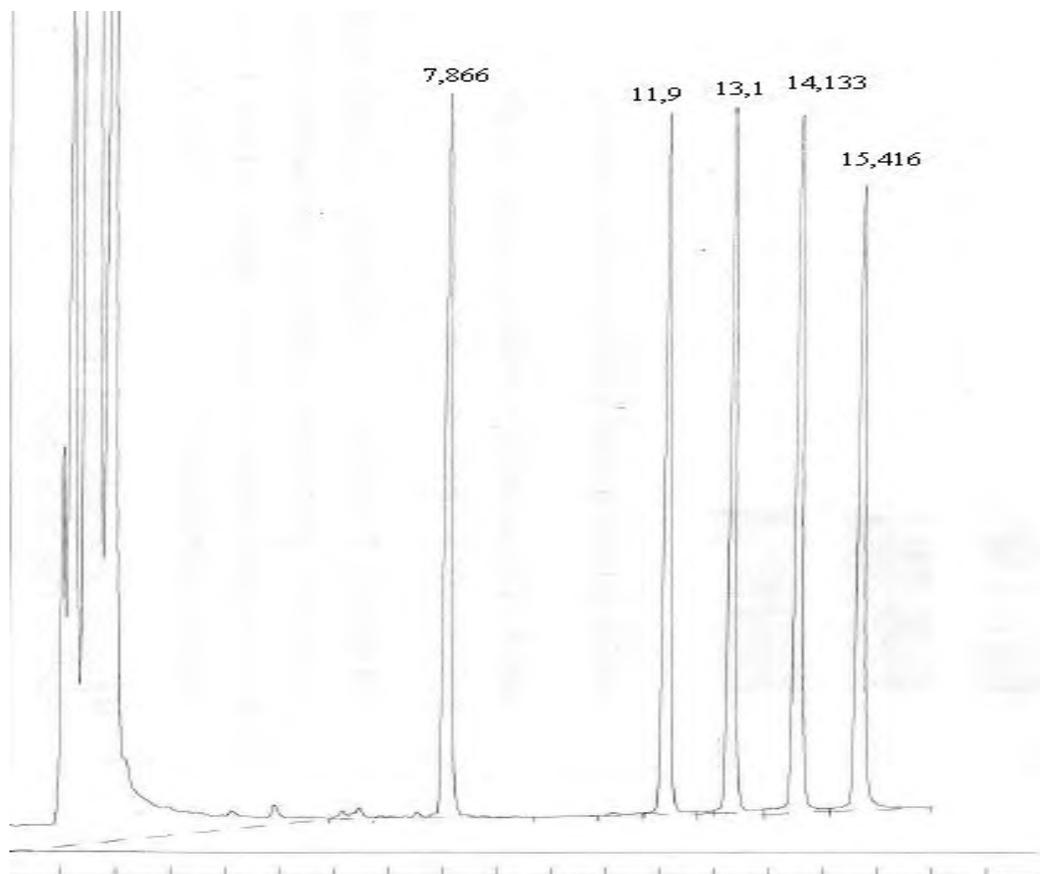


Figura 11. Cromatograma de estándares (C7 – C10) derivatizados

¹ Estándar Interno

Tabla 14. Tiempos de retención promedio de las muestras farmacéuticas comerciales

| Derivado de ácido | Tiempo de retención promedio (min) |
|-------------------|------------------------------------|
| Succínico (C4) | 7.95 |
| Azelaico (C9) | 14.2 |

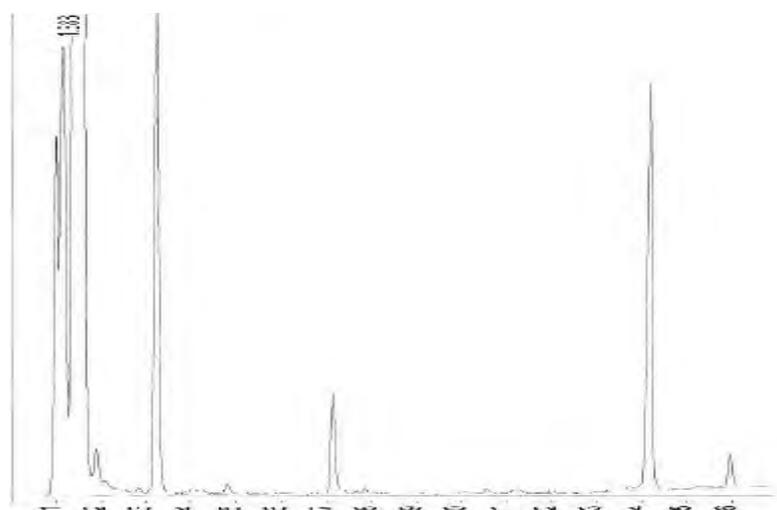


Figura 12. Cromatograma de muestra comercial derivatizada.

Previo a la validación del método analítico, se estudió si existían compuestos homólogos o de degradación en las muestras comerciales y en el placebo, y como se observó en los cromatogramas no se tuvo algún analito presente en las formulaciones farmacéuticas y en placebo que pudieran interferir con el análisis del C9. En la tabla 13 se observan los tiempos de retención de los ácidos dicarboxílicos similares al C9 (C7,C8,C10) en su forma derivatizada de trimetilsilil y se comparan con los tiempos de retención reportados en la tabla 14, se aprecia que no hay interferencia de estos compuestos en su análisis. Con esto se puede deducir que los productos comerciales no son adulterados con ningún compuesto parecido y tampoco se han degradado.

7.2 Adecuabilidad del sistema

Esta prueba es la única reportada en la guía de validación de métodos analíticos, recomendada para todos éstos, ya que permite verificar que el sistema de medición funciona apropiadamente, independientemente de las condiciones ambientales.

Por lo mencionado anteriormente, esta prueba es importante y se evaluó en primer lugar. Para evaluar la adecuabilidad del sistema, se inyectó por sextuplicado una solución con una concentración de 8 mg/ml de C9 correspondiente al 100% de la concentración del analito en la muestra.

Como se muestra en la tabla 15 el CV es menor al 2% tanto en tiempos de retención y en la relación del área del ácido azelaico con respecto al ácido succínico C9/EI.

Además, los picos presentan una muy buena resolución de 12 la cuál es ampliamente mayor a 1,5 que es el valor mínimo recomendado para picos gaussianos, lo que significa una buena separación de los componentes de la mezcla, y el número de platos teóricos también son valores altos tanto para el C9 como para el EI, que indican una alta eficiencia en el proceso cromatográfico (Ver tabla 15A).

Tabla 15. Resultados obtenidos para la evaluación de adecuabilidad del sistema para C9

| Corrida | Sistema | Tr EI | Tr C9 | Área EI | Área C9 | A C9/A EI |
|---------|-----------------|-------|--------|-----------|----------|-----------|
| 1 | 1 | 7,866 | 14,133 | 10128,912 | 7661,792 | 0,756 |
| 2 | 2 | 7,883 | 14,150 | 9915,418 | 7511,403 | 0,758 |
| 3 | 3 | 7,866 | 14,133 | 10290,342 | 7785,927 | 0,757 |
| 4 | 4 | 7,866 | 14,133 | 9929,065 | 7691,603 | 0,775 |
| 5 | 5 | 7,816 | 14,083 | 9980,404 | 7641,550 | 0,766 |
| 6 | 6 | 7,866 | 14,133 | 9761,298 | 7207,505 | 0,738 |
| | Promedio | 7,861 | 14,128 | | | 0,758 |
| | Desvest | 0,023 | 0,023 | | | 0,012 |
| | CV (%) | 0,291 | 0,162 | | | 1,589 |

Tabla 15A. Resultados de resolución y platos teóricos para la evaluación de adecuabilidad del sistema para C9

| | EI | C9 |
|----------------------|-----------|-----------|
| N² | 18583 | 79240 |
| R³ | 12 | |

7.3 Especificidad

La determinación de la especificidad del método confirma que la medida de la señal es debida solamente al analito. En la guía de validación se indica, que para métodos de contenido / potencia / valoración, se deben analizar placebos del producto, muestras del producto, y cuando proceda: sustancias relacionadas, precursores, homólogos y una mezcla del producto con ellos o cualquiera de ellos.

