



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

Complementación del proceso de Validación de un método analítico para cuantificar Besilato de Amlodipino en tabletas de 5 mg de Amlodipino tableta, por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADO EN FARMACIA**

**PRESENTA:**

OROZCO GARDUÑO JUAN CARLOS

**ASESOR:**

Q.F.B. JOSÉ ANTONIO GARDUÑO ROSAS

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



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.

## **SUPERARSE A SÍ MISMO**

*“Están los que usan siempre la misma ropa,  
Están los que llevan amuleto.  
Los que hacen promesas.  
Los que imploran mirando al cielo.  
Los que creen en supersticiones.  
Están los que siguen corriendo cuando les tiemblan las piernas.  
Los que siguen jugando cuando se les acaba el aire.  
Los que siguen luchando cuando todo parece perdido.  
Como si cada vez fuera la última.  
Convencidos de que la vida misma es un desafío sufren, pero no se  
quejan.  
Porque saben que el dolor pasa, el sudor se seca y el cansancio termina.  
Pero hay algo que nunca desaparecerá la satisfacción de haberlo  
logrado.  
En sus cuerpos corre la misma sangre.  
Lo que los hace diferentes es su espíritu, la determinación de alcanzar la  
cima; una cima a la que no se llega superando a los demás, si no  
SUPERANDOSÉ A UNO MISMO”  
Tiempo sobra para los mediocres, pero tiempo falta para realizar tus  
sueños.*

**-Daisaku Ikeda**

*“La diferencia entre una persona exitosa y otros no es la falta de  
fortaleza, ni la falta de conocimiento, si no la falta de voluntad.”*

**-Vincent Lombardi.**

## **AGRADECIMIENTOS**

*Agradezco a Dios, en definitiva, primero por estar viviendo este momento en el cual finalizo la etapa de mi vida como Universitario para convertirme en Profesionista.*

*Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán - Campo 1, el haberme permitido tener la oportunidad de ingresar y formarme como Licenciado en Farmacia convirtiéndome en una persona que se desempeñará con valores y ética profesional, dedicándome con pasión, amor, compromiso, responsabilidad, valentía y coraje en aportar con un granito de arena para brindar bienestar a través de los medicamentos y restablecer la salud de las personas.*

### ***A mi madre***

*Este es el resultado de muchos años luchando de caer y levantarse, pero siguiéndolo adelante. Te agradezco tu labor como madre, por criarme, guiarme y formarme como persona, dando todo, enseñando con el ejemplo. Te agradezco la paciencia infinita y nunca dejar de creer en mí, por levantarme el ánimo en momentos difíciles y estar en los muy buenos, gracias por quererme y por ayudarme a alcanzar mis sueños, objetivos y metas, Te amo Mamá*

### ***A mi padre***

*Gracias papá por jamás evitar rendirme, por estar ahí a pesar de la distancia, por preocuparte por nosotros y brindarnos las herramientas para realizar lo que ahora soy junto con mi hermana, gracias por regalarme el mayor de los tesoros: ser independiente, tener criterio, atreverse hacer las cosas con valentía, coraje y sin miedo, por estar ahí siempre cuando lo necesite, eres mi mayor apoyo en la vida. Esto es por tí y por ustedes mi familia. Gracias papá, te amo Papá.*

### ***A mis hermanas Lizbeth y Tania***

*Gracias Liz por ayudarme a tener una profesión, ya que desde muy pequeño fuiste mi tutora, mi mamá, mi respaldo, mi ejemplo a seguir, mi guía. Te agradezco jamás dejarme sólo y poder aprender de tí, siempre has sido mi figura a seguir y por tí es por lo que estoy en esto.*

*Gracias Tani por ser mi confidente, creer en mí, por defenderme, aunque seas la más pequeña de los tres y por quererme tanto. Estoy tan feliz de que me veas lograr este objetivo y más feliz porque me llenas de orgullo al verte como te entregas, los objetivos que te has planteado y las cosas que hasta hoy has logrado y que lograrás, porque sé que llegarás muy alto y lejos, sabiendo que lo que te he transmitido te ha ayudado. Gracias por su cálido amor, cariño y comprensión. Las Amo mucho hermanitas.*

