



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

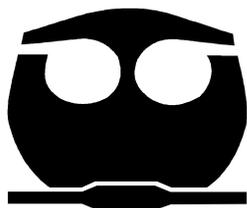
**VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA
ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE
IMPUREZAS DE CEFADROXILO POR HPLC
EN CÁPSULAS, TABLETAS Y
SUSPENSIONES**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

ANA ANGELINA GONZÁLEZ BAUTISTA



MÉXICO, D. F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Nombre de archivo: TESIS_UNAM.doc
Directorio: D:\Documents and Settings\jaimes\Mis documentos
Plantilla: D:\Documents and Settings\jaimes\Datos de
programa\Microsoft\Plantillas\Normal.dotm
Título:
Asunto:
Autor: ANA ANGELINA
Palabras clave:
Comentarios:
Fecha de creación: 16/08/2010 16:37:00
Cambio número: 11
Guardado el: 28/10/2011 8:26:00
Guardado por: MARY
Tiempo de edición: 62 minutos
Impreso el: 22/11/2011 16:42:00
Última impresión completa
Número de páginas: 1
Número de palabras: 69 (aprox.)
Número de caracteres: 383 (aprox.)

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Georgina Margarita Maya Ruiz
VOCAL: Profesor: María del Socorro Alpizar Ramos
SECRETARIO: Profesor: Pedro Salvador Valadez Eslava
1er. SUPLENTE: Profesor: Ivan Alejandro Franco Morales
2° SUPLENTE: Profesor: Verónica Zamora Salazar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

BRISTOL MYERS SQUIBB S DE R. L. (PLANTA SAN ANGEL)

ASESOR DEL TEMA: M. EN C. MARÍA DEL SOCORRO ALPIZAR RAMOS.

SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay): QFB. MARÍA ISABEL VALDES ALMAGUER.

SUSTENTANTE (S): ANA ANGELINA GONZÁLEZ BAUTISTA.

Nombre de archivo: JURADO ASIGNADO PAG2.doc
Directorio: D:\Documents and Settings\jaimes\Mis documentos
Plantilla: D:\Documents and Settings\jaimes\Datos de programa\Microsoft\Plantillas\Normal.dotm
Título: JURADO ASIGNADO:
Asunto:
Autor: MARY
Palabras clave:
Comentarios:
Fecha de creación: 28/10/2011 0:07:00
Cambio número: 3
Guardado el: 05/11/2011 13:48:00
Guardado por: WinuE
Tiempo de edición: 2 minutos
Impreso el: 22/11/2011 16:43:00
Última impresión completa
Número de páginas: 1
Número de palabras: 84 (aprox.)
Número de caracteres: 468 (aprox.)

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres por que gracias a su amor, apoyo, desvelos, esfuerzos y comprensión durante toda mi carrera pude cumplir otra de mis metas en la vida que fue terminar mi carrera profesional, así como a mis hermanas por que siempre estuvieron conmigo apoyándome y animándome para seguir adelante.

También la dedico muy especialmente a mi esposo por todo su amor y apoyo que siempre me ha brindado dándome lo mejor de él al dedicarme su tiempo y paciencia para que yo pudiera concluir con mis estudios y a mi hija por que es un gran impulso en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a mi asesora la M. en F. María del Socorro Alpizar Ramos por su interés y paciencia mostrados en el tiempo que tardé sobre mi tesis, gracias por que con Maestras como usted se hacen las cosas con más ganas.

De igual forma agradezco al Jurado de esta tesis por que a pesar de todas sus ocupaciones se dieron tiempo para revisarla y especialmente a la Maestra Georgina Margarita Maya Ruiz por que me enseñó a ver las cosas desde otra perspectiva.

Agradezco enormemente a la QFB Isabel Valdés Almaguer por su entusiasmo de siempre querer ayudarme para concluir mi tesis a pesar de la cantidad de trabajo que tenía nunca se negó a brindarme su apoyo.

También agradezco a la QFB Laura Rosas Calderón por haberme ofrecido el tema de mi tesis que mientras estuve laborando en BMS pude concluir.

Nombre de archivo: TESIS_UNAM1.doc
Directorio: D:\Documents and Settings\jaimes\Mis documentos
Plantilla: D:\Documents and Settings\jaimes\Datos de
programa\Microsoft\Plantillas\Normal.dotm
Título:
Asunto:
Autor: ANA ANGELINA
Palabras clave:
Comentarios:
Fecha de creación: 25/08/2009 13:24:00
Cambio número: 32
Guardado el: 28/10/2011 8:33:00
Guardado por: MARY
Tiempo de edición: 160 minutos
Impreso el: 22/11/2011 16:43:00
Última impresión completa
Número de páginas: 1
Número de palabras: 216 (aprox.)
Número de caracteres: 1,191 (aprox.)

ÍNDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN	9
Planteamiento	11
Objetivos	12
Hipótesis	12
CAPÍTULO 1	
Marco teórico	13
Fundamentos y Legislación de Validación de Métodos Analíticos	13
Categorías I, II, III y IV	14
Adecuabilidad del sistema	16
Especificidad/Selectividad del método	16
Exactitud	16
Linealidad e intervalo del método	16
Linealidad del sistema	17
Precisión del método	17
Precisión del sistema	17
Robustez del método	17
Sensibilidad del método (Límite de detección y cuantificación)	17
Tolerancia del método	18

CAPÍTULO 2

Fundamentos de HPLC	19
Cromatografía	19
Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR o HPLC)	19
Separación de los compuestos	20
Fases estacionarias	21
Instrumentos para cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	22
Fuente de fase móvil (FM)	23
Características de la fase móvil	24
Recipientes para la fase móvil	24
Desgasificación de la fase móvil	24
Sistema de bombeo	25
Sistema de inyección de muestras	26
Sistema de separación	28
Sistema detector	31
Arreglo de diodos y UV	33
Sistema de registro	34
Verificación del sistema	35
Aplicaciones cuantitativas	40
Análisis cuantitativo	40
Método del estándar externo	41
Análisis cualitativo	42
Limpieza de la columna y del equipo	45

CAPÍTULO 3

Información de la molécula de cefadroxilo	47
Mecanismos de acción	47
Clasificación	47
Características generales de las cefalosporinas	48
Reacciones adversas	49
Aplicaciones terapéuticas	49
Descripción	49
Características físicas y químicas	49
Fórmula condensada	49
Formula desarrollada	49
Nombre químico, descripción y peso molecular	50
Propiedades químicas	50
Presentaciones en las que se encuentra el cefadroxilo	50
Indicaciones terapéuticas	50
Farmacocinética y farmacodinámica en humanos	51
Farmacología clínica	51
Microbiología	51
Contraindicaciones	52
Advertencias y precauciones	52
Precauciones o restricciones de uso durante el embarazo y la lactancia	53
Reacciones secundarias y adversas	53

CAPÍTULO 4

Diseño experimental	54
Lista de equipos / instrumentos	55
Lista de reactivos / estándares / columnas	56
Soluciones	57
Registro de condiciones de operación del sistema	60
Procedimiento	61
Adecuabilidad del sistema	61
Precisión del sistema	61
Especificidad	61
Especificidad para métodos indicativos de estabilidad	63
Linealidad del sistema	64
Linealidad del método	65
Exactitud repetibilidad	67
Precisión intermedia	67
Robustez	68
Estabilidad de la muestra y estándar de trabajo	68
Variación de los métodos de filtración	69
Tolerancia	70
El factor a evaluar es: sistema cromatográfico	70
Extractabilidad de la muestra	70
Sensibilidad del método (límite de detección y cuantificación)	71
Criterios de aceptación	72

CAPÍTULO 5

Resultados	75
Criterios de aceptación	120
Resumen de resultados suspensiones	120
Resumen de resultados cápsulas	123
Resumen de resultados tabletas	126

CAPÍTULO 6

Análisis de resultados y discusión	129
Criterios de aceptación	140
Conclusiones para suspensiones	140
Conclusiones para cápsulas	140
Conclusiones para tabletas	141
Conclusión para la validación de cefadroxilo impurezas	141

BIBLIOGRAFÍA	142
---------------------------	------------

Nombre de archivo: TESIS_UNAM2.doc
Directorio: D:\Documents and Settings\jaimes\Mis documentos
Plantilla: D:\Documents and Settings\jaimes\Datos de
programa\Microsoft\Plantillas\Normal.dotm
Título:
Asunto:
Autor: ANA ANGELINA
Palabras clave:
Comentarios:
Fecha de creación: 31/05/2011 20:11:00
Cambio número: 26
Guardado el: 05/11/2011 9:38:00
Guardado por: MARY
Tiempo de edición: 688 minutos
Impreso el: 22/11/2011 16:43:00
Última impresión completa
Número de páginas: 5
Número de palabras: 813 (aprox.)
Número de caracteres: 4,477 (aprox.)

INTRODUCCIÓN

Los métodos analíticos utilizados para evaluar la calidad de los productos farmacéuticos, están sujetos a varios requisitos de acuerdo con la normatividad vigente tanto nacional como internacional si los productos involucrados se exportan a otros países. La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) es el documento legal instituido por la Ley General de Salud (LGS) donde se establecen los métodos de análisis y los requisitos sobre la identidad, pureza, potencia y otras características de calidad que garanticen que los fármacos (principios activos), aditivos, medicamentos (preparados farmacéuticos) y productos biológicos sean eficaces y seguros.

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006, “Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos”, la **validación** es la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y los atributos de calidad establecidos. Los estudios de validación deben realizarse al inicio de la operación y deben ser terminados antes de emitir algún resultado oficial. Los métodos analíticos que no sean farmacopéicos deben de ser validados de acuerdo a un protocolo aprobado, el protocolo debe especificar los pasos críticos, su programa de seguimiento de actividades y los criterios de aceptación. Antes de su ejecución, el protocolo debe ser revisado y aprobado por el responsable de la unidad de calidad. Una vez realizada la validación debe prepararse un reporte que haga referencia cruzada al protocolo de validación, que reúna los resultados obtenidos, comentando acerca de cualquier desviación o no conformidad observada y mencionando las conclusiones necesarias, incluyendo los cambios necesarios recomendados para corregir deficiencias, este reporte también debe ser aprobado por el responsable de la unidad de calidad y el responsable del proceso o sistema.

Cualquier cambio en un método analítico validado debe ser sometido a un proceso de control de cambios.

Para mantener el estado validado de un método se debe evaluar el cumplimiento de los siguientes puntos:

- Sistema de control de cambios
- Sistema de calibración
- Sistema de calificación de personal
- Sistema de auditorías técnicas
- Sistema de desviaciones o no conformidades
- Sistema de reporte anual de producto
- Sistema de evaluación de proveedores
- Programa de mantenimiento

Cuando haya cambios que impacten la calidad del producto o se presenten tendencias adversas en los resultados obtenidos en el producto se debe evaluar la necesidad de una nueva validación o revalidación del método.

Tanto en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos FEUM 9ª Ed. como en la Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 32, se establece que la **validación** de un método es el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método satisfacen los requisitos para su aplicación analítica.

Esta tesis trata de la validación de la metodología analítica para la determinación de impurezas de cefadroxilo por HPLC en cápsulas, tabletas y suspensiones por un método analítico no farmacopéico, es decir, que no se encuentra en las farmacopeas (FEUM, USP, EP, etc). Se requiere de los siguientes insumos: placebo, muestras, estándares de referencia, reactivos, columnas y equipos.

Planteamiento

Se llevará a cabo la validación de un método analítico no farmacopéico, para la determinación de impurezas de cefadroxilo por el método de HPLC en las siguientes formas farmacéuticas: cápsulas, tabletas y suspensión.

Se escogió la validación de este método debido a que:

- 1.- Este método analítico es desarrollado al interior de una compañía farmacéutica privada y no está aún incluido en ningún compendio, se debe hacer la validación ya que así lo indica la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006, "Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos" en su apartado **9.12.3** dice que se debe contar con métodos de análisis validados para producto a granel, producto terminado y materia prima en caso de no aparecer en cualquier farmacopea internacional ni en la FEUM.
- 2.- Es un método para evaluación de indicativo de estabilidad ya que de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005, "Estabilidad de Fármacos y Medicamentos" en su apartado **7.3** Parámetros a evaluar y metodología analítica. El protocolo del estudio debe incluir los parámetros y especificaciones de estabilidad que son susceptibles de cambiar durante el estudio y que pueden influir en la calidad, seguridad o eficacia del medicamento. Las pruebas deben cubrir en su caso, parámetros físicos, químicos, biológicos o microbiológicos. Se deben aplicar métodos analíticos indicativos de estabilidad validados. Los cuales se establecen en el apartado **4.1.26**. Método analítico indicativo de estabilidad. Método analítico cuantitativo para un fármaco o un medicamento, capaz de distinguir cada ingrediente activo de otras sustancias y de sus productos de degradación.

Objetivos

Objetivos Generales

- Contar con un método validado para la determinación de impurezas de muestras procedentes de un antibiótico durante el estudio de estabilidad.
- Obtener la evidencia documentada de la validación del método analítico: Determinación de impurezas de cefadroxilo por HPLC en cápsulas, tabletas y suspensiones por un método no farmacopéico.
- Comprobar mediante distintas pruebas aplicadas al método que éste es lineal, robusto y tolerante a diferentes cambios propuestos en el diseño experimental de la validación.

Objetivo Específico

- Aplicar un solo método (HPLC) para la determinación de impurezas de cefadroxilo en:
 - Cápsulas de 250mg y 500mg
 - Tabletas de 1g
 - Suspensiones de 125mg/5mL, 250mg/5mL y 500mg/5mL.

Hipótesis

- Con esta validación se tendrá un método confiable y accesible para llevar a cabo la determinación de impurezas de cefadroxilo por HPLC en tres presentaciones cápsulas, tabletas y suspensiones.

Nombre de archivo: TESIS_UNAM3.doc
Directorio: D:\Documents and Settings\jaimes\Mis documentos
Plantilla: D:\Documents and Settings\jaimes\Datos de
programa\Microsoft\Plantillas\Normal.dotm
Título:
Asunto:
Autor: ANA ANGELINA
Palabras clave:
Comentarios:
Fecha de creación: 16/08/2010 16:42:00
Cambio número: 27
Guardado el: 28/10/2011 8:47:00
Guardado por: MARY
Tiempo de edición: 776 minutos
Impreso el: 22/11/2011 16:44:00
Última impresión completa
Número de páginas: 4
Número de palabras: 945 (aprox.)
Número de caracteres: 5,201 (aprox.)

CAPÍTULO 1

Marco Teórico

Fundamentos y Legislación de Validación de Métodos Analíticos

En los diferentes países las instituciones gubernamentales de salud establecen los métodos de análisis y los requisitos sobre la identidad, pureza, potencia y otras características de calidad que garanticen que los fármacos (principios activos), aditivos, medicamentos (preparados farmacéuticos) y productos biológicos sean eficaces y seguros, a través y con ayuda de las Farmacopeas las cuales son documentos legales instituidos por estas.

Los métodos analíticos utilizados para evaluar la calidad de los productos farmacéuticos, están sujetos a varios requisitos de acuerdo con la normatividad vigente en cada país, así como, con otros documentos normativos nacionales e internacionales.

Dentro de los requisitos básicos tenemos a la validación de los métodos analíticos, la cual de acuerdo a diferentes fuentes se puede definir como:

De acuerdo a la FEUM 9^a Ed. La **validación** de un método es el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio; que las características de desempeño del método, satisfacen los requisitos para su aplicación analítica.

De acuerdo a la USP 32. La **validación** de un procedimiento analítico es el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.

De acuerdo a la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A. C. Un método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra.

De acuerdo a la FEUM 9ª Ed., la USP 32 y la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A. C. la **validación** de métodos analíticos es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada; es decir, cumple con su propósito.

El proceso de validación de los métodos analíticos puede comprender pero no está limitado a las siguientes pruebas: verificación del sistema, precisión del sistema, linealidad del sistema, especificidad/selectividad del método, exactitud del método, linealidad e intervalo del método, precisión del método, límite de detección del método, límite de cuantificación del método, robustez del método, tolerancia del método.

Los requisitos de las pruebas farmacopéicas varían desde determinaciones analíticas muy rigurosas hasta evaluaciones subjetivas de atributos. Considerando esta amplia variedad, es lógico que diferentes procedimientos de prueba requieran diferentes esquemas de validación. Existen diferentes categorías de prueba para las que se exigen datos de validación, las cuales son las siguientes:

Categoría I. Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.

Categoría II. Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en análisis cuantitativos y pruebas límite.

Categoría III. Procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño (por ejemplo, disolución, liberación de fármacos).

Categoría IV. Pruebas de identificación. Para cada categoría, se requiere diferente información analítica.

En la siguiente tabla se indican los datos que normalmente se requieren para cada una de estas categorías.

Características de Desempeño Analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis Cuantitativos	Pruebas de Límite		
Exactitud	Sí	Sí	*	*	No
Precisión	Sí	Sí	No	Sí	No
Especificidad	Sí	Sí	Sí	*	Sí
Límite de Detección	No	No	Sí	*	No
Límite de Cuantificación	No	Sí	No	*	No
Linealidad	Sí	Sí	No	*	No
Intervalo	Sí	Sí	*	*	No

* Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

El método validado en esta tesis está dentro de la categoría II ya que es un método para la determinación de impurezas en muestras de estabilidad.

De acuerdo a la FEUM (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos) 9ª Ed. se consideran **impurezas** a los contaminantes adicionados durante el curso del proceso de manufactura o almacenamiento, y contaminantes peligrosos tales como metales pesados o arsénico, entre otros.

A continuación se dan las definiciones de las pruebas que se realizan para esta validación del método analítico de acuerdo a la FEUM 9ª Ed. y a la Guía de Validación de Métodos Analíticos.

Adecuabilidad del sistema: Es la verificación de que el sistema (instrumento, analista, equipo, sustancia de referencia, entre otros) opera con base a criterios preestablecidos, que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico.

Especificidad/Selectividad del método: Es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra, que pueden estar presentes (especificidad) o que se pudieran presentar por efectos ambientales y/o de interacción con los mismos componentes (selectividad) tales como: impurezas, productos de degradación o componentes de la misma muestra. Para determinar la especificidad, se debe demostrar que la respuesta analítica se debe únicamente al analito.

Exactitud: Es la concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia.

Linealidad e intervalo del método: Es el intervalo comprendido entre las concentraciones superior e inferior del analito (incluyendo dichas concentraciones) y para el que se ha demostrado que el analito es cuantificado con un nivel satisfactorio de precisión, exactitud y linealidad, cuando se aplica el método analítico.

Linealidad del sistema: Es la verificación de que la respuesta analítica y la concentración del analito (puede ser una sustancia de referencia) se ajustan al modelo matemático, en un intervalo de concentraciones pertinente a la aplicación analítica. Este concepto generalmente se denomina “curva de calibración” y es parte esencial de varios métodos analíticos en las determinaciones cuantitativas del analito.

Precisión del método: Es el grado de concordancia relativa entre los resultados obtenidos al aplicar el método analítico, bajo las mismas condiciones analíticas (repetibilidad) o bajo diferentes condiciones analíticas (reproducibilidad), utilizando una muestra homogénea. La precisión de un método analítico generalmente se expresa como la desviación estándar o como el coeficiente de variación (desviación estándar relativa).

Precisión del sistema: Es el grado de concordancia relativa de la respuesta analítica de soluciones de referencia de concentración o magnitud conocida.

Robustez del método: Es la capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en las características normales de operación del método.

Sensibilidad del Método (Límite de detección y cuantificación).

- **Límite de detección (LD) del método:** Es una característica de desempeño analítico que debe determinarse cuando un método analítico se aplica como prueba límite.

- **Límite de cuantificación (LC) del método:** Es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser determinada con exactitud y precisión aceptable, bajo las condiciones de aplicación del método. Las unidades del límite se expresan como se indica en el método analítico (por ejemplo porcentaje, ppm., ppb., mg/g, etc.).

Tolerancia del método: Es el grado de reproducibilidad de los resultados de prueba obtenidos por el análisis de la misma muestra, bajo una variedad de condiciones tales como: diferentes laboratorios, analistas, instrumentos, lotes de reactivos, días, etc.

Nombre de archivo: TESIS_UNAM4_CAP1.doc
Directorio: D:\Documents and Settings\jaimes\Mis documentos\Downloads
Plantilla: D:\Documents and Settings\jaimes\Datos de programa\Microsoft\Plantillas\Normal.dotm
Título: CAPITULO 1
Asunto:
Autor: ANA ANGELINA
Palabras clave:
Comentarios:
Fecha de creación: 26/08/2010 16:58:00
Cambio número: 26
Guardado el: 05/11/2011 13:54:00
Guardado por: WinuE
Tiempo de edición: 686 minutos
Impreso el: 24/11/2011 11:38:00
Última impresión completa
Número de páginas: 6
Número de palabras: 1,234 (aprox.)
Número de caracteres: 6,792 (aprox.)

CAPÍTULO 2

Fundamentos de HPLC

Cromatografía.

La cromatografía es una técnica desarrollada a principios del siglo XX, que permite la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla. El nombre cromatografía (kromos: color, graphos: descripción) se debe a que las primeras separaciones se llevaron a cabo con pigmentos de plantas, los cuales se observaban como bandas coloridas.