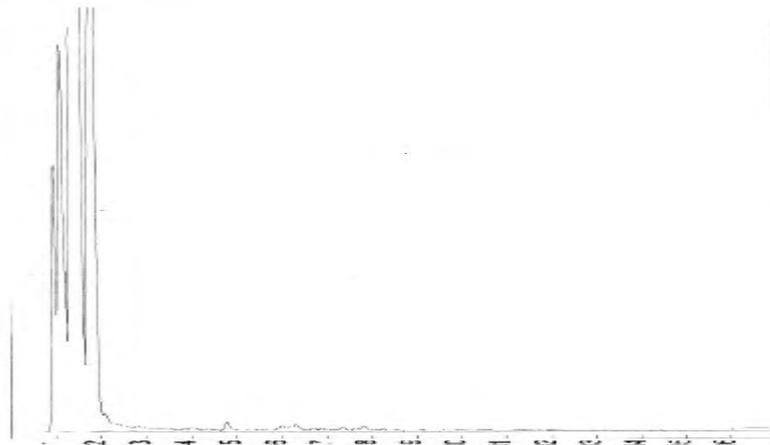


Figura 13. Cromatograma del blanco (piridina + BSTFA)

² N: Numero de platos teóricos (proporcionados por el computador del equipo)

³ R: Resolución entre picos (obtenidos mediante fórmula)

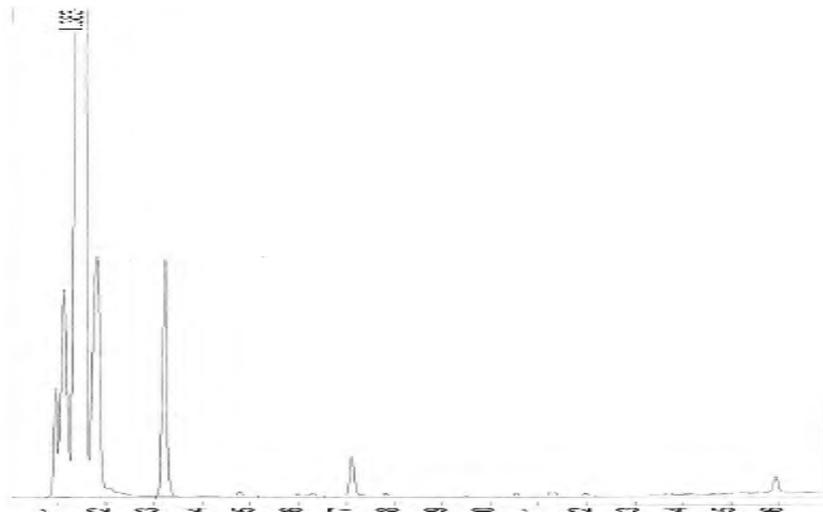


Figura 14. Cromatograma de una muestra de placebo derivatizado

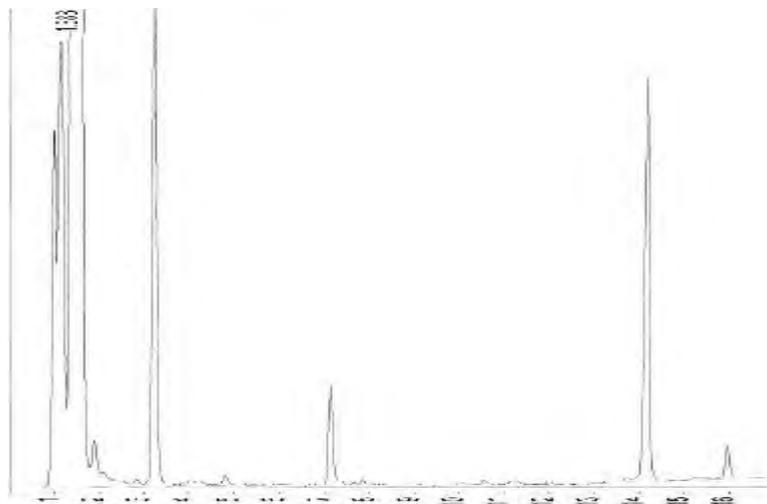


Figura 15. Cromatograma de una muestra de placebo fortificado con C9 derivatizado

En un primer estudio se analizó la piridina con BSTFA (figura 11), posteriormente se analizó el placebo con BSTFA (figura 12) y se advierte que no hay señal en el tiempo de retención en las señales del EI y del C9; en el último estudio donde se analizó el placebo cargado con C9 (figura 13) se observan los tiempos de retención del analito y del EI. Con todo esto se confirma que la señal cromatográfica es solo generada por el EI y el C9 derivatizados en su forma de trimetilsilil. Por lo que el método es específico para valorar el contenido de los analitos en la forma farmacéutica mencionada.

7.4 Precisión del sistema

Este parámetro indica el grado de dispersión entre una serie de mediciones bajo condiciones establecidas, y de acuerdo con los criterios de aceptación, en la tabla 16 se observa que el coeficiente de variación de la relación de áreas entre el valor de C9 y el valor de EI se encuentra dentro de los límites de aceptación, por lo que se considera que el método es preciso.

Tabla 16. Datos obtenidos para la evaluación de la precisión del sistema para C9

| Corrida | Sistema | Tr EI | Tr C9 | Área EI | Área C9 | $\frac{A_{C9}}{A_{EI}}$ |
|---------|-----------------|-------|--------|-----------|----------|-------------------------|
| 1 | 100% | 7,866 | 14,133 | 10390,342 | 7785,927 | 0,749 |
| 2 | 100% | 7,866 | 14,133 | 10128,912 | 7661,792 | 0,756 |
| 3 | 100% | 7,866 | 14,133 | 9761,298 | 7207,505 | 0,738 |
| 4 | 100% | 7,866 | 14,133 | 10204,326 | 7679,436 | 0,753 |
| 5 | 100% | 7,866 | 14,133 | 10029,065 | 7691,603 | 0,767 |
| 6 | 100% | 7,866 | 14,133 | 10024,063 | 7575,093 | 0,756 |
| | Promedio | 7,866 | 14,133 | | | 0,753 |
| | Desvest | 0 | 0 | | | 0,009 |
| | CV (%) | 0 | 0 | | | 1,246 |

7.5 Linealidad del sistema

La evaluación de la linealidad puede ser describe como la caracterización de una curva de respuesta. Una gráfica de la respuesta en función de la concentración del analito, frecuentemente se espera que sea lineal en un rango específico de concentraciones.

Tabla 17. Datos obtenidos para la evaluación de la linealidad del sistema para C9

| Nivel (%) | Tr EI | Tr C9 | A EI | A C9 | A EI/A C9 | C9 (mg/ml) | EI (mg/ml) | C9/EI |
|-----------------|-------|--------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|-------|
| 50 | 7,783 | 14,066 | 11343,669 | 4137,005 | 0,365 | 0,4 | 0,8 | 0,5 |
| | 7,833 | 14,100 | 10573,246 | 3883,872 | 0,367 | 0,4 | 0,8 | 0,5 |
| | 7,850 | 14,116 | 10281,823 | 3761,793 | 0,366 | 0,4 | 0,8 | 0,5 |
| 75 | 7,850 | 14,116 | 10347,946 | 5696,403 | 0,550 | 0,6 | 0,8 | 0,75 |
| | 7,883 | 14,150 | 10224,397 | 5655,424 | 0,553 | 0,6 | 0,8 | 0,75 |
| | 7,866 | 14,133 | 10456,199 | 5698,768 | 0,545 | 0,6 | 0,8 | 0,75 |
| 100 | 7,966 | 14,383 | 11379,580 | 8698,330 | 0,764 | 0,8 | 0,8 | 1 |
| | 7,866 | 14,133 | 11300,449 | 8424,257 | 0,745 | 0,8 | 0,8 | 1 |
| | 7,866 | 14,133 | 10559,055 | 8044,708 | 0,762 | 0,8 | 0,8 | 1 |
| 125 | 7,883 | 14,150 | 10045,603 | 9152,382 | 0,911 | 1 | 0,8 | 1,25 |
| | 7,933 | 14,283 | 10099,790 | 9259,075 | 0,917 | 1 | 0,8 | 1,25 |
| | 7,900 | 14,166 | 10046,572 | 9426,873 | 0,938 | 1 | 0,8 | 1,25 |
| 150 | 8,000 | 14,500 | 10548,258 | 11574,375 | 1,097 | 1,2 | 0,8 | 1,5 |
| | 8,016 | 14,550 | 10202,825 | 11139,433 | 1,092 | 1,2 | 0,8 | 1,5 |
| | 8,066 | 14,716 | 10250,048 | 11385,815 | 1,111 | 1,2 | 0,8 | 1,5 |
| Promedio | 7,904 | 14,246 | | | | | | |
| Desvest | 0,077 | 0,198 | | | | | | |
| CV (%) | 0,977 | 1,390 | | | | | | |

