



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR CLAR, PARA LA
VALORACIÓN DE UN ANTIINFLAMATORIO DE TIPO CORTICOSTEROIDE Y
CUANTIFICACIÓN DE SUS IMPUREZAS EN UN UNGÜENTO COMO FORMA
FARMACÉUTICA”

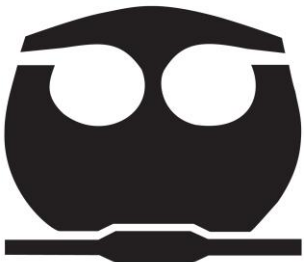
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO

PRESENTA:

ZYANYA ELIZABETH HERNÁNDEZ CALDERÓN



MEXICO, D.F

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Francisco Rojo Callejas

VOCAL: José de Jesús García Valdez

SECRETARIO: Omar Amador Muñoz

1er. SUPLENTE: Gloria García Ramírez

2° SUPLENTE: Silvia Citlalli Gama González

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Desarrollo Analítico y Estabilidades, Mexico Pharmaceutical Development Laboratory (MPDL), MSD.

ASESOR DEL TEMA: Omar Amador Muñoz

ASESOR TECNICO: Ramiro Rojas Hernández.

SUSTENTANTE: Zyanya Elizabeth Hernández Calderón.

Dedicatoria

A mis padres Elizabeth Calderón Medina y Carlos Hernández Castillo por su esfuerzo y lucha constante para mantener y proteger nuestra familia, nuestros valores y nuestra fe. Este trabajo no existiría sin su amor, comprensión, apoyo, constancia, regaños y un sinfín más de palabras que engloban cuanto me han brindado. Los amo profundamente.

A mi hermano Carlos Hernández Calderón por ser mi mejor amigo hoy y siempre. Nunca olvides cuán grande e incondicional es mi amor para ti.

A mi tío Marco Aurelio Calderón Medina por enseñarme a amar la ciencia, a buscar el conocimiento y atesorarlo, a soñar más y mejor. A veces pienso si yo pude enseñarte algo, porque tú me lo enseñaste todo.

A mis tías y tíos, Josefina, Pilar, Edith, José Luis, Manuel y Guillermo por su apoyo y su amor a lo largo de mi vida. Un agradecimiento especial a mi tía Roció por ser la unión de la familia, por su temple, su coraje y sus ganas de vivir, tu partida ha dejado un hueco que jamás podrá ser llenado.

A mis primos, Omar y Diego, por hacerme reír y llorar, por protegerme, por quererme siempre. A mi prima Andrea por ser mi hermana durante 14 años, por los juegos que jugamos y las palabras que nos dijimos, por los buenos y los malos ratos, porque el día que te fuiste perdí a mi mejor amiga y porque hoy a pesar de los años, te extraño y te amo tanto como aquel día.

A Ricardo Camacho, él, todos los adjetivos del mundo era él.

A ti Tonatiuh Chavira Ramírez (Hagrid), por amarme incondicionalmente, por aceptarme tal cual soy y por compartir tu vida conmigo. Un amigo para el fin del mundo, ese eres tú.

A mis amigos y compañeros de vida, Saverio Meoli, Karim Franco, Gabriela Zepeda, Yazmin Cruz, Marisol Monroy, Gabriela Gil, Tania Soto.

Agradecimientos

A mi asesor, el Dr. Omar Amador Muñoz, por su infinita comprensión y dedicación en la realización de esta tesis. Gracias por confiar en mí y por alentarme a mejorar en todos los aspectos.

A mi asesor técnico Ramiro Rojas Hernández por darme un trabajo, un tema para mi tesis y más importante aún, su amistad. Siempre podrás contar conmigo y con mis galletas.

A mis compañeros y amigos en MPDL, Delia, Jorge, Paola, Mireya, David, Sandra, Leticia, Juan, Armando, Joaly, Pepe, Armando, Alma, Tony y Mara por enseñarme a ser profesional, a ser responsable y a reconocer mis errores y virtudes, un agradecimiento especial a Norma Escobedo y Beatriz Blancas que se quemaron las manos junto a mí para poder realizar este trabajo y a Víctor Cruz, Lizeth Olivares, Oscar Alfaro y Norma Gutiérrez por enseñarme que el trabajo también puede ser divertido y por todas esas cervezas, risas y juegos de cubilete compartidos. También agradezco el apoyo y amistad de mis compañeros becarios, Nefi, Angie, Belén, Oscar, Jocelyn, Maribel y Marisol, fue un honor aprender a equivocarse junto a ustedes.

A mis maestros a lo largo de mi vida por sus enseñanzas y aliento.

A la UNAM, institución que me forjó como profesionista y a la Facultad de Química donde aprendí a amar la ciencia.

Lo más bello que podemos experimentar es el lado misterioso de la vida; es el sentimiento profundo que se encuentra en la cuna del arte y de la ciencia verdadera.

Albert Einstein.

CONTENIDO

RESUMEN.....	17
1.0 MARCO TEORICO.....	18
1.1 Medicamento.....	18
1.2 Excipiente.....	18
1.3 Ungüento.....	18
1.3.1 Tipo de bases.....	18
1.3.2 Preparación del ungüento.....	20
1.3.2.1 Método de incorporación.....	20
1.3.2.2 Método de fusión.....	20
1.3.2.3 Enfriamiento y Acondicionamiento.....	21
1.4 Principio Activo.....	22
1.4.1 Esteroides.....	22
1.4.1.1 Corticosteroides.....	23
1.4.1.2 Principio Activo 1 (API 1).....	24
1.4.2 Antibiótico.....	25
1.4.2.1 Principio Activo 2 (API 2).....	25
1.4.3 Anti fúngico.....	26
1.4.3.1 Principio Activo 3 (API 3).....	26
1.5 Productos de Degradación e impurezas identificadas.....	27
1.6 Estabilidad de un medicamento.....	27
1.7 Tipos de descomposición de un fármaco.....	27

1.8 Desarrollo de un método analítico.....	29
1.9 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).....	30
1.9.1 Cromatografía de fase inversa.....	31
1.10 Cromatograma.....	32
1.11 Parámetros cromatográficos.....	32
1.11.1 Selectividad (Factor de separación).....	32
1.11.2 Factor de capacidad (retención).....	33
1.11.3 Eficiencia.....	34
1.11.4 Resolución (R).....	34
1.12 Preparación de la muestra.....	36
1.13 Calificación del sistema instrumental.....	36
1.14 Validación.....	36
1.14.1 Exactitud.....	36
1.14.2 Precisión.....	37
1.14.3 Linealidad.....	38
1.14.4 Rango.....	41
1.14.5 Especificidad.....	41
1.14.6 Robustez.....	42
1.14.7 Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).....	43
2.0 OBJETIVOS.....	46
2.1 Objetivo General.....	46

2.2 Objetivos Específicos.....	46
3.0 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	47
3.1 Diseño Experimental.....	47
3.2 Calificación del sistema de CLAR.....	48
3.2.1 Identificación cualitativa de los principios activos.....	48
3.2.2 Evaluación de la proporción de fase orgánica en la fase móvil.....	49
3.2.3 Evaluación de la proporción de fase acuosa en la fase móvil.....	50
3.2.4 Evaluación del valor de pH en la disolución amortiguadora.....	52
3.2.5 Determinación de la máxima longitud de onda de los activos.....	53
3.2.6 Optimización del sistema cromatográfico para la cuantificación del API 1 y sus productos de degradación e impurezas.....	56
3.3 Preparación de muestras y estándares.....	59
3.3.1 Preparación de la muestra.....	59
3.3.2 Preparación de las disoluciones estándar del API 1.....	59
3.3.3 Preparación de la disolución del estándar de API 1 al límite de reporte (LR).....	59
3.3.4 Preparación de las disoluciones estándar de impurezas del API 1.....	59
3.3.5 Preparación de la disolución de resolución.....	60
3.3.6 Preparación de fases móviles.....	60
3.3.7 Preparación de las disoluciones primarias del estándar del API 1 (DP) para el cálculo del LC y LD.....	60
3.3.8 Preparación de las muestras para la evaluación de la linealidad.....	61
3.3.9 Preparación de las muestras para la evaluación de la precisión del sistema.....	62

3.3.10 Preparación de las muestras para la evaluación de la precisión al límite de cuantificación.....	62
3.3.11 Preparación de las muestras para la evaluación de la exactitud del método.....	62
3.3.12 Preparación de las muestras para la evaluación de la exactitud del método al límite de cuantificación.....	63
3.3.13 Preparación de las muestras para la evaluación de la especificidad.....	64
3.3.13.1 Preparación de las disoluciones de productos de degradación e impurezas del API 1 para la evaluación de la especificidad.....	64
3.3.14 Preparación de las muestras para la evaluación de la precisión en el nivel de repetibilidad.....	64
3.3.15 Preparación de las muestras para la evaluación de la precisión intermedia.....	64
3.3.16 Preparación de las muestras para la evaluación de la robustez.....	65
3.4 Calificación del CLAR.....	65
3.4.1 Condiciones finales del análisis por CLAR.....	66
3.5 Análisis cualitativo por CLAR.....	66
3.6 Análisis cuantitativo.....	67
3.6.1 Evaluación del factor respuesta en la disolución estándar.....	67
3.6.2 Cuantificación del API 1.....	67
3.6.3 Cuantificación de impurezas (productos de degradación).....	68
3.7 Metodología para la evaluación de los parámetros de validación.....	69
3.7.1 Linealidad del sistema.....	69
3.7.2 Límites de cuantificación y detección (LD) y (LD).....	70
3.7.3 Precisión del sistema.....	72

3.7.4 Precisión del sistema al límite de cuantificación.....	72
3.7.5 Exactitud del método (placebo adicionado).....	72
3.7.6 Exactitud del método (placebo adicionado) al límite de cuantificación.....	74
3.7.7 Especificidad.....	75
3.7.8 Precisión del método (repetibilidad).....	75
3.7.9 Precisión del método (precisión intermedia).....	75
3.7.10 Robustez.....	76
4.0 RESULTADOS Y DISCUSION.....	78
4.1 Análisis cualitativo.....	78
4.2 Análisis cuantitativo.....	80
4.2.1 Linealidad.....	80
4.2.2 Límites de cuantificación y detección.....	82
4.2.3 Precisión del sistema analítico.....	85
4.2.3.1 Precisión al límite de cuantificación.....	87
4.2.3.2 Precisión del método (repetibilidad).....	88
4.2.3.3 Precisión intermedia del método.....	89
4.2.4 Exactitud.....	90
4.2.4.1 Exactitud al límite de cuantificación.....	92
4.2.5 Especificidad.....	95
4.2.6 Robustez.....	101

5.0 CONCLUSIONES.....	105
6.0 RECOMENDACIONES.....	106
7.0 ANEXOS.....	107
8.0 BIBLIOGRAFIA.....	109

INDICE DE TABLAS

I. Propiedades de bases utilizadas en la preparación de ungüentos.....	19
II. Ejemplos de descomposición por hidrólisis, oxidación y fotólisis de algunos principios activos en medicamentos.....	28
III. Relación entre las variables que se encuentran en la ecuación para el cálculo del factor de retención.....	34
IV. ANOVA para la evaluación de linealidad.....	40
V. Sistema de CLAR para la cuantificación de los 3 activos.....	48
VI. Tiempos de retención (t_R) y valores de simetría para cada API en las diferentes proporciones de fase orgánica evaluadas.....	50
VII. Porcentajes de fase móvil orgánica y acuosa a evaluar en el sistema cromatográfico (% v/v).....	51
VIII. Tiempos de retención (t_R) y valores de simetría para cada API en las diferentes proporciones de fase móvil evaluadas.....	51
IX. Tiempos de retención (t_R) y valores de simetría para cada API en las diferentes proporciones de fase móvil evaluadas.....	52
X. Sistema cromatográfico propuesto para la determinación de los máximos de absorbancia de los activos.....	55
XI. Longitudes de absorbancia máximas para los tres activos.....	55
XII. Sistema cromatográfico propuesto para la determinación de los máximos de absorbancia de los activos.....	57
XIII. Gradiente programado para la fase móvil.....	58
XIV. Gradiente final para el sistema cromatográfico a utilizar para la cuantificación del API 1 y sus productos de degradación.....	59
XV. Preparación de las diluciones para el cálculo del LC y LD.....	62

XVI. Preparación de las muestras para la evaluación de la linealidad.....	62
XVII. Preparación de las muestras para la evaluación de la exactitud del método de API 1 (placebo adicionado).....	63
XVIII. Preparación de las muestras para la evaluación de la exactitud del método de API 1 (placebo adicionado) al límite de cuantificación (LC).....	64
XIX. Información del sistema cromatográfico utilizado.....	67
XX. Parámetros para evaluar la pureza de los picos cromatográficos.....	76
XXI. Variables a evaluar en la Precisión Intermedia del método.....	77
XXII. Variables cromatográficas para evaluar la robustez del método.....	77
XXIII. Identificación de señales para el API 1, con sus tiempos de retención y tiempos de retención relativos.....	80
XXIV. Cálculos previos para obtener F_{cal}	82
XXV. Límite de cuantificación y detección para el API 1.....	83
XXVI. Análisis estadístico LC-LD.....	85
XXVII. Cálculos previos para la precisión del sistema.....	86
XXVIII. Precisión del sistema.....	87
XXIX. Precisión de la medición.....	87
XXX. Precisión del sistema.....	88
XXXI. Precisión de la medición.....	89
XXXII. Repetibilidad del método.....	90
XXXIII. Precisión intermedia del método.....	90
XXXIV. Exactitud del método (placebo adicionado).....	91

XXXV. Datos estadísticos para los datos obtenidos para la evaluación de la exactitud del método y los criterios de aceptación establecidos.....	92
XXXVI. Exactitud del método (placebo adicionado) al LC.....	93
XXXVII. Datos estadísticos para los datos obtenidos para la evaluación de la exactitud del método al LC y los criterios de aceptación establecidos.....	94
XXXVIII. Identificación de señales para el API 1, con sus tiempos de retención y tiempos de retención relativos para la evaluación de la especificidad del método.....	96
XXXIX. Pureza de la señal en una muestra placebo de API 2-API 3 a 40°C + 80°C por una semana.....	98
XL. Pureza de la señal en una muestra de la disolución de resolución.....	98
XLI. Pureza de la señal en una muestra de materia prima del API 1.....	99
XLII. Pureza de la señal en una muestra de la disolución de resolución.....	100
XLIII. Resultados de robustez para la disolución de resolución con un cambio de columna.....	101
XLIV. Resultados de robustez para la disolución de resolución con un cambio de pH.....	102
XLV. Resultados de robustez para la disolución de resolución con un cambio de la temperatura de la columna.....	102
XLVI. Resultados de robustez para la disolución de resolución con un cambio en la velocidad de flujo.....	102
XLVII. Resultados de robustez para la disolución de resolución con un cambio en la concentración de la fase acuosa.....	103

INDICE DE FIGURAS

1. Esquema de preparación de un ungüento que contiene una fase oleosa y una acuosa.....	21
2. Esqueleto de los esteroides y del colesterol.....	22
3. Vía de estimulación de la fosfolipasa A2 que provoca la inflamación de la membrana celular.....	23
4. Fórmula estructural del principio activo 1 (API 1).....	24
5. Fórmula estructural del principio activo 2 (API 2).....	25
6. Formula estructural del Principio activo 3 (API 3).....	26
7. Cromatogramas que muestran al medicamento Atorvastin (AT) y sus degradaciones bajo diferentes condiciones hidrolíticas.....	29
8. Sistema típico de cromatografía de líquidos de alta resolución.....	31
9. Cromatógrama que muestra la separación de dos compuestos.....	32
10. Grafica que muestra el efecto del aumento en la selectividad, eficiencia y retención en la resolución cromatográfica.....	35
11. Prueba de significación empleada para estimar el límite de detección.....	44
12. Cromatograma de un estándar combinado.....	49
13. Cromatogramas de un estándar combinado API 1 (1) 0.05, API 2 (2) 1.0 y API 3 (3) 0.56 mg g ⁻¹ . Porcentaje Agua: ACN en fase móvil A: 20:70, B: 35:55, C: 50:40 % v/v.....	49
14. Cromatograma de un estándar combinado API 1 (1) 0.05, API 2 (2) 1.0 y API 3 (3) 0.56 mg g ⁻¹ , que muestra los cambios de los tiempos de retención de los activos debido al cambio de proporción del amortiguador de acetato de amonio en la fase móvil.....	51
15. Cromatogramas de un estándar combinado API 1 (1) 0.05, API 2 (2) 1.0 y API 3 (3) 0.56 mgg ⁻¹ que muestra los cambios de pH en la fase móvil. A) pH = 2.9, B) pH = 3.9, C) pH = 4.9.....	53

16. Cromatograma de una muestra que contenía los 3 API's obtenido con un detector de arreglo de diodos.....	55
17. Barrido espectral de los tres activos, en donde se muestran las longitudes de onda máximas para cada uno.....	55
18. Representación gráfica de las curvas de gradiente disponibles.....	57
19. Cromatograma de una inyección de producto terminado estresado (40 ° C / 75 % humedad relativa (H.R) por 1 mes) con el gradiente descrito en la tabla XIII.....	58
20. Cromatograma tipo para el método de cuantificación del API 1 y sus productos de degradación.....	78
21. Curva de calibración del método.....	80
22. Grafica de la exactitud del método.....	92
23. Grafica de la exactitud del método al LC.....	95
24. Cromatograma tipo para la especificidad del API 1 y sus productos de degradación.....	96
25. Cromatograma para la pureza de pico en una muestra de placebo total.....	97
26. Cromatograma para la pureza de pico en una muestra de placebo de API 2-API 3 a 40°C/75%HR por 28 días.....	97
27. Cromatograma para la pureza de pico en una muestra de disolución de resolución.....	98
28. Cromatograma para la pureza de pico en una muestra de materia prima del API 1.....	99
29. Cromatograma para la pureza de pico en una muestra de producto terminado.....	101

RESUMEN

El desarrollo de un fármaco nuevo, conlleva el desarrollo paralelo de un método analítico para asegurar la calidad del producto su revisión, aprobación y comercialización. Un método analítico debe validarse cuando se desea confirmar que sus parámetros de desempeño son adecuados para el uso pretendido.

El objetivo de este trabajo fue validar un método analítico para la valoración y la cuantificación de un corticosteroide, así como sus productos de degradación e impurezas en un nuevo medicamento de tipo tópico. El método desarrollado debió ser indicativo de estabilidad para monitorear el comportamiento del activo en la forma farmacéutica durante su almacenamiento bajo condiciones de estrés. Para ello se utilizó la técnica de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAR). Se optimizaron las condiciones cromatográficas para el análisis del corticosteroide y se evaluaron los siguientes parámetros de validación: linealidad, límites de detección y de cuantificación, exactitud, precisión, especificidad y robustez.

Se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson de 0.99997 en la prueba de linealidad, límites de detección de 24.27 ng mL^{-1} y de cuantificación de 73.56 ng mL^{-1} . La prueba de exactitud arrojó coeficientes de variación (% CV) menores al 2 % y porcentajes de recobro promedios de 99.7 %, se evaluó la precisión a niveles de repetibilidad y precisión intermedia, también con % CV menores al 2 %. El método resultó ser específico para la cuantificación del corticosteroide y sus productos de degradación e impurezas, además de robusto ya que el cambio de columna, pH y concentración de la fase acuosa, no genera un impacto apreciable en los parámetros cromatográficos evaluados. También se evaluaron la exactitud y precisión del método a la concentración del límite de cuantificación obteniendo % CV menores al 10 % y en el caso de la exactitud al límite de cuantificación porcentajes de recobro promedio de 104.0 %.

Los resultados mostraron que el método es eficiente, sensible y específico para el API 1 y sus productos de degradación e impurezas en el ungüento.

1.0 MARCO TEORICO

1.1 Medicamento

La norma oficial mexicana NOM-O59-SSA1-2013, describe medicamento como "toda sustancia o mezcla de sustancias de origen natural o sintético que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica y se identifique como tal por su actividad farmacológica, características físicas, químicas y biológicas". Hoy en día, la mayoría de las drogas utilizadas son de origen sintético y se comercializan en forma de tabletas, cápsulas, suspensiones, cremas, e inyectables. Estas formulaciones entregan las drogas de manera que sean estables y no tóxicas, asegurando su biodisponibilidad y actividad terapéutica (Nageswara 2003)

1.2 Excipiente

La norma también describe excipiente o aditivo como "toda sustancia que se incluya en la formulación de los medicamentos y que actúe como vehículo, conservador o modificador de algunas de sus características para favorecer su seguridad, estabilidad y apariencia."

1.3 Ungüento

La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) en su séptima edición, define ungüento como una preparación de consistencia blanda que contiene el o los principios activos y aditivos incorporados a una base apropiada que le proporciona la masa y la consistencia. Se adhieren y se aplican en piel y mucosas. Estas bases pueden ser liposolubles o hidrosolubles; generalmente son anhidras o presentan un máximo de agua del 20 %. También se denomina ungüento hidrofílico cuando contiene una base lavable o removible con agua. Las bases que se utilizan como vehículo para los ungüentos, pueden clasificarse en 5 tipos: oleaginosas, absorbentes, de emulsión acuosa/oleosa (w/o, por sus siglas en inglés), de emulsión oleosa/acuosa (o/w, por sus siglas en inglés) e hidrosolubles.

1.3.1 Tipos de bases

La elección de base para un ungüento depende de la acción que se desee obtener, las características del o los principios activos, y la biodisponibilidad de éstos, es decir, si se desea obtener una acción sistémica. La tabla 1, resume las propiedades que presenta cada base y provee ejemplos de cada una de ellas.

Tabla I. Propiedades de bases utilizadas en la preparación de ungüentos
(Copyright© 1996-2013, Laboratorio de Cuidados Farmacéuticos, UNC, Escuela de Farmacia Eshelman)

	Bases oleaginosas	Bases absorbentes	Bases de emulsión w/o	Bases de emulsión o/w	Bases hidrosolubles
Composición	compuestos oleaginosos	bases oleaginosas + surfactantes w/o	bases oleaginosas + agua (< 45 % P/P) + surfactante w/o (BHL ≤ 8)	bases oleaginosas + agua (> 45 % P/P) + surfactante o/w (BHL ≥ 9)	Glicoles de Polietileno (PEGs)
Contenido de agua	anhidro	anhidro	hidratado	hidratado	anhidro / hidratado
Afinidad por agua	hidrofóbico	hidrofilico	hidrofilico	hidrofilico	hidrofilico
Untabilidad	difícil	difícil	moderado a fácil	fácil	moderado a fácil
Lavabilidad	no lavable	no lavable	no lavable o escasamente lavable	lavable	lavable
Estabilidad	con aceites muy pobre ; mejora con hidrocarburos	con aceites muy pobre ; mejora con hidrocarburos	inestable, especialmente con jabones alcalinos y coloides naturales	inestable, especialmente con jabones alcalinos y coloides naturales ; mejora con surfactantes no iónicos	estable
Potencial para la incorporación de principio activo	sólidos o aceites (liposolubles)	sólidos, aceites y soluciones acuosas (pequeñas cantidades)	sólidos, aceites y soluciones acuosas (pequeñas cantidades)	sólidos, aceites y soluciones acuosas (pequeñas cantidades)	sólidos y soluciones acuosas
Oclusividad	si	si	Algunas veces	no	no
Usos	protectores, emolientes (+/-), vehículo para principios activos hidrolizables	protectores, emolientes (+/-), vehículo para soluciones acuosas, sólidos y principios activos hidrolizables	emolientes, cremas de limpieza, vehículo para principios activos sólidos, líquidos y no hidrolizables	emolientes, vehículos para principios activos sólidos, líquidos y no hidrolizables	vehículo para principio activo
Ejemplos	Petrolato blanco, ungüento blanco	Petrolato hidrofílico, lanolina hidratada, Aquabase™, Aquaphor®, Polysorb®	tipo de crema fría, lanolina hidratada, ungüento de agua de rosas, Hydrocream™, Eucerin®, Nivea®	Ungüento hidrofílico, Dermabase™, Velvachol®, Unibase®	Ungüento PEG, Polybase™
w/o= emulsión acuosa/oleosa o/w= emulsión oleosa/acuosa BHL=Balance Hidrófilo-Lipófilo % P/P= Porcentaje peso a peso (indica el peso de soluto por cada 100 unidades de peso de la disolución)					

1.3.2 Preparación del ungüento

La preparación del ungüento generalmente se realiza por alguno de los métodos conocidos como: incorporación o fusión. El objetivo final de ambos es disolver el principio activo uniformemente a través del vehículo (base). La elección del método de preparación debe basarse en la naturaleza de los ingredientes.

1.3.2.1 Método de incorporación

En este método se incorporan uno a uno los ingredientes en el vehículo (base). Cuando se añade un sólido, se debe cuidar que el tamaño de partícula de éste, sea lo más pequeña posible. Los sólidos pueden ser reducidos por levigación. La levigación es un proceso que reduce una sustancia a un estado sumamente fino por medio de frotación de esta sustancia en un mortero con ayuda de un pistilo o espátulas sobre una losa. El ingrediente puede ser levigado utilizando un volumen pequeño de la base, hasta la formación de una pasta suave y libre de grumos, que se diluye con la base restante. Este procedimiento es útil con petrolato o bases oleaginosas en general.

Grandes cantidades de ungüento deben ser preparadas en mezcladores mecánicos. Un molino de rodillos reemplazará las espátulas o pistilo utilizados en el proceso de levigación para asegurar una consistencia uniforme y la homogeneidad de todos los ingredientes.

1.3.2.2 Método de fusión

Este método se utiliza para incorporar ingredientes sólidos que por su naturaleza, se necesitan calentar para mezclarlos junto con la base elegida, las ceras, son un ejemplo de este tipo de sólidos. Normalmente, todos los ingredientes se combinan, derriten y enfrían con agitación constante hasta que ocurra una solidificación y se obtenga una mezcla homogénea.

En el caso de tener una fase oleosa y una fase acuosa, es recomendable calentar la fase acuosa unos cuantos grados más que la fase oleosa, antes de mezclarlas. Esto se debe a que la fase acuosa, tiende a enfriarse más rápido y podría causar una solidificación prematura de algunos ingredientes. Sin embargo, el calentamiento debe usar la temperatura mínima requerida y en el menor tiempo posible, minimizando así, la pérdida de agua por evaporación. El proceso de fabricación de un ungüento con estas características (como el utilizado en este trabajo), se representa en la figura 1.

En el caso de componentes múltiples, se debe calentar en principio el que tenga la temperatura de fusión más alta, se baja la temperatura gradualmente, para añadir el componente con el siguiente punto de fusión más alto, se continúa, hasta que todos los componentes hayan sido añadidos a la mezcla, con ello se asegura que los componentes se expongan a la más baja temperatura posible, mejorando así la estabilidad del producto terminado.

1.3.2.3 Enfriamiento y Acondicionamiento

El paso de enfriamiento al preparar un ungüento es de suma importancia. El proceso no debe ser acelerado, por ejemplo, utilizando agua o hielo. Esto cambiaría la consistencia del producto terminado, haciéndolo más duro de lo deseado. Muchas de las bases empleadas en la preparación de ungüentos logran su consistencia y textura final varias horas después de ser fabricadas. Una vez, que el medicamento ha sido preparado, necesita pasar por una serie de operaciones, conocidas como “acondicionamiento”, de esta manera el medicamento llega al paciente en condiciones óptimas de estabilidad, seguridad y eficacia. El acondicionamiento de un medicamento cumple esencialmente con dos funciones:

- ✓ La protección del producto terminado frente a agentes externos de tipo mecánico, ambiental biológico, etc., además de garantizar su inviolabilidad (envasándolo ya sea en un blíster, frasco, ampolleta o tubo).
- ✓ Proporciona identificación e información del producto tanto al paciente como al personal sanitario.

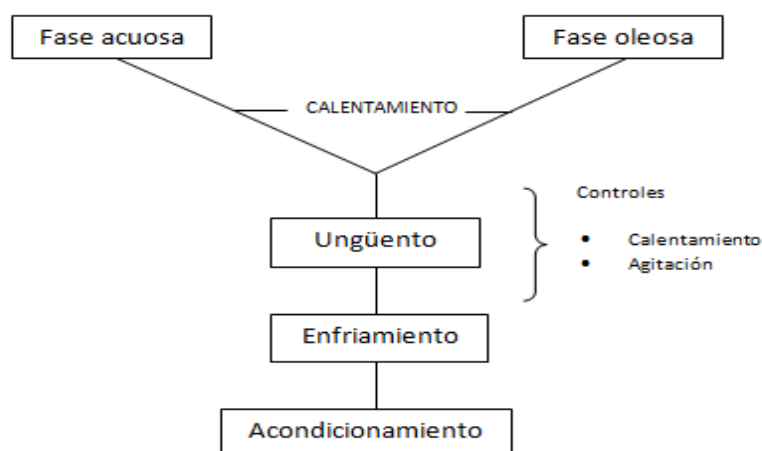


Figura 1. Esquema de preparación de un ungüento que contiene una fase oleosa y una acuosa.

1.4 Principio Activo

La norma oficial mexicana NOM-O59-SSA1-2013, describe principio activo como “sustancia natural o sintética que tenga alguna actividad farmacológica y que se identifique por sus propiedades físicas, químicas o acciones biológicas, que no se presenten en forma farmacéutica y que reúna condiciones para ser empleada como medicamento o ingrediente de un medicamento.” En lo que respecta a este trabajo, se utilizó un ungüento con 3 principios activos, cada uno de ellos, con una estructura distinta, perteneciente al grupo de esteroides, antibióticos y anti fúngicos respectivamente.

1.4.1 Esteroides

Los esteroides son moléculas policíclicas, presentes en todas las plantas y animales. Se clasifican como lípidos simples. Presentan en común el esqueleto tetra cíclico del ciclopentanoperhidrofenantreno (figura 2), con una determinada configuración en cada uno de sus centros estereogénicos.

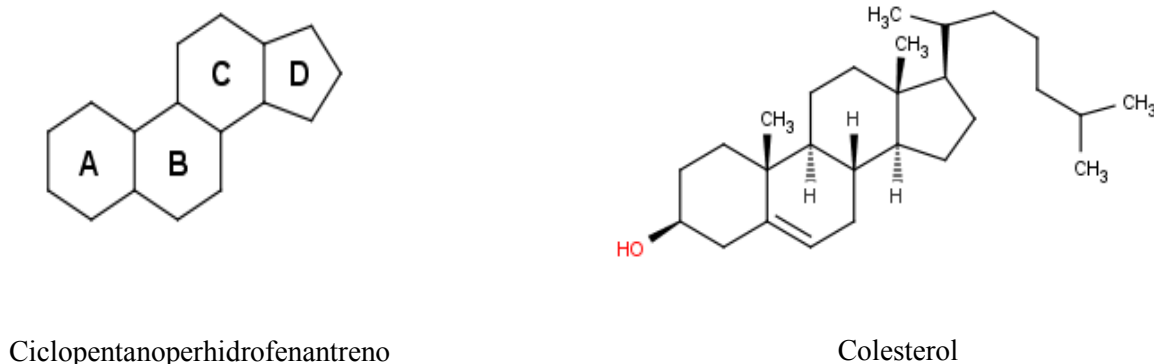


Figura 2. Esqueleto de los esteroides y del colesterol.

La similitud estructural entre las diversas hormonas esteroideas se justifica por su procedencia biosintética a partir del colesterol (Figura 2).

1.4.1.1 Corticosteroides

Los corticosteroides (glucocorticoides) son una familia de esteroides que se utilizan en el tratamiento de una variedad de enfermedades inflamatorias y de tipo inmune. Comprenden un grupo de hormonas

de núcleo esteroideo que se biosintetizan en la corteza suprarrenal. Intervienen en una gran variedad de procesos metabólicos.

Los glucocorticoides son responsables de gran cantidad de efectos fisiológicos, pero se reconocen por sus efectos antiinflamatorios y antialérgicos. Estos dos efectos se derivan de la inhibición de la fosfolipasa A₂, una enzima que interviene en la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana, que sintetiza el ácido araquidónico, éste, es un precursor metabólico de las prostaglandinas y de los leucotrienos (Figura 3).

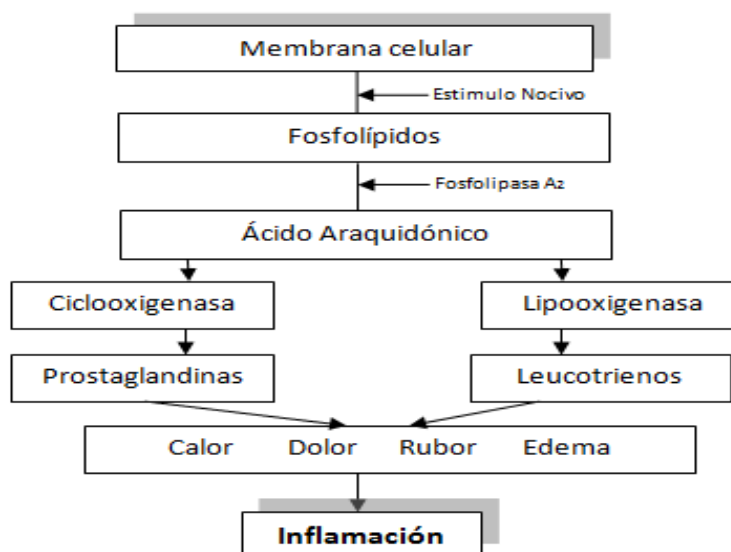


Figura 3. Vía de estimulación de la fosfolipasa A₂ que provoca la inflamación de la membrana celular.

Al quedar inhibida la liberación del ácido araquidónico, las rutas biosintéticas que parten de él, quedan igualmente bloqueadas, lo que se traduce en una disminución tanto de mediadores de la inflamación (prostaglandinas) como de mediadores de procesos anafilácticos (leucotrienos).

1.4.1.2 Principio activo 1 (API 1)

El compuesto (11β, 16α)-9,21-dicloro-11-hidroxi-16-metil-3,20-dioxopregna-1,4-dien-17-il-2-furoato (figura 4), es un corticosteroide sintético, que presenta actividad antiinflamatoria, con la fórmula empírica C₂₇H₃₀Cl₂O₆ y peso molecular de 521.4 g mol⁻¹.

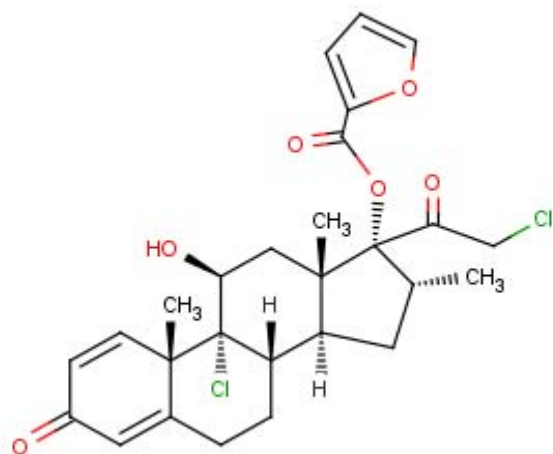


Figura 4. Fórmula estructural del principio activo 1 (API 1)

Es un polvo blanco. Tiene un punto de fusión de 220 °C. Es insoluble en agua, muy soluble en acetona y cloruro de metileno y poco soluble en alcoholes. La constante de disociación ácida, pKa, del API 1 es 13.08 ± 0.20 , esta constante define que tanto se ioniza la molécula y nos ayuda a predecir su comportamiento químico y biológico. El Log P del API 1 tiene un valor de 4.725 ± 0.523 . Este coeficiente nos ayuda a estimar la absorción, la distribución y el transporte de potencial de una molécula en sistemas biológicos. Moléculas que presentan valores de Log P, entre 2 y 3, han demostrado tener una absorción cutánea óptima (Purdon 2001).

En términos clínicos, el API 1, es un corticosteroide sintético de potencia alta con propiedades anti-inflamatorias, antipruríticas y vasoconstrictoras. Se utiliza tópicamente para aliviar las manifestaciones pruríticas e inflamatorias de algunas dermatosis que responden a los corticoides. Intranasalmente, se utiliza para aliviar los síntomas de la rinitis alérgica y en el tratamiento del asma.

1.4.2 Antibiótico

Los antibióticos son moléculas que matan o impiden el crecimiento de microorganismos, incluidas las bacterias y los hongos. Los antibióticos que matan bacterias se llaman bactericidas y los que impiden su crecimiento, se conocen como bacteriostáticos.

1.4.2.1 Principio activo 2 (API 2)

2-[(1S,2S,5R,6S,7S,10S,11S,13S,14Z,15R,17R) -13- (acetiloxi) -5,17 - dihidroxi-2,6,10,11-tetrametiltetraciclo[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}] heptadecan-14-iliden]-6-metilhept-5-enoic (figura 5), es un antibiótico con una estructura molecular similar a la de los esteroides, pero sin poseer ninguna actividad esteroidea, con fórmula molecular $C_{31}H_{48}O_6$ y peso molecular de 516.7 g mol^{-1} .

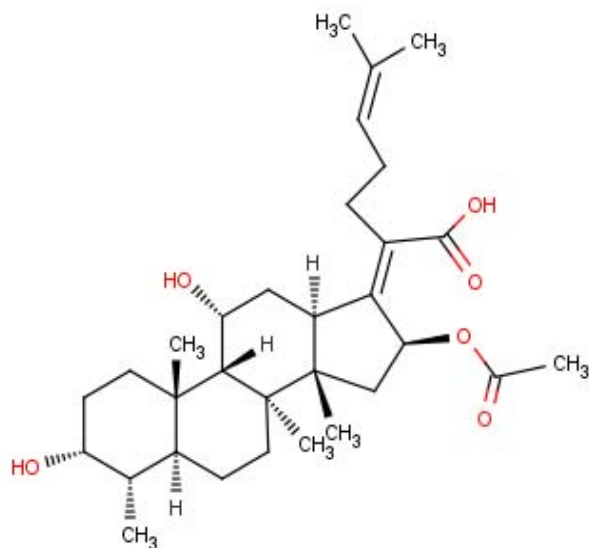


Figura 5. Fórmula estructural del principio activo 2 (API 2)

Es un polvo blanco, con un punto de fusión de 192.5°C . El API 2 es un ácido débil con un pKa de 5.7. Por sí mismo, es poco soluble en agua, sin embargo su sal de sodio es muy soluble en agua. El Log P es 6.71.

Es efectivo contra bacterias gram-positiva incluyendo especies de *Staphylococcus* y *Corynebacterium*. Este activo inhibe la replicación bacteriana, es decir sólo es un "bacteriostático". Debido a su estructura de "tipo esteroide", no se presentan casos de alergias con este antibiótico, por lo que suele utilizarse en muchos casos donde otros antibióticos están contraindicados, por ejemplo en pacientes alérgicos a la penicilina u otros antibióticos y en pacientes con insuficiencia renal. Tópicamente se utiliza para el tratamiento de infecciones de la piel y tejido suave con baja a moderada severidad, como la furunculosis, eritemas, foliculitis, abscesos y heridas infectadas.

1.4.3 Anti fúngico

Un anti fúngico o antimicótico puede ser cualquier sustancia capaz de producir una alteración de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped.

1.4.3.1 Principio Activo 3 (API 3)

N-[(2E)-6,6—dimetil-2-hepten-4-inil]-N-metil-1-naftalenmetanamina (figura 6), es un anti fúngico sintético, con la fórmula empírica $C_{21}H_{26}ClN$ con peso molecular de $327.90 \text{ g mol}^{-1}$.

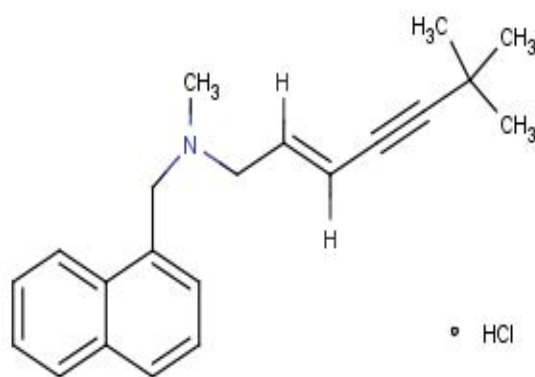


Figura 6. Fórmula estructural del Principio activo 3 (API 3)

Es un polvo cristalino fino blanco, con punto de fusión de 195°C . Es soluble en metanol y cloruro de metileno, soluble en etanol, y ligeramente soluble en agua. Su valor de pKa es de 7.10. Su valor de Log P es 5.9. Ya que esta molécula es altamente lipofílica tiende a acumularse en la piel, uñas y tejidos grasos, se usa para tratar las infecciones fúngicas de las uñas de los pies y de las manos.

1.5 Productos de degradación e impurezas identificadas

La ICH (la Conferencia de Armonización Internacional de Requerimientos Técnicos para el Registro de Farmacéuticos para uso Humano por sus siglas en inglés), define producto de degradación como: “una impureza resultante de un cambio químico en el principio activo ocurrido durante su proceso de

manufactura y/o almacenamiento del nuevo medicamento, por el efecto de luz, temperatura, pH, agua o de alguna reacción con un excipiente y/o el empaque de contención primario”.

También en la Guía para la industria Q3B (R2) “Impurezas en drogas nuevas”, se define impureza como: “cualquier componente del nuevo medicamento que no es el principio activo o un excipiente en el producto”.

1.6 Estabilidad de un medicamento

La estabilidad de un medicamento es el tiempo que transcurre desde la fecha de fabricación y empaquetado, hasta el momento en el que la actividad química y biológica disminuye de un nivel predeterminado de potencia fijada y sus características físicas se modifican apreciablemente o degeneran, esta fecha corresponde a la caducidad del medicamento. El nivel mínimo requerido para que un medicamento se considere estable es del 90 % de la concentración declarada en etiqueta. Todos los medicamentos que se encuentran en el mercado deben tener fecha de caducidad y ésta no debe exceder los 5 años de la fecha de fabricación. La degradación que puede sufrir un medicamento está relacionada directamente con su naturaleza. Los factores que afectan son: tiempo, luz, temperatura, oxígeno y humedad. También pueden influir los excipientes o los aditivos y el propio material de empaque.

El objetivo de los estudios de estabilidad de un medicamento, es proveer evidencia documentada de cómo las características físicas, químicas, fisicoquímicas, microbiológicas y biológicas del medicamento, varían con el tiempo bajo la influencia de factores ambientales; y establecer las condiciones de almacenamiento adecuadas y el periodo de caducidad (NOM-073-SSA1-2005).

1.7 Tipos de descomposición de un fármaco

La descomposición de un medicamento se da más por reacciones con agentes del ambiente, como el agua, el oxígeno o la luz, que por la acción con otros agentes activos. Por lo regular las condiciones de reacción son las ambientales, además de que la duración de éstas se da en el término de meses o años. Hay diferentes tipos de descomposición de un medicamento, las más comunes son:

- Hidrólisis: Una reacción química en la que se rompe un enlace en presencia de agua. La degradación hidrolítica es la más común en los medicamentos debido a los grupos funcionales presentes en éstos.

- Oxidación: Generalmente el oxígeno atmosférico es el responsable de estas reacciones conocidas como auto oxidación. Los mecanismos de reacción son por lo general complejos, involucrando reacciones de iniciación, propagación, y terminación de radicales libres.
- Fotólisis: Estas reacciones se caracterizan por el rompimiento de los enlaces químicos en presencia y a causa de luz radiante.

Tabla II. Ejemplos de descomposición por hidrólisis, oxidación y fotólisis de algunos principios activos en medicamentos (Crowley 2001)

Hidrólisis	Oxidación	Fotólisis
Metildopa	Calcitonina	Rivoflavina
Procaina	Ácido ascórbico	Ácido Fólico
Penicilinas	Isoprenalina	Nifepidina

En la figura 7 se muestra un ejemplo de la descomposición de un medicamento por efecto de la hidrólisis. El Atorvastin (AT) es una molécula usada en el tratamiento de la hipercolesterolemia. Se conduce un estudio de estrés forzado a esta molécula por medio de diferentes condiciones hidrolíticas, como puede verse en los cromatogramas de la figura 7, el AT, presenta una mínima degradación en condiciones de pH neutras y básicas. En cambio en condiciones ácidas, los productos de degradación del AT aumentan claramente.

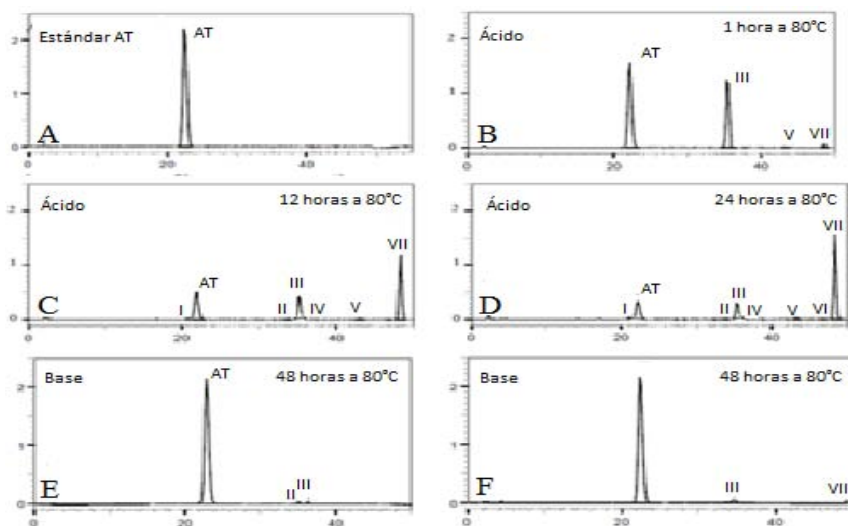


Figura 7. Cromatogramas que muestran al medicamento Atorvastin (AT) y sus degradaciones bajo diferentes condiciones hidrolíticas.

A. Estándar de AT, B. AT en condiciones ácidas por 1 hora a 80 °C, C. AT en condiciones ácidas por 12 horas a 80 °C, D. AT en condiciones ácidas por 24 horas a 80 °C, E. AT en condiciones neutras por 48 horas a 80 °C y F. AT en condiciones básicas por 48 horas a 80 °C.

Un fármaco inevitablemente se descompondrá; es por ello que el estudio de estabilidad de un medicamento debe incluir las pruebas necesarias para sus características dependiendo de la forma farmacéutica. Para cremas y ungüentos los parámetros a evaluar son: concentración del fármaco, características organolépticas, homogeneidad, penetrabilidad y/o viscosidad; y cuando proceda: pH, prueba de eficacia de conservadores y/o valoración de los mismos, tamaño de partícula, pérdida de peso (envase de plástico), esterilidad y prueba de irritabilidad ocular o en piel y límites microbianos.

1.8 Desarrollo de un método analítico

La producción de un medicamento nuevo, involucra, entre otras cosas, la implementación de técnicas de control de calidad para el producto farmacéutico. El primer paso que se debe abordar para el desarrollo de un método analítico es la definición del objetivo del método. En este punto, es importante la integración de un grupo interdisciplinario conformado por químicos analíticos, profesionales de áreas regulatorias, formuladores y personal del área de control químico, que eventualmente serán los encargados de realizar rutinariamente el método analítico desarrollado (Gadkari 2012).

En la industria farmacéutica, existen dos principales categorías en las que podemos clasificar un método analítico:

- Pruebas específicas – Diseñadas para establecer parámetros tales como tamaño de partícula, polimorfismo, estructura espacial y quiralidad, mediante difracción por rayos x, determinación de disolventes residuales, rotación óptica y cromatografía de capa fina.
- Métodos indicativos de estabilidad – Cuantifican posibles degradaciones e impurezas del o de los principios activos presentes. Es necesario contar con información de muestras estresadas a diferentes condiciones y evaluadas por medio de un método indicativo de estabilidad, de esta manera, es posible demostrar que se pueden separar, detectar y cuantificar todos los productos de degradación e impurezas relacionadas con el principio activo. Este tipo de métodos analíticos ayudan a establecer las condiciones de acondicionamiento de un medicamento.

Una vez que se ha establecido el objetivo del método a desarrollar, el segundo paso a seguir es la elección de una técnica analítica. Lo más adecuado, en este punto, es realizar una extensa revisión bibliográfica, de esta manera el analista ahorrará tiempo, debido a la probabilidad de que existan numerosos experimentos realizados y documentados del principio activo con el que se está

trabajando. De igual manera, en este punto es importante considerar a quien finalmente será el encargado de reproducir el método, en este caso, el departamento de control de calidad, por lo que, se debe considerar, los equipos con los que se cuenta en esta área, así como el tiempo y el dinero destinados al desarrollo del método.

En las últimas décadas, el desarrollo de métodos analíticos ha sido muy rápido y sustancial. Gracias al desarrollo de la tecnología en cromatografía, la mayoría de las monografías en las farmacopeas modernas contienen pruebas cromatográficas para caracterizar el perfil de impurezas de los fármacos. La cromatografía de líquidos de alta resolución es sin duda el principal método para la determinación de productos relacionados e impurezas en los fármacos (Gorog 2008).

1.9 Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)

La cromatografía es una “técnica de separación de moléculas, en una fase móvil, basándose en sus diferentes afinidades por una fase estacionaria. Cuanto mayor es la afinidad por la fase estacionaria, más tiempo se retiene la molécula” (Harris 2001).

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) utiliza una presión elevada para forzar el paso del disolvente (fase móvil), por una columna que contiene partículas muy finas (fase estacionaria), consiguiendo así separaciones de gran resolución.

El sistema CLAR que se muestra en la figura 8, consta de un sistema de suministro de disolvente, una válvula de inyección de muestra, una columna de alta presión, un detector y un software para controlar el sistema y visualizar los resultados. Actualmente los sistemas incluyen además un horno para controlar la temperatura de la columna y del auto muestreador (inyector).

1.9.1 Cromatografía de fase inversa

Es un tipo de cromatografía con en el que existen interacciones no polares entre el analito y la superficie hidrofóbica de la fase estacionaria. Las diferentes afinidades de absorción que existen entre los analitos resultan en su separación. Como regla general, los analitos más polares se retienen muy poco, mientras que los analitos que presentan mayor hidrofobicidad se retienen por más tiempo. Las fases móviles utilizadas en este tipo de cromatografía son en mayor proporción acuosas, con la presencia en menor cantidad de un disolvente orgánico miscible en agua, comúnmente se utilizan el acetonitrilo y el metanol. Esta cromatografía se puede utilizar en moléculas no polares, polares, ionizables u iónicas. El uso de gradientes de elución es muy común en la cromatografía de fase inversa.

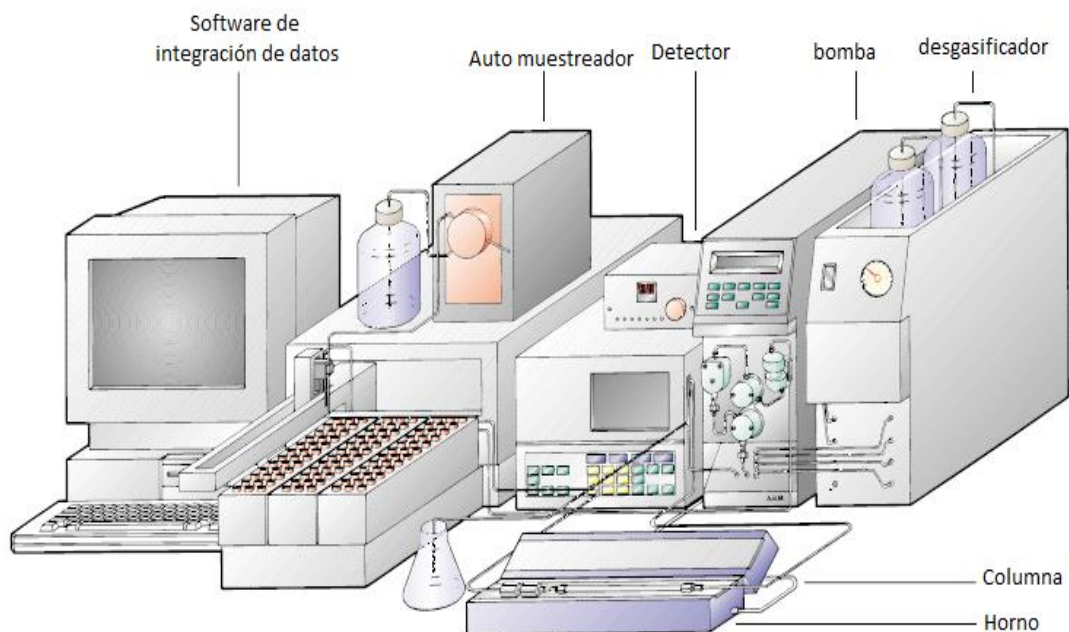


Figura 8. Sistema típico de cromatografía de líquidos de alta resolución, que consiste en un desgasificador, una bomba, un sistema de distribución de fase móvil (isocrático o gradiente), un detector (UV, fluorescencia, etc.), un auto muestreador y un sistema de integración de datos. La columna se puede mantener a una temperatura constante con la ayuda de un horno. (ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES / & 2002 Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group / www.els.net)

1.10 Cromatograma

Es un gráfico que representa la respuesta del detector en función del tiempo de elución. La figura 9 representa un cromatograma con 2 compuestos. El tiempo de retención, t_R , de un compuesto, es el tiempo que transcurre desde la inyección de una muestra en la columna, hasta la llegada del compuesto al detector. Se define t_0 como el tiempo que tarda la fase móvil no retenida en atravesar la columna y llegar al detector.

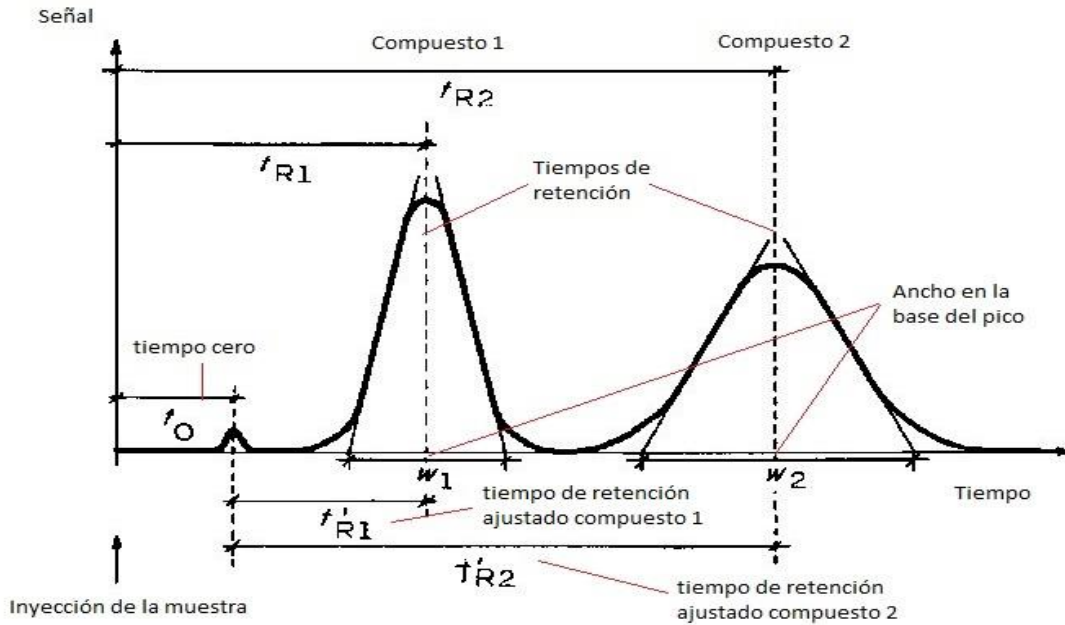


Figura 9. Cromatógrama que muestra la separación de dos compuestos

El tiempo de retención ajustado de un soluto (t'_R), define el tiempo efectivo que ha permanecido en la fase estacionaria, dado por:

$$t'_R = t_R - t_0$$

Ecuación 1

1.11 Parámetros cromatográficos

1.11.1 Selectividad (Factor de separación)

Define que tan selectiva es una columna para separar dos picos, dado por:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$

Ecuación 2

Donde el factor de capacidad (k') del compuesto 2 debe ser mayor al del compuesto 1 y por lo tanto $\alpha > 1$, para que la separación ocurra. Mientras más grande sea el valor del factor de selectividad, mayor será la separación entre los compuestos.

1.11.2 Factor de capacidad (retención).

Describe las velocidades de migración de los analitos en las columnas y se interpreta considerando que mientras mayor sea el valor de este factor menor es la velocidad de migración de los solutos en la columna. Para una especie A, el factor de capacidad k'_A se define como:

Ecuación 3

$$k'_A = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Donde:

t_R = tiempo de retención de la especie A

t_0 = tiempo cero

La selectividad en caso de un gradiente de elución se determina mediante el factor de retención:

$$k' = \frac{t_g F}{S V_m \Delta \Phi}$$

Ecuación 4

Donde:

$\Delta \Phi$ = cambio en la fracción de volumen del disolvente B (disolvente orgánico).

S = constante ($S \approx 4-5$ para moléculas pequeñas, $10 < S < 1000$ para péptidos y proteínas).

F = velocidad de flujo (mL min^{-1})

t_g = tiempo del gradiente (min)

V_m = volumen muerto de la columna (mL)

Por lo tanto, con la ayuda de la ecuación 4, podemos mantener un pico en su misma posición relativa en un cromatograma, la tabla 3 resume las modificaciones que podemos realizar a un método cromatográfico y la manera de minimizar el cambio en la posición de un pico, que estas modificaciones conllevan, mediante el uso de un gradiente de elución. Por ejemplo si se disminuye la longitud de la columna utilizada, sería necesario disminuir el tiempo del gradiente de elución o la velocidad de flujo y aumentar el cambio en la fracción de disolvente orgánico.

Tabla III. Relación entre las variables que se encuentran en la ecuación para el cálculo del factor de retención.

Cualquier disminución en:	Puede ser contrarrestado por un proporcional:
Longitud de la columna	Disminución en t_g o F Aumento en $\Delta\Phi$
Volumen de la columna	Disminución en t_g o F Aumento en $\Delta\Phi$
$\Delta\Phi$	Disminución en t_g o F

1.11.3 Eficiencia

La eficiencia de una separación cromatográfica, se calcula por medio del número de platos teóricos (N). Mientras mayor sea la cantidad de platos teóricos, mayor será la eficiencia de una columna. En el caso de la cromatografía de líquidos la eficiencia es una medida del ensanchamiento relativo del pico obtenido para un analito durante su separación (W).

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

Ecuación 5

1.11.4 Resolución (R)

Se define como el grado de separación entre dos picos vecinos en un cromatograma. Cuando $R \geq 1.5$, entonces se dice que se tiene una resolución a nivel de la línea base, en el caso de encontrarse en una etapa del desarrollo de un método cromatográfico es deseable obtener resoluciones mayores o iguales a 2.

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

Ecuación 6

En la ecuación 5, se puede ver como la resolución depende del ensanchamiento de los picos (W), mientras más anchos sean los picos, menor será su resolución.

El valor de resolución también puede definirse en términos de los tres parámetros cromatográficos discutidos previamente, es decir, la eficiencia, la selectividad y la retención.

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

Ecuación 7

Donde:

α = Selectividad – influenciada tanto por la fase móvil, como la fase estacionaria.

N = Eficiencia de la columna – influenciada por la longitud y el tamaño de partícula.

k = Factor de retención – influenciado por la fase móvil, la fase estacionaria y los cambios de gradientes aplicados al sistema.

La figura 10, representa los cambios en la resolución debidos a los tres parámetros de los que depende.

Se puede apreciar como la selectividad es la que tiene un mayor impacto, de manera que para lograr una mejor resolución se deben hacer cambios en la fase estacionaria y la fase móvil utilizadas.

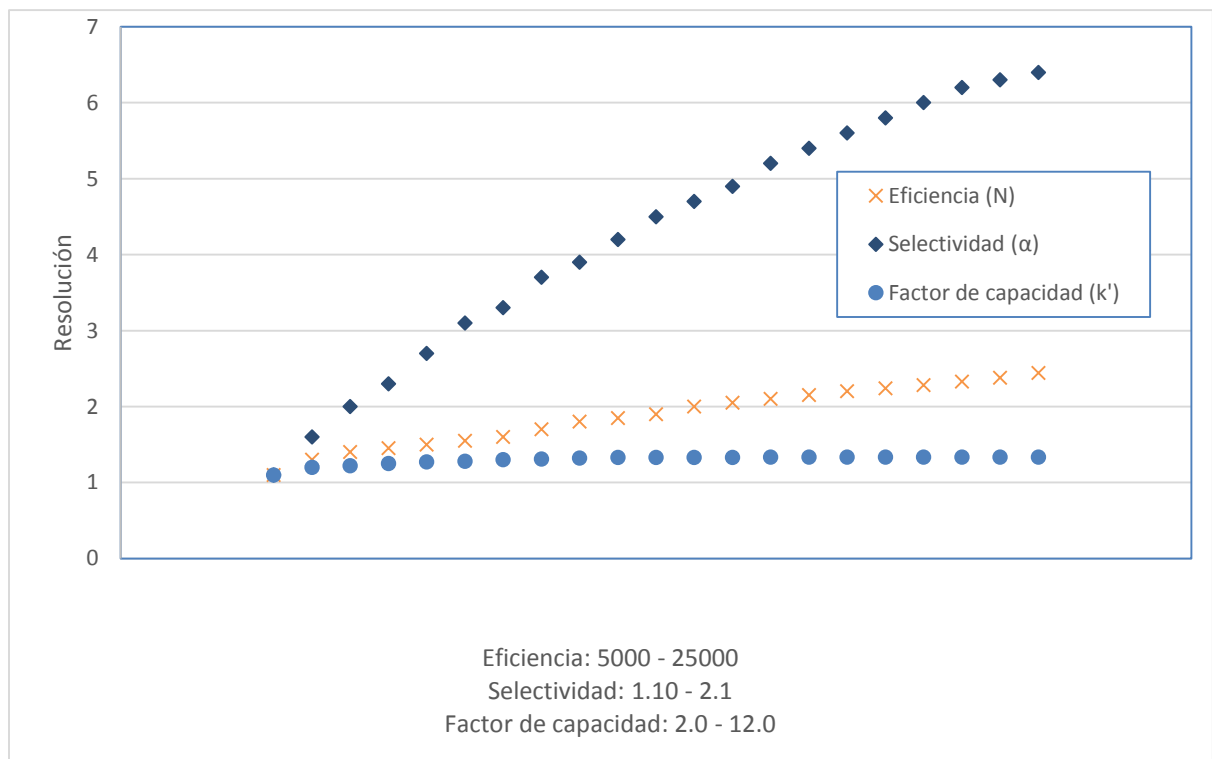


Figura 10. Gráfica que muestra el efecto del aumento en la selectividad, eficiencia y retención en la resolución cromatográfica

1.12 Preparación de la muestra

Una vez que se ha elegido una técnica analítica para el desarrollo de un método, se debe transformar una muestra real en una adecuada para su análisis.

La mayoría de las preparaciones de muestras, involucran el uso de extracciones ya sean ácido-base u orgánica-acuosa. Por tal motivo, es importante conocer las propiedades químicas y físicas del analito o analitos con los que se está trabajando. Propiedades como la solubilidad, ayudaran a determinar el disolvente adecuado. El valor de pKa determinara los valores de pH en que la molécula existirá como una especie neutra o ionizada. Esta información facilitará una extracción de muestra eficiente y determinará el valor óptimo de pH en la fase móvil (Gadkari 2012).

1.13 Calificación del sistema instrumental

La calificación del sistema instrumental es una parte integral en el empleo de técnicas analíticas como la cromatografía de líquidos y de gases. Se usa para verificar que la sensibilidad del detector, la resolución y la reproducibilidad del sistema cromatográfico sean las adecuadas para el análisis que se va a realizar. En el proyecto de norma oficial mexicana NOM-177-SSA1-2013, se define la verificación del sistema o “adecuación del sistema”, como “la verificación de que el sistema analítico opera con base a criterios preestablecidos, que permitan asegurar su desempeño óptimo”.

1.14 Validación

La norma oficial mexicana NOM-177-SSA1-2013, define validación como “la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado”. En el caso de la industria farmacéutica, se debe cumplir con buenas prácticas de fabricación, siendo la validación de métodos analíticos, un requisito imprescindible establecido por agencias regulatorias y por comisiones de Farmacopeas para el registro de nuevos medicamentos. Las exigencias de validación de estos métodos, a efectos del cumplimiento de normas, incluyen estudios de exactitud, precisión, linealidad, especificidad, robustez y límites de detección y de cuantificación (si aplica).

1.14.1 Exactitud

La exactitud de un método analítico se define como la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor considerado como verdadero.

En el caso de un principio activo, la exactitud se mide con la aplicación del método analítico al analito de una pureza conocida (estándar de referencia). Para determinar la exactitud en el producto terminado, se aplica el método analítico a mezclas del producto terminado que contenga adiciones de cantidades conocidas del analito, estas adiciones deben encontrarse dentro del rango establecido para el método.

La guía de validación de procedimientos analíticos emitida por la ICH recomienda evaluar la exactitud efectuando un mínimo de 9 determinaciones sobre un mínimo de 3 niveles de concentración que cubran el rango estudiado (3 concentraciones/ triplicado). La exactitud se debe reportar como el porcentaje de recobro del ensayo, sobre la cantidad de analito añadida a la muestra. Típicamente se espera que el porcentaje de recobro de un principio activo se encuentre entre 99 y 101 %. El porcentaje de recobro que se espera para el activo en producto terminado es de 98 a 102 %.

1.14.2 Precisión

Se define precisión como el grado de concordancia entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos de la misma muestra homogénea, bajo condiciones establecidas. La precisión se considera a tres niveles: reproducibilidad, precisión intermedia y repetibilidad (ICH 1996). Es importante que la precisión se determine a partir de muestras homogéneas.

➤ Repetibilidad

La repetibilidad es una medición de la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo, es decir, bajo las condiciones normales de operación del método analítico realizadas con un mismo equipo.

La ICH recomienda que la repetibilidad se determine usando un mínimo de nueve mediciones que cubran el rango especificado para el método analítico. Convencionalmente se mide utilizando un mínimo de seis determinaciones al 100 % de la concentración analizada. Se debe reportar la desviación estándar y el coeficiente de variación (desviación relativa estándar).

➤ Precisión Intermedia

Este tipo de precisión se define como la variación en el mismo laboratorio. Los parámetros típicos a analizar en este caso incluyen: variaciones día a día, variaciones de analista, y variaciones de equipos. Este tipo de estudios suelen ser extensos, por lo que se recomienda utilizar un diseño de experimentos que minimice el número de experimentos que se necesitan.

La ICH permite que no se realicen estudios de precisión intermedia, cuando la reproducibilidad se ha probado. Se espera que la precisión intermedia arroje resultados con variaciones en el mismo rango o menores de aquellas obtenidas en los estudios de repetibilidad. La ICH recomienda reportar la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) y un intervalo de confianza de los datos.

➤ Reproducibilidad

La reproducibilidad mide la precisión entre distintos laboratorios. Normalmente, este parámetro se considera en la estandarización de un procedimiento analítico, como la inclusión del procedimiento en una farmacopea o una transferencia del método entre distintos laboratorios. Para la validación de esta característica se deben realizar estudios similares en diferentes laboratorios utilizando el mismo lote de muestra homogénea y el mismo diseño experimental.

1.14.3 Linealidad

La linealidad de un procedimiento analítico es su habilidad (dado un determinado rango) para obtener resultados experimentales directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra (ICH 1996).

En los métodos utilizados para valoración de impurezas y productos de degradación se debe demostrar linealidad desde la concentración de límite de cuantificación, hasta una concentración al menos 10 veces mayor al límite de cuantificación.

La pendiente de la línea de regresión provee la relación matemática entre los resultados experimentales y la concentración del analito, con el intercepto en y, dando un estimado de posibles sesgos en el método. En la mayoría de los casos, la linealidad asociada con el método analítico puede ser estimada mediante el coeficiente de correlación, que debe ser lo más cercano a 1 como sea posible. Un método con un coeficiente de correlación menor de 0.98 o mayor a 1.02 podría ser insuficientemente preciso o no lineal.

Sin embargo, es bien sabido que el coeficiente de correlación, por sí solo, no es el mejor parámetro para evaluar la linealidad de un método analítico. Por lo tanto, es necesario usar una prueba estadística para poder verificar la significancia del mismo. El método más simple para llevar a cabo esto, es mediante el estadístico t (ecuación 8) utilizando la siguiente ecuación (Miller y Miller 2002):

$$t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

Ecuación 8

Donde:

r: coeficiente de correlación

n: número de niveles de confianza

En este caso, la hipótesis nula (H_0), es que no hay correlación lineal y la hipótesis alterna (H_a), que existe una correlación lineal. El valor t calculado, se compara con el valor tabulado al nivel de significancia deseado con n-2 grados de libertad, utilizando una distribución de dos colas. Si $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tablas}}$ se rechaza la hipótesis nula y por tanto se concluye que la correlación es lineal.

Si suponemos que los errores están presentes en los datos graficados en y, entonces se debe buscar la línea que minimice las desviaciones en la dirección de y, entre los puntos obtenidos experimentalmente y la línea calculada. Algunos de estos errores (conocidos técnicamente como residuales en y), serán valores positivos y otros valores negativos, por lo que es más sencillo tratar de minimizar la suma de los cuadrados de los residuales. Cuando el criterio de suma de cuadrados se utiliza para determinar la curva de calibración de un sistema, es necesario un método que elija la mejor manera de graficar la curva, entre las posibilidades existentes. El método de análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés), puede cumplir con esta tarea, este método asume que existen dos tipos de variaciones asociadas a los datos graficados en y, la primera es la debida a la regresión, entre la señal del instrumento y la concentración del analito. La segunda es el error experimental aleatorio en los valores de y, que se denomina variación sobre la regresión. ANOVA separa las dos fuentes de variación utilizando la relación en que la suma de cuadrados total (SC) sobre el promedio de los valores de los puntos de calibración, es igual a la SC debida a la regresión más la SC de los residuales (ecuación 9) (Miller y Miller 2002):

Suma de cuadrados aditiva:

$$\frac{\sum i (y_i - \bar{y})^2}{SC_{\text{totales}}(SC_t)} = \frac{\sum i (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2 + \sum i (y_i - \hat{y}_i)^2}{SC_{\text{regresión}}(SC_e) + SC_{\text{residuales}}(SC_r)}$$

Ecuación 9

Donde:

y_i : valores experimentales

\hat{y}_i : valores calculados por la ecuación de la recta

\bar{y} : Media de los valores de y_i

La tabla IV, resume las diferentes fuentes de variación que evalúa ANOVA, a partir de la ecuación 9.

Tabla IV. ANOVA para la evaluación de linealidad.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Varianzas
Estimación interna (regresión)	1	$S_e^2 = \frac{SC_e}{1}$
Estimación intermitente (residuales)	n-2	$S_r^2 = \frac{SC_r}{n-2}$
Total	n-1	$S_t^2 = \frac{SC_t}{n-1}$

Una vez con las varianzas se calcula la “F de Fischer” conforme a la ecuación 10 y la siguiente prueba de hipótesis, donde:

H₀: el modelo no es lineal
H_a: el modelo es lineal

$$F_{cal} = \frac{S_e^2}{S_r^2}$$

Ecuación 10

Si $F_{cal} \geq F_{tab}$ a un nivel de confianza determinado, se rechaza H₀ y por consecuencia el modelo lineal es adecuado para explicar la dispersión de los puntos experimentales.

1.14.4 Rango

La norma oficial mexicana NOM-177-SSA1-2013, define rango como “el intervalo de un método analítico definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles superior e inferior del compuesto, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal”

$$Rango = Conc_{\cdot máx} - Conc_{\cdot mín}$$

Ecuación 11

Donde:

Conc._{·máx}: concentración máxima del analito
Conc._{·mín}: concentración mínima del analito

1.14.5 Especificidad

La ICH define especificidad como la habilidad inequívoca de determinar un analito en la presencia de otros componentes que podrían estar presentes.

La especificidad para un ensayo y prueba de impurezas debe ser abordada desde dos ángulos:

1. Cuando las impurezas están disponibles. La especificidad de un método se determina comparando resultados del análisis de una muestra que contenga las impurezas, productos de degradación o ingredientes del placebo con resultados obtenidos del análisis de una muestra sin impurezas, productos de degradación o ingredientes del placebo.

Para un método indicativo de estabilidad, los picos de degradados deben estar resueltos del pico del principio activo. Sin embargo, los picos atribuidos a impurezas pueden no estar resueltos entre ellos. Para una prueba de impurezas, la determinación debe demostrar la separación de los picos de impurezas del pico correspondiente al principio activo, así como, a los picos correspondientes a otras degradaciones o impurezas. Se deben presentar cromatogramas representativos.

2. Cuando las impurezas no están disponibles. La especificidad se debe demostrar comparando los resultados de muestras que contengan impurezas o productos de degradación con un segundo método analítico propiamente caracterizado o algún otro método analítico validado. Se deben realizar pruebas de estrés acelerado (luz, calor, humedad, hidrólisis acida/básica, y oxidación). Los estudios de homogeneidad del pico deben ser realizados con un detector de arreglo de diodos o por espectrometría de masas para demostrar que el pico cromatográfico del analito no se atribuye a más de un componente.

1.14.6 Robustez

La robustez de un método analítico es una medida de su capacidad para permanecer inafectado por pequeñas, pero deliberadas variaciones en los parámetros del método. Nos proporciona información sobre la confianza del método en el uso diario. La evaluación de la robustez se considera normalmente en la fase de desarrollo y depende mucho del tipo de estudio que se realice. Un diseño de experimentos puede ayudar a determinar los parámetros críticos que afectaran más el desempeño del método.

Parámetros comunes que pueden afectar al método analítico deben ser considerados, de acuerdo a la técnica analítica utilizada y las propiedades fisicoquímicas de la muestra:

1. Preparación de la muestra

- a. Tiempo de extracción
- b. Disolvente de la muestra (pH \pm 0.05 unidades, porcentaje orgánico \pm 2 % absoluto)
- c. Filtros de membrana
- d. Estabilidad de la muestra y del estándar.

2. Condiciones en la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

- a. Composición de la fase móvil (pH \pm 0.05 unidades, porcentaje orgánico \pm 2 % absoluto)
- b. Columna utilizada (columnas equivalentes, lotes y/o proveedores, antigüedad)
- c. Temperatura
- d. Velocidad flujo

1.14.7 Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC)

El límite de detección se refiere a la más baja cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto.

Por el contrario, el límite de cuantificación se refiere a la más baja cantidad de analito en una muestra que puede ser cuantificada con precisión y exactitud. Esta última puede ser usada para la cuantificación de degradados del analito, debido a que éstos, se encuentran en cantidades muy bajas en la muestra.

La ICH (1996) recomienda calcular el límite de detección en alguna de las siguientes tres formas:

- Modo visual. Se analizan muestras de concentraciones conocidas del analito, estableciendo así el nivel mínimo al que el analito puede ser detectado.
- En base a la relación señal/ruido. Se comparan muestras con concentraciones bajas del analito contra placebos, estableciendo así la mínima concentración del analito que puede ser detectada. Una relación señal/ruido de 3 a 1, se considera aceptable para la medición del límite de detección.
- En base a la desviación estándar de la respuesta, mediante una prueba de hipótesis estadística.

En el último de los casos, el límite de detección se calcula en función de la desviación estándar de la concentración predicha por un blanco (S_0). De acuerdo a la figura 11 el LD se calcula mediante una prueba de hipótesis estadística, fijando en un principio una concentración llamada nivel crítico (L_C) a partir de esta, se toman decisiones respecto de la detección del analito. Para concentraciones superiores a L_C , existe una probabilidad α de cometer el llamado error de tipo I o falso positivo. Este último consiste en aceptar erróneamente la hipótesis alternativa, admitiendo que el analito está presente cuando en realidad está ausente. Como se aprecia en la figura 10, la probabilidad de cometer este error de tipo I está dada por la zona sombreada de azul (área α), siendo la "distancia" de L_C al cero de la escala igual al producto de S_0 por el coeficiente $t_{\alpha, v}$. Si α se toma igual a 0.05, entonces una concentración superior a L_C tendrá sólo un 5% de probabilidad de constituir un falso positivo.

Del mismo modo, existe una probabilidad β de cometer un error de tipo II o falso negativo, en el que se acepta erróneamente la hipótesis nula, admitiendo que el analito está ausente cuando en realidad está presente (zona sombreada de rojo en la Figura 10, con probabilidad igual a β). Si β se toma también como 0.05, la probabilidad de obtener un falso negativo será del 5%. En este caso la distancia de L_C a la concentración correspondiente a dicho valor de β es el producto del coeficiente $t_{\beta, v}$ por S_0 , considerando que este último parámetro es muy cercano al desvío estándar en la concentración de una muestra blanco.

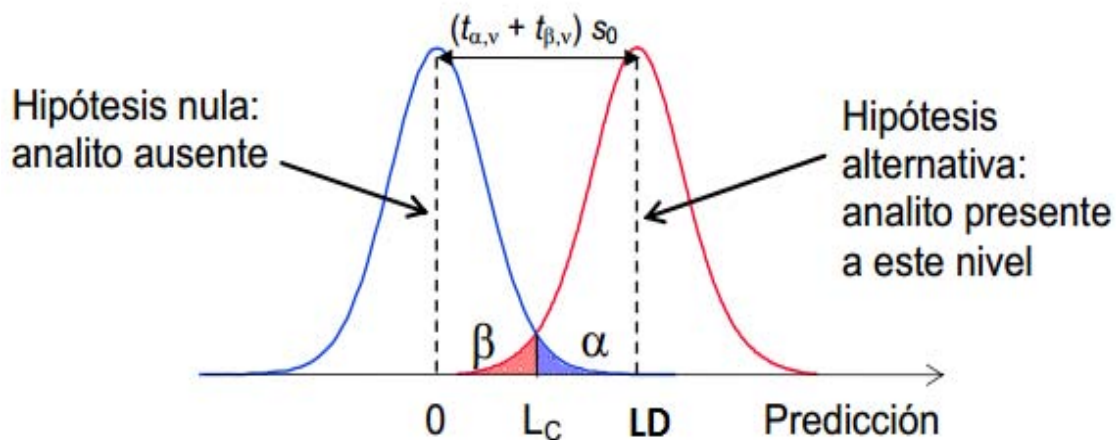


Figura 11. Prueba de significación empleada para estimar el límite de detección. L_C es el nivel crítico, LD el límite de detección, α y β las probabilidades correspondientes a errores de tipo I y II respectivamente, S_0 la desviación estándar del blanco (en unidades de concentración) y $t_{\alpha, v}$ y $t_{\beta, v}$ los coeficientes de student para v grados de libertad.

Puede notarse entonces que el valor de LD depende de α y β , y de las desviaciones estándar de las dos curvas gaussianas de la figura 10. En general, ambas probabilidades se toman como iguales 0,05,

mientras que las desviaciones estándar se suponen ambos iguales a S_0 . De este modo, el LD está dado por:

$$LD = 2t_{0,05,m-2} S_0$$

Ecuación 12

Dado que m es un número relativamente grande, el valor de $(2t_{0,05,m-2})$ tiende a 3,3, por lo que una ecuación aproximada para el límite de detección es:

$$LD = 3.3 S_0$$

Ecuación 13

Donde:

S_0 = Desviación estándar de la concentración predicha para un blanco

De la misma forma, el límite de cuantificación se puede determinar por medio de diferentes enfoques:

- Modo visual. Se analizan muestras de concentraciones conocidas del analito, estableciendo así el nivel mínimo al que el analito puede ser cuantificado.
- En base a la relación señal/ruido. Comparación de señales medidas de muestras con concentración de analito conocidas contra placebos que establecen la mínima concentración a la que el analito puede ser detectado. Normalmente se considera aceptable un valor de relación señal/ruido mayor o igual a 10.
- En base a la desviación estándar de la respuesta, mediante una prueba de hipótesis estadística.

El límite de cuantificación se toma como la concentración correspondiente a 10 veces la desviación estándar (en unidades de concentración) del blanco, con lo cual se puede expresar al (LC), como:

$$LC = 10 S_0$$

Ecuación 14

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

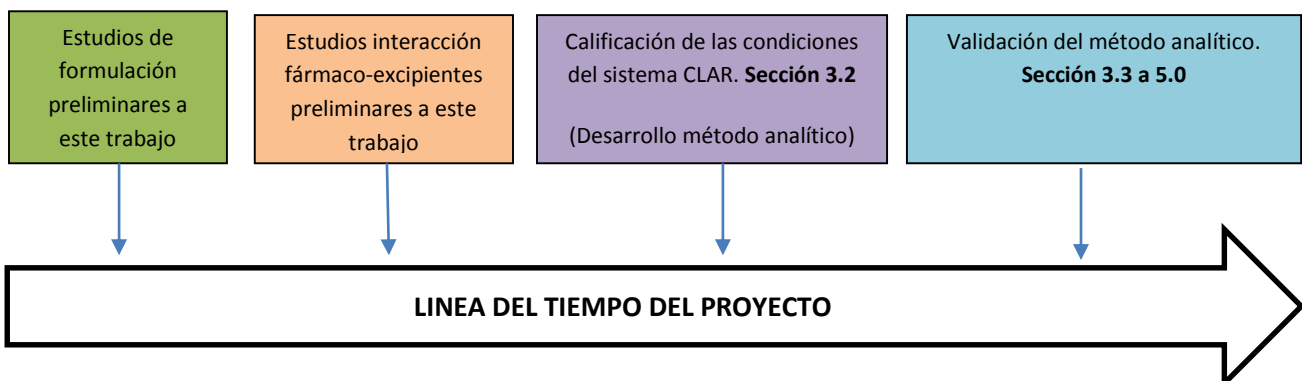
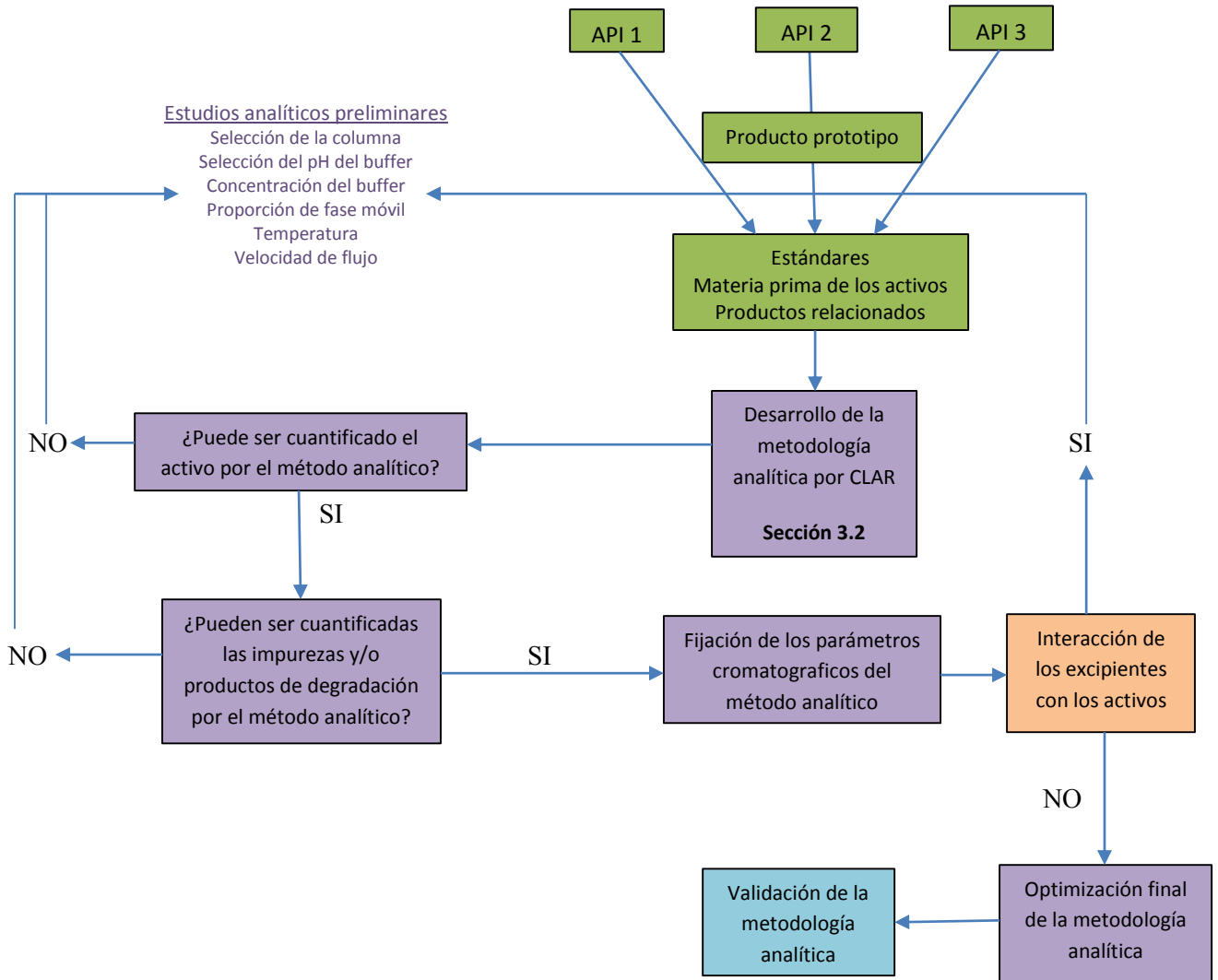
- Validar un método analítico por CLAR, para la valoración de un antiinflamatorio de tipo corticosteroide y la cuantificación de sus impurezas en un ungüento como forma farmacéutica

2.2 Objetivos Específicos

- Optimización de un método para el análisis en cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), del principio activo de tipo corticosteroide en un ungüento.
- Cuantificar impurezas y degradados correspondientes al principio activo.
- Evaluar el método, para que sea indicativo de estabilidad en el monitoreo del comportamiento del activo en la forma farmacéutica durante su estrés en estudios de estabilidad.
- Validar el método analítico evaluando linealidad, límites de cuantificación y de detección, especificidad, precisión, exactitud y robustez.

3.0 DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 Diseño Experimental



3.2 Calificación del sistema de CLAR.

3.2.1 Identificación cualitativa de los principios activos.

En la primera fase del desarrollo del método analítico, se intentó desarrollar una metodología analítica capaz de cuantificar a los 3 principios activos, junto con sus productos de degradación y/o relacionados. Se empleó un sistema cromatográfico muy similar al utilizado para cuantificar el activo 3 (anti fúngico), descrito en la farmacopea de los Estados Unidos (USP 32–NF 27).

Tabla V. Sistema de CLAR para la cuantificación de los 3 activos.

Columna:	Symmetry C18 de 100 x 4.6 mm, 3.5 μ m
Temperatura de la columna:	40 ° C
Temperatura del auto muestraedor:	15 ° C
Disolución de lavado de la aguja del auto muestraedor:	Agua: Acetonitrilo 50:50 (v/v)
Longitud de onda del detector:	254 nm
Volumen de inyección:	15 μ L
Velocidad de Flujo:	1.4 mL min ⁻¹
Tiempos de corrida:	Por determinar
Fase Móvil	Acetonitrilo:Agua:Acetato de Amonio 0.01 M pH 3.9
Proporción	60:30:10 v/v

Se inyectó una disolución de estándar combinado de API 1 (0.05 mg g⁻¹), API 2 (1.0 mg g⁻¹) y API 3 (0.56 mg g⁻¹), así como 3 disoluciones estándar de cada uno de los activos por separado. Esta concentración se utilizó en las pruebas del desarrollo del método, a menos que se especifique lo contrario. Se utilizó acetonitrilo (ACN) como diluyente, ya que los 3 activos son solubles en él. La figura 12 muestra el cromatograma de la inyección de estándar combinado. El sistema cromatográfico separara a los 3 principios activos, sin embargo es necesario aumentar la resolución entre los picos, ya que se desea no solo cuantificar a los API's, sino también sus impurezas y productos de degradación.

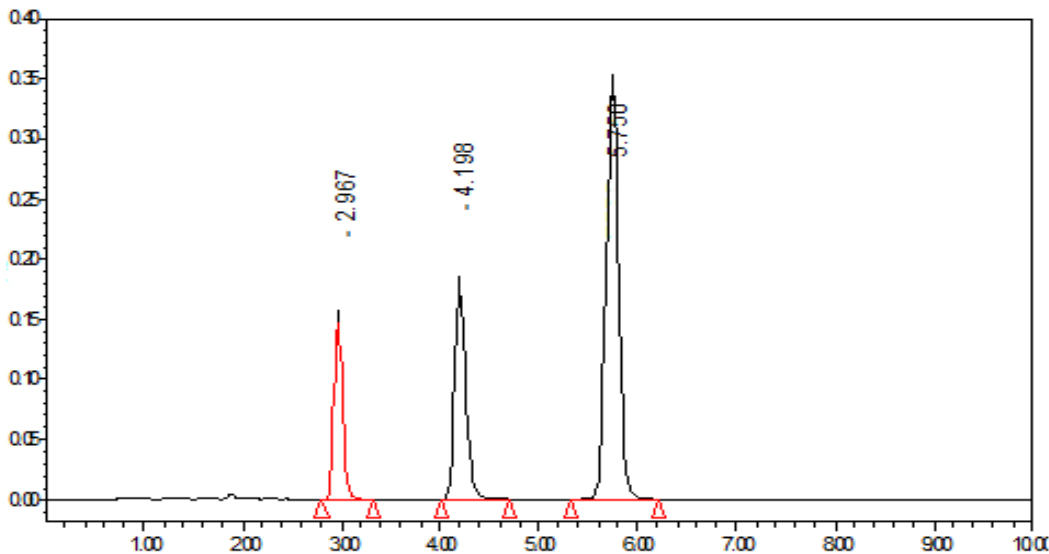


Figura 12. Cromatograma de un estándar combinado. La señal 1 ($tr=2.967$) corresponde al API 1, la señal 2 ($tr=4.198$) corresponde al API 2 y la señal 3 ($tr=5.750$) corresponde al API 3.

3.2.2 Evaluación de la proporción de fase orgánica en la fase móvil.

En el análisis cromatográfico anterior, la fase móvil fue una mezcla de ACN: agua: disolución amortiguadora de acetato de amonio 0.01 M pH=3.9 (60:30:10 % v/v). En esta separación se cambió el porcentaje de Agua: ACN, el porcentaje de amortiguador permaneció inmóvil. Se prepararon 3 mezclas de fase variando la proporción de ACN y agua en función de la proporción mencionada con anterioridad, tomando un valor de fase orgánica mayor a este, uno similar y uno más bajo. La primera mezcla contenía, agua: ACN: amortiguador (acetato de amonio 0.01 M pH=3.9) (20:70:10 % v/v), la segunda mezcla contenía agua: ACN: amortiguador (acetato de amonio 0.01 M pH=3.9) (35:55:10 % v/v) y la última mezcla contenía agua: ACN: amortiguador (acetato de amonio 0.01 M pH=3.9) (50:40:10 % v/v).

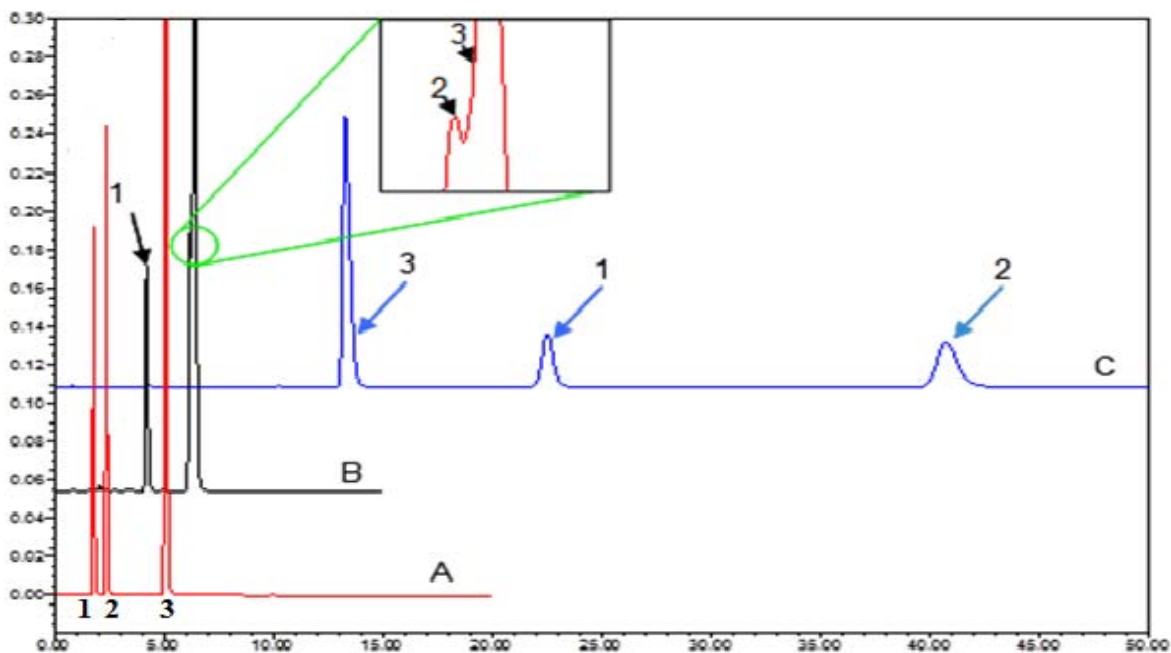


Figura 13. Cromatogramas de un estándar combinado API 1 (1) 0.05, API 2 (2) 1.0 y API 3 (3) 0.56 mg g⁻¹. Porcentaje Agua: ACN en fase móvil A: 20:70, B: 35:55, C: 50:40 % v/v.

La figura 13 muestra 3 cromatogramas, cada uno con diferente proporción de fase móvil y la tabla VI, resume los tiempos de retención para cada uno de los principios. De acuerdo a los principios de la cromatografía, al usar fase reversa, los analitos con mayor polaridad se retendrán menos, en este caso el API 3. El API 1 y API 2 son más afines a la fase estacionaria no polar de la columna. Sin embargo, si la fase móvil es predominantemente orgánica, como en el caso de los cromatogramas A y B los analitos no polares interactuarán más con la fase móvil, teniendo en consecuencia, menores tiempos de retención. Al aumentar la polaridad de la fase móvil, como en el caso del cromatograma C, estos analitos interactuarán ahora con la fase estacionaria, aumentando sus tiempos de retención. De manera contraria para el API 3, que siendo polar al aumentar el porcentaje de agua en la fase móvil no interactuará con la fase estacionaria, teniendo tiempos de retención menores.

Tabla VI. Tiempos de retención (t_R) y valores de simetría para cada API en las diferentes proporciones de fase orgánica evaluadas.

Muestra		API 1		API 2		API 3	
		t_R	Simetría	t_R	Simetría	t_R	Simetría
A	STD COMB 20_70_10	1.8	1.16	2.37	1.22	5.1	1
B	STD COMB 35_55_10	4.23	1.16	6.22	0.7	6.41	1.19
C	STD COMB 50_40_10	22.53	1.09	40.74	1.2	13.29	1.62

La proporción C, ofreció las mayores resoluciones entre los API's, ver figura 13, y ofrece un margen para resolver aquellos de los productos de degradación y relacionados de los activos.

3.2.3 Evaluación de la proporción de la fase acuosa en la fase móvil.

En esta fase del desarrollo, se pretendió conocer el efecto del amortiguador en el sistema cromatográfico. El aumento en la polaridad de la fase móvil, provocó mayores tiempos de retención en los API's con estructuras no polares y disminuyeron los tiempos de retención de aquellos con estructuras polares. La composición de fase orgánica (Agua: ACN 50:40 % v/v) se mantuvo constante durante el experimento. Se examinaron las siguientes proporciones:

Tabla VII. Porcentajes de fase móvil orgánica y acuosa a evaluar en el sistema cromatográfico (% v/v)

Fase orgánica	Fase acuosa
Agua: acetonitrilo (50:40 % v/v)	Buffer acetato de amonio 0.01 M pH=3.9
85	15
90	10
95	5

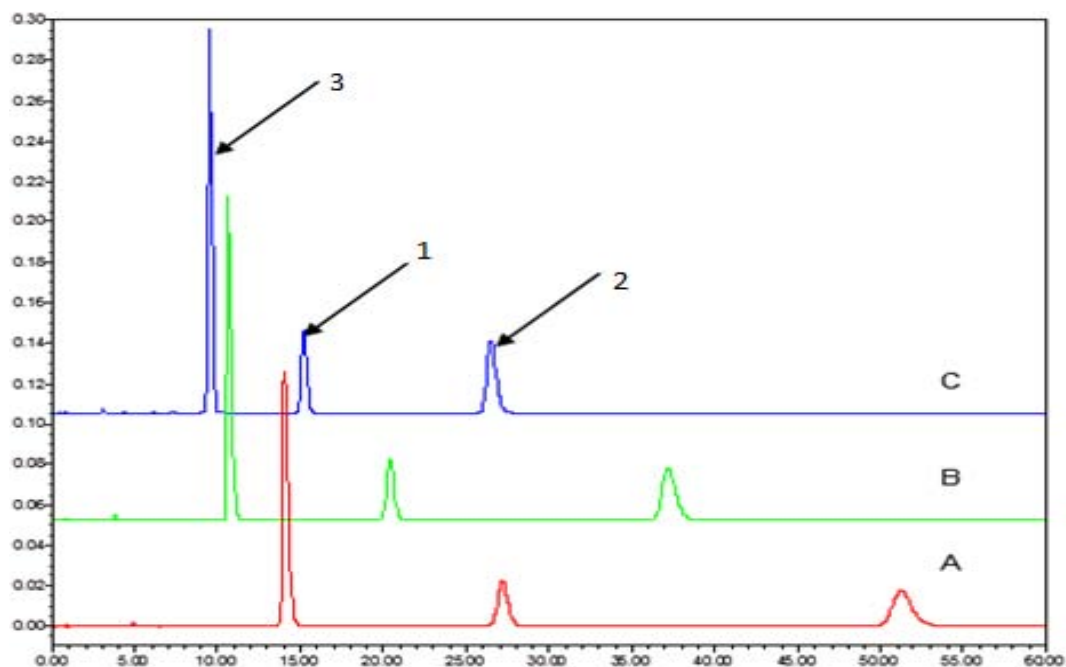


Figura 14. Cromatograma de un estándar combinado API 1 (1) 0.05, API 2 (2) 1.0 y API 3 (3) 0.56 mg g⁻¹, que muestra los cambios de los tiempos de retención de los activos debido al cambio de proporción del amortiguador de acetato de amonio en la fase móvil.

Las condiciones cromatográficas para este experimento se describen en la tabla V (con excepción de los porcentajes utilizados en la fase móvil). La figura 14 ilustra los cromatogramas para los 3 porcentajes de fase móvil estudiados. El orden de elución de los activos no cambió, sin embargo hubo movimientos en los tiempos de retención. Estos cambios se debieron al cambio de la polaridad en la fase móvil y con ello modificación de la interacción de los analitos con la fase estacionaria.

Tabla VIII. Tiempos de retención (t_R) y valores de simetría para cada API en las diferentes proporciones de fase móvil evaluadas.

Muestra		API 1		API 2		API 3	
		t_R	Simetría	t_R	Simetría	t_R	Simetría
A	STD COMB 20_70_10	27.18	1.07	51.22	1.16	14.01	1.7
B	STD COMB 35_55_10	20.39	1.07	37.18	1.19	10.63	1.77
C	STD COMB 50_40_10	15.21	1.07	26.47	1.25	9.5	1.41

Como se aprecia, aumentó la resolución entre los compuestos, lo que benefició el análisis con muestras estresadas que presentarán impurezas a resolver. Se elige la proporción ACN-agua: amortiguador de acetato de amonio (90:10 % v/v). La figura 14 presenta los cromatogramas para esta fase de la optimización. Se prefirió las condiciones del cromatograma B debido a su alta resolución y sus menores tiempos de retención.

3.2.4 Evaluación del valor de pH en la disolución amortiguadora.

El pH de la disolución amortiguadora es importante para la separación eficiente de los activos por fase reversa. El buffer proporciona el medio para una ionización estable de los analitos y reduce o

elimina significativamente su interacción electrostática con la carga residual de la superficie de la fase estacionaria, la ionización de las moléculas hace que estas presenten características polares o hidrofílicas lo que permite una mayor interacción molécula-fase móvil. Cuando las moléculas se encuentran no ionizadas tendrán características no polares o hidrofóbicas por lo que estas tendrán más afinidad por la fase estacionaria y por lo que se retendrán mucho más tiempo en la columna cromatográfica.

Solo se evaluó el cambio en el pH de la fase disolución amortiguadora, la composición total de la fase móvil se mantendrá en la proporción establecida en los dos últimos experimentos agua: ACN: amortiguador acetato de amonio 0.01 M (50:40:10 % v/v). Se estudiaron 3 valores de pH: 2.9, 3.9 y 4.9.

Tabla IX. Tiempos de retención (t_R) y valores de simetría para cada API en los diferentes valores de pH en la disolución amortiguadora.

pH	Muestra	API 1		API 2		API 3	
		t_R	Simetría	t_R	Simetría	t_R	Simetría
2.9	STD COMB 20_70_10	17.6	1.1	37.3	1.1	3.0	2.1
3.9	STD COMB 35_55_10	20.4	1.1	37.2	1.2	10.6	1.8
4.9	STD COMB 50_40_10	20.9	1.1	27.4	1.2	57.8	1.0

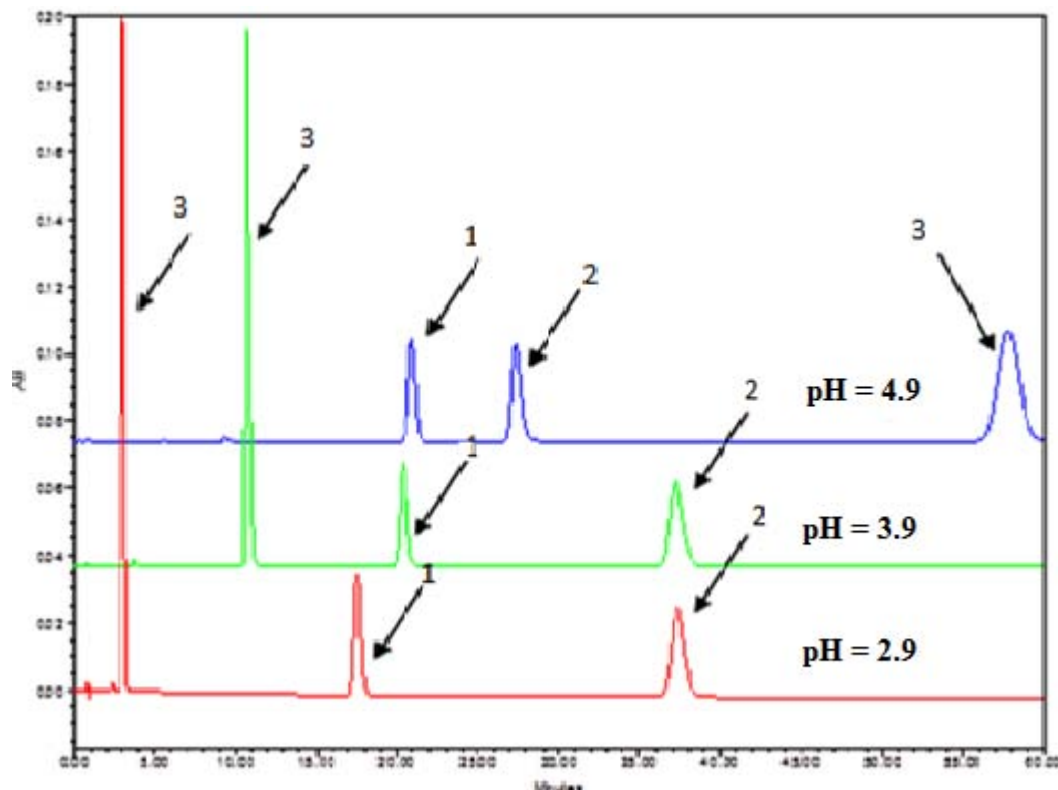


Figura 15. Cromatogramas de un estándar combinado API 1 (1) 0.05, API 2 (2) 1.0 y API 3 (3) 0.56 mgg^{-1} que muestra los cambios de pH en la fase móvil. A) pH = 2.9, B) pH = 3.9, C) pH = 4.9.

En la figura 15 se aprecia como el cambio en el pH del amortiguador afectó tanto el orden de elución como los tiempos de retención de los activos, es el API 3 el más ya que a pH=2.9 su $t_r = 3$ min, a diferencia de los 57 min a pH=4.9. Este efecto se debe a que esta molécula es una base y a pH ácido se encuentra ionizada por lo que se vuelve mucho más afín a la fase móvil, en cuanto se aumenta el valor de pH, la ionización de la molécula disminuye y por lo tanto se comienza a retener más en la fase estacionaria. El API 2, aunque también se afectó por el cambio de pH no cambió su orden de elución, pero si su tiempo de retención ya que es una molécula ácida que a valores bajos de pH no se encuentra ionizada reteniéndose más en la fase estacionaria. El API 1 conservó su orden de elución y sus tiempos de retención se mantuvieron muy cercanos debido a que esta molécula es un esteroide y no modifica su patrón de selectividad con el pH, este tipo de compuestos se consideran no ionizables por el pH, y su selectividad se afecta primordialmente por la interacción con los grupos silanos de la fase estacionaria.

3.2.5 Determinación de la máxima longitud de onda de los activos.

Se realizó un barrido espectral en un detector de arreglo de fotodiodos (PDA por sus siglas en ingles). Un detector de este tipo permite hacer barridos a distintas longitudes de onda de cada uno de los componentes separados, para generar su espectro de absorción al UV-VIS. Mediante los arreglos de diodos se puede determinar la mejor longitud de onda a la que debe monitorearse el compuesto de interés. De acuerdo a los experimentos anteriores, se trabajó con las siguientes condiciones cromatográficas, indicadas en tabla X. Las figuras 16 y 17 presentan el cromatograma obtenido con un detector PDA, así como las máximas longitudes de onda para cada uno de los principios activos.

Tabla X. Sistema cromatográfico propuesto para la determinación de los máximos de absorbancia de los activos.

Columna:	Symmetry C18 de 100 x 4.6 mm, 3.5 μ m
Temperatura de la columna:	40 ° C
Temperatura del auto muestraedor:	15 ° C
Solución de lavado de la aguja del auto muestraedor:	Agua: acetonitrilo 50:50 (v/v)
Detector:	Arreglo de fotodiodos (PDA)
Rango de lectura:	200-400 nm
Volumen de inyección:	15 μ L
Velocidad de Flujo:	1.4 mL min ⁻¹
Tiempos de corrida:	60 min
Fase Móvil	Agua :ACN :acetato de amonio 0.01 M pH 3.9
Proporción	50:40:10 % v/v

Tabla XI. Longitudes de absorbanza máximas para los tres activos.

Activo	Longitud de absorbanza máxima (nm)
API 1	250
API 2	223
API 3	223

Obtenidas las longitudes de absorbanza máximas de los activos (tabla XI), se inyectó el mismo estándar combinado (API 1 0.05 mg g⁻¹, API 2 1.0 mg g⁻¹ y API 3 0.56 mg g⁻¹), en un detector UV. El activo 1 no cumplió con el criterio establecido por la ICH Q3B (R2) sobre impurezas en nuevos fármacos, que establece que para cuantificar con exactitud y precisión un analito la relación señal/ruido debe ser mayor o igual a 10, en este caso evaluando un peor caso con un valor de ruido de 10, la relación señal/ruido al límite de reporte (0.1 % de la respuesta con respecto al 100 % de la concentración del estándar), sería de 3.2, El API 1, tiene una concentración de 0.05 mg mL⁻¹, en las muestras analizadas, esta concentración no es suficiente para cumplir con el criterio establecido, es decir, el método no se puede considerar como indicativo de estabilidad para el ensayo del analito antes mencionado. Por este motivo se comenzó con el desarrollo de una técnica analítica por separado que cumpla con la sensibilidad para cuantificar el API 1 y sus impurezas.

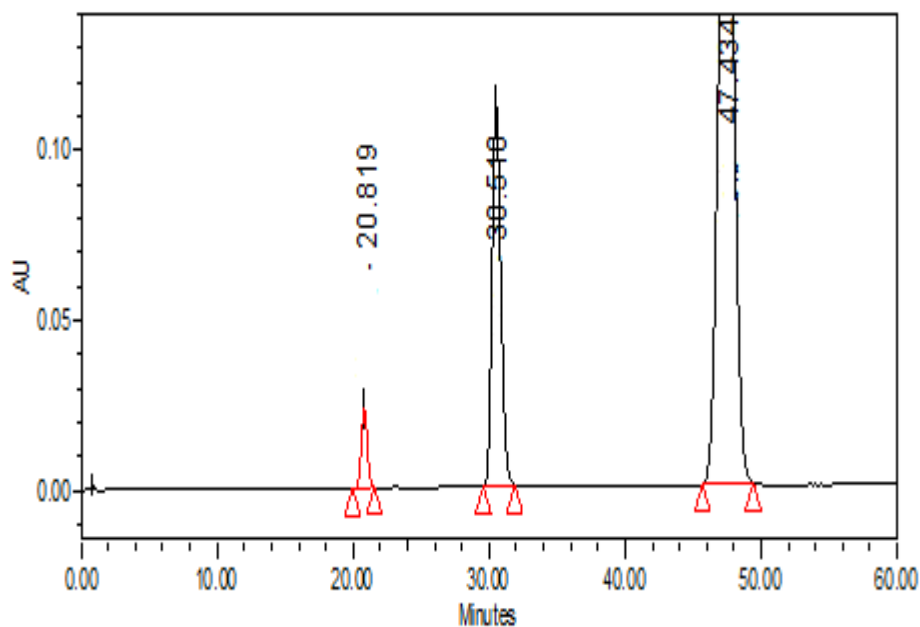


Figura 16. Cromatograma de una muestra que contenía los 3 API's obtenido con un detector de arreglo de diodos.

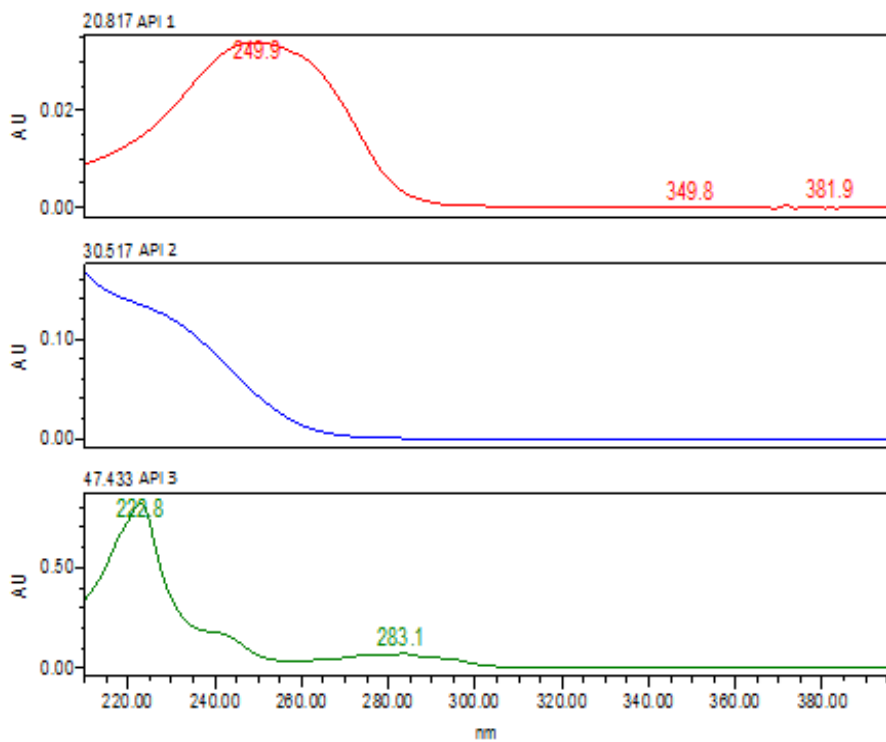


Figura 17. Barrido espectral de los tres activos, en donde se muestran las longitudes de onda máximas para cada uno.

3.2.6 Optimización del sistema cromatográfico para la cuantificación del API 1 y sus productos de degradación e impurezas.

Los experimentos anteriores mostraron las diferencias en selectividad para los analitos de interés. En general, están son mayores al cambiar el pH cuando se presentan grupos funcionales ionizables. Los compuestos neutros no modifican sus tiempos de retención con el cambio de pH en la fase acuosa de la fase móvil, son aquellos que no cambian su ionización con el pH. Esto incluye a todos los compuestos neutros, como los esteroides (API 1).

Con el objetivo de separar a la molécula API 1 y sus productos de degradación y/o relacionados de las moléculas API 2 y API 3 y sus productos relacionados y de degradación, se utilizó una disolución de fosfatos con pH 3. Esta se realizó con el objetivo de eluir primero al API 3 (molécula ionizable), posteriormente dejar eluir al API 1 de interés junto con la mayor cantidad de productos relacionados y de degradación, finalmente el API 2 que se retuvo más en la columna cromatográfica por lo que se programó un gradiente después de los 40 min para eluir rápidamente al API 2 y sus productos relacionados y de degradación. Las condiciones cromatográficas para esta prueba se definieron en la tabla XII.

Tabla XII. Sistema cromatográfico propuesto para la determinación de los máximos de absorbancia de los activos

Columna:	Symmetry C18 de 100 x 4.6 mm, 3.5 μm
Temperatura de la columna:	40 ° C
Temperatura del auto muestraedor:	15 ° C
Solución de lavado de la aguja del auto muestraedor:	Agua: Etanol 70:30 (v/v)
Longitud de onda del detector:	250 nm
Volumen de inyección:	50 μl
Velocidad de Flujo:	2.0 mL min ⁻¹
Tiempos de corrida:	70 min
Fase Móvil	Acetonitrilo : fosfato de sodio 0.01 M pH 3.0
Proporción	Gradiente

El gradiente que se creó para eluir al API 2 se encuentra resumido en la tabla XIII. La fase acuosa, fue fosfato de sodio 0.01 M pH 3.0 y la fase orgánica, acetonitrilo. La última columna de la tabla XIII señala el número de curva que siguió la bomba del equipo para pasar de un gradiente a otro durante la corrida. La figura 18 ejemplifica los tipos de curva de gradiente disponibles con el equipo utilizado. En este caso y en lo posterior se utilizó una curva 6 (lineal), a menos de que se indique lo contrario.

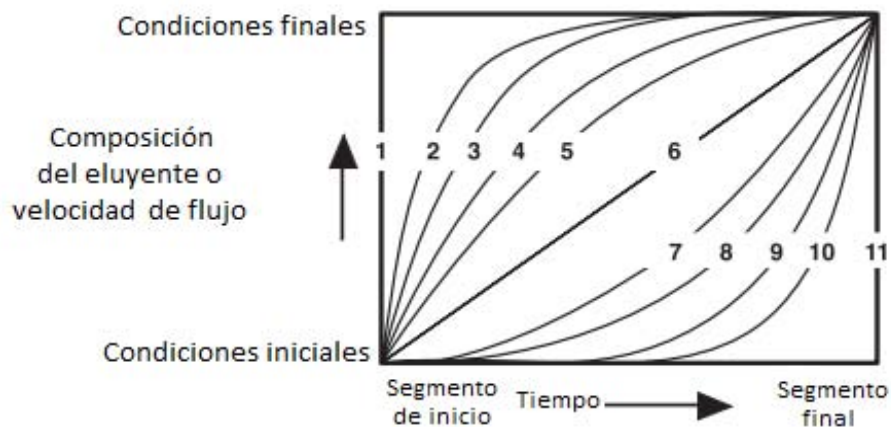


Figura 18. Representación gráfica de las curvas de gradiente disponibles.

Tabla XIII. Gradiente programado para la fase móvil.

	Tiempo (min)	Flujo (mL min ⁻¹)	Fase Acuosa	Fase Orgánica	Curva
1	0.01	2	80	20	6
2	40	2	20	80	6
3	45	2	80	20	6
4	50	2	80	20	6

El cromatograma de producto terminado estresado de la Figura 19 presenta las señales de los 3 activos con una buena resolución entre ellos. La modificación de pH, hizo que el API 3 eluya rápidamente, mientras que el gradiente al final de la corrida eluyó al API 2, sin embargo no se observa una buena separación entre productos de degradación e impurezas, así que se opta por programar distintos gradientes, para aumentar la resolución entre el API 1 y 2. En el anexo 1, se incluyen las tablas que detallan cada uno de los gradientes que fueron evaluados para la obtención de una mejor resolución.

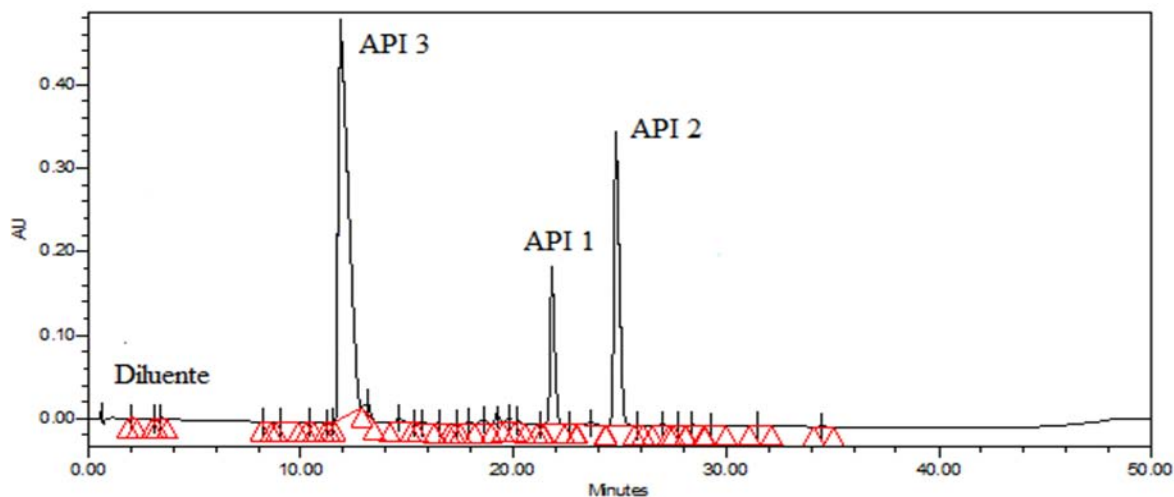


Figura 19. Cromatograma de una inyección de producto terminado estresado (40 ° C / 75 % humedad relativa (H.R) por 1 mes) con el gradiente descrito en la tabla XIII.

Se inyectó una muestra de producto terminado estresado a 40°C/75% H.R. (humedad relativa) por 1 mes, se llegó a la conclusión de que el gradiente en la tabla XVIII era el más adecuado debido a que los productos de degradación presentaban una mejor resolución entre ellos. Se decidió aumentar la concentración de la fase orgánica y la curva al final del gradiente debido a un arrastre de la inyección anterior.

En la tabla XIV, se resume el último gradiente propuesto en el método para la cuantificación del API 1 y sus productos de degradación, de esta manera, se concluye con el desarrollo del sistema cromatográfico para este método.

Tabla XIV. Gradiente final para el sistema cromatográfico a utilizar para la cuantificación del API 1 y sus productos de degradación.

	Tiempo (min)	Flujo (mL min ⁻¹)	%A	%B	Curva
1	0.01	2	70	30	6
2	15	2	65	35	6
3	33	2	65	35	6
4	40	2	60	40	6
5	45	2	60	40	6
6	57	2	30	70	1
7	58	2	30	70	1
8	60	2	70	30	6
9	70	2	70	30	6

3.3 Preparación de muestras y estándares

Las muestras de ungüento que se utilizaron fueron entregadas por el departamento de formulaciones del centro de investigación en desarrollo farmacéutico “Mexico Pharmaceutical Development Laboratory” (MPDL, por sus siglas en ingles), se recibieron muestras placebo y producto terminado. Se resguardaron muestras de producto terminado para estresar y para estudios de estabilidad. El API 1 contaba con una concentración de 1 mg g⁻¹ en el ungüento.

3.3.1 Preparación de la muestra

Se pesaron 2.5 ± 0.1 g de muestra de ungüento en un tubo de centrifuga de plástico con sello, se agregaron 25 mL de disolvente (ácido acético 0.1 % en una mezcla de ACN: Agua (80:20 v/v)). Se colocó el tubo en un baño maría a 80 ° C, cada 10 minutos el tubo se retiró para agitarse en un vortex por 1 min. Este paso se repitió 3 veces. Posteriormente, se introdujo en un congelador o en baño de metanol/hielo por 15 minutos, se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos, el sobrenadante, se filtró a través de un filtro acrodisc® PSF syringe con GxF / 0.2 µm y membrana GHP, 25 mm, descartando los primeros mililitros y se colectó en un vial adecuado.

3.3.2 Preparación de las disoluciones estándar de API 1

Se preparó una disolución estándar del API 1 a 100 µg mL⁻¹. Se pesaron con exactitud 20.0 mg \pm 2 mg del estándar de referencia de API 1. Se transfirió cuantitativamente a un matraz de 200 mL, se

adiciono 100 mL del disolvente, se sonicó durante 5 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente y se aforó con el disolvente.

3.3.3 Preparación de la disolución del estándar de API 1 al límite de reporte (LR, ANEXO 2)

Se tomaron 10 mL de la disolución estándar del API 1 descrita en la sección 3.3.2, se transfirieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 200 mL y se aforó con diluyente. De esta disolución se tomaron 2 mL y se transfirieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL y se aforó con diluyente.

3.3.4 Preparación de las disoluciones estándar de impurezas del API 1

Se prepararon de manera individual disoluciones estándar de las impurezas del API 1: compuesto-D, compuesto-E, API 1 relacionado-1, 17-alcohol y 21-alcohol. Para ello se pesaron $20 \text{ mg} \pm 2 \text{ mg}$ de estándar de referencia de cada impureza. Cada una de las impurezas pesadas se transfirió cuantitativamente a un matraz volumétrico de 20 mL. Se adicionó 10 mL de disolvente a cada matraz y se sonicaron por 5 minutos, se dejaron enfriar y se aforaron con el disolvente. Con una pipeta volumétrica se transfirió 2.5 mL de cada una de las disoluciones de impurezas a matraces volumétricos de 100 mL y se llevaron al aforo con disolvente.

3.3.5 Preparación de la disolución de resolución

Se preparó una disolución que contenía las impurezas preparadas con anterioridad, pesando $20.00 \text{ mg} \pm 2 \text{ mg}$ de estándar de referencia de API 1, posteriormente, se transfirió el estándar a un matraz volumétrico de 200 mL y se adicionó 2.0 mL de la disolución estándar de API 1 impureza compuesto-D, 2.0 mL de impureza compuesto-E, 2.0 mL de API 1 relacionado-1, 2.0 mL de impureza 17-alcohol y 1.0 mL impureza 21-alcohol. Se adicionó 100 mL de disolvente, se sonicó por 5 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente, para después llevar al aforo con el disolvente y mezclar.

3.3.6 Preparación de fases móviles

Para la solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH=3.0 (disolución A), se disolvieron $1.38 \text{ g} \pm 0.13 \text{ g}$ de fosfato de sodio monohidratado en 1000 mL de agua ultra pura. Se ajustó el pH a 3.00 ± 0.05 con ácido orto-fosfórico, posteriormente, se filtró a través de un filtro de nylon de $0.2 \mu\text{m}$ (Waters), utilizando una bomba de vacío. Se transfirió el filtrado a un reservorio adecuado y se desgasificó por 30 min. La disolución B, acetonitrilo 100 % (grado CLAR), se filtró a través de un

filtro nylon de 0.2 μm (Waters) utilizando una bomba de vacío. Se transfirió el filtrado a un reservorio adecuado y se desgasificó por 15 min.

3.3.7 Preparación de las disoluciones primarias (DP) del estándar del API 1 para el cálculo de LC y LD

Se utilizaron los estándares como se indicó en la sección 3.3.2 (STD 1 y STD 2). Cualquiera de estos se puede tomar como la DP1 del API 1 ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Para la DP2 del API 1, se transfirieron 20 mL de la DP1 a un matraz volumétrico de 200 mL y se aforó con diluyente ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Para la DP3 se transfirieron 20 mL de la DP2 un matraz volumétrico de 200 mL y se aforó con diluyente ($1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Por último, la DP4, se preparó transfiriendo 40 mL de la DP3 a un matraz de 200 mL y se aforó con diluyente ($0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$).

La tabla XV muestra la curva a partir de las disoluciones primarias del estándar de API 1.

Tabla XV. Preparación de las diluciones para el cálculo del LC y LD (el volumen de la disolución primaria usada para cada nivel de concentración se llevó al aforo con diluyente en un matraz volumétrico de 20 mL)

Nivel %	Disol. primaria estándar usada	Volumen de la Disol. primaria estándar usada (mL)	[API 1] $\mu\text{g mL}^{-1}$
20.0	1 _[zc1]	4.0	20.00
10.0	1	2.0	10.00
2.00	2	4.0	2.000
1.00	2	2.0	1.000
0.20	3	4.0	0.200
0.10	3	2.0	0.100
0.09	4	9.0	0.090
0.08	4	8.0	0.080
0.07	4	7.0	0.070
0.06	4	6.0	0.060
0.05	4	5.0	0.050
0.04	4	4.0	0.040
0.03	4	3.0	0.030
0.02	4	2.0	0.020
0.01	4	1.0	0.010

3.3.8 Preparación de las muestras para la evaluación de la linealidad

Se pesaron $80 \text{ mg} \pm 10 \text{ mg}$ del estándar de referencia del API 1, se transfirieron a un matraz volumétrico de 200 mL, posteriormente se adicionaron 150 mL de diluyente y se sonicó durante 5

minutos. Se dejó enfriar y se aforó con diluyente. Se identificó el matraz como disolución primaria de la linealidad del sistema del estándar de API 1 ($400.0 \mu\text{g mL}^{-1}$).

La tabla XVI, contiene las alícuotas que se tomaron de la disolución primaria de la linealidad del sistema preparada, así como las concentraciones obtenidas por cada uno de ellas.

Tabla XVI. Preparación de las muestras para la evaluación de la linealidad

Nivel (%)	Disolución primaria de la linealidad del sistema del estándar de API 1 (mL)	Volumen final (mL)	Concentración final API 1 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
160	8	20.0	160.0
120	6	20.0	120.0
100	5	20.0	100.0
80	4	20.0	80.0
60	3	20.0	60.0

3.3.9 Preparación de las muestras para la evaluación de la precisión del sistema

Por sextuplicado, se pesaron con exactitud $20 \text{ mg} \pm 2 \text{ mg}$ del estándar de referencia del API 1, posteriormente se transfirió cuantitativamente a un matraz volumétrico de 200 mL. Se adicionaron 150.0 mL de diluyente y se sonicó durante 5 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se aforó con el diluyente.

3.3.10 Preparación de las muestras para la evaluación de la precisión del límite de cuantificación (LC)

Se pesaron y prepararon por sextuplicado de forma separada e independiente el estándar de referencia del API 1 a la concentración del límite de cuantificación de acuerdo a los resultados obtenidos en la sección 4.2.2.

3.3.11 Preparación de las muestras para la evaluación de la exactitud del método

Se preparó una disolución adicionada de estándar del API 1 ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$), pesando $50 \text{ mg} \pm 5 \text{ mg}$ de API 1 en un matraz volumétrico de 200 mL, posteriormente se adicionó 150 mL de diluyente, y se sonicaron por 5 minutos y se aforó.

Para el placebo, se pesaron 2.5 g de este, en un tubo de centrifuga al que se le añadió la cantidad de disolución adicionada de estándar del API 1, descrita en la tabla XVII para cada nivel evaluado.

Tabla XVII. Preparación de las muestras para la evaluación de la exactitud del método de API 1 (placebo adicionado).

Nivel (%)	Placebo API 1 (g)	Disolución estándar adicionada de API 1 (mL)	Volumen de diluyente para extracción (mL)	Concentración final ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
160	2.5	16	25	160
120	2.5	12	25	120
100	2.5	10	25	100
80	2.5	8	25	80
60	2.5	6	25	60

3.3.12 Preparación de las muestras para la evaluación de la exactitud del método al límite de cuantificación (LC).

Se preparó una disolución adicionada del estándar del API 1, pesando $20 \text{ mg} \pm 2 \text{ mg}$ de API 1 en un matraz volumétrico de 200 mL que se aforó con diluyente, posteriormente se transfirieron 8.0 mL de esta disolución a un matraz volumétrico de 100 mL y se aforó con diluyente, finalmente se tomaron 10 mL de la última disolución preparada y se transfirieron a un matraz volumétrico de 200 y se aforó con diluyente para alcanzar una concentración de $0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para el placebo, se pesó 2.5 g de este, en un tubo de centrifuga al cual se le añadió la cantidad de solución adicionada de estándar del API 1, descrita en la tabla XVIII para cada nivel evaluado.

Tabla XVIII. Preparación de las muestras para la evaluación de la exactitud del método de API 1 (placebo adicionado) al límite de cuantificación (LC).

Nivel (%)	Placebo API 1 (g)	Disolución estándar adicionada de API 1 (mL)	Volumen de diluyente para extracción (mL)	Concentración final ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
160 LR	2.5	10	25	0.16
120 LR	2.5	8	25	0.12
100 LR	2.5	7	25	0.1
90 LR	2.5	6	25	0.09
80 LR	2.5	5	25	0.08

3.3.13 Preparación de las muestras para la evaluación de la especificidad

Se utilizaron muestras placebo de API 2 y API 3, placebos totales y el producto terminado, que fueron proporcionadas por el departamento de formulaciones de MPDL, se almacenaron bajo las condiciones descritas a continuación:

- A 25 °C durante 28 días.
- A 30 °C durante 28 días.
- A 40 °C durante 28 días.
- Fotólisis: Al menos la cantidad indicada en la guía ICH Q1B "Photostability testing of new drug substances and products", es decir una iluminación total de no menos de 1.2 millones lux horas y una energía del ultravioleta cercano de no menos de 200 watts horas m^{-2} .

3.3.13.1 Preparación de las disoluciones de productos de degradación e impurezas del API 1 para la evaluación de la especificidad.

Las disoluciones de los siguientes productos de degradación y sustancias relacionadas del API 1, se prepararon a la concentración del límite de reporte (0.1% con respecto al 100 % de la concentración del estándar primario del API 1):

- API 1 Compuesto Relacionado 1
- API 1 A-17
- API 1 A-21
- API 1 Relacionado D
- API 1 Epóxido compuesto E.

3.3.14 Preparación de las muestras para la evaluación de la precisión en el nivel de repetibilidad

Se prepararon las disoluciones estándar (STD 1 y STD 2) como se indicó en la sección 3.3.2.

Se preparó por sextuplicado, muestras estresadas de producto terminado como se indica en la sección 3.3.1.

3.3.15 Preparación de las muestras para la evaluación de la precisión intermedia

Se prepararon las disoluciones estándar (STD 1 y STD 2) como se indicó en la sección 3.3.2. De acuerdo con los resultados obtenidos con anterioridad se preparó la disolución del LC (sección 4.2.2) realizando las diluciones adecuadas de una solución primaria del estándar de API 1. Se preparó por sextuplicado, muestras estresadas de producto terminado como se indica en la sección 3.3.1.

3.3.16 Preparación de las muestras para la evaluación de la robustez

Se evaluó la robustez cromatográfica inyectando las siguientes disoluciones:

- Disolución estándar de API 1 al 100% (sección 3.3.2)
- Disolución estándar al límite de cuantificación de API 1 (sección 4.2.2)
- Disolución estándar al límite de reporte de API 1 (sección 3.3.3)
- Disolución de resolución de API 1 (sección 3.3.5)

3.4 Calificación del CLAR

Se procedió como lo indica la versión vigente de la USP en el capítulo general 621 “Adecuabilidad del Sistema en Cromatografía” (Chromatography System Suitability), donde se verificó que el coeficiente de variación (CV), obtenido del factor de respuesta para 5 inyecciones consecutivas del

estándar del API 1 sea $\leq 2\%$. El factor de respuesta se obtuvo mediante las ecuaciones 15 y 16 mientras que el coeficiente de variación fue calculado con la ecuación 17.

$$FR_i = \frac{A_{STD}}{(W_{STD})(FP_{STD})} \times \frac{FD_{STD}}{1}$$

Ecuación 15

$$FR_{PROMEDIO} = \frac{\sum FR_i}{n}$$

Ecuación 16

$$CV = \frac{DE}{FR_{PROMEDIO}} \times 100$$

Ecuación 17

Donde:

FR_i: Factor respuesta de cada inyección de la solución estándar (mL mg⁻¹)

A_{STD}: Área del pico de la disolución estándar del API 1.

W_{STD} = masa del estándar de referencia del API 1 (mg).

FD_{STD} = Factor de dilución del estándar (mL)

FP_{STD} = Factor de pureza del estándar (pureza/100).

FR_{PROMEDIO}: Factor respuesta promedio para el principio activo en los estándares (mL mg⁻¹)

n: Número de inyecciones de estándar realizadas.

CV = coeficiente de variación (porcentaje)

DE = desviación estándar (mL mg⁻¹)

3.4.1 Condiciones finales del análisis por CLAR.

Las condiciones utilizadas en el análisis por CLAR, se describen en la tabla XIX. Se utilizó un sistema de gradientes para separar mejor los componentes, usando las bombas del HPLC, de acuerdo al gradiente descrito en la tabla XIV.

Tabla XIX. Información del sistema cromatográfico utilizado.

Columna:	Symmetry C18 100 x 4.6 mm, 3.5 µm (Waters)
Pre filtro:	Filtro pre-columna MetaSaver de 0.5 µm (VARIAN A6005)
Temperatura de la columna:	40 °C
Temperatura del auto muestreador:	5 °C
Disolución de lavado de la aguja del auto muestreador:	Etanol: Agua 70:30 % v/v
Longitud de onda del detector:	250 nm
Volumen de inyección:	50 µL
Velocidad de flujo:	2.0 mL min ⁻¹
Tiempos de corrida:	70 min
Fase móvil:	Disol. Amortiguadora de fosfato de sodio 0.01 M, pH = 3.0. Acetonitrilo 100 %

3.5 Análisis cualitativo por CLAR

Los picos se identificaron por medio de una serie de inyecciones del diluyente, el estándar de API 1, la disolución de resolución y la inyección de la muestra. De esta manera, también se obtuvieron los tiempos de retención y los tiempos de retención relativos de cada pico identificado. Los últimos, se utiliza frecuentemente con fines cualitativos, se refiere a la razón entre los tiempos de retención corregidos entre un componente y otro que se toma como estándar interno. El tiempo de retención relativo, se calculó por medio de la ecuación 18.

$$t_{rr} = \frac{tr_{ANALITO}}{tr_{ESTÁNDAR INTERNO}}$$

Ecuación 18

Donde:

t_{rr} = tiempo de retención relativo

$tr_{ANALITO}$ = tiempo de retención corregido del analito de interés

$tr_{ESTÁNDAR INTERNO}$ = tiempo de retención corregido del estándar interno.

El estándar interno empleado fue el API 1 y solo se utilizó para el análisis cualitativo.

3.6 Análisis cuantitativo

3.6.1 Evaluación del factor de respuesta en la disolución estándar.

Se calcularon los factores de respuesta individuales (F_{Ri}) de los principios activos, empleando la ecuación 15, posteriormente se calculó el promedio de estos y su coeficiente de variación en toda la regresión empleando las ecuaciones 16 y 17.

3.6.2 Cuantificación del API 1

En este caso, se utilizaron solo las áreas de los picos de las inyecciones de la muestra. Para esto, se calcularon tanto la concentración teórica del API en la muestra, como el porcentaje de esta concentración en la misma, utilizando las ecuaciones 19 y 20.

$$[PA]mg\ g^{-1} = \frac{A_{MTA} \times A_{foro}}{FR_{PROMEDIO} \times W_{MTA}} + \frac{(0.15 \times W_{MTA})}{W_{MTA}}$$

Ecuación 19

$$[PA](\%) = \frac{[PA]mg\ g^{-1}}{[PA]_{TEORICA}mg\ g^{-1}} \times 100$$

Ecuación 20

Donde:

A_{MTA} = Área del pico del principio activo en la muestra.

$FR_{PROMEDIO}$ = Factor respuesta promedio de las inyecciones del STD 1 y STD 2 de API 1 ($mL\ mg^{-1}$)

0.15 = Porcentaje en peso (g/100 g) de excipiente $H_{[zc2]}$ y agua en la fórmula de la crema.

W_{MTA} = Peso de muestra utilizada (g)

$[PA]_{TEORICA}$ = Concentración del principio activo teórico en la muestra ($mg\ g^{-1}$).

3.6.3 Cuantificación de impurezas (productos de degradación)

La ecuación 21 se utilizó para calcular las concentraciones en mg g^{-1} de los productos de degradación y las impurezas identificadas, utilizando el area de cada impureza y el factor de respuesta promedio de los estándares inyectados durante el analisis. Se tuvieron que hacer correcciones en el cálculo de estas concentraciones debido a un excipiente utilizados en la formula, asi como al contenido de agua en la misma. El factor de corrección, se incluye en la formula final. Por medio de la ecuación 22, se calculó el porcentaje de la concentración de cada impureza y finalmente con la ecuación 23, se hizo una suma del porcentaje de cada una de las impurezas halladas.

$$[IMPUREZA_{PA}] \text{mg g}^{-1} = \frac{A_{IMP} \times A_{foro}}{FR_{PROMEDIO} \times W_{MTA}} + \frac{(0.15 \times W_{MTA})}{W_{MTA}} \times \frac{1}{FRR_{IMP}} \quad \text{Ecuación 21}$$

$$[IMPUREZA_{PA}] (\%) = \frac{[IMPUREZA_{PA}] \text{mg g}^{-1}}{[PA]_{TEORICA} \text{mg g}^{-1}} \times 100 \quad \text{Ecuación 22}$$

$$[IMPUREZAS_{TOTALES}] (\%) = \sum [IMPUREZA_{PA}] \quad \text{Ecuación 23}$$

Donde:

A_{IMP} = Área del pico individual de la impureza del principio activo (producto de degradación y/o sustancia relacionada).

$FR_{PROMEDIO}$ = Factor respuesta promedio de las inyecciones del STD 1 y STD 2 de API 1 (mL mg^{-1})

0.15 = Porcentaje en peso ($\text{g}/100 \text{ g}$) de excipiente H y agua en la fórmula de la crema.

W_{MTA} = Peso de muestra utilizada (g)

FD_{MTA} = Factor de dilución de la muestra (mL)

FRR_{IMP} = Factor de respuesta relativa de la impureza del principio activo (si no se conoce, atribuir 1.0).

$[IMPUREZA_{PA}] (\%)$ = Porcentaje de la impureza individual del principio activo (producto de degradación y/o sustancia relacionada) expresadas en % (masa/masa).

$[PA]_{TEORICA}$ = Concentración del principio activo teórico en la muestra (mg g^{-1}).

[IMPUREZAS_{TOTALES}] (%) = Sumatoria de las impurezas individuales del principio activo expresadas en % (masa/masa)

3.7 Metodología para la evaluación de los parámetros de validación

3.7.1 Linealidad del sistema

De acuerdo a lo especificado en la ICH Q2A y Q2B la linealidad del sistema se midió con 5 concentraciones diferentes de estándar por triplicado. En este caso, se tomaron concentraciones de 60, 80, 100, 120 y 160 % con respecto al 100% de la disolución estándar de API 1 que se preparó a 100 µg/mL⁻¹ y se utilizó como estándar externo.

La preparación de las muestras se describe en la sección 3.3.8.

Se realizó una curva de calibración con los datos obtenidos en esta prueba, uno de los puntos de esa curva (concentración 100 % del estándar del API 1) se utilizó como estándar externo, para esta y las demás pruebas llevadas a cabo. La linealidad de esta curva se evaluó mediante el coeficiente de correlación de Pearson (r) y el análisis de varianza (ANOVA) (sección 1.14.3). El cálculo del coeficiente de correlación (r) se hizo mediante la ecuación 24. Posteriormente, se evaluó este coeficiente mediante el estadístico t utilizando la ecuación 8.

$$r = \frac{\sum xy}{\sqrt{\sum x^2} \sqrt{\sum y^2}}$$

Ecuación 24

Donde:

$$x = X_i - X$$

$$y = Y_i - Y$$

3.7.2 Límites de cuantificación y detección (LC y LD)

Para calcular los límites de cuantificación y detección se compara la señal producida por una muestra con la señal de ruido del sistema (relación señal/ruido), de esa manera se puede establecer la mínima concentración donde el API 1 puede ser detectado y cuantificado confiablemente.

La preparación de las muestras para esta prueba se describe en la sección 3.3.7. Se preparó por triplicado cada nivel de concentración, iniciando con el 20 % del 100 % de la concentración del estándar del API 1 (100.00 µg mL⁻¹), y se continuó con diluciones hasta la concentración mínima que el sistema cromatográfico detecte de acuerdo a la sensibilidad del mismo. La ecuación 25 indica como calcular la concentración de cada nivel evaluado.

$$Disolución I [PA] \frac{ng}{mL} = \frac{w_r PA \times Alícuota 1 \times Alícuota Final \times 1000000}{Aforo \times Aforo 1 \times Aforo Final} \quad \text{Ecuación 25}$$

Donde:

[PA] ng mL⁻¹ = Concentración para el principio activo en nanogramos por mililitro en el estándar.
w_rPA = Peso real del estándar de referencia del principio activo (mg).

El LC y LD se calculó se acuerdo a lo establecido en la sección 1.14.7 de dos maneras.

Primeramente se calcularon las concentraciones al LC y LD mediante una relación entre las señales obtenidas mediante CLAR y el promedio del ruido en el sistema, utilizando la ecuación 26:

$$Relación \frac{señal}{ruido} = \frac{Altura del pico}{Promedio del ruido} \quad \text{Ecuación 26}$$

Una relación señal/ruido de 3, se considera aceptable para la medición del límite de detección. En el caso del límite de cuantificación se acepta una relación señal/ruido de 10.

Para el cálculo de los límites de cuantificación y detección mediante un análisis estadístico de acuerdo a lo establecido en la sección 1.14.7 se utilizan las ecuaciones 27-30 descritas a continuación:

$$A = \frac{Q_{xy}}{Q_{xx}} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Ecuación 27}$$

$$B = \bar{y} - A\bar{x} \quad \text{Ecuación 28}$$

$$S_0 = \frac{S_{yx}}{A} = \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_{xx}}} \quad \text{Ecuación 29}$$

$$S_{yx} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

Ecuación 30

Donde:

A= pendiente de la recta

B=ordenada al origen de la recta

x_i = concentración en cada nivel evaluado

y_i = respuesta en cada nivel evaluado

\bar{x} = promedio de las concentraciones en cada nivel evaluado

\bar{y} = promedio de las respuestas en cada nivel evaluado

\hat{y} = respuesta estimada en cada nivel evaluado

n=número de datos

Una vez calculados los mencionados datos estadísticos, se utilizaron las ecuaciones 13 y 14 para el cálculo del LC y LD.

3.7.3 Precisión del Sistema

Se evaluó la precisión del sistema con el coeficiente de variación de un total de 6 soluciones estándar del API 1 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ que se pesaron y prepararon de manera individual (precisión del estándar). La precisión de la medición se midió inyectando 10 veces una de las muestras utilizadas para la precisión del estándar. La preparación de las muestras se describe en la sección 3.3.9.

Para el reporte de resultados, se utilizó la ecuación 31 para calcular el coeficiente de variación.

$$CV = \frac{DE}{FR_{PROMEDIO}} \times 100$$

Ecuación 31

Donde:

DE = desviación estándar de los datos.

$FR_{PROMEDIO}$ = Factor de respuesta promedio de las inyecciones del STD1 y STD2 de API1 (mL mg^{-1})

3.7.4 Precisión del sistema al límite de cuantificación

Se evaluó la precisión del sistema al límite de cuantificación con el coeficiente de variación de un total de 6 soluciones estándar del API 1 a la concentración del límite de cuantificación que se pesaron y prepararon de manera individual (precisión del estándar).

La precisión de la medición se midió inyectando 10 veces una de las muestras utilizadas para la precisión del estándar. La preparación de las muestras se describe en la sección 3.3.10. La precisión del sistema se evalúa mediante el coeficiente de variación obtenido de las inyecciones realizadas de acuerdo a la ecuación 31.

3.7.5 Exactitud del método (Placebo Adicionado)

Se verificó la exactitud del método con placebo de API 1 en el rango de 60, 80, 100, 120 y 160% de la concentración analítica de la disolución estándar $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. La preparación de las muestras se describe en la sección 3.3.12. Cada nivel evaluado se preparó por triplicado. Se utilizaron las ecuaciones 32-36 para el cálculo de las concentraciones de estándar añadidas y recobradas. Así como la concentración añadida y recobradas de acuerdo la concentración del principio activo indicada en el marbete del producto, que en este caso es de 1 mg.

$$[P.A] \text{ Adicionada } (\mu\text{g mL}^{-1}) = \frac{W_r P.A \text{ Ad. } \times \text{Alícuota final}}{\text{Aforo final}} \quad \text{Ecuación 32}$$

$$[P.A] \text{ Recobrada } (\mu\text{g mL}^{-1}) = \frac{A.P.A.M \times 1000}{FR_{\text{PROMEDIO}} P.A} \quad \text{Ecuación 33}$$

$$[P.A.] \text{ Adicionado marbete } (mg) = \frac{[P.A.] \text{ Adicionada } (\mu\text{g mL}^{-1}) \times [P.A] \text{ teórico marbete } (mg)}{[P.A.] \text{ estándar teórico } \mu\text{g mL}^{-1}} \quad \text{Ecuación 34}$$

$$[P.A.] \text{ Recobrada marbete } (mg) = \frac{[P.A.] \text{ Recobrada } (\mu\text{g mL}^{-1}) \times [P.A] \text{ teórico marbete } (mg)}{[P.A.] \text{ estándar teórico } \mu\text{g mL}^{-1}} \quad \text{Ecuación 35}$$

$$[P. A.] \text{ Marbete } \% = \frac{[P. A.] \text{ Recobrada marbete (mg)} \times 100}{[P. A.] \text{ Adicionada marbete (mg)}}$$

Ecuación 36

Donde:

[P.A.] Adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$): Concentración adicionada del principio activo en la muestra.

Wr P.A. Ad. : Peso real del estándar de referencia del principio activo adicionado (mg).

[P.A.] Recobrada ($\mu\text{g mL}^{-1}$): Concentración recobrada del principio activo en la muestra.

A P.A.M: Área del pico del principio activo en las muestra.

FR_{PROMEDIO} P.A.: Factor respuesta promedio para el principio activo en los estándares.

[P.A.] Adicionada Marbete (mg): Concentración adicionada del principio activo en la muestra con respecto al marbete.

[P.A.] teórico marbete (mg): Concentración teórica del principio activo indicada en el marbete.

[P.A.] estándar teórico ($\mu\text{g mL}^{-1}$): Concentración teórica del principio activo en el estándar.

[P.A.] Recobrada marbete (mg): Concentración recobrada del principio activo en la muestra con respecto al marbete.

[P.A.] marbete (%): Concentración recobrada en por ciento del principio activo en la muestra con respecto al marbete.

Se calcula el coeficiente de variación de acuerdo a la ecuación 31, para los datos de concentración añadida y recobrada de acuerdo a la concentración en marbete (mg), así como la ecuación de la recta al graficar las concentraciones añadidas vs las concentraciones recobradas.

3.7.6 Exactitud del método (placebo adicionado) al límite de cuantificación

Se verificó la exactitud del método al LC con placebo de API 1 en el rango de 80, 90, 100, 120 y 160% de la concentración analítica de la disolución al límite de reporte $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$. La preparación de las muestras se describe en la sección 3.3.12. Cada nivel evaluado se preparó por triplicado. Se utilizaron las ecuaciones 32-36 para el cálculo de las concentraciones de estándar añadidas y recobradas. Así como la concentración añadida y recobradas de acuerdo la concentración del principio

activo indicada en el marbete del producto, que en este caso es de 1 mg. Se calcula el coeficiente de variación de acuerdo a la ecuación 31, para los datos de concentración añadida y recobrada de acuerdo a la concentración en marbete (mg), así como la ecuación de la recta al graficar las concentraciones añadidas vs las concentraciones recobradas.

3.7.7 Especificidad

En esta prueba se utilizaron dos detectores diferentes, uno de arreglo de fotodiodos (PDA por sus siglas en ingles) para obtener la pureza de los picos cromatográficos, mientras que en uno de UV/VIS, se evaluaron estos mismos picos de interés, pero con respecto a sus tiempos de retención y de retención relativa.

La preparación de las muestras se describe en la sección 3.3.13. Se prepararon las disoluciones estándar (STD 1 y STD 2) y la disolución de resolución como se indicó en la sección 3.3.2 y 3.3.3 respectivamente.

Los cromatogramas obtenidos en el detector de arreglo de diodos se procesaron con los parámetros descritos en la tabla XX. La prueba que se realizó por medio de este detector consiste en verificar si una señal es espectralmente pura, es decir, si solo representa a un compuesto. El software (Empower PRO ©), utiliza la técnica de contraste espectral, tanto para establecer la igualación de espectros como para probar la homogeneidad en la elución de un compuesto. Para ello convierte los espectros en vectores y compara el espectro de un analito con espectros conocidos, detecta la coelución comparando todos los espectros dentro de un pico y determina el número de compuestos espectralmente diferentes dentro de éste. Cuatro valores de ángulos cuantifican lo anterior, los que pueden variar entre 0° y 90°. Los ángulos de pureza y umbral de pureza representan la calidad de la separación. Como regla general, siempre que el ángulo de umbral sea mayor que el de pureza, significara que no hay evidencia espectroscópica de coelución.

Tabla XX. Parámetros para evaluar la pureza de los picos cromatográficos.

Parámetros de pureza		Parámetros de contraste espectral
Pureza disponible:	√	Rango del barrido (nm)
Región del pico activo (%)	100	200-400

Criterio del umbral:	Auto	Intervalo de tiempo de ruido (min): Sera determinado durante la prueba
Angulo del disolvente (grados):	1.00	
Pases de pureza	4	

3.7.8 Precisión del Método (repetibilidad)

La Precisión del método (repetibilidad), se calculó obteniendo el % de recobro y el coeficiente de variación en 6 muestras preparadas independientemente para la valoración del API 1 y cuantificación de sus productos de degradación y/o impurezas relacionadas en el producto terminado estresado. El producto terminado debe estar degradado entre un 5.0-10.0 %. La preparación de las muestras se describe en la sección 3.3.15.

3.7.9 Precisión del método (precisión intermedia)

Se evaluó por dos analistas al valorar el API 1, así como la cuantificación de sus productos de degradación y/o impurezas relacionadas en diferentes días, disoluciones, columnas y equipos. El API 1 en el producto terminado debe estar degradado entre un 5.0-10.0 %. La preparación de las muestras se describe en la sección 3.3.16. Cada analista, deberá pesar 6 muestras en días diferentes (3 el día 1 y 3 el día 2). Las muestras deben analizarse de acuerdo como se indica en la tabla XXVI.

Tabla XXI. Variables a evaluar en la Precisión Intermedia del método.

Analista	Día	Equipo	Columna
A	1	a	β
A	2	b	α
B	1	b	α
B	2	a	β

3.7.10 Robustez

La robustez del método se determinó mediante la evaluación de los parámetros cromatográficos críticos de la disolución estándar y de la disolución de resolución haciendo variaciones deliberadas en los parámetros del sistema cromatográfico dentro de un intervalo establecido.

La preparación de las muestras se describe en la sección 3.3.15. Estas inyecciones se realizaron modificando diferentes variables cromatográficas indicadas en la tabla XXII, para determinar la medida en la que se ven afectados los siguientes parámetros (simetría, resolución, platos teóricos, factor de capacidad, tiempo de retención), con la finalidad de evaluar su impacto en la metodología analítica.

Tabla XXII. Variables cromatográficas para evaluar la robustez del método.

Parámetros CLAR	Rango de variable		
Columna	3 diferentes números de serie o lote.		
Velocidad de flujo (mL/min)	1.8	2.0	2.2
Buffer de fosfatos (M)	0.009	0.01	0.011
pH de la disolución A	4.5	3.0	3.5
Temperatura de la columna (°C)	35	40	45

Se prepararon las soluciones de estándar (STD 1 y STD 2) como se indicó en la sección 3.3.2. De acuerdo con los resultados obtenidos con anterioridad se preparó la solución del LC realizando las diluciones adecuadas de una solución primaria del Estándar de API 1.

4.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis Cualitativo

La figura 20 presenta los conjuntos de cromatogramas del diluyente (A), estándar del API 1 al límite de reporte $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (B), estándar del API 1 $100.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ (C), disolución de resolución del API 1 $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ (D) y una muestra de ungüento estresada a 45°C por 28 días (E). Los tiempos de retención y tiempos de retención relativos al API 1, se presentan en la tabla XXIII.

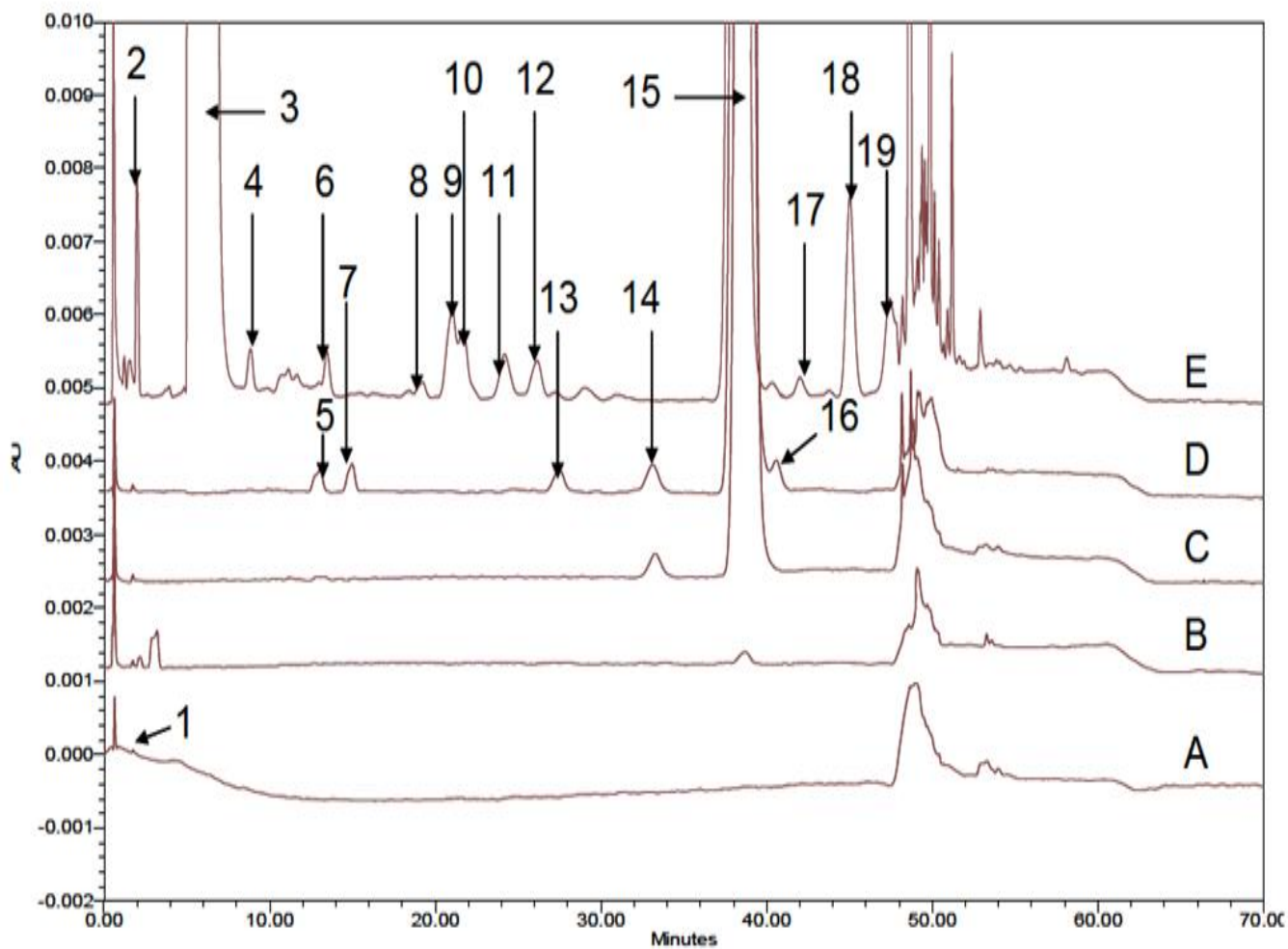


Figura 20. Cromatograma tipo para el método de cuantificación del API 1 y sus productos de degradación. A) Diluyente, B) disolución estándar al límite de reporte para el API 1 C) disolución estándar del API 1, D) disolución de resolución para el API 1, E) muestra estresada a 45°C /75 % humedad relativa por 28 días.

Tabla XXIII. Identificación de señales para el API 1, con sus tiempos de retención y tiempos de retención relativos.

Señal	Identificación	Tiempo de retención (min)	Tiempo de retención Relativo (trr)
1	Diluyente + Pico-1 de Excipientes	1.76	0.046
2	Excipiente H Pico-1	2.01	0.053
3	API 3 + Degradado de API 2 -1 + Excipiente L Pico-1	5.23	0.137
4	Degradado de API 3 Pico-1	8.86	0.231
5	API 1 Imp. A-21	13.06	0.341
6	Excipiente H Pico-2 + Excipiente P Pico-2 + Degradado de API 2 Pico-2	13.47	0.352
7	API 1 Imp. A- 17	14.98	0.391
8	Degradado de API 2 Pico-3	19.22	0.502
9	Degradado de API 2 Pico-4	21.03	0.550
10	Degradado de API 2 Pico-5	21.75	0.568
11	Degradado de API 3 Pico-2	24.19	0.632
12	Degradado de API 2 Pico-6	26.15	0.683
13	API 1 Compuesto Relacionado 1	27.49	0.718
14	API 1 Compuesto D	33.12	0.865
15	API 1	38.28	1.000
16	API 1 EE	40.39	1.055
17	Degradado de API 2 Pico-7	42.01	1.097
18	Degradado de API 2 Pico-8	45.02	1.176
19	Degradado de API 2 Pico-9	47.37	1.237

4.2 Análisis cuantitativo

4.2.1 Linealidad

La figura 21 muestra la curva de calibración obtenida, así como la ecuación de la recta y su coeficiente de determinación (R^2) con un valor de 0.9999.

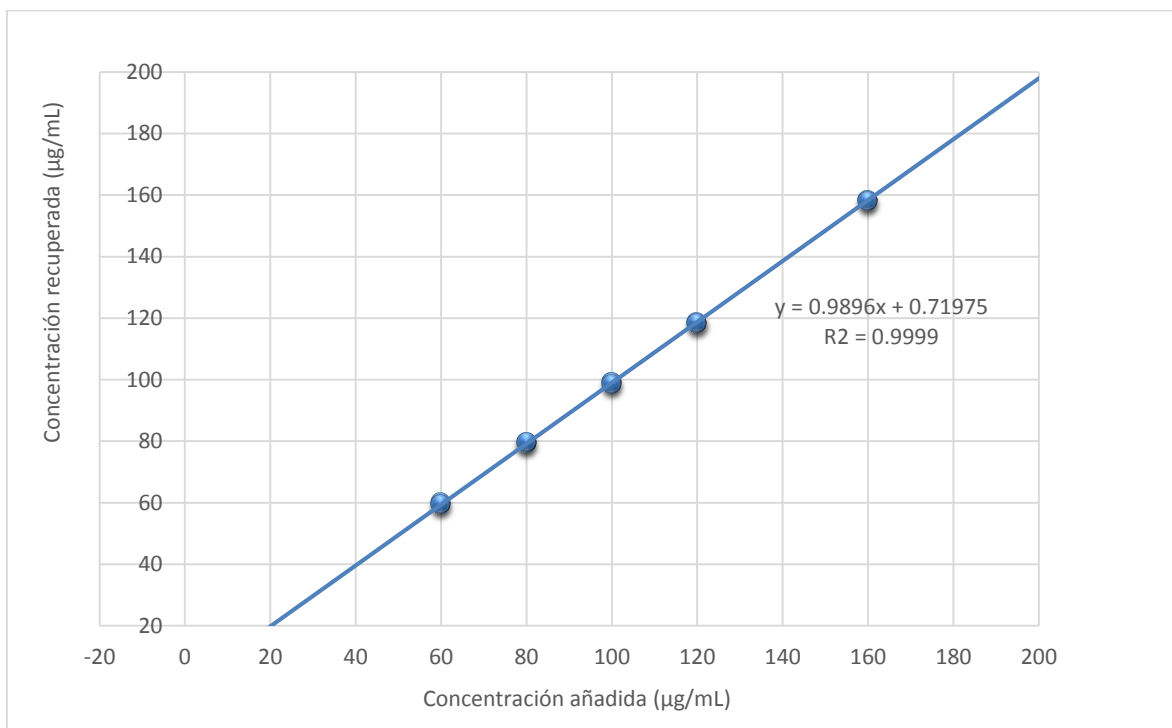


Figura 21. Curva de calibración del método.

El coeficiente de correlación de Pearson (r) se determinó mediante la ecuación 30. A pesar de ser alto e indica la linealidad de los datos, es necesario evaluar también mediante un análisis de varianza (ANOVA) (sección 1.14.3).

$$r = \frac{17782.1492}{\sqrt{17782.15}\sqrt{17196.64}} = 0.99997$$

Finalmente, se obtuvo el estadístico de t_{cal} sustituyendo en la ecuación 8:

$$t = \frac{|0.99997|\sqrt{15-2}}{\sqrt{1-0.99997^2}} = 483.897523$$

El valor de t_{tab} a un nivel de significancia p , de 0.05 es de 2.92 por lo que se rechaza la hipótesis nula de la sección 1.14.3 y al aceptar la hipótesis alterna por consecuencia, existe una correlación lineal entre la respuesta del detector y la masa del analito.

Una vez, evaluado el coeficiente de correlación, se prosiguió al cálculo de la F_{cal} ("F de Fischer"), para la evaluación de la linealidad mediante ANOVA. Los cálculos se muestran en la tabla XXIV.

Tabla XXIV. Cálculos previos para obtener F_{cal}

Nivel de concentración %	Muestra			$(x_1-x_1)^2$	$(x_2-x_2)^2$	$(x_3-x_3)^2$	
	1	2	3				
60	60.03	59.6	59.62	467.381161	470.239225	468.809104	
80	79.74	79.33	79.83	138.391696	139.7124	133.333209	
100	99.22	99.13	98.69	4.096576	3.6864	4.481689	
120	118.84	118.47	118.47	60.621796	60.0625	60.419529	
160	158.51	158.32	158.01	762.919641	765.905625	758.616849	Estimación interna
Suma	516.34	514.85	514.62	1433.41087	1439.60615	1425.66038	1432.892467
Medias muestrales	103.268	102.97	102.924				
s^2 medias muestrales	0.034876						
n	15						
Estimación intermitente	0.52314						

Al sustituir los resultados obtenidos mediante ANOVA, en la ecuación 10, se tiene que:

$$F_{\text{cal}} = \frac{S_e^2}{S_r^2} = \frac{1432.8924}{0.52314} = 2739.023$$

El valor F_{tab} a un nivel de significancia p , de 0.05 es de 3.23, por lo que se sugiere el rechazo de la hipótesis nula y se concluye que el modelo es lineal.

4.2.2 Límites de Cuantificación y Detección

Para el cálculo de los límites de cuantificación y detección, se procedió como se indica en la sección 3.7.1. En la tabla XXV se encuentran los datos de área, altura y ruido obtenidos mediante CLAR, así como la concentración de cada nivel evaluado, calculado con la ecuación 24.

Tabla XXV. Límite de cuantificación y detección para el API 1.

						Relación s/r
Nivel de concentración /repetición	[ng/mL]	área	altura	Ruido sistema	Relación señal/ruido	Promedio
	API 1					
20.0 % - 1	20159.8	1450355	36954	10	2640	2644.67
20.0 % - 2	20159.8	1451196	37268	8	2662	
20.0 % - 3	20159.8	1449594	36847	23	2632	
10.0 % - 1	10079.9	730007	18059	17	1290	1291.67
10.0 % - 1	10079.9	730331	18034	11	1288	
10.0 % - 1	10079.9	723197	18161	14	1297	
2.0 %-1	2016.0	144372	3565	16	255	260.00
2.0 %-2	2016.0	146384	3650	14	261	
2.0 %-3	2016.0	143537	3698	5	264	
1.0 %-1	1008.0	71371	1803	19	129	130.67
1.0 %-2	1008.0	72096	1840	9	131	
1.0 %-3	1008.0	71940	1852	11	132	
0.2 %-1	201.6	14881	376	19	27	25.67
0.2 %-2	201.6	14092	368	11	26	
0.2 %-3	201.6	10970	330	22	24	
0.1 %-1	100.8	8498	200	24	14	13.67
0.1 %-2	100.8	6982	190	21	14	
0.1 %-3	100.8	6231	176	11	13	
0.09 %-1	90.7	5345	160	12	11	11.33

0.09 %-2	90.7	3411	173	17	12	
0.09 %-3	90.7	6494	158	12	11	
0.08 %-1	80.6	5853	142	11	10	10.00
0.08 %-2	80.6	5308	137	8	10	
0.08 %-3	80.6	5056	145	15	10	
0.07 %-1	70.6	4294	121	23	9	9.33
0.07 %-2	70.6	6027	157	14	11	
0.07 %-3	70.6	4411	114	15	8	
0.06 %-1	60.5	4483	125	12	9	8.33
0.06 %-2	60.5	5010	117	13	8	
0.06 %-3	60.5	4570	111	7	8	
0.05 %-1	50.4	3944	93	13	7	7.00
0.05 %-2	50.4	2987	87	13	6	
0.05 %-3	50.4	4267	108	10	8	
0.04 %-1	40.3	2430	147	11	11	7.00
0.04 %-2	40.3	1499	49	11	4	
0.04 %-3	40.3	2606	78	20	6	
0.03 %-1	30.2	777	33	10	2	3.00
0.03 %-2	30.2	1545	46	12	3	
0.03 %-3	30.2	2260	59	8	4	
0.02 %-1	20.2	1347	35	14	3	2.67
0.02 %-2	20.2	1964	48	6	3	
0.02 %-3	20.2	788	32	5	2	
0.01 %-1	10.1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
0.01 %-2	10.1	N/A	N/A	N/A	N/A	
0.01 %-3	10.1	872	33	11	2	

Como se establece en la sección 3.7.1, un criterio para la obtención del LC-LD, es la relación señal/ruido. En este caso, se tomó un promedio del ruido observado en el equipo, que fue de 14, este

valor se utilizó para obtener los valores de la relación señal/ruido, de acuerdo a la ecuación 25. De esta manera, se calcularon las relaciones señal/ruido (s/r) para cada uno de los niveles evaluados (tabla XXX) y se obtuvo una s/r de 3, para el nivel de concentración al 0.03 % del 100 % del estándar del API 1, es decir **30 ng mL⁻¹**. En el caso del límite de cuantificación, le corresponde un valor de s/r de 10, que en este caso corresponde a una concentración de 0.08 % del 100 % del estándar de API 1, es decir **80 ng mL⁻¹**.

En la misma sección se establece otra manera de calcular el LC-LD, en función de la desviación estándar de la concentración predicha para una muestra blanco (S_0). De acuerdo a las ecuaciones 26-29, se estimó el valor de S_0 .

El anexo 3 contiene los cálculos previos para la obtención del límite de cuantificación y límite de detección por medio de un análisis estadístico. Una vez, que se obtuvieron estos datos, se calcularon cada una de las ecuaciones 25-28, los resultados se resumen en la tabla XXVI.

Tabla XXVI. Análisis estadístico LC-LD

Pendiente de la recta	$A = \frac{Q_{xy}}{Q_{xx}} = \frac{1.69 \times 10^8}{1.29 \times 10^9} = 0.1306$
Ordenada al origen de la recta	$B = 316.07 - 0.1306(2429.25) = -1.307$
Desviación estándar de los residuales de la regresión	$S_{yx} = \sqrt{\frac{2863.28}{40}} = 8.461$
Desviación estándar de la concentración predicha para una muestra blanco	$S_0 = \frac{8.461}{0.1306} \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{40} + \frac{5.9 \times 10^6}{1.292 \times 10^9}} = 7.356$

Por lo tanto, al sustituir las ecuaciones 13 y 14 se tiene que:

$$LD = 24.2740 \text{ ng mL}^{-1}$$

$$LC = 73.56 \text{ ng mL}^{-1}$$

En la primera manera de cálculo del LD y LC se contemplan únicamente errores de tipo I, como la concentración correspondiente a una relación señal/ruido igual a 3 e igual a 10. Sin embargo esta definición ha sido abandonada por la IUPAC, debido a que no contempla los errores de tipo II, es decir, es probable que los resultados obtenidos de esta manera arrojen falsos negativos al admitir que el analito está presente cuando no lo está. Debido a esto, los valores de LD y LC obtenidos mediante un análisis estadístico son más confiables. Sin embargo, es importante añadir que para los fines del desarrollo de métodos para medicamentos, la reglamentación y guías internacionales en la actualidad usan el primer método de cálculo y lo consideran válido.

4.2.3 Precisión del sistema analítico

La precisión se evaluó conforme a lo descrito en la sección 3.7.3, el coeficiente de variación se calculó de acuerdo a la ecuación 28. La tabla XXVII muestra el cálculo previo, en donde se corrigen los pesos del estándar, de acuerdo a su pureza, que en este caso, para el API 1, es de 99.9 %, por lo tanto para obtener el peso corregido es necesario multiplicar el peso por 99.9 y dividirlo por 100.

Tabla XXVII. Cálculos previos para la precisión del sistema

Identificación	Peso (W)	Peso con FC (mg)	Peso real Wr (mg)	Área
Estándar	(mg)			
1	20.13	20.13	20.10987	7478224
2	20.14	20.14	20.11986	7457060
3	20.13	20.13	20.10987	7433507
4	20.11	20.11	20.08989	7411135
5	20.13	20.13	20.10987	7420623
6	20.13	20.13	20.10987	7342830

Las tablas XXVIII y XXIX contienen los resultados obtenidos tanto para la precisión del sistema (estándar), como para la precisión de la medición. Los coeficientes de variación obtenidos son 0.6 % y 0.1 % respectivamente. De acuerdo a procedimientos internos, un coeficiente menor o igual al 1.5% es un criterio aceptable de precisión del sistema. Por lo tanto, se considera que el sistema posee una precisión adecuada. En el caso de la precisión de la medición, se considera un criterio aceptable un CV% menor o igual a 1.0 %, de la misma manera, los datos obtenidos cumplen con el criterio establecido.

Tabla XXVIII. Precisión del sistema

Muestra de estándar	API 1
	Área/peso
1	371868
2	370632
3	369645
4	368899
5	369004
6	365136
Promedio áreas	369197
CV %	0.6

Tabla XXIX. Precisión de la medición.

Muestra de estándar	API 1
	Área
1	7386310
2	7399942
3	7393026
4	7401637
5	7383896
6	7403619
7	7402010
8	7397810
9	7408187
10	7415532
Promedio áreas	7399197
CV %	0.1

4.2.3.1 Precisión del límite de cuantificación

La precisión al límite de cuantificación se evaluó conforme a lo descrito en la sección 3.7.4 y el coeficiente de variación se calculó de acuerdo a la ecuación 31. Las tablas XXX y XXXI contienen los resultados obtenidos tanto para la precisión del sistema (estándar), como para la de la medición. Los coeficientes de variación obtenidos son 0.5 % y 0.2 % respectivamente. De acuerdo a procedimientos internos, un coeficiente menor o igual al 10 % es un criterio aceptable al LC. Por lo tanto, se considera que se cumple a concentraciones bajas, esto es importante porque los productos de degradación e impurezas, se encuentran dentro de estos rangos de concentración, por lo que se puede decir que estos se cuantifican con precisión.

Tabla XXX. Precisión del sistema

Muestra de estándar	API 1
	Área/peso
1	296997
2	293614
3	295718
4	296396
5	297947
6	295474
Promedio área/peso	296024
CV %	0.5

Tabla XXXI. Precisión de la medición.

Inyección del estándar	API 1
	Área
1	5954133
2	5955454
3	5957704
4	5949895
5	5932401
6	5963809
7	5953587
8	5959566
9	5961676
10	5967144
Promedio áreas	5955537
CV %	0.2

4.2.3.2 Precisión del método (repetibilidad)

La repetibilidad se evaluó conforme a lo descrito en la sección 3.7.8. Se utilizó una muestra estresada a 50 ° C haciendo preparaciones por sextuplicado. La tabla XXXII, muestra los resultados obtenidos, el cálculo de la concentración del API 1 en $mg\ g^{-1}$, se realizó mediante la ecuación 19. El cálculo del porcentaje de recobro, se obtuvo mediante la ecuación 20.

A continuación se ejemplifica el cálculo realizado para la muestra 1, utilizando el $FR_{PROMEDIO}$ obtenida para este análisis de 74652470 y una concentración teórica del API 1 de $1.0\ mg\ g^{-1}$.

$$[PAM]\ mg\ g^{-1} = \frac{7697233 \times 25}{74652470 \times 2.50082} + \frac{0.15 \times 2.50082}{2.50082} = 1.0462\ mg\ g^{-1}$$

$$[P. A. M]\% = \frac{1.0462 \text{ m}g g^{-1} \times 100}{1.0 \text{ m}g g^{-1}} = 104.6 \%$$

Tabla XXXII. Repetibilidad del método.

Muestra estresada	Cantidad muestra	API 1		
		Área	(m $g g^{-1}$)	% Recobro
Muestra-1	2.50082	7697233	1.0462	104.6
Muestra-2	2.50082	7594581	1.0323	103.2
Muestra-3	2.50096	7656522	1.0406	104.1
Muestra-4	2.50077	7604921	1.0337	103.4
Muestra-5	2.50087	7546847	1.0257	102.6
Muestra-6	2.50099	7556823	1.0271	102.7
		Promedio	1.0	103.4
		DE	0.0079	0.7898
		CV (%)	0.8	0.8

El coeficiente de variación obtenido para los datos de precisión intermedia es de 0.8 %, un CV menor o igual a 2.0%, se considera un criterio aceptable de acuerdo a procedimientos internos, por lo que el método cumple con el parámetro de repetibilidad.

4.2.3.3 Precisión intermedia del método.

La precisión intermedia se evaluó conforme a lo descrito en la sección 3.11. La tabla XXXIII, resume los resultados obtenidos en la prueba. El porcentaje de recobro recuperado, se calculó mediante las ecuaciones 35 y 36. El factor de respuesta individual, el factor de respuesta promedio y el coeficiente de variación, se calcularon mediante as ecuaciones 15, 16 y 17.

Tabla XXXIII. Precisión intermedia del método.

API 1			
Muestra	Día	Porcentaje de recobro (%)	
		Analista 1	Analista 2
1	1	101.9	101.3
2	1	102.0	101.7
3	1	102.5	101.7
1	2	98.6	98.6
2	2	99.0	98.6
3	2	101.3	99.6
Promedio (n=6)		100.9	100.2
CV % (n=6)		1.6	1.5
Diferencia absoluta recobro API 1		0.6	
CV % (n=12)		1.5	

El coeficiente de variación para el promedio de los porcentajes de recobro para cada analista fue de 1.6 % y 1.5 % respectivamente, la ICH (1996), recomienda que el coeficiente de variación para esta prueba sea menor o igual al 2.0 %, en el caso del coeficiente de variación de las muestras del analista 1 y 2, se recomienda un CV, menor o igual a 3.0%, en este caso, se obtuvo un valor de 1.5%, por lo que se concluye que el método cumple con la prueba de precisión intermedia.

4.2.4 Exactitud

La exactitud del método, se evaluó de acuerdo a lo establecido en la sección 3.12. Se verificó en el rango de 60 a 160% de una concentración de 100 µg mL⁻¹. La tabla XXXIV, resume los resultados obtenidos para esta prueba, con tres repeticiones para cada nivel evaluado, se reporta la cantidad de API 1 adicionado al placebo y la cantidad recobrada en mg, así como el porcentaje de recobro, calculados de acuerdo a las ecuaciones 33-36.

Tabla XXXIV. Exactitud del método (placebo adicionado).

API 1			
Nivel %	Adicionado (mg)	Recobrado (mg)	Porcentaje de recobro (%)
60	0.601	0.617	102.5
	0.601	0.613	101.9
	0.601	0.615	102.2
80	0.802	0.789	98.5
	0.802	0.796	99.2
	0.802	0.794	99.0
100	1.002	0.996	99.4
	1.002	0.992	99.0
	1.002	0.993	99.1
120	1.203	1.182	98.3
	1.203	1.181	98.2
	1.203	1.180	98.1
160	1.604	1.579	98.5
	1.604	1.580	98.5
	1.604	1.573	98.1
Recobro promedio		99.4	
Recobro mínimo		98.1	
Recobro máximo		102.5	
CV %		1.5	

El coeficiente de variación para la prueba de exactitud es de 1.5 %, un CV menor o igual a 2.0%, se considera un criterio aceptable de acuerdo a procedimientos internos, por lo que este criterio se cumple satisfactoriamente, en el caso de los porcentajes de recobro, se obtuvo un dato promedio de 99.7 % con un mínimo de 98.1 y un máximo de 102.5 % de API 1 recobrado. La ICH recomienda

mantenerse en recobros con un error relativo de $\pm 2\%$, es decir entre un 98-102 %, por lo cual se puede concluir que se está cumpliendo con el criterio establecido.

La figura 22 muestra una gráfica de los datos de concentración añadida vs los de concentración recobrada durante este análisis, en la tabla XXXV se muestran los criterios establecidos en protocolos internos para los datos estadísticos obtenidos de la regresión lineal de los datos graficados.

Tabla XXXV. Datos estadísticos para los datos obtenidos para la evaluación de la exactitud del método y los criterios de aceptación establecidos.

Ecuación de la recta			y = 0.96 x + (0.02766)		
Numero de datos (n)	Ordenada al origen (a)	Respuesta promedio al 100 %	Coefficiente de correlación al cuadrado (r ²)	Pendiente	a% con respecto a la respuesta promedio al 100%
15	0.0283	7470044	1.000	1.04	0.0
Criterio de aceptación		≥	0.999	0.95	-3.0
		≤	1.05	+ 3.0

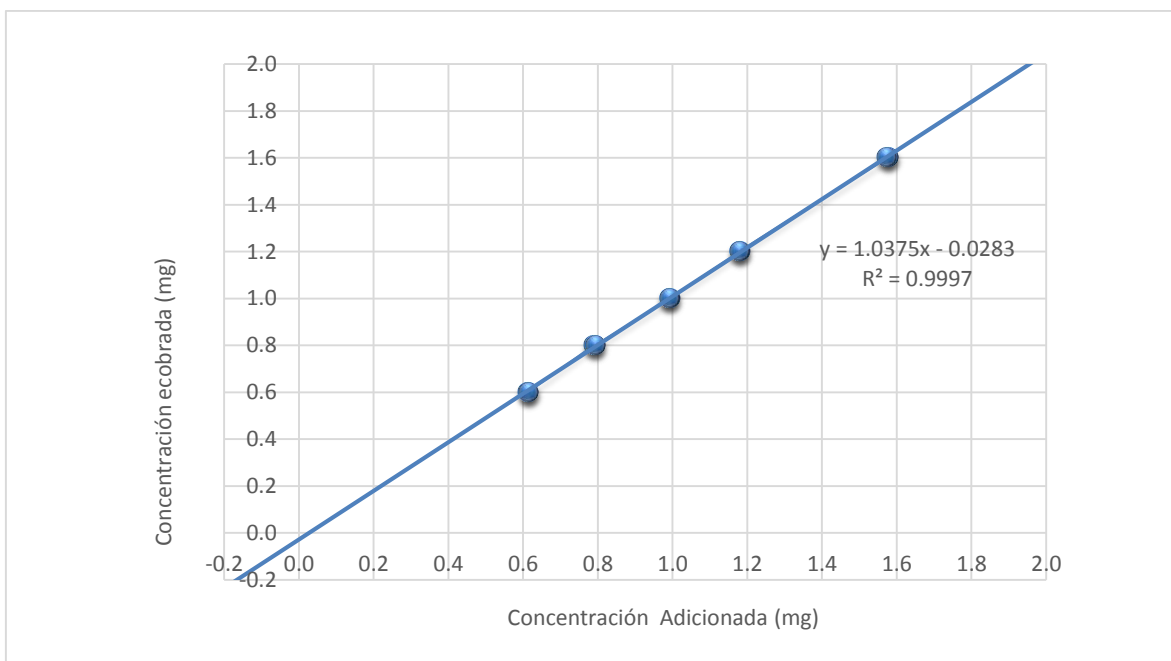


Figura 22. Gráfica de la exactitud del método.

De acuerdo a la ecuación de la recta obtenida para los datos graficados en la figura 21, se tiene un coeficiente de correlación de 0.9933 y una pendiente de 1.04 cubriendo los criterios de aceptación del protocolo de validación interno de la tabla XL. Por otra parte la relación en porcentaje del dato promedio de las áreas obtenidas para la concentración al 100 % en este análisis y la ordenada al origen debe encontrarse entre -3.0 y 3.0, se obtiene un valor de 0.0, por lo que se concluye que el método es exacto.

4.2.4.1 Exactitud al límite de cuantificación

La exactitud del método, se evaluó de acuerdo a lo establecido en la sección 3.12. Se verificó en el rango de 80 a 160% de una concentración de 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La tabla XXXVI, resume los resultados obtenidos para esta prueba, con tres repeticiones para cada nivel evaluado, se reporta la cantidad de API 1 adicionado al placebo y la cantidad recobrada en mg, así como el porcentaje de recobro, calculados de acuerdo a las ecuaciones 33-36.

Tabla XXXVI. Exactitud del método (placebo adicionado) al LC.

API 1			
Nivel %	Adicionado (ng)	Recobrado (ng)	Porcentaje de recobro (%)
80	0.8266	0.8542	103.3
	0.8266	0.8774	106.1
	0.8266	0.8440	102.1
90	0.9919	1.0024	101.1
	0.9919	1.0299	103.8
	0.9919	1.0389	104.7
100	1.1573	1.2398	107.1
	1.1573	1.1926	103.1
	1.1573	1.1850	102.4
120	1.3226	1.3884	105.0
	1.3226	1.3705	103.6
	1.3226	1.4325	108.3

160	1.6532	1.6827	101.8
	1.6532	1.7021	103.0
	1.6532	1.7382	105.1
Recobro promedio		104.0	
Recobro mínimo		101.1	
Recobro máximo		108.3	
CV %		1.9	

El coeficiente de variación para la prueba de exactitud es de 1.9 %, un CV menor o igual a 10.0%, se considera un resultado aceptable de acuerdo a procedimientos internos, por lo que se cumple satisfactoriamente, en el caso de los porcentajes de recobro, se obtuvo un dato promedio de 104.0 % con un mínimo de 101.1 y un máximo de 108.3 % de API 1 recobrado. La ICH recomienda mantenerse en recobros con un error relativo de ± 30 %, es decir entre un 70-130 %, se puede concluir que se está cumpliendo con el criterio establecido.

La figura 23 muestra una gráfica de los datos de concentración añadida vs los de concentración recobrada durante este análisis, en la tabla XXXVII se muestran los criterios establecidos en protocolos internos para los datos estadísticos obtenidos de la regresión lineal de los datos graficados.

Tabla XXXVII. Datos estadísticos para los datos obtenidos para la evaluación de la exactitud del método al LC y los criterios de aceptación establecidos.

Ecuación de la recta			$y = 1.03841 x + (0.00253)$		
Numero de datos (n)	Ordenada al origen (a)	Respuesta promedio al 100 %	Coefficiente de correlación al cuadrado (r^2)	Pendiente	a% con respecto a la respuesta promedio al 100%
15	0.00253	8856	0.99339	1.04	0.0
Criterio de aceptación		\geq	0.98	0.875	-50.0
		\leq	1.250	+ 50.0

De acuerdo a la ecuación de la recta obtenida para los datos graficados en la figura 22, se tiene un coeficiente de correlación de 0.9933 y una pendiente de 1.04 cumpliendo así los criterios de aceptación del protocolo de validación interno de la tabla XXXVII que en este caso están mucho más abiertos, debido a las concentraciones tan pequeñas que se manejaron en este análisis, por otra parte la relación en porcentaje del dato promedio de las áreas obtenidas para la concentración al 100 % en este análisis y la ordenada al origen debe encontrarse entre -50.0 y 50.0, se obtiene un valor de 0.0, por lo que se concluye que el método es exacto.

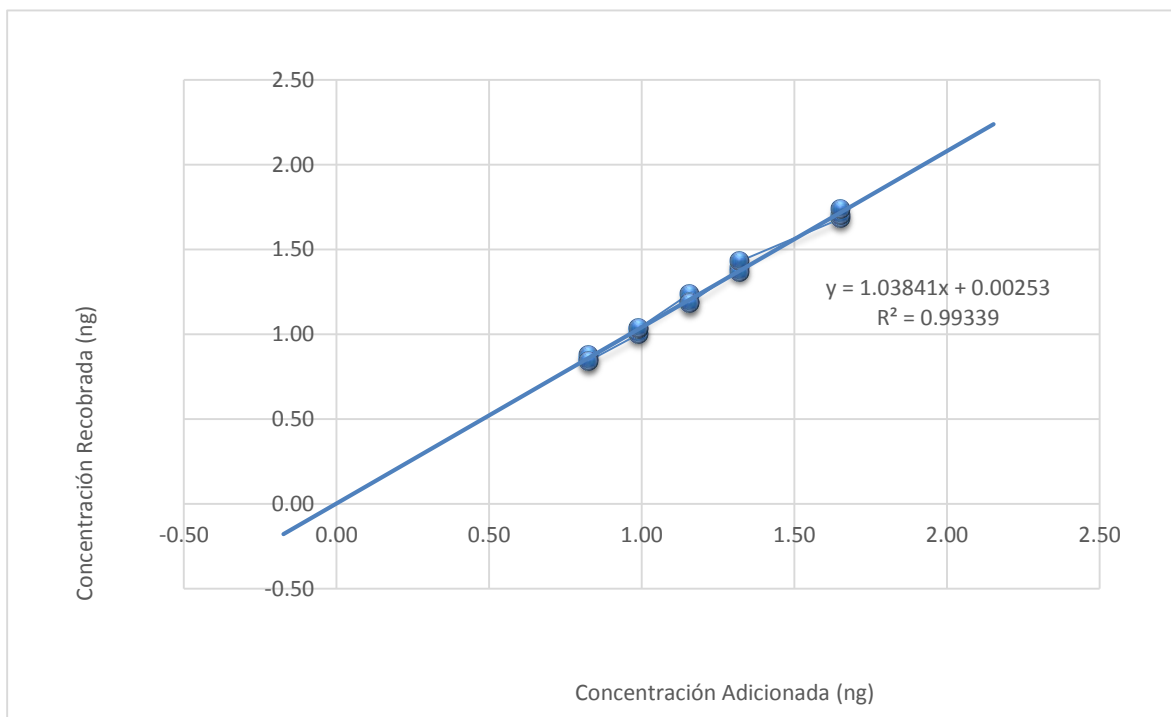


Figura 23. Grafica de la exactitud del método al LC.

4.2.5 Especificidad

Se evaluó la especificidad del método de acuerdo a la sección 3.6.7. Primeramente con el detector UV-vis, se obtuvieron los tiempos de retención y tiempos de retención relativos. La figura 24 y la tabla XXXVIII, resume los resultados. Los tiempos de retención relativos se calcularon mediante la ecuación 18 y en comparación con el tiempo de retención del API 1. De acuerdo a los datos, cada una de las señales obtenidas presenta tiempos de retención distintos y suficientemente distanciados como para declarar que no existe interferencia para la identificación del API 1 y por lo tanto este método es específico para este analito.

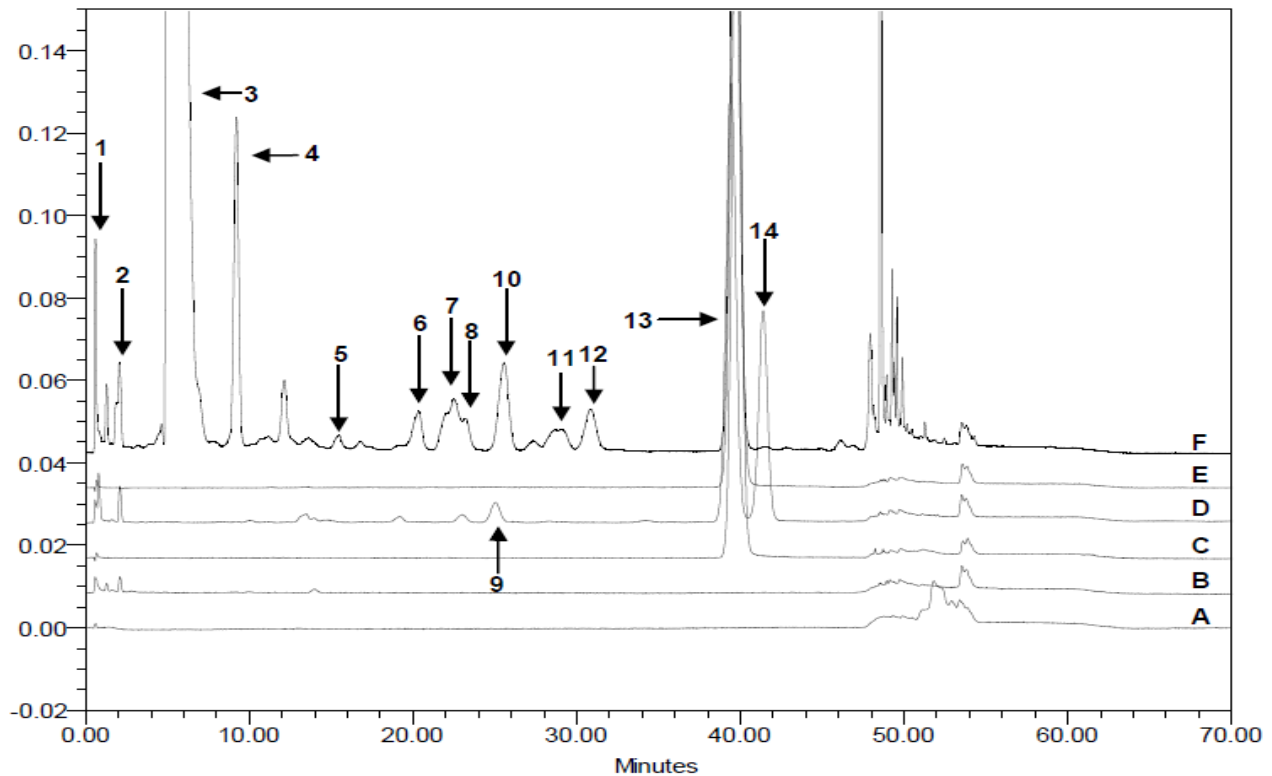


Figura 24. Cromatograma tipo para la especificidad del API 1 y sus productos de degradación. A) Diluyente, B) placebo total a 40°C/75%HR por 28 días C) disolución estándar del API 1, D) placebo de API 2-API 3 a 40°C/75%HR por 28 días E) materia prima de API 1 a 40°C/75%HR por 28 días F) producto terminado a 40°C/75%HR por 28 días.

Tabla XXXVIII. Identificación de señales para el API 1, con sus tiempos de retención y tiempos de retención relativos para la evaluación de la especificidad del método.

Señal	Identificación	Tiempo de retención (min)	Tiempo de retención relativo (trr)
1	Diluyente + Pico-1 de Excipientes	1.76	0.044
2	Excipiente H Pico-1	2.06	0.051
3	API 3 + Degradado de API 2 -1 + Excipiente L Pico-1	5.02	0.126
4	Degradado de API 3 Pico-1	9.20	0.232
5	API 1 Imp. A- 17	15.27	0.385
6	Degradado de API 2 Pico-3	20.34	0.513
7	Degradado de API 2 Pico-4	21.95	0.554
8	Degradado de API 2 Pico-5	22.53	0.568
9	Degradado de API 1 trr=0.634	25.03	0.634
10	Degradado API 3 Pico-2 + Degradado de API 1 trr=0.634	25.51	0.643
11	Compuesto relacionado API 1	28.33	0.715
12	Degradado de API 1 trr=0.778	30.86	0.778
13	API 1	39.64	1.00
14	API 1 EE	41.38	1.044

De acuerdo a la sección 3.6.7, se prosiguió a evaluar la especificidad del método mediante un detector de arreglo de fotodiodos, los valores pequeños del ángulo de pureza indican homogeneidad, al contrario valores grandes indican heterogeneidad. En el caso de ángulos de umbral, valores grandes indican baja sensibilidad en la medición. Los cálculos realizados para la pureza, resumidas en las figuras 25-29 y las tablas XXXIX-XLII, indican que ningún compuesto coeluye de acuerdo al principio de que si el ángulo de umbral es mayor al ángulo de pureza entonces esa señal solo puede atribuirse a un solo analito y por lo tanto el método es específico para la identificación de ese compuesto.

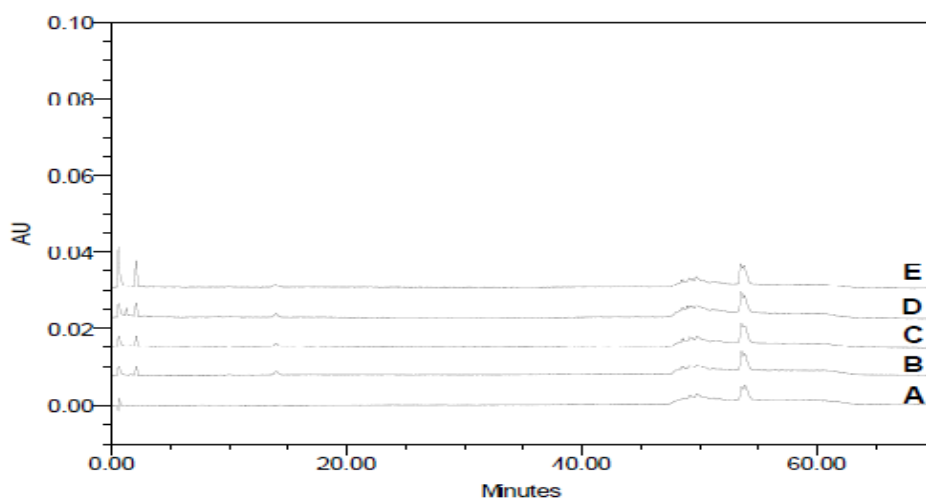


Figura 25. Cromatograma para la pureza de pico en una muestra de placebo total A) Diluyente, B) placebo total a 25°C/60%HR por 28 días C) placebo total a 30°C/65%HR por 28 días D) placebo total a 40°C + 80°C por una semana E) placebo total estresado con luz UV por 28 días.

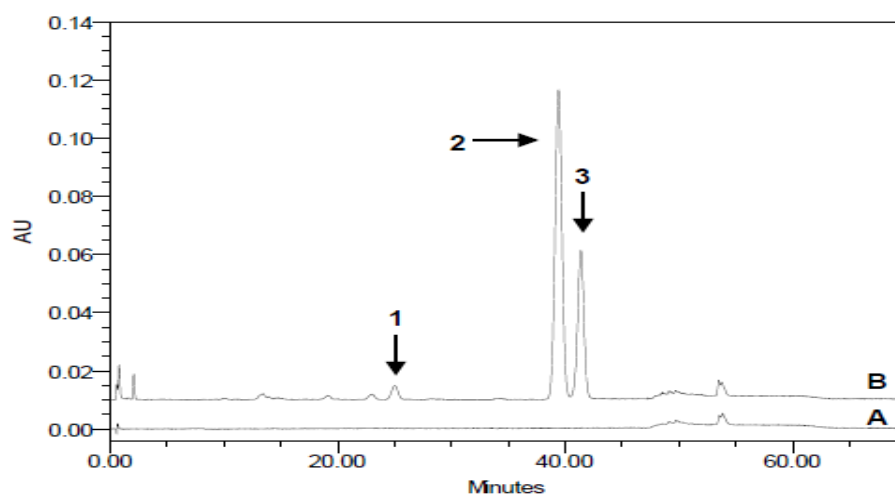


Figura 26. Cromatograma para la pureza de pico en una muestra de placebo de API 2-API 3 a 40°C/75%HR por 28 días A) Diluyente, B) placebo de API 2-API 3 a 40°C + 80°C por una semana.

Tabla XXXIX. Pureza de la señal en una muestra placebo de API 2-API 3 a 40°C + 80°C por una semana.

Identificación		RT	Área	Angulo de pureza 4	Angulo del umbral de ruido 4	Pureza del pico
1	Degradado de API 1 trr=0.634	25.028	185575	11.009	90.00	PURO
2	API 1	39.419	4460163	0.753	7.269	PURO
3	API 1 EE	41.348	1933906	1.383	14.015	PURO

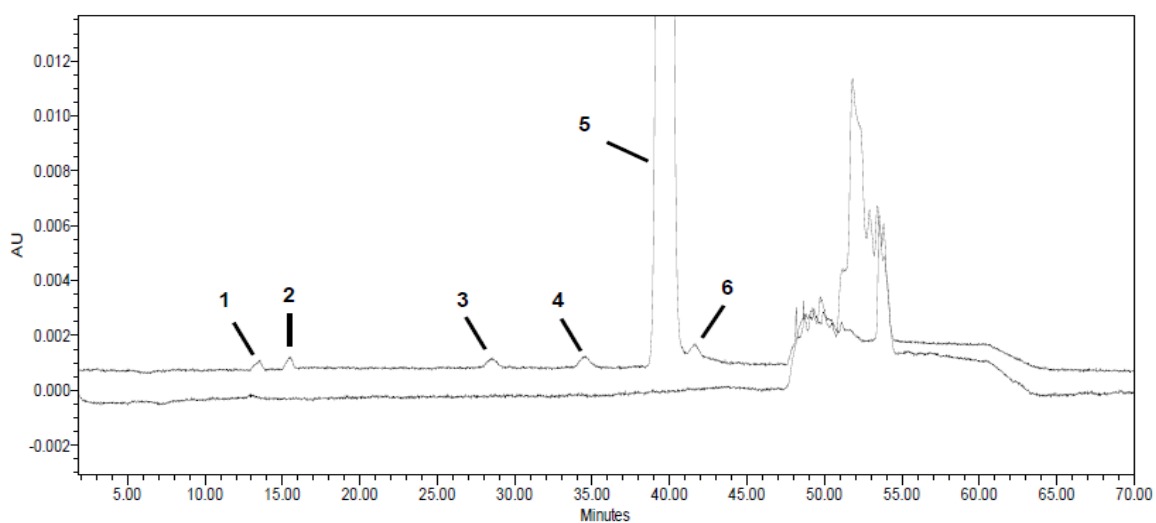


Figura 27. Cromatograma para la pureza de pico en una muestra de disolución de resolución A) Diluyente, B) disolución de resolución.

Tabla XL. Pureza de la señal en una muestra de la disolución de resolución

Identificación		RT	Área	Angulo de pureza 4	Angulo del umbral de ruido 4	Pureza del pico
1	API 1 Imp. A- 21	13.548	10894	42.766	90.00	PURO
2	API 1 Imp. A- 17	15.458	10734	39.845	90.00	PURO
3	Compuesto relacionado API 1	28.592	13736	44.094	90.00	PURO
4	Compuesto D API 1	34.566	16167	38.128	90.00	PURO

5	API 1	39.679	7315222	0.202	1.680	PURO
6	API 1 EE	41.646	14179	39.754	90.00	PURO

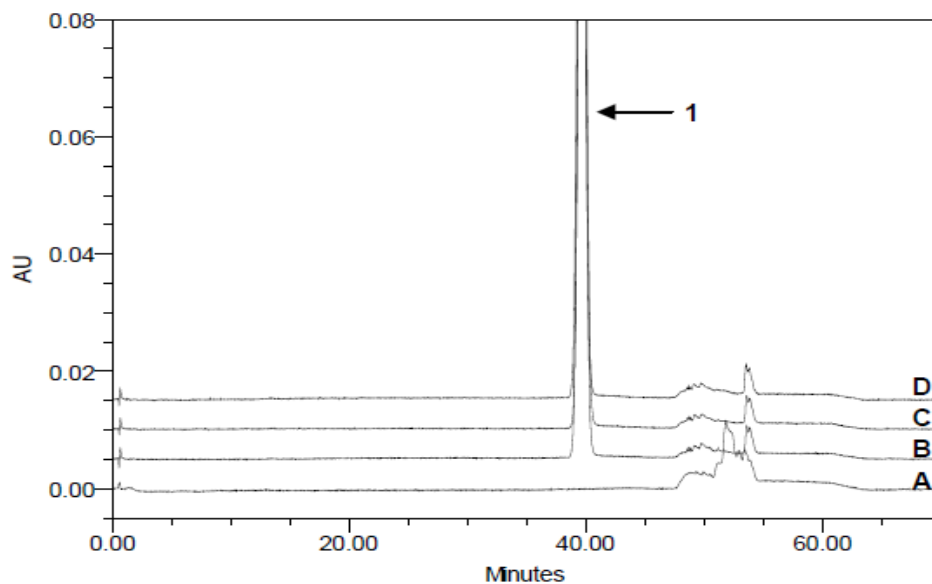


Figura 28. Cromatograma para la pureza de pico en una muestra de materia prima del API 1 A) Diluyente, B) 25°C/60%HR por 28 días C) 40°C + 80°C por una semana D) luz UV por 28 días.

Tabla XLI. Pureza de la señal en una muestra de materia prima del API 1.

Identificación		Cromatograma	RT	Área	Angulo de pureza 4	Angulo del umbral de ruido 4	Pureza del pico
1	API 1	A	39.637	7251678	0.225	1.924	PURO
		B	39.702	7203476	0.203	1.704	PURO
		C	39.606	7325759	0.204	1.579	PURO

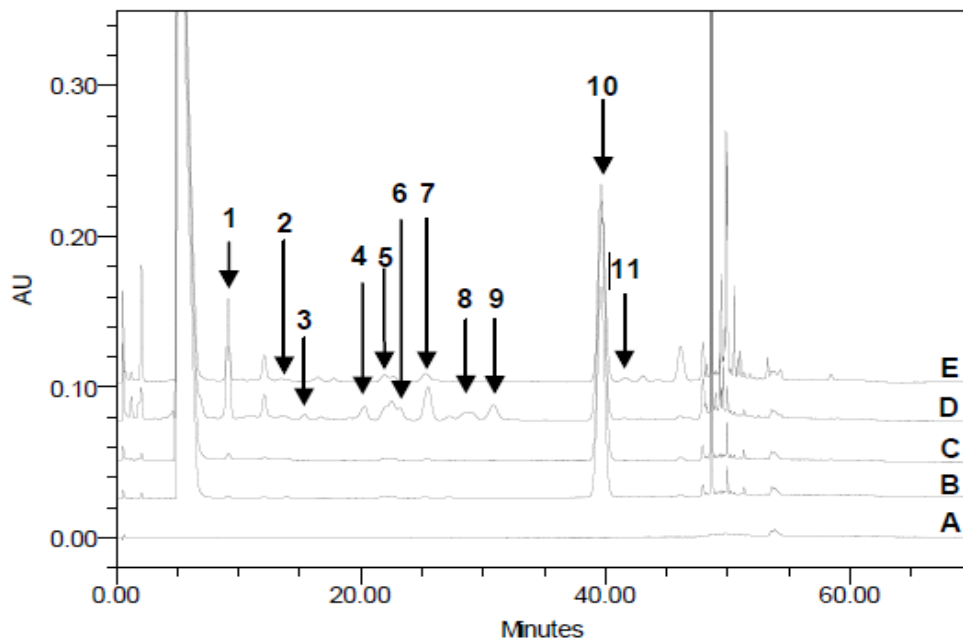


Figura 29. Cromatograma para la pureza de pico en una muestra de producto terminado A) Diluyente, B) 25°C/60%HR por 28 días C) 30°C/75%HR por 28 días D) 40°C + 80%HR por una semana E) luz UV por 28 días.

Tabla XLII. Pureza de la señal en una muestra de la disolución de resolución

Identificación		Cromatograma	RT	Área	Angulo de pureza 4	Angulo del umbral de ruido 4	Pureza del pico
1	Degradado de API 3 Pico-1	C	9.211	41156	6.713	49.853	PURO
		D	9.189	1710312	0.771	5.680	
		E	9.191	470851	2.416	16.917	
2	API 1 impureza A-21	E	14.016	10860	65.397	90.00	PURO
3	API 1 impureza A-17	D	15.267	10582	53.899	90.00	PURO
4	Degradado de API 2 Pico-3	D	20.343	297191	44.400	90.00	PURO
5	Degradado de API 2 Pico-4	D	21.950	45215	52.294	90.00	PURO
		E	21.980	93416	49.036	90.00	
6	Degradado de API 2 Pico-5	D	22.531	102760	47.803	90.00	PURO
7	Degradado de API 3 Pico-2	D	25.514	896923	30.826	90.00	PURO

		E	25.308	194391	51.844	90.00	
8	Compuesto relacionado API 1	D	28.333	15716	52.289	90.00	PURO
		E	28.539	36166	50.998	90.00	
9	Degradado de API 1 trr=0.778	D	30.855	471741	45.867	90.00	PURO
10	API 1	B	39.686	5812192	0.843	6.903	PURO
		C	39.686	7043042	1.176	8.604	
		D	39.640	6547147	8.011	90.00	
		E	39.722	4509066	11.917	90.00	
11	API 1 EE	E	41.632	84031	51.382	90.00	PURO

4.2.6 Robustez

La evaluación de la robustez del método analítico se realizó de acuerdo a lo establecido en la sección 3.13. Este parámetro es considerado por la ICH y otras organizaciones internacionales y nacionales como parte del desarrollo analítico, es decir un trabajo previo a la validación del método, por lo tanto, no hay criterios claros establecidos para su evaluación, sin embargo, se puede evaluar y en este caso, validar este parámetro considerando que no exista un cambio significativo en los parámetros cromatográficos como tiempo de retención, el factor de capacidad, el número de platos teóricos y la simetría del pico o coleo al llevar a cabo un análisis con condiciones cromatográficas distintas. Para el API 1 se evaluó un cambio en la columna, el valor del pH, la temperatura de la columna, velocidad de flujo y la concentración de la fase móvil acuosa. Las tablas XLIII-LI resumen los resultados obtenidos.

Tabla XLIII. Resultados de robustez para la disolución de resolución con un cambio de columna

API 1	Columna 1	Columna 2
Tiempo de retención	36.46	36.28
Capacidad	67	66
Número de platos teóricos	9897	12114
Simetría	1.0	1.0
Señal/ruido	119	34
Resolución API 1/API 1 EE	3.7	4.2

Tabla XLIV. Resultados de robustez para la disolución de resolución con un cambio de pH

API 1	Límite inferior (3.5)	Límite central (3.0)	Límite superior (4.5)
Tiempo de retención	37.69	36.46	38.11
Capacidad	69	67	70
Número de platos teóricos	13218	9897	15493
Simetría	0.9	1.0	0.9
Señal/ruido	18	119	24
Resolución API 1/API 1 EE	4.2	3.7	4.1

Tabla XLV. Resultados de robustez para la disolución de resolución con un cambio de la temperatura de la columna.

API 1	Límite inferior (35°C)	Límite central (40°C)	Límite superior (45)
Tiempo de retención	39.56	39.46	15.44
Capacidad	72	67	28
Número de platos teóricos	19288	9897	7956
Simetría	1.0	1.0	1.0
Señal/ruido	138	119	553
Resolución API 1/API 1 EE	4.1	3.7	1.7

Tabla XLVI. Resultados de robustez para la disolución de resolución con un cambio en la velocidad de flujo

API 1	Límite inferior (1.8 mLmin ⁻¹)	Límite central (2.0 mLmin ⁻¹)	Límite superior (2.2 mLmin ⁻¹)
Tiempo de retención	38.59	36.46	33.83
Capacidad	70	67	62
Número de platos teóricos	14305	9897	9983
Simetría	1.0	1.0	1.0
Señal/ruido	168	119	144
Resolución API 1/API 1 EE	3.9	3.7	3.6

Tabla XLVII. Resultados de robustez para la disolución de resolución con un cambio en la concentración de la fase acuosa.

API 1	Límite inferior (0.09 M)	Límite central (0.010 M)	Límite superior (0.011 M)
Tiempo de retención	37.86	36.46	37.83
Capacidad	69	67	69
Número de platos teóricos	14448	9897	14043
Simetría	0.9	1.0	0.9
Señal/ruido	28	119	34
Resolución API 1/API 1 EE	4.4	3.7	4.3

De acuerdo a los resultados obtenidos, el cambio de columna, pH y concentración de la fase acuosa, no genera un impacto apreciable en los parámetros cromatográficos evaluados, en cambio el aumento en la temperatura de la columna (de 40° C a 45° C), hace que el tiempo de retención del API 1 disminuya drásticamente, por lo tanto, se considera un parámetro crítico en el método. El aumento en la velocidad de flujo, también resulto en un cambio en las condiciones cromatográficas, en particular en el tiempo de retención de la columna, que disminuyo. A pesar los resultados obtenidos para estos cambios, se puede decir que el método cromatográfico validado es robusto y puede soportar pequeños cambios, sin comprometer los resultados obtenidos.

5.0 CONCLUSIONES

El método analítico es adecuado para la valoración del ungüento API 1/API 2/API 3 y sus productos de degradación e impurezas. Los parámetros de validación evaluados cumplen con los criterios establecidos por protocolos internos y por organizaciones internacionales y nacionales.

La linealidad, la exactitud y la precisión se establecieron en el intervalo de concentración de 60% a 160 % del estándar del API 1, con una concentración de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Se demostró que el método es lineal en el intervalo de concentración establecido, por medio de la evaluación de los coeficientes “r de Pearson” con un valor de 0.9999 y el estadístico ANOVA.

Los límites de cuantificación y detección para el método, se establecieron en 0.07% y 0.02% del estándar del API 1 con una concentración de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y fueron evaluados mediante el estadístico ANOVA.

Se demostró la precisión del método analítico a niveles de repetibilidad y precisión intermedia.

Las condiciones del método cromatográfico son robustas, con excepción del aumento de la temperatura, que resulta ser un parámetro crítico para el análisis.

El método analítico fue optimizado antes de su validación para la cuantificación del API 1 y sus productos de degradación.

El método resultó ser específico tanto para el API 1, como para sus productos de degradación y sus impurezas, por lo que se puede utilizar en estudios de estabilidad, es decir, el método es indicativo de estabilidad del API 1 y sus productos de degradación e impurezas.

6.0 RECOMENDACIONES

Se propone una optimización del sistema cromatográfico enfocado al ahorro de tiempo (corridos más cortos) y a la disminución de costos (uso de fase orgánica menos costosa).

Es posible desarrollar un método analítico que cuantifique los 3 activos presentes en la muestra, pero es necesaria un diseño de experimentos más amplio, que permita evaluar esta posibilidad.

El uso de técnicas como la extracción en fase sólida, podrían ser alternativas que ahorrarían tiempo y esfuerzo en la etapa de la preparación de muestra.

La evaluación de la reproducibilidad, será un parámetro que nos brindara una mayor seguridad en la eficiencia del método analítico y la posibilidad de una transferencia a laboratorios de control químico.

7.0 ANEXOS

ANEXO 1. Gradientes evaluados en la optimización del sistema cromatográfico

Tabla 1. Gradiente A, diseñado para aumentar la resolución entre los compuestos. En la línea A del equipo se tiene fosfato de sodio 0.01 M pH 3.0, en la línea B se tiene acetonitrilo.

	Tiempo (min)	Flujo (mLmin ⁻¹)	%A	%B	Curva
1	0.01	2	70	30	6
2	15	2	65	35	6
3	70	2	65	35	6
4	71	2	70	30	6
5	75	2	70	30	6

Tabla 2. Gradiente B, diseñado para aumentar la resolución entre los compuestos. En la línea A del equipo se tiene fosfato de sodio 0.01 M pH 3.0, en la línea B se tiene acetonitrilo.

	Tiempo (min)	Flujo (mLmin ⁻¹)	%A	%B	Curva
1	0.01	2	70	30	6
2	15	2	65	35	6
3	38	2	65	35	6
4	49	2	50	50	6
5	60	2	50	50	6
6	61	2	70	30	6
7	66	2	70	30	6

Tabla 3. Gradiente C, diseñado para aumentar la resolución entre los compuestos. En la línea A del equipo se tiene fosfato de sodio 0.01 M pH 3.0, en la línea B se tiene acetonitrilo.

	Tiempo (min)	Flujo (mLmin ⁻¹)	%A	%B	Curva
1	0.01	2	70	30	6
2	15	2	65	35	6
3	38	2	65	35	6
4	49	2	53	47	6
5	60	2	53	47	6
6	61	2	70	30	6
7	66	2	70	30	6

Tabla 4. Gradiente E, diseñado para aumentar la resolución entre los compuestos. En la línea A del equipo se tiene fosfato de sodio 0.01 M pH 3.0, en la línea B se tiene acetonitrilo.

	Tiempo (min)	Flujo (mLmin ⁻¹)	%A	%B	Curva
1	0.01	2	70	30	6
2	15	2	65	35	6
3	38	2	65	35	6
4	49	2	55	45	6
5	60	2	55	45	6
6	61	2	70	30	6
7	66	2	70	30	6

Tabla 5. Gradiente D, diseñado para aumentar la resolución entre los compuestos. En la línea A del equipo se tiene fosfato de sodio 0.01 M pH 3.0, en la línea B se tiene acetonitrilo.

	Tiempo (min)	Flujo (mLmin ⁻¹)	%A	%B	Curva
1	0.01	2	70	30	6
2	15	2	65	35	6
3	33	2	65	35	6
4	40	2	60	40	6
5	50	2	60	40	6
6	55	2	70	30	6
7	60	2	70	30	6

ANEXO 2.

La figura 1 representa gráficamente los conceptos de límite de reporte, identificación y calificación. El límite de reporte de un principio activo es el porcentaje de fármaco mínimo para que una señal atribuida a éste deba ser reportada, en el caso de límite de identificación se refiere al porcentaje de fármaco mínimo para que una señal atribuida a éste deba ser reportada e identificada, el límite de calificación exige que la señal atribuida al fármaco no solo sea reportada e identificada, sino también calificada, regularmente mediante estudios toxicológicos.

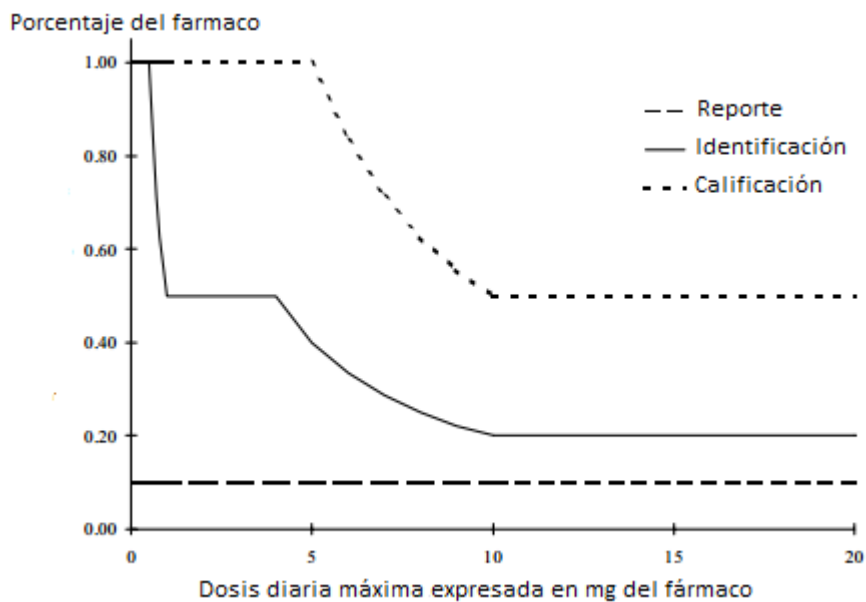


Figura 1. Límite de reporte, identificación y calificación

ANEXO 3.

Tabla 1. Cálculos previos a la obtención de LC-LD									
x_i	y_i	$X_i - X$	$Y_i - Y$	$(X_i - X)^2$	S_{xy}		Y_i^{\wedge}	$Y_i - Y_i^{\wedge}$	$(Y_i - Y_i^{\wedge})^2$
20159.82	2640	17730.562	2323.9286	314372818	41204559	m	2632.5421	7.45787	55.61978
20159.82	2662	17730.562	2345.9286	314372818	41594631	0.130648467	2632.5421	29.4579	867.7659
20159.82	2632	17730.562	2315.9286	314372818	41062714	b	2632.5421	-0.54213	0.293908
10079.91	1290	7650.6517	973.92857	58532471	7451188	-1.307445647	1315.6173	-25.6173	656.2483
10079.91	1288	7650.6517	971.92857	58532471	7435887		1315.6173	-27.6173	762.7177
10079.91	1297	7650.6517	980.92857	58532471	7504743		1315.6173	-18.6173	346.6055
2015.982	255	-413.2763	-61.071429	170797.31	25239.37		262.07751	-7.07751	50.09118
2015.982	261	-413.2763	-55.071429	170797.31	22759.72		262.07751	-1.07751	1.161033
2015.982	264	-413.2763	-52.071429	170797.31	21519.89		262.07751	1.92249	3.695959
1007.991	129	-1421.267	-187.07143	2020000.8	265878.5		130.38503	-1.38503	1.918317
1007.991	131	-1421.267	-185.07143	2020000.8	263036		130.38503	0.61497	0.378184
1007.991	132	-1421.267	-184.07143	2020000.8	261614.7		130.38503	1.61497	2.608118
201.5982	27	-2227.66	-289.07143	4962469.6	643952.9		25.03105	1.96895	3.876764
201.5982	26	-2227.66	-290.07143	4962469.6	646180.6		25.03105	0.96895	0.938864
201.5982	24	-2227.66	-292.07143	4962469.6	650635.9		25.03105	-1.03105	1.063064
100.7991	14	-2328.459	-302.07143	5421722.3	703361		11.861802	2.1382	4.57189
100.7991	14	-2328.459	-302.07143	5421722.3	703361		11.861802	2.1382	4.57189
100.7991	13	-2328.459	-303.07143	5421722.3	705689.5		11.861802	1.1382	1.295494
90.71919	11	-2338.539	-305.07143	5468765.2	713421.5		10.544877	0.45512	0.207137
90.71919	12	-2338.539	-304.07143	5468765.2	711082.9		10.544877	1.45512	2.117382
90.71919	11	-2338.539	-305.07143	5468765.2	713421.5		10.544877	0.45512	0.207137
80.63928	10	-2348.619	-306.07143	5516011.3	718845.2		9.2279527	0.77205	0.596057
80.63928	10	-2348.619	-306.07143	5516011.3	718845.2		9.2279527	0.77205	0.596057
80.63928	10	-2348.619	-306.07143	5516011.3	718845.2		9.2279527	0.77205	0.596057
70.55937	9	-2358.699	-307.07143	5563460.7	724289.1		7.9110279	1.08897	1.18586
70.55937	11	-2358.699	-305.07143	5563460.7	719571.7		7.9110279	3.08897	9.541749
70.55937	8	-2358.699	-308.07143	5563460.7	726647.8		7.9110279	0.08897	0.007916
60.47946	9	-2368.779	-307.07143	5611113.2	727384.3		6.5941031	2.4059	5.78834
60.47946	8	-2368.779	-308.07143	5611113.2	729753.1		6.5941031	1.4059	1.976546
60.47946	8	-2368.779	-308.07143	5611113.2	729753.1		6.5941031	1.4059	1.976546
50.39955	7	-2378.859	-309.07143	5658969	735237.3		5.2771783	1.72282	2.968115
50.39955	6	-2378.859	-310.07143	5658969	737616.1		5.2771783	0.72282	0.522471
50.39955	8	-2378.859	-308.07143	5658969	732858.4		5.2771783	2.72282	7.413758
40.31964	11	-2388.939	-305.07143	5707028	728796.9		3.9602535	7.03975	49.55803
40.31964	4	-2388.939	-312.07143	5707028	745519.5		3.9602535	0.03975	0.00158
40.31964	6	-2388.939	-310.07143	5707028	740741.6		3.9602535	2.03975	4.160566
30.23973	2	-2399.019	-314.07143	5755290.1	753463.2		2.6433287	-0.64333	0.413872
30.23973	3	-2399.019	-313.07143	5755290.1	751064.2		2.6433287	0.35667	0.127214
30.23973	4	-2399.019	-312.07143	5755290.1	748665.2		2.6433287	1.35667	1.840557
20.15982	3	-2409.098	-313.07143	5803755.5	754219.9		1.3264039	1.6736	2.800924
20.15982	3	-2409.098	-313.07143	5803755.5	754219.9		1.3264039	1.6736	2.800924
20.15982	2	-2409.098	-314.07143	5803755.5	756629		1.3264039	0.6736	0.453732
2429.2583	316.07	-2.55E-11	-5.002E-12	1.292E+09	1.69E+08		13275	5.2E-12	2863.28

8.0 BIBLIOGRAFIA

1. Araujo P. (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B* 877, 224-2234.
2. Crowley P. (2001). Drug-Excipient Interactions *Pharmaceutical Technology Europe*, 0582.
3. Ermer J. (2001). Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 24, 755-767.
4. Ermer J., Ploss H.J. (2005). Validation in pharmaceutical analysis. Part II: central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data.
5. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Séptima Edición*, Ed. Secretaría de Salud, México, 2000.
6. Gorog S. (2008). Drug safety, drug quality, drug analysis. *J. Pharm Biomed. Anal*, 48, 247-253.
7. ICH (Internal Conference on Harmonization) (1995). Text on validation of analytical procedures. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration.
8. ICH (International Conference on Harmonization) (1996). Guidance for Industry Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology, <http://www.fda.gov/Cder/Guidance/1320fn>
9. International Conference on Harmonization (ICH) (1999, Oct.), harmonized tripartite guideline Q6A, Specifications: Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: Chemical substances.
10. International Conference on Harmonization (ICH) (2000, Nov.), Harmonized tripartite guideline Q7A GMP for active pharmaceutical ingredient.
11. International Conference on Harmonization (ICH) (2005, Nov.), Harmonized tripartite guideline Q2(R1), Validation of analytical procedures: Text and methodology.
12. ISO (International Organization for Standardization) (1994a). Guide 5725-1: Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and result part 1: general principles and definitions, Geneva.
13. ISO (International Organization for Standardization) (1994b). Guide 8402: Quality Vocabulary, ISO, Geneva
14. ISO (International Organization for Standardization) (1997). ISO 11843-1: Capability of detection. Part 1: terms and definitions. ISO, Geneva

15. IUPAC (International Union of Pure Applied Chemistry) (1999). Harmonized Guidelines for In-House Validation of Methods of Analysis (Technical Report). Budapest, <http://old.iupac.org/divisions/V/501/draftoct19.pdf>.
16. Miller J.N., Miller J.C. (2002). Estadística y quimiometría para química analítica. Pearson, España pp. 111-143.
17. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013. Buenas prácticas de fabricación de medicamentos.
18. Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-1993. Estabilidad de medicamentos.
19. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad.
20. Sýkora D., Tesarová E., Popl M. (1997). Interactions of basic compounds in reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A*, 758, 37-51.
21. Turnidge J. (1999). Fusidic acid pharmacology, pharmacokinetics and pharmacodynamics. *International Journal of antimicrobial agents* 12, S23-S34.
22. U.S. Pharmacopeia (USP), General Chapter <621>, Validation of compendial procedures, USP, Rockville, MD.
23. Wei Teng X, Cutler D., Davies N. (2003). Degradation kinetics of mometasone furoate in aqueous systems. *International Journal of Pharmaceutics* 259, 129-141.