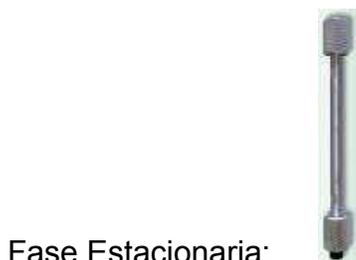
En general, la cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil (gas o líquido) y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido.

Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR o HPLC).

Esta técnica es conocida como Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) o HPLC por sus siglas en inglés. En HPLC, una muestra líquida o una muestra sólida disuelta en un disolvente adecuado se hacen pasar por una columna cromatográfica junto con una fase móvil líquida. La separación se efectúa gracias a las interacciones de las fases soluble y estacionaria.

El éxito en la aplicación de la HPLC para un compuesto dado depende de la composición correcta de las condiciones de operación, es decir, la preparación de la muestra, el tipo de la columna, la fase móvil, la longitud de diámetro de la columna, la velocidad de flujo de la fase móvil, el tipo de detección, el algoritmo de integración, etc.

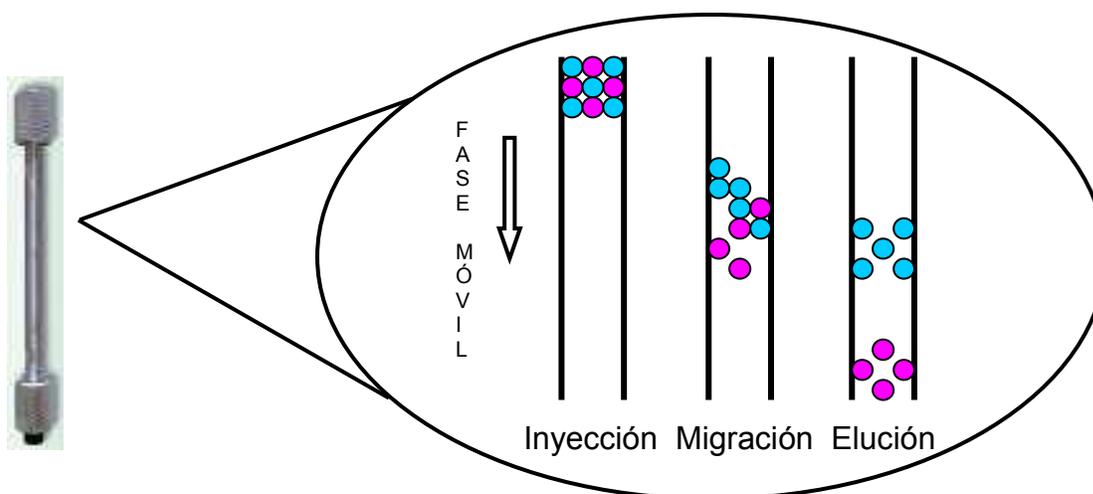
La migración diferencial en la HPLC es resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil.



Dichos componentes se separan en la columna y al salir de ésta son conducidos por la fase móvil en el orden en que emergieron, hacia un detector donde se registra una respuesta proporcional a su cantidad, sus concentraciones y sus tiempos de retención en la columna. El cromatograma resultante muestra cada compuesto que sale de la columna en forma de picos simétricos con un tiempo de retención característico por lo que este tiempo puede emplearse para identificar el compuesto. Este tiempo de retención (t_r) se mide desde el momento de la inyección de la muestra hasta el momento en que aparece el máximo del pico en el cromatograma.

Separación de los compuestos.

La separación de los compuestos depende de la columna y de la fase móvil. Los compuestos a separar se concentran en la columna con una inyección, después pasan a la migración llegando a la elución.



Fases estacionarias.

En cromatografía líquido-líquido, la fase estacionaria es una película que reviste el material empaquetado, formado por partículas de sílice porosa de 3-10 μm . La fase estacionaria puede ser parcialmente soluble en la fase móvil, lo que con el tiempo producen pérdidas de fase. Para evitar las pérdidas de fase estacionaria, ésta se une mediante enlaces covalentes a las partículas de sílice. Las **fases estacionarias ligadas** se fijan mediante una reacción entre las partículas de sílice y un organoclorosilano de fórmula general $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{RCl}$, donde R es un grupo alquilo o alquilo sustituido.

Las propiedades de la fase estacionaria dependen de la naturaleza del grupo alquilo del organosilano. Si R es un grupo funcional polar, la fase estacionaria será polar.

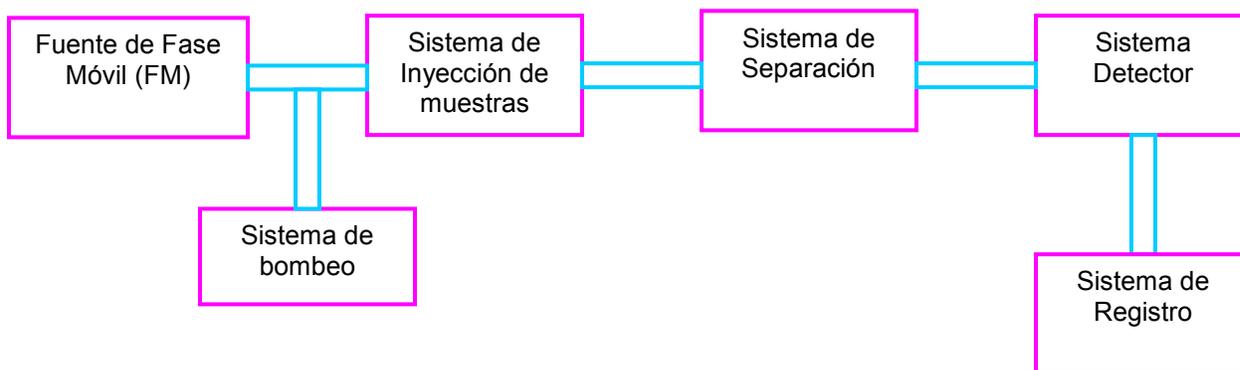
Como la fase estacionaria es polar, la fase móvil es un disolvente no polar o moderadamente polar. La combinación de una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar recibe el nombre de **cromatografía de fase normal**.

En la **cromatografía de fase inversa**, que es la forma más habitual de **HPLC**, la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es polar. Las fases estacionarias no polares más utilizadas tienen un organoclorosilano en el que el grupo R es una cadena de hidrocarburos *n*-octil (C₈) o *n*-octodecil (C₁₈). La mayoría de las separaciones en fase inversa se efectúan usando una disolución acuosa (buffer) como fase móvil polar. Como el sustrato de sílice se hidroliza en disoluciones básicas, el pH de la fase móvil debe ser inferior a 7.5.

Instrumentos para cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Para alcanzar velocidades de flujo razonables con los empaques de 3 a 10 μm que comúnmente se emplean en la cromatografía de líquidos moderna, es necesario aplicar presiones de varios cientos de atmósferas. Debido a estas presiones tan altas, el equipo para HPLC es mucho más elaborado y costoso.

Los componentes más importantes de un instrumento para HPLC son los siguientes:



Fuente de fase móvil (FM).

La fase móvil en cromatografía, es la fase que se desplaza a través del sistema. El orden de elución de los solutos en HPLC depende de la polaridad. En una separación de fase normal, el soluto menos polar pasa proporcionalmente menos tiempo en la fase estacionaria polar y es el primero que eluye de la columna. Los tiempos de retención se controlan seleccionando la fase móvil, de forma que las fases móviles menos polares producen tiempos de retención mayores. Si, por ejemplo, una separación es mala porque los solutos eluyen con demasiada rapidez, el uso de una fase móvil menos polar alargará los tiempos de retención, proporcionando más oportunidades para que la separación sea aceptable. Cuando dos solutos se separan de forma adecuada, el cambio a una fase móvil más polar puede proporcionar una separación aceptable y reducir la duración del análisis. En la separación de fase inversa, el orden de elución es el inverso, y el soluto que primero sale es el más polar. Si se aumenta la polaridad de la fase móvil, se prolongará el tiempo de retención, mientras que las fases móviles con polaridades menores acortan los tiempos de retención.

Elución isocrática frente a elución en gradiente. Cuando en una separación se usa una sola fase móvil de composición fija, se dice que la **elución es isocrática**. Sin embargo, a menudo es difícil encontrar una composición de fase móvil única adecuada para todos los solutos. Volviendo a la elución, una fase móvil adecuada para los solutos que eluyen primero pueden hacer que los tiempos de retención de los más tardíos sean excesivamente largos. Por otra parte, la optimización de las condiciones para los solutos que salen al final puede hacer que la separación de los primeros sea insuficiente. Para resolver este problema, puede recurrirse a un cambio de la composición de la fase móvil a lo largo del tiempo. En una separación de **fase inversa**, la composición inicial de la fase móvil es relativamente polar, para hacer que su polaridad sea cada vez menor a medida que la separación progresa. Estas separaciones se llaman **eluciones en gradiente**.

Características de la fase móvil.

- Reactivos grado HPLC.
- Inerte.
- Bajo punto de ebullición.
- Baja viscosidad. Para tener mejor eficiencia en la separación, ya que puede afectar en la transferencia de masa entre la fase móvil y la fase estacionaria.
- Debe ser compatible con el detector.
- Fuerzas iónicas y pH.
- Solubilidad con la muestra. Para ser transportada a través de la columna y va a depender de la fase estacionaria.
- Compatible con la columna.
- Baja toxicidad.
- Ser barato y accesible.
- No debe degradar o disolver a la fase estacionaria.

Recipientes para la fase móvil.

Los equipos modernos para HPLC vienen equipados con varios recipientes de vidrio o de acero inoxidable con capacidad de 500 mL o más para los disolventes. Es indispensable tomar precauciones para eliminar los gases disueltos y las partículas de polvo de los líquidos.

Desgasificación de la fase móvil.

El objetivo es quitar las burbujas de aire en el sistema cromatográfico.

Hay dos formas de desgasificar:

- a) Al vacío
- b) Con Sonicación

Sistema de bombeo.

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

La calidad de una bomba es determinada por el grado de estabilidad y reproducibilidad del flujo que genera.

Las bombas para cromatografía de líquidos deben cubrir los siguientes requisitos:

- La presión de salida debe estar libre de pulsos.
- Proporcionar velocidades de flujo de 0.1 a 10 mL/min.
- Debe tener un flujo reproducible dentro de un valor relativo de 0.5% o mejor.
- Ser resistente a la corrosión por diversos disolventes.

Las bombas que se emplean en HPLC son:

- **Isocráticas:** Son las que tiene una proporción constante respecto al tiempo. Es cuando la elución se mantiene constante, es decir, la composición de la fase móvil que es bombeada hacia la columna permanece constante durante todo el tiempo de análisis en el sistema cromatográfico.
- **Gradiente:** Son las que tienen un cambio de la proporción respecto al tiempo. Es cuando la elución se varía de un poder de elución bajo a uno alto, es decir, la composición de la fase móvil es cambiada durante el tiempo de análisis.

Dentro de las bombas de gradiente se encuentran:

- Binaria
 - Terciaria
 - Cuaternaria
 - Válvulas check
-
- Bomba de pistón con válvulas check: Tienen sellos, permiten la entrada y no el regreso. El pistón empuja y pasa a la columna, estas bombas nos dicen si la columna tiene algo, es decir, si ya está lastimada por las sales que le quedan y por lo tanto sería una desventaja por que se tendría que cambiar la válvula check.

Las presiones elevadas que generan las bombas para cromatografía líquida no representan un peligro de explosión porque los líquidos no son muy compresibles. La rotura de algún componente cuando mucho produce un escurrimiento del disolvente. Por seguridad, hay que evitar estas fugas porque pueden provocar un incendio.

Sistema de inyección de muestras.

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

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

Un segundo y mejor sistema consiste en inyectores con *asas* intercambiables de volumen fijo, las cuales pueden llenarse con un exceso de muestra; estos dispositivos desvían el flujo del disolvente mientras se introduce la muestra reanudándolo posteriormente a través del inyector y arrastrando un volumen constante de muestra. Estos sistemas son más precisos, pero se tienen que estar cambiando cuando es necesario inyectar volúmenes diferentes en una corrida analítica.

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

Esta validación se llevó a cabo con el tercer sistema.

Preparación de las muestras para su análisis. Las muestras en forma líquida pueden analizarse directamente, tras una limpieza adecuada para eliminar todas las partículas sólidas o tras una extracción adecuada para eliminar interferentes de la matriz.

Las muestras sólidas se disuelven primero en un disolvente adecuado o bien se disuelven los analitos de interés después de extraerlos.

Las inyecciones de la muestra se hacen automáticamente.

La introducción de la muestra al sistema más común es a través de una válvula de inyección o válvula de seis pasos, la cual consiste en un cuerpo fijo con un rotor de sello que gira y un bucle (“loop” en inglés) de muestra externo en el que se introduce la muestra, cuya capacidad puede ser de 5 a 200 microlitros.

La muestra se introduce, por tanto, usando un **bucle de inyección**. Los bucles de muestreo son intercambiables.

En cromatografía de líquidos, las muestras líquidas, sólidas y semisólidas necesitan disolverse en la fase móvil ya sea directamente en éste o en alguno de los disolventes que forme la fase móvil en caso de ser una mezcla de varios disolventes.

Sistema de separación.

En el sistema de separación se encuentra la columna empacada que contiene la fase estacionaria.

La columna de HPLC es considerada como el corazón de la separación.



Se considera a la columna como la parte fundamental de la cromatografía ya que es en ésta, donde se va a llevar a cabo la separación. El material de empaque seleccionado dependerá básicamente de la separación que se desee hacer.

Las dimensiones de una columna dependerán también del tipo de separación que se desee hacer.

Las columnas más comunes para cromatografía de líquidos son de 5, 10, 15, 20 y 25 cm de longitud y son empacadas con partículas de un diámetro extremadamente pequeño: 3, 5 o 10 μm . El diámetro interno de las columnas es usualmente de 4 a 4.6mm, estas características son consideradas como las más comprometidas entre el volumen de muestra que pasa por la columna, (capacidad de la columna) el consumo de fase móvil, velocidad y resolución.

Las separaciones por cromatografía de líquidos de alta eficiencia están basadas en las interacciones de las moléculas de analito en la superficie de la fase estacionaria y dependen de los sitios de equilibrio.

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

Por lo que respecta a las columnas analíticas y su relleno, este puede ser a base de partículas de una cerámica inorgánica (sílica o alúmina) o un polímero orgánico (poliestireno-divinilbenceno o metacrilatos). Se debe considerar la influencia de la geometría de la partícula en el empacamiento de la columna y por tanto en la eficiencia de la separación (partícula irregular o esférica). Se debe considerar también la porosidad de la partícula y la influencia que el tamaño del poro puede tener, sobre todo en separaciones fundamentadas en la diferencia de pesos moleculares. Se considera que el tamaño promedio de un poro de partículas de sílica para aplicaciones analíticas es de $100 \text{ \AA} \pm 20 \text{ \AA}$ (10^{-10} m). Aunado al tamaño del poro está la cantidad de poros que cada partícula presenta, lo cual le va a dar cierto grado de rigidez (poco porosa será mecánicamente muy resistente, muy porosa presentará mayor superficie de separación pero será más frágil). Una sílica con un volumen de poro específico de 1 mL/g se considera un material promedio. Otro parámetro importante asociado a la partícula es su tamaño; generalmente partículas de gran tamaño se emplean en cromatografía preparativa, en tanto que partículas pequeñas se emplean en separaciones muy rápidas. Los tamaños de partícula disponibles comercialmente son:

>10 μm , para técnicas preparativas.

10 μm , cromatografía semi-preparativa.

5 μm , es el tamaño más común en técnicas analíticas.

3 μm , para separaciones muy rápidas.

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

Las dimensiones de las columnas analíticas van de los 30 mm a los 300 mm de longitud, y de los 0,5 mm a los 4,6 mm de diámetro. Otra manera de mejorar la eficiencia y resolución es el empleo de hornos que mantienen una temperatura constante a lo largo de la columna. Cuando se tienen valores de k' muy semejantes entre dos o más analitos, es conveniente el empleo de temperatura para lograr buenas separaciones.

En general, las columnas utilizadas en cromatografía de líquidos son bastante durables, a menos que se utilicen de una manera destructiva, como por ejemplo: eluyentes demasiado ácidos o básicos, o continuas inyecciones de matrices complejas (eluyentes con partículas muy grandes).

Cabe mencionar, que la inmensa mayoría de los adsorbentes son de sílice. El mecanismo principal en la adsorción es la interacción de los grupos hidrófilo del gel de sílice con el grupo funcional polar de una molécula de soluto (o de disolvente). Los grupos silanol (Si-OH) se encuentran en la superficie y se extienden por ella en los canales internos de la estructura del poro. El número y el arreglo topográfico de los varios tipos de hidrófilo determinan la actividad del adsorbente y por lo tanto la retención de los solutos.

Los modelos actuales del proceso de adsorción suponen que los sitios de adsorción se encuentran completamente cubiertos ya sea por las moléculas del soluto o las del disolvente. Las moléculas del soluto o del disolvente se adsorben dependiendo de su fuerza relativa en esta interacción competitiva. La competencia entre la molécula del soluto y la de la fase móvil por un sitio activo proporciona la fuerza motriz y la selectividad de las separaciones.

En la cromatografía de líquidos con fases químicamente unidas se requiere unir químicamente un radical orgánico que será la fase estacionaria a una partícula sólida (como la sílica gel comúnmente empleada), y dependiendo de la polaridad del radical unido se tendrá la interacción.

En esta validación se utilizó una columna C18 que en la FEUM 9ª Ed. está considerada como L1 que es Octadecil-silano enlazado químicamente a sílica porosa o a micropartículas de cerámica de 5 μm a 10 μm de diámetro.

Sistema detector.

El sistema de detección es la parte del equipo cromatográfico que debe generar algún fenómeno físico y convertir éste en algo manejable para que permita ver y ubicar en tiempo la elución de cada componente de una muestra a la salida de la columna analítica.

Para controlar las separaciones en HPLC se han desarrollado numerosos detectores. Hasta la fecha, muy pocos de ellos son exclusivos para ese método y son, sobre todo, instrumentos autónomos o modificaciones adaptadas de los mismos.

Un detector puede ser de dos tipos, aquellos que miden alguna propiedad de:

1. la fase móvil.
2. el analito.

Detectores espectroscópicos. Los detectores más populares para HPLC se basan en medidas espectroscópicas tales como la absorción UV/Vis y la fluorescencia. Cuando se utiliza un detector UV/Vis (longitud fija o arreglo de diodos), el cromatograma resultante es una gráfica de absorbancia en función del tiempo de elución. Los aparatos que utilizan un espectrofotómetro de red de diodos registran la totalidad del espectro, proporcionando un cromatograma tridimensional que muestra la absorbancia en función de la longitud de onda y del tiempo de elución. Una limitación al uso de la absorbancia es que la fase móvil no debe absorber a la longitud de onda elegida.

Los detectores cumplen estas características:

- **Respuesta universal o selectiva.** Los detectores universales miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene al analito en comparación con la fase móvil pura y los detectores selectivos son sensibles a alguna propiedad del analito.
- **Linealidad.** El detector debe medir alguna propiedad del analito que se incremente proporcionalmente al aumentar la concentración.
- **Ruido.** Variaciones que se producen en la línea base del detector que se originan por pequeñas fallas en el sistema eléctrico, variaciones en el flujo eléctrico o temperatura, fluctuaciones en el voltaje, etc. El ruido nunca se atribuye a la muestra.
- **Sensibilidad.** Es la concentración mínima de un analito que puede ser detectada, la cuál debe producir una señal igual al doble del ruido del instrumento.

- **Estabilidad.** Debe soportar cambios de temperatura y variaciones de flujo.

Los detectores más utilizados en HPLC se dividen en 2 tipos tomando en cuenta la propiedad física que miden:

- **Espectroscópicos:** Espectrofotómetro UV-Visible, espectrofotómetro de fluorescencia, refractómetro y espectrómetro de masas.
- **Electroquímicos:** Conductímetro, amperímetro, voltamperímetro y coulombímetro.

El detector que se utilizó en esta validación fue el de arreglo de diodos y el de UV-Visible.

Arreglo de diodos y UV.

Existen dos tipos de detectores de UV-Visible para la cromatografía de líquidos, los de tipo dispersivo (que pueden ser de longitud de onda fija y de longitud de onda variable) y los de arreglo de diodos, cuyas características son las siguientes:

- Los espectrofotómetros de longitud de onda fija, utilizan filtros como sistema dispersivo o monocromático y normalmente trabajan a 254, 275 y 284 nm.
- Los espectrofotómetros de longitud de onda variable cuentan con un sistema dispersivo o monocromático que permite variar la longitud de onda a la que se quiere trabajar, lo cual permite aumentar la sensibilidad ya que se puede trabajar a la longitud de máxima absorción del analito de interés.

- Los espectrofotómetros de arreglo de diodos emplean un sistema óptico invertido, utilizan un espejo holográfico que realiza una primera dispersión de la radiación electromagnética y la dirige al detector conocido como arreglo de diodos, estos diodos responden de manera específica para cada fotón por lo que se tiene una respuesta inmediata obteniéndose el espectro de UV-Visible completo como se va generando el cromatograma, y así se puede tener el espectro de cada uno de los picos cromatográficos y también se pueden generar varios cromatogramas a diferentes longitudes de onda al mismo tiempo, lo cuál no es posible realizar con los sistemas dispersivos; debido a la gran cantidad de información que se obtiene es necesario contar con una computadora como sistema de registro para poder almacenarla y procesarla.

Sistema de registro.

La IUPAC define a un cromatograma como “un gráfico u otra representación de la respuesta del detector, concentración del efluente u otra cantidad usada como una medida de la concentración del efluente, versus el volumen de efluente o tiempo”.

El cromatograma se empieza a generar desde el momento en que la muestra es inyectada, las señales que aparecen serán de importancia para realizar análisis cuantitativos y cualitativos de las señales que más interesen, de éste se obtienen varios parámetros de importancia en el trabajo cromatográfico.

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

El método más sencillo de medición es mediante la altura de los picos desde la línea base hasta el máximo del pico, aunque es deseable tener una línea base estable para obtener la máxima precisión. Otros métodos de medición involucran el cálculo del área bajo el pico. Dicha área puede calcularse de muy diversas maneras: si el pico es simétrico puede medirse el área por triangulación prolongando los lados del pico hasta la línea base midiendo el ancho y la altura del pico. Otra forma es utilizando un planímetro o bien, recortando y pesando el área obtenida.

En el caso del graficador es necesario ajustar la velocidad de la señal para obtener un cromatograma adecuado y calcular manualmente la intensidad de la respuesta generada por cada pico.

El uso de integradores electrónicos evita los errores en la medición de las áreas. Estos integradores registran las señales e imprimen el área de los picos en forma numérica. Por último, el empleo de una computadora y el software adecuado puede facilitar el procesamiento de los datos, desde el algoritmo empleado para la integración, hasta la construcción de curvas de calibración y cuantificación de los picos. Dichos programas deben cumplir con ciertos criterios de aseguramiento de la calidad.

Verificación del sistema.

El buen funcionamiento de un sistema cromatográfico se verá reflejado en la calidad del análisis. Es necesario considerar por esta razón todos los componentes del sistema (columna, velocidad de flujo, flujo de gas transportador, temperatura de operación, entre otros) para obtener resultados óptimos.

Es conveniente preparar una curva de calibración a concentraciones adecuadas, a las condiciones especificadas para el fármaco en análisis, así como inyectar blancos para poder detectar alguna posible interferencia.

Las especificaciones de la columna y los parámetros del instrumento en la monografía correspondiente no excluyen otras condiciones de operación adecuadas. Las variaciones normales en el equipo y en los materiales pueden requerir ajustes de las condiciones experimentales para obtener una operación aceptable.

Para asegurar la efectividad del sistema, es necesario someterlo a una prueba antes de utilizarse. La esencia de este tipo de pruebas es el concepto de que el equipo en general, las partes electrónicas, las operaciones analíticas y la muestra, constituyen un sistema analítico completo el cual puede someterse a una prueba general de funcionamiento del sistema. Se pueden obtener datos específicos de inyecciones repetidas (no menos de seis inyecciones) de una preparación ya sea de la muestra, de la SRef o del estándar interno (es una sustancia que se añade a la muestra en una cantidad constante).

Estos datos pueden ser comparados con valores máximos y mínimos especificados tales como eficiencia, precisión interna, resolución, tiempo de retención, naturaleza de la curva de calibración, respuesta y recobros (entre otros parámetros), de acuerdo a lo especificado en las monografías individuales.

El parámetro más útil es la reproducibilidad de inyecciones repetidas de la solución analítica mezclada con la solución de estándar interno, preparadas a partir de la SRef como se indica en la monografía individual. La reproducibilidad de las inyecciones repetidas se expresa como el **coeficiente de variación** de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$CV = \frac{100}{\bar{X}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Donde:

CV = Coeficiente de variación expresado en por ciento.

\bar{X} = Media de una serie de n determinaciones.

X_i = Medida individual.

Cuando se utiliza el estándar interno la X_i usualmente se refiere a la medida del área relativa, (A_s):

$$X_i = A_s = \frac{a_r}{a_i}$$

Donde:

a_r = Área del pico correspondiente a la sustancia problema.

a_i = Área del pico correspondiente al estándar interno.

Cuando se utiliza la altura del pico para la cuantificación, la medida X_i , indica la altura relativa, (H_s).

$$X_i = H_s = \frac{h_r}{h_i}$$

Donde:

h_r = A la altura del pico correspondiente a la sustancia problema.

h_i = A la altura del pico correspondiente a la referencia interna.

Algunas veces es útil establecer un factor de coleo para limitar el máximo permisible con relación a la asimetría del pico. Para propósitos farmacopeicos, **el factor de coleo T**, se define como la relación de la distancia del ancho del pico, W dividido entre dos veces la distancia, f. Estas distancias deben medirse a un punto que corresponda a un 5 por ciento de la altura partiendo de la línea base. Para un pico simétrico el factor de coleo es la unidad y el valor de T aumenta conforme el coleo va siendo más pronunciado.

El cálculo se expresa por la fórmula:

$$\text{Factor de Coleo} = T = \frac{W}{2f}$$

La **eficiencia** es un indicador del ensanchamiento de un pico durante su separación, una medida de la eficiencia de una columna en particular se puede conocer calculando el número de platos teóricos (**N**) en la columna con la siguiente fórmula:

$$N = 16 \left[\frac{t}{W} \right]^2$$

Donde:

t = Tiempo de retención de la sustancia

W = Ancho de la base del pico obtenido extrapolando los lados del pico hasta la línea base, en las mismas unidades de tiempo que t.

El valor de N es dependiente de la sustancia que está siendo analizada y de las condiciones de operación tales como la velocidad de flujo, la temperatura, la cantidad del empaque de la columna y la uniformidad de éste.

Como una medida de la eficiencia de la separación de dos componentes en una mezcla, **la resolución, R**, se determina por la siguiente fórmula:

$$R = 2 \frac{t_2 - t_1}{W_2 + W_1}$$

Donde:

t_1 y t_2 = Tiempos de retención para los componentes

W_2 y W_1 = Anchos correspondientes de las bases de los picos obtenidos extrapolando los lados de los picos hasta la línea base.

El factor de **resolución (R)** es importante para asegurar la separación de dos componentes que eluyen muy cercano uno del otro y para establecer la eficiencia del sistema.

La separación entre dos picos, o resolución, depende tanto de la selectividad como de la eficiencia cromatográfica.

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

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

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

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

Aplicaciones cuantitativas.

HPLC se utiliza de forma habitual para análisis tanto cuantitativos como cualitativos de muestras medioambientales, farmacéuticas, industriales, forenses, clínicas y de bienes de consumo.

Cálculos cuantitativos. A menudo, los análisis cuantitativos son más fáciles de llevar a cabo con **HPLC** ya que las inyecciones se hacen mediante un bucle de inyección de volumen fijo en lugar de una jeringa. En consecuencia, las variaciones en la cantidad de muestra inyectada se reducen al mínimo y las medidas cuantitativas pueden hacerse usando patrones externos y una curva de calibración normal.

Análisis cuantitativo.

Basado en la medición de las áreas o alturas de los picos cromatográficos dados por los compuestos que eluyen en el sistema cromatográfico y que son obtenidos en el cromatograma.

Se trabajan los siguientes métodos cuantitativos:

- ✓ Normalización.
- ✓ Normalización con F_r = Pendiente.
- ✓ Estándar externo.
- ✓ Estándar interno.
- ✓ Adición patrón.

En este trabajo se aplicó el método de estándar externo, por lo que se dará una explicación de éste.

Método del estándar externo.

Se basa en la ecuación:

$$Fr = \text{Área} / \text{Conc.}$$

Donde:

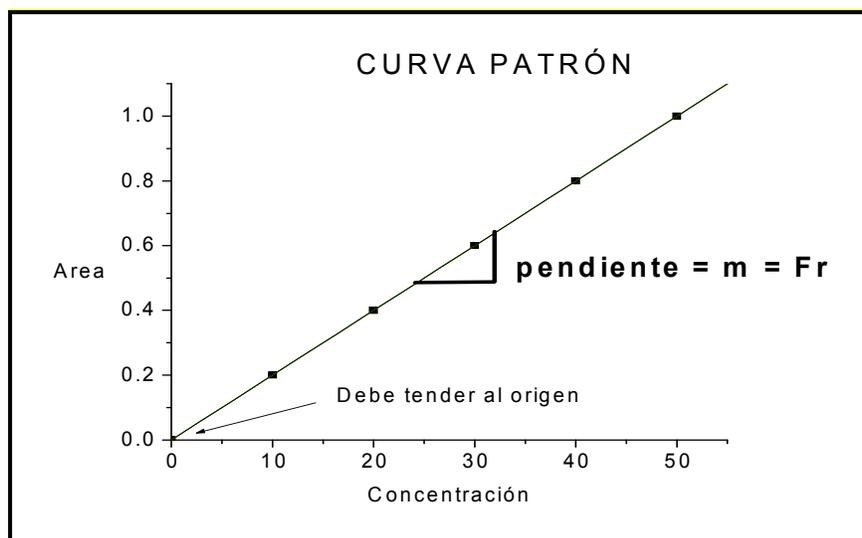
Fr = Pendiente

Conc.= Concentración

Si la ecuación anterior se reordena queda:

$$\text{Área} = Fr \times \text{Conc.}$$

Lo anterior dice que si se gráfica Área vs Conc. se deberá obtener una curva de calibración que deberá tener una tendencia lineal, hacia el origen y cuya pendiente es el Fr.



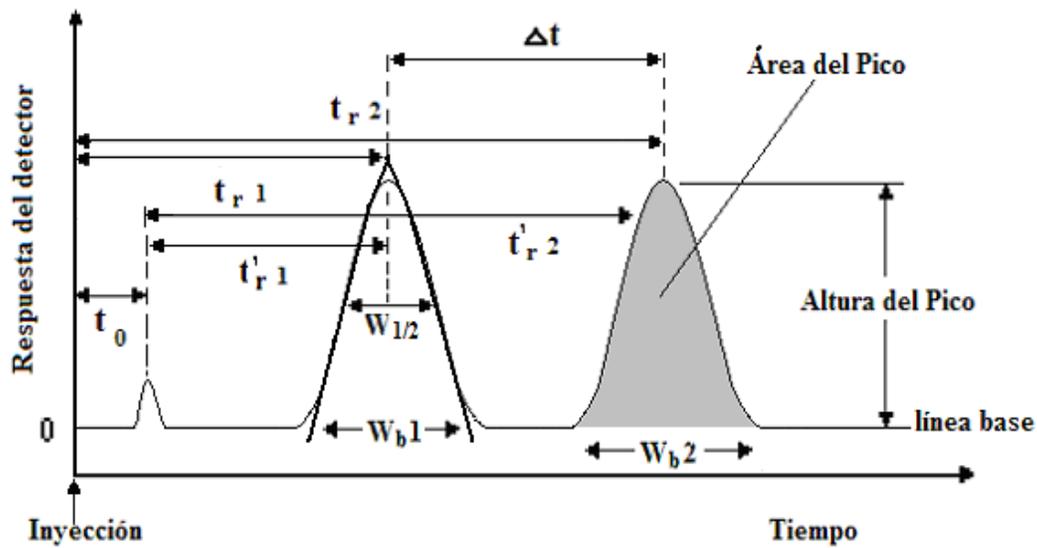
Características ideales de la curva patrón para aplicar la ecuación del método de estándar externo.

Análisis cualitativo.

El análisis cualitativo está basado en la medición de los tiempos de retención (t_r) de los picos cromatográficos de los compuestos que eluyen en el sistema y que son obtenidos en el cromatograma.

Se pueden trabajar las siguientes opciones:

- La comparación entre los t_r de los compuestos obtenidos en la muestra con los de los estándares de éstos inyectados de manera separada a las mismas condiciones cromatográficas.
- La adición de estándares a la muestra se realiza en el caso de que se tengan más de 2 compuestos que dan tiempos de retención muy semejantes pero no iguales a la muestra.
- Comparación en 2 ó más fases estacionarias. Esto se realiza cuando aún realizando las 2 técnicas anteriores se tienen 2 ó más compuestos que dan los mismos t_r .



Cromatograma y parámetros medibles en el mismo.

A continuación se dan algunas definiciones importantes que se utilizan en la lectura de los cromatogramas.

Eficiencia: Es un indicador del ensanchamiento de un pico durante su separación, y está reflejada por el número de platos teóricos (N) de la columna en donde se realiza el proceso cromatográfico. Me dice que tan bueno es mi sistema para separar la muestra.

Factor de Capacidad k' : Es la masa del analito entre la masa del analito en la fase móvil.

Número de platos teóricos: Son una serie de equilibrios, es decir, interacciones que existen entre la muestra y la fase estacionaria (FE). Entre más a fin es el analito tarda más en salir y entre menos a fin es el analito tarda menos en salir.

Resolución R: Nos indica que tan separado está un pico con respecto a otro.

Selectividad (α): Nos dice que tan afín es el analito (muestra) a la fase estacionaria.

Tiempo muerto (t_0): Es el tiempo que tarda un analito en cruzar todo el sistema pero no interactúa con la FE.

Tiempo de Retención (t_r): Es el tiempo que tarda el analito en cruzar el sistema e interactuar con la FE.

Tiempo de retención corregido (t_r'): Es la resta de $t_r - t_0$

Wb: Es el ancho de la base en un pico.

Para llevar a cabo esta validación se utilizó un Espectrofotómetro Waters 2695 con un detector de diodos Waters 2487:



De acuerdo a éste espectrofotómetro la secuencia de inyecciones fue la siguiente:

Adecuabilidad del sistema:

- Se verificó la adecuabilidad del sistema por análisis y si hubiera existido un cambio significativo en el equipo o en los reactivos importantes se tenía que verificar nuevamente.
- A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, se emplean los datos de cinco inyecciones repetidas del analito para calcular la desviación estándar relativa (RSD), si el requisito de RSD es 2.0% se emplean los datos de 6 inyecciones repetidas.

Limpieza de la columna y del equipo.

Al terminar el análisis perfectamente según las indicaciones del proveedor (el Method Set de lavado debe cumplir con lo sugerido por el fabricante). Para los cuidados de la columna se sigue un procedimiento interno. Cuando se guarde la columna se debe colocar en cada extremo un tornillo para prevenir la evaporación del solvente de almacenamiento.

Se debe programar un sistema de lavado para cada columna dependiendo de la fase móvil utilizada. Para nuestro sistema el método de lavado de la columna fue el siguiente gradiente:

	Tiempo	Flujo	%A	%B	%C	%D	Curva
1	0.00	1.00	100.0	0.0	0.0	0.0	6
2	30.00	1.50	100.0	0.0	0.0	0.0	6
3	120.00	1.50	100.0	0.0	0.0	0.0	6
4	200.00	1.00	60.0	0.0	40.0	0.0	6
5	260.00	1.00	30.0	0.0	70.0	0.0	6
6	280.00	1.00	30.0	0.0	70.0	0.0	6
7	330.00	1.00	50.0	0.0	50.0	0.0	6
8	345.00	0.00	50.0	0.0	50.0	0.0	6

Nombre de archivo: TESIS_UNAM5_CAP2.doc
Directorio: D:\Documents and Settings\jaimes\Mis documentos
Plantilla: D:\Documents and Settings\jaimes\Datos de
programa\Microsoft\Plantillas\Normal.dotm
Título: CAPITULO 2
Asunto:
Autor: fonsecgu
Palabras clave:
Comentarios:
Fecha de creación: 11/11/2010 18:22:00
Cambio número: 38
Guardado el: 29/10/2011 19:07:00
Guardado por: MARY
Tiempo de edición: 2,694 minutos
Impreso el: 24/11/2011 10:56:00
Última impresión completa
Número de páginas: 28
Número de palabras: 5,492 (aprox.)
Número de caracteres: 30,207 (aprox.)

CAPÍTULO 3

Información de la molécula de cefadroxilo

El cefadroxilo pertenece a las cefalosporinas.

En 1948, Brotzu aisló a *Cephalosporium acremonium* que fue la primera fuente de cefalosporinas del agua de mar cerca de una descarga de aguas negras en la costa de Cerdeña. Los filtrados “en bruto” del cultivo de dicho hongo inhibieron la proliferación in vitro de *Staphylococcus aureus* y curaron infecciones estafilocócicas y fiebre tifoidea en seres humanos.

Mecanismos de acción.

Las cefalosporinas inhiben la síntesis de la pared bacteriana.

Clasificación.

La obtención de un sin número de cefalosporinas en los últimos 10 años ha obligado a crear un sistema de clasificación propio. A pesar de que ellas pueden clasificarse con base en su estructura química, características de farmacología clínica, resistencia a la β -lactamasa o espectro antimicrobiano, el sistema aceptado de clasificación es por “generaciones”.

La clasificación por generaciones se basa en características generales de acción antimicrobiana (Karchmer, 1995).

- La “primera generación” incluyó compuestos con actividad contra gérmenes grampositivos, pero moderada contra gramnegativos.

- La “segunda generación” comprendió productos con actividad un poco mayor contra microorganismos gramnegativos y algunos medicamentos con efectos contra anaerobios.
- La “tercera generación” tiene compuestos con menor actividad contra microorganismos grampositivos, pero posee acción mucho más intensa contra *Enterobacteriaceae*, y un subgrupo activo contra *Pseudomona aeruginosa*.
- La “cuarta generación” tiene entre sus miembros productos con un espectro semejante al de la tercera, pero una mayor estabilidad a la hidrólisis por β -lactamasas.

Características generales de las cefalosporinas.

Las cefalosporinas se absorben después de la ingestión y es posible administrarlos por vía oral. Se excretan de manera predominante por riñón y por ello hay que modificar sus dosis en personas con insuficiencia renal. Algunas cefalosporinas penetran en el líquido cefalorraquídeo a concentración suficiente para ser útiles en el tratamiento de meningitis. Las cefalosporinas también cruzan la placenta; aparecen en elevadas concentraciones en los líquidos sinovial y pericárdico. La penetración en el humor acuoso del ojo es relativamente adecuada después de administración sistémica de los compuestos de la tercera generación, pero es poca la penetración en el humor vítreo. Hay algunos datos de que las concentraciones suficientes para el tratamiento de infecciones oculares por grampositivos y de algunos gramnegativos se logran después de la administración sistémica.

Reacciones adversas.

El efecto adverso más común de las cefalosporinas es la hipersensibilidad (Petz, 1978) y no hay datos de que una sola de ellas tenga mayor o menor propensión a causar esta manifestación. Las reacciones al parecer son idénticas a las generadas por las penicilínicas y ello depende de la estructura β -lactámica compartida por ambos grupos de antibióticos (Bennett y col., 1983). Se observan reacciones inmediatas como anafilaxia, broncoespasmo y urticaria.

Aplicaciones terapéuticas.

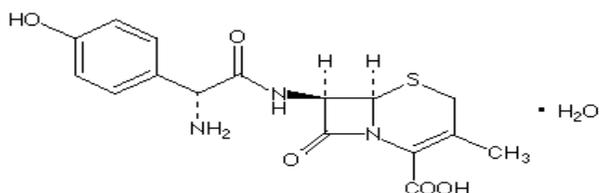
Las cefalosporinas se utilizan ampliamente y son antibióticos de importancia en terapéutica, por desgracia, su abuso en situaciones en que sería más conveniente utilizar compuestos con un espectro de acción menos amplio ha dado por resultado la aparición de muy diversos tipos de bacterias resistentes a su actividad. Los estudios en seres humanos han indicado que las cefalosporinas son eficaces como medicamentos terapéuticos y profilácticos.

Descripción: Es un antibiótico cefalosporínico para administración oral.

Características físicas y químicas

Fórmula condensada: $C_{16}H_{17}N_3O_5S \cdot H_2O$

Formula desarrollada:



Nombre químico: 5-Thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylic acid, 7-[[amino(4-hydroxyphenyl)acetyl]amino]-3-methyl-8-oxo-, monohydrate (6R-[6 α ,7 β (P*)])–.

Descripción: Es un antibiótico semisintético cefalosporínico para administración oral, indicado para el tratamiento de infecciones debidas a microorganismos sensibles.

Peso molecular: 381.41g/mol

Propiedades químicas: El cefadroxilo es un polvo fino de color blanco que puede encontrarse como cefadroxilo monohidrato y como cefadroxilo anhidro, es soluble en agua además de ser ligeramente soluble en metanol, 4g/mol en su forma monohidratada, un punto de ebullición de 197°C. Tiene tres valores de pKa, 2,64 (que corresponde al ácido carboxílico), 7,30 (que corresponde al grupo α amino) y 9,69 (correspondiente al grupo fenólico); se clasifica como agente antimicrobiano. Su nombre químico IUPAQ es: ácido – 8 - [2 – amino – 2 - (4 - hidroxifenil) - acetil] - amino - 4 - metil - 7 - oxo - 2 - tia - 6 - azabicyclo - [4.2.0] - oct - 4 - ene - 5 – carboxílico.

Presentaciones en las que se encuentra el cefadroxilo.

El cefadroxilo monihidratado se encuentra en las siguientes presentaciones comerciales en México con el nombre de Duracef[®]: cápsulas, tabletas y suspensiones.

Indicaciones terapéuticas: Es un antibiótico cefalosporínico para administración oral; está indicado en el tratamiento de las siguientes infecciones, debidas a microorganismos sensibles:

- Infecciones respiratorias
- Infecciones de la piel y tejidos blandos
- Infecciones del tracto genitourinario
- Otras infecciones como la osteomielitis y artritis séptica

Farmacocinética y farmacodinámica en humanos.

Farmacología clínica: Se absorbe rápidamente después de administrarse oralmente. A dosis única de 500 y 1000mg, alcanza concentraciones en suero máximas aproximadamente de 16 y 28 μ g/mL, respectivamente. Se obtienen niveles detectables hasta 12 horas después de administrarse. Más del 90% del medicamento es excretado sin cambios por la orina dentro de 24 horas. Las concentraciones máximas en orina son aproximadamente 1800 μ g/mL durante el periodo siguiente a la administración única de 500mg. Los incrementos en la dosis generalmente producen un aumento proporcional en la orina.

Microbiología: Pruebas *in Vitro* demuestran que las cefalosporinas son bactericidas debido a la inhibición de la síntesis de la pared celular. Esta molécula es activa contra los siguientes organismos *in Vitro*:

- *Streptococo beta hemolítico*
- *Estafilococo*, incluyendo coagulasa-positivo, coagulasa-negativo y cepas productoras de betalactamasa
- *Streptococcus (Diplococo) pneumoniae*
- *Escherichia coli*
- *Proteus mirabilis*
- *Klebsiella spp*
- *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*
- Otras cepas de microorganismos gramnegativos sensibles son: *H. influenzae*, *Salmonella ssp* y *Shigella ssp*.

La mayoría de las cepas de enterococo (*Streptococcus faecalis* y *S. Faecium*) son resistentes.

No es activo contra todas las cepas de *Enterobacter especies*, *P. Norgani* y *P. vulgaris*. No tiene actividad contra *Pseudomonas sp* y *Acinetobacter calcoaceticus*.

Contraindicaciones: Está contraindicado en pacientes con alergia conocida al grupo de antibióticos cefalosporínicos.

Advertencias: En pacientes alérgicos a la penicilina, los antibióticos cefalosporínicos deberán administrarse con gran cuidado, ya que existe evidencia clínica y de laboratorio de alergenidad parcial cruzada entre cefalosporinas y penicilinas.

Existen, además, antecedentes de pacientes que han reaccionado con alergia a ambos fármacos incluyendo anafilaxia fatal (que es una reacción alérgica severa en todo el cuerpo) después del uso parenteral (vía intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraósea que es un acceso vascular de urgencia para la infusión de fármacos y líquidos).

Precauciones: Los pacientes deben ser vigilados cuidadosamente para que cualquier efecto o manifestación anormal al medicamento pueda ser detectado. Si ocurre una reacción de hipersensibilidad, debe ser discontinuado. En pacientes con insuficiencia renal o con sospecha de ella, deben realizarse observaciones clínicas cuidadosas y estudios de laboratorio, antes y durante el tratamiento.

Precauciones o restricciones de uso durante el embarazo y la lactancia:

Uso en el embarazo y lactancia: Se han realizado estudios de reproducción en ratas y ratones administrando hasta 11 veces la dosis empleada en seres humanos; estos no han revelado alteraciones en fertilidad, como daño al feto, debido al uso de cefadroxilo, sin embargo, no se han realizado estudios clínicos bien controlados en la mujer embarazada. Debido a que los estudios en animales no siempre reproducen la respuesta en humanos, el medicamento deberá emplearse durante el embarazo, solamente si es claramente necesario.

Reacciones secundarias y adversas.

Gastrointestinales: Pueden aparecer durante el tratamiento síntomas de colitis pseudomembranosa. Se han reportado raramente náuseas y vómito. La administración con alimentos disminuye las náuseas y no altera la absorción de cefadroxilo. También puede presentarse diarrea.

Hipersensibilidad: Se han observado reacciones alérgicas en forma de prurito, urticaria y angioedema; estas reacciones usualmente desaparecen al discontinuar el medicamento.

Nombre de archivo: TESIS_UNAM6_CAP3.doc
Directorio: D:\Documents and Settings\jaimes\Mis documentos
Plantilla: D:\Documents and Settings\jaimes\Datos de
programa\Microsoft\Plantillas\Normal.dotm
Título: CAPITULO 3
Asunto:
Autor: fonsecgu
Palabras clave:
Comentarios:
Fecha de creación: 11/11/2010 18:23:00
Cambio número: 27
Guardado el: 30/10/2011 15:04:00
Guardado por: MARY
Tiempo de edición: 423 minutos
Impreso el: 24/11/2011 10:56:00
Última impresión completa
Número de páginas: 7
Número de palabras: 1,389 (aprox.)
Número de caracteres: 7,645 (aprox.)

CAPÍTULO 4

Diseño experimental

Llevar a cabo la validación de la determinación de impurezas de cefadroxilo por HPLC en cápsulas, tabletas y suspensiones por un método no farmacopéico, mediante la realización de las pruebas establecidas a continuación:

- 4.5.1 Adecuabilidad del sistema
- 4.5.2 Precisión del sistema
- 4.5.3 Especificidad
- 4.5.4 Especificidad para métodos indicativo de estabilidad
- 4.5.5 Linealidad del sistema
- 4.5.6 Linealidad del método
- 4.5.7 Exactitud Repetibilidad
- 4.5.8 Precisión intermedia
- 4.5.9 Robustez
 - 4.5.9.1 Estabilidad de la muestra y estándar de trabajo
 - 4.5.9.2 Variación de los métodos de filtración
- 4.5.10 Tolerancia
 - 4.5.10.1 El factor a evaluar es: Sistema cromatográfico
 - 4.5.10.2 Extractabilidad de la muestra
- 4.5.11 Sensibilidad del método (Límite de detección y cuantificación)
 - 4.5.11.1 Límite de detección
 - 4.5.11.2 Límite de cuantificación

Para realizar ésta validación se utilizó lo siguiente:

- 4.1 Equipos e instrumentos (TABLA A)
- 4.2 Reactivos, estándares, columnas (TABLA B)
- 4.3 Soluciones (TABLA C)
- 4.4 Registro de condiciones de operación del sistema (TABLA D)
- 4.5 Procedimiento
- 4.5.12 Criterios de aceptación

A continuación se muestran las tablas de lo que se utilizó para realizar ésta validación.

4.1 Lista de equipos / instrumentos.

TABLA A

Equipo/ Instrumento	Marca	Fecha última calibración	Fecha próxima calibración	Fecha próximo mantenimiento
Módulo de separación	Waters	29 Ene 2009	29 Ene 2010	29 Ene 2010
Detector arreglo de fotodiodos	Waters	29 Ene 2009	29 Ene 2010	29 Ene 2010
Módulo de separación	Waters	30 Ene 2009	30 Ene 2010	30 Ene 2010
Detector UV	Waters	30 Ene 2009	30 Ene 2010	30 Ene 2010
Balanza	Sartorius	05 Feb 2009	Feb 2010	Feb 2010
Balanza	Sartorius	04 Feb 2009	Feb 2010	Feb 2010
Balanza	Explorer	04 Feb 2009	Feb 2010	Feb 2010
Agitador Magnético	Cole Parmer	19 Ene 2009	19 Ene 2010	19 Ene 2010
Agitador Magnético	Lab-Line Multi- Magnestir	19 Ene 2009	19 Ene 2009	19 Ene 2010
Potenciómetro	Inolab	20 Feb 2009	20 Ago 2010	20 Ago 2010
Sonicador	Branson	13 Mar 2009	13 Mar 2010	13 Mar 2010

4.2 Lista de reactivos / estándares / columnas.

TABLA B

Reactivo / Estándar	Potencia $\mu\text{g}/\text{mg}$	Fecha de Caducidad
Fosfato de potasio monobásico	N/A	02 ABR 2014
Acetonitrilo grado HPLC	N/A	30 MAR 2014
STD de referencia de cefadroxilo	943 $\mu\text{g}/\text{mg}$	31 DIC 2010
Ácido o-fosfórico	N/A	30 JUN 2013
Hidróxido de potasio	N/A	10 AGO 2012
Empaque (L1) Columna LiChrosorb RP-18 (Merck)	N/A	N/A
Empaque (L1) Columna alterna Symmetry C-18 5micras 4.6X250mm (Waters)	N/A	N/A

4.3 Soluciones.

TABLA C

Soluciones	
Fase móvil A (Diluyente)	Solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico. Disolver 5.44g de KH_2PO_4 en 2 litros de agua y mezclar hasta que se disuelva completamente. Ajustar el pH a 5.0 usando KOH 1% y desgasificar para su uso posterior.
Fase móvil B	Combinar 400mL de acetonitrilo con 600mL de solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico. Ajustar el pH a 5.0 usando ácido fosfórico 2%. Desgasificar para su uso posterior.
Estándar	Solución Stock: Pesar aproximadamente 100mg de ER (Estándar de Referencia) de cefadroxilo y colocarlos en un matraz volumétrico de 100mL y diluir con diluyente, llevar a volumen (concentración de 1.0mg/mL). Sonicar y agitar aproximadamente 5 minutos hasta completa disolución. Solución de trabajo: Pipetear 1.0mL del Stock de el estándar en un matraz volumétrico de 100mL después diluir a volumen con diluyente y mezclar (concentración de 0.01mg/mL).
Muestra	Cápsulas de 250mg y 500mg. Combinar el polvo de 20 unidades y pesar el equivalente a $100\text{mg} \pm 10\text{mg}$ de cefadroxilo, colocarlos en un matraz volumétrico de 100mL, diluir y llevar a volumen con diluyente. Agitar y/o sonicar aproximadamente por 30 minutos hasta obtener una solución con un ligero asentamiento (suspensión final). Filtrar la muestra a través de un acrodisco de PVDF $0.45\mu\text{m}$, descartar los primeros 2mL de la solución filtrada para permitir que se sature el filtro, para inyectar posteriormente. (Concentración de 1mg/mL).

Soluciones	
Muestra	<p>Tabletas de 1g.</p> <p>Combinar el polvo de 20 unidades y pesar el equivalente a $100\text{mg} \pm 10\text{mg}$ de cefadroxilo, colocarlos en un matraz volumétrico de 100mL, diluir y llevar a volumen con diluyente. Agitar y/o sonicar aproximadamente por 30 minutos hasta obtener una solución transparente. Filtrar la muestra a través de un acrodisco de PVDF $0.45\mu\text{m}$, descartar los primeros 2mL de la solución filtrada para permitir que se sature el filtro, para inyectar posteriormente. (Concentración de 1mg/mL).</p> <p>Suspensión Oral. 125mg/5mL (A) 250mg/5mL (B) 500mg/5mL (C)</p> <p>Reconstituir el bote (envase) como se indica en la etiqueta de instrucciones y agitar por 15 minutos.</p> <p>Transferir 10mL de (A) reconstituido en un matraz volumétrico de 250mL. (Concentración de 1mg/mL).</p> <p>.</p> <p>Transferir 5mL de (B) reconstituido en un matraz volumétrico de 250mL. (Concentración de 1mg/mL).</p> <p>Transferir 5mL de (C) reconstituido en un matraz volumétrico de 500mL. (Concentración de 1mg/mL).</p> <p>Diluir a volumen con diluyente. Mezclar con agitador magnético por 10 minutos. Filtrar la muestra a través de un acrodisco de PVDF $0.45\mu\text{m}$, descartar los primeros 2mL de la solución filtrada para permitir que se sature el filtro para inyectar posteriormente.</p>
Blanco	Fase Móvil A.

Soluciones	
Placebo	<p>Cápsula.</p> <p>Pesar el placebo equivalente 10 veces el contenido de 100mg de producto terminado y diluirlo en 100mL de fase móvil.</p> <p>Tableta.</p> <p>Pesar el placebo equivalente 10 veces el contenido de 100mg de producto terminado y diluirlo en 100mL de fase móvil.</p> <p>Suspensión.</p> <p>Pesar y reconstituir con agua el placebo equivalente a 100mL de suspensión, transferir 5mL de placebo y procesar igual que la muestra.</p> <p>Placebo por componente.</p> <p>Pesar el equivalente al contenido de cada componente a 5mL de suspensión y disolver en el diluyente cbp 100mL de solución.</p>

4.4 Registro de condiciones de operación del sistema.

TABLA D

Sistema	
Temperatura de columna	Prevaleciendo a temperatura ambiente
Flujo	1.0mL/min
Volumen de inyección	20µl
Longitud de onda	254nm
Gradiente	0 – 5 minutos 2% Fase móvil B 5 – 35 minutos Gradiente lineal para 32% Fase móvil B 35 – 60 minutos 32% Fase móvil B 60 – 61 minutos 2 % Fase móvil B
Tiempo posterior	10 minutos
Tiempo de corrida	60 minutos

4.5 Procedimiento.

4.5.1 Adecuabilidad del sistema.

Preparar la solución del estándar como se indica en la TABLA C, filtrar a través de un acrodisco de PVDF de 0.45 μ m, descartar los primeros 2mL de la solución filtrada para permitir que se sature el filtro, inyectar la solución al sistema cromatográfico 6 veces.

Calcular los parámetros de adecuabilidad del sistema de acuerdo a lo establecido en el método analítico.

4.5.2 Precisión del sistema.

Preparar la solución del estándar como se indica en la TABLA C, filtrar a través de un acrodisco de PVDF de 0.45 μ m, descartar los primeros 2mL de la solución filtrada para permitir que se sature el filtro, inyectar la solución al sistema cromatográfico 6 veces.

Calcular: el promedio, desviación estándar y CV de la respuesta analítica.

4.5.3 Especificidad.

Preparar la solución del estándar como se indica en la TABLA C, filtrar a través de un acrodisco de PVDF de 0.45 μ m, descartar los primeros 2mL de la solución filtrada para permitir que se sature el filtro, inyectar la solución al sistema cromatográfico 6 veces.

TABLA E

Solución de prueba a inyectar
Fase móvil A
Fase móvil B
Placebo cápsula
Placebo tableta
Placebo suspensión
Estándar
Muestra

En caso de que algún componente del placebo presente señal entonces inyectar cada uno por separado con el fin de saber a cual de los componentes se debe esa señal.

Sobreponer los cromatogramas con el propósito de mostrar que el pico generado por el compuesto de interés se encuentra separado de picos generados por la fase móvil y diluyente.

Realizar el análisis de los espectros para determinar homogeneidad y pureza de los picos bajo la comparación de los parámetros de purity angle y purity threshold a las muestras que presentan el pico de cefadroxilo y cualquier otro pico que se presente en cada una de las inyecciones y que estos picos no se presenten en los cromatogramas de las fases móviles, diluyente o placebo.

El criterio de aceptación es que el valor de purity angle debe ser menor que el de purity threshold, siendo que mientras el valor de purity angle esté más cercano a cero y purity angle esté más cercano a uno indicará que el pico del activo (cefadroxilo) es más puro.

El purity angle y el purity threshold se calculan con el software del equipo de HPLC, con un programa que ya tiene establecido.

4.5.4 Especificidad para métodos indicativos de estabilidad.

Preparar la solución del estándar como se indica en la TABLA C, filtrar a través de un acrodisco de PVDF de 0.45µm, descartar los primeros 2mL de la solución filtrada para permitir que se sature el filtro, inyectar la solución al sistema cromatográfico.

Realizar la degradación del placebo bajo las condiciones ácidas, básicas y temperatura, así como probar la degradación térmica del producto (activo) para evaluar si existe alguna interferencia en la cuantificación del activo. Ver tabla F.

TABLA F

Condición de degradación	
Suspensión ácida	Transferir placebo a un tubo de ensaye y adicionar ácido clorhídrico 1N hasta lograr un pH entre 1 y 2. Sonicar y agitar si es necesario. Almacenar a temperatura ambiente. Analizar a partir del 1er. día y no más allá de los 7 días. Registrar pH inicial de la muestra, al inicio, periodos intermedios y fin del estudio. Cuando se analice, se deberá neutralizar con hidróxido de sodio 1N.
Suspensión básica	Transferir placebo a un tubo de ensaye y adicionar hidróxido de sodio 1N hasta lograr un pH entre 10 y 12. Sonicar y agitar si es necesario. Almacenar a temperatura ambiente. Analizar a partir del 1er. día y no más allá de los 7 días. Registrar pH inicial de la muestra, al inicio, periodos intermedios y fin del estudio. Cuando se analice, se deberá neutralizar con ácido clorhídrico 1N.

Condición de degradación	
Suspensión térmica	Transferir muestra y placebo, almacenar a 80°C, durante 24 horas. Preparar las muestras conforme el método.
Cápsulas/Tabletas Térmico/Humedad	Transferir muestras y placebo, almacenar a 40°C/75% HR, después del tiempo transcurrido, preparar las muestras conforme el método.

4.5.5 Linealidad del sistema.

Preparación de la solución stock de cefadroxilo.

El intervalo de trabajo es del 10% a 200%. Con respecto al límite de impureza 0.010mg/mL establecido en la especificación.

Pesar de la sustancia del estándar secundario de cefadroxilo monihidrato el equivalente a 100mg de cefadroxilo y transferirlos a un matraz volumétrico de 100mL. Adicionar 50mL de diluyente (solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico con pH 5.0), sonicar hasta disolución y llevar a volumen con diluyente, realizar una dilución de 20mL de la solución anterior y transferirlos a un matraz de 200mL y llevar a volumen con diluyente (esta será la solución stock de trabajo).

A partir de la solución stock realizar las diluciones indicadas en la TABLA G. Filtrar una porción a través de un filtro PVDF de 0.45µm, descartar los primeros 2mL de la solución filtrada para permitir que se sature el filtro, determinar el área del pico de interés en el sistema cromatográfico. Preparar por triplicado las soluciones.

TABLA G

Nivel (%)	Concentración aproximada (mg/mL)	Alícuota (Sol. Stock) (mL)	Volumen matraz (mL)
0.10	0.001	5.0	500
0.50	0.005	5.0	100
1.00	0.010	10.0	100
1.50	0.015	15.0	100
2.00	0.020	20.0	100

Trazar la gráfica de área vs concentración. Generar un modelo de regresión lineal usando el método de mínimos cuadrados y determinar la pendiente (m), coeficiente de correlación (r), el coeficiente de determinación (r^2), ordenada al origen (b), el intervalo de confianza para la pendiente y la desviación estándar de la regresión.

4.5.6 Linealidad del método.

Preparar una solución del estándar al 100% preparada como lo indica en la TABLA C. Inyectar en el cromatógrafo por sextuplicado para determinar la respuesta de la solución para obtener la concentración.

Preparación de los placebos cargados.

Preparar los placebos cargados de acuerdo a la TABLA H para cápsulas o tabletas y la TABLA H1 para suspensión utilizando el estándar de cefadroxilo monohidrato y el placebo o muestra cargada respectivamente. Preparar las soluciones de los placebos cargados o muestras cargadas por triplicado.

Solución stock 2 del estándar: 0.1mg/mL.

A partir de la solución stock del estándar (ver TABLA C) realizar una dilución 50mg en 500mL.

Realizar a partir de ésta las diluciones indicadas en la TABLA H y H1. Filtrar una porción a través de un acrodisco de PVDF de 0.45 μ m, descartar los primeros 2mL de la solución filtrada para permitir que se sature el filtro, determinar el área del pico de interés en el sistema cromatográfico.

Preparar por triplicado las soluciones.

Preparar la solución placebo stock para cargar de acuerdo a la TABLA C.

TABLA H (Cápsulas/Tabletas)

Nivel (%)	Concentración (mg/mL)	Solución placebo stock (mL)	Estándar (Soln stock 2) (mL)	Volumen final de dilución (mL)
LC (10%)	0.001	5	1	100
100	0.010	5	10	100
200	0.020	5	20	100

TABLA H1 (Suspensión)

Nivel (%)	Concentración (mg/mL)	Placebo placebo stock (mL)	Estándar (Soln stock 2) (mL)	Volumen final de dilución (mL)
LC (10%)	0.001	5	2	200
100	0.010	5	20	200
200	0.020	5	40	200

Solución Stock de muestra: 0.0516mg/mL.

Lote usado 9A51512 contenido de cefadroxilo reportado 129mg/5mL.

Dilución 1mL de suspensión reconstituida en 500mL, concentración de la solución final 0.0516mg/mL.

4.5.7 Exactitud repetibilidad.

Preparar una solución del estándar al 100% preparada como lo indica en la TABLA C. Inyectar en el cromatógrafo por sextuplicado para determinar la respuesta de la solución para obtener la concentración.

Preparación de los placebos cargados.

Placebo al 100%.

Preparar los placebos cargados para cápsulas de acuerdo a la TABLA H sólo usar la preparación equivalente al 100% y TABLA H1 para suspensión utilizando sólo la preparación equivalente al 100%.

4.5.8 Precisión intermedia.

Se realiza por dos analistas diferentes en dos días diferentes.

Preparar la solución estándar de cefadroxilo monohidrato y la muestra de cápsulas de 250mg y 500mg, tabletas de 1g y suspensión oral de 125mg/5mL, 250mg/5mL y 500mg/5mL como se indica en la TABLA C. Filtrar una porción a través de un acrodisco de PVDF de 0.45µm, descartar los primeros 2mL de la solución filtrada para permitir que se sature el filtro, determinar la concentración en el sistema cromatográfico. Preparar por triplicado la solución muestra.

Dado que se llega a la misma concentración final de cefadroxilo en las muestras de suspensión en la preparación de cualquiera de las tres concentraciones, se decide solo hacerlo para suspensión de 125mg/5mL, ya que es la que mayor concentración de excipientes presenta en su fórmula.

4.5.9 Robustez.

4.5.9.1 Estabilidad de la muestra y estándar de trabajo.

Preparar la solución estándar de cefadroxilo monohidrato y la muestra de cápsulas de 250mg, tabletas de 1g y suspensión oral de 125mg/5mL como se indica en la TABLA C. Filtrar una porción a través de un acrodisco de PVDF de 0.45 μ m, descartar los primeros 2mL de la solución filtrada para permitir que se sature el filtro, inyectar y determinar la concentración en el sistema cromatográfico.

Almacenar bajo condiciones: ambiente y refrigeración, almacenar en viales de vidrio translucido y determinar su estabilidad por 24, 48 y 72 horas.

Las muestras y el estándar al t_0 deben cuantificarse utilizando una solución de estándar de trabajo recién preparado para cada tiempo. Cuando la prueba no se cumple a un tiempo t_x , el estudio se da por terminado para la condición respectiva.

Calcular el promedio de cada tiempo y condición. Determinar la diferencia absoluta del promedio de cada tiempo y condición respecto al t_0 . Expresar en porcentaje la diferencia absoluta de medias.

Cápsulas/Tabletas/Suspensiones

Parámetro	Rango sugerido
Tiempo de agitación	30 min +/- 50 %

Calcular la media aritmética de la condición normal de operación y de cada condición de operación diferente a la condición normal. Calcular la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto a la condición normal.

4.5.9.2 Variación de los métodos de filtración.

Preparar la solución estándar de cefadroxilo monohidrato y la muestra de cápsulas de 250mg, tabletas de 1g y suspensión oral de 125mg/5mL como se indica en la TABLA C. Filtrar una porción a través de un acrodisco de PVDF de 0.45 μ m y otra porción a través de un filtro HPF Millex de 0.45 μ m y determinar la concentración en el sistema cromatográfico. Preparar por triplicado las muestras.

Para ambos filtros descartar los primeros 2mL de la solución filtrada para permitir que se sature el filtro, inyectar posteriormente para filtrar el estándar de trabajo y muestras.

Características e información de los filtros PVDF: consta de membrana DURAPORE PVDF hidrófilo, carcasa de polipropileno, adaptadores de entrada LUER-LOK, conexión de salida LUER-SLIP, volumen de proceso menor de 100mL, volumen muerto < a 80 μ L, presión máxima de entrada 8.6 bar, temperatura operativa máxima 45°C.

Características e información de los filtros HPF Millex: incluyen dos medios diferentes, un prefiltro graduado de fibra de vidrio de 10.0-0.7 μ m para extraer partículas grandes y un filtro de membrana de 0.45 μ m para filtración de partículas finas, la combinación de ambas ofrece un rendimiento mayor a los filtros estándar (menor problema de saturación al filtrar suspensiones). Material de la carcasa HDPE, adaptadores de entrada LUER-LOK, conexión de salida LUER-SLIP, área de filtración 3.9 cm², volumen de proceso 100mL, volumen muerto 250 μ L, presión máxima de entrada 6.9 bar, temperatura operativa máxima 45°C.

Calcular el promedio de la condición normal de operación y de cada condición diferente a la condición normal. Determinar la diferencia absoluta del promedio de cada condición respecto a la condición normal (PVDF). Expresar el resultado en mg/unidad (cápsulas o tabletas), mg/5mL (suspensión).

4.5.10 Tolerancia.

4.5.10.1 El factor a evaluar es: Sistema cromatográfico.

Realizar la prueba cambiando el sistema cromatográfico 1 (HPLC Waters modelo 2695 detector UV 247 ubicado en el área de estabilidades), sistema cromatográfico 2 (HPLC Waters modelo 2695 detector PDA 996 ubicado en el área de rutina).

Preparar la solución estándar de cefadroxilo monohidrato y las muestras de cápsulas, tabletas y suspensión oral como se indica en la TABLA C. Filtrar una porción a través de un acrodisco de PVDF 0.45 μ m, descartar los primeros 2mL de la solución filtrada para permitir que se sature el filtro, inyectar posteriormente y determinar la concentración en el sistema cromatográfico. Preparar por triplicado las muestras.

Determinar el promedio, desviación estándar y CV del grupo.

4.5.10.2 Extractabilidad de la muestra.

Preparar la solución estándar de cefadroxilo monohidrato y la muestra de cápsulas, tabletas y suspensión oral como se indica en la TABLA C sólo se debe variar el tiempo de agitación.

Filtrar una porción a través de un acrodisco de PVDF de 0.45 μ m, descartar los primeros 2mL de la solución filtrada para permitir que se sature el filtro, determinar la concentración en el sistema cromatográfico.

4.5.11 Sensibilidad del método (Límite de detección y cuantificación).

4.5.11.1 Límite de detección.

Calcular a partir de los datos obtenidos de la linealidad del sistema (pendiente y error estándar de la regresión) la concentración del límite de detección.

Preparar la solución estándar de cefadroxilo monohidrato como se indica en la TABLA C, preparar una solución que contenga aproximadamente la concentración calculada como límite de detección e inyectarla por sextuplicado.

Determinar la adecuabilidad del sistema y corroborar que el sistema es capaz de detectar la concentración inyectada equivalente al límite de detección.

4.5.11.2 Límite de cuantificación.

Calcular a partir de los datos obtenidos de la linealidad del sistema (pendiente y error estándar de la regresión) la concentración del límite de cuantificación.

Preparar la solución estándar de cefadroxilo monohidrato como se indica en la TABLA C, preparar una solución que contenga aproximadamente la concentración calculada como límite de cuantificación e inyectarla por sextuplicado.

Determinar la adecuabilidad del sistema, calcular el CV y promedio para las inyecciones del límite de cuantificación.

4.5.12 Criterios de aceptación.

PRUEBA	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
Adecuabilidad	<p>El Tiempo de retención debe estar entre los 12-18 min.</p> <p>La eficiencia debe ser ≥ 2000</p> <p>El coe \leq a 1.5</p> <p>El coeficiente de variación $\leq 5.0\%$</p>
Precisión del sistema	El coeficiente de variación $\leq 5.0\%$
Especificidad	<p>Ninguna impureza debe interferir con el pico de cefadroxilo.</p> <p>El purity angle debe de ser menor al purity threshold para el cefadroxilo.</p>
Especificidad para métodos indicativos de estabilidad	<p>Ninguna impureza debe interferir con el pico de cefadroxilo.</p> <p>El purity angle debe de ser menor al purity threshold para el cefadroxilo.</p>
Linealidad del sistema	<p>$r^2 > 0.98$</p> <p>El $(IC_{\beta 1})$ no debe incluir el cero.</p>
Linealidad del método	<p>$r^2 \geq 0.98$</p> <p>Pendiente cercana a 1 ($m \approx 1$)</p> <p>La ordenada al origen cercana a 0 ($b \approx 0$)</p> <p>Por ciento de recobro entre 80 – 120 %</p> <p>Coeficiente de variación del porcentaje de recobro \leq a 5%</p> <p>Para porcentaje de recobro: El IC (μ) incluye 100% o el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: 95.0 - 105.0%</p> <p>El CV $\leq 20.0\%$.⁽¹⁾</p>

PRUEBA	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
Exactitud y repetibilidad	<p>El IC(μ) Incluye el 100 % ó el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: 95.0 -105.0%</p> <p>El CV del porcentaje de recobro \leq 5.0%</p>
Precisión intermedia	El coeficiente de variación total de los resultados debe ser \leq al 20%
Robustez	<p>El coeficiente de variación total de los resultados debe ser \leq al 20%</p> <p>La diferencia absoluta de las medias no debe ser mayor al 5.0% para el pico de cefadroxilo en la preparación del estándar y de la muestra.</p>
Estabilidad de la muestra y estándar de trabajo	<p>El coeficiente de variación total de los resultados debe ser \leq al 20%⁽¹⁾</p> <p>La diferencia absoluta de las medias no debe ser mayor al 5.0% para cefadroxilo en el estándar.⁽¹⁾</p> <p>La diferencia absoluta de las medias no debe ser mayor al 20% para impurezas de cefadroxilo en las muestras.⁽¹⁾</p>
Tolerancia	El coeficiente de variación total de los resultados debe ser \leq al 20% ⁽¹⁾

PRUEBA	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
Sensibilidad (límite de detección y cuantificación)	La concentración calculada del límite de detección y cuantificación deben estar por abajo de la concentración límite de impurezas. Límite de detección - señal del pico de interés detectable. Límite de cuantificación - $CV \leq 5.0\%$

(1) Criterios obtenidos de la directiva corporativa de validación del laboratorio en que se desarrolló el tema.

Nombre de archivo: TESIS_UNAM7_CAP4.doc
Directorio: D:\Documents and Settings\jaimes\Mis documentos
Plantilla: D:\Documents and Settings\jaimes\Datos de
programa\Microsoft\Plantillas\Normal.dotm
Título: CAPITULO 4
Asunto:
Autor: MARY
Palabras clave:
Comentarios:
Fecha de creación: 19/10/2010 15:35:00
Cambio número: 25
Guardado el: 30/10/2011 15:12:00
Guardado por: MARY
Tiempo de edición: 7,047 minutos
Impreso el: 24/11/2011 10:55:00
Última impresión completa
Número de páginas: 21
Número de palabras: 3,600 (aprox.)
Número de caracteres: 19,806 (aprox.)

CAPÍTULO 5

Resultados

Resultados obtenidos de las pruebas planteadas en el capítulo 4 (Diseño experimental).

4.5.1 Adecuabilidad del sistema.

Cefadroxilo				
Inyección	Área	Eficiencia	Coleo	Tiempo de retención
1	249760	7789	1.0	13.9
2	250424	7828	1.0	14.0
3	248558	8041	1.0	14.0
4	246192	8245	1.0	14.1
5	245661	8164	1.0	14.1
6	248878	7918	1.0	14.0
Promedio	248245	7997	1.0	14.0
Std. Dev.	1920			
C.V.	0.8%			

4.5.2 Precisión del sistema.

Cefadroxilo	
Inyección	Área
1	237818
2	237903
3	238695
4	238351
5	236965
6	236039
Promedio	237629
Std. Dev.	973.4
C.V.	0.4%

4.5.3 Especificidad.

Especificidad suspensión

Muestra	Tiempo de retención (min)	Área cefadroxilo
Fase móvil A/diluyente	14.8	Ninguna
Fase móvil B	14.8	Ninguna
Estándar	14.8	238048
Placebo completo	14.8	Ninguna
Muestra	14.9	853947

Muestra	Tiempo de retención cefadroxilo (min)	Área	Tiempo de retención de impurezas debido a los placebos (min)	Área
Benzoato de sodio	14.47	Ninguna	16.22	198434
Celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa	14.47	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Goma tragacanto	14.47	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Rojo # 40	14.47	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Sabor frambuesa	14.47	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Sabor fresa	14.47	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Sabor limón	14.47	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Sabor refrescante	14.47	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Sacarosa	14.47	Ninguna	Ninguna	Ninguna
Tween 40	14.47	Ninguna	Ninguna	Ninguna

Especificidad cápsulas

Muestra	Tiempo de retención (min)	Área cefadroxilo
Fase móvil A/diluyente	14.0	Ninguna
Fase móvil B	14.0	Ninguna
Estándar	14.0	241698
Placebo (Estearato de magnesio)	14.0	Ninguna
Muestra	14.1	225846

La solución blanco es la fase móvil A

Especificidad tabletas

Muestra	Tiempo de retención (min)	Área cefadroxilo
Fase móvil A/diluyente	14.0	Ninguna
Fase móvil B	14.0	Ninguna
Estándar	14.0	234828
Placebo (Estearato de magnesio)	14.0	Ninguna
Muestra	13.5	194369

La solución blanco es la fase móvil A

4.5.4 Especificidad para métodos indicativo de estabilidad.

Suspensión

Resultados para cefadroxilo		
Muestra degradada/condición	Área	(%) de degradación
Suspensión sin degradar	853947	0
Suspensión pH (ácido)	754267	11.7
Suspensión pH (básico)	331724	61.2
Placebo temperatura	710679	16.8

El % de degradación es calculado con respecto al área de la muestra sin tratar para cada formulación.

Las impurezas representativas para la suspensión son 5 obtenidas de la prueba de precisión intermedia como se observa en el siguiente cromatograma.



Condición normal		
	TR	TRR
Cefadroxilo	14.5	1.00
Impureza 1	3.0	0.21
Impureza 2	4.5	0.31
Impureza 3	18.4	1.27
Impureza 4	45.0	3.10
Impureza 5	53.8	3.71

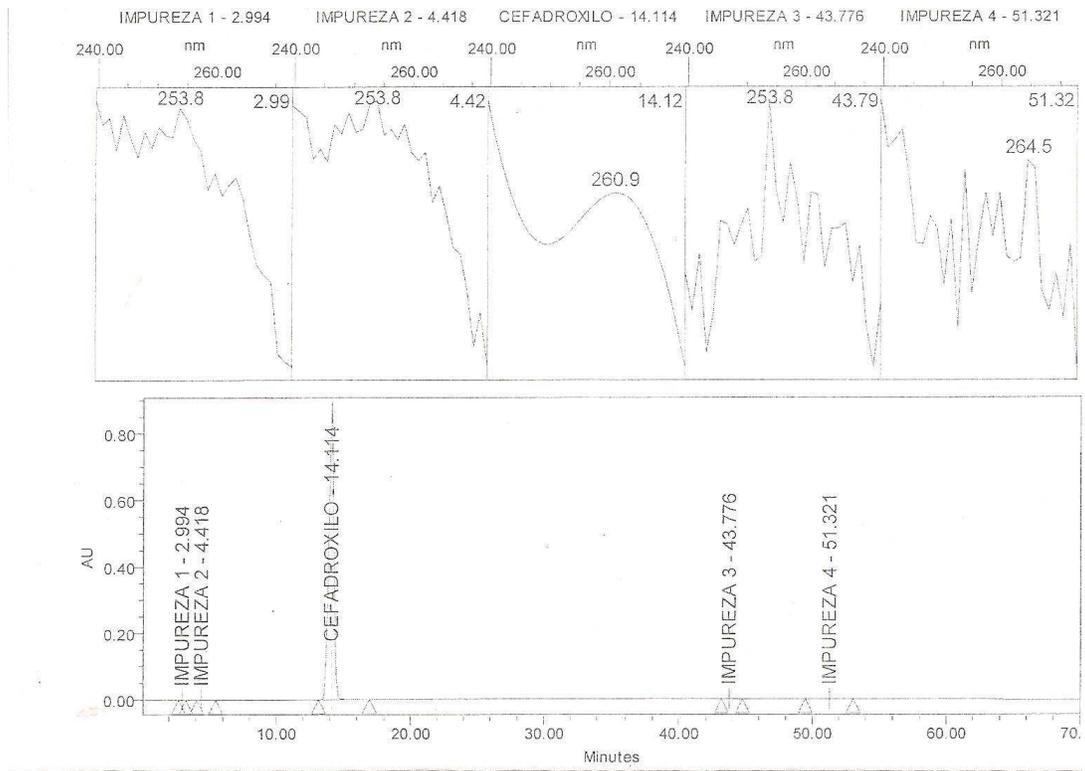
TR = Tiempo de retención

TRR = Tiempo de retención relativo

Cápsulas

Resultados para cefadroxilo		
Muestra degradada/condición	Área	(%) de degradación
Cápsula sin degradar	225846	0
Cápsulas pH (ácido)	221251	2.0
Cápsulas pH (básico)	172130	23.8
Cápsulas temperature	216076	4.3

El % de degradación es calculado con respecto al área de la muestra sin tratar para cada formulación.



	Pico	TR	TRR	Purity angle	Purity threshold	Resultado
Condición normal	Cefadroxilo	14.1	1.00	0.032	0.277	Cumple
	Impureza 1	3.0	0.21	5.800	23.574	Cumple
	Impureza 2	4.4	0.31	9.617	19.758	Cumple
	Impureza 3	43.8	3.11	6.718	24.498	Cumple
	Impureza 4	51.3	3.64	5.551	19.426	Cumple
pH básico	Cefadroxilo	14.0	1.00	0.019	0.260	Cumple
	Impureza 1	----	----	----	----	----
	Impureza 2	4.5	0.32	3.644	4.649	Cumple
	Impureza 3	----	----	----	----	----
	Impureza 4	----	----	----	----	----
pH ácido	Cefadroxilo	14.1	1.00	0.044	0.299	Cumple
	Impureza 1	3.1	0.22	4.555	16.952	Cumple
	Impureza 2	4.4	0.31	5.825	20.437	Cumple
	Impureza 3	43.7	3.10	6.009	23.673	Cumple
	Impureza 4	51.4	3.65	4.984	19.916	Cumple
Temperatura	Cefadroxilo	14.0	1.00	0.037	0.268	Cumple
	Impureza 1	3.0	0.21	3.457	6.022	Cumple
	Impureza 2	4.4	0.31	8.321	12.393	Cumple
	Impureza 3	43.8	3.13	6.881	24.652	Cumple
	Impureza 4	51.4	3.67	4.873	17.529	Cumple

Nota: Las impurezas 1, 2, 3 y 4 analizadas bajo el criterio de purity angle y purity threshold para cápsulas son las mismas tomadas en cuenta para el cálculo de precisión intermedia.

Tabletas

Muestra	Tiempo de retención (min)	Área cefadroxilo	Purity angle	Purity threshold
Tableta	14.0	194369	0.014	0.239

Nota: Para el caso de tabletas se presenta el resultado de purity angle y purity threshold, siendo menor el resultado de purity angle.

4.5.5 Linealidad del sistema.

Linealidad del sistema				
Nivel	Concentración (mg/mL)	Área		
		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
0.10%	0.000991	24639	24691	24195
0.50%	0.004957	122433	123544	124451
1.00%	0.009915	247786	248043	241909
1.50%	0.014872	369551	373136	374075
2.00%	0.019829	489316	496250	495131

Pendiente = 2.49397E7

Coefficiente de correlación (r) = 0.999907

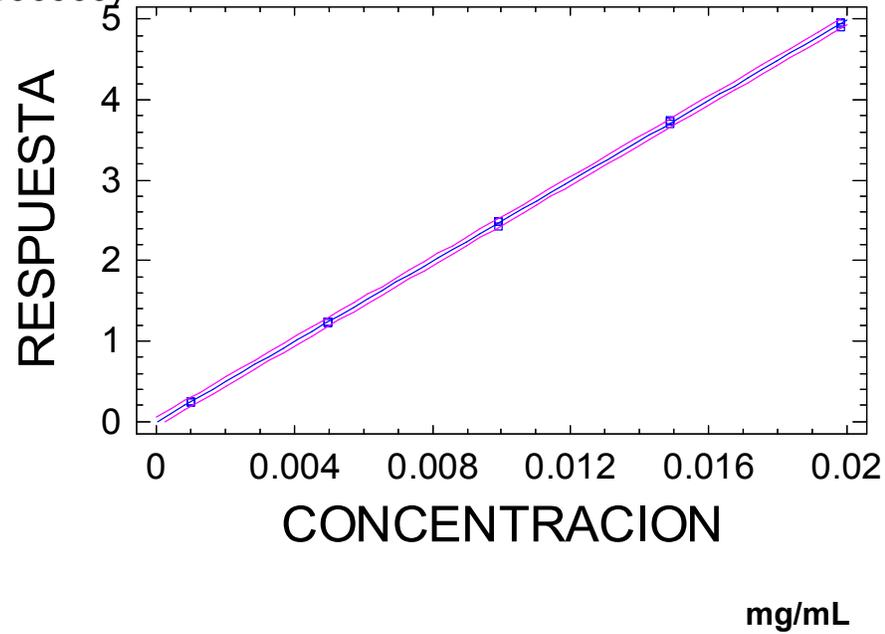
Coefficiente de determinación (r^2) = 0.999815

Ordenada al origen = -266.722

Intervalo de confianza para la pendiente (2.47364E7 – 2.5143E7)

LINEALIDAD DEL SISTEMA CEFADROXILO IMP

(X 100000)



4.5.6 Linealidad del método.

TABLA de recobros suspensión

% Nivel de concentración	mg/mL adicionados	mg/mL Recuperados	% Recobro	Por nivel
Límite de cuantificación	0.000905	0.000880	97.2	Promedio= 95.8 CV=1.9%
		0.000872	96.4	
		0.000848	93.7	
100%	0.009049	0.008824	97.5	Promedio= 97.2 CV=0.8%
		0.008845	97.7	
		0.008711	96.3	
200%	0.018099	0.017891	98.9	Promedio= 97.5 CV=1.3%
		0.017493	96.7	
		0.017517	96.8	
		Promedio	96.8	
		Desviación estándar	1.4	
		CV	1.5%	

Pendiente = 0.975197

Coefficiente de correlación (r) = 0.999869

Coefficiente de determinación (r^2) = 0.999737

Ordenada al origen = -0.000021174

Intervalo de confianza para la pendiente (0.961062-0.989331)

Intervalo de confianza para la ordenada al origen (-0.00018647-0.000144122)

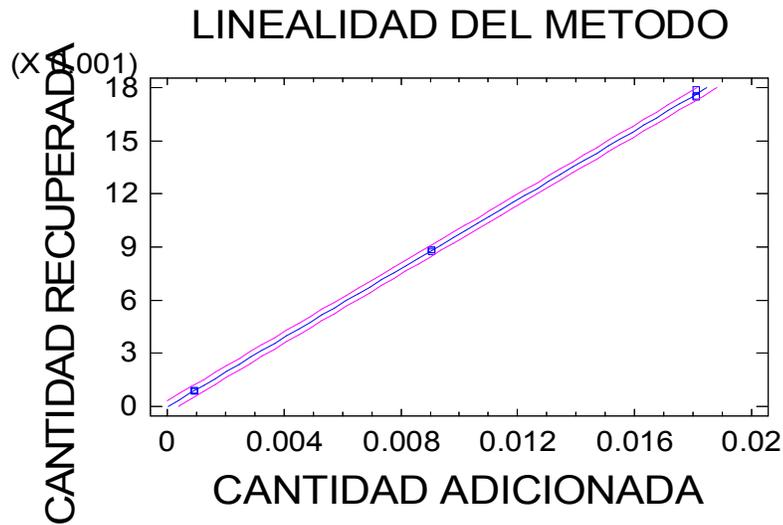


TABLA de recobros cápsulas

% Nivel de concentración	mg/mL Adicionados	mg/mL Recuperados	% Recobro	Por nivel
Límite de cuantificación	0.000972*	0.000983	101.1	Promedio = 102.1 CV=0.9%
		0.000999	102.8	
		0.000995	102.4	
100%	0.009716	0.009621	99.0	Promedio = 99.3 CV=0.3%
		0.009637	99.2	
		0.009675	99.6	
200%	0.019432	0.019464	100.2	Promedio = 100.3 CV=0.1%
		0.019515	100.4	
		0.019471	100.2	
		Promedio	100.5	
		Desviación estándar	1.3%	
		CV	1.3%	

*Concentración con base al peso del estándar empleado

Pendiente = 1.00188

Coefficiente de correlación (r) = 0.999975

Coefficiente de determinación (r^2) = 0.999949

Ordenada al origen = -0.0000188951

Intervalo de confianza para la pendiente (0.995517 – 1.00825)

Intervalo de confianza para la ordenada al origen (-0.0000988111 – 0.0000610208)

TABLA de recobros tabletas

% Nivel de concentración	mg/mL Adicionados	mg/mL Recuperados	% Recobro	Por nivel
Límite de cuantificación	0.000997*	0.000998	100.1	Promedio = 99.7 CV = 0.6%
		0.000997	100.0	
		0.000988	99.1	
100%	0.009969	0.009737	97.7	Promedio = 97.1 CV = 0.7%
		0.009612	96.4	
		0.009685	97.2	
200%	0.019939	0.019627	98.4	Promedio = 98.8 CV = 0.4%
		0.019740	99.0	
		0.019762	99.1	
		Promedio	98.6	
		Desviación estándar	1.2501	
		CV	1.3%	

*Concentración con base al peso del estándar empleado

Pendiente = 0.988369

Ordenada al origen = -0.0000545138

Coeficiente de correlación (r) = 0.99992

Coeficiente de determinación (r^2) = 0.999841

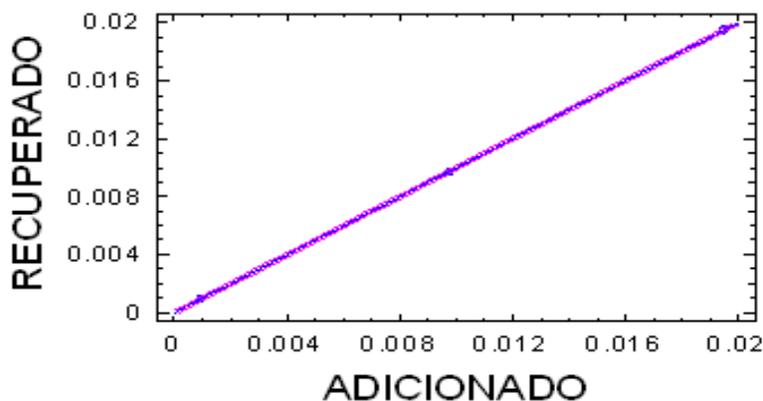
Intervalo de confianza para la pendiente (0.977216 – 0.999521)

Intervalo de confianza para la ordenada al origen (-0.000198194 – 0.0000891669)

Intervalo de confianza para los recobros = (97.7-99.4)

No se hizo producto cargado; sólo placebo cargado con cefadroxilo ya que son impurezas inespecíficas y no se cuenta con ellas y sólo se probó con placebo cargado para demostrar que en el rango de linealidad no existe interferencia por el placebo para la cuantificación.

LINEALIDAD DEL METODO PRODUCTO



4.5.7 Exactitud del método al 100%.**Suspensión**

Se aplican las mismas fórmulas que para linealidad del método.

TABLA de recobros

% Nivel de concentración	mg/mL Adicionados	mg/mL Recuperados	% Recobro
100	0.009049	0.008824	97.5
		0.008845	97.7
		0.008711	96.3
		0.008740	96.6
		0.008864	98.0
		0.008795	97.2
		Promedio	97.2
		Desviación estándar	0.6555
		CV	0.7%

Intervalo de confianza para el promedio de recobro: (96.5% – 97.9%)

Cápsulas

Se aplican las mismas fórmulas que para linealidad del método.

TABLA de recobros

% Nivel de concentración	mg/mL Adicionados	mg/mL Recuperados	% Recobro
100	0.009716	0.009621	99.0
		0.009637	99.2
		0.009675	99.6
		0.009707	99.9
		0.009709	99.9
		0.009735	100.2
		Promedio	99.6
		Desviación estándar	0.4590
		CV	0.5%

Tabletas

Se aplican las mismas fórmulas que para linealidad del método.

TABLA de recobros

% Nivel de concentración	mg/mL Adicionados	mg/mL Recuperados	% Recobro
100	0.009969	0.009737	97.7
		0.009612	96.4
		0.009685	97.2
		0.009753	97.8
		0.009841	98.7
		0.009825	98.6
		Promedio	97.7
		Desviación estándar	0.8664
		CV	0.9%

4.5.8 Precisión intermedia.

Los cálculos de impurezas de acuerdo a los parámetros indicados en el método establecen que:

- Se deben detectar todos los picos $\geq 0.05\%$ del área respecto al pico de cefadroxilo que no sean inherentes al blanco.
- Reportar las impurezas y degradantes que sean $\geq 0.10\%$

Para efecto del cálculo de la precisión intermedia se tomarán en cuenta las impurezas que estén presentes en la muestra y cumplan con tener un porcentaje de área mayor a 0.05% respecto al cefadroxilo y el porcentaje de impureza sea mayor a 0.07% .

Para suspensiones se descartará para el cálculo de la precisión, la impureza 3, que como se establece en la especificidad corresponde al benzoato de sodio; aún cuando cumple con los parámetros establecidos para el cálculo de impurezas como es porcentaje de área y porcentaje de impureza esta señal no es debida al cefadroxilo sino a un aditivo.

Precisión intermedia suspensión.**Suspensión de 500mg/5mL**

Para la suspensión de 500mg/5mL las impurezas 1, 4 y 5 se descartan por ser menores a 0.05% de área, la impureza 3 es benzoato de sodio, por tanto el cálculo se efectúa en la impureza 2.

Impureza 2 Suspensión de 500mg/5mL		
ANALISTA 1		
Muestra	Día 1 %	Día 2 %
1	0.0816	0.0984
2	0.0914	0.0990
3	0.0824	0.1011
Promedio	0.0851	0.0995
Desviación estándar	0.0054	0.0014
CV	6.4%	1.4%

Impureza 2 Suspensión de 500mg/5mL		
ANALISTA 2		
Muestra	Día 1 %	Día 2 %
1	0.0872	0.0799
2	0.0927	0.0893
3	0.0909	0.0879
Promedio	0.0903	0.0857
Desviación estándar	0.0028	0.0051
CV	3.1%	5.9%

Análisis estadístico de los dos analistas y los dos días	
Promedio	0.0902
DESTD	0.0069
CV	7.7%

Suspensión de 125mg/5mL

Para la suspensión de 125mg/5mL solo se cuantifica la impureza 2 ya que es la única mayor a 0.05% de área.

Impureza 2 Suspensión de 125mg/5mL		
ANALISTA 1		
Muestra	Día 1 %	Día 2 %
1	0.1175	0.1116
2	0.1193	0.1155
3	0.1208	0.1172
Promedio	0.1192	0.1148
Desviación estándar	0.0017	0.0029
CV	1.4%	2.5%

Impureza 2 Suspensión de 125mg/5mL		
ANALISTA 2		
Muestra	Día 1 %	Día 2 %
1	0.0894	0.1050
2	0.0873	0.1074
3	0.0908	0.1011
Promedio	0.0892	0.1045
Desviación estándar	0.0018	0.0032
CV	2.0%	3.0%

Análisis estadístico de los dos analistas y los dos días	
Promedio	0.1069
DESTD	0.0122
CV	11.5%

Precisión intermedia cápsulas.**Cápsulas de 250mg**

Para las cápsulas de 250mg se descartan las impurezas 1, 2 y 3 por ser menores a 0.05% de área, por tanto el cálculo se efectúa en la impureza 4.

Impureza 4 Cápsulas de 250mg		
ANALISTA 1		
Muestra	Día 1 %	Día 2 %
1	0.1043	0.0839
2	0.1035	0.0874
3	0.1130	0.0954
Promedio	0.1069	0.0889
Desviación estándar	0.0053	0.0059
CV	4.9%	6.6%

Impureza 4 Cápsulas de 250mg		
ANALISTA 2		
Muestra	Día 1 %	Día 2 %
1	0.1100	0.0997
2	0.1133	0.1119
3	0.1020	0.0899
Promedio	0.1084	0.1005
Desviación estándar	0.0058	0.0110
CV	5.4%	10.9%

Análisis estadístico de los dos analistas y los dos días	
Promedio	0.1012
DESTD	0.0102
CV	10.1%

Cápsulas de 500mg

Para las cápsulas de 500mg se descartan las impurezas 1 y 3 ya que presentan un área menor a 0.05%.

Impureza 2 Cápsulas de 500mg		
ANALISTA 1		
Muestra	Día 1 %	Día 2 %
1	0.0826	0.1020
2	0.0874	0.0955
3	0.0857	0.0951
Promedio	0.0852	0.0975
Desviación estándar	0.0024	0.0039
CV	2.9%	4.0%

Impureza 2 Cápsulas de 500mg		
ANALISTA 2		
Muestra	Día 1 %	Día 2 %
1	0.0727	0.0927
2	0.0764	0.0957
3	0.0713	0.0862
Promedio	0.0735	0.0915
Desviación estándar	0.0026	0.0049
CV	3.6%	5.3%

Análisis estadístico de los dos analistas y los dos días	
Promedio	0.0869
DESTD	0.0097
CV	11.3%

Impureza 4 Cápsulas de 500mg		
ANALISTA 1		
Muestra	Día 1 %	Día 2 %
1	0.1228	0.0934
2	0.1164	0.0892
3	0.1146	0.1062
Promedio	0.1179	0.0963
Desviación estándar	0.0043	0.0089
CV	3.7%	9.2%

Impureza 4 Cápsulas de 500mg		
ANALISTA 2		
Muestra	Día 1 %	Día 2 %
1	0.1157	0.0997
2	0.1188	0.0789
3	0.1079	0.0988
Promedio	0.1141	0.0925
Desviación estándar	0.0056	0.0118
CV	4.9%	12.7%

Análisis estadístico de los dos analistas y los dos días	
Promedio	0.1052
DESTD	0.0134
CV	12.8%

Precisión intermedia tabletas.**Tabletas**

Para las tabletas se descartan las impurezas 1 y 3 ya que presentan un área menor a 0.05%, por tanto los cálculos se efectúan en las impurezas 2, 4 y 5.

Impureza 2 Tablet		
ANALISTA 1		
Muestra	Día 1 %	Día 2 %
1	0.0647	0.0495
2	0.0613	0.0538
3	0.0622	0.0505
Promedio	0.0627	0.0513
Desviación estándar	0.0018	0.0023
CV	2.8%	4.4%

Impureza 2 Tablet		
ANALISTA 2		
Muestra	Día 1 %	Día 2 %
1	0.0502	0.0519
2	0.0645	0.0523
3	0.0653	0.0712
Promedio	0.0600	0.0585
Desviación estándar	0.0085	0.0110
CV	14.2%	18.9%

Análisis estadístico de los dos analistas y los dos días	
Promedio	0.0581
DESTD	0.0075
CV	12.9%

Impureza 4 Tabletas		
ANALISTA 1		
Muestra	Día 1 %	Día 2 %
1	0.0508	0.0430
2	0.0438	0.0475
3	0.0517	0.0411
Promedio	0.0488	0.0439
Desviación estándar	0.0043	0.0033
CV	8.9%	7.5%

Impureza 4 Tabletas		
ANALISTA 2		
Muestra	Día 1 %	Día 2 %
1	0.0453	0.0583
2	0.0550	0.0589
3	0.0522	0.0530
Promedio	0.0508	0.0567
Desviación estándar	0.0050	0.0032
CV	9.8%	5.7%

Análisis estadístico de los dos analistas y los dos días	
Promedio	0.0501
DESTD	0.0059
CV	11.8%

Impureza 5 Tabletas		
ANALISTA 1		
Muestra	Día 1 %	Día 2 %
1	0.0800	0.0831
2	0.0676	0.0853
3	0.0773	0.0825
Promedio	0.0750	0.0836
Desviación estándar	0.0065	0.0015
CV	8.7%	1.8%

Impureza 5 Tabletas		
ANALISTA 2		
Muestra	Día 1 %	Día 2 %
1	0.0944	0.0831
2	0.0847	0.0866
3	0.1018	0.0845
Promedio	0.0936	0.0847
Desviación estándar	0.0086	0.0018
CV	9.2%	2.1%

Análisis estadístico de los dos analistas y los dos días	
Promedio	0.0842
DESTD	0.0084
CV	9.9%

4.5.9 Robustez.

Se determinó realizando la prueba de estabilidad de la muestra y estándar de trabajo y la prueba de variación de los métodos de filtración.

4.5.9.1 Estabilidad de la suspensión, muestra y estándar de trabajo.

La estabilidad tanto de muestra como de estándar se realizó en condiciones de refrigeración durante el periodo reportado.

Los cálculos de impurezas de acuerdo a los parámetros indicados en el método establecen que:

- Se deben detectar todos los picos $\geq 0.05\%$ del área respecto al pico de cefadroxilo que no sean inherentes al blanco.
- Reportar las impurezas y degradantes que sean $\geq 0.07\%$.

Nota:

El tiempo real de estabilidad final fue de 186 horas y no 96 horas como está rotulada la muestra, en los cromatogramas.

Tiempo cero: Primera inyección = 19 oct 2009 9:22pm

Tiempo final: Primera inyección = 27 oct 2009 3:13pm

Tiempo total inicio - tiempo final = tiempo de estudio = 186horas.

Estándar cefadroxilo				
Muestra	t=0 h (mg/mL)	t=48 h (mg/mL)	t=72h (mg/mL)	t=186 h (mg/mL)
1	0.009528	0.009727	0.009393	0.009545
2	0.009528	0.009608	0.009283	0.009250
3	0.009528	0.009668	0.009249	0.009484
Promedio	0.009528	0.009668	0.009308	0.009426
CV	1.7%			

Nota: La concentración inicial (t=0) se estima por cálculo del peso del estándar y la dilución y pureza de éste.

La siguiente fórmula es la misma que se utiliza de aquí en adelante.

$$\% \text{ Dif. Abs} = \frac{\left| \text{Prom. cond. normal} - \text{Prom. del cambio} \right|}{\text{Prom. cond normal}} \times 100$$

Donde:

Dif. Abs = Diferencia Absoluta

Prom. cond. normal = Promedio de condición normal

Prom. del cambio = Promedio del cambio

Ejemplo:

$$\% \text{ Dif. Abs} = \frac{\left| 0.009528 - 0.009668 \right|}{0.009528} \times 100$$

Inicio 0 h	t=0 h (mg/mL)	t=48 h (mg/mL)	t=72 h (mg/mL)	t=186 h (mg/mL)
Promedio (mg/mL)	0.009528	0.009668	0.009308	0.009426
Diferencia abs		0.00014	0.00022	0.000102
%		1.5	2.3	1.1

Estabilidad del producto

Muestra cefadroxilo				
Muestra	t=0 h Área	t=48 h Área	t=72h Área	t=186 h Área
1	260538	258341	258154	254566
2	260576	259619	258034	255269
3	260277	257350	241088	250896
Promedio	260464	258437	252425	253577
CV	2.2%			

Inicio 0 h	t=0 h Área	t=48 h Área	t=72h Área	t=186 h Área
Promedio (mg/mL)	260464	258437	252425	253577
Diferencia abs		2027	8039	6887
%		0.8	3.1	2.6

Se calculó también la diferencia absoluta para las impurezas de manera informativa tomando en cuenta que el CV aceptable para éstas debe ser menor al 20.0% ya que, es el CV permitido para impurezas de acuerdo a los criterios establecidos en el protocolo.

Muestra impureza 5				
Muestra	t=0 h (%)	t=48 h (%)	t=72h (%)	t=186 h (%)
1	0.1881	0.1896	0.1865	0.2039
2	0.1761	0.1856	0.1916	0.1981
3	0.1838	0.2062	0.1716	0.1838
Promedio	0.1827	0.1938	0.1832	0.1953
CV	5.4%			

Inicio 0 h	t=0 h (%)	t=48 h (%)	t=72h (%)	t=186 h (%)
Promedio (mg/mL)	0.18267	0.19380	0.18321	0.19526
Diferencia abs		0.01113	0.00054	0.01259
%		6.1	0.3	6.9

4.5.9.1 Estabilidad de las cápsulas, muestra y estándar de trabajo.

Nota:

La linealidad del sistema para ésta validación abarca de 0.01mg/mL a 0.020mg/mL, por lo que aún cuando el protocolo establece calcular la diferencia absoluta para cefadroxilo en muestras y estándares, solo se realiza éste cálculo para el estándar, por que es la única solución donde el cefadroxilo se encuentra dentro de éste rango de concentración.

La estabilidad tanto de muestra como de estándar se realizó en condiciones de refrigeración durante el periodo reportado.

Para el estándar

Nota:

El tiempo real de estabilidad final fue de 186 horas y no 96 horas como está rotulada la muestra en los cromatogramas.

Tiempo cero: Primera inyección = 19 oct 2009 9:22pm

Tiempo final: Primera inyección = 27 oct 2009 3:13pm

Tiempo total inicio- tiempo final = tiempo de estudio = 186horas.

Estándar cefadroxilo				
Muestra	t=0 h (mg/mL)	t=48 h (mg/mL)	t=72h (mg/mL)	t=186 h (mg/mL)
1	0.009528	0.009727	0.009393	0.009545
2	0.009528	0.009608	0.009283	0.009250
3	0.009528	0.009668	0.009249	0.009484
Promedio	0.009528	0.009668	0.009308	0.009426
CV	1.7%			

Nota: La concentración inicial (t = 0) es estimada por cálculo del peso del estándar y la dilución y pureza de éste.

Inicio 0 h	t=0 h (mg/mL)	t=48 h (mg/mL)	t=72h (mg/mL)	t=186 h (mg/mL)
Promedio (mg/ml)	0.009528	0.009668	0.009308	0.009426
Diferencia abs		0.00014	0.00022	0.000102
%		1.5	2.3	1.1

Estabilidad producto

Tiempo cero: Primera inyección = 20 nov 2009 10:50 pm

Tiempo final: Primera inyección = 29 nov 2009 05:19pm

Tiempo total inicio- tiempo final = tiempo de estudio = 211 horas.

Muestra cefadroxilo		
Muestra	t=0 h % ÁREA	t=211 h % ÁREA
1	233363	219579
2	231799	218121
3	235056	218700
Promedio	233406	218800
CV	3.6%	

Muestra impureza 4		
Muestra	t=0 h (%)	t=211 h (%)
1	0.078301	0.085487
2	0.082993	0.081393
3	0.088230	0.081344
Promedio	0.083175	0.082741
CV	4.2%	

Inicio 0 h	t=0 h (%)	t=211 h (%)
Promedio (mg/mL)	0.083175	0.082741
Diferencia abs	0.000434	
%	0.5	

4.5.9.1 Estabilidad de las tabletas, muestra y estándar de trabajo.

Nota:

La linealidad del sistema para ésta validación abarca de 0.01mg/mL a 0.020mg/mL, por lo que aún cuando el protocolo establece calcular la diferencia absoluta para cefadroxilo en muestras y estándares, solo se realiza éste cálculo para el estándar, por que es la única solución donde el cefadroxilo se encuentra dentro de éste rango de concentración.

La estabilidad tanto de muestra como de estándar se realizó en condiciones de refrigeración durante el periodo reportado.

Para el estándar**Nota:**

El tiempo real de estabilidad final fue de 186 horas y no 96 horas como está rotulada la muestra en los cromatogramas.

Tiempo cero: Primera inyección = 19 oct 2009 9:22pm

Tiempo final: Primera inyección = 27 oct 2009 3:13pm

Tiempo total inicio- tiempo final = tiempo de estudio = 186horas.

Estándar cefadroxilo				
Muestra	t=0 h (mg/mL)	t=48 h (mg/mL)	t=72h (mg/mL)	t=186 h (mg/mL)
1	0.009528	0.009727	0.009393	0.009545
2	0.009528	0.009608	0.009283	0.009250
3	0.009528	0.009668	0.009249	0.009484
Promedio	0.009528	0.009668	0.009308	0.009426
CV	1.7%			

Nota: La concentración inicial (t=0) es estimada por el cálculo del peso del estándar y la dilución y pureza de éste.

$$\% \text{ Dif. Abs} = \frac{\left| \text{Prom. cond. normal} - \text{Prom. del cambio} \right|}{\text{Prom. cond normal}} \times 100$$

Donde:

Dif. Abs = Diferencia Absoluta

Prom. Cond. Normal = Promedio de condición normal

Prom. Del cambio = Promedio del cambio

Ejemplo:

$$\% \text{ Dif. Abs} = \frac{|0.009528 - 0.009668|}{0.009528} \times 100$$

Inicio 0 h	t=0 h (mg/mL)	t=48 h (mg/mL)	t=72h (mg/mL)	t=186 h (mg/mL)
Promedio (mg/mL)	0.009528	0.009668	0.009308	0.009426
Diferencia abs		0.00014	0.00022	0.000102
%		1.5	2.3	1.1

Estabilidad muestra

Tiempo cero: Primera inyección = 28 nov 2009 13:56 pm

Tiempo final: Primera inyección = 01 dic 2009 6:23 am

Tiempo total inicio – tiempo final = tiempo de estudio = 90 horas.

Las muestras se rotularon con tiempo de 72 horas, el tiempo de 90 horas se establece entre la diferencia de la primera inyección de muestra del tiempo 1 y la primera inyección de muestra del tiempo 2.

$$\% \text{ Dif. Abs} = \frac{| \text{Prom. cond. normal} - \text{Prom. del cambio} |}{\text{Prom. cond normal}} \times 100$$

Impureza 2		
Muestra	t=0 h % Impureza	t=90 h % Impureza
1	0.056048	0.064614
2	0.054419	0.058647
3	0.059187	0.057030
Promedio	0.056551	0.060097
CV	6.1%	

Inicio 0 h	t=0 h (%)	t=90 h (%)
Promedio (mg/mL)	0.0566	0.0601
Diferencia abs		0.0035
%		6.2

Muestra impureza 4		
Muestra	t=0 h % Impureza	t=90 h % Impureza
1	0.080027	0.070026
2	0.073155	0.058142
3	0.047500	0.079673
Promedio	0.066894	0.069280
CV	18.9%	

Inicio 0 h	t=0 h (%)	t=90 h (%)
Promedio (mg/mL)	0.066894	0.069280
Diferencia abs		0.002386
%		3.6

4.5.9.2 Variación de los métodos de filtración.

Prueba de filtros suspensión.

Filtro PVDF 0.45µm vs Filtro NYLON 0.45µm

Muestra	Filtro PVDF (0.45µm) (Condición normal) Área	Filtro NYLON (0.45µm) (Condición de cambio) Área
1	255538	258534
2	254477	255682
3	252554	255492
Promedio	254190	256569
CV	0.8%	

$$\% \text{ Dif. Abs} = \frac{| \text{Prom. cond. normal} - \text{Prom. del cambio} |}{\text{Prom. cond normal}} \times 100$$

	Filtro PVDF (0.45µm) (Condición normal) mg/mL (unidades)	Filtro NYLON (0.45µm) (Condición de cambio) mg/mL (unidades)
Promedio	254190	256569
Diferencia absoluta		2379
%		0.9

Muestra	Filtro PVDF (0.45µm) (Condición normal) % Impureza 5	Filtro NYLON (0.45µm) (Condición de cambio) % Impureza 5
1	0.0833	0.0833
2	0.0840	0.0813
3	0.0781	0.0826
Promedio	0.0818	0.0824
CV	2.6%	

$$\% \text{ Dif. Abs} = \frac{| \text{Prom. cond. normal} - \text{Prom. del cambio} |}{\text{Prom. cond normal}} \times 100$$

	Filtro PVDF (0.45µm) (Condición normal) mg/mL (unidades)	Filtro NYLON (0.45µm) (Condición de cambio) mg/mL (unidades)
Promedio	0.0818	0.0824
Diferencia absoluta		0.0006
%		0.7

La prueba de linealidad y exactitud del método se realizó con filtros PVDF 0.45 μ m obteniéndose resultados satisfactorios por lo que se decide que se indicará el uso de éstos en el método.

Prueba de filtros, cápsulas y tabletas.

La prueba de linealidad y exactitud del método se realizó con filtros PVDF 0.45 μ m obteniéndose resultados satisfactorios por lo que se decide que se indicará el uso de éstos en el método.

4.5.10 Tolerancia.

4.5.10.1 El factor a evaluar es: Sistema cromatográfico.

Suspensión.

- **Nota:** Solo se realizó la prueba de extracción en la concentración de 125mg/5mL ya que en la preparación de las suspensiones, en todas sus concentraciones se llega al final a la misma concentración y la suspensión de 125mg/5mL es la que en su formulación contiene mayor cantidad de placebo.

Muestra	Tolerancia equipo	
	Equipo 1 ALLIANCE 3 Área cefadroxilo	Equipo 2 ALLIANCE 4 Área cefadroxilo
1	255759	255538
2	244226	254540
3	262424	252636
Promedio	254136	254238

Estadístico de todos los datos	
Promedio	254187
Desv. STD	5897
CV	2.3%

Muestra	Tolerancia equipo	
	Equipo 1	Equipo 2
	ALLIANCE 3 % Impureza 2	ALLIANCE 4 % Impureza 2
1	0.1175	0.1025
2	0.1193	0.1026
3	0.1208	0.1045
Promedio	0.1192	0.1032

Estadístico de todos los datos	
Promedio	0.1112
Desv. STD	0.008854
CV	8.0%

Cápsulas.

Se realizó la prueba de tolerancia sólo con la presentación de 500mg por que la concentración final de la solución es la misma para 250mg y 500mg.

Muestra	Tolerancia equipo	
	Equipo 1 ALLIANCE 3 % Impureza 2	Equipo 2 ALLIANCE 8 % Impureza 2
1	0.082529	0.078369
2	0.079035	0.077577
3	0.082299	0.077782
Promedio	0.081288	0.077909

Estadístico de todos los datos	
Promedio	0.079599
Desv. STD	0.002240
CV	2.8%

Muestra	Tolerancia equipo	
	Equipo 1 ALLIANCE 3 % Impureza 4	Equipo 2 ALLIANCE 8 % Impureza 4
1	0.118930	0.112322
2	0.123511	0.110822
3	0.120002	0.114477
Promedio	0.120814	0.112540

Estadístico de todos los datos	
Promedio	0.116677
Desv. STD	0.004918
CV	4.2%

Tabletas.

Esta prueba se realizó para este parámetro en las formas farmacéuticas de suspensión y cápsulas dando como resultado un método tolerante al cambio de equipo, por lo mismo se decide ya no realizar la prueba en tabletas ya que su formulación es más simple.

4.5.10.2 Extractabilidad de la muestra.

Extractabilidad (tiempo de agitación) Suspensión.

Tiempo normal 10 min de agitación magnética vs 5 min y vs 15min.

Muestra	Tiempo de agitación (condición normal) 10 min Área cefadroxilo	Tiempo de agitación (condición de cambio) 5 min Área cefadroxilo	Tiempo de agitación (condición de cambio) 15 min Área cefadroxilo
1	255673	255969	251258
2	245715	252449	252241
3	254968	257763	252932
Promedio	252119	255394	252144
CV	1.7%		

	Tiempo de agitación (condición normal) 10 min Cefadroxilo	Tiempo de agitación (condición de cambio) 5 min cefadroxilo	Tiempo de agitación (condición de cambio) 15 min cefadroxilo
Prom	252119	255394	252144
Diferencia absoluta		3275	25
%		1.3	0.01

Muestra	Tiempo de agitación (condición normal) 10 min % Impureza 5	Tiempo de agitación (condición de cambio) 5 min % Impureza 5	Tiempo de agitación (condición de cambio) 15 min % Impureza 5
1	0.1830	0.1837	0.1788
2	0.1786	0.1804	0.1798
3	0.1832	0.1850	0.1941
Promedio	0.1816	0.1830	0.1842
CV		2.6%	

	Tiempo de agitación condición normal 10 min % impureza	Tiempo de agitación condición de cambio 5 min % impureza	Tiempo de agitación condición de cambio 15 min % impureza
Prom	0.1816	0.1830	0.1842
Diferencia absoluta		0.0014	0.0026
%		0.8	1.4

Tabla de resultados.

Tiempos de extracción	Pico	CV	Dif abs	Criterio	Cumple
5 minutos	cefadroxilo	1.7%	1.3	%CV \leq 20.0	Sí
15 minutos			0.01		Sí
5 minutos	impureza 5	0.7%	0.8	% Dif Absoluta \leq 5.0% para CEFADROXILO	Sí
15 minutos			1.4	% Dif Absoluta para impurezas CEFADROXILO	Sí

Extractabilidad (tiempo de agitación) cápsulas y tabletas.

En este punto solo se revisó el tiempo de agitación.

4.5.11 Sensibilidad del método (Límite de detección y cuantificación).

4.5.11.1 Límite de detección

4.5.11.2 Límite de cuantificación

Parámetros obtenidos del cálculo de la linealidad del sistema	
Pendiente	2.49397E7
S _(Y/X)	2455.09

$$LD = 3.3 \times 2455.09 / 24939700 = 0.000324855 \text{ mg/mL}$$

$$LC = 10 \times 2455.09 / 24939700 = 0.0009844 \text{ mg/mL}$$

Comprobación de límite de detección	
Concentración de la solución preparada al LD	Área obtenida
0.0003760	6569
	6483
	6613
	6033
	6124
	8206
Promedio	6671
Desv. STD	788.9
CV	11.8%

Comprobación de límite de cuantificación	
Concentración de la solución preparada al LC	Área obtenida
0.000940	2277
	2286
	2257
	2193
	2230
	2320
Promedio	2261
Desv. STD	44.6
CV	2.0%

	% con respecto al 100% del activo	% con respecto al 100% de la especificación
Límite de Detección	0.03760	37.6
Límite de Cuantificación	0.094	94.0

4.5.12 Criterios de Aceptación.

Resumen de resultados suspensiones.

Prueba	Especificación	Resultado
Adecuabilidad	$CV \leq 5.0\%$ del área Platos teóricos ≥ 2000 $Coleo \leq 1.5$ Tiempo de retención= 12-18 minutos	$CV = 0.8\%$ del área Platos teóricos = 7997 $Coleo = 1.0$ Tiempo de retención= 14.0 minutos
Precisión del sistema	$CV \leq 5.0\%$ del area	$CV = 0.4 \%$
Especificidad	No se encuentra interferencia con el pico de interés debido a excipientes de la muestra ó productos de degradación y/o sí cumple con los criterios de linealidad del método, el método analítico es específico.	No se encuentra interferencia con el pico de interés debido a excipientes de la muestra ó productos de degradación y cumple con los criterios de linealidad del método
Especificidad para métodos indicativo de estabilidad	El valor de purity threshold es mayor al valor de purity angle.	Cumple
Linealidad del sistema	$r^2 \geq 0.98$ El $(IC_{\beta 1})$ no debe incluir el cero.	$r^2 = 0.999815$ Ordenada al origen = -266.722 El $(IC_{\beta 1})$ no incluye el cero.
Linealidad del método	Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada: $r^2 \geq 0.98$ El $CV_{y/x}$ del % de recobro \leq a 2.0% Para porcentaje de recobro: El IC (μ) Incluye 100% o Promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: 95.0 - 105.0% El $CV \leq 5.0\%$	Producto $r^2 = 0.999737$ El $CV = 1.5\%$ El IC (μ) promedio de recobro: (95.8% - 97.5%) El promedio aritmético del % de recobro= 96.8%

Prueba	Especificación	Resultado
Exactitud y repetibilidad	El IC(μ) Incluye el 100 % ó el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: 95.0 -105.0% El CV del porcentaje de recobro \leq 5.0%	Producto El IC(μ)=96.5% - 97.9% El CV=0.7%
Precisión intermedia	$CV \leq 20.0\%$	Producto 125mg/5mL El CV impureza 2 = 12.5% Producto 500mg/5mL El CV impureza 2 = 7.4%
Robustez	%Diferencia absoluta de la media aritmética (d_i) \leq 5.0% para cefadroxilo CV total \leq 20.0%	Variación filtro $d_i = 0.9\%$
Estabilidad de la muestra y estándar de trabajo	%Diferencia absoluta de la media aritmética (d_i) \leq 5.0% para cefadroxilo CV total \leq 20.0%	Temperatura refrigeración STD 186h $d_i = 1.1\%$ CV = 1.6% Temperatura refrigeración muestra cefadroxilo $d_i = 2.6$ CV = 1.5%

Prueba	Especificación	Resultado
Tolerancia	$CV \leq 20.0\%$	Equipo CV = 0.03% Extractabilidad (tiempo de agitación 5 minutos) $d_i = 1.3\%$ Extractabilidad (tiempo de agitación 15 minutos) $d_i = 0.01\%$
Límites de detección y de cuantificación	El LD y LC debe ser menor a la especificación de la valoración LD señal de interés detectables por el sistema LC El CV del área $\leq 5\%$	LD = 0.0003760mg/mL señal detectable LC = 0.0009400mg/mL CV de área = 2.0%

Resumen de resultados cápsulas.

Prueba	Especificación	Resultado
Adecuabilidad	$CV \leq 5.0\%$ del área Platos teóricos ≥ 2000 $Coleo \leq 1.5$ Tiempo de retención = 12-18 minutos	$CV = 0.8\%$ del área Platos teóricos = 7997 Coleo = 1.0 Tiempo de Retención = 14.0 minutos
Precisión del sistema	$CV \leq 5.0\%$ del area	$CV = 0.4\%$
Especificidad	Los picos de interés no deben presentar interferencia con otras sustancias presentes, impurezas, productos de degradación u otros picos presentes en el sistema por arriba del 1.0%.	No se encuentra interferencia con el pico de interés debido a excipientes de la muestra ó productos de degradación y cumple con los criterios de linealidad del método
Especificidad para métodos indicativo de estabilidad	Los picos de interés no deben presentar interferencia con otras sustancias presentes, impurezas, productos de degradación u otros picos presentes en el sistema por arriba del 1.0%. El valor de purity threshold es mayor al valor de purity angle.	No se encuentra interferencia con el pico de interés debido a excipientes de la muestra ó productos de degradación y cumple con los criterios de linealidad del método. Cumple.
Linealidad del sistema	$r^2 \geq 0.98$ El $(IC_{\beta 1})$ no debe incluir el cero.	$r^2 = 0.999815$ Ordenada al origen = -266.722 El $(IC_{\beta 1})$ no incluye el cero.

Prueba	Especificación	Resultado
Linealidad del método	<p>Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada: $r^2 \geq 0.98$</p> <p>Pendiente: Cercana a 1 Ordenada al Origen: Cercana a cero El $CV_{y/x}$ del % de recobro \leq a 2.0%</p> <p>Para porcentaje de recobro: El IC (m) incluye 100% o Promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: 95.0 - 105.0% El $CV \leq 5.0\%$</p>	<p>$r^2 = 0.999949$ Pendiente: 0.993176 Ordenada origen: 0.0000527169 El $CV = 1.3\%$ El IC (μ) promedio de recobro: (99.5% - 101.5%) El promedio aritmético del % de recobro = 100.5%</p> <p>(99.4% - 102.0%) El promedio aritmético del % de recobro = 100.7%</p>
Exactitud y repetibilidad	<p>El IC(μ) Incluye el 100 % ó el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: 95.0 -105.0% El CV del porcentaje de recobro \leq 5.0%</p>	<p>Producto El IC(μ) = 99.2% – 100.1% El $CV = 0.5\%$</p>
Precisión intermedia	<p>$CV \leq 20.0\%$</p>	<p>Producto 250mg El CV impureza 4 = 10.1%</p> <p>Producto 500mg El CV impureza 4 = 12.8% El CV impureza 2 = 11.3%</p>

Prueba	Especificación	Resultado
Estabilidad del estándar de trabajo y de la muestra	%Diferencia absoluta de la media aritmética (d_i) \leq 5.0% para cefadroxilo CV total \leq 20.0%	<p>Temperatura Refrigeración STD 186h d_i =1.1% CV=1.7%</p> <p>Temperatura Refrigeración Muestra cefadroxilo CV= 3.6%</p> <p>Impureza 4 CV= 4.2% $\%d_i$ =0.5%</p>
Tolerancia	CV \leq 20.0%	<p>Equipo CV = 2.8%</p>
Límites de detección y de cuantificación	El LD y LC debe ser menor a la especificación de la valoración LD señal de interés detectables por el sistema LC El CV del área \leq 5.0%	<p>LD = 0.0003760mg/mL señal detectable</p> <p>LC = 0.0009400mg/mL CV de area = 2.0%</p>

Resumen de resultados tabletas.

Prueba	Especificación	Resultado
Adecuabilidad	$CV \leq 5.0\%$ del área Platos teóricos ≥ 2000 $Coleo \leq 1.5$ Tiempo de Retención= 12-18 minutos	$CV = 0.8\%$ del área Platos teóricos = 7997 $Coleo = 1.0$ Tiempo de Retención= 14.0 minutos
Precisión del Sistema	$CV \leq 5.0\%$ del area	$CV = 0.4\%$
Especificidad	Los picos de interés no deben presentar interferencia con otras sustancias presentes, impurezas, productos de degradación u otros picos presentes en el sistema por arriba del 1.0%	No se encuentra interferencia con el pico de interés debido a excipientes de la muestra ó productos de degradación y cumple con los criterios de linealidad del método.
Especificidad para métodos indicativo de estabilidad	Los picos de interés no deben presentar interferencia con otras sustancias presentes, impurezas, productos de degradación u otros picos presentes en el sistema por arriba del 1.0% El valor de purity threshold es mayor al valor de purity angle.	No se encuentra interferencia con el pico de interés debido a excipientes de la muestra ó productos de degradación y cumple con los criterios de linealidad del método. Cumple
Linealidad del sistema	$r^2 \geq 0.98$ El $(IC_{\beta 1})$ no debe incluir el cero.	$r^2 = 0.999815$ Ordenada al origen = -266.722 El $(IC_{\beta 1})$ no incluye el cero.

Prueba	Especificación	Resultado
Linealidad del Método Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada:	$r^2 \geq 0.98$ Pendiente: Cercana a 1 Ordenada al Origen: Cercana a cero El $CV_{y/x}$ del % de recobro \leq a 2.0% Para porcentaje de recobro: El IC (μ) Incluye 100% o Promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: 95.0 - 105.0%	$r^2 = 0.999841$ Pendiente: 0.988369 Ordenada Origen: -0.0000545138 El CV = 1.3% El IC (μ) promedio de recobro: (97.7% - 99.3%) El promedio aritmético del % de recobro= 98.5%
Exactitud y repetibilidad	El IC(μ) Incluye el 100 % ó el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: 95.0 -105.0% El CV del porcentaje de recobro \leq 5.0%	El IC(μ)=96.8% – 98.6% El CV = 0.9%
Precisión intermedia	$CV \leq 20.0\%$	El CV impureza 2 =12.9% El CV impureza 4= 11.8% El CV impureza 5=9.9%

Prueba	Especificación	Resultado
Estabilidad del estándar de trabajo y de la muestra	<p>%Diferencia absoluta de la media aritmética (d_i) \leq 5.0% para cefadroxilo</p> <p>CV total \leq 5.0% para cefadroxilo</p> <p>%Diferencia absoluta de la media aritmética (d_i) informativa para impurezas</p> <p>CV total \leq al 20.0% para impurezas</p>	<p>Temperatura refrigeración STD 186h $d_i = 1.1\%$ CV=1.7%</p> <p>Temperatura refrigeración Muestra 90horas Impureza 2 CV= 6.1% $\%d_i = 6.3\%$ Impureza 4 CV= 18.9% $\%d_i = 3.6\%$</p>
Tolerancia	CV \leq 20.0%	Tolerante a cambio de equipo. Se probó en cápsulas y suspensiones
Límites de detección y de Cuantificación	<p>El LD y LC debe ser menor a la especificación de la valoración</p> <p>LD señal de interés detectables por el sistema</p> <p>LC El CV del área \leq 5.0%</p>	<p>LD = 0.0003760mg/mL señal detectable</p> <p>LC = 0.0009400mg/mL</p> <p>CV de área= 2.0%</p>

Nombre de archivo: TESIS_UNAM8_CAP5.doc
Directorio: D:\Documents and Settings\jaimes\Mis documentos\tesis
imprimir\RESCATADO\8 tomos
Plantilla: D:\Documents and Settings\jaimes\Datos de
programa\Microsoft\Plantillas\Normal.dotm
Título: CAPÍTULO 5
Asunto:
Autor: Usuario
Palabras clave:
Comentarios:
Fecha de creación: 25/10/2010 21:31:00
Cambio número: 59
Guardado el: 05/11/2011 9:20:00
Guardado por: MARY
Tiempo de edición: 12,252 minutos
Impreso el: 24/11/2011 10:55:00
Última impresión completa
Número de páginas: 54
Número de palabras: 5,890 (aprox.)
Número de caracteres: 32,397 (aprox.)

CAPÍTULO 6

ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al término de la validación para impurezas de cefadroxilo en cápsulas, tabletas y suspensiones y de acuerdo a los resultados obtenidos tenemos que:

4.5.1 Adecuabilidad del sistema.

Al evaluar la adecuabilidad del sistema verificamos el funcionamiento apropiado de nuestro sistema (instrumento, analista, equipo, sustancia de referencia, entre otros) que éste opere con base a los criterios preestablecidos en nuestro método lo cual permite asegurar la confiabilidad de los resultados. Los resultados obtenidos para la adecuabilidad de nuestro sistema de Cefadroxilo impurezas cumplen satisfactoriamente con los criterios establecidos por nuestro método ya que se obtuvo un CV de 0.8% para la respuesta medida (área) que es menor al 5.0% indicado en los criterios de aceptación, la eficiencia de 7997 es mayor a 2000 platos teóricos y un factor de coleo de 1.0 el cual es menor a 1.5 indicado en los criterios de aceptación y asegurando con esto la confiabilidad de nuestros resultados.

4.5.2 Precisión del sistema.

El sistema es preciso por que hay concordancia entre los resultados analíticos, obtenidos a partir de inyecciones individuales de diferentes porciones de una referencia, el resultado obtenido para el CV de las áreas de cefadroxilo fue de 0.4% el cual fue menor al 5.0% establecido como criterio de aceptación.

4.5.3 Especificidad.

En el método para determinación de impurezas de cefadroxilo

- 1.- Las impurezas se cuantifican a través de porcentajes de área con respecto al pico de cefadroxilo.
- 2.- No se cuenta con marcadores de impurezas conocidas de cefadroxilo.

Tomando en cuenta las consideraciones anteriores tenemos que al determinar la especificidad nos interesa:

- a) Que la señal generada por el cefadroxilo no sea interferida por señales generadas por la fase móvil, el diluyente o el gradiente, es decir obtener una señal pura (homogénea determinada por ángulos de pureza y ruido).
- b) Las señales generadas por las impurezas, tampoco sean interferidas por señales generadas por la fase móvil, el diluyente o el gradiente.

Al analizar por forma farmacéutica tenemos que:

Especificidad para suspensión.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el método es específico para la determinación de impurezas de cefadroxilo en suspensión, ya que ninguno de los componentes del sistema interfiere con el tiempo de retención del activo, es decir, ni la fase móvil, ni el diluyente generan señales o picos que coincidan con el tiempo de retención del cefadroxilo y el único componente del placebo que genera señal es el benzoato de sodio, la señal generada por éste, es un pico definido que se separa visiblemente y sale en tiempo posterior al pico del principio activo.

Al realizar el análisis de los espectros para determinar homogeneidad y pureza de los picos bajo la comparación de purity angle y purity threshold a las muestras que presentan el pico de cefadroxilo el resultado en todos los casos, es que el parámetro de purity angle es menor al parámetro de purity threshold lo cual se interpreta como que el pico de cefadroxilo presenta un cromatograma homogéneo en todos sus puntos y se puede considerar por lo mismo puro.

Aún cuando no existe un estándar marcador de impurezas para el cefadroxilo con el que descartaríamos las señales presentes en el cromatograma que no son impurezas propias del principio activo, debemos identificar todas las señales obtenidas que no se presenten en el blanco; para descartar el reportar el benzoato de sodio como parte de las impurezas de cefadroxilo, se sugiere, que posterior a la validación en cada corrida de muestras de suspensión de cefadroxilo se realice una inyección del estándar de benzoato de sodio o una inyección del placebo de suspensión para identificar el tiempo de retención del benzoato de sodio.

Especificidad para cápsulas y tabletas.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el método es específico para la determinación de impurezas de cefadroxilo en cápsulas ya que ninguno de los componentes del sistema interfiere con el tiempo de retención del activo, es decir, ni la fase móvil, ni el diluyente generan señales o picos que coincidan con el tiempo de retención del cefadroxilo y el único componente del placebo no genera ninguna señal.

Al realizar el análisis de los cromatogramas para determinar homogeneidad y pureza de los picos bajo la comparación de purity angle y purity threshold a las muestras que presentan el pico de cefadroxilo el resultado en todos los casos, es que el parámetro de purity angle es menor al parámetro de purity threshold lo

cual se interpreta como que el pico de cefadroxilo presenta un espectro homogéneo en todos sus puntos y se puede considerar por lo mismo puro.

Aún cuando no existe un estándar marcador de impurezas para el cefadroxilo con el que descartaríamos las señales presentes en el cromatograma que no son impurezas propias del principio activo, debemos identificar todas las señales obtenidas que no se presenten en el blanco.

4.5.4 Especificidad para métodos indicativos de estabilidad.

El método analítico es específico para cuantificar impurezas de cefadroxilo ya que no existe coelución de ningún pico con el pico del principio activo, al degradarse la muestra en las distintas condiciones de temperatura, pH ácido y pH básico y ningún pico adicional interfiere con el pico de cefadroxilo.

Al realizar el análisis de los cromatogramas para determinar homogeneidad y pureza de los picos bajo la comparación de purity angle y purity threshold a las muestras que presentan el pico de cefadroxilo el resultado en todos los casos, es que el parámetro de purity angle es menor al parámetro de purity threshold lo cual se interpreta como que el pico de cefadroxilo presenta un espectro homogéneo en todos sus puntos y se puede considerar por lo mismo puro.

Aún cuando no existe un estándar marcador de impurezas para el cefadroxilo con el que descartaríamos las señales presentes en el cromatograma que no son impurezas propias del principio activo, debemos identificar todas las señales obtenidas que no se presenten en el blanco.

En el caso de suspensión para descartar el reportar el benzoato de sodio como parte de las impurezas de cefadroxilo, se sugiere, que posterior a la validación en cada corrida de muestras de suspensión de cefadroxilo se realice una inyección del estándar de benzoato de sodio o una inyección del placebo de suspensión para identificar el tiempo de retención del benzoato de sodio.

Para cada una de las preparaciones de cada forma farmacéutica la presencia de impurezas en número y en tiempo de retención fue recurrente.

Suspensión: 5 impurezas

Tabletas: 5 impurezas

Cápsulas: 4 impurezas

4.5.5 Linealidad del sistema.

El sistema es lineal ya que los resultados obtenidos son proporcionales a la concentración del analito. El coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r^2) son 0.999907 y 0.999815 respectivamente; el intervalo de confianza para la pendiente **NO** incluye al cero. Por lo que podemos cuantificar con nuestro sistema confiablemente impurezas, dentro del rango de concentración de 0.000991mg/mL-0.0198294mg/mL que equivale a cuantificar dentro de un rango de 0.10% al 2.0% cefadroxilo.

4.5.6 Linealidad del método.

Al determinar los parámetros establecidos en nuestro diseño experimental para la linealidad del método:

Suspensión.

El coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r^2) son (r) = 0.999869 y (r^2) = 0.999737; la pendiente 0.975197 y la ordenada al origen -0.000021174 se encuentra cercana a 0.

Cápsulas.

El coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r^2) son (r) = 0.999949 y (r^2) = 0.999892; la pendiente 0.993176 se encuentra cercana a 1 y la ordenada al origen 0.0000527169 se encuentra cercana a 0.

Tabletas.

El coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r^2) son (r) = 0.99992 y (r^2) = 0.999841; la pendiente 0.988369 se encuentra cercana a 1 y la ordenada al origen -0.0000545138 se encuentra cercana a 0.

Podemos determinar que el método es lineal en el intervalo de concentraciones analizado y por tanto, la presencia de excipientes en las diferentes formulaciones probadas, no interfiere tanto en la cuantificación, en el rango establecido en el diseño experimental como dentro del rango establecido para cuantificación de impurezas de cefadroxilo por nuestro método.

4.5.7 Exactitud del método.

Al determinar los parámetros establecidos en nuestro diseño experimental para la exactitud del método:

Exactitud del método al 100% suspensión.

El método es exacto porque el porcentaje de recuperación promedio es 97.2 %, valor que se encuentra incluido en el intervalo del criterio de aceptación que va del 95.0% – 105.0%. El método es repetible por que se obtienen un CV = 0.7% menor al 5.0%, para ambos casos; indicado en los criterios de aceptación.

Exactitud del método al 100% cápsulas.

El método es exacto porque el porcentaje de recuperación promedio es 99.6%, valor que se encuentra incluido en el intervalo del criterio de aceptación que va del 95.0% – 105.0%. El método es repetible por que se obtienen un CV= 0.5% menor al 5.0%, para ambos casos; indicado en los criterios de aceptación.

Exactitud del método al 100% tabletas.

El método es exacto porque el porcentaje de recuperación promedio es 97.7%, valor que se encuentra incluido en el intervalo del criterio de aceptación que va del 95.0% – 105.0%. El método es repetible por que se obtienen un CV = 0.9% menor al 5.0%, para ambos casos; indicado en los criterios de aceptación.

El método es exacto ya que el porcentaje de recuperación promedio está dentro del rango del criterio de aceptación, así como es repetible por que se obtiene un CV menor al establecido.

4.5.8 Precisión intermedia.

Al determinar el grado de variabilidad entre los resultados obtenidos para impurezas de dos analistas en dos días distintos y considerando que las concentraciones evaluadas en el presente método para las impurezas de cefadroxilo son muy pequeñas y que tienden a aumentar con respecto al tiempo y que por tanto el CV permitido de acuerdo al diseño experimental debe ser \leq al 20% entre muestras, obtenemos que el grado de concordancia entre los resultados no presenta un grado significativo de variabilidad y por tanto podemos decir que nuestro método es preciso para la determinación de impurezas de cefadroxilo en las 3 formulaciones farmacéuticas probadas.

4.5.9 Robustez.

4.5.9.1 Estabilidad de la muestra y estándar de trabajo.

Al realizar las comparaciones de medias y calcular la diferencia de éstas entre el tiempo inicial y los tiempos de 48 horas, 72 horas y 186 horas, para las respuestas obtenidas del pico de cefadroxilo en el estándar, podemos observar que el resultado, tomando como base el obtenido al tiempo inicial y comparando con los resultados subsecuentes las diferencias de medias obtenidas están por abajo del límite establecido en el diseño experimental con lo que podemos decir que nuestro estándar es estable en condiciones de refrigeración hasta por 186 horas que fue el tiempo probado.

Para las muestras de suspensión se compararon las medias (el tiempo inicial y los tiempos de 48 horas, 72 horas y 186 horas para la muestra con las respuestas obtenidas de los picos de impurezas mayores a 0.10%) y el cálculo de la diferencia de medias en general fue por abajo del 20% que fue el límite establecido en el protocolo, así como también el CV promedio de cada impureza para las respuestas obtenidas en los diferentes tiempos determinados se encontró por abajo del límite establecido en el diseño para determinar que nuestra muestra es estable por 186 horas en refrigeración.

Estabilidad de la suspensión, muestra y estándar de trabajo.

De acuerdo a los resultados presentados concluimos que los estándares son estables por 186 horas, las muestras de producto son estables por 186 horas.

Estabilidad de las cápsulas, muestra y estándar de trabajo.

De acuerdo a los resultados presentados concluimos que los estándares son estables por 186 horas, las muestras de producto son estables por 211 horas.

Estabilidad de las tabletas, muestra y estándar de trabajo.

De acuerdo a los resultados presentados concluimos que los estándares son estables por 186 horas, las muestras de producto son estables por 90 horas.

4.5.9.2 Variación en los métodos de filtración.

Prueba de filtro suspensión.

Los resultados obtenidos en los porcentajes de diferencia de medias para los picos de cefadroxilo y para la impureza 5 de cefadroxilo suspensión en la condición de cambio de filtros están por abajo del 2.0% por lo que concluimos que el usar cualquiera de los dos filtros es equivalente.

Prueba de filtros cápsulas.

Los resultados obtenidos en los porcentajes de diferencia de medias para los picos de cefadroxilo y para la impureza 5 de cefadroxilo cápsulas en la condición de cambio de filtros están por debajo del 2.0% por lo que concluimos que el usar cualquiera de los dos filtros es equivalente.

Prueba de filtros tabletas.

La prueba de linealidad y exactitud del método se realizó con filtros PVDF 0.45 μ m obteniéndose resultados satisfactorios por lo que se decide que se indicará el uso de éstos en el método.

4.5.10 Tolerancia.

4.5.10.1 El factor a evaluar es: Sistema cromatográfico.

Al realizar el cálculo del porcentaje de coeficiente de variación (CV) para los resultados obtenidos para cefadroxilo y para las impurezas presentes en nuestras muestras observamos que están por abajo del límite establecido como parámetro para determinar como tolerante a nuestro método al cambio de equipo ninguna de las impurezas salió del límite de 20.0%

El coeficiente de variación obtenido para los picos de cefadroxilo y para la impureza 2 de cefadroxilo suspensión en la condición de cambio de equipo están por abajo del 20.0% por lo que concluimos que el usar cualquier equipo es equivalente en el análisis de impurezas de cefadroxilo por este método.

Esta prueba se realizó con este método en las formas farmacéuticas de suspensión y cápsulas dando como resultado un método tolerante al cambio de equipo, por lo mismo, se decidió no realizar la prueba en tabletas ya que su formulación es más simple.

4.5.10.2 Extractabilidad de la muestra.

Extractabilidad (tiempo de agitación) suspensión.

Al realizar la comparación de medias y calcular la diferencia de éstas entre los resultados obtenidos para la comparación de tiempos de agitación de las muestras en la condición original (30 minutos de agitación magnética) y la condición probada para robustez (5 minutos de agitación magnética) los porcentajes de diferencias de medias para los picos de cefadroxilo y para la impureza 5 en el caso de suspensión están por abajo del 5.0% por lo que concluimos que el tiempo de extractabilidad de las muestras por agitación

magnética puede variar de entre 5 y 30 minutos sin tener problemas de reproducibilidad en los resultados ya que las muestras no presentan disminución en los porcentajes de disolución y extracción del principio activo y las impurezas de las muestras de suspensión de cefadroxilo al presentar esta variación.

Extractabilidad (tiempo de agitación) cápsulas y tabletas.

En este punto solo se revisó el tiempo de agitación.

4.5.11 Sensibilidad del método (Límite de detección y cuantificación).

Límites de detección y cuantificación.

- Al calcular el límite de detección a través del uso de error estándar de la regresión y el valor obtenido de la pendiente de la linealidad del sistema obtuvimos que, nuestro límite de detección es 0.000324855mg/mL el cuál, es inferior al límite de impurezas de cefadroxilo establecido para nuestro método como: informar todas las impurezas y degradantes que sean $\geq 0.10\%$ equivalentes a 0.001 mg/mL.
- Al comprobar la sensibilidad de nuestro método inyectamos repetidamente la concentración calculada como límite de detección y obtuvimos en todas las inyecciones una respuesta fácilmente detectable de cefadroxilo por nuestro sistema de integración de datos (Empower).

Por lo que podemos decir que aún a concentraciones de 0.0003mg que equivale en por ciento al 0.03760 del principio activo, nuestro sistema es capaz de detectar fácilmente la señal.

- Los resultados obtenidos y calculados como límites de detección y cuantificación están por abajo de la concentración establecida como límite de reporte de impurezas de cefadroxilo que es el reportar todas las impurezas y degradantes que sean $\geq 0.10\%$ equivalentes a 0.001mg/mL .
- Límite de cuantificación en el análisis de la comprobación obtenemos señal detectable y reproducible por el sistema reportar datos en los límites establecidos en el protocolo para el pico de interés CV del área $\leq 5\%$.

4.5.12 Criterios de aceptación.

Conclusiones para suspensiones.

El método analítico de HPLC empleado para la determinación de impurezas en cefadroxilo suspensión en sus presentaciones comerciales: $125\text{mg}/5\text{mL}$ y $500\text{mg}/5\text{mL}$ cumple satisfactoriamente con los parámetros evaluados en las condiciones de operación del método, ya que es específico, lineal, exacto y reproducible.

Conclusiones para cápsulas.

El método analítico de HPLC empleado para la determinación de impurezas en cefadroxilo cápsulas en sus presentaciones comerciales: 250mg y 500mg cumple satisfactoriamente con los parámetros evaluados en las condiciones de operación del método, ya que es específico, lineal, exacto y reproducible.

Conclusiones para tabletas.

El método analítico de HPLC empleado para la determinación de impurezas en cefadroxilo tabletas de 1g cumple satisfactoriamente con los parámetros evaluados y en las condiciones de operación del método, ya que es específico, lineal, exacto y reproducible.

Conclusión para la validación de cefadroxilo impurezas.

De acuerdo a los resultados y al análisis de éstos podemos concluir que nuestro método evaluado en el presente documento es lineal, preciso, exacto y robusto a las variaciones establecidas en el diseño experimental, probadas analíticamente y comprobadas estadísticamente ya que cumple con los criterios de aceptación establecidos para cada prueba .

El método se deberá revalidar cuando se modifique cualquier condición de operación del método analítico que pudiese afectar directamente alguno de los parámetros evaluados en la validación ó exista algún cambio en la fórmula cualitativa y/o cuantitativa, proceso ó materia prima en el producto.

Para el caso de suspensiones la impureza 3 corresponde al benzoato de sodio por lo que no se toma como una impureza por que esta señal no es debida al cefadroxilo sino a un aditivo.

Aún cuando este método se planteó originalmente como método para determinación de impurezas, realmente después del desarrollo de esta validación se puede concluir que este método es realmente para determinación de degradantes formados por el proceso de degradación de la muestra a través de las condiciones de almacenamiento. (temperatura, humedad y pH).

Nombre de archivo: TESIS_UNAM9_CAP6.doc
Directorio: D:\Documents and Settings\jaimes\Mis documentos\Downloads
Plantilla: D:\Documents and Settings\jaimes\Datos de programa\Microsoft\Plantillas\Normal.dotm
Título: CAPITULO 6
Asunto:
Autor: fonsecgu
Palabras clave:
Comentarios:
Fecha de creación: 11/11/2010 18:24:00
Cambio número: 17
Guardado el: 05/11/2011 9:29:00
Guardado por: MARY
Tiempo de edición: 1,344 minutos
Impreso el: 24/11/2011 13:00:00
Última impresión completa
Número de páginas: 13
Número de palabras: 2,932 (aprox.)
Número de caracteres: 16,127 (aprox.)

BIBLIOGRAFÍA

1. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). Novena Edición. Pág. 11. Apéndice I. Validación de Métodos Analíticos. Recomendaciones para su presentación ante la FEUM pág. 2472. Vol. 2.
2. Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP) 32. Formulario Nacional Compendios de Normas Oficiales. Monografías oficiales / Cefadroxilo Vol. 2. págs. 1961-1963.
3. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006, “Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos”, (modifica a la NOM-059-SSA1-1993, publicada el 31 de julio de 1998).
4. Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de Fármacos y Medicamentos (Modifica a la NOM-073-SSA1-1993, Estabilidad de Medicamentos, publicada el 3 de agosto de 1996).
5. Guía de Validación para Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C., Edición 202, Comisión de Validación de Métodos Analíticos, Ma. Araceli García.
6. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Goodman & Gilman 9ª Edición. Mc Graw-Hill Interamericana Vol. II, Cap. 5, págs. 1158, 1163-1165.
7. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas (PLM) 2004. Dr. Emilio Rosenstein Ster. Ediciones PLM, S.A. de C.V.
8. Química Analítica Moderna. David Harvey. Mc Graw-Hill Interamericana España S.A.U. 2002 págs. 402-406.

Nombre de archivo: TESIS_UNAM10_BIBLIOGRAFIA.doc
Directorio: D:\Documents and Settings\jaimes\Mis documentos
Plantilla: D:\Documents and Settings\jaimes\Datos de
programa\Microsoft\Plantillas\Normal.dotm
Título: BIBLIOGRAFIA
Asunto:
Autor: fonsecgu
Palabras clave:
Comentarios:
Fecha de creación: 19/10/2010 15:32:00
Cambio número: 11
Guardado el: 05/11/2011 9:39:00
Guardado por: MARY
Tiempo de edición: 10 minutos
Impreso el: 24/11/2011 10:54:00
Última impresión completa
Número de páginas: 1
Número de palabras: 207 (aprox.)
Número de caracteres: 1,141 (aprox.)