#### *A Sergio*

*Gracias Sergio por todos estos años de conocernos, gracias por tu calidez, tus palabras, consejos, enseñanzas y apoyarme en realizarme profesionalmente y en todos los aspectos, hasta el día de hoy has sido una influencia positiva en mi vida. Gracias que a pesar de todos los momentos que hemos tenido juntos, buenos y malos, estamos siempre. Gracias ser mi familia, por ser un Padre para mí. Gracias por todo. Te Amo*

#### *A mi Abuelita*

*En ti me inspiró para salir adelante.*

*Te agradezco el haberme cuidado desde muy pequeño, criarme, preocuparte por mí. Gracias por tantos momentos cálidos muy a tu forma de ser, pero que hoy en día soy lo que soy gracias a todo lo que me has regalado. Tu tiempo y dedicación. Te amo Abuelita*

#### *A tí mi amor*

*Gracias por guiarme y acompañarme en este gran suceso, por ser una persona entregada, dedicada, amorosa, paciente, comprometida, cálida, en la cual he podido confiar abiertamente sin temor, por hacerme mejor ser humano en muchos aspectos porque a donde voy te llevo gracias por ayudarme a pasar obstáculos para poder estar aquí finalizando esta etapa. ¡Te amo!*

#### *A mi asesor el Profesor José Antonio Garduño Rosas*

*Gracias Profesor por tener la paciencia y tiempo para ayudarme a lograr mis objetivos por enseñarme a hacer las cosas con calidad, dedicación y mucha pasión, investigando y siempre retroalimentándose, gracias por realizar este proyecto conmigo y concederme su confianza.*

### *A mis amigos*

*Mario, Alejandro y Luciano sin duda personas de admirarse porque luchan por sus sueños porque son parte de mí desde hace más de 15 años, mis mejores amigos que les puedo comentar cualquier cosa sin razón. Gracias a ustedes por aguantarme, por quererme a su forma, por crecer juntos, pero sobre todo y por no dejarnos ahora que las distancias se hacen largas pero los amigos siempre estarán ahí y cuento con ustedes.*

### *A mis amigos en la Industria Farmacéutica*

*Agradezco a todas las personas que me han dejado una enseñanza en los lugares donde me he desempeñado profesionalmente, gracias compañeros por brindarme su confianza y apoyo en momentos de aprendizaje y resolución de problemas. A todas las personas con las que he trabajado, jefes, compañeros del laboratorio, producción y otras áreas gracias por su dedicación, apoyo, llamados de atención y tiempo ya que es lo que me llevo de ustedes, así como las experiencias que viví.*

**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPIRITÚ”**

## ÍNDICE

1. OBJETIVO .....	13
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	13
3. HIPÓTESIS .....	13
4. INTRODUCCIÓN .....	13
5. MARCO TEÓRICO .....	15
5.1 MÉTODO ANALÍTICO .....	15
5.2 VALIDACIÓN DE MÉTODOS .....	15
5.2.1 Requerimientos generales para Validación de métodos analíticos ...	15
5.2.2 Criterios de aceptación .....	16
5.3 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN.....	16
5.3.1 Adecuabilidad del Sistema .....	18
5.3.2 Especificidad, Selectividad e Idoneidad .....	19
5.3.3 Linealidad del Sistema .....	19
5.3.4 Linealidad del Método .....	20
5.3.5 Exactitud.....	23
5.3.6 Precisión.....	23
5.3.7 Repetibilidad .....	20
5.3.8 Precisión del Método.....	23
5.3.9 Reproducibilidad del Método.....	23
5.3.10 Límite de Detección .....	24
5.3.11 Límite de Cuantificación.....	24
5.3.12 Tolerancia.....	25
5.3.13 Robustez.....	25
5.3.14 Estabilidad de las soluciones .....	25
5.4 CROMATOGRAFÍA .....	25
5.4.1 Cromatografía de adsorción .....	26
5.4.2 Cromatografía de partición.....	26
5.4.3 Cromatografía de intercambio iónico .....	26
5.4.4 Cromatografía plana o de capa fina .....	26
5.4.5 Cromatografía en papel.....	26

5.4.6 Cromatografía en columna .....	26
5.4.7 Cromatografía gaseosa.....	26
5.4.8 Cromatografía de adsorción gas-sólido .....	26
5.4.9 Cromatografía de adsorción gas-líquido.....	26
<b>5.5 GENERALIDADES DE LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR) .....</b>	<b>30</b>
<b>5.6 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS Y FISICOQUÍMICAS DEL AMLODIPINO .....</b>	<b>34</b>
5.6.1 Propiedades Farmacológicas .....	34
5.6.2 Farmacocinética.....	35
5.6.3 Farmacodinamia .....	35
5.6.4 Efectos adversos .....	36
5.6.5 Interacciones Farmacológicas.....	36
5.6.6 Indicaciones .....	36
5.6.7 Nombre y estructura .....	37
5.6.8 Propiedades Fisicoquímicas.....	37
5.6.9 Naturaleza Química.....	39
<b>6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>40</b>
<b>6.1 PLAN DE TRABAJO .....</b>	<b>40</b>
<b>6.2 ESPECIFICACIONES .....</b>	<b>41</b>
<b>6.3 REACTIVOS Y MATERIALES NECESARIOS PARA LA VALIDACIÓN .....</b>	<b>41</b>
<b>6.4 MÉTODO COMPENDIAL.....</b>	<b>42</b>
6.4.1 Solución p.H. 3.0 .....	42
6.4.2 Fase móvil y Blanco .....	42
6.4.3 Solución de Referencia .....	42
6.4.4 Solución de la muestra.....	42
6.4.5 Solución de la muestra para Exactitud/Repetibilidad y Tolerancia...	42
6.4.6 Condiciones cromatográficas .....	42
6.4.7 Requerimientos de Adecuabilidad para la Solución de Referencia ..	42
6.4.8 Procedimiento .....	42
6.4.9 Cálculos .....	44



6.4.10 Lavado de Columna.....	42
6.5 PREPARACIÓN DE PLACEBO .....	46
6.5.1 Formulación cuali-cuantitativa .....	42
6.5.2 Datos de la sustancias de referencia .....	42
6.6 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA .....	47
6.7 ESPECIFICIDAD.....	47
6.8 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD .....	49
6.9 PRECISIÓN DEL MÉTODO.....	50
6.10 ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA.....	50
6.11 TOLERANCIA.....	51
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	52
8. CONCLUSIONES .....	82
9. REFERENCIAS.....	82
10. ANEXOS .....	85

## NDICE DE TABLAS

<b>Tabla No.1</b>	Parámetros requeridos para la Validación.....	17
<b>Tabla No.2</b>	Clase método analítico guía ICH.....	22
<b>Tabla No.3</b>	Propiedades Fisicoquímicas de Amlodipino .....	37
<b>Tabla No.4</b>	Datos espectrofotométricos de Amlodipino .....	38
<b>Tabla No.5</b>	% Recobro de SRef. Adecuabilidad del Sistema.....	52
<b>Tabla No.6</b>	Resultados generales de % Recobro de SRef. ....	53
<b>Tabla No.7</b>	Resultados obtenidos de Adecuabilidad del sistema cromatográfico .....	54
<b>Tabla No.8</b>	Porcentaje de recobro Exactitud y Repetibilidad .....	57
<b>Tabla No.9</b>	mg Adicionados y Recuperados de la prueba de Exactitud y Repetibilidad... 57	
<b>Tabla No.10</b>	Respuesta analítica de la prueba de Tolerancia equipos y columnas .....	60
<b>Tabla No.11</b>	Concentración adicionada y recuperada de la prueba de Tolerancia equipos y columnas .....	60
<b>Tabla No.12</b>	mg Adicionados y recuperados de la prueba de Tolerancia .....	61
<b>Tabla No.13</b>	% Recobro y Diferencia absoluta de Tolerancia entre equipos y tolerancia entre columnas .....	61
<b>Tabla No.14</b>	Resultados obtenidos en la Estabilidad Analítica de la muestra .....	65
<b>Tabla No.15</b>	Resultados obtenidos de Precisión del método Día y Analista .....	69
<b>Tabla No.16</b>	Degradación ácida del placebo adicionado .....	71
<b>Tabla No.17</b>	Degradación básica del placebo adicionado .....	72
<b>Tabla No.18</b>	Degradación oxidativa del placebo adicionado.....	72
<b>Tabla No.19</b>	Impurezas en la degradación ácida del placebo adicionado.....	75
<b>Tabla No.20</b>	Impurezas en la degradación básica del placebo adicionado.....	75
<b>Tabla No.21</b>	Impurezas en la degradación oxidativa del placebo adicionado .....	75
<b>Tabla No.22</b>	Resumen de Resultados.....	82
<b>Tabla No.23</b>	% Recobro de SRef. Exactitud-Repetibilidad y Especificidad.....	86
<b>Tabla No.24</b>	% Recobro de SRef. Precisión del Método Día 1, Analista 1 y 2.....	87
<b>Tabla No.25</b>	% Recobro de SRef. Precisión del Método Día 2, Analista 1 y 2.....	88
<b>Tabla No.26</b>	% Recobro de SRef. Tolerancia Columnas (ACE 5 y WATERS).....	89
<b>Tabla No.27</b>	% Recobro de SRef. Tolerancia Equipos (AGILENT y HITACHI).....	90
<b>Tabla No.28</b>	% Recobro de SRef. Estabilidad analítica de la muestra inicial y 48 horas .	91