Tabla 17A. Resultados obtenidos para la evaluación de la linealidad del sistema para C9

| A EI/A C9 | CC9 CEI | AC9 AEI Conc ConcEI |
|------------------|--------------------|--|
| 0,365 | 0,5 | 0,729 |
| 0,367 | 0,5 | 0,735 |
| 0,366 | 0,5 | 0,732 |
| 0,550 | 0,75 | 0,734 |
| 0,553 | 0,75 | 0,738 |
| 0,545 | 0,75 | 0,727 |
| 0,764 | 1 | 0,764 |
| 0,745 | 1 | 0,745 |
| 0,762 | 1 | 0,762 |
| 0,911 | 1,25 | 0,729 |
| 0,917 | 1,25 | 0,733 |
| 0,938 | 1,25 | 0,751 |
| 1,097 | 1,5 | 0,732 |
| 1,092 | 1,5 | 0,728 |
| 1,111 | 1,5 | 0,741 |
| | Promedio | 0,739 |
| | Desv est | 0,012 |
| | CV (%) | 1,619 |

La pendiente de la recta se refiere al factor respuesta, en este caso con un valor de 0,736

que es la relación de la división de las áreas ($\frac{A_{C9}}{A_{EI}}$) y la división de las concentraciones de los analitos ($\frac{C_{C9}}{C_{EI}}$), así, el factor de respuesta será constante cualesquiera que sean los valores de los pares de relación de áreas – relación de concentración, además el CV obtenido de cada valor a partir de la relación de la desviación estándar (DesvEst) con respecto a la media aritmética es menor a 2.

En la figura 13 se puede apreciar que efectivamente hay una respuesta lineal directamente proporcional a la concentración.

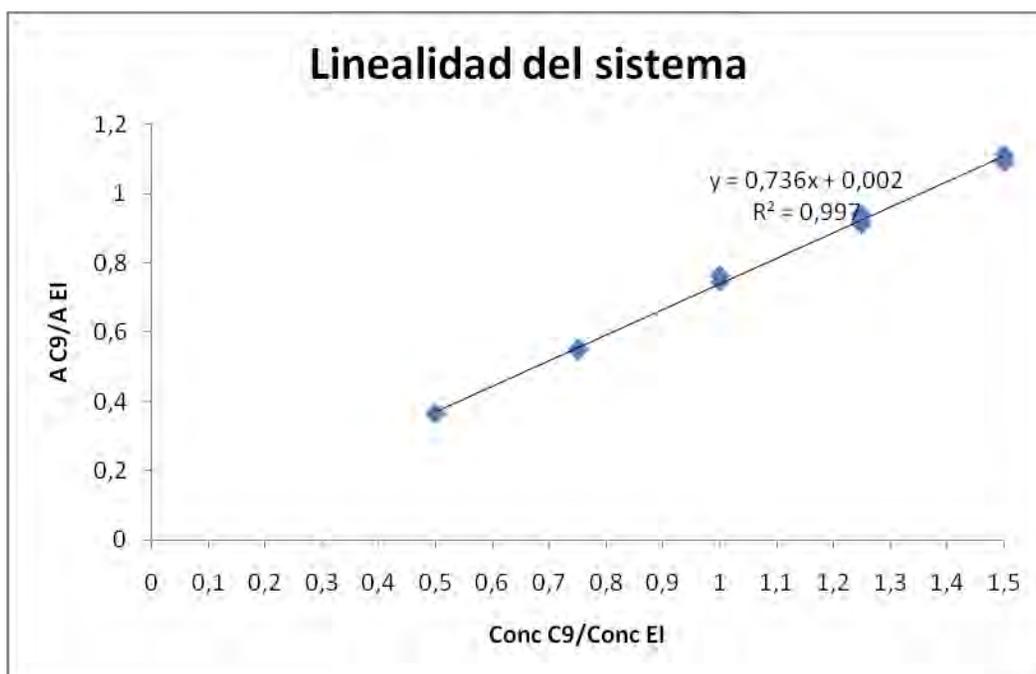


Figura 16. Curva de calibración de C9 con EI por GC

Las pruebas para que se considere lineal son el factor de determinación que como se observa en el gráfico es de 0,997; lo que quiere decir que el modelo se ajusta prácticamente a una línea recta.

Tabla 18. Parámetros estadísticos para la linealidad del sistema de C9 por GC

| Parámetros | C9 |
|----------------------|----------------|
| R | 0,999 |
| R ² | 0,998 |
| Pendiente (m) | 0,736 |
| Ordenada (b) | 0,003 |
| IC (β ₁) | 0,716 - 0,757 |
| IC (β ₀) | -0,019 - 0,024 |

El ANOVA en un experimento diseñado ayuda a determinar qué factores son importantes, usándose el de regresión para construir un modelo cuantitativo que relaciona los factores importantes con la respuesta.

Al realizar un análisis de regresión se desea determinar la relación entre una sola variable de regresión x y la respuesta y . Usualmente se supone que la variable de regresión x es continua y controlable por el experimentador. En este caso, las variables independientes son las concentraciones de C9 y del EI y la dependiente o respuesta la relación de áreas de los picos.

Para establecer hipótesis relacionadas con la significación de la regresión, se debe proponer que:

H_0 : Los datos no se ajustan a un modelo lineal.

H_a : Los datos se ajustan a un modelo lineal

$$F_{\text{Calc}} < F_{\text{Crit}}$$

Tabla 19. ANOVA realizado para determinar la linealidad del sistema de C9 considerando un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

| | <i>G.L.</i> | <i>S.C.</i> | <i>C.M.</i> | <i>F</i> | <i>Valor crítico de F</i> |
|------------------|-------------|-------------|-------------|----------|---------------------------|
| Regresión | 1 | 1,016 | 1,016 | 6093,047 | 9,3372E-19 |
| Residuos | 13 | 0,002 | 0,0001668 | | |
| Total | 14 | 1,018 | | | |

El ANOVA muestra que el valor de F crítica es menor que el valor de F calculada, por lo que se rechaza la hipótesis nula. Comprobando que la relación que existe entre la concentración versus área es lineal para el C9.

Con el valor de porcentaje del error relativo se demuestra la existencia de tendencia en los datos. En una situación ideal implica que no exista tendencia alguna entre los datos. En este caso particular se corrobora que no hay tendencia; esto se sabe porque los datos trazados en el gráfico muestra que el error es aleatorio por la lejanía que existe entre cada punto.

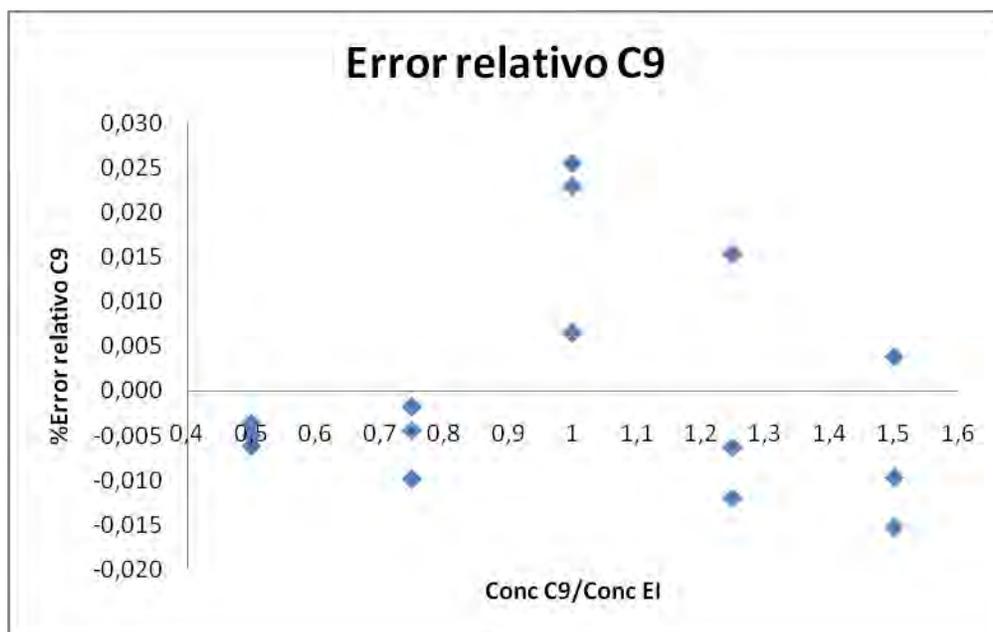


Figura 17. Gráfico de porcentaje de error relativo de C9 en función de la concentración adicionada

7.6 Exactitud y repetibilidad

En la tabla 20 se observa que el promedio aritmético del porcentaje de recobro para C9 se encuentra dentro del intervalo establecido; así mismo el coeficiente de variación del porcentaje de recobro es menor al 2% y el intervalo de confianza del porcentaje incluye el 100%.

Con los resultados obtenidos, se determinó que el método cumple con los criterios establecidos en la guía de validación por lo que es exacto.

Tabla 20. Datos obtenidos para la evaluación de la exactitud y repetibilidad del método para C9

| Nivel (%) | Tr EI | Tr C9 | A EI/A C9 | Cant rec | Cant ad | % |
|------------------------------|-------|--------|-----------|----------|---------|---------------|
| 90,25 | 7,866 | 14,133 | 0,681 | 0,737 | 0,725 | 101,703 |
| | 7,866 | 14,133 | 0,652 | 0,705 | 0,725 | 97,291 |
| | 7,883 | 14,133 | 0,673 | 0,729 | 0,725 | 100,507 |
| | 7,900 | 14,150 | 0,668 | 0,723 | 0,725 | 99,740 |
| | 7,900 | 14,166 | 0,682 | 0,738 | 0,725 | 101,775 |
| | 7,916 | 14,166 | 0,659 | 0,713 | 0,725 | 98,356 |
| 100 | 7,900 | 14,166 | 0,723 | 0,783 | 0,8 | 97,900 |
| | 7,916 | 14,183 | 0,730 | 0,790 | 0,8 | 98,788 |
| | 7,916 | 14,183 | 0,748 | 0,810 | 0,8 | 101,272 |
| | 7,933 | 14,200 | 0,734 | 0,795 | 0,8 | 99,320 |
| | 7,916 | 14,183 | 0,737 | 0,797 | 0,8 | 99,671 |
| | 7,933 | 14,200 | 0,739 | 0,800 | 0,8 | 100,016 |
| 109,75 | 7,900 | 14,166 | 0,799 | 0,865 | 0,875 | 98,828 |
| | 7,883 | 14,150 | 0,800 | 0,867 | 0,875 | 99,032 |
| | 7,900 | 14,166 | 0,816 | 0,884 | 0,875 | 101,031 |
| | 7,916 | 14,183 | 0,809 | 0,876 | 0,875 | 100,096 |
| | 7,916 | 14,183 | 0,791 | 0,857 | 0,875 | 97,943 |
| | 7,933 | 14,183 | 0,812 | 0,880 | 0,875 | 100,534 |
| Promedio | 7,905 | 14,168 | | | | 99,656 |
| Desvest | 0,021 | 0,021 | | | | 1,296 |
| CV (%) | 0,261 | 0,151 | | | | 1,301 |
| IC (μ) | | | | | | 99,01 – 100,3 |

7.7 Linealidad del método

En la tabla 21 se observa que el coeficiente de variación del promedio aritmético del porcentaje de recobro dentro del intervalo del 80 al 120 % es menor al 2 %. Por lo que inicialmente cumple con este parámetro.

Tabla 21. Datos obtenidos para la evaluación de la linealidad del método para C9

| Nivel (%) | Tr EI | Tr C9 | AC9/AEI | Cantidad recuperada (µg) | Cantidad adicionada (µg) | % |
|------------------|--------------|---------------|----------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| 81,25 | 8,016 | 14,683 | 0,597 | 0,645 | 0,65 | 99,299 |
| | 8,266 | 15,300 | 0,590 | 0,638 | 0,65 | 98,193 |
| | 7,866 | 14,200 | 0,605 | 0,654 | 0,65 | 100,654 |
| 90,625 | 7,833 | 14,100 | 0,668 | 0,723 | 0,725 | 99,672 |
| | 7,850 | 14,116 | 0,670 | 0,726 | 0,725 | 100,077 |
| | 7,850 | 14,116 | 0,663 | 0,717 | 0,725 | 98,951 |
| 100 | 7,866 | 14,133 | 0,738 | 0,799 | 0,8 | 99,895 |
| | 8,133 | 14,950 | 0,745 | 0,807 | 0,8 | 100,882 |
| | 8,133 | 14,916 | 0,731 | 0,791 | 0,8 | 98,864 |
| 109,375 | 7,950 | 14,383 | 0,807 | 0,874 | 0,875 | 99,854 |
| | 7,883 | 14,166 | 0,812 | 0,879 | 0,875 | 100,447 |
| | 7,883 | 14,150 | 0,811 | 0,878 | 0,875 | 100,353 |
| 118,75 | 7,983 | 14,500 | 0,863 | 0,934 | 0,95 | 98,361 |
| | 8,000 | 14,500 | 0,885 | 0,959 | 0,95 | 100,931 |
| | 7,883 | 14,150 | 0,862 | 0,934 | 0,95 | 98,313 |
| Promedio | <i>7,960</i> | <i>14,424</i> | | | | <i>99,745</i> |
| Desvest | <i>0,129</i> | <i>0,379</i> | | | | <i>0,897</i> |
| CV (%) | <i>1,626</i> | <i>2,03</i> | | | | <i>0,900</i> |
| IC(µ) | | | | | | <i>99,25 – 100,24</i> |

Asimismo se realizó un gráfico cantidad adicionada vs cantidad recuperada, el cual se muestra en la figura 18. Idealmente la pendiente de la regresión debe ser de 1 y la ordenada al origen debe ser 0. Sin embargo esto nunca ocurre en la práctica, aun si los errores sistemáticos están ausentes, la presencia de errores aleatorios conduce a tener una

dispersión de los puntos alrededor de la línea del cuadrado medio y pequeñas desviaciones de la estimación de la pendiente y la ordenada al origen. El valor de la pendiente de 0.997 significa que hay un recobro de 99.72% de la cantidad adicionada; mientras que el valor de 0 en la intersección quiere decir que cuando no se adiciona analito, no es posible que haya recuperación; interpretando esto, se puede confirmar que el método no es afectado por la presencia de los excipientes de las muestras comerciales.

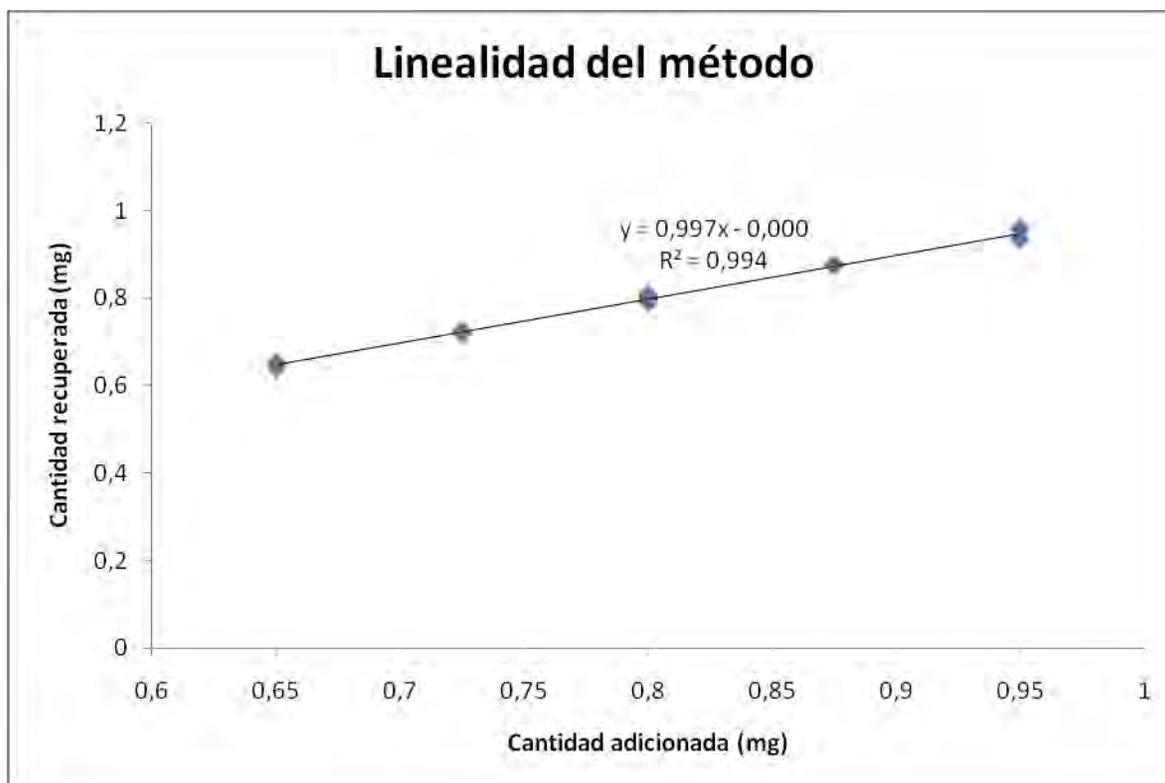


Figura 18. Linealidad del método de C9 con EI por GC

Tabla 22. Parámetros estadísticos para la linealidad del método de C9 por GC

| Parámetros | C9 |
|----------------------------------|----------------|
| R | 0,997 |
| R² | 0,995 |
| R² ajustado | 0,994 |
| Pendiente (m) | 0,997 |
| IC (β_1) | 0,983 – 1,010 |
| IC (β_0) | -0,035 - 0,034 |

Para determinar la linealidad de los datos, se realizó un análisis de varianza al 95 % de confianza en el cual se observa que el valor de F calculada es mayor que el valor crítico de F, por lo que los datos se ajustan a un modelo lineal, los resultados se muestran en la tabla 23.

Tabla 23. ANOVA para C9 considerando un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

| | G.L. | S.C. | C.M. | F | Valor crítico de F |
|------------------|-------------|-------------|-------------|----------|---------------------------|
| Regresión | 1 | 0,168 | 0,168 | 2529,555 | 2,779E-16 |
| Residuos | 13 | 0,001 | 0,0000663 | | |
| Total | 14 | 0,169 | | | |

La tabla 22 muestra los valores que comprueban la linealidad del método, mostrando que el valor del coeficiente cuadrado de correlación es mayor a 0,98, la pendiente tiene un valor muy próximo a 1 y el IC (β_1) incluye la unidad; la ordenada al origen tiene un valor muy próximo a cero y el IC (β_0) incluye el 0.

El CV del porcentaje de recuperación es menor a 2%.

Una vez analizados los datos, se determinó que el método cumple con los parámetros de linealidad establecidos en la guía de validación

7.8 Precisión del método (precisión intermedia)

En la tabla 24 se comprueba que el día y el analista no son parámetros que interfieran con la reproducibilidad del método, ya que en ambos casos para el C9 los coeficientes de variación del porcentaje de recobro obtenido tanto en diferentes días como por diferentes analistas son menores al 2 %.

Tabla 24. Datos obtenidos para la evaluación de la precisión intermedia del método de C9 por GC

| DIA | ANALISTA 1 | ANALISTA 2 | CV (%) |
|------------------------|-------------------|-------------------|---------------|
| 1 | % RECOBRO | | 0,996 |
| | 98,190 | 98,869 | |
| | 100,953 | 98,969 | |
| | 99,864 | 98,738 | |
| Promedio | 99,669 | 98,859 | |
| DesvEst | 1,392 | 0,116 | |
| CV (%) | 1,396 | 0,117 | |
| 2 | % RECOBRO | | 1,274 |
| | 99,725 | 99,774 | |
| | 99,255 | 99,033 | |
| | 102,493 | 100,682 | |
| Promedio | 100,491 | 99,83 | |
| Desvest | 1,749 | 0,826 | |
| CV (%) | 1,741 | 0,827 | |
| CV (%) Global = | | | 1,135 |

7.9 Muestras comerciales

Durante la validación del método se estudiaron dos muestras tópicas farmacéuticas, la primera proporcionada por los laboratorios Darier y la segunda Finacea de los laboratorios Sheringh Plough, obteniendo los resultados siguientes:

Laboratorios Darier

Tabla 25. Resultados de la cuantificación de crema tópica con ácido azelaico al 20% por GC

| Sistema | Tr EI | Tr C9 | $\frac{A_{EI}}{A_{C9}}$ | $\frac{C_{EI}}{C_{C9}}$ | Conc EI ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) | Conc C9 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) | %p/p |
|-----------------|--------------|-------------|-------------------------|-------------------------|--|--|---------------|
| Darier | 7,933 | 14,2 | 0,746 | 1,009 | 0,8 | 0,807 | 20,184 |
| Darier | 7,933 | 14,2 | 0,744 | 1,007 | 0,8 | 0,806 | 20,146 |
| Darier | 7,933 | 14,2 | 0,756 | 1,023 | 0,8 | 0,818 | 20,459 |
| Promedio | <i>7,933</i> | <i>14,2</i> | <i>0,749</i> | <i>1,013</i> | | <i>0,811</i> | <i>20,263</i> |
| Desv Est | <i>0</i> | <i>0</i> | <i>0,006</i> | <i>0,009</i> | | <i>0,007</i> | <i>0,171</i> |
| CV | <i>0</i> | <i>0</i> | <i>0,842</i> | <i>0,845</i> | | <i>0,845</i> | <i>0,845</i> |

Finacea (Sherinf Pharma)

Tabla 26. Resultados de la cuantificación de gel tópico con ácido azelaico al 15% por GC

| Sistema | Tr EI | Tr C9 | $\frac{A_{EI}}{A_{C9}}$ | $\frac{C_{EI}}{C_{C9}}$ | Conc EI | Conc C9 | %p/p |
|-----------------|---------------|---------------|-------------------------|-------------------------|---------|--------------|---------------|
| Finacea | 7,933 | 14,183 | 0,565 | 0,764 | 0,8 | 0,611 | 15,279 |
| Finacea | 7,95 | 14,2 | 0,565 | 0,764 | 0,8 | 0,611 | 15,276 |
| Finacea | 7,95 | 14,2 | 0,565 | 0,764 | 0,8 | 0,611 | 15,276 |
| Promedio | <i>7,944</i> | <i>14,194</i> | <i>0,565</i> | <i>0,764</i> | | <i>0,611</i> | <i>15,277</i> |
| Desv Est | <i>0,0098</i> | <i>0,0098</i> | <i>0,000</i> | <i>0,000</i> | | <i>0,000</i> | <i>0,002</i> |
| CV | <i>0,1235</i> | <i>0,0691</i> | <i>0,011</i> | <i>0,011</i> | | <i>0,011</i> | <i>0,011</i> |

Los resultados que arrojan los cromatogramas en las tablas 25 y 26 muestran que los % p/p de ácido azelaico obtenidos corresponden a los valores señalados en los marbetes de las formulaciones farmacéuticas de Finacea gel y de la crema de los laboratorios Darier.

| Parámetro de desempeño | Criterio de aceptación | C9 | Observación |
|----------------------------------|---|--|-------------|
| Adecuabilidad | $CV \leq 2\%$ para la respuesta analítica $R > 2$ | $CV = 1,58$ $R = 12$ | Aceptado |
| Precisión del sistema | $CV \leq 1,5\%$ para la respuesta analítica | $CV = 1,245$ | Aceptado |
| Linealidad del sistema | $R^2 \geq 0.98$ IC(β_1) no debe incluir el cero IC(β_0) debe incluir el cero $CV \leq 2\%$ | $R^2 = 0,9978$ IC(β_1) = 0,7309 – 0,7414 IC(β_0) = -0,0028 – 0,0083 $CV = 1,619 \%$ | Aceptado |
| Especificidad | La respuesta debe ser debida al analito | No hay interferencias de los excipientes con los analitos | Aceptado |
| Exactitud y repetibilidad | IC(μ) debe incluirse en el intervalo de 98 – 102 % CV de recobro < 2% | IC(μ) = 99,01 – 100,3 CV = 1,3 | Aceptado |
| Linealidad del método | <i>Cantidad adicionada vs cantidad recuperada</i> $R^2 \geq 0.98$ IC(β_1) debe incluir la unidad IC(β_0) debe incluir el cero CV _{y/x} del % de recobro < 2% | $R^2 = 0.997$ IC(β_1) = 0,983 – 1,01 IC(β_0) = -0,0062 – 0,0154 CV _{y/x} = % | Aceptado |
| | <i>Porcentaje de recobro</i> IC(μ) debe incluirse en el intervalo de 98 – 102 % CV de recobro < 2% | IC(μ) = 99,25 – 100,24 CV = 0,899 | Aceptado |
| Precisión intermedia | $CV \leq 2\%$ | $CV = 1,135$ | Aceptado |

Capítulo 8. CONCLUSIONES

Se optimizó el método analítico para la separación de C9 en una formulación farmacéutica mediante GC.

Se realizó la validación del método para la determinación de contenido químico de C9, evaluándose los parámetros de adecuabilidad, precisión y linealidad del sistema y del método, especificidad, exactitud y repetibilidad, mismos que cumplen con los criterios especificados en la guía de validación de métodos analíticos, por lo que puede utilizarse para realizar el control de calidad de tópicos (gel o crema) que contengan este analito de una forma rápida, económica y confiable.

Se optimizaron las condiciones de reacción logrando que se ahorraran reactivos durante la experimentación, asimismo se seleccionaron y verificaron que las condiciones cromatográficas óptimas cumplieran con los propósitos prácticos para la separación y cuantificación de ácido azelaico en formulaciones farmacéuticas comerciales.

Se analizaron dos muestras comerciales Finacea (presentación en gel 15% p/p de C9) y la muestra proporcionada por los laboratorios Darier (presentación en crema 20% p/p de C9) y se probó que el método es confiable y factible para separar y cuantificar ácido azelaico.

ANEXO A

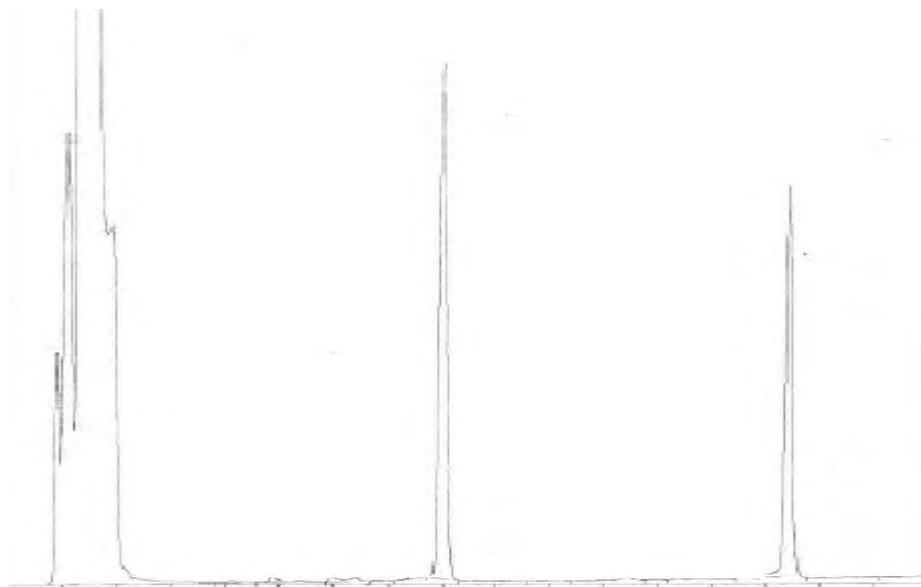


Figura 19. Cromatograma de la prueba de adecuabilidad del sistema

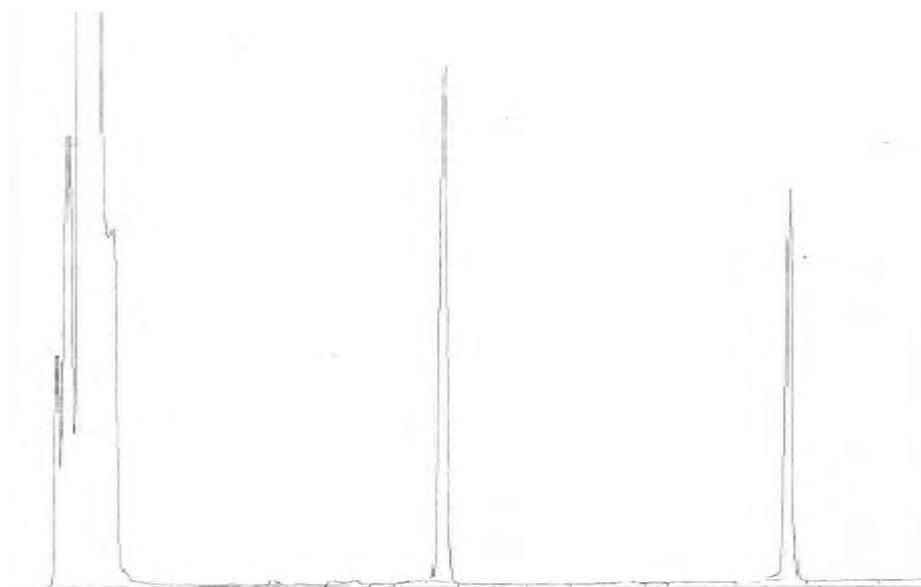


Figura 20. Cromatograma de la prueba de la precisión del sistema

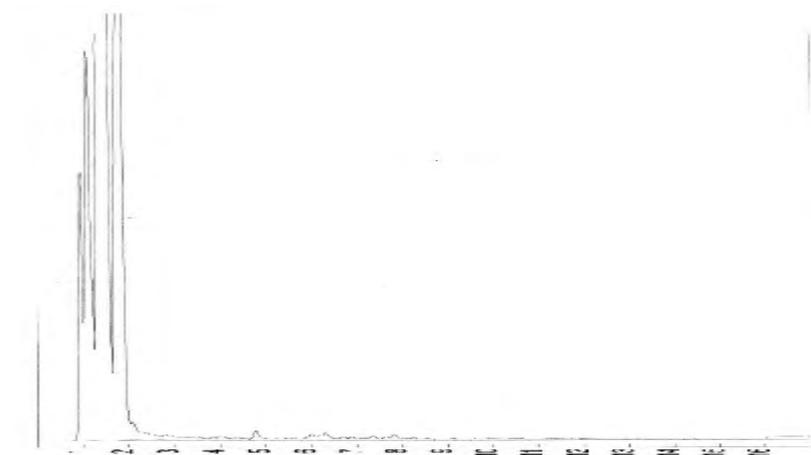


Figura 21. Cromatograma del blanco (piridina + BSTFA) para la prueba de especificidad

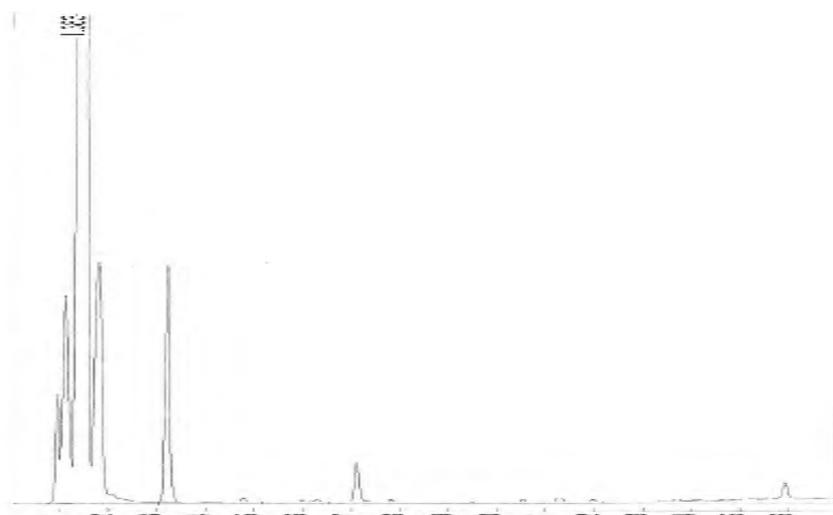


Figura 22. Cromatograma de una muestra de placebo derivatizado para la prueba de especificidad

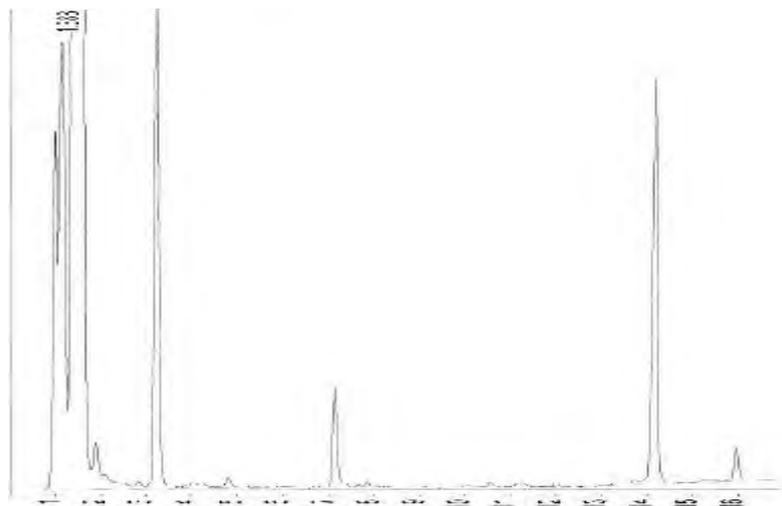


Figura 23. Cromatograma de una muestra de placebo fortificado con C9 derivatizado, para la prueba de especificidad

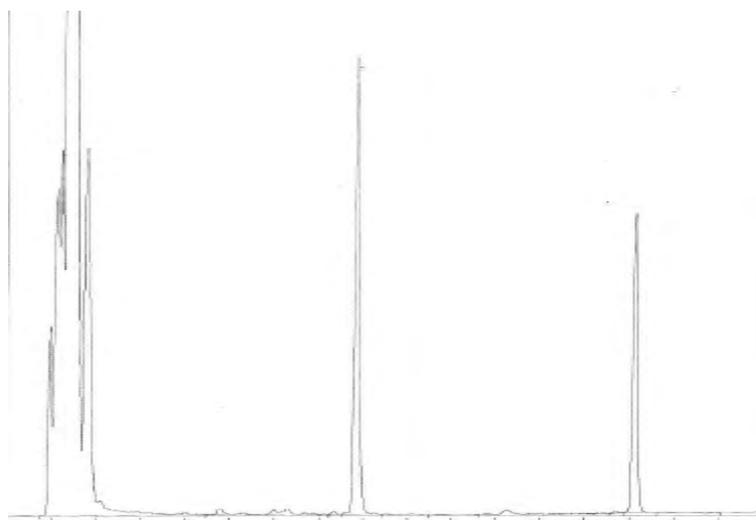


Figura 23. Cromatograma de una muestra de la prueba de linealidad del sistema

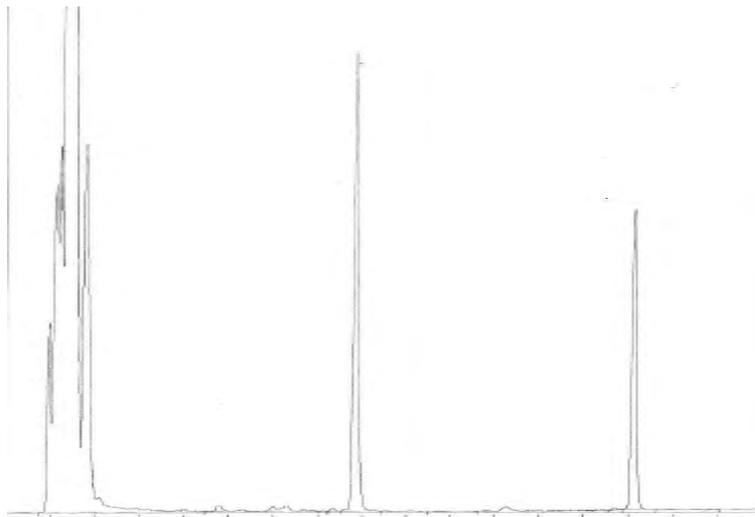


Figura 24. Cromatograma de una muestra de la prueba de exactitud y repetibilidad

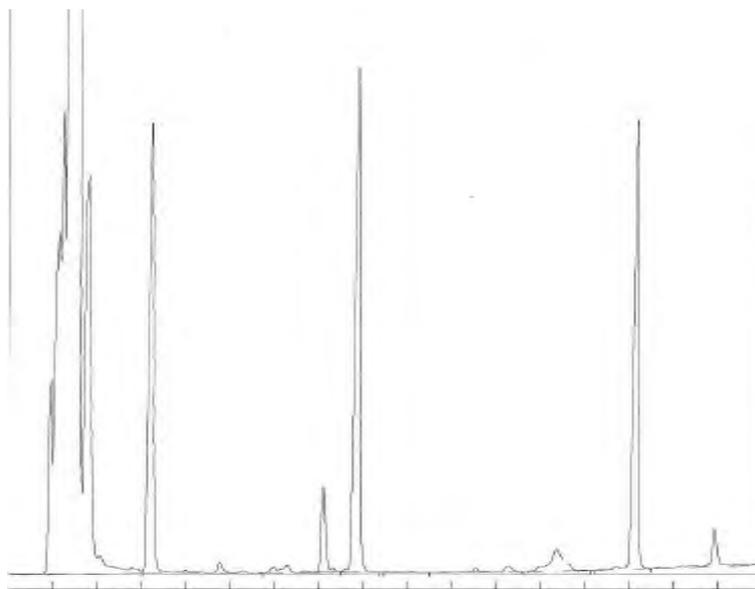


Figura 24. Cromatograma de una muestra de la prueba de linealidad del método

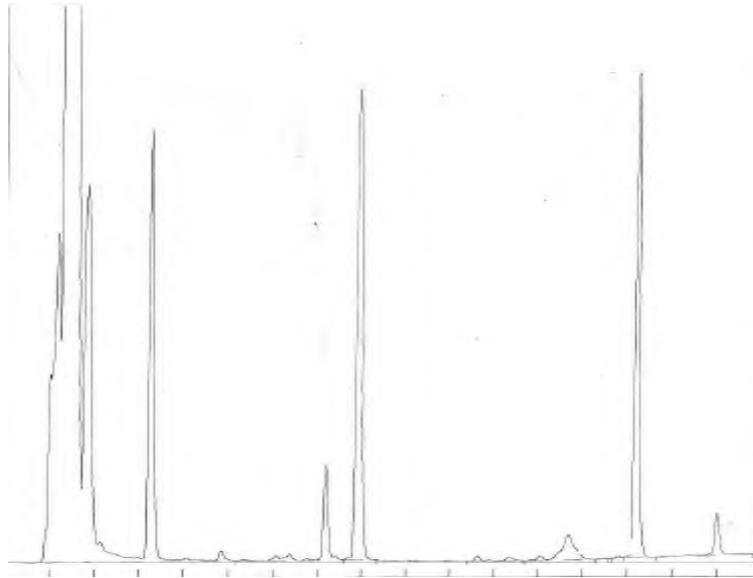


Figura 25. Cromatograma de una muestra de la precisión intermedia del método

ANEXO B

Fichas de seguridad de los reactivos

1. IDENTIFICACIÓN DE LA SUSTANCIA O PREPARADO

Compuesto: Ácido Azelaico

Uso: Producto químico para síntesis

2. INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES

Nombre IUPAC: Ácido nonadioico

Masa molar: 188.23 g/mol

Fórmula molecular condensada: C₉H₁₆O₄

Fórmula química: HOOC(CH₂)₇COOH

Componentes peligrosos: Ácido subérico (<1%)

3. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Sin exigencias

4. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

Estado físico: cristalino

Color: blanco

Olor: inodoro

Punto de fusión: 107° C

Punto de ebullición: 237° C

1. IDENTIFICACIÓN DE LA SUSTANCIA O PREPARADO

Compuesto: Piridina

Uso: Análisis e investigación química fina

2. INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES

Masa molar: 79.1 g/mol

Fórmula molecular condensada: C₅H₅N

3. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Sin indicaciones particulares

PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

Estado físico: líquido transparente

Color: ligeramente amarillo

Olor: característico desagradable

Punto de ebullición: 115.2° C

1. IDENTIFICACIÓN DE LA SUSTANCIA O PREPARADO

Compuesto: N,O Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

Uso: Producto químico para síntesis

2. INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES

Nombre IUPAC: 2,2,2-trifluoro-N-trimetilsilil-1-trimetilsililoxi-etanimina

Masa molar: 257.4 g/mol

Fórmula molecular condensada: C₈F₃NSi₂H₁₉O

Fórmula química: CF₃CN=Si(CH₃)₃OSi(CH₃)₃

3. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Sin exigencias

4. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

Estado físico: líquido

Color: incoloro

Olor: inodoro

Punto de ebullición: 55° C

5. IDENTIFICACIÓN DE LA SUSTANCIA O PREPARADO

Compuesto: TMCS

Uso: Producto químico para síntesis

6. INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES

Nombre IUPAC: Trimetilclorosilano

Masa molar: 108.66 g/mol

Fórmula molecular condensada: C₃H₉ClSi

Fórmula química: ClSi(CH₃)₃

1. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Sin exigencias

2. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

Estado físico: líquido

Color: incoloro

Olor: inodoro

Punto de ebullición: 57° C

Optimización

ANEXO C

Análisis de micropipetas

1. En un vaso de precipitados de 20 mL agregar 100 μL con una micropipeta de 20 – 200 μL y anotar su peso.
2. Realizar el paso anterior por quintuplicado.
3. En un vaso de precipitados de 20 mL agregar 250 μL con una micropipeta de 250 – 1000 μL y anotar su peso.
4. Realizar el paso anterior por quintuplicado.

Tabla 28. Preparación de soluciones para evaluar el CV de la pipeta de 20 – 200 μL

| Micropipeta 20 – 200 μL | | | |
|--|--|------------------|------------------|
| Lectura | Vol. (μl) | Peso (mg) | Vol./peso |
| 1 | 100 | | |
| 2 | 100 | | |
| 3 | 100 | | |
| 4 | 100 | | |
| 5 | 100 | | |

Tabla 29. Preparación de soluciones para evaluar el CV de la pipeta de 250 – 1000 μL

| Micropipeta 250 – 1000 μL | | | |
|--|--|------------------|------------------|
| Lectura | Vol. (μl) | Peso (mg) | Vol./peso |
| 1 | 250 | | |
| 2 | 250 | | |
| 3 | 250 | | |
| 4 | 250 | | |
| 5 | 250 | | |

Resultados del análisis de micropipetas

Tabla 30. Resultados del CV de la micropipeta de 20 – 200 μL

| Vol. (μl) | Peso (mg) | Vol./peso |
|--|----------------------|------------------|
| 100 | 97,1 | 1,029 |
| 100 | 98,9 | 1,011 |
| 100 | 97,6 | 1,024 |
| 100 | 96,7 | 1,034 |
| 100 | 97,4 | 1,026 |
| Promedio | 97,54 | 1,025 |
| DesvEst | 0,83246622 | 0,008 |
| CV | 0,85346137 | 0,847 |

Tabla 31. Resultados del CV de la micropipeta de 250 – 1000 μL

| Promedio | Vol. μL | Peso/Vol. |
|-----------------|--|------------------|
| 250 | 252 | 0,992 |
| 250 | 249,4 | 1,002 |
| 250 | 249,5 | 1,002 |
| 250 | 248,7 | 1,005 |
| 250 | 248,4 | 1,006 |
| Promedio | 249,6 | 1,001 |
| DesvEst | 1,419 | 0,005 |
| CV | 0,568 | 0,565 |

Con base a los resultados obtenidos del posible error que pudieran tener la medición de las micropipetas, su CV indica que las lecturas de volúmenes que se midan con ellas es confiable, puesto que este valor es menor al 2% y se observa en ambas tablas que no hay gran desvío en los resultados del peso con respecto al volumen proporcionado.

BIBLIOGRAFÍA

[1] www.azelaic-acid.es/scripts/patients/topic_1article_1.php

Página consultada en la fecha: 01 de septiembre de 2009

[2] McMurry, J., “Química Orgánica” 5º edición, México, Thomson Editores, 2001

[1] A. Mayer-Da silva, H. Gollnick, E. Imcke, C.E. Orfanos. “Azelaic acid vs placebo: effects on normal human keratinocytes and melanocytes.”

[3] Nazzaro-Porro M, Passi S. Inibitori della pigmentogenesi in coltor e di Pityrosporum & loro effetti in vivo & in vitro *Gior Ital Dermatol* 1977; 112: 207-218.

[4] Pérez Elizondo, Antonio David. “Estudio comparativo de crema de ácido azelaico al 20% y solución alcohólica de hidroquinona al 4% en el tratamiento de melasma.” Tesis de posgrado para obtener la especialidad en dermatología, Facultad de Medicina – UNAM, 1998.

[5] Capristo, Esmeralda; Mingrone, Geltrude, A new HPLC method for the direct analysis of triglycerides of dicarboxylic acids in biological samples. *Clinica Chimica Acta*, Vol 289, Noviembre 1999, pp. 11 – 21

[6] Van Pinxteren, Dominik Determination of functionalised carboxylic acids in atmospheric particles and cloud water using capillary electrophoresis. *Journal of chromatography* No. 1171, 2007, pp. 122-123

[7] Julian de la Cruz, Sonia. “Desarrollo de un método analítico para la determinación de ácido azelaico y compuestos relacionados en una formulación farmacéutica mediante cromatografía de gas (FID-GC)”. Tesis de licenciatura, UNAM, FES-Cuautitlán, 2008.

[8] www.dromayor.com.co/diccionario/PLM/productos/27563.html

Página consultada el día: 01 de septiembre de 2009

[9] www.facmed.unam.mx/bmnd/plm_2k8/src/prods/38989.html

Página consultada el día 01 de septiembre de 2009

[10] A.I. M. Keulemans, “Gas Chromatography”. Reinhold Publishing Corp. 2ª ed. New York, E.U.A., 1959.

[11] Rubinson, Kenneth A. “Análisis Instrumental” Edit, Pearson, Madrid, España, 2004.

[12] Skoog, A., Douglas, (2000). “Química Analítica”. 7ª edición. Mc Graw – Hill. México.

[13] Valcarcel Cases, M. “Técnicas Analíticas de Separación.” Edit. Reverté, Barcelona, España, 1988.

[14] www.wikipedia.com

[15] Lee L, Milton. “Open Tubular Column Gas Chromatography.” Edit. Wiley-Interscience, E.U.A., 1984.

[16] Kitson G., Fulton. “Gas Chromatography and Mass Spectrometry” Edit. Academic Press, San Diego California, E.U.A., 1996.

[17] Underwood, L.A. “Química Analítica Cuantitativa” Edit. Pearson, 5ª edición, Naucalpan, edo. de México, 1989.

[18] Swartz, M; Krull, Ira S. “Analytical Method Development and Validation”. Edit Marcel Dekker, Inc. New York, E.U.A., 1997.

[19] “Guía de Validación de Métodos Analíticos”. Colegio Nal. QFB de México A.C.

[20] ADAMOVICS, J. A. (1997). “Chromatographic analysis of pharmaceuticals. Chromatographic science series”. Segunda Edición, Ed. Marcel Dekker, USA. Vol. 74.

[21] CARSTENSEN, J. T.; Rhodes, C. T. (2000). “Drug stability. Principles and practices”. Tercera Edición. Editorial Marcel Dekker, USA. Vol. 107.