



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

***VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA
CUANTIFICAR CLONIXINATO DE LISINA Y
DICLOFENACO SÓDICO EN UNA
SOLUCION INYECTABLE POR CROMATOGRFÍA
DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN***

TESIS:

Que para obtener el título de
Químico Farmacéutico Biólogo

PRESENTA:

Hugo Cuatecontzi Flores

ASESOR:

M. en C. Elvia Adriana Morales Hipólito

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**



**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

EXÁMENES PROFESIONALES

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Validación de un método analítico para cuantificar Clonixinato de Lisina y Diclofenaco Sódico en una solución inyectable por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

Que presenta el pasante: Hugo Cuatecontzi Flores
Con número de cuenta: 099074432 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 12 de enero de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	QFB. Elia Granados Enriquez	
VOCAL	Dra. Raquel López Arellano	
SECRETARIO	M. en C. Elvia Adriana Morales Hipólito	
1er SUPLENTE	QFB. José Antonio Garduño Rosas	
2do SUPLENTE	Dra. Flora Adriana Ganem Rondero	

NOTA: los síndicos suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

II Dedicatorias

A mi hermana

*Por ser la familia que
necesito,
por ser la persona que me
respalda en los actos,
pensamiento y la razón
por el consejo que hace falta
en los momentos difíciles,
por enseñarme a tener valor
para afrontar la vida y ser
honesto siempre, gracias.*

A mis amigos

*(Iván De la O, Israel Trejo e Iván Vázquez)
Mucha suerte tuve al encontrarlos
y mucho más en conservar su amistad
verlos hoy conseguir sus metas
es una inmensa alegría,
gracias por compartir conmigo todo este tiempo
y viva el AD&D y el MH2*

III Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi segunda casa desde mi adolescencia hasta hoy, por todas las experiencias vividas ahí y las que me dará en un futuro cercano, para seguir creciendo como científico, gracias.

A mis padres Don Odi y Doña Placida por las enseñanzas y la educación que me dieron me hicieron mucho bien en dejarme tomar mis propias decisiones y apoyarme aun cuando no lo pedía.

A mi familia de voluntad y elección (Alejandro Castro y Fernanda "Matas"), por hacer a mi hermana feliz en cuerpo y alma y llenar mi tiempo de inmensas experiencias e inagotables anécdotas, que atesoro en mi mente.

A mi hermano, tíos, primos y sobrinos, por la alegría de una experiencia de vida, vista desde otro punto y por los consejos culturales, sociales, políticos, morales pero sobretodo por los honestos.

A mi asesora de tesis la M. en C. Adriana Morales por todos los consejos y enseñanzas, porque aunque no me conocías tu confiaste en mí, por tu inmensa paciencia y el apoyo incondicional y total, gracias.

A Sorayda Espinosa gracias por compartir un momento de tu vida conmigo, y brindarme felicidad y experiencia desde que nuestros caminos se cruzaron, espero que sigamos juntos llenando de alegría nuestras memorias, para el futuro.

A mis compañeros y amigos: Fabiola, Alinne, Jazmín, Hecuba, Lourdes, Alejandro, Regina, Gabriela, Claudia Mariano, Esmeralda, Verónica, Sra. Carmen, Omar, Humberto, Octavio, Gabriel Gabriela (Bio), Jessica, Humberto (la maldita) y a todas las personas que comparten o compartieron algún momento de su vida conmigo.

A la Doctora Raquel López y el Profesor Juan José Díaz, gracias por permitirme formar parte del grupo LEDEFAR, y por el apoyo mostrado siempre.

A los compañeros de laboratorio Sandra, Néstor, Alinne, Pablo, Abdiel, Lizbeth, y Nora, y Lupita por la compañía durante mi proceso de elaboración de esta tesis.

Índice General

1. Introducción.....	1
2. Objetivos	2
<i>Objetivo general</i>	2
<i>Objetivos particulares</i>	2
3. Marco teórico.....	3
A) <i>Generalidades</i>	3
1.- CLAR (Ventajas, usos y utilidad en la actualidad)	3
2.- Tipos de CLAR.....	4
a) Cromatografía de fase normal.....	4
b) Cromatografía de fase reversa	5
c) Cromatografía de exclusión molecular	6
d) Cromatografía de intercambio iónico.....	7
e) Cromatografía basada en bioafinidad.....	7
3.- Parámetros a considerar en CLAR	8
• Diámetro interno.....	8
• Tamaño de las partículas.....	8
• Tamaño de poro.....	8
• Presión de la bomba	9
4.- Clonixinato de Lisina.....	9
5.- Diclofenaco sódico.....	10
B) Importancia de la validación de los métodos analíticos	12
1) Validación	12
a) <i>Verificación y Validación</i>	12
b) Categorías y aspectos de la validación	13
➤ La validación prospectiva.....	13
➤ La validación retrospectiva	14
➤ Validación concurrente	15
➤ Validación cruzada.....	16
➤ Validación total.....	17
➤ Validación Parcial	17
➤ Revalidación	18

2) Ventajas y usos de la validación	20
C) Comparación entre métodos analíticos para determinar CL y DS.	21
1) Condiciones cromatográficas	21
4. Desarrollo experimental.....	23
A) Cuadro metodológico	23
B) Materiales y métodos	24
C) Condiciones cromatográficas.....	24
D) Procedimientos	25
I) Preparación de Búfer de fosfatos 0.0064 M pH 7.00	25
II) Procedimiento para la preparación de STD de CL - DS.....	26
III) Procedimiento descriptivo del ensayo por HPLC de una solución inyectable de CL – DS.....	27
IV) Respuesta	28
i) <i>Fórmula para calcular el contenido químico de Clonixinato de Lisina ...</i>	28
ii) <i>Fórmula para calcular el contenido químico de Diclofenaco Sódico:....</i>	28
5.- Resultados y discusión.....	29
A) Determinación de las condiciones de trabajo.....	29
B) Especificidad	30
C) Adecuabilidad del sistema	31
D) Precisión del sistema	32
E) Linealidad del sistema.....	33
F) Precisión del método (precisión intermedia).....	38
G) Exactitud del método	39
H) Linealidad del método	45
I) Reproducibilidad y repetibilidad del método	55
6. Conclusiones.....	58
7. Anexos	59
7. Referencias	81

Índice de Figuras

Figura	Descripción	Página
1	Evaluación de la respuesta obtenida en relación con el volumen de inyección de la muestra.	30
2	Cromatogramas que muestran la especificidad del método.	30
3	Gráfico de la linealidad del sistema para el Clonixinato de Lisina	34
4	Gráfico de la linealidad del sistema para el Diclofenaco Sódico	34
5	Gráfico del error relativo para el Clonixinato de Lisina vs. la concentración del analito.	35
6	Grafico del error relativo para el Diclofenaco Sódico vs. la concentración del analito.	36
7	Gráfico del porcentaje recuperado y los intervalos de confianza obtenidos para Clonixinato de Lisina.	44
8	Gráfico del porcentaje recuperado y los intervalos de confianza obtenidos para Diclofenaco Sódico.	44
9	Gráfico de la linealidad ajustada del método para el Clonixinato de Lisina	49
10	Gráfico de la linealidad ajustada del método para el Diclofenaco Sódico.	49
11	Grafico del error relativo para el Clonixinato de Lisina vs. la concentración del analito.	50

12	Grafico del error relativo para el Diclofenaco Sódico vs. la concentración del analito.	50
13	Porcentajes de recobro del CL \pm la desviación estándar para la reproducibilidad del método.	57
14	Porcentajes de recobro del DS \pm la desviación estándar para la reproducibilidad del método.	57

Índice de tablas

Tabla no.	Descripción	Página
1 a y b	Condiciones cromatográficas experimentales encontradas en la revisión bibliográfica realizada. (a) y (b)	22
2	Condiciones experimentales de trabajo para la validación del método analítico.	24
3	Datos de la evaluación de la adecuabilidad del sistema.	31
4	Datos obtenidos de la evaluación de la precisión del sistema cromatográfico.	32
5	Datos que muestran el área obtenida para la evaluación de la linealidad del sistema y el área vs. concentración del analito.	33
6	Resultados del ANOVA realizado a la regresión de los dos analitos (CL y DS).	37

7	Resultados de la regresión para la determinación de la linealidad del sistema.	37
8	Datos de la precisión del método a la nivel de 100% de analito.	38
9	Resultados de CV de 2 analistas, 2 días para determinar a cantidad real recuperada.	39
10	Resultados de los CV para Clonixinato de Lisina a los tres niveles de trabajo.	40
11	Resultados de los CV para Diclofenaco Sódico a los tres niveles de trabajo.	41
12	Prueba de t para los dos analitos (CL y DS) e IC calculados.	43
13	Resultados de la evaluación de la linealidad del método por triplicado para CL.	45
14	Resultados de la evaluación de la linealidad del método por triplicado para DS	46
15	Resultados de la regresión para la determinación de la linealidad del método.	47
16	Resultados de la concentración recuperada y % de CL a los 5 niveles de trabajo.	47
17	Resultados de la concentración recuperada y % de DS a los 5 niveles de trabajo.	48
18	Resultados del ANOVA realizado a la regresión de los dos	51

	analitos (CL y DS) para la determinación de linealidad.	
19	Resultados de la regresión ajustada para la determinación de los coeficientes y la realización de las hipótesis.	52
20	Prueba de t para los dos analitos (CL y DS) y la probabilidad para la comprobación de las hipótesis.	53
21	Resultados de la evaluación de la repetibilidad (1 analista, 2 días) y la reproducibilidad (2 analistas, 2 días).	55

1. Introducción

La determinación del contenido químico en los productos farmacéuticos es una parte fundamental, que se realiza para mantener el control de calidad en los procesos de fabricación, con el fin de determinar si presentan la cantidad de principio activo que indica en el marbete, para ello es importante contar con una metodología analítica cuantitativa, fundamentada en las diferencias estructurales y propiedades químicas de los principios activos del producto farmacéutico, para permitir distinguir entre estos principios y determinar cual es el contenido real de forma selectiva y precisa.

En general todos los métodos analíticos son sometidos a una evaluación que se denomina validación, mediante la cual se demuestra y también se comprueba que el método es lo suficientemente confiable y que los resultados se encuentran dentro de las especificaciones farmacopeicas o de fabricación en el caso de productos nuevos.

La validación consta de dos partes, la primera incluye una evaluación de la adecuabilidad, linealidad y precisión del sistema, es decir, lo referente al equipo o instrumento utilizado; mientras que la segunda parte corresponde a la linealidad, precisión, exactitud, repetibilidad, reproducibilidad, y rango del método, esto corresponde al desarrollo del método analítico que permite cuantificar a los principios activos con confiabilidad.

En este caso en particular se validó un método por CLAR, utilizando las condiciones de los métodos existentes para establecer métodos de análisis de principios activos más eficaces y eficientes, que permitan no solo cuantificar un principio activo, sino múltiples, de manera confiable y rápida, con el menor gasto de recursos y haciendo el mejor uso del material disponible para la optimización de los recursos de investigación.

Debido a que la demanda de métodos analíticos para cuantificar sustancias por CLAR, va en aumento por la capacidad de este equipo para realizar múltiples ensayos en un periodo de tiempo relativamente pequeño; el mejorar los métodos desarrollados por otros investigadores permite realizar un trabajo más rápido en la validación de los mismos, y la reproducibilidad de un método en diversos laboratorios, lo que facilita el análisis de medicamentos.

2. Objetivos

Objetivo general

Validar un método analítico experimental por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) evaluando los parámetros estadísticos para determinar su confiabilidad, en la cuantificación de una solución inyectable de Clonixinato de Lisina (CL) y Diclofenaco Sódico (DS)

Objetivos particulares

- Investigar y seleccionar las condiciones cromatográficas de análisis, utilizando como referencia las condiciones establecidas en diversos artículos para cuantificar a CL, DS o ambos.

- Determinar que el método analítico cumple con las pruebas estadísticas (especificaciones) para métodos cromatográficos y puede ser utilizado para cuantificar CL – DS en solución inyectable de manera simultánea y confiable.

- Evaluar la posible aplicabilidad del método analítico cuantificando una muestra de CL – DS en solución inyectable para determinar el contenido químico que presentan.

3. Marco teórico

A) Generalidades

1.- CLAR (Ventajas, usos y utilidad en la actualidad)

Las siglas CLAR son la abreviatura de Cromatografía Líquida de Alta Resolución, esta es una de las tantas variantes de cromatografía que se conocen en el área de la química, en este tipo de cromatografía se usan columnas de sílica con determinadas características (grupos funcionales, cadena, etc.), sus usos en la actualidad están enfocados en la bioquímica y química analítica.

En la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución del tipo isocrática, él o los compuestos pasan por la columna cromatográfica y atraviesan la fase estacionaria mediante el bombeo de la fase móvil a alta presión. El o los analitos que se desean cuantificar son introducidos mediante una inyección en pequeñas cantidades y todos los componentes se retienen diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria.

El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía.

Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo. El agua puede contener tampones, sales, o compuestos como el ácido trifluoroacético, que ayudan a la separación de los compuestos.

Una mejora introducida a la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, es la variación en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como elución en gradiente. El gradiente separa los componentes de la muestra como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad por la fase estacionaria. En esta tesis se utilizó la elución de tipo isocrática la cual mantienen constante la composición de la fase móvil

durante todo el análisis de la muestra, en este caso los componentes necesitan que la columna cromatográfica llegue al equilibrio para evitar comportamientos variados entre los cromatogramas, y obtener así los mejores resultados posibles.

También se le denomina Cromatografía Líquida de Alta Presión, porque en el principio del desarrollo de la cromatografía se pensó que la presión era parte fundamental de la separación de las sustancias pero después se demostró que solo mejoraba la forma de los picos, y aunque esta terminología se considera antigua y está en desuso; los aparatos más modernos de CLAR incorporan mejoras para poder trabajar a presiones más altas y, por lo tanto, poder utilizar partículas de tamaño más pequeño en las columnas (< 2 micrómetros). Estos nuevos aparatos, denominados Cromatógrafos de líquidos de ultra resolución o UPLC por sus siglas en inglés pueden trabajar con valores de hasta 100 MPa de presión (aprox. 1000 atmósferas).^{18, 23,27.}

2.- Tipos de CLAR

La Cromatografía de líquidos de alta resolución es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

a) Cromatografía de fase normal

La cromatografía de fase normal, fue el primer tipo de sistema CLAR utilizado en el campo de la química, y se caracteriza por separar los compuestos en base a su polaridad. Esta técnica utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil apolar, y se utiliza cuando el compuesto de interés es polar. El compuesto polar interacciona y es retenido por la fase estacionaria. La fuerza de adsorción aumenta a medida que aumenta la polaridad del compuesto y la interacción entre el compuesto polar y la fase estacionaria polar (en comparación a la fase móvil) aumenta el tiempo de retención.

La fuerza de interacción no sólo depende de los grupos funcionales del compuesto de interés, sino también en factores estéricos de forma que los isómeros estructurales a menudo se pueden diferenciar el uno del otro. La utilización de disolventes más polares en la fase móvil disminuye el tiempo de

retención de los compuestos mientras que los disolventes más hidrofóbicos tienden a aumentar el tiempo de retención.^{18, 23, 27.}

b) Cromatografía de fase reversa

La Cromatografía de líquidos de alta resolución de fase reversa consiste en una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada. Una de las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía es la sílica modificada (grupos funcionales, cadena, etc.) El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente.

El tiempo de retención aumenta con la adición de disolvente polar a la fase móvil y disminuye con la introducción de disolventes más hidrofóbicos. La cromatografía de fase reversa es tan utilizada que a menudo se lo denomina CLAR sin ninguna especificación adicional. La cromatografía de fase reversa se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar, y una fase estacionaria apolar. La fuerza conductora en la unión del compuesto a la fase estacionaria es la disminución del área del segmento apolar del analito expuesto al disolvente. El efecto hidrofóbico disminuye con la adición de disolvente apolar a la fase móvil. Esto modifica el coeficiente de partición de forma que el compuesto se mueve por la columna y eluye.

Las características del compuesto de interés juegan un papel muy importante en la retención. En general, un compuesto con una cadena alquil larga se asocia con un tiempo de retención mayor porque aumenta la hidrofobicidad de la molécula. Aun así, las moléculas muy grandes pueden ver reducida la interacción entre la superficie del compuesto y la fase estacionaria. El tiempo de retención aumenta con el área de superficie hidrofóbica que suele ser inversamente proporcional al tamaño del compuesto. Los compuestos ramificados suelen eluir más rápidamente que sus isómeros lineales puesto que la superficie total se ve reducida.

Aparte de la hidrofobicidad de la fase móvil, otras modificaciones de la fase móvil pueden afectar la retención del compuesto; por ejemplo, la adición de sales

inorgánicas provoca un aumento lineal en la tensión superficial, y como la entropía de la interfase compuesto-disolvente está controlada precisamente por la tensión superficial, la adición de sales tiende a aumentar el tiempo de retención.

Otra variable importante es el pH puesto que puede cambiar la hidrofobicidad del compuesto. Por este motivo, la mayoría de métodos utilizan un tampón como el fosfato de sodio por controlar el valor del pH. Estos tampones controlan el pH, pero también neutralizan la carga o cualquiera resto de sílica de la fase estacionaria que haya quedado expuesta y actúan como contraiones que neutralizan la carga del compuesto. El efecto de los tampones sobre la cromatografía puede variar, pero en general mejoran la separación cromatográfica.

Las columnas de fase reversa se echan a perder con menor facilidad que las columnas de sílica normales. Aun así, muchas columnas de fase reversa están formadas por sílica modificada con cadenas alquil y no se deben utilizar nunca con bases en medio acuoso puesto que éstas podrían dañar el esqueleto de sílica subyacente. Las columnas se pueden utilizar en ácidos en medio acuoso pero no deberían estar expuestas demasiado tiempo al ácido porque puede corroer las partes metálicas del aparato de HPLC.^{18, 23, 27.}

c) Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular, también conocida como cromatografía por filtración en gel, separa las partículas de la muestra en función de su tamaño. Generalmente se trata de una cromatografía de baja resolución de forma que se suele utilizar en los pasos finales del proceso de purificación. También es muy útil para la determinación de la estructura terciaria y la estructura cuaternaria de las proteínas purificadas.

La cromatografía de filtración molecular es un método de cromatografía en columna por el cual las moléculas se separan en solución según su peso molecular, o más precisamente, según su radio de Stokes.

En esta cromatografía, la fase estacionaria consiste en largos polímeros entrecruzados que forman una red tridimensional porosa. Para fines prácticos, las columnas se empaquetan con pequeñas partículas esféricas formadas por

esos polímeros entrecruzados. En consecuencia, estas partículas son porosas, y el tamaño de los poros es tal que algunas moléculas (las demasiado grandes) no podrán ingresar a esos poros, en tanto que otras (las suficientemente pequeñas) podrán pasar libremente. Los poros quedan conectados formando una malla o red, lo cual determina una serie de caminos a ser recorridos por las moléculas que acceden al interior de esta.^{18, 27}

d) Cromatografía de intercambio iónico

En la cromatografía de intercambio iónico, la retención se basa en la atracción electrostática entre los iones en solución y las cargas inmovilizadas a la fase estacionaria. Los iones de la misma carga son excluidos mientras que los de carga opuesta son retenidos por la columna. Algunos tipos de intercambiadores iónicos son:

1. Resinas de poliestireno,
2. Intercambiadores iónicos de celulosa y dextranos (geles)
3. Sílica porosa o vidrio de tamaño de poro controlado.

En general los intercambiadores iónicos favorecen la unión de iones que presentan radio pequeño. Un incremento en la concentración del contraión (respeto a los grupos funcionales de la resina) reduce el tiempo de retención. Un incremento en el pH reduce el tiempo de retención en las cromatografías de intercambio catiónico mientras que una disminución del pH reduce el tiempo de retención en las cromatografías de intercambio aniónico.^{18, 23, 27.}

e) Cromatografía basada en bioafinidad

Este tipo de cromatografía se basa en la capacidad de las sustancias biológicamente activas de formar complejos estables, específicos y reversibles. La formación de estos complejos implica la participación de fuerzas moleculares como las interacciones de Van der Waals, interacciones electrostáticas, interacciones dipolo-dipolo, interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno entre las partículas de la muestra y la fase estacionaria.^{18, 27}

3.- Parámetros a considerar en CLAR

- Diámetro interno

El diámetro interno de una columna de CLAR es un aspecto crítico que determina la cantidad de muestra que se puede cargar a la columna y también influye en su sensibilidad. Las columnas de diámetro interno más grande (>10 mcm) se utilizan normalmente en la purificación de compuestos para su utilización posterior. En cambio, las columnas de diámetro interno menor (4-5 mcm) se utilizan en el análisis cuantitativo de las muestras, y se caracterizan por el aumento de la sensibilidad y la minimización del consumo de disolventes que conllevan. Estas columnas se suelen denominar columnas de rango analítico y normalmente están asociadas a un detector UV-VIS.²⁷

- Tamaño de las partículas

La mayoría de HPLC tradicionales se realizan con una fase estacionaria unida al exterior de partículas esféricas de sílica. Estas partículas pueden tener diferentes medidas, siendo las de 5 µm de diámetro las más utilizadas.

Partículas más pequeñas ofrecen una mayor superficie y una mejor separación, pero la presión que se requiere por obtener una velocidad lineal óptima aumenta de forma inversamente proporcional al cubo del diámetro de la partícula. Esto significa que disminuir la medida de las partículas a la mitad, aumentaría la resolución de la columna, pero a la vez, aumentaría la presión necesaria en un factor de ocho.²⁷

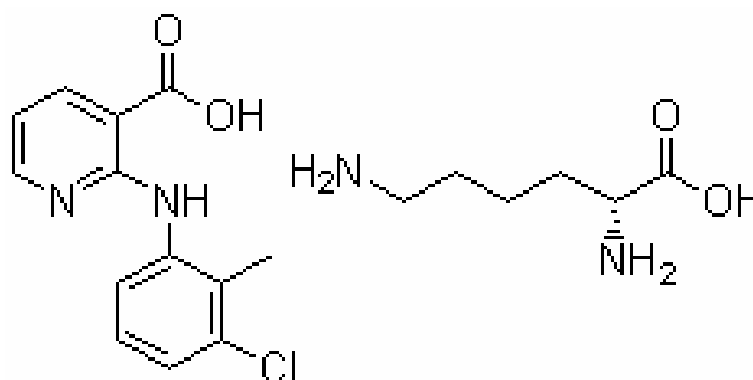
- Tamaño de poro

Muchas fases estacionarias son porosas para proporcionar una mayor superficie. Los poros pequeños proporcionan una mayor superficie mientras que los poros de mayor medida proporcionan una cinética mejor, especialmente para los compuestos de tamaño más grande; por ejemplo, una proteína que sea ligeramente más pequeña que el tamaño de los poros puede entrar, pero difícilmente saldrá con facilidad.²⁷

- Presión de la bomba

La presión de las bombas es variable según el modelo y fabricante, pero su rendimiento se mide en su habilidad para generar un flujo constante y reproducible. La presión puede lograr valores de hasta 40 MPa (o unas 400 atmósferas).²⁷

4.- Clonixinato de Lisina ^{2, 7, 28, 31}



Fórmula Molecular $C_{13}H_{11}ClN_2O_2 \cdot C_6H_{14}N_2O_2$ Peso Molecular 408.88

CAS Número de Registro 55837-30-4

Formas comerciales existentes de Clonixinato de Lisina ^{7, 28}

DORIXINA FORTE

Inyectable

Cada ml de SOLUCIÓN INYECTABLE contiene:

Clonixinato de Lisina..... 50 mg

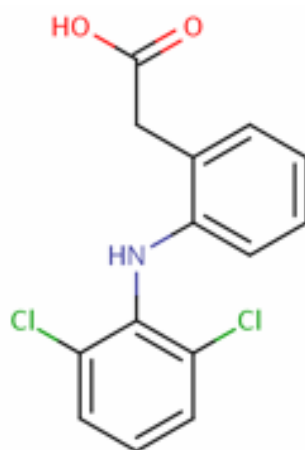
Vehículo, c.b.p..... 2 ml.

FIRAC**Inyectable**

Cada ml de SOLUCIÓN INYECTABLE contiene:

Clonixinato de Lisina100 mg 200 mg

Vehículo c.b.p.2 ml 4 ml

5.- Diclofenaco sódico ^{2, 7, 28, 31}

Fórmula Molecular $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$ Peso Molecular 295.0167

CAS Número de registro 15307-86-5

Punto de fusión 283-285 °C

Predicción Log P 4.98

pKa / Punto isoeléctrico 4.15

Formas comerciales existentes de Diclofenaco Sódico

ARTRENAC **Inyectable**

Cada ml de SOLUCIÓN INYECTABLE contiene:

Diclofenaco sódico..... 75 mg

Vehículo, c.b.p.3 ml.

ATALAK **Inyectable**

Cada ml de SOLUCIÓN INYECTABLE contiene:

Diclofenaco sódico..... 75 mg

Vehículo, c.b.p.3 ml.

DICLAC **Inyectable**

Cada ml de SOLUCIÓN INYECTABLE contiene:

Diclofenaco sódico.....75 mg

Agua inyectable, c.b.p.3 ml.

Estos son los productos que comercialmente se encuentran disponibles, por este motivo es que se genero una formulación que contenga CL – DS, para potenciar el efecto por acción de sinergia o aumentar su capacidad de acción por sitio múltiple de acción generando en el paciente una mayor respuesta de los fármacos ya mencionados contra el dolor.

Debido a que la mezcla de CL – DS es nueva, es necesario generar una técnica analítica para cuantificar y este trabajo sirve para ese fin, y es de gran utilidad para la cuantificación de contenido químico, por tal motivo fue necesario seleccionar las condiciones de los artículos encontrados a fin de establecer cuales eran la mas viables dependiendo de los recursos que se requerían y los que se tenían.

B) Importancia de la validación de los métodos analíticos

1) Validación ^{10, 20, 22, 27}

a) Verificación y Validación

La verificación y la validación es el proceso de comprobar que un método cumple con las especificaciones y con el propósito para lo que fue creado; este es un componente crítico de control de calidad bajo la norma ISO 9000.

La Verificación es un proceso de calidad que es usado para evaluar si un producto o servicio cumple con la regulación, especificación o condiciones impuestas al comenzar a desarrollar. La verificación puede ser en el desarrollo, en el escalamiento o en el proceso de producción, esto es a menudo un proceso interno.

La validación se define como la evidencia documentada que provee un alto grado de seguridad de que un proceso específico o un equipo producirán en forma homogénea y reproducible un producto que cumplirá con especificaciones predeterminadas y sus atributos de calidad. Esto a menudo involucra la aceptación o conveniencia del cliente.

La validación de un equipo o proceso asegura que:

- El resultado del mismo es reproducible, cumple con el uso propuesto y está normalizado
- El resultado es comparable al de otro equipo o proceso similar validado
- El mantenimiento de las propiedades de un proceso, producto o equipo

Las principales razones para validar son, para cumplir con los principios básicos del Control de Procesos

- La calidad, inocuidad y eficacia se construyen en el producto
- La calidad no se puede ensayar o inspeccionar en el producto final
- Cada paso de un proceso se debe controlar para alcanzar los requerimientos de calidad

El diseño de proceso es esencial porque la calidad del producto se diseña en el proceso de producción y la validación al final demuestra que:

- La calidad final del producto es inherente al proceso
- Cada etapa del proceso se diseña y controla para tener la máxima seguridad que el producto cumple con las especificaciones

Por otra parte el control de calidad por si mismo no otorga seguridad de la calidad del producto, ya que todo plan de muestreo pueden no detectar algún porcentaje de producto no conforme.

b) Categorías y aspectos de la validación

Trabajar en una validación puede ser generalmente categorizado como sigue:

- La validación prospectiva^{20, 21, 27}

La validación prospectiva, es asegurar que los nuevos métodos analíticos estén listos para evaluar o analizar, sustancias de interés con propiedades farmacológicas y establecer previamente los estándares de seguridad y calidad.

Es la que se realiza sobre un proceso antes de que sea implementado

- Para la fabricación de nuevos productos
- Cuando hay cambios fundamentales en un proceso

Es la que comúnmente se elige porque regularmente asegura el éxito del proceso antes de su implementación y se pueden elegir y controlar las variables a ensayar en el proceso

La validación prospectiva debería incluir lo siguiente:

- Breve descripción del proceso
- Resumen de las fases críticas del proceso de fabricación que se van a investigar
- Listado de los equipos o instalaciones que se van a utilizar junto con su estado de calificación

- Especificaciones del producto terminado para su aprobación
- Listado de métodos analíticos, según corresponda
- Propuesta de controles durante el proceso, junto con sus criterios de aceptación
- Ensayos adicionales, junto con sus criterios de aceptación y la validación analítica
- Plan de muestreo
- Métodos de registro y evaluación de los resultados
- Funciones y responsabilidades;
- Calendario propuesto.
- Mediante el proceso así definido, incluidos los componentes especificados, se debe elaborar una serie de lotes del producto final en condiciones de rutina.
- En teoría, el número de repeticiones del proceso y de las observaciones realizadas deberá bastar para que se pueda establecer el margen normal de variación y las tendencias para facilitar datos suficientes para su evaluación.
- Se considera como validación aceptable para el proceso no menos de tres lotes o repeticiones consecutivas que cumplan con los parámetros especificados.
- Los lotes realizados para la validación del proceso deben ser del mismo tamaño que los lotes previstos a escala operacional.

➤ La validación retrospectiva^{20, 21, 27}

Es un proceso en el que los métodos analítico ya están en uso, esta validación se basa en mejorar nuevamente las especificaciones o las expectativas del método, optimizándolo para su mejor desempeño; basados en toda la información documental histórica disponible para este método analítico. En caso que datos críticos se pierdan, no puedan ser procesados o solo puedan ser procesados parcialmente. La prueba es considera necesaria si:

- La validación prospectiva se anulo, es inadecuada o fallo.
- Los cambios en la regulación gubernamental o los estándares de calidad afectan al producto que fue liberado o recién salio al mercado.
- Se quiere restablecer producto fuera de uso.

La validación retrospectiva solo aplica en los siguientes casos:

- Solamente es aceptable para procesos ya establecidos y será inadecuada cuando se han producido cambios recientes en la composición del producto, en los procedimientos de fabricación o en el equipamiento.
- Los datos empleados para esta validación se deben extraer, entre otras fuentes, de los archivos de elaboración y acondicionamiento de lotes, diagramas de control de proceso, cuadernos de mantenimiento, registros de cambios de personal, estudios de adecuación de proceso, datos sobre productos terminados
- Los lotes seleccionados para la validación retrospectiva deben ser representativos de todos los lotes fabricados durante el periodo de revisión, incluidos los que no cumplan las especificaciones, y su número será suficiente para demostrar la consistencia del proceso.

➤ Validación concurrente^{20, 21}

Este tipo de validación es la que se realiza durante la producción normal y por esto es efectiva solo si el desarrollo del proceso permite asegurar su comprensión total para la ejecución y para esto se deben monitorear tan profundamente como sea posible los tres primeros lotes de producción. Este tipo de validación es llevada a cabo durante el proceso de producción, análisis de producto, etc.; un ejemplo de esta validación puede ser al procesar o analizar muestras por duplicado, o un análisis simple con múltiples testigos.

Está basada en la revisión histórica de los registros como evidencia documental de la validación

- Para procesos / productos ya en uso o disponibles antes de requerir la validación
- Para asegurar la calidad de un procesos / producto

➤ Validación cruzada ^{11, 12, 17, 19}

Esta validación también es llamada estimación rotacional, se trata de una práctica estadística, en la que se distribuye una muestra de datos dentro de subcategorías cuyo análisis es ejecutado sobre una sola categoría, mientras que las otras subcategorías son retenidas para su subsecuente uso en la confirmación y validación del análisis inicial de datos.

La categoría inicial es llamada categoría base; y el resto es llamada categorías de validación. Esto es importante para defender la propuesta contra las hipótesis sugeridas por los datos, especialmente cuando las muestras directas son peligrosas, costosa o imposible de coleccionar.

Es la comparación de los parámetros de validación cuando dos o mas métodos bioanalíticos reutilizan para generar los datos y estos datos pueden proceder de diferentes estudios. Un ejemplo de esto es que un método analítico que se utiliza sirve también como referencia para comparar en respuesta otro método analítico desarrollado o modificado.

Los tipos más comunes de validación cruzada:

- Validación Holdout (alargada o estirada)
- Repeated random sub-sampling validation
- K-fold cross-validation
- Leave-one-out cross-validation

➤ Validación total^{11, 12}

Es importante cuando se desarrolla o implementa un método analítico o bioanalítico por primera vez, en un laboratorio.

También es importante realizar una validación total cuando se tiene como objeto un nuevo analito o la combinación de analitos en el desarrollo de una nueva formulación o forma farmacéutica.

Una validación completa es necesaria para demostrar que el método de determinado ensayo, sirve aun incluyendo los metabolitos existentes del analito en cuestión y puede cuantificarlos.

➤ Validación Parcial^{11, 12, 32}

Es usada menudo para buscar y recopilar información de estudios piloto si el tiempo es una limitante. En este caso solo las partes más importantes de una validación son examinadas o evaluadas. Y desde un punto de vista de la química analítica solo se analiza la selectividad, exactitud, repetibilidad, linealidad y el rango. La validación parcial abarca desde la evaluación de un pequeño rango de muestras hasta casi una validación completa, esto depende de las necesidades del laboratorio.

Un cambio en la metodología analítica cae dentro de esta categoría cuando incluye alguno de estos cambios pero no la limitan:

- Cuando el método va a ser transferido entre laboratorios
- Cambio en la metodología analítica
- Cambios en la matriz de la especie de animal con el que se trabaja
- Cambio en el proceso de muestras de análisis
- Cambios relevantes en el rango de concentración
- Cambios en el instrumento o plataforma del software de análisis
- Demostración selectiva de un analito en presencia de metabolitos específicos

➤ Revalidación^{1, 20}

Los métodos analíticos requieren validación sin embargo en determinados condiciones los métodos pueden desarrollar cambios. La revalidación de un método analítico puede llevarse a cabo si cumple con las siguientes circunstancias:

- Un método existente es modificado para darle determinados requerimientos especiales.
- Cambios en la ruta de síntesis del principio activo que constituye la formulación, que puede generar distinta carga de impurezas
- Cambios en la composición de la formulación del producto.
- Los protocolos deben establecer cuando se necesitará realizar la revalidación del sistema o de un proceso.
- La revalidación está vinculada al control de procesos y el control de cambios

También conocida como validación local o validación periódica, es llevada de forma separada y se le realiza a los productos que fueron retirados, reformulados o después del periodo de caducidad. Ejemplos de esta categoría son la rectificación de una balanza analítica después de su fecha de ajuste o al ser reubicada, y necesita una revalidación profesional.

Los cambios son inevitables y siempre acabarán por aparecer, pero lo primordial es mantener las condiciones por eso se deben identificar las fuentes y mantener procedimientos adecuados para su control. La revalidación debería ser para mejorar y asegurar que el método analítico mantiene sus características. El grado de revalidación depende de la naturaleza del cambio, por ejemplo una nueva forma farmacéutica con mayor dureza requiere una validación en términos del recobro y la linealidad, mientras que una nueva formulación requiere una revalidación de la especificidad, el recobro, etc.

“EL DESAFIO ES MANTENER EL PROCESO VALIDADO”

Un cambio es cualquier modificación voluntariamente introducida que afecta los procedimientos, equipos, instalaciones, métodos de control, materiales, la cual debe estar amparada y además tener un procedimiento de control de cambios; ya que si no se establecen procedimientos adecuados para el control de cambios, los mismos pueden provocar la pérdida de control de los procesos, los equipos y por lo tanto la razón de ser de su validación

FUENTES DE CAMBIOS

I) Proveedores

- *Equipos*
- *Componentes*
- *Materias primas*
- *Reactivos*

II) Medio ambiente

- *Ubicación*
- *Temperatura, humedad*

III) Equipos

- *Ajustes. Reparaciones*
- *Modificaciones*

IV) Personal

- *Falta de entrenamiento*
- *Cambios en los PNO sin evaluación*

V) Calidad

- *Cambios en el sistema*
- *Modificaciones en los PNO*

Este proceso de revalidación es necesario cuando existen cambio en:

- Envase / Empaque
- Equipos
- Procesos / Procedimientos
- Características del producto

2) Ventajas y usos de la validación ^{20, 21,22}

Como se ha revisado la industria del sector farmacéutico requiere de múltiples documentos que demuestren que cumplen con las especificaciones de calidad que necesita el cliente, por esto la validación de los procesos es esencial para cumplir las normas BPF.

La validación de sistemas permite garantizar en gran medida que un proceso específico generará siempre un producto que se ajuste a especificaciones predeterminadas.

Ventajas de la validación:

“La Validación es garantía de tranquilidad”

Además de documentar las funciones operativas habituales, se pueden establecer alertas en los sistemas, para cumplir la norma BPF.

La Validación ahorra tiempo y dinero. Porque permite a los profesionales en el sector farmacéutico estar capacitados para comprender las necesidades del producto y para identificar las posibles soluciones

Ejecución de la Validación

Gracias a una documentación completa y detallada, la validación se puede realizar en el propio laboratorio o transferirlo, con el fin de llevar a cabo el proceso de producción y evitar así gastos de transporte o tener que realizar nuevas exigencias normativas.

C) Comparación entre métodos analíticos para determinar CL y DS.

En la búsqueda bibliográfica realizada se procedió a seleccionar cuales podrían ser las mejores condiciones de trabajo para determinar el CL - DS, las condiciones encontradas de muestran en la tabla 1a y 1b, la fase móvil más común era el metanol y una solución búfer, la longitud de onda para determinar los analitos debería ser cercana al 280, y los volúmenes de inyección entre 10 y 30 μL ; y las proporciones de metanol deberían ser mayores que las del búfer, cuando menos en una proporción (3:2).

1) Condiciones cromatográficas

Tabla 1a: Condiciones cromatográficas experimentales encontradas en la revisión de artículos.

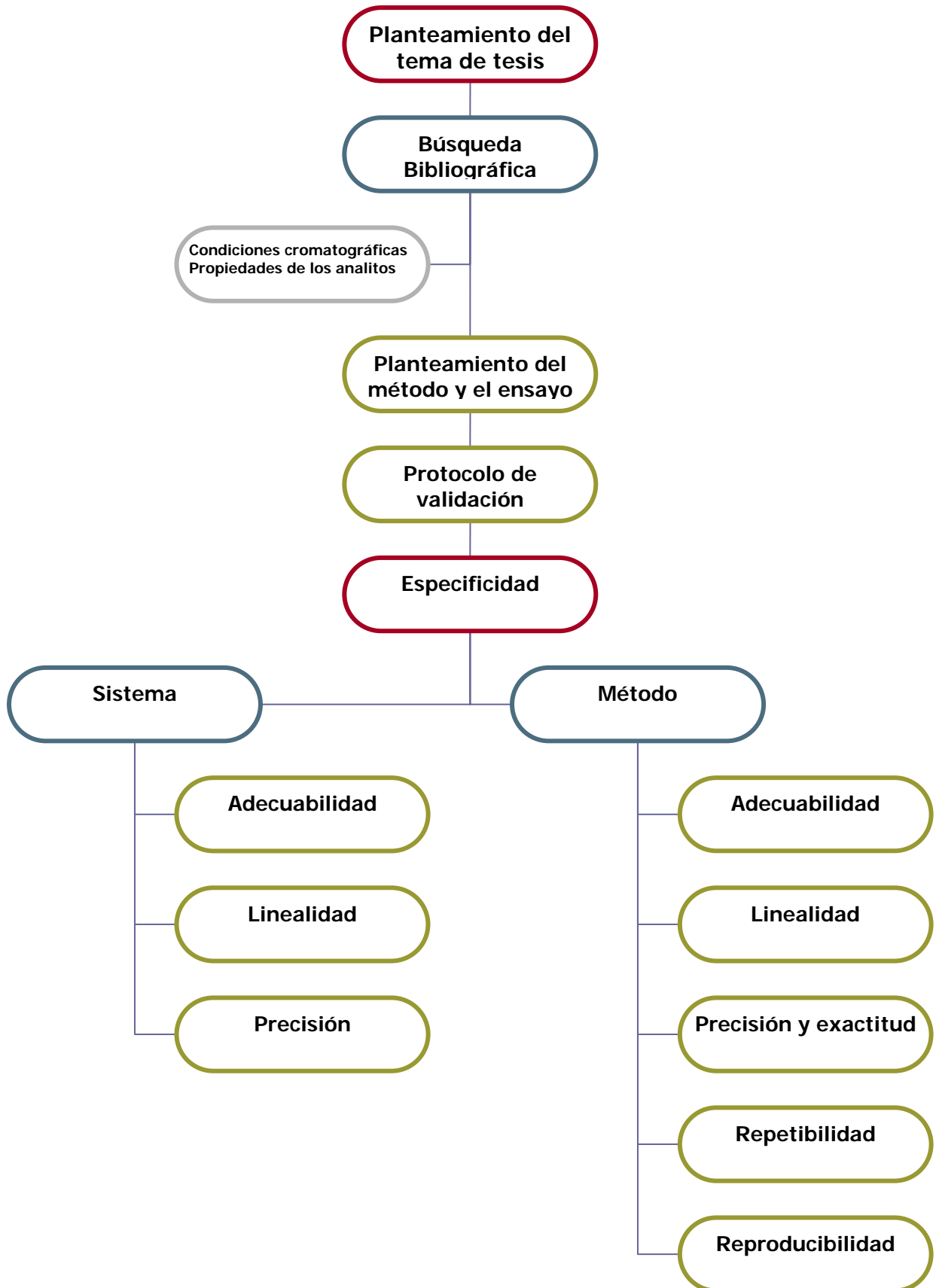
Condiciones para	Columna	Medidas de columna (mm)	Detección (nm)	Fase Móvil	Proporción (v/v)	Flujo (mL/min)	Volumen de inyección (μL)
CL ⁹	RPC-18, Spherisorb ODS	300 x 4.0, tamaño de part 5 μm	287	Metanol – búfer NaH_2PO_4 50 mM pH 4.48	55 : 45	0.8	ND
CL ²⁴	C18 ODS	250 x 4.0 , tamaño de part 5 μm	280	Metanol – Búfer de fosfatos 0.064 M pH 6.5	70 : 30	0.8	30
CL ¹⁴	RPC-18, Spherisorb ODS2	300 x 4.0 , tamaño de part 5 μm	287	Metanol – Búfer NaH_2PO_4 50 mM pH 4.48	55 : 45	0.8	ND
CL ²⁶	Spherisorb C18 RPC (Teknokroma)	200 x 4.6, tamaño de part 5 μm	252	Acetonitrilo – Búfer NaH_2PO_4 pH 3.3	70 : 30	ND	100
CL ¹³	Cartucho Radialpak μ -Bondapak C 18	100 x 8.0, tamaño de part 5 μm	254	Metanol – Solución 0.02 M de K_2HPO_4 pH 6.0	60 : 40	2	10

Tabla 1b: Condiciones cromatográficas experimentales encontradas en la revisión bibliográfica realizada.

Condiciones para	Columna	Medidas de columna (mm)	Detección (nm)	Fase Móvil	Proporción (v/v)	Flujo (mL/min)	Volumen de inyección (μL)
CL ³	Hypersil C18	250 x 4.6, tamaño de part 5 μm	280	Metanol – Búfer fosfatos 0.064 M pH 6.5	60 : 40	1.0	30
DS ²⁵	LiChrosorb RP18 – (Merck) Nova-Pak® C18 – (Waters).	50 x 3.9 150 x 3,9	280	Acetonitrilo – Agua	65 : 35	0.7	20
DS ¹⁵	Two Kromasil C8KR100	150 x 4.6, tamaño de part 5 μm	275 y 282	Metanol – Búfer NaH ₂ PO ₄ (1.4 g/L) y Acido Fosfórico (1.6 g/l) [50 : 50] pH = 2.50	58 : 42	1.0	ND
DS ¹⁶	Kromasil C18	250 x 4.6, tamaño de part 5 μm	282	Acetonitrilo – Trietanolamina al 0.02% en Búfer NaH ₂ PO ₄ 0.02M pH 7.0	75 : 25	1.0	100
DS ⁴	Hypersil BDS C18	250 x 4.6, tamaño de part 5 μm	230	Acetonitrilo – Búfer NaH ₂ PO ₄ pH 3.0 (6.81 g/l)	28 : 72	1.0	50
CL – DS ⁵	Nucleosil-100	250 x 4.0 tamaño de part 5 μm	290	Acetonitrilo – Metanol – Ácido acético al 0.3 %	28 : 36 : 36	1.0	20
CL – DS ⁶	Spherisorb S5 ODS1 (Waters) Precolumn (Supelco Inc.)	250 x 4.6, 20 μm	230	Acetonitrilo – Búfer NaH ₂ PO ₄ al 0.02 M	70 : 30	1.2	20

4. Desarrollo experimental

A) Cuadro metodológico



B) Materiales y métodos

REACTIVOS:

- ✓ Agua purificada Milli-Q Waters® Systems
- ✓ Metanol HPLC Marca Mallinckroft®
- ✓ Acetonitrilo HPLC Marca Mallinckroft®
- ✓ Búfer fosfatos 0.0064 M pH 7.0
 - Fosfato de sodio dibásico J.T. Baker
 - Fosfato de sodio monobásico J.T. Baker
- ✓ Clonixinato de Lisina (Farmacéuticos RAYERE)
- ✓ Diclofenaco Sódico (Farmacéuticos RAYERE)

EQUIPO UTILIZADO

- ✓ Balanza analítica Mettler Toledo modelo HR73
- ✓ pH-metro Mettler – Toledo Seven multi
- ✓ Purificador de agua Millipore (Milli Q)
- ✓ Cromatógrafo Waters:
 - Waters TM 600 Controller
 - Software Empower
 - Waters TM 996 Photodiode Array Detector
 - Waters TM 717plus Autosampler

C) Condiciones cromatográficas

Tabla 2: Condiciones experimentales de trabajo para la validación del método analítico.

Columna:	Symmetry C18, 3.5 μ m, 4.6 x 75 mm
Fase móvil:	Metanol : Búfer fosfatos 0.0064 M (60 : 40)
Flujo:	0.7 mL / min
Volumen de inyección:	30 μ L
Detección:	281.9 nm

Estas condiciones se seleccionaron por ser las más comunes en la revisión de los artículos, se modificó la cantidad de fosfatos porque esta generaba una saturación en el interior de la columna y por ende aumento en la presión del equipo cromatográfico, la concentración del búfer se disminuyó 10 veces, pero aun así mantuvo el pH y facilitó el proceso de inyecciones continuas en el equipo; así como su limpieza y mantenimiento para todas las pruebas necesarias de la validación.

D) Procedimientos

I) Preparación de Búfer de fosfatos 0.0064 M pH 7.00

1. Revisar que todo el material a utilizar este completamente limpio y seco.
2. Verificar que el almacén de reactivos cuente con las siguientes sales:
 - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$ (Fosfato dibásico de sodio) 883 mg
 - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 7 \text{H}_2\text{O}$ (Fosfato monobásico de sodio)..... 1714.0 mg
3. Pesar lo más exacto posible en la balanza analítica 883 mg fosfato dibásico de sodio.
4. Verter esta sal en un matraz aforado de 1000 mL.
5. Pesar lo más exacto posible en la balanza analítica 1714.0 mg fosfato monobásico de sodio
6. Verter en el mismo matraz aforado de 1000 mL que la sal anterior.
7. Adicionar agua purificada por las paredes hasta arrastrar todas las sales.
8. Agitar vigorosamente el matraz, hasta disolver totalmente las sales (si es necesario agregar más agua purificada aprox. hasta 900 mL).
9. Tomar una muestra y medir el pH para el registro. Ajustar el pH con Ac. Fósforico 0.1 N o Hidróxido de sodio 0.02 N (valor de pH aceptado 6.95 - 7.05).
10. Llevar a la marca de aforo con agua purificada.
11. Llevar a filtrar con el embudo para el HPLC, coleccionar en el matraz Kitasato.

12. Verter el contenido del matraz Kitasato en un reservorio para HPLC limpio y seco, previamente etiquetado.

II) Procedimiento para la preparación de STD de CL - DS

Relación de los activos 5 : 1; concentraciones propuestas 12.5 μg / mL de CL y 2.5 μg / mL de DS.

1. Pesar lo más exacto posible, 52.1 mg de CL en la balanza analítica.
2. Pesar lo más exacto posible, 10.4 mg de DS en la balanza analítica.
3. Verter los activos pesados en un matraz aforado de 250 mL.
4. Adicionar aprox. 100 mL de agua purificada por las paredes el matraz, agitar hasta disolver los activos.
5. Llevar a la marca de aforo con agua purificada (Milli Q plus).
6. Tomar de la solución anterior, 6 mL con una pipeta volumétrica y transferir a un matraz aforado de 100 mL.
7. Llevar a la marca de aforo con agua purificada.
8. Tomar de la solución anterior aproximadamente 5 mL con una jeringa (limpia y seca).
9. Colocar en el microfiltro una membrana para filtración de 0.45 μm , cerrarlo y colocarlo en la jeringa.
10. Desechar las primeras 10 gotas del filtrado.
11. Llenar el vial de HPLC previamente etiquetado con la solución filtrada.
12. Colocarlo en la charola el auto-muestreador del HPLC respetando el orden.

Para la realización de la prueba de especificidad

Para la determinación de la especificidad lo mas conveniente es preparar un blanco, un placebo, un estándar al 100% y una muestra con el equivalente al contenido químico que indica el marbete; la preparación del placebo, es realizada por el encargado en el desarrollo de la formulación nueva de CL – DS para los farmacéuticos RAYERE, y también nos da una muestra del producto terminado para correr el análisis de especificidad.

III) Procedimiento descriptivo del ensayo por HPLC de una solución inyectable de CL – DS.

1. Revisar que todo el material a utilizar este completamente limpio y seco.
2. Tomar una muestra representativa del lote de producción del inyectable.
3. Verificar que las ampollas a examinar contienen las siguientes cantidades:
 - Clonixinato de lisina.....125 mg
 - Diclofenaco sódico..... 25 mg
 - Excipientes c.b.p 3 mL
4. Romper 5 ampollas tomadas al azar y verter el contenido en un vaso de precipitados de 25 mL.
5. Agitar levemente el vaso para dar homogeneidad.
6. Tomar de esta solución, 3 mL con una pipeta volumétrica y transferir a un matraz aforado de 200 mL.
7. Llevar a la marca de aforo con agua purificada; (conc. aprox. 625 µg / mL de CL y 125 µg / mL de DS). **Solución A**
8. Tomar 2 mL de la sol. A con una pipeta volumétrica y transferir a un matraz aforado de 100 mL. Llevar a la marca de aforo con agua purificada; (conc. aprox. 12.50 µg / mL de CL y 2.50 µg / mL de DS). **Solución B**
9. Tomar de la sol. B aproximadamente 5 mL con una jeringa (limpia y seca).
10. Colocar en el microfiltro una membrana para filtración de 0.45 µm, cerrarlo y colocarlo en la jeringa.
11. Desechar las primeras 10 gotas del filtrado.
12. Llenar el vial de HPLC (aprox. 2 mL) previamente etiquetado con la solución filtrada.
13. Colocarlo en la charola el auto-muestreador del HPLC respetando el orden.

El tratamiento para la muestra placebo es igual al procedimiento anterior desde el paso 4, para esto la muestra se toma de los viales placebo que fueron proporcionados por el formulador encargado del inyectable.

IV) Respuesta

i) Fórmula para calcular el contenido químico de Clonixinato de Lisina:

$$0.9814 (X) - 0.1052 \times \frac{100 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \times \frac{200 \text{ mL}}{3 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ mg}}{1000 \mu \text{ g}} = [CL \text{ Iny}]$$

X es igual al área obtenida en la muestra de Clonixinato de Lisina

$[CL \text{ Iny}] = \text{mg} / \text{mL}$ de Clonixinato de Lisina por ampolleta.

ii) Fórmula para calcular el contenido químico de Diclofenaco Sódico:

$$0.9981 (X) - 0.0034 \times \frac{100 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \times \frac{200 \text{ mL}}{3 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ mg}}{1000 \mu \text{ g}} = [DS \text{ Iny}]$$

X es igual al área obtenida en la muestra de Diclofenaco Sódico

$[DS \text{ Iny}] = \text{mg} / \text{mL}$ de Diclofenaco Sódico por ampolleta.

5.- Resultados y discusión

A) Determinación de las condiciones de trabajo

En el presente trabajo se realizó una intensa búsqueda bibliográfica sobre las condiciones experimentales de muchos investigadores acerca de los dos analitos de interés en esta tesis, los cuales son el Clonixinato de Lisina y el Diclofenaco Sódico; y como se puede ver en la tabla no.1a y 1b los métodos que se han desarrollado en diversos laboratorios muestran que las condiciones pueden variar, pero existen algunas características que se pueden tomar como base, para aplicar el método analítico desarrollado por otros laboratorios, pero realizando modificaciones para mejorar y adaptar el método.

Como ya se menciona anteriormente para seleccionar las condiciones de trabajo se revisaron varios artículos y se tomo la decisión de trabajar con la fase móvil de Metanol - búfer de fosfatos 0.0064 M pH = 7 (60 : 40) con un flujo de 0.7 mL / min. basados en que no en todos los artículos se mostraban con claridad los cromatogramas y en los aquellos que si mostraban que bajo estas condiciones la respuesta del pico cromatográfico era buena y también en que el metanol es uno de los solventes más utilizados en la mayoría de los artículos revisados, mientras que el búfer de fosfatos se utilizo por su capacidad para mantener el pH durante el ensayo, y se cambio su concentración 0.0064 M para evitar problemas de aumento de presión por la acumulación de sales dentro de la columna y el sistema de tuberías, por otra parte la columna con la que se trabajó fue una Symmetry C18, 4.6 x 7.5 mm , y aunque los artículos trabajaban con columnas más largas, el tener una columna más pequeña nos permitía un análisis más rápido; mientras que para la elección de longitud de onda de trabajo lo que se hizo fue un barrido de los dos analitos de interés y se selecciono la longitud de 281.9 nm, que nos permitía analizar y cuantificar los picos cromatográficos que resultaban del ensayo; y para el volumen de inyección se inyectaron diferentes volúmenes para observar su absorbancia y elegir, en este caso fue de 30 µL. (Ver fig. 1).

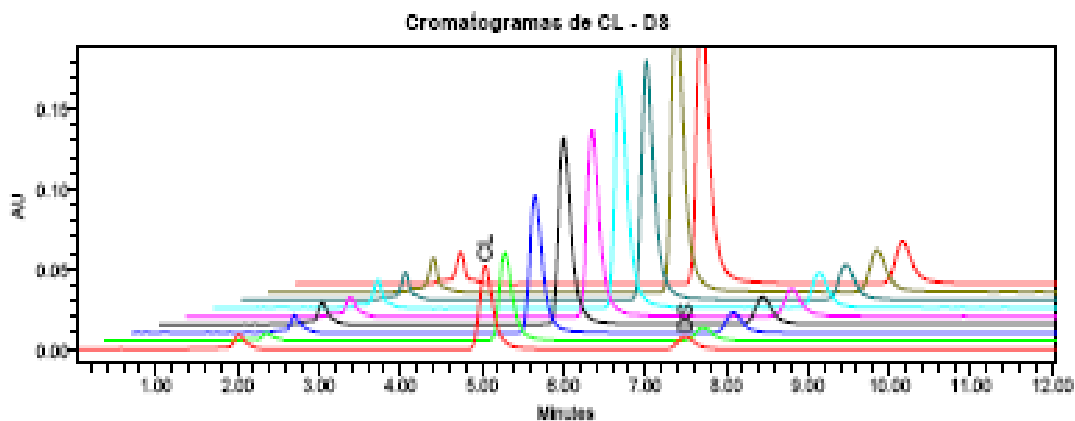


Figura 1: Evaluación de la respuesta obtenida en relación con el volumen de inyección de la muestra.

B) Especificidad

Para la especificidad del método (fig. 2) que debe ser la primera prueba a realizar la inyección de un blanco, un placebo con los excipientes que contiene la formulación (pat. Farmacéuticos RAYERE), un placebo adicionado al 100% de Clonixinato de Lisina y Diclofenaco Sódico, y una solución STD de Clonixinato de Lisina y Diclofenaco Sódico (12.5 – 2.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$).

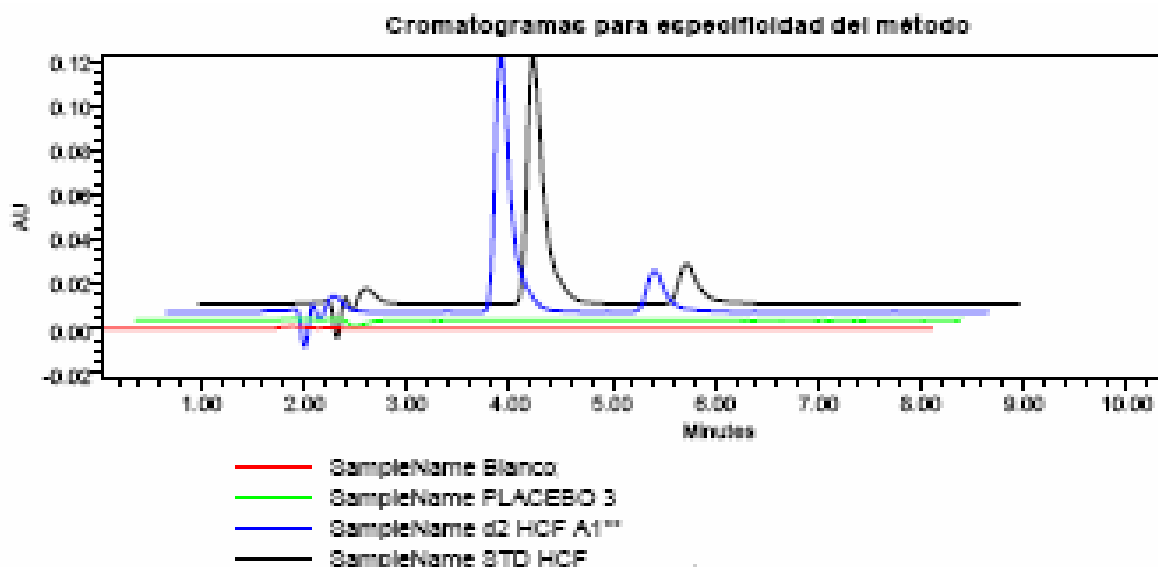


Figura 2: Cromatogramas que muestran la especificidad del método.

En el grupo de cromatogramas anterior se demuestra que no hay presencia de sustancias al mismo tiempo de retención que los analitos, y también que ni el blanco ni los excipientes muestran a la longitud de onda de 281.9 respuesta

alguna; lo que confirma que las condiciones elegidas funcionarían para la separación y la cuantificación de los analitos de interés. La información obtenida se encuentra en el anexo 1.^{8, 27}

C) Adecuabilidad del sistema

Esta prueba se realiza cada vez que se utiliza el equipo, para asegurar que el sistema cromatográfico se encuentra en condiciones adecuadas de trabajo y que no existen cambios significativos en los resultados que ocasionen un aumento en la desviación de los datos, y esta prueba se evalúa inyectando por sextuplicado una solución estándar al 100% de Clonixinato de Lisina y Diclofenaco Sódico.⁸

Tabla 3: Datos de la evaluación de la adecuabilidad del sistema.

Datos de la adecuabilidad del sistema para CL - DS

Name: CL

	Sample Name	Name	RT	Area	K Prime	Resolution	Symmetry Factor	USP Tailing	USP Plate Count
1	STD HCF	CL	3.411	1278501	1.707076e+000		1.479242e+000	1.479242e+000	3.728376e+003
2	STD HCF	CL	3.403	1281189	1.700633e+000		1.497526e+000	1.497526e+000	3.799166e+003
3	STD HCF	CL	3.406	1282631	1.703065e+000		1.481895e+000	1.481895e+000	3.659089e+003
4	STD HCF	CL	3.413	1284827	1.708500e+000		1.495483e+000	1.495483e+000	3.609368e+003
5	STD HCF	CL	3.424	1283509	1.717140e+000		1.492434e+000	1.492434e+000	3.554185e+003
6	STD HCF	CL	3.427	1274503	1.720021e+000		1.491526e+000	1.491526e+000	3.526969e+003

Datos de la adecuabilidad del sistema para CL - DS

Name: DS

	Sample Name	Name	RT	Area	K Prime	Resolution	Symmetry Factor	USP Tailing	USP Plate Count
1	STD HCF	DS	5.004	271666	2.971417e+000	6.588927e+000	1.277357e+000	1.277357e+000	5.437492e+003
2	STD HCF	DS	4.990	267916	2.960380e+000	6.726371e+000	1.288096e+000	1.288096e+000	5.780826e+003
3	STD HCF	DS	4.994	270881	2.963293e+000	6.596116e+000	1.273141e+000	1.273141e+000	5.493237e+003
4	STD HCF	DS	5.004	270628	2.971546e+000	6.544444e+000	1.273015e+000	1.273015e+000	5.481105e+003
5	STD HCF	DS	5.024	269881	2.987001e+000	6.475634e+000	1.274116e+000	1.274116e+000	5.290013e+003
6	STD HCF	DS	5.031	267383	2.993131e+000	6.474500e+000	1.271599e+000	1.271599e+000	5.329124e+003

D) Precisión del sistema

La precisión del sistema se realiza inyectando por sextuplicado diferentes concentraciones de los analitos, tratando de abarcar un rango amplio para evaluar la variación que pueden presentar estos porcentajes y determinar si cumplen con los límites de variación establecidos.

Tabla 4: Resultados obtenidos de la evaluación de la precisión del sistema cromatográfico.

Porcentaje (%)	Clonixinato de Lisina			Diclofenaco Sódico		
	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Área ($\text{mcV}\cdot\text{sec}$)	Área / []	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Área ($\text{mcV}\cdot\text{sec}$)	Área / []
66.66	8.3456	844820	101229	1.672	160098	95752
		848958	101725		160752	96144
		844826	101230		159987	95686
		847621	101565		161016	96301
		842386	100938		159805	95577
		850186	101872		162225	97025
100	12.5184	1272044	101614	2.508	241163	96157
		1282896	102481		241545	96310
		1271623	101580		240864	96038
		1275478	101888		241120	96140
		1275325	101876		240256	95796
		1274482	101809		240000	95694
133.33	16.6912	1710609	102486	3.344	321665	96192
		1687760	101117		321225	96060
		1701232	101924		323636	96781
		1699281	101807		321525	96150
		1695645	101589		323765	96820
		1714115	102696		323494	96739
Promedio			101746	Promedio		96187
Desvest			470.70	Desvest		422.86
CV (%)			0.463	CV (%)		0.440

Con base en los resultados anteriores se puede decir que el sistema presentó un desempeño aceptable ya que el CV de las Áreas vs. Concentración se encuentra dentro de los límites establecidos que para esta prueba son de 2%, y para los analitos de interés los coeficientes fueron menores.^{8,27, 29}

E) Linealidad del sistema

Esta prueba se realiza para ver el comportamiento que presentan los analitos a diversas concentraciones, y esto se prepara a partir de una solución Stock, a partir de la cuál se preparan los niveles de concentración a evaluar en este caso fueron 5, cada uno se realiza por triplicado y de forma independiente, para tener más datos y poder evaluar estadísticamente la información que se genera y determinar los parámetros que se evalúan de esta prueba. Los resultados se muestran a continuación:

Tabla 5: Resultados obtenidos en la linealidad del sistema y el área vs. Concentración del analito.

Nivel	Conc CL [µg/mL]	Area (mcV*sec)	Area / []	Conc DS [µg/mL]	Area (mcV*sec)	Area / []
1	4.1728	423940	101596	0.836	79043	94549
	4.1728	426997	102329	0.836	81906	97974
	4.1728	420482	100767	0.836	80193	95925
2	8.3456	848958	101725	1.672	160752	96144
	8.3456	847621	101565	1.672	161016	96301
	8.3456	850186	101872	1.672	162225	97025
3	12.5184	1277878	102080	2.508	241849	96431
	12.5184	1275478	101888	2.508	241120	96140
	12.5184	1275325	101876	2.508	240256	95796
4	16.6912	1704838	102140	3.344	322631	96481
	16.6912	1699281	101807	3.344	321525	96150
	16.6912	1714115	102696	3.344	323494	96739

5	20.864	2121552	101685	4.18	402777	96358
	20.864	2126393	101917	4.18	402992	96410
	20.864	2136342	102394	4.18	402746	96351
Promedio			101889	Promedio		96318
Desvest			441.07	Desvest		712.88
CV (%)			0.433	CV (%)		0.740

En las figuras 3 y 4 se muestran los datos de la regresión lineal, en los diversos niveles de concentración, y la ecuación que permite calcular la concentración de los analitos, dentro del rango de trabajó.

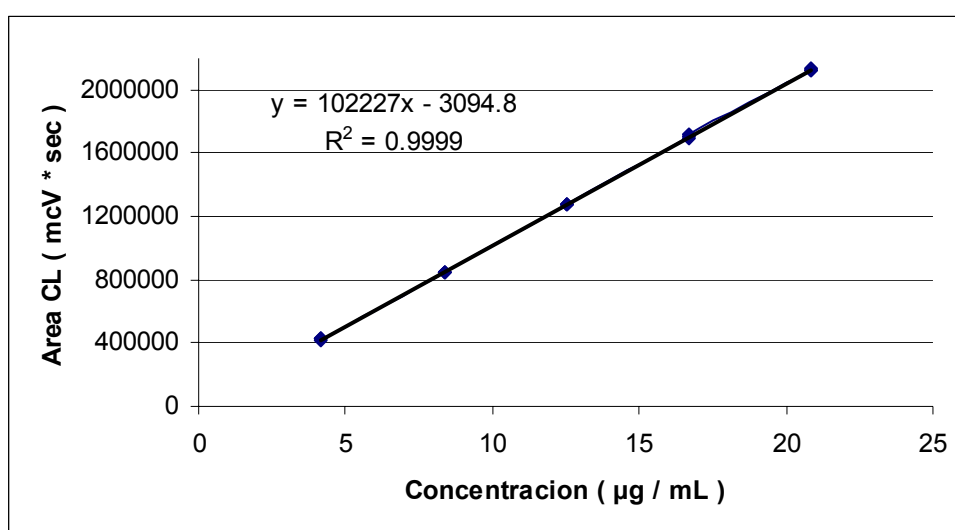


Figura 3: Gráfico de la linealidad del sistema para el Clonixinato de Lisina.

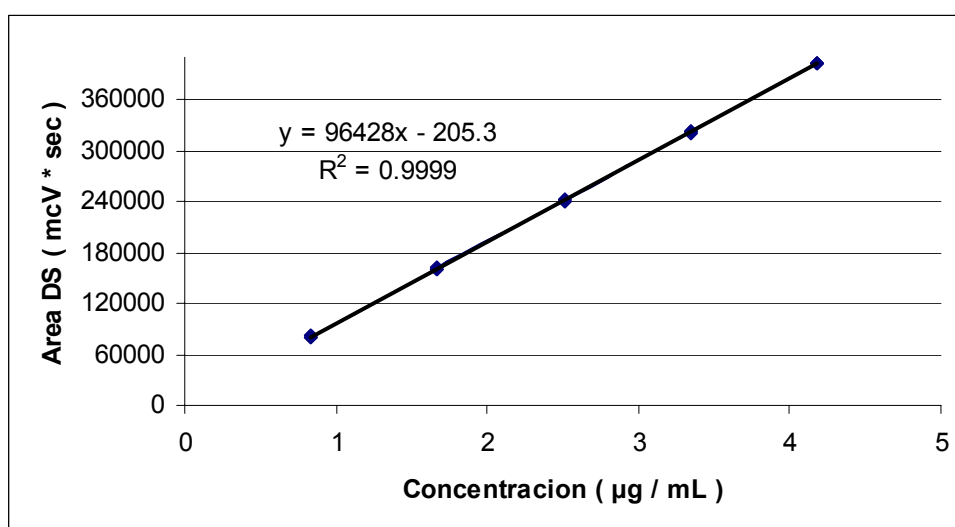


Figura 4: Gráfico de la linealidad del sistema para el Diclofenaco Sódico.

En las figuras 5 y 6 se muestra el error que presentaron los dos analitos, debido a la variación al momento de preparar las soluciones, y también demuestran que no existen tendencias, es decir, que existe aleatoriedad en los datos.

En el caso del Clonixinato de Lisina (figura 5) se observa que el nivel inferior es el que presenta mayor variabilidad, esto se puede deber a que el uso de pipetas de volumen pequeño generan mas variación, pero los resultados están dentro de los límites permitidos de 2%.^{8,27}

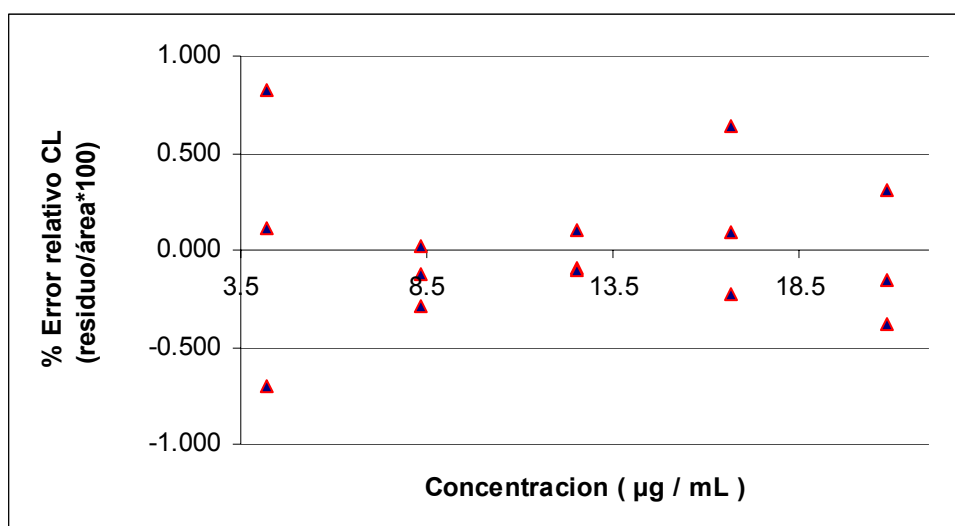


Figura 5: Gráfico del error relativo para el Clonixinato de Lisina vs. la concentración del analito.

El Diclofenaco Sódico (figura 6) se observa una mayor variación de los datos en el primer nivel, cercano a los límites permitidos, o sea 2%; debido a las proporciones que guardan los analitos en la formulación, ya que el CL y el DS, se encuentran en una proporción (5 :1) y en el primer nivel solo tenemos 0.836 µg / mL de DS y el uso de pipetas de volumen pequeño, genera una mayor variación y también podemos observar que el ultimo nivel no presenta casi variación.^{8,27}

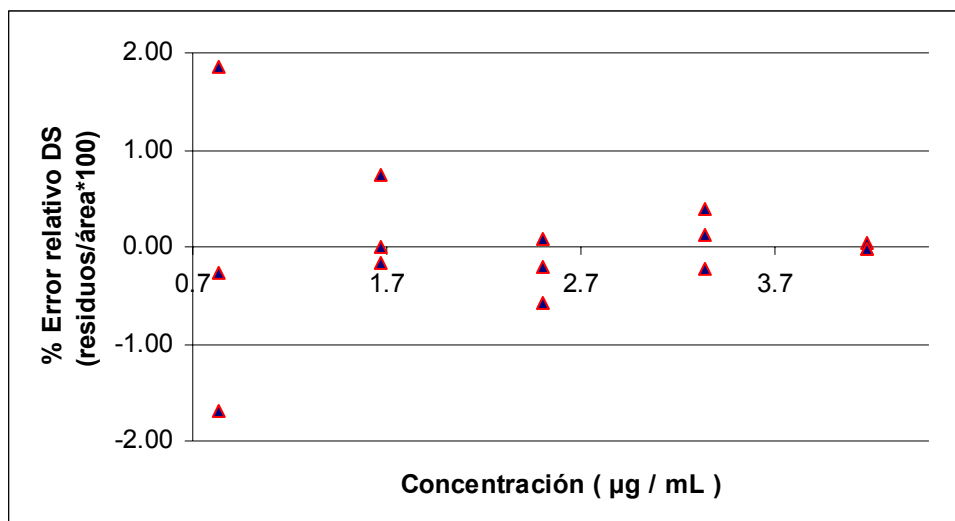


Figura 6: Grafico del error relativo para el Diclofenaco Sódico vs. la concentración del analito.

Al realizó el análisis de los datos, para obtener el valor de F_{cal} , el cual debe ser comparado contra un valor crítico de F , y se espera que el valor de F_{cal} se mayor para que se acepte la hipótesis alterna. Para esto se redactan dos hipótesis, una nula y la otra alterna, es decir:

H_0 : No existe una relación de linealidad entre la concentración y de área obtenida.

H_a : Existe una relación de linealidad entre la concentración y área obtenida.

Para elegir se realiza a los datos una ANOVA o análisis de varianza, y se establecen los criterios de aceptación para la prueba, los cuales son los siguientes:

Si F_{cal} es menor que F_{crit} no se rechaza H_0 , ó bien, si $F_{cal} < F_{crit}$ no se rechaza H_0

Si F_{cal} es mayor que $F_{critica}$ se rechaza H_0 , o bien, si $F_{cal} > F_{critica}$ se rechaza H_0

Tabla 6: Resultados del ANOVA realizado a la regresión de los dos analitos (CL y DS).

Datos	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Prom. de los cuadrados	F _{cal}	Valor crítico de F
Clonixinato de Lisina					
Regresión	1	5.45895E+12	5.45895E+12	242516.068	3.7697E-29
Residuos	13	292625273.4	22509636.42		
Total	14	5.45924E+12			
Diclofenaco Sódico					
Regresión	1	1.9496E+11	1.9496E+11	249800.45	3.11E-29
Residuos	13	10145798.4	780446.028		
Total	14	1.9497E+11			

De acuerdo a los valores mostrados en la tabla no. 6 se obtuvo que los valores de F_{cal} para los dos analitos son mayores que los valores de F_{crit} por lo tanto se rechaza la hipótesis H_0 , entonces tanto para el Clonixinato de Lisina como para el Diclofenaco Sódico; se puede decir, que existe una relación lineal entre la concentración del analito y área obtenida, con un nivel de significancia del 0.05.²⁹

Tabla 7: Resultados de la regresión para la determinación de la linealidad del sistema.

Datos	CL	DS	Criterio de aceptación
Coefficiente de correlación múltiple R	0.99997	0.99997	$R \geq 0.98$
Coefficiente de determinación R^2	0.99995	0.99995	$R^2 \geq 0.98$
Pendiente (m o b_0)	102227.16	96427.55	b_0 debe ser diferente de 0

Intercepto (b o b₁)	-3094.77	-205.3	b ₁ debe incluir el 0
IC de b₁	101778.7 - 102675.6	96010.7 - 96844.4	
No. observaciones	15	15	5 niveles por triplicado

En la tabla no. 7 se muestran los datos del Clonixinato de Lisina y el Diclofenaco Sódico que resultan de la regresión realizada, en la cual se observa que el coeficiente de correlación (R) y de determinación (R²) cumplen con el criterio de aceptación incluido en la misma tabla, y establecen los valores de la ecuación de la recta ($y = m x + b$), los cuales cumplen también con los criterios de aceptación.^{8, 27, 29}

F) Precisión del método (precisión intermedia).

Se prepararon los sistemas como se indica en la tabla no. 8, y solo se trabajó con los que involucraban condiciones contrarias, lo que nos permite demostrar que no existe colinealidad entre los analitos, es decir, que la presencia de un analito no modifica el área del otro.

Tabla 8: Datos de la precisión del método a la nivel de 100% de analito.

Sistema	Conc. CL (µg / mL)	Conc. DS (µg / mL)	% CL	% DS
A	12.512	2.491	100	100
B	11.260	2.491	90	100
C	15.014	2.490	120	100
D	12.512	1.993	100	80
E	12.511	2.241	100	90
F	12.512	2.989	100	120
G	12.511	2.739	100	110
H	13.761	2.491	110	100
I	10.009	2.490	80	100

Se trabajó para CL con los sistemas A, C e I y para DS con los sistemas A, D y F; se realizó el ensayo por sextuplicado a las muestras como se describe en el procedimiento experimental.

Se calculó la cantidad recuperada para todos los sistemas pero solo se reporta el que comprende el 100 %, para determinar la precisión intermedia, la cual se muestra en la tabla no. 9, en la cual se demuestra que el Clonixinato y el Diclofenaco cumplen con los criterios establecidos al presentar ambos un CV menor a 2 % en la cantidad recuperada.⁸

Tabla 9: Resultados de CV de 2 analistas, 2 días para determinar a cantidad real recuperada.

Día	Analista 1	Analista2	Analista 1	Analista 2	CV Cantidad Rec	
	Cantidad Rec (mg /mL)		Cantidad Rec (mg /mL)		CL	DS
	CL	CL	DS	DS		
1	12.356	12.458	2.492	2.473	0.356	0.479
	12.395	12.475	2.469	2.465		
	12.397	12.434	2.488	2.466		
CV	0.185	0.163	0.513	0.189		
2	12.470	12.729	2.477	2.489	0.842	1.138
	12.454	12.511	2.481	2.460		
	12.532	12.451	2.507	2.541		
CV	0.330	1.165	0.661	1.646		
CV (%) global					0.7586	0.9077

G) Exactitud del método

Se ocuparon las mismas soluciones utilizadas en la precisión del método, para el CL con los sistemas A, C e I y para DS con los sistemas A, D y F; y se realizó el ensayo por sextuplicado a las muestras como se describe en el procedimiento experimental, y se calculó el porcentaje de recobro como sigue:

$$\% \text{ Recobro} = \left(\frac{\text{Concentracion. adicionada}}{\text{Concentracion. recuperada}} \right) * 100$$

En la tabla no. 10 se muestran los resultados obtenidos para el Clonixinato de Lisina, reportando el CV del porcentaje recuperado, para los tres niveles que fueron evaluados, el CV aceptado para la exactitud de método es de 2 % tanto para las evaluaciones parciales como para el CV global, este ultimo es el que tiene mayor importancia porque demuestra que el método es exacto a las concentraciones experimentales, siempre y cuando se encuentre dentro del rango examinado; para este analito la variación fue de 0.605.^{8, 27}

Tabla 10: Resultados de los CV para Clonixinato de Lisina a los tres niveles de trabajo.

Clonixinato de Lisina				
Nombre	Porcentaje de CL	Área (mcV* sec)	Concentración adicionada	% de Clonixinato
HCF B2	80 %	1142032	11.26	99
HCF B3		1142216	11.26	99
HCF B4		1136574	11.26	99
HCF B5		1138533	11.26	99
HCF B6		1145181	11.26	99
HCF B7		1144538	11.26	99
			Promedio parcial	99.10
			Desvest parcial	0.292
			CV parcial	0.295
HCF A1	100 %	1274606	12.51	100
HCF A2		1255279	12.51	98
HCF A3		1256878	12.51	98
HCF A4		1266895	12.51	99
HCF A5		1254193	12.51	98
HCF A8		1273222	12.51	99
			Promedio parcial	98.71
			Desvest parcial	0.723
			CV parcial	0.732

HCF H2	120 %	1381900	13.76	98
HCF H3		1380513	13.76	98
HCF H4		1395738	13.76	99
HCF H5		1384810	13.76	98
HCF H6		1378947	13.76	98
HCF H8		1379377	13.76	98
Promedio parcial				98.27
Desvest parcial				0.450
CV parcial				0.458
Promedio global				98.7
Desvest global				0.598
CV global				0.605

En la tabla no. 11 se muestran los resultados obtenidos para el Diclofenaco Sódico, reportando el CV del porcentaje recuperado, para los tres niveles que fueron evaluados; en las evaluaciones parciales del DS muestran un CV para 80% y 100% elevado, pero no superior al 2%, mientras que en el CV global reporta un CV de 1.464 que cumple con el limite.⁸

Tabla 11: Resultados de los CV para Diclofenaco Sódico a los tres niveles de trabajó.

Diclofenaco Sódico				
Nombre	Porcentaje de DS	Área (mcV* sec)	Concentración adicionada	% de Diclofenaco
HCF E1	80 %	216430	2.2413	99
HCF E2		215817	2.2413	99
HCF E3		220437	2.2413	101
HCF E4		221077	2.2413	101
HCF E5		213499	2.2413	98
HCF E6		219367	2.2413	100
Promedio parcial				100
Desvest parcial				1.364
CV parcial				1.369

HCF A1	100 %	237015	2.49054	98
HCF A2		239903	2.49054	99
HCF A3		248450	2.49054	102
HCF A5		236939	2.49054	98
HCF A6		241748	2.49054	100
HCF A7		238885	2.49054	98
			Promedio parcial	99
			Desvest parcial	1.771
			CV parcial	1.789
HCF G1	120%	270571	2.7345	101
HCF G2		271009	2.7345	102
HCF G4		265979	2.7345	100
HCF G5		265284	2.7345	99
HCF G6		269110	2.7345	101
HCF G7		266702	2.7345	100
			Promedio parcial	101
			Desvest parcial	0.918
			CV parcial	0.913
			Promedio global	99.7
			Desvest global	1.460
			CV global	1.464

Posteriormente se procedió a calcular los intervalos de confianza (IC) que se encuentran relacionados de manera directa con la desviación estándar de los datos, estos IC toman la media de los datos como base para calcular los sesgos que podrían presentar los datos y determinar si son confiables, y se obtienen mediante la siguiente fórmula:

$$IC = t_{\alpha 0.05, n-1} \cdot \frac{S}{\sqrt{n}}$$

El IC se calcula obteniendo un valor de t, en base a tablas considerando un $\alpha = 0.05$ y el numero de observaciones (n) que es multiplicado por la desviación estándar dividida por la raíz del número de observaciones (n), y este intervalo

considera que la muestra tiene una distribución t y por tanto considera las dos colas de la distribución como zonas de rechazo.^{8, 27,}

En la tabla no. 12 se pueden observar los datos del CL y DS, a los cuales se les calculó la media, se les sumó y restó el intervalo de confianza calculado, para determinar el valor que presentan de t_{calc} y compararla con la t_{crit} , se calcula como sigue:

$$t_{\text{calc}} = \frac{(\% \text{ Recuperado} - 100\%)}{S / \sqrt{n}}$$

Tabla 12: Prueba de t para los dos analitos (CL y DS) e IC calculados.

Fármaco	Nivel	LIC	LSC	Promedio	IC	t calc	t crit
CL	80	98.7845	99.3978	99.0911	0.3066	-7.6194	2.57
	100	97.9479	99.4639	98.7059	0.7580	-4.3885	
	120	97.7991	98.7436	98.2714	0.4722	-9.4096	
	Global	98.1750	99.2040	98.6895	0.5145	-9.3075	2.109
DS	80	98.1826	101.0452	98.9972	1.4312	-0.6934	2.57
	100	97.1386	100.8558	99.6139	1.8585	-1.3869	
	120	99.5569	101.4835	100.5202	0.9632	1.3831	
	Global	98.9844	100.4365	99.7104	0.7260	-0.8414	2.109

Por medio de la prueba de t, se determinó la exactitud del método para el caso de Clonixinato de Lisina, cumple con lo que se encuentra reportado como aceptable, ya que para un método cromatográfico existen dos opciones para el porcentaje de recobro; la primera que el IC debe incluir el 100% o que el promedio aritmético se incluya en el intervalo entre 98 – 102 %, y debido que los porcentajes de recobro no fueron superiores al 100, el IC no incluye el 100%, pero la media es de 98.69, lo que cumple con el segundo criterio de aceptación.⁸

Para el caso del Diclofenaco este no presenta problemas para demostrar la exactitud del método ya que cumple con los dos requisitos mencionados en el párrafo anterior, es decir, el IC incluye el 100% y el promedio aritmético se encuentra entre el 98 – 102%.

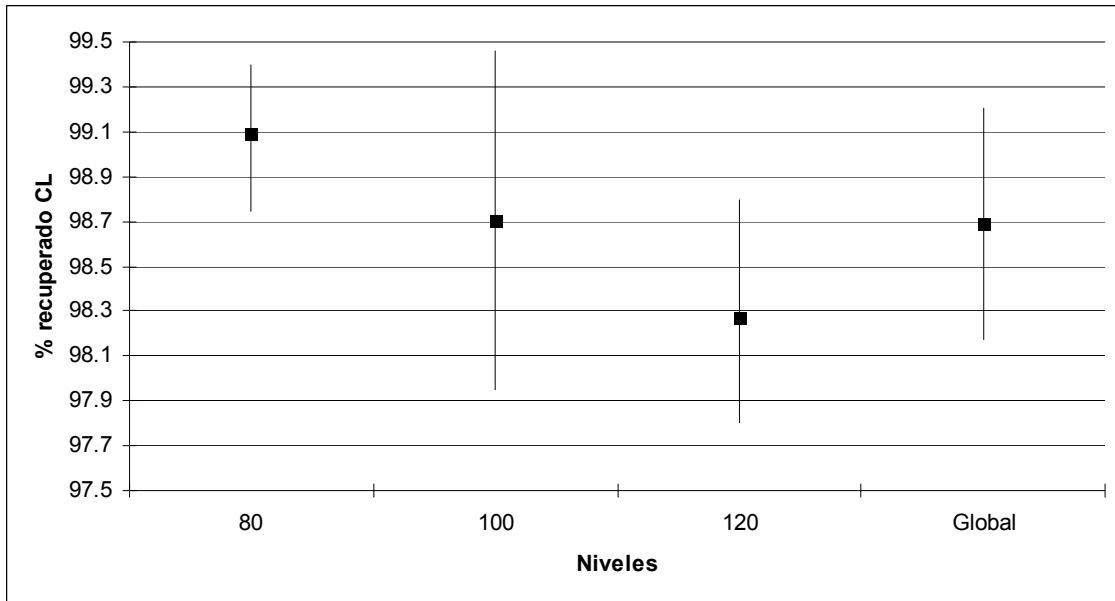


Figura 7: Gráfico del porcentaje recuperado y los intervalos de confianza obtenidos para Clonixinato de Lisina.

El la figura no. 7 se observa el % recuperado de Clonixinato de Lisina, y se muestra en evidencia porque este criterio no cumple con la prueba de t, debido a que los intervalos de confianza no incluyen el 100%, aunque los datos presentan varianzas iguales.

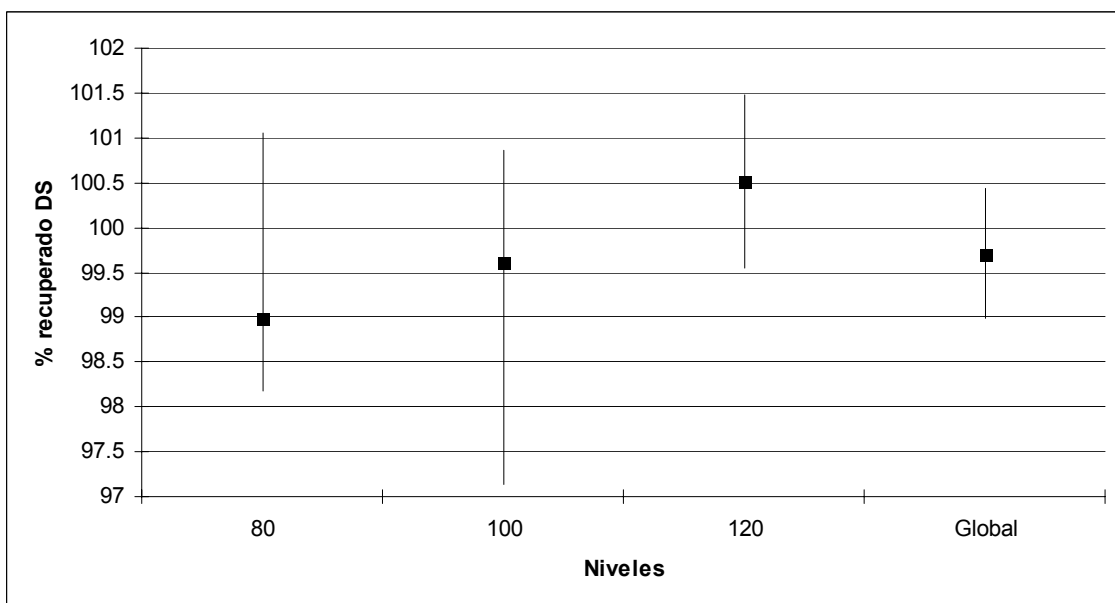


Figura 8: Gráfico del porcentaje recuperado y los intervalos de confianza obtenidos para Diclofenaco Sódico.

Por otra parte en la figura no. 8 se observa el % recuperado de Diclofenaco Sódico, y a diferencia del anterior aquí se muestra cual debería ser el comportamiento optimo que se esperaría de los datos.

H) Linealidad del método

La linealidad del método se evalúa preparando 5 placebos cargados, en el que se considera un rango de concentraciones o de porcentajes en este caso se trabajó con 80, 90, 100, 110 y 120 % para el Clonixinato de Lisina y el Diclofenaco Sódico, la preparación de muestras se realizó por triplicado para cada uno de los niveles.⁸

En las tablas no. 13 y 14 se muestran los datos obtenidos del Clonixinato de Lisina y el Diclofenaco Sódico, así como la cantidad adicionada y el área resultante, los resultados se muestran a continuación:

Tabla 13: Resultados de la evaluación de la linealidad del método por triplicado para CL

Clonixinato de Lisina			
Nombre	Nivel	Concentración adicionada (µg / mL)	Área (mcV * sec)
d2 HCF A1**	80	9.93	993273
d2 HCF A2**		9.93	989746
d2 HCF A4**		9.93	1003507
d2 HCF B1**	90	11.16	1135923
d2 HCF B3**		11.16	1142229
d2 HCF B5**		11.16	1133673
d2 HCF C1**	100	12.39	1252488
d2 HCF C2**		12.39	1246285
d2 HCF C4**		12.39	1249916
d2 HCF H1**	110	13.61	1385801
d2 HCF H3**		13.61	1376932
d2 HCF H6**		13.61	1411724

d2 HCF I1**	120	14.84	1496698
d2 HCF I2**		14.84	1483090
d2 HCF I4**		14.84	1488454

Tabla 14: Resultados de la evaluación de la linealidad del método por triplicado para DS

Diclofenaco Sódico			
Nombre	Nivel	Concentración adicionada ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	Área ($\text{mcV} * \text{sec}$)
HCF A2	80	1.99	196625
HCF A6		1.99	191226
HCF A7		1.99	197938
HCF D1	90	2.24	216430
HCF D2		2.24	220437
HCF D3		2.24	219367
HCF E1	100	2.49	239903
HCF E3		2.49	241748
HCF E6		2.49	238885
HCF F1	110	2.73	265979
HCF F2		2.73	269110
HCF F4		2.73	266702
HCF G4	120	2.99	291831
HCF G6		2.99	290433
HCF G7		2.99	293796

Tabla 15: Resultados de la regresión para la determinación de la linealidad del método.

Parámetros estadísticos para evaluar la regresión		
Datos	CL	DS
Pendiente (m o b₀)	99270.2487	97353.0503
Intercepto (b o b₁)	10660.214	530.57424
No. De observaciones	15	15

A partir de estos datos se calculó la ecuación de la recta ($y = mx + b$), con la ecuación generada se determinó la cantidad recuperada de cada analito, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración recuperada} = \frac{(\text{Área obtenida} - \text{Ordenada al origen})}{\text{Pendiente}}$$

En las tablas no. 16 y 17 se muestran los resultados de la concentración recuperada y el % recuperado de Clonixinato de Lisina y el Diclofenaco Sódico, demostrando que el CV global de todos los datos de la regresión es menor al 2%, es decir, cumple con el límite establecido.

Tabla 16: Resultados de la concentración recuperada y % de CL a los 5 niveles de trabajó.

Clonixinato de Lisina				
Nombre	Nivel	Concentración adicionada (µg / mL)	Concentración recuperada (µg / mL)	% Recuperado
d2 HCF A1**	80	10.009	9.8201	98.1
d2 HCF A2**		10.009	9.7852	98.0
d2 HCF A4**		10.009	9.9213	99.1

d2 HCF B1**	90	11.260	11.2304	99.7
d2 HCF B3**		11.260	11.2928	100.3
d2 HCF B5**		11.260	11.2082	99.5
d2 HCF C1**	100	12.512	12.3829	99.0
d2 HCF C2**		12.512	12.3215	98.5
d2 HCF C4**		12.512	12.3574	98.8
d2 HCF H1**	110	13.761	13.7009	99.6
d2 HCF H3**		13.761	13.6132	98.9
d2 HCF H6**		13.761	13.9572	101.4
d2 HCF I1**	120	15.014	14.7973	98.6
d2 HCF I2**		15.014	14.6627	98.0
d2 HCF I4**		15.014	14.7158	98.0
Promedio				99.0
Desvest				0.970
CV				0.980

Tabla 17: Resultados de la concentración recuperada y % de DS a los 5 niveles de trabajo.

Diclofenaco Sódico				
Nombre	Nivel	Concentración adicionada (µg / mL)	Concentración recuperada (µg / mL)	% Recuperado
HCF A2	80	1.9926	2.0159	101.17
HCF A6		1.9926	1.9605	98.39
HCF A7		1.9926	2.0293	101.84
HCF D1	90	2.2413	2.2189	99.00
HCF D2		2.2413	2.2600	100.83
HCF D3		2.2413	2.2490	100.34
HCF E1	100	2.4905	2.4595	98.76
HCF E3		2.4905	2.4785	99.52
HCF E6		2.4905	2.4491	98.34
HCF F1	110	2.7345	2.7269	99.72
HCF F2		2.7345	2.7590	100.90
HCF F4		2.7345	2.7343	99.99

HCF G4	120	2.9890	2.9919	100.10
HCF G6		2.9890	2.9776	99.62
HCF G7		2.9890	3.0121	100.77
Promedio				100.0
Desvest				1.045
CV				1.046

En las figuras 9 y 10 se muestran los datos de la regresión lineal, en los diversos niveles de concentración que se manejaron, y se muestra además la ecuación que permite determinar la concentración recuperada.

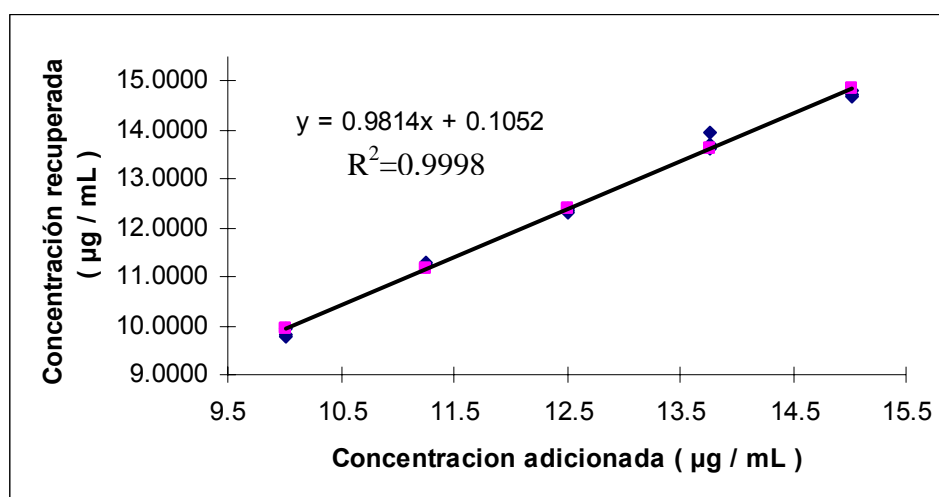


Figura 9: Gráfico de la linealidad normal del método para el Clonixinato de Lisina

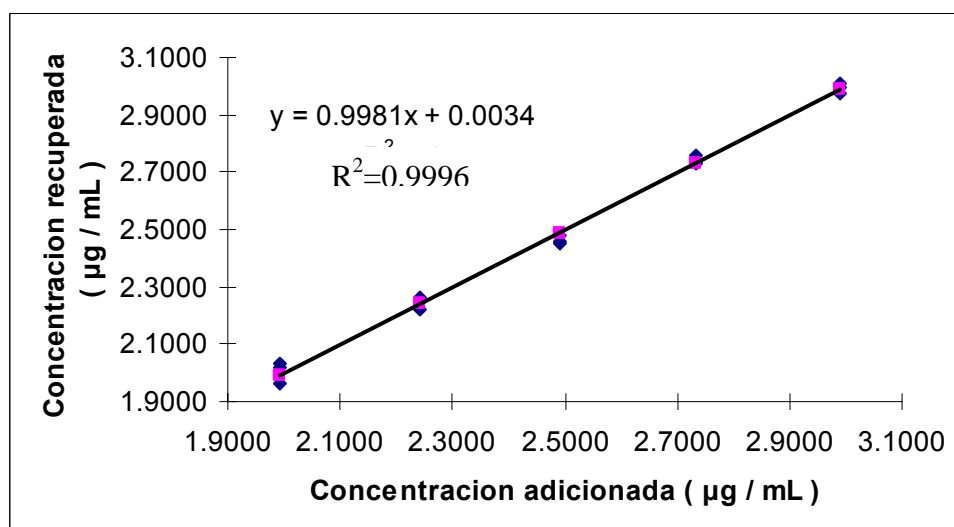


Figura 10: Gráfico de la linealidad normal del método para el Diclofenaco Sódico.

En las figuras 11 y 12 se muestra el error que presentaron los dos analitos, el cual es despreciable para la cuantificación de los analitos, y también demuestran que no existen tendencias en los resultados debida acumulación de error al analizar.

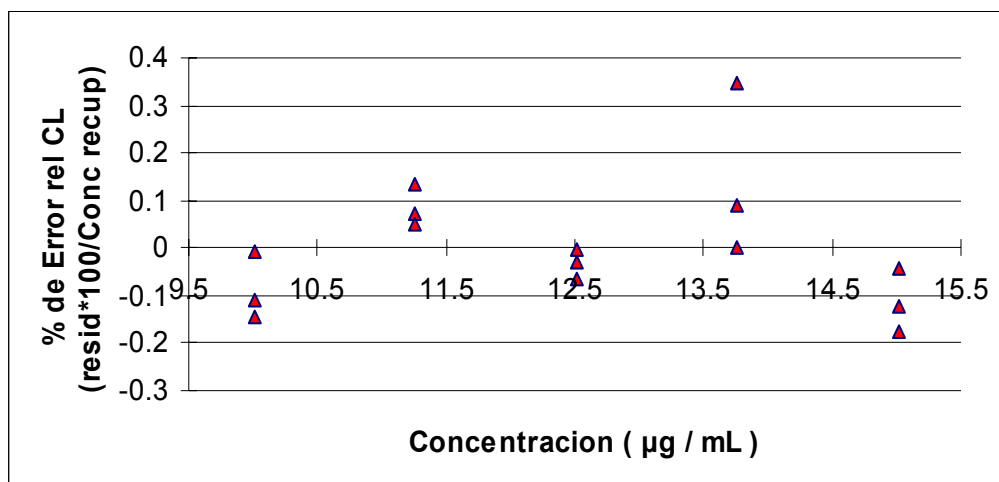


Figura 11: Grafico del error relativo para el Clonixinato de Lisina vs. la concentración del analito.

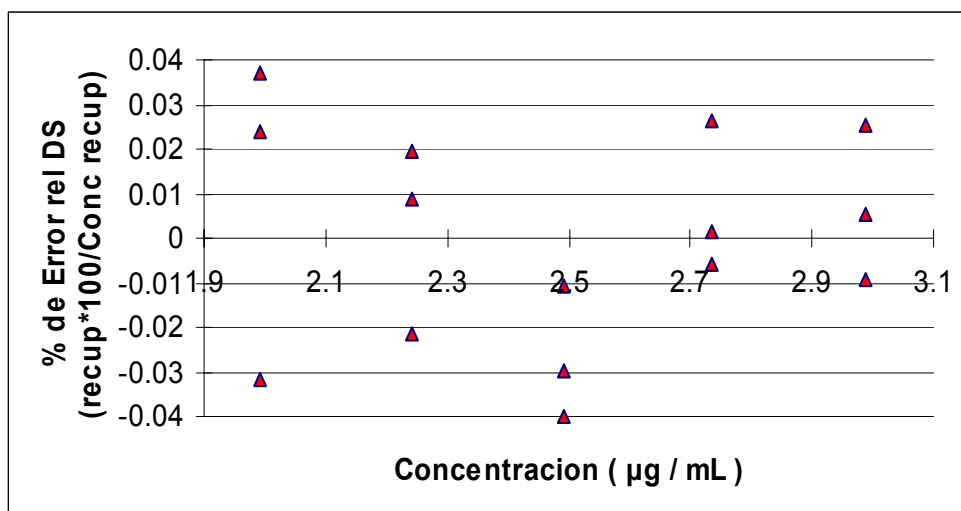


Figura 12: Grafico del error relativo para el Diclofenaco Sódico vs. la concentración del analito.

En el caso del Clonixinato de Lisina (figura No.11) solo el cuarto nivel presenta una ligera variación de los datos, pero los resultados están dentro de los límites permitidos que son de $\pm 2\%$. Mientras que el Diclofenaco Sódico (figura

No. 12) presenta una mayor variación en todos sus datos, pero los datos están dentro de los límites establecidos.⁸

Se realizó el cálculo, para obtener un valor de F_{cal} , el cual debe ser comparado contra un Valor crítico de F , y se espera que el valor de F_{cal} sea mayor para que se acepte la hipótesis alterna. Para esto se redactan dos hipótesis, una nula y la otra alterna, es decir:

H_0 : No existe una relación lineal entre la cantidad adicionada y cantidad recuperada.

H_a : Existe una relación de lineal entre la cantidad adicionada y cantidad recuperada.

Para elegir se realiza a los datos una ANOVA o análisis de varianza, y se establecen los criterios de aceptación para la prueba, los cuales son los siguientes:

Si F_{cal} es menor que F_{crit} no se rechaza H_0 , ó bien, si $F_{cal} < F_{crit}$ no se rechaza H_0

Si F_{cal} es mayor que $F_{critica}$ se rechaza H_0 , o bien, si $F_{cal} > F_{critica}$ se rechaza H_0

Tabla 18: Resultados del ANOVA realizado a la regresión de los dos analitos (CL y DS) para la determinación de linealidad.

Datos	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Prom. de los cuadrados	F_{cal}	Valor crítico de F
Clonixinato de lisina					
Regresión	1	45.23	45.233	2443.63	3.4757E-16
Residuos	13	0.2406	0.0185		
Total	14	45.47			
Diclofenaco Sódico					
Regresión	1	1.847	1.847	3023.29	8.7665E-17
Residuos	13	0.007	0.001		
Total	14	1.854			

De acuerdo a los valores mostrados en la tabla no. 18 se obtuvo que los valores de F_{cal} para los dos analitos son mayores que los valores de F_{crit} por lo tanto se rechaza la hipótesis H_0 , entonces se puede decir que tanto para el Clonixinato de Lisina como para el Diclofenaco Sódico, existe una relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración recuperada, con un nivel de significancia del 0.05.²⁹

Tabla 19: Resultados de la regresión ajustada para la determinación de los coeficientes y la realización de las hipótesis.

Parámetros estadísticos para evaluar la regresión			
Datos	CL	DS	Criterio de aceptación
Coefficiente de correlación múltiple	0.9973	0.9978	$R \geq 0.98$
Coefficiente de determinación R^2	0.9947	0.9957	$R \geq 0.98$
Pendiente (m o b_0)	0.9814	0.9981	
IC b_0	0.938 - 1.024	0.959 - 1.037	b_1 debe incluir el 1
Probabilidad	b_0 (3.4757E-16)	b_1 (0.68175923)	
Intercepto (b o b_1)	0.1052	0.0034	
IC	-0.437 - 0.6472	-0.095 - 0.102	b_0 debe incluir el 0
Probabilidad	b_0 (8.7665E-17)	b_1 (0.94228821)	
No. De observaciones	15	15	5 niveles por triplicado

En la tabla no. 19 se muestran los datos del Clonixinato de Lisina y el Diclofenaco Sódico que resultan de la regresión realizada por el programa Excel 2003, en la cual se observa que el coeficiente de correlación (R) y de determinación (R^2) cumplen con el criterio de aceptación incluido en la misma tabla, y establecen los valores de la ecuación de la recta ($y = m x + b$), en el caso de la pendiente (m o b_1) debe incluir el uno en su intervalo, mientras que la ordenada al origen (b o b_0) tiene que pasar por el cero en su intervalo para que sean parámetros aceptables.^{8, 29}

Para evaluar los datos de la regresión es necesario realizar una prueba de t, para determinar si la pendiente (m o b_1) y el intercepto (b o b_0) cumplen con los criterios de aceptación, antes mencionados, los datos obtenidos se muestran a continuación en la tabla no. 20.

Tabla 20: Prueba de t para los dos analitos (CL y DS) y la probabilidad para la comprobación de las hipótesis

Fármaco	Parámetro	LIC	LSC	Probabilidad	t calc	t crit
CL	Pendiente	0.938	1.024	$b_0 (3.47E-16)$	49.43	2.145
	Intercepto	-0.437	0.6472	$b_1 (0.681)$	0.419	2.145
DS	Pendiente	0.959	1.037	$b_0 (8.76E-17)$	54.98	2.145
	Intercepto	-0.095	0.102	$b_1 (0.942)$	0.074	2.145

Para la pendiente que tiene que incluir al 1 en su intervalo, se observa que cumple con este parámetro, y se demuestra con las siguientes hipótesis:

H_0 : La pendiente o b_1 es igual a cero

H_a : La pendiente al origen o b_1 es diferente de cero

Si t_{cal} es menor que t_{crit} no se rechaza H_0 , ó bien, si $t_{cal} < t_{crit}$ no se rechaza H_0

Si t_{cal} es mayor que $t_{crítica}$ se rechaza H_0 , o bien, si $t_{cal} > t_{crítica}$ se rechaza H_0

Como se observa en la **tabla no. 20**, el valor de t_{cal} para la pendiente de Clonixinato de Lisina es de 49.43, por lo que se rechaza H_0 , lo que indica que la pendiente es diferente de 0, y al observar la misma tabla se observa que el intervalo es de 0.938 a 1.024, por lo cual el parámetro es aceptable, y para el caso del Diclofenaco Sódico el valor de t_{cal} es de 54.98, por lo que se rechaza H_0 , lo que indica que la pendiente es diferente de 0, y al observar la misma tabla se observa que el intervalo es de 0.959 – 1.037, es decir los dos analitos cumplen con la prueba.^{8, 29}

Para el intercepto u ordenada al origen este debe incluir al 0 en su intervalo, se observa que cumple con este parámetro, y se demuestra con las siguientes hipótesis:

H_0 : La ordenada al origen o b_0 es igual a cero

H_a : La ordenada al origen o b_0 es diferente de cero

Si t_{cal} es menor que t_{crit} no se rechaza H_0 , ó bien, si $t_{cal} < t_{crit}$ no se rechaza H_0

Si t_{cal} es mayor que $t_{crítica}$ se rechaza H_0 , o bien, si $t_{cal} > t_{crítica}$ se rechaza H_0

Como se observa en la tabla no. 20, el valor de t_{cal} para la ordenada al origen de Clonixinato de Lisina es de 0.419, por lo que no se rechaza H_0 , lo que indica que la ordenada al origen es igual a 0, y al observar la misma tabla se observa que el intervalo es de - 0.437 a 0.6472, por lo cual el parámetro es aceptable, y para el caso del Diclofenaco Sódico el valor de t_{cal} es de 0.074, por lo que no se rechaza H_0 , lo que indica que la ordenada al origen es igual a 0, y al observar la misma tabla se observa que el intervalo es de - 0.095 a 0.102, es decir los dos analitos cumplen con la prueba.^{8, 29}

I) Reproducibilidad y repetibilidad del método

La repetibilidad del método, se evalúa la variación que presenta el analista y que este determine cuales son los puntos clave para reducir el error al momento de realizar el ensayo, para esto se necesitan tres niveles de concentración y se trabaja dos días diferentes para demostrar que el método puede realizarse en cualquier momento.

Para la reproducibilidad se necesitan dos analistas, los cuales deben de conocer exactamente como se realiza el ensayo a las muestras, para que exista independencia en las determinaciones que va a realizar, y solo presentar el error asociado al analista y no existan tendencias; para esto se realizó la preparación de tres placebos cargados con tres niveles de concentración, y también se trabaja dos días diferentes.

Tabla 21: Resultados de la evaluación de la repetibilidad (1 analista, 2 días) y la reproducibilidad (2 analistas, 2 días).

Día	Analista 1	Analista2	Analista 1	Analista 2	CV % Recobro	
	% Recobro		% Recobro		CL	DS
	CL	CL	DS	DS		
1	98	100	100	100	0.9798	0.8706
	98	101	100	100		
	99	101	99	101		
	99	100	100	99		
	99	100	99	99		
	99	99	100	99		
	98	101	101	98		
	98	101	101	99		
CV (%)	0.4274	0.7416	0.5997	1.0602		
	99	97	100	98		
	98	100	100	100		
	99	99	100	99		
	100	102	99	100		

2	100	100	100	99	1.080	1.3632
	100	100	101	102		
	100	100	99	98		
	99	100	96	101		
	101	102	99	101		
CV (%)	0.8964	1.2620	1.3345	1.4383		
CV (%) día 1 y 2	0.8155	1.0430	1.0850	1.2265		
CV % GLOBAL (Anal 1 – 2 y Día 1 – 2)					1.076	1.141

Como se observa en la tabla no. 21, el Clonixinato de Lisina cumple con el criterio establecido, para la repetibilidad del método, en cual el CV parcial y el global no debe ser superior de 2 %, para el día 1 el CV fue de 0.427, mientras que para el segundo día el CV fue 0.896, y el global el mas importante para demostrar que no hay diferencia entre los días fue de 0.8155; y para el Diclofenaco Sódico el CV para el día 1 fue de 0.599, mientras que para el segundo día el CV fue 1.438 y el global fue 1.2265, el cual esta dentro del límite de 2 % establecido.⁸

La reproducibilidad es el ultimo parámetro que se evaluó en esta validación, y los resultados mostrados en la tabla no. 21, demuestran que tanto para el CL como el DS, los CV indican la diferencia que se puede presentar entre los analistas y los días, no es superior al 2 % que es el criterio establecido, ya que el CL presenta un CV global de 1.076 y el DS el CV es de 1.141, por lo tanto se dice que el método es reproducible.⁸

En las figura No. 13 y 14 se muestran los gráficos del porcentaje de recobro obtenido al evaluar la reproducibilidad, en donde se observa el traslape para el Clonixinato de Lisina, donde se observa que los datos del día 1 – analista 1 no presentan un traslape con el resto de los datos, pero aun así estadísticamente se encuentran dentro de los límites establecidos, pero justifica el aumento en el CV y para el DS todos los datos presentan una región de traslape lo que redujo el CV.

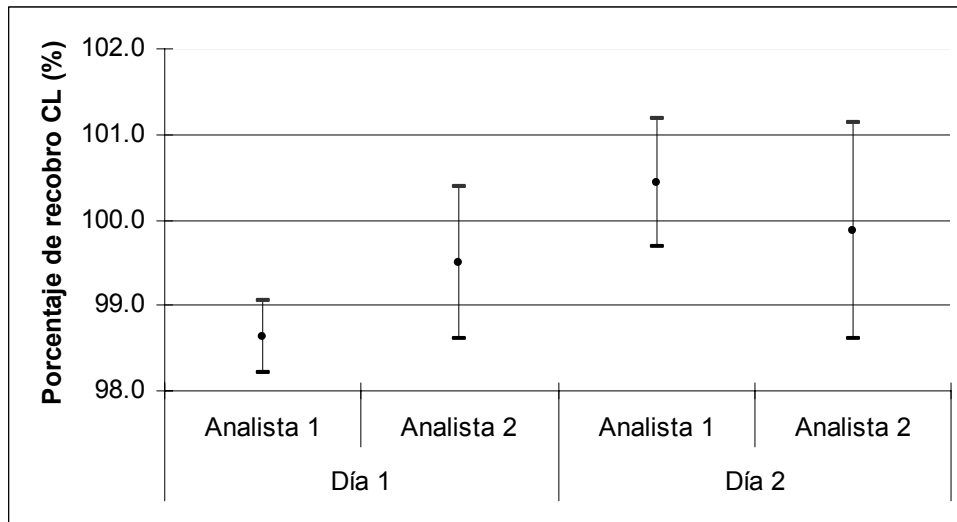


Figura 13: Porcentajes de recobro del CL \pm la desviación estándar para la reproducibilidad del método.

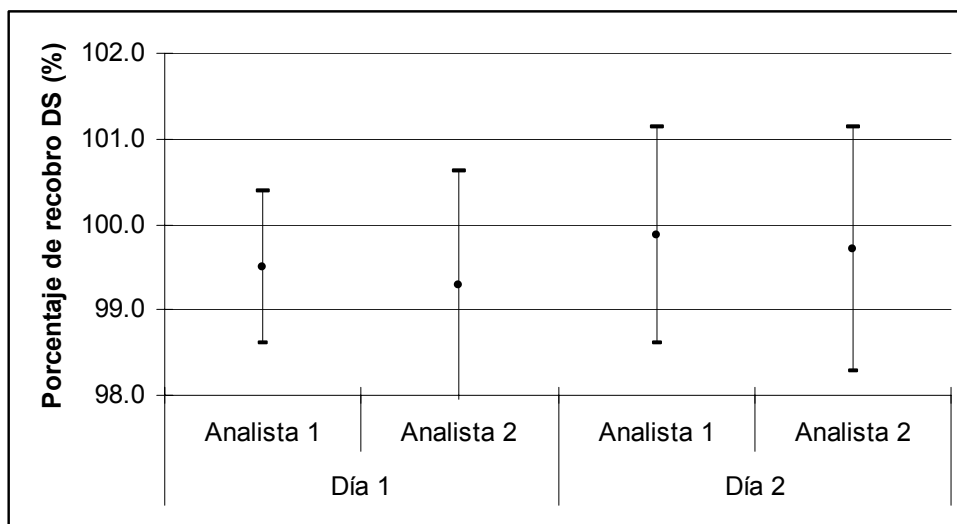


Figura 14: Porcentajes de recobro del DS \pm la desviación estándar para la reproducibilidad del método.

6. Conclusiones

- Se demostró la confiabilidad del método seleccionado mediante el análisis estadístico de los datos generados experimentalmente, comprobando que este método cumple con su función de cuantificar la solución inyectable de Clonixinato de Lisina y Diclofenaco Sódico.
- Se comprobó la utilidad del método analítico propuesto, mediante la aplicación de las herramientas de validación, para la cuantificación del contenido químico de la forma farmacéutica de interés.
- Esta tesis permitió la aplicación y utilización de los conocimientos adquiridos durante mi preparación profesional en la licenciatura, para el desarrollo de un método experimental de análisis para uso general en la industria farmacéutica.

7. Anexos



ANEXO 1. Especificidad del método para CL - DS (5 : 1)

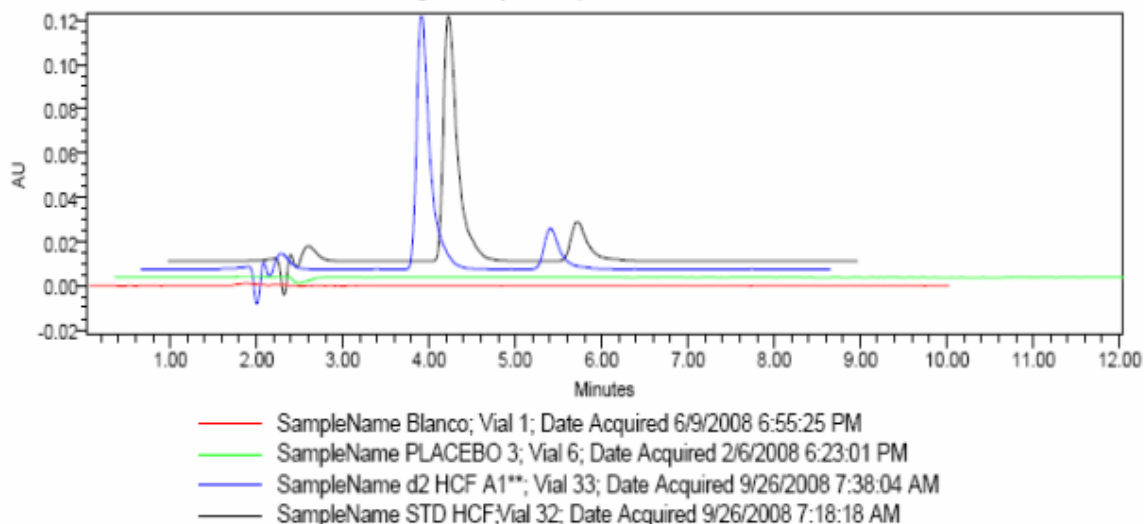
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C-4
Unidad Multidisciplinaria de Investigación
Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (L-5)



En este anexo se encuentra la información referente a la realización de la especificidad del método cromatográfico, esta información es necesaria para determinar las condiciones de análisis, que se utilizaran para el desarrollo y validación del método analítico, a fin de determinar que algunas condiciones inherentes a la preparación de las muestras no interfieren con el análisis.

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Blanco, PLACEBO 3, STD HCF, d2	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown, Standard	Date Acquired:	2/6/2008 6:23:01 PM, 6/9/2008
Vial:	1, 32, 33, 6	Acq. Method Set:	Fase Movil Met_Buffer 60_40
Injection #:	1, 2, 6	Date Processed:	9/26/2008 6:15:23 PM, 2/19/2009
Injection Volume:	20.00, 30.00, 50.00 ul	Processing Method:	CL_DS_131108, CL_DS_220908
Run Time:	8.0, 10.0, 12.0 Minutes	Channel Name:	Wvin Ch1
Sample Set Name:	Ensayo 24 Sep 08, Evaluación de	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 282.0 nm

Cromatogramas para especificidad del método





ANEXO 2.- Adecuabilidad del método para CL - DS (5 : 1)

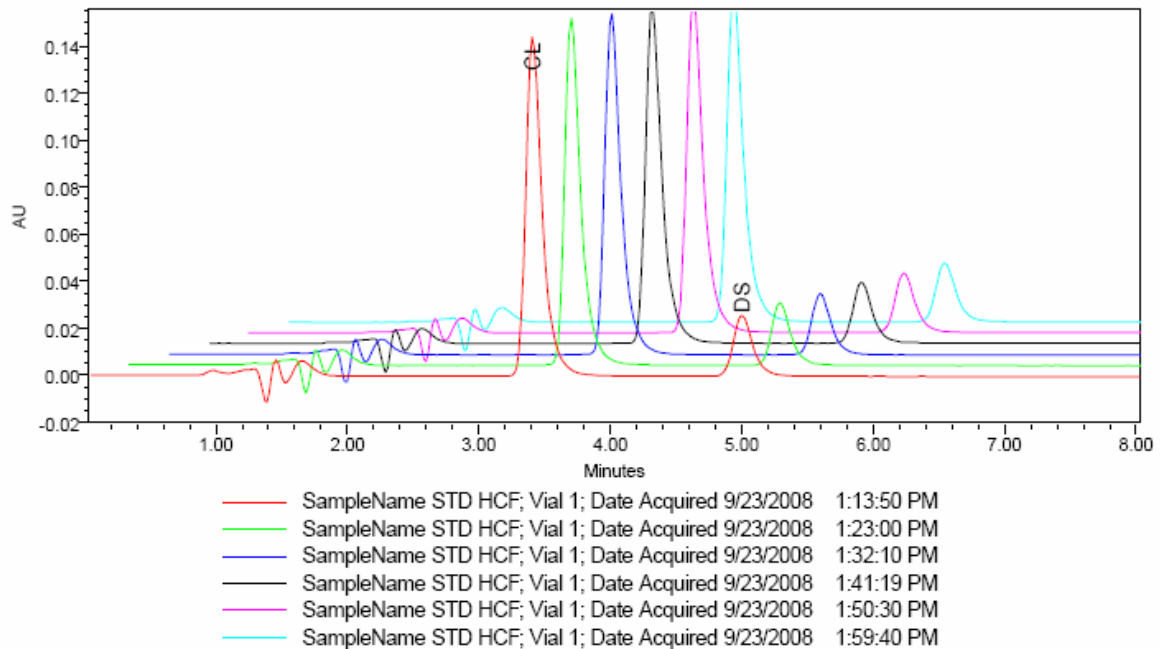
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C-4
 Unidad Multidisciplinaria de Investigación
 Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (L-5)



La adecuabilidad nos indica las condiciones diarias que presenta nuestro equipo cromatográfico, en este caso solo se muestran algunos datos recopilados a lo largo del experimento, este parámetro se usa como control para la transferencia del método así como una prueba confiabilidad en el instrumento que nos ayudara a la cuantificación de los analitos, cualquier variación mayor en el en las partes y componentes del equipo se hará notar y nos permitirá su corrección para continuar con una validación confiable.

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	STD HCF	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Date Acquired:	9/23/2008 1:13:50 PM, 9/23/2008
Vial:	1	Acq. Method Set:	Fase Movil Met_Buffer 60_40
Injection #:	1, 2, 3, 4, 5, 6	Date Processed:	9/23/2008 3:32:00 PM, 9/23/2008
Injection Volume:	30.00 ul	Processing Method:	CL_DS_220908
Run Time:	8.0 Minutes	Channel Name:	Wwin Ch1
Sample Set Name:	Ensayo 23 Sep 08	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 282.0 nm

Cromatogramas de la adecuabilidad del sistema





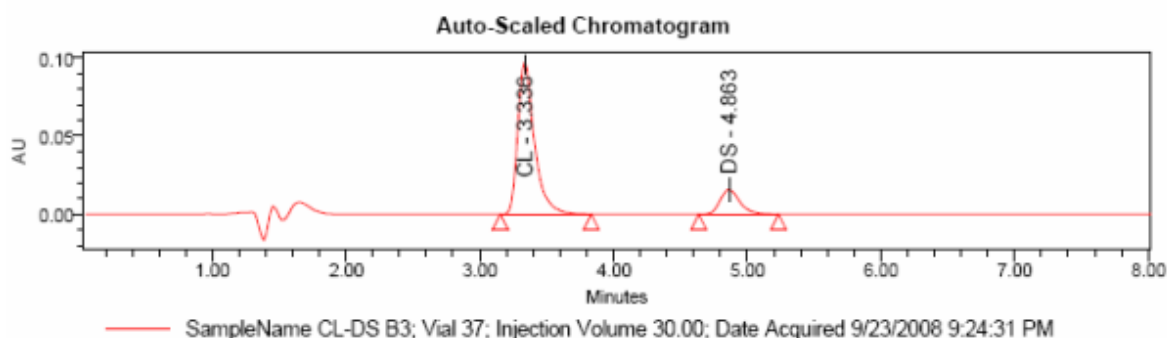
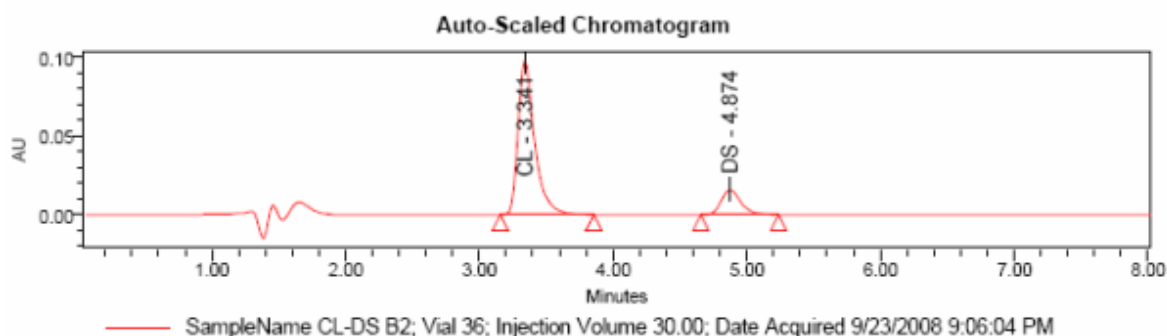
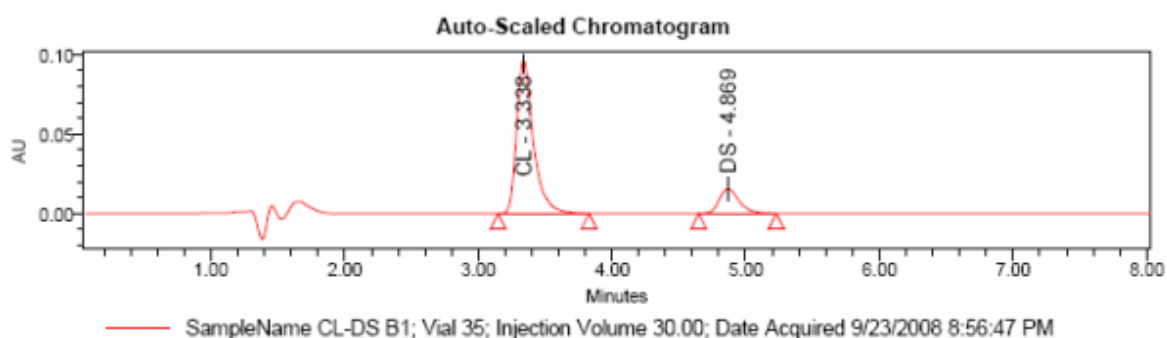
ANEXO 3. Precisión del sistema para CL

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C-4
 Unidad Multidisciplinaria de Investigación
 Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (L-5)



En este anexo se encuentra un compendio de los cromatogramas que son parte de la evidencia digital de la validación que se desarrollo en este trabajo de tesis y nos permiten visualizar los datos gráficos que se interpretaron matemáticamente para realizar el análisis estadístico; para su aceptación y posterior uso en el proceso experimental.

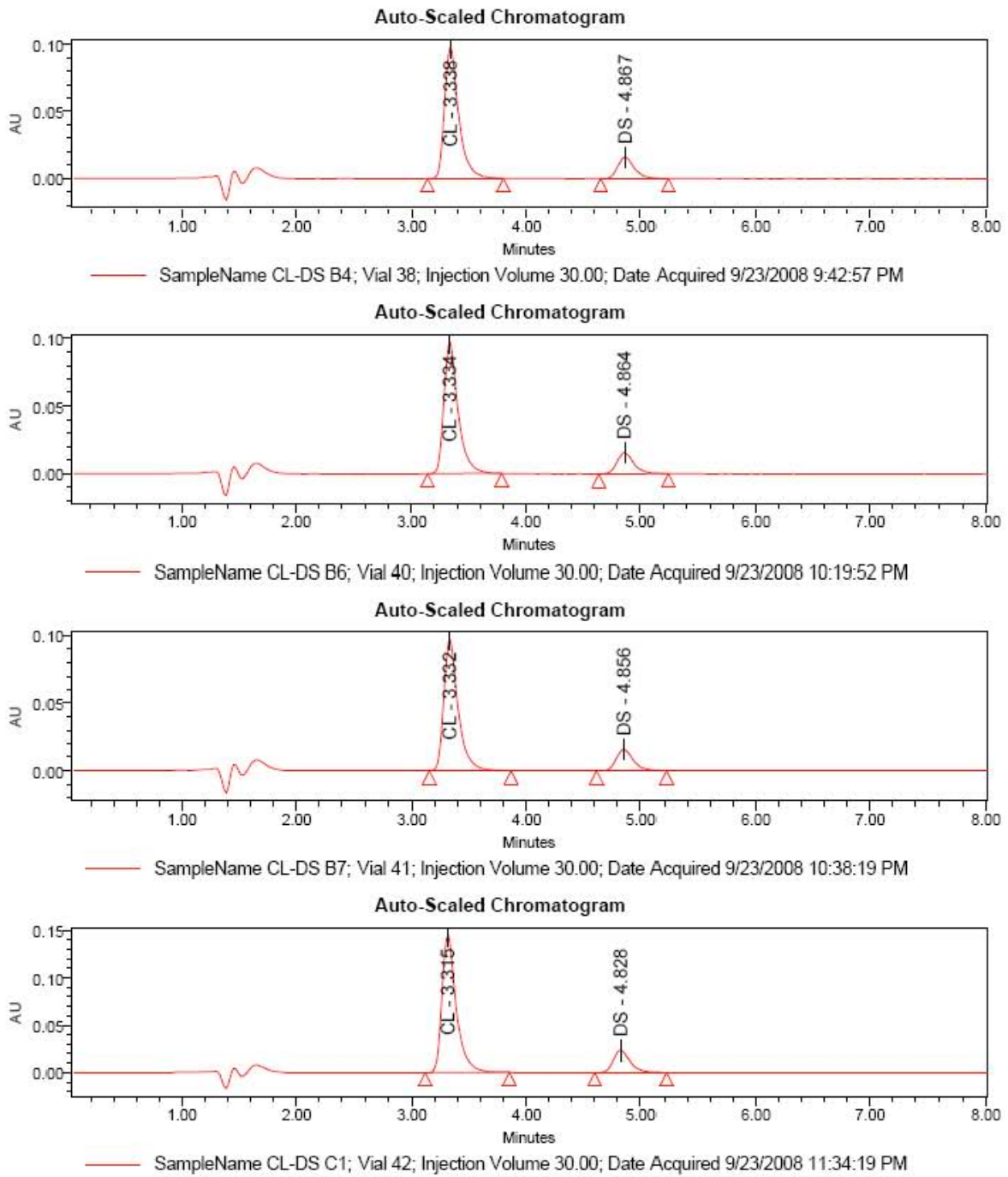
SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	CL-DS B1, CL-DS B2, CL-DS B3,	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Date Acquired:	9/23/2008 8:56:47 PM, 9/23/2008
Vial:	35, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 44,	Acq. Method Set:	Fase Movil Met_Buffer 60_40
Injection #:	1, 2	Date Processed:	9/24/2008 12:16:27 PM, 9/24/2008
Injection Volume:	30.00 ul	Processing Method:	CL_DS_220908
Run Time:	8.0 Minutes	Channel Name:	Wvln Ch1
Sample Set Name:	Ensayo 23 Sep 08	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 282.0 nm





ANEXO 3. Precisión del sistema para CL

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C-4
Unidad Multidisciplinaria de Investigación
Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (L-5)



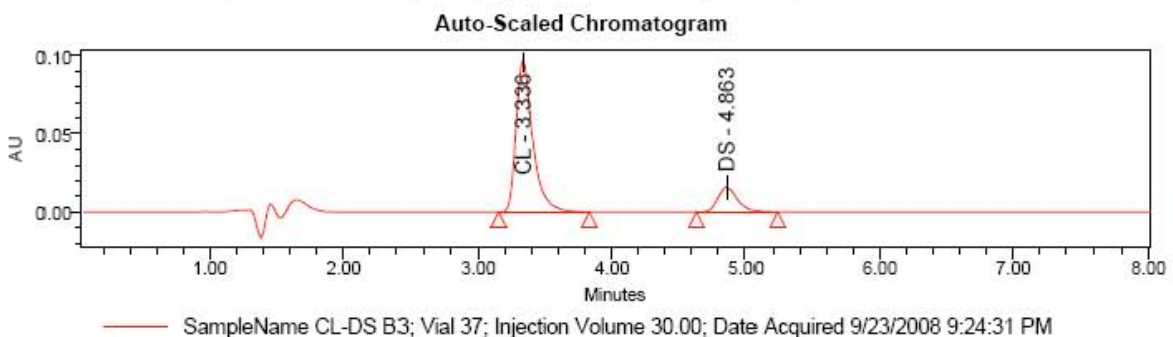
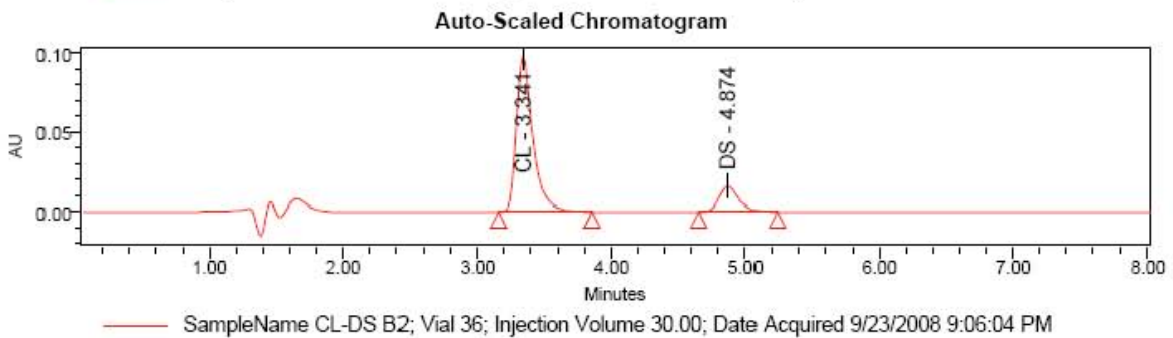
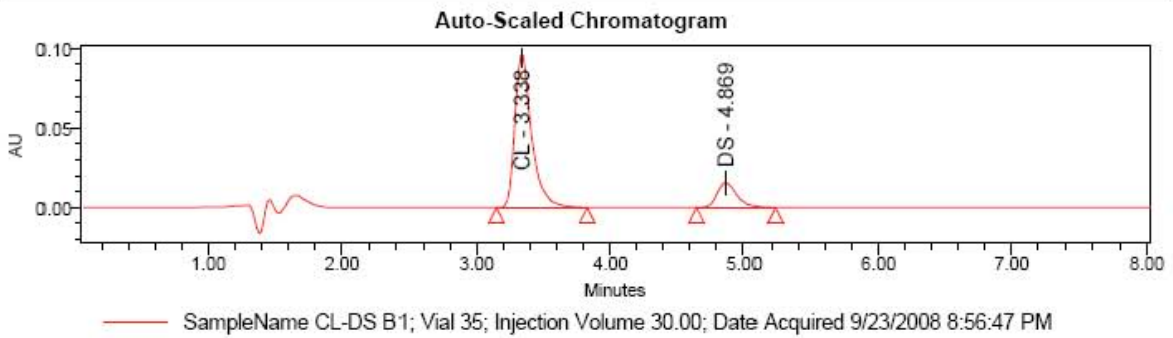


ANEXO 3. Precisión del sistema para DS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C-4
 Unidad Multidisciplinaria de Investigación
 Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (L-5)



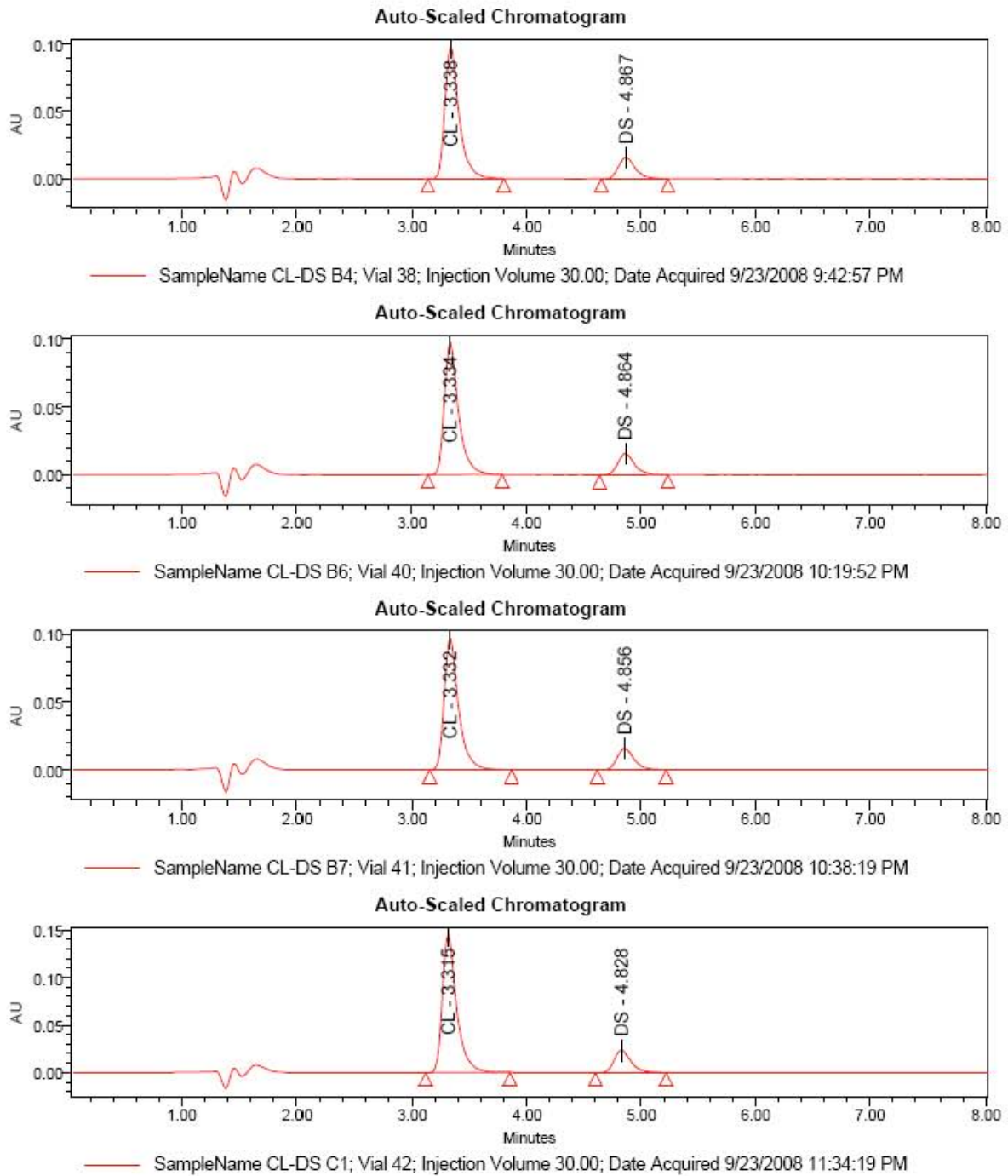
SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	CL-DS B1, CL-DS B2, CL-DS B3,	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Date Acquired:	9/23/2008 8:56:47 PM, 9/23/2008
Vial:	35, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 44,	Acq. Method Set:	Fase Movil Met_Buffer 60_40
Injection #:	1, 2	Date Processed:	9/24/2008 12:16:27 PM, 9/24/2008
Injection Volume:	30.00 ul	Processing Method:	CL_DS_220908
Run Time:	8.0 Minutes	Channel Name:	Wvln Ch1
Sample Set Name:	Ensayo 23 Sep 08	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 282.0 nm





ANEXO 3. Precisión del sistema para DS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C-4
Unidad Multidisciplinaria de Investigación
Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (L-5)





ANEXO 4. Linealidad del sistema para CL

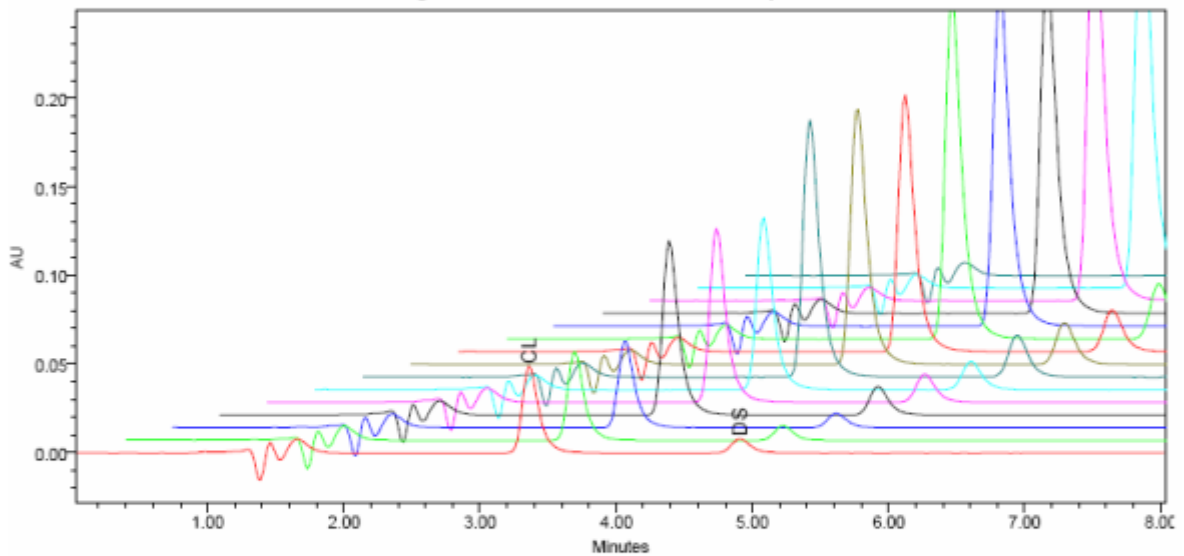
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C-4
 Unidad Multidisciplinaria de Investigación
 Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (L-5)



En este anexo se muestran los cromatogramas a las distintas concentraciones que se trabajó para poder interpolar la cantidad de contenido químico que presentan las muestras, además de permitirnos demostrar la proporcionalidad de la relación cantidad vs. respuesta; tanto para Clonixinato de Lisina como Diclofenaco Sódico.

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	CL-DS A1, CL-DS A2, CL-DS A4,	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Date Acquired:	9/23/2008 6:58:03 PM, 9/23/2008
Vial:	31, 32, 34, 36, 38, 41, 45, 47, 52,	Acq. Method Set:	Fase Movil Met_Buffer 60_40
Injection #:	1, 2	Date Processed:	9/24/2008 12:16:13 PM, 9/24/2008
Injection Volume:	30.00 ul	Processing Method:	CL_DS_220908
Run Time:	8.0 Minutes	Channel Name:	Wvin Ch1
Sample Set Name:	Ensayo 23 Sep 08	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 282.0 nm

Cromatogramas de la linealidad del sistema para CL



- SampleName CL-DS A1; Injection Volume 30.00; Date Acquired 9/23/2008 6:58:03 PM
- SampleName CL-DS A4; Injection Volume 30.00; Date Acquired 9/23/2008 8:02:44 PM
- SampleName CL-DS A2; Injection Volume 30.00; Date Acquired 9/23/2008 7:16:34 PM
- SampleName CL-DS B2; Injection Volume 30.00; Date Acquired 9/23/2008 9:06:04 PM
- SampleName CL-DS B4; Injection Volume 30.00; Date Acquired 9/23/2008 9:42:57 PM
- SampleName CL-DS B7; Injection Volume 30.00; Date Acquired 9/23/2008 10:38:19 PM
- SampleName CL-DS C4; Injection Volume 30.00; Date Acquired 9/24/2008 12:38:53 AM
- SampleName CL-DS C4; Injection Volume 30.00; Date Acquired 9/24/2008 12:29:42 AM
- SampleName CL-DS C6; Injection Volume 30.00; Date Acquired 9/24/2008 1:15:52 AM
- SampleName CL-DS D4; Injection Volume 30.00; Date Acquired 9/24/2008 3:16:47 AM
- SampleName CL-DS D5; Injection Volume 30.00; Date Acquired 9/24/2008 3:44:28 AM
- SampleName CL-DS D7; Injection Volume 30.00; Date Acquired 9/24/2008 4:21:28 AM
- SampleName CL-DS E1; Injection Volume 30.00; Date Acquired 9/24/2008 5:26:54 AM
- SampleName CL-DS E2; Injection Volume 30.00; Date Acquired 9/24/2008 5:45:23 AM
- SampleName CL-DS E3; Injection Volume 30.00; Date Acquired 9/24/2008 6:03:53 AM



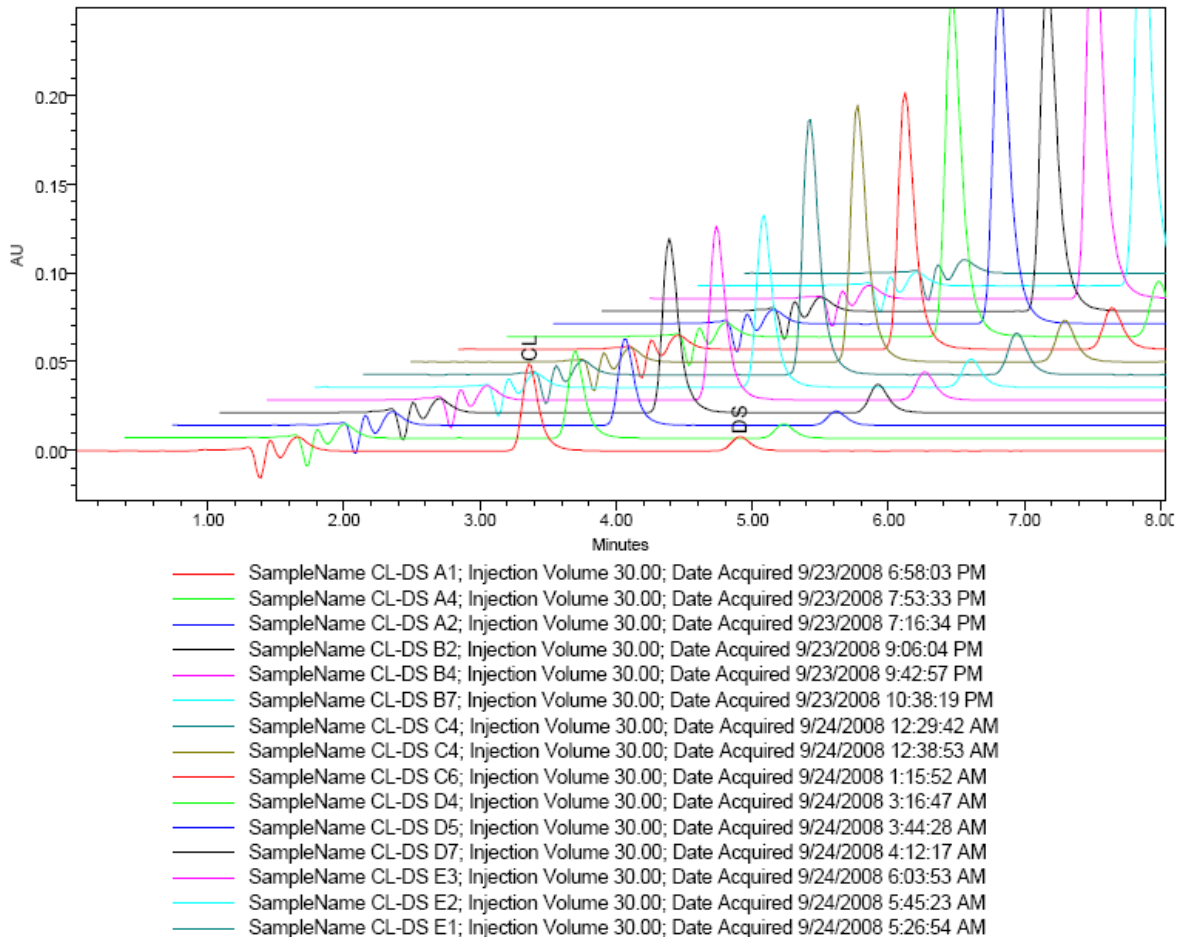
ANEXO 4. Linealidad del sistema para DS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C-4
 Unidad Multidisciplinaria de Investigación
 Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (L-5)



SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	CL-DS A1, CL-DS A2, CL-DS A4,	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Date Acquired:	9/23/2008 6:58:03 PM, 9/23/2008
Vial:	31, 32, 34, 36, 38, 41, 45, 47, 52,	Acq. Method Set:	Fase Movil Met_Buffer 60_40
Injection #:	1, 2	Date Processed:	9/24/2008 12:16:13 PM, 9/24/2008
Injection Volume:	30.00 ul	Processing Method:	CL_DS_220908
Run Time:	8.0 Minutes	Channel Name:	Wvln Ch1
Sample Set Name:	Ensayo 23 Sep 08	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 282.0 nm

Cromatogramas de la linealidad del sistema para DS





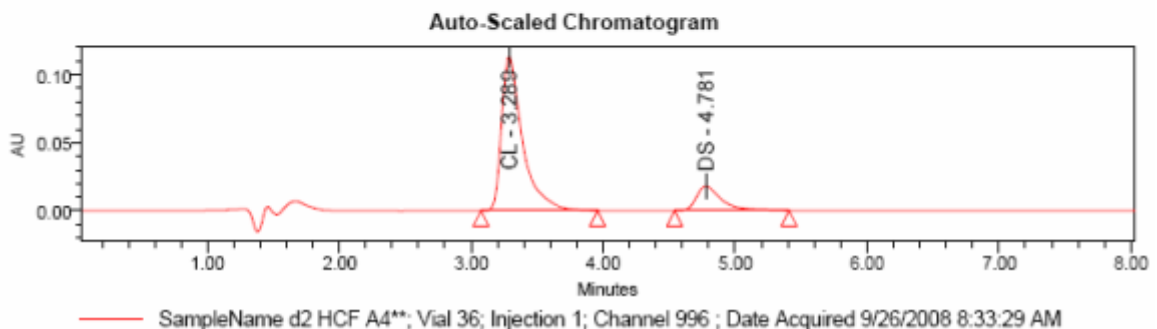
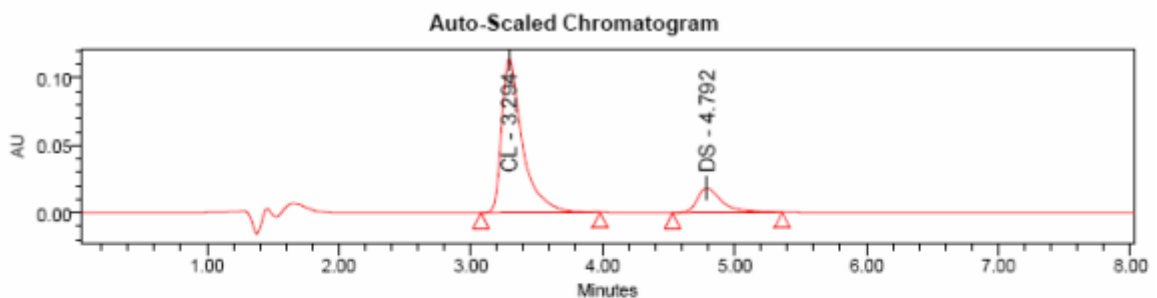
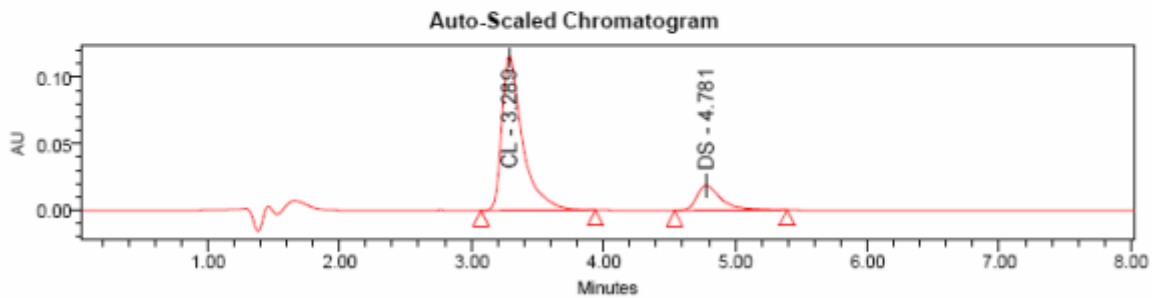
ANEXO 6. Linealidad del método para CL

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C-4
 Unidad Multidisciplinaria de Investigación
 Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (L-5)



Los cromatogramas que se muestran en este anexo, nos muestran el comportamiento que presentaron los analitos desde el punto más complejo de análisis, para determinar si se sigue conservando la linealidad en la cuantificación o si esta se ve modificada por la influencia de los excipientes que acompañan a la formulación y establecer si el método analítico es confiable para la cuantificación.

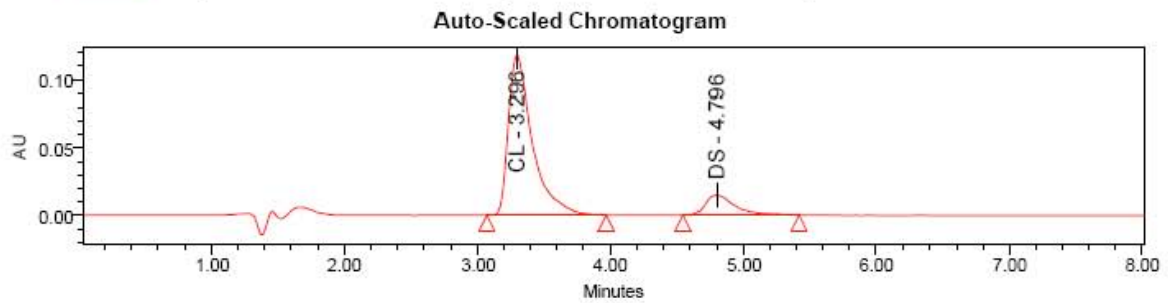
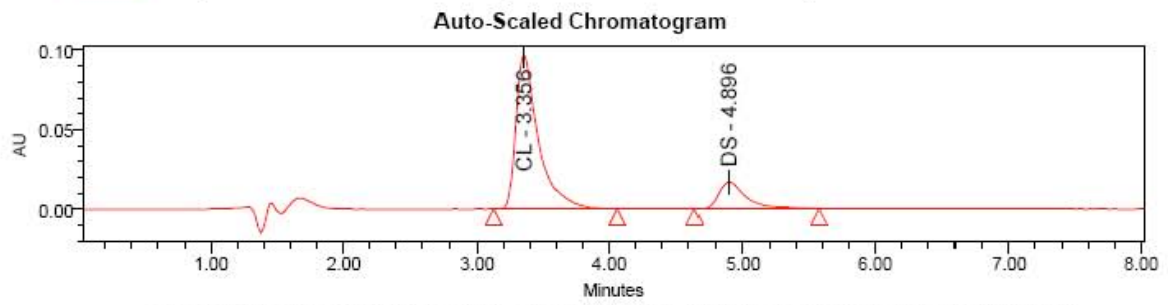
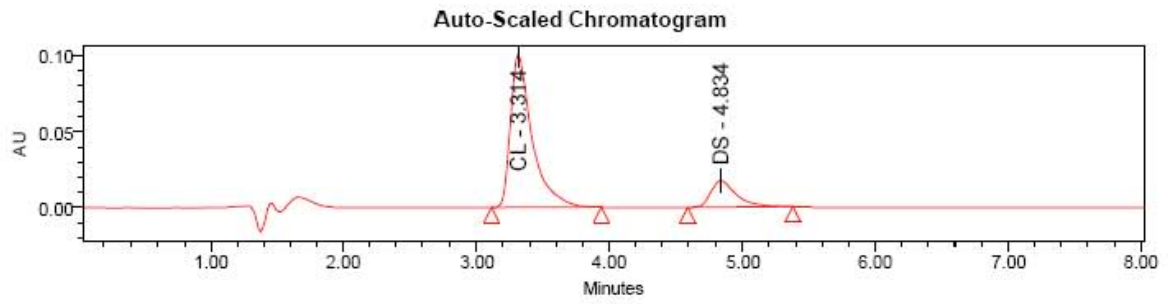
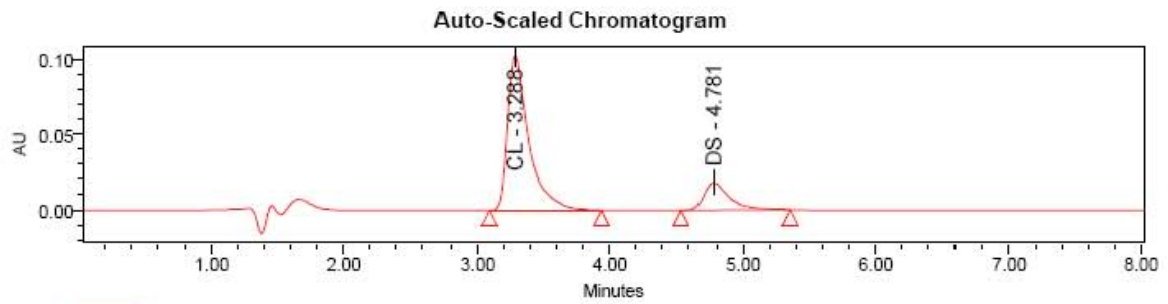
SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	d2 ASG I1**, d2 ASG I2**, d2 ASG	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown, Standard	Date Acquired:	9/26/2008 5:13:00 AM, 9/26/2008
Vial:	27, 28, 30, 33, 34, 36, 40, 42, 44,	Acq. Method Set:	Fase Movil Met_Buffer 60_40
Injection #:	1, 2	Date Processed:	9/26/2008 5:46:19 PM, 9/26/2008
Injection Volume:	30.00 ul	Processing Method:	CL_DS_220908
Run Time:	8.0 Minutes	Channel Name:	Wvin Ch1
Sample Set Name:	Ensayo 24 Sep 08	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 282.0 nm





ANEXO 6. Linealidad del método para CL

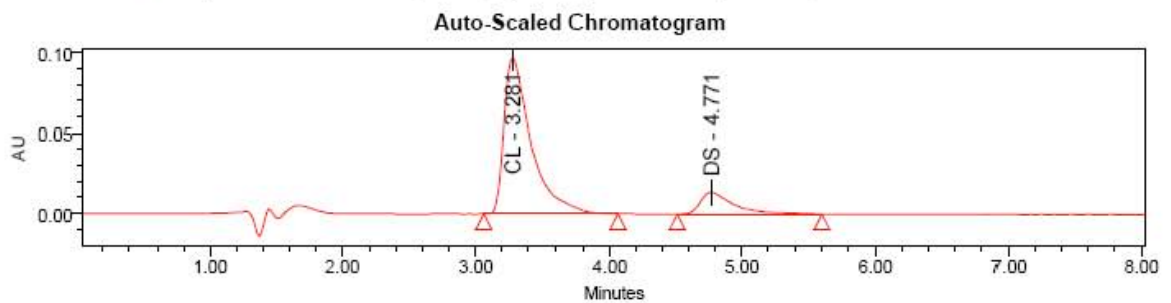
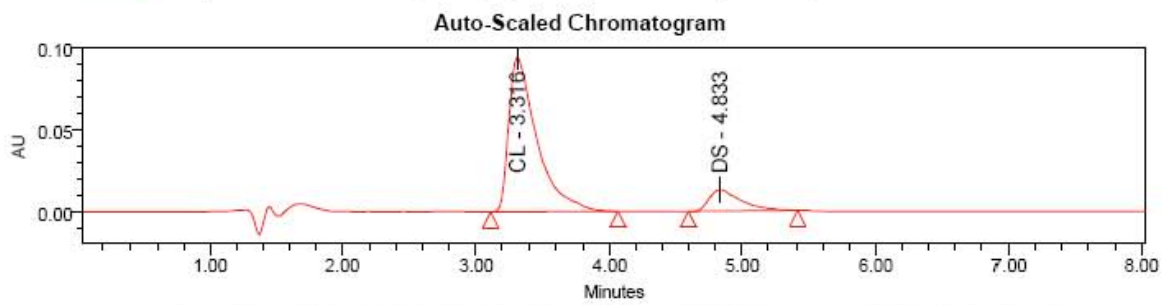
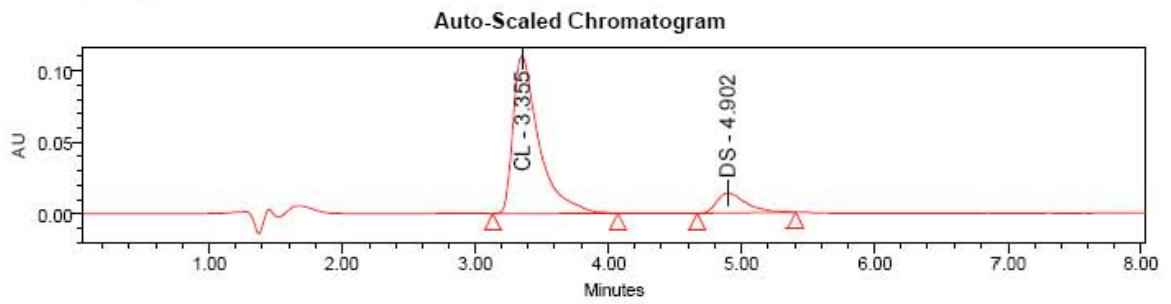
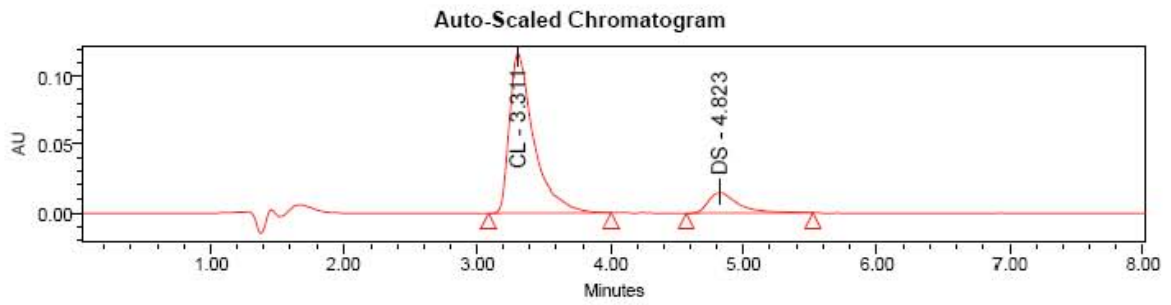
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C-4
Unidad Multidisciplinaria de Investigación
Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (L-5)





ANEXO 6. Linealidad del método para CL

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C-4
Unidad Multidisciplinaria de Investigación
Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (L-5)



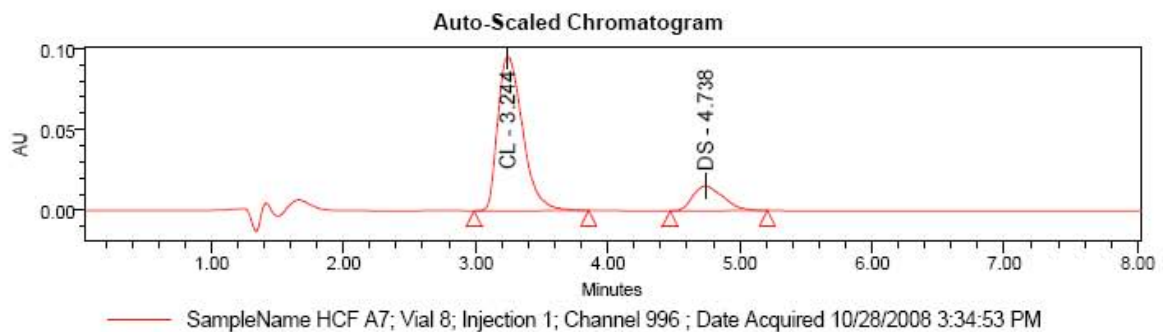
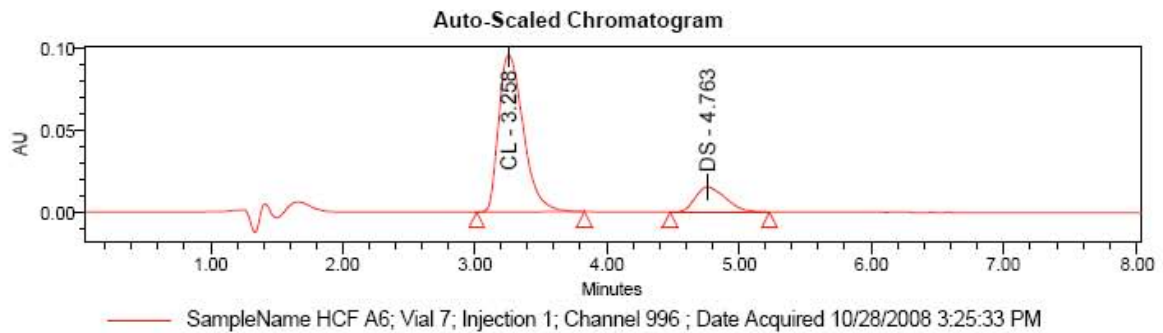


ANEXO 6. Linealidad del método para DS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C-1
 Unidad Multidisciplinaria de Investigación
 Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (L-5)



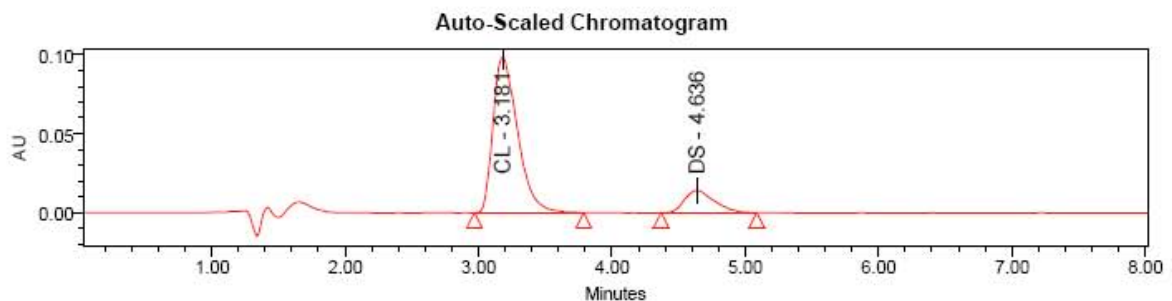
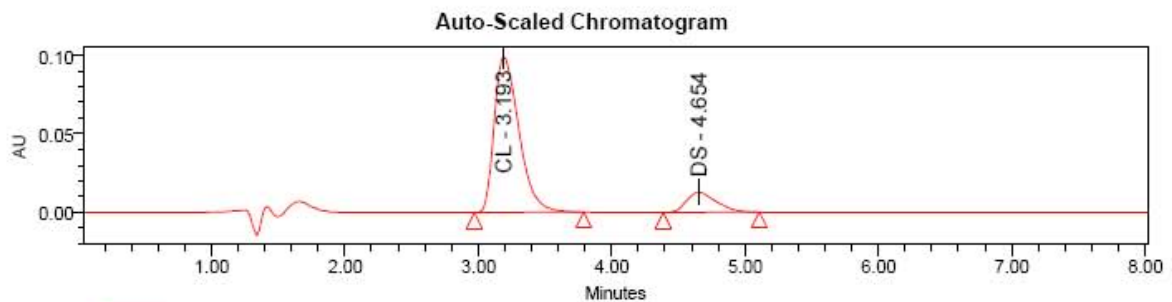
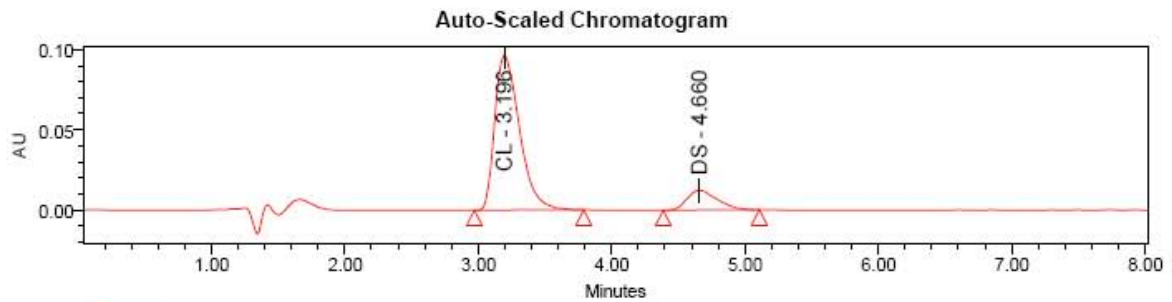
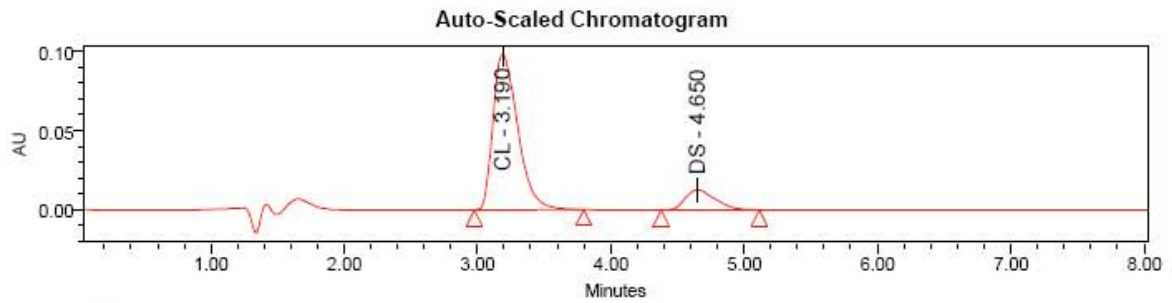
SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	HCF A2, HCF A6, HCF A7, HCF D1,	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Date Acquired:	10/28/2008 2:48:15 PM, 10/28/2008
Vial:	16, 17, 18, 20, 22, 25, 27, 28, 3, 30,	Acq. Method Set:	Fase Movil Met_Buffer 60_40
Injection #:	1	Date Processed:	10/28/2008 4:23:31 PM, 10/28/2008
Injection Volume:	30.00 ul	Processing Method:	CL_DS_220908
Run Time:	8.0 Minutes	Channel Name:	Wvin Ch1
Sample Set Name:	Ensayo 28 Oct 2008	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 282.0 nm





ANEXO 6. Linealidad del método para DS

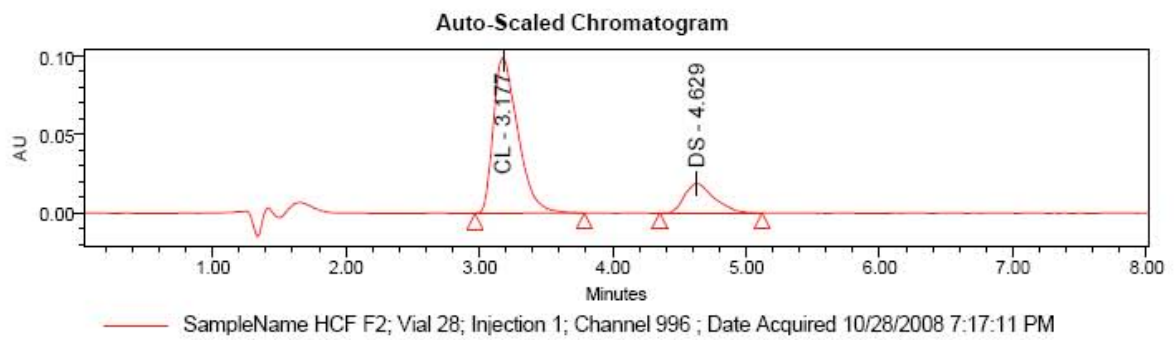
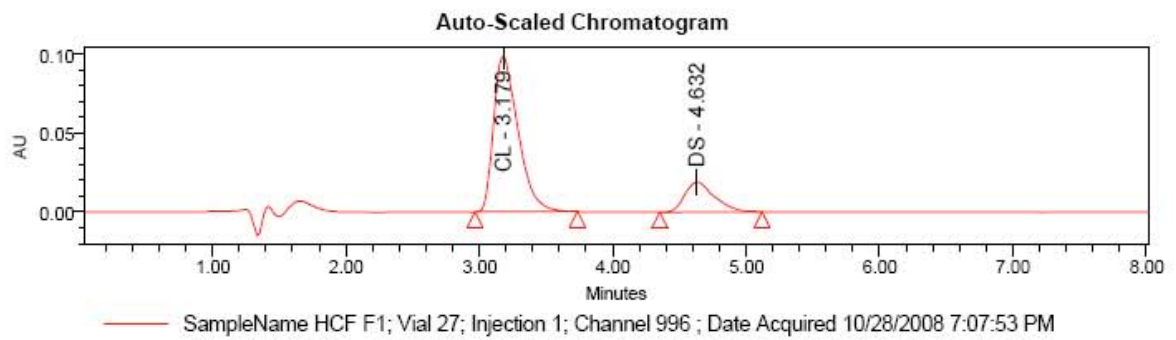
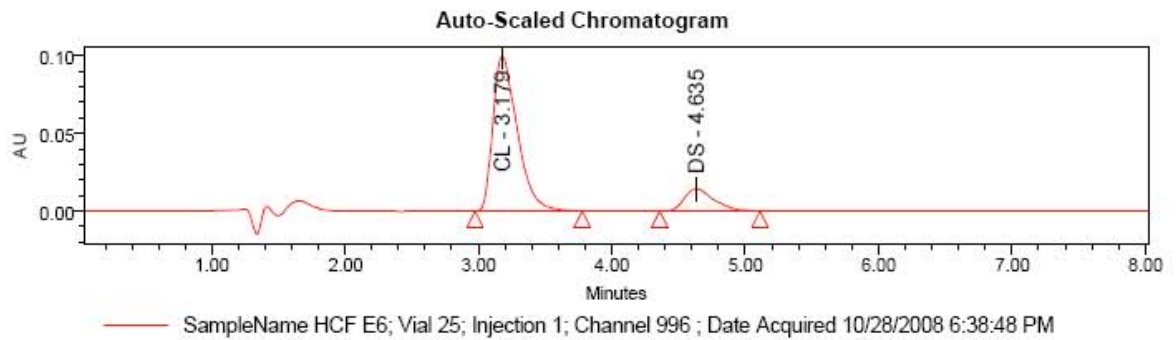
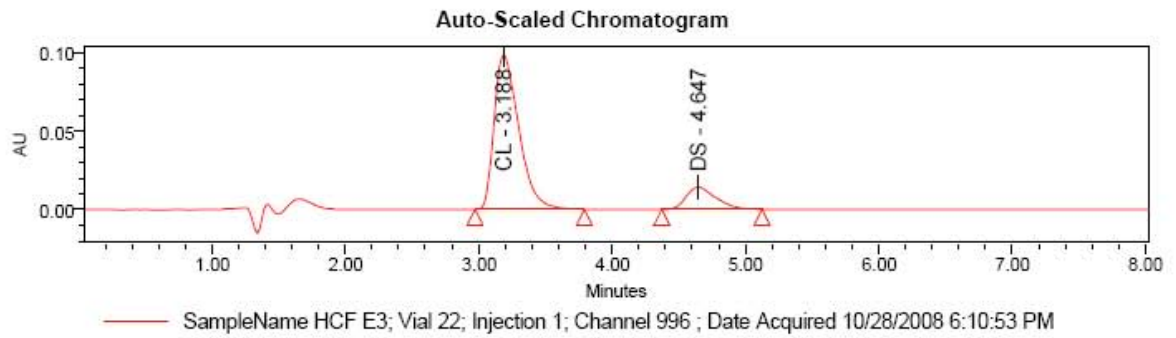
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C-4
Unidad Multidisciplinaria de Investigación
Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (L-5)





ANEXO 6. Linealidad del método para DS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C-4
Unidad Multidisciplinaria de Investigación
Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (L-5)





ANEXO 7. Reproducibilidad del método para CL

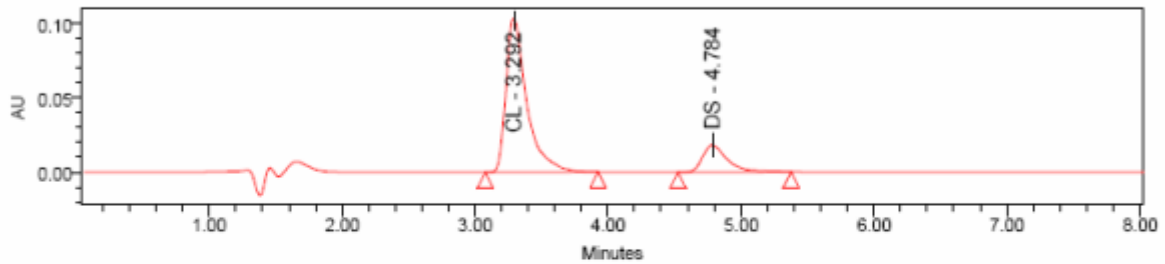
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C-4
 Unidad Multidisciplinaria de Investigación
 Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (L-5)



Por ultimo, aquí se muestran los resultados de la evaluación de la reproducibilidad del método validado lo que nos permite de forma confiable y segura la transferencia de los métodos analíticos desarrollados entre distintos laboratorios, además de confirmar que el método lo puede llevar a cabo cualquier analista siguiendo los procedimientos descritos.

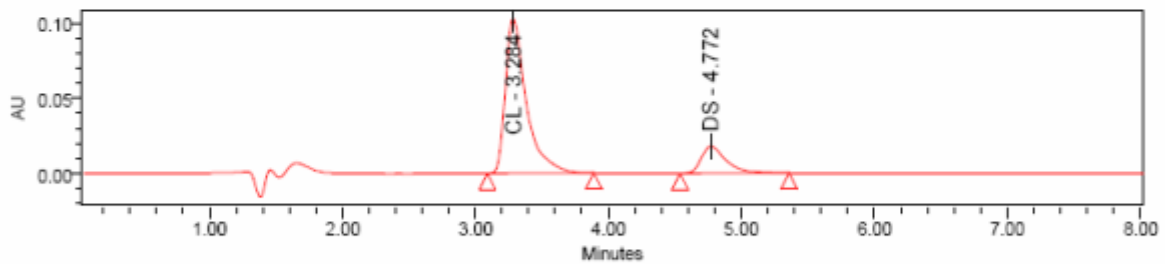
SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	ASG 1A, ASG 1B, ASG 2H, ASG	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown, Standard	Date Acquired:	9/25/2008 8:37:23 PM, 9/25/2008
Vial:	10, 12, 13, 15, 18, 20, 21, 23, 24,	Acq. Method Set:	Fase Movil Met_Buffer 60_40
Injection #:	1, 2	Date Processed:	9/26/2008 5:46:13 PM, 9/26/2008
Injection Volume:	30.00 ul	Processing Method:	CL_DS_220908
Run Time:	8.0 Minutes	Channel Name:	Wvln Ch1
Sample Set Name:	Ensayo 20 Oct 04, Ensayo 21 Oct	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 282.0 nm

Cromatogramas de la reproducibilidad del método para CL



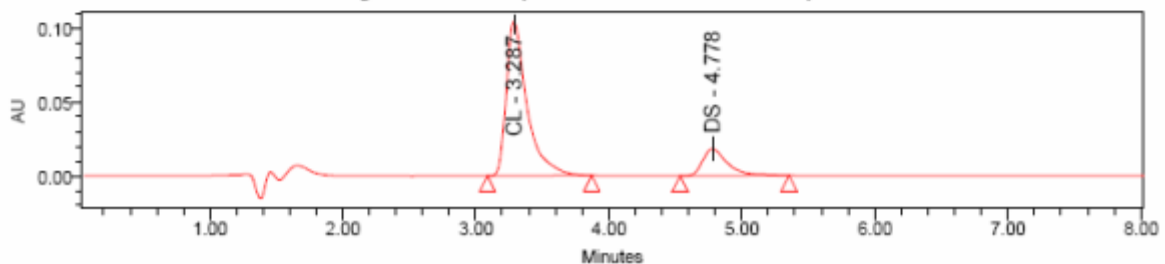
SampleName d2 ASG B4** ; Vial 12; Injection 1; Channel 996 ; Date Acquired 9/25/2008 11:07:06 PM

Cromatogramas de la reproducibilidad del método para CL



SampleName d2 ASG B5** ; Vial 13; Injection 2; Channel 996 ; Date Acquired 9/25/2008 11:34:47 PM

Cromatogramas de la reproducibilidad del método para CL



SampleName d2 ASG B7** ; Vial 15; Injection 2; Channel 996 ; Date Acquired 9/26/2008 12:11:46 AM

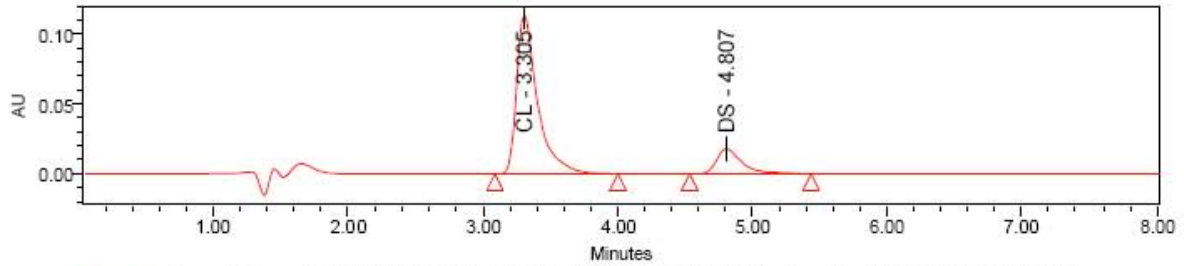


ANEXO 7. Reproducibilidad del método para CL

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C-4
Unidad Multidisciplinaria de Investigación
Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (L-5)

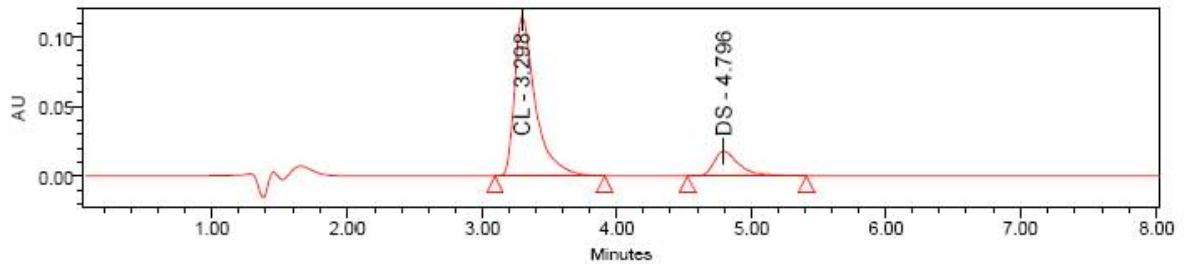


Cromatogramas de la reproducibilidad del método para CL



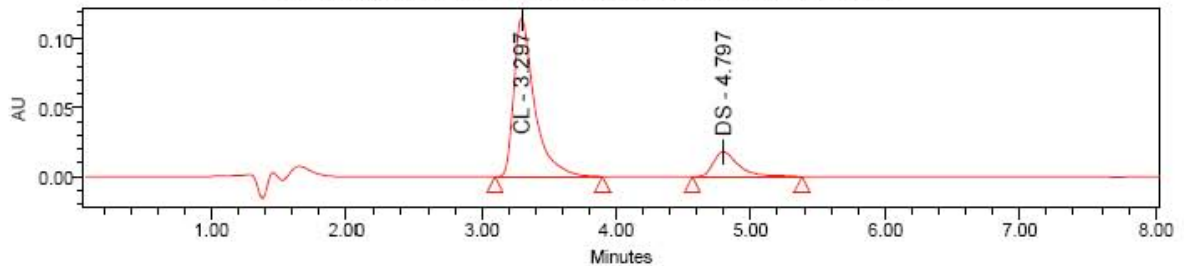
SampleName d2 ASG A4** ; Vial 5; Injection 2; Channel 996 ; Date Acquired 9/25/2008 8:37:23 PM

Cromatogramas de la reproducibilidad del método para CL



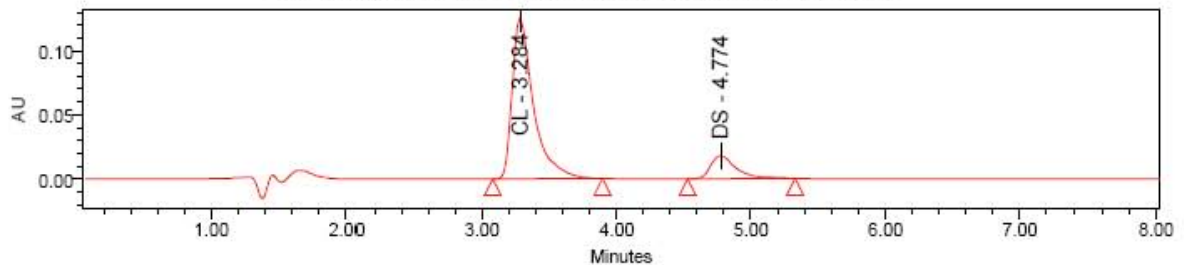
SampleName d2 ASG A5** ; Vial 6; Injection 2; Channel 996 ; Date Acquired 9/25/2008 8:55:51 PM

Cromatogramas de la reproducibilidad del método para CL



SampleName d2 ASG A6** ; Vial 7; Injection 1; Channel 996 ; Date Acquired 9/25/2008 9:05:09 PM

Cromatogramas de la reproducibilidad del método para CL



SampleName d2 ASG H4** ; Vial 23; Injection 1; Channel 996 ; Date Acquired 9/26/2008 3:29:35 AM

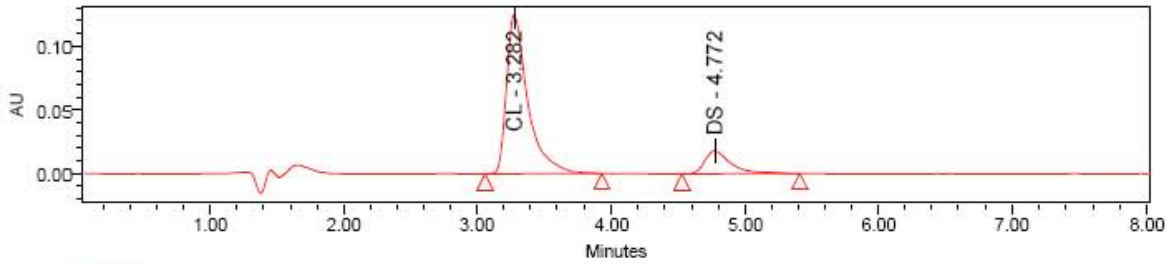


ANEXO 7. Reproducibilidad del método para CL

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C-4
Unidad Multidisciplinaria de Investigación
Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (L-5)

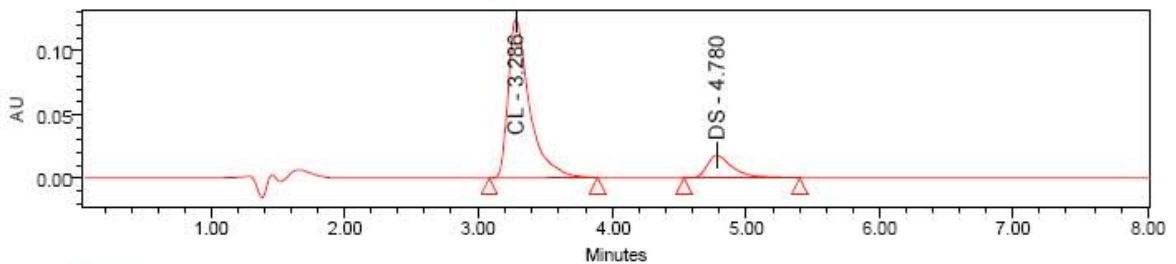


Cromatogramas de la reproducibilidad del método para CL



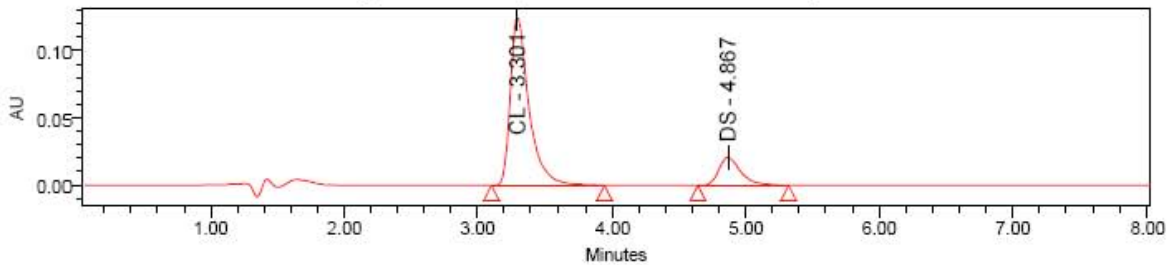
SampleName d2 ASG H5** ; Vial 24 ; Injection 1 ; Channel 996 ; Date Acquired 9/26/2008 3:48:05 AM

Cromatogramas de la reproducibilidad del método para CL



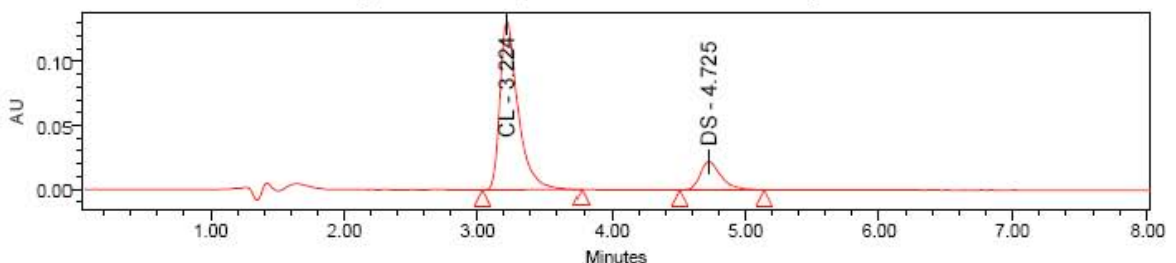
SampleName d2 ASG H6** ; Vial 25 ; Injection 2 ; Channel 996 ; Date Acquired 9/26/2008 4:15:43 AM

Cromatogramas de la reproducibilidad del método para CL



SampleName ASG 1A ; Vial 6 ; Injection 1 ; Channel 996 ; Date Acquired 10/20/2008 8:11:55 PM

Cromatogramas de la reproducibilidad del método para CL



SampleName ASG 3A ; Vial 8 ; Injection 1 ; Channel 996 ; Date Acquired 10/20/2008 8:30:31 PM

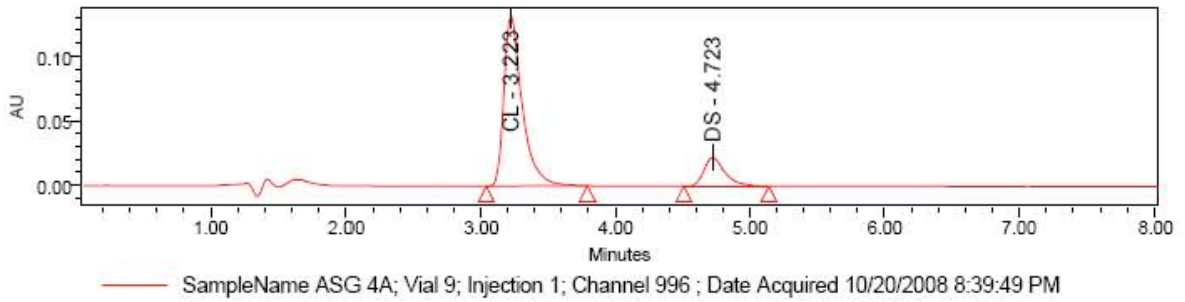


ANEXO 7. Reproducibilidad del método para CL

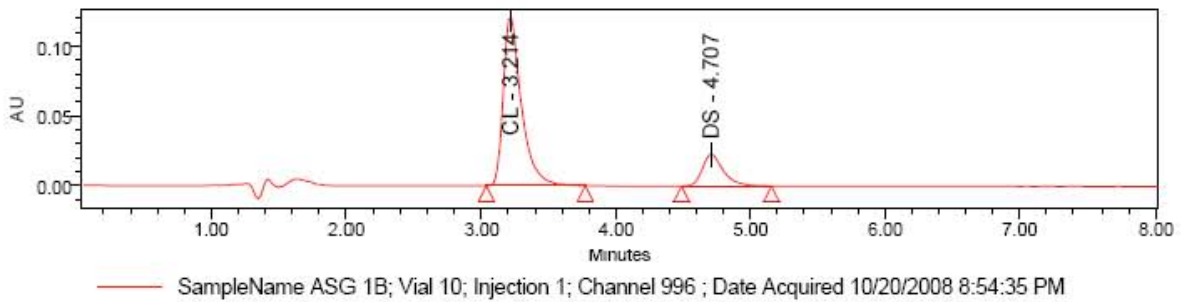
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C-4
Unidad Multidisciplinaria de Investigación
Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (L-5)



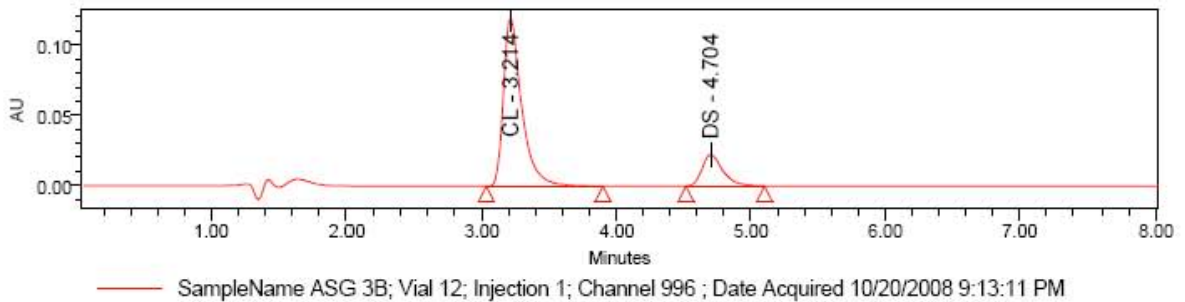
Cromatogramas de la reproducibilidad del método para CL



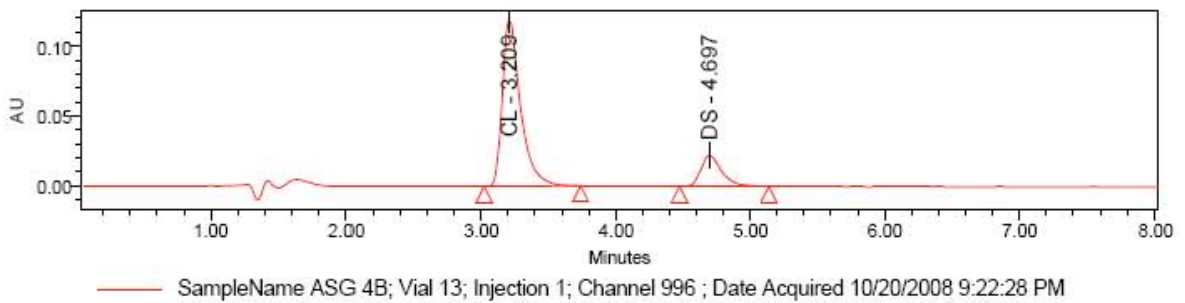
Cromatogramas de la reproducibilidad del método para CL



Cromatogramas de la reproducibilidad del método para CL



Cromatogramas de la reproducibilidad del método para CL





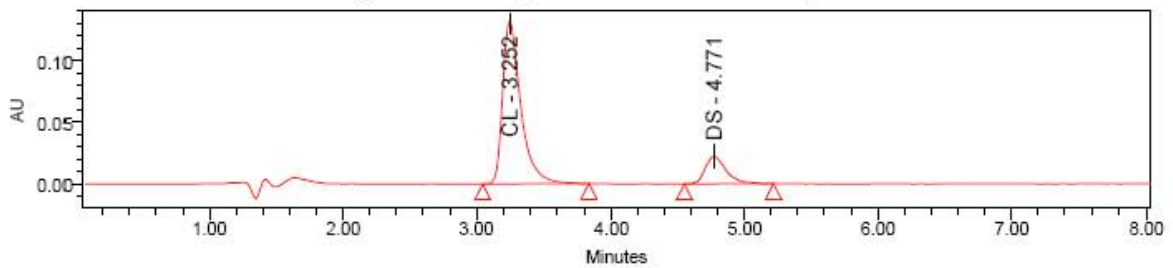
ANEXO 7. Reproducibilidad del método para DS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C-4
 Unidad Multidisciplinaria de Investigación
 Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (L-5)



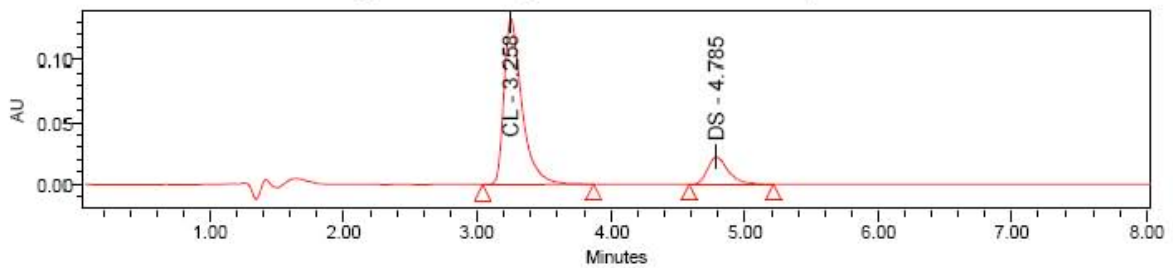
SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	ASG 1A, ASG 1G, ASG 2E, ASG	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown, Standard	Date Acquired:	9/24/2008 5:04:13 PM, 9/24/2008
Vial:	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,	Acq. Method Set:	Fase Movil Met_Buffer 60_40
Injection #:	1, 2	Date Processed:	9/24/2008 5:29:00 PM, 9/24/2008
Injection Volume:	30.00 ul	Processing Method:	CL_DS_211008, CL_DS_220908
Run Time:	8.0 Minutes	Channel Name:	Wvln Ch1
Sample Set Name:	Ensayo 20 Oct 04, Ensayo 21 Oct	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 282.0 nm

Cromatogramas de la reproducibilidad del método para DS



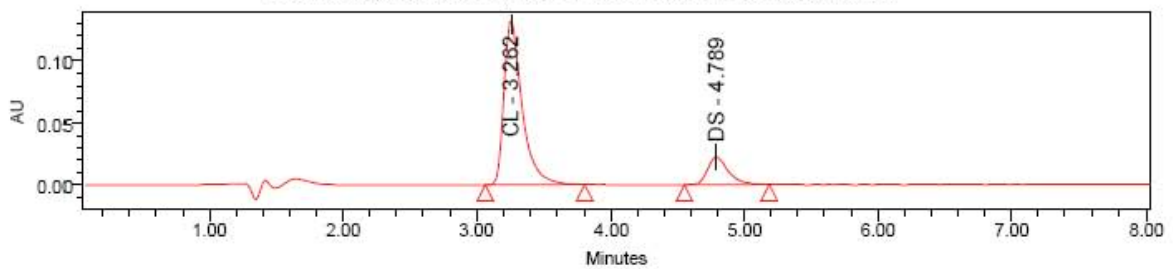
SampleName HCF 1A; Vial 2; Injection 1; Channel 996 ; Date Acquired 10/21/2008 4:55:57 PM

Cromatogramas de la reproducibilidad del método para DS



SampleName HCF 2A; Vial 3; Injection 1; Channel 996 ; Date Acquired 10/21/2008 5:05:16 PM

Cromatogramas de la reproducibilidad del método para DS



SampleName HCF 3A; Vial 4; Injection 1; Channel 996 ; Date Acquired 10/21/2008 5:14:36 PM

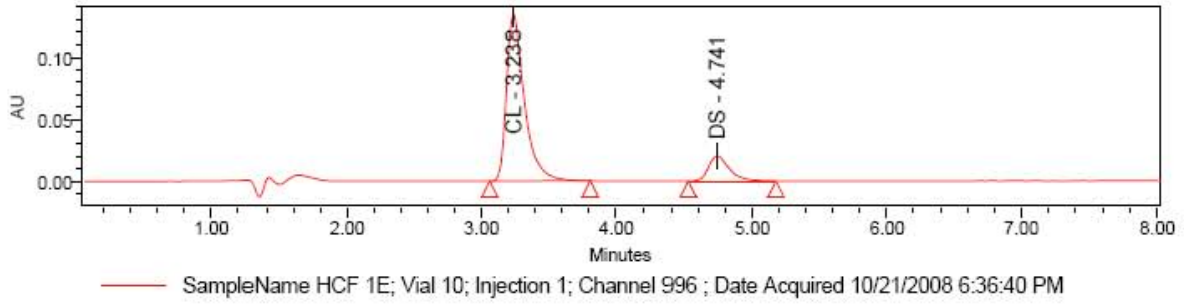


ANEXO 7. Reproducibilidad del método para DS

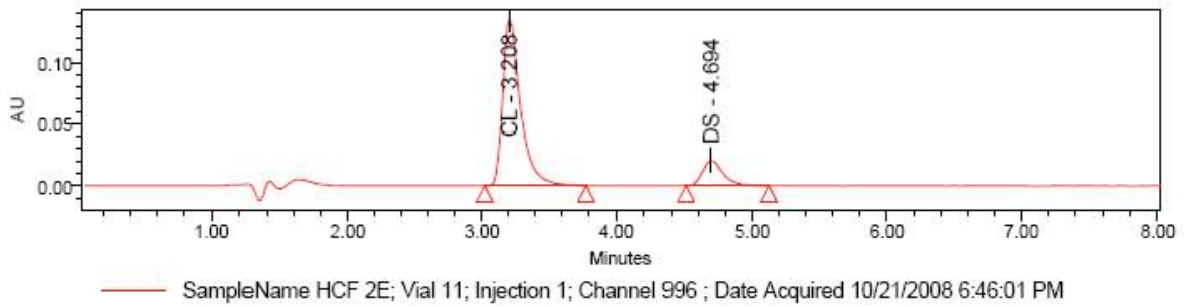
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C-4
Unidad Multidisciplinaria de Investigación
Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (L-5)



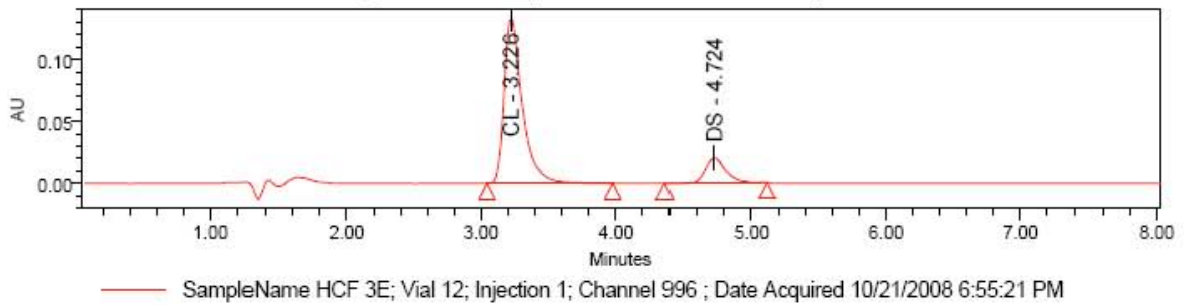
Cromatogramas de la reproducibilidad del método para DS



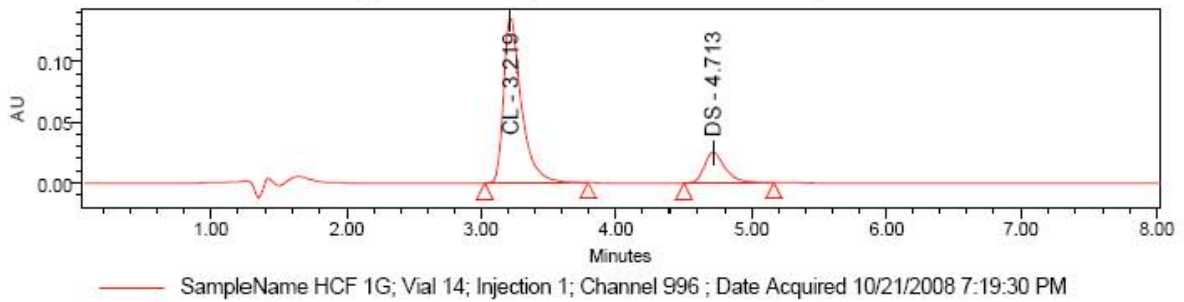
Cromatogramas de la reproducibilidad del método para DS



Cromatogramas de la reproducibilidad del método para DS



Cromatogramas de la reproducibilidad del método para DS



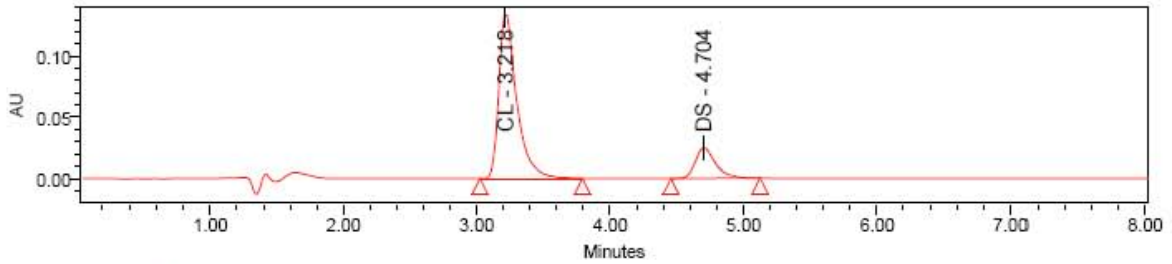


ANEXO 7. Reproducibilidad del método para DS

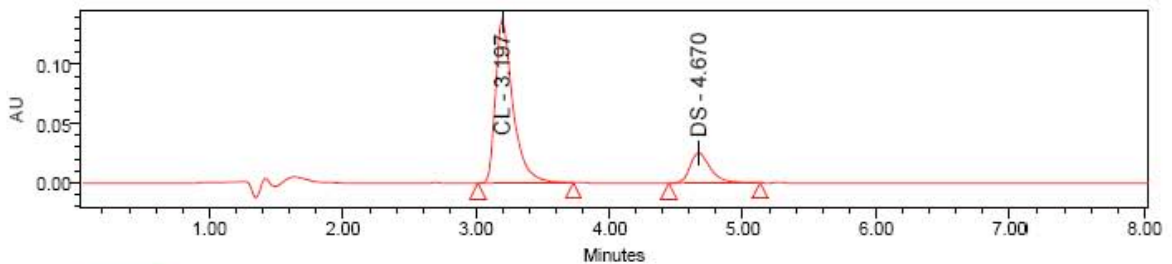
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C-4
Unidad Multidisciplinaria de Investigación
Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (L-5)



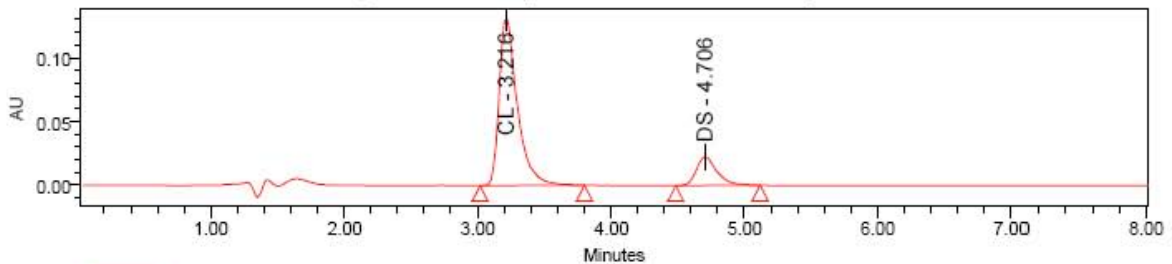
Cromatogramas de la reproducibilidad del método para DS



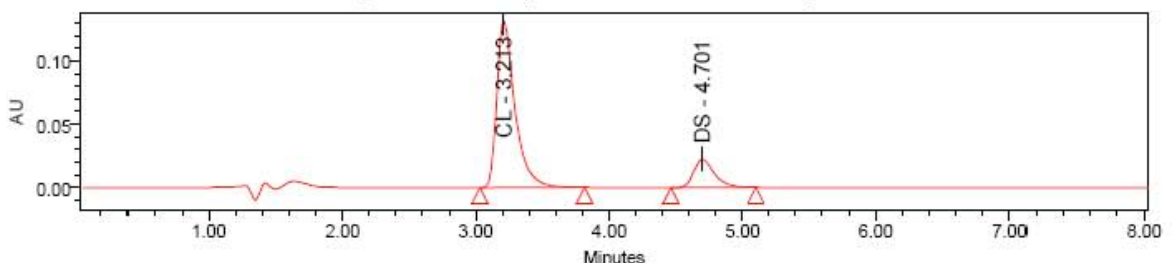
Cromatogramas de la reproducibilidad del método para DS



Cromatogramas de la reproducibilidad del método para DS



Cromatogramas de la reproducibilidad del método para DS



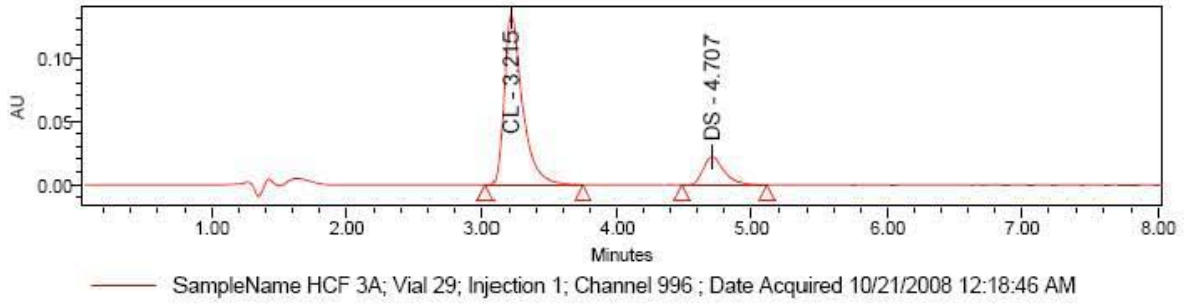


ANEXO 7. Reproducibilidad del método para DS

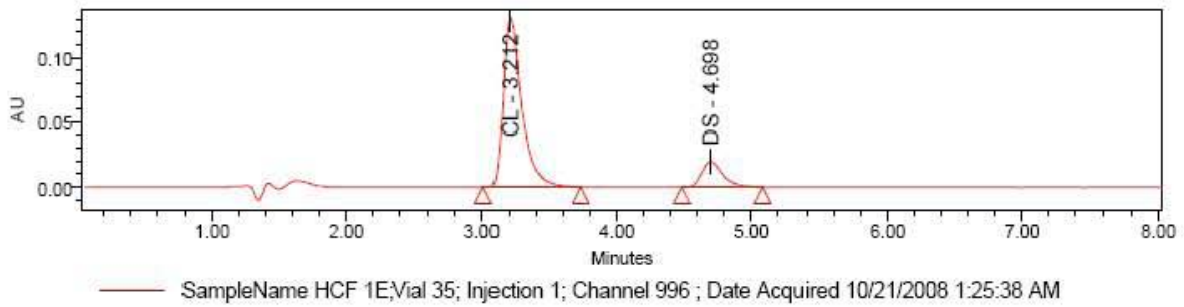
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C-4
Unidad Multidisciplinaria de Investigación
Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (L-5)



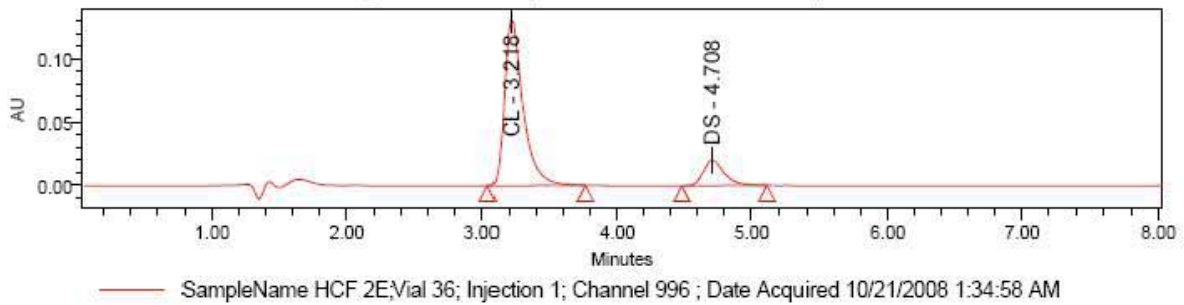
Cromatogramas de la reproducibilidad del método para DS



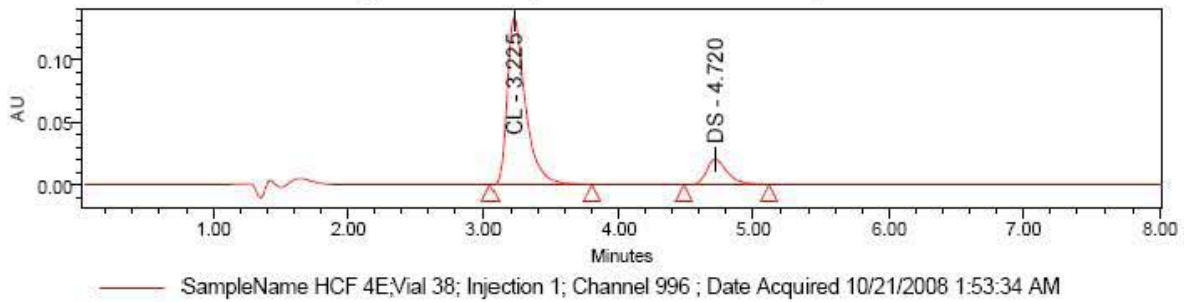
Cromatogramas de la reproducibilidad del método para DS



Cromatogramas de la reproducibilidad del método para DS



Cromatogramas de la reproducibilidad del método para DS



8. Referencias

1. APVMA, *Guidelines for the validation of analytical methods for active constituent, agricultural en veterinary chemical products*. Octubre, 2004. pp. 7.
2. Bábic, S. Horvat, A. *Determination of pK_a values of active pharmaceutical ingredients*. Trends in Analytical Chemistry, Vol.26, No. 11, 2007. pp. 1043 – 1060.
3. Balderrama, S. *Influencia de la dieta en la biodisponibilidad de un producto comercial de clonixinato de lisina*. Departamento de Farmacia. 2002.
4. Bautista, H. *Desarrollo y validación de la metodología analítica para la cuantificación de clonixinato de lisina en diferentes formas farmacéuticas*. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. 1998.
5. Bica, A; Farinha A. *Determination of clonixin in plasma and urine by reversed-phase HPLC*. Journal of Chromatography A, Vol. 889, 2000. pp. 135 – 141.
6. Carlucci, G, D'archivio A. *Investigation of retention behavior of non-steroidal anti-inflammatory drug in HPLC by using quantitative structure-retention relationships*. Analytica Chemica Acta 601, 2007. pp. 68 – 76.
7. Clarke's Analysis of drugs and poisons 2004, M.D.O. Anthony C Moffat, Brian Widdop, Laurent Y Galichet; Editor 2004, Pharmaceutical press.
8. CNQFB, Comisión de validación de métodos analíticos. Guía de validación de métodos analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C. Ed. 2002.
9. Di Girolamo, G; Franchi, A. *Acción de los anti-inflamatoria no esteroideos sobre la actividad lipogenasa y ciclooxigenasa colónica de pacientes con neoplasia de colon*. Medicina, Vol. 61, No. 5/1, 2001. pp. 556 – 572,

10. FDA, ICH. *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1), in International Conference of Harmonization*. ICH Harmonized tripartite guideline. 2005,
11. FDA, ICH. *Guidance for industry. Q1A (R2) Stability Testing of New Drug Substances and products*. Noviembre 2003. pp. 2 – 16.
12. FDA, ICH. *Guidance for Industry. Q2 Validation of Analytical Procedures y Q2B Validation of analytical procedures: Methodology*. June 2005. pp. 2– 12.
13. Fele, L; Jazbin, A. *Solubility of sodium diclofenac in different solvents*. Fluid Phase Equilibria Vol. 261, 2007. pp. 140–145.
14. Franci, A; Di Girolamo, G. *Accion diferencial de los antiinflamatorios no esteroideos sobre la ciclooxigenasa y lipogenasa de vesícula biliar humana*. Medicina. Vol. 60, No. 5/1, 2000. pp. 580 – 586
15. Gaudiano, L; Valvo, P. *RP-HPLC study of the degradation of diclofenac and piroxicam in the presence of hydroxyl radicals*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Vol. 32, 2003. pp. 151 – 158.
16. Giglio, N; Altchek, J. *Farmacocinética del Clonixinato de lisina en pacientes pediátricos*. Arch.argent.pediatric. Vol. 99 No. 5 2001.
17. <http://en.wikipedia.org/wiki/Cross-validation>
18. http://es.wikipedia.org/wiki/Cromatografía_líquida_de_alta_eficacia
19. <http://www.autonlab.org/tutorials/overfit.html>
20. <http://www.ministeriodesalud.go.cr/protocolos/quiavalidacionmetodosanaliticos.pdf>
21. <http://www.pharmweb.net/forum/0068/1997/msg00004.html>
22. Ermer, J. *Methods Validation in Pharmaceutical Analysis*, Wiley-VCH, Weinheim. Ed. 2005
23. Lung, G; *HPLC methods for pharmaceutical analysis*. Ed. W. interscience. Vol. 2 y 3. 2000.

24. Morano, Cinthya; Fuentes, I. *HPLC method for quantification of lysine clonixinate in human plasma, using ultraviolet detection*. Facultad de Química, UNAM. 1998.
25. Müller, C; Haas, S. *Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas*. Facultad de Farmácia, Universidad de Federal do Rio. 2004.
26. Pineros, I. *Extraction and LC determination of lysine clonixinate salt in water / oil microemulsions*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Vol. 27. 2002. pp. 747-754.
27. Quatrocchi, O; Abelaira, S; Laba, R. *Introducción a la HPLC (Aplicación y Práctica)*. ed. Artes gráficas Farro, 1992.
28. Rosenstein Ster Emilio. *Diccionario de especialidades farmacéuticas*. Ed. 28
29. Sanders, D; Smidt, R. *Statistics (A first course)*. Ed. 6^{ta}, ed. McGraw-Hill, 2000.
30. Thompson, M. *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis*. Pure Appl. Chem., Vol. 74, No. 5. 2002. pp. 835-855.
31. Unites states pharmacopeical convention. *USP 30 Farmacopea de los Estados Unidos, edición en español*, Ed. C. Press. Vol. 1. 2007.
32. Wood, R. *How to validate analytical methods*. Trends in analytical chemistry. Vol 18, No. 9 - 10, 1999.
33. Wieling, J. *Rational experimental design for bioanalytical methods validation*. Journal of Chromatography A, Vol. 730, 1996. pp 381 – 394.

Υ Ω 

Α τ8 χη ν7νκα μ3 Ηαζ δ3ξαδ9 υ Ηαβιτασ δεντρ9 δε μ8

Πα_ρα χε ν7νκα σα_λυ_ας α λα λμζ

π9ρ 3λ β8εν δελ μμνδ9 εν ελ χε Ηο6 εξιστ9

υ π9ρ ελ μί9 πρ9π89;

σ3 χε σ8εμπρ3 3σταρεμ9ς ξμντος 3ν μν δ3λικάδ9 ε1ιλιβ4ιο

3ντ4ε ελ μαλ υ 3λ β83ν

Ηας5α 3λ φ8ναλ δ3 λ9ς δ7ας...

Atte: HCF