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de Cromatografía plana, columna y líquida .....	27
<b>Figura 2.</b> Cromatografía en capa delgada .....	27
<b>Figura 3.</b> Cromatografía en papel ascendente .....	28
<b>Figura 4.</b> Cromatografía en columna .....	29
<b>Figura 5.</b> Representación de un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución .....	31
<b>Figura 6</b> Estructura Química de Amlodipino .....	37
<b>Figura 7.</b> Espectro de absorción de Amlodipino en medio acuoso (ácido y álcali), e Infrarrojo de Amlodipino .....	38
<b>Figura 8.</b> Análisis de naturaleza química de estructura de Amlodipino .....	39

## ÍNDICE DE CROMATOGRAMAS

<b>Cromatograma No.1</b> Adecuación del Sistema .....	55
<b>Cromatograma No.2</b> Prueba de Exactitud y Repetibilidad.....	58
<b>Cromatograma No.3</b> Tolerancia equipo HITACHI .....	62
<b>Cromatograma No.4</b> Tolerancia equipo AGILENT .....	62
<b>Cromatograma No.5</b> Tolerancia columna ACE 5.....	63
<b>Cromatograma No.6</b> Tolerancia columna WATERS.....	63
<b>Cromatograma No.7</b> Estabilidad analítica de la muestra inicial .....	67
<b>Cromatograma No.8</b> Estabilidad analítica de la muestra a las 48 horas.....	67
<b>Cromatograma No.9</b> Precisión del Método Analista 1 Día 1 .....	69
<b>Cromatograma No.10</b> Precisión del Método Analista 2 Día 1 .....	70
<b>Cromatograma No.11</b> Precisión del Método Analista 1 Día 2.....	70
<b>Cromatograma No.12</b> Precisión del Método Analista 2 Día 2.....	71
<b>Cromatograma No.13</b> Blanco de la prueba Especificidad .....	75
<b>Cromatograma No.14</b> Placebo sin degradar .....	76
<b>Cromatograma No.15</b> Degradación ácida del placebo .....	77
<b>Cromatograma No.16</b> Degradación básica del placebo .....	78
<b>Cromatograma No.17</b> Degradación oxidativa del placebo.....	78
<b>Cromatograma No.18</b> Placebo adicionado sin degradar .....	79
<b>Cromatograma No.19</b> Degradación ácida del placebo adicionado .....	79
<b>Cromatograma No.20</b> Degradación básica del placebo adicionado .....	80
<b>Cromatograma No.21</b> Degradación oxidativa del placebo adicionado.....	80

## ABREVIATURAS

$\alpha$	Factor de selectividad.
$b_0$	Ordenada al origen.
$Ca^{2+}$	Molécula de calcio con valencia 2 <sup>+</sup> .
<b>CCD</b>	Cromatografía de capa delgada.
<b>CLAR</b>	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.
<b>CNQFB</b>	Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.
$C_s$	Concentración de Amlodipino Besilato en la solución de referencia (mg/mL).
$C_u$	Concentración de Amlodipino en la solución de la muestra (mg/mL).
<b>CV</b>	Coeficiente de variación.
$CV_{y/x}$	Coeficiente de variación de regresión.
$ d_i $	Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto a la media aritmética del análisis inicial.
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration.
<b>FEUM</b>	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
<b>g/mol</b>	Propiedad física definida como su masa por unidad de cantidad de sustancia.
<b>ICH</b>	International Conference Harmonisation.
<b>IC (<math>\beta_1</math>)</b>	Intervalo de confianza de la pendiente debe de incluir a la unidad.
<b>IC (<math>\beta_0</math>)</b>	Intervalo de confianza de la ordenada al origen debe incluir el cero.
<b>IC (<math>\mu</math>)</b>	Promedio aritmético.
$k'$	Factor de capacidad.
$m$	Pendiente.
<b>(N)</b>	Número de platos teóricos.
<b>ODS</b>	Sílice Octadecilo (por sus siglas en inglés).
<b>PA</b>	Principio Activo.
<b>% B.H.</b>	Porcentaje base húmeda.
<b>% rec.</b>	Porcentaje de recobro.
<b>pH</b>	Coeficiente que indica el grado de acidez de una solución acuosa.
<b>pK<sub>a</sub></b>	Fuerza que tienen las moléculas al disociarse
<b>PTFE</b>	Membranas de politetrafluoroetileno
$r^2$	Coeficiente de correlación al cuadrado
$r_u$	Respuesta del pico de la solución de la muestra
$r_s$	Respuesta del pico de la solución de referencia
<b>Rf</b>	Relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen.
$s$	Desviación Estándar Relativa.
<b>Rs</b>	Factor de resolución.
<b>SSA</b>	Secretaría de Salud.
<b>SRef</b>	Sustancia de Referencia.
<b>T.A.</b>	Temperatura Ambiente.
$t$	Factor de asimetría o de coileo.
$t_M$	Tiempo muerto.
$t_R$	Tiempo de retención.
<b>USP</b>	United States Pharmacopeia.
$V_M$	Volumen muerto.

$V_R$	Volumen de retención.
$Q$	Porcentaje disuelto.
$\bar{x}$	Promedio.
$\bar{x}_0$	Media aritmética análisis inicial.
$\bar{y}_i$	Condición de resguardo o almacenaje.
$(y^0)$	Condición inicial.
$(y^1)$	Condición temperatura ambiente y protegido de la luz.
$(y^2)$	Condición temperatura ambiente expuesta luz.
$(y^3)$	Condición Refrigeración (6°C +/- 2.0°C).

## **1. OBJETIVO**

Complementar el proceso de Validación de un método analítico, para la cuantificación de Besilato de Amlodipino en tabletas de 5 mg de Amlodipino tableta, por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) evaluando los parámetros desempeño: Especificidad, Adecuabilidad del sistema, Exactitud y Repetibilidad, Precisión del método, Tolerancia y Estabilidad de la muestra.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Debido a que no se cuenta con el estudio completo de la Validación de Amlodipino tabletas 5 mg, se procederá a realizar los parámetros de desempeño mencionados anteriormente, por lo cual es imprescindible realizarlas para dar cumplimiento a la NOM-059 (Buenas prácticas de fabricación de medicamentos) , para comprobar que el método analítico es lo suficientemente confiable, repetible y robusto dentro de las condiciones analíticas establecidas.

## **3. HIPÓTESIS**

Se complementará el proceso de validación de un método analítico de Besilato de Amlodipino en tabletas de 5 mg de Amlodipino tableta, mediante el estudio de Estabilidad analítica de la muestra y Tolerancia, si esta cumple se demuestra que el método es robusto y las muestras conservan sus características fisicoquímicas durante el tiempo de almacenamiento y las especificaciones establecidas.

## **4. INTRODUCCIÓN** (Pérez de la Cruz, 2006).

Los procedimientos analíticos utilizados para determinar la calidad de productos farmacéuticos abarcan la mayoría de las técnicas y tecnologías disponibles, por lo que es imprescindible tener en cuenta el aspecto más importante de cualquier método analítico, la calidad de datos que produce. Una de las guías más utilizadas y consultadas en la industria farmacéutica es la llamada "Validation of Compendial Methods" encontrado en el apartado de Métodos Generales de la USP, donde se define a la validación de métodos analíticos como el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de un método analítico cumplen con los requisitos para su aplicación analítica y que será libre de problemas durante su uso. (USP, 2017)

Existen Guías como la de Food and Drug Administration e ICH (FDA e ICH por sus siglas en inglés) las cuales describen que parámetros de validación se determinan necesarios dependiendo de la aplicación del método analítico. Por ejemplo, para métodos de impurezas, contenido de principios activos, o validación de limpieza etc.

Los parámetros de validación para un determinado método analítico deben ser evaluados para demostrar y documentar que dicho método se obtendrán resultados confiables cuando se lleve a cabo. Por eso la validación o revalidación del método analítico debe hacerse en base a sus requerimientos propios.

En nuestro país existen guías como la de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de QFB (CNQFB) y normas como la Norma Oficial NOM-059-SSA1-2015, “Buenas prácticas de fabricación de medicamentos” y otras normas relacionadas publicadas en el Diario oficial de la Federación. En dichas guías se establece que los establecimientos que se destinen a la fabricación de insumos para fármacos y medicamentos, así como los que fabriquen fármacos y medicamentos, deben llevar el control analítico de éstos incluyendo especificaciones y técnicas analíticas para analizar los componentes de sus productos, así como la validación de cualquier técnica empleada-

La “NOM-059-SSA1-2015”, establece que los métodos analíticos deben ser validados de acuerdo al apartado de “Control de Laboratorio Analítico”; Sí no aparece en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) o en cualquier farmacopea internacional, la documentación relativa a este estudio de validación, debe realizarse por el laboratorio siendo el fabricante responsable de mantenerla y revisarla. Esta documentación debe estar completa, ordenada y disponible para su presentación en caso de requerirse durante alguna auditoría

Antes de comenzar una validación se debe contar con documentación. El protocolo de validación que es un documento que especifica los parámetros de validación a ser evaluados, las pruebas y parámetros que se llevarán a cabo y como serán valorados los resultados a través de criterios de aceptación.

La validación de métodos es un requisito importante en la práctica de los análisis químicos. Si bien la mayoría de los químicos analíticos son conscientes de ello, no siempre está claro por qué y cuándo debe realizarse y qué es necesario hacer.

La USP No. 41 NF 36 en el apartado de validación de métodos analíticos <1225> para sólidos orales requiere que cumpla con los requisitos de Adecuabilidad, Linealidad (Método y Sistema), Exactitud y Especificidad para dictaminar que un método cumple con todos los atributos para decir que un método tiene el estatus de validado como se presenta en la Tabla No. 1 y 2.

Previamente se realizó la validación del método analítico de Amlodipino, cumpliendo con las pruebas antes mencionadas, sin embargo no se cuenta con la información de tolerancia y estabilidad de la solución. Con el fin de dar cumplimiento a la normatividad de estos parámetros serán evaluados en la presente complementación de la validación.

La finalidad de este trabajo es complementar el proceso de Validación de un método analítico Compendial y aumentar la comprensión sobre los parámetros evaluados y el por qué es importante, así como se debe llevar a cabo mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución y los criterios de análisis estadísticos, establecidos en la Guía de Validación de métodos analíticos del Colegio de QFB. (Magnusson et.al. Örnemark, 2016), (Guía Métodos Analíticos, 2002).

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es una técnica que por su naturaleza es muy fiable, es específica, selectiva y de muy buena exactitud.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 MÉTODO ANALÍTICO (USP, 2017)

Un método analítico es la forma de llevar a cabo un análisis, ya que describe a detalle los pasos necesarios para realizar una prueba e incluye tratamiento de muestras, de sustancias de referencia, preparación de reactivos, equipos, aparatos, fórmulas para cálculos, etc.

Los métodos o procedimientos, analíticos se dividen, de acuerdo a su propósito analítico en diferentes categorías:

- **Categoría I:** Procedimientos analíticos para la cuantificación de productos farmacéuticos a granel o principios activos, en productos terminados.
- **Categoría II:** Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en API (principio activo) o compuestos de degradación en productos farmacéuticos. Incluyen análisis cuantitativos y pruebas límite.
- **Categoría III:** Procedimientos analíticos para la determinación de características de desempeño, por ejemplo: disolución, liberación del fármaco, etc.
- **Categoría IV:** Pruebas de identificación.

### 5.2 VALIDACIÓN DE MÉTODOS

La validación de un método o procedimiento analítico surge de la necesidad de tener métodos analíticos que no presenten variaciones durante su uso cumpliendo con su propósito analítico para obtener datos exactos, precisos y sobre todo confiables. Se llevan a cabo pruebas en el laboratorio que cumplan con parámetros y criterios de aceptación previamente establecidos.

#### 5.2.1 Requerimientos generales para validación de métodos analíticos

El nivel y extensión de los requerimientos de una validación de métodos analíticos debe tomar en cuenta la etapa de desarrollo de un producto, el tipo de método



(impurezas de identificación, potencia, ensayo, etc.) y su uso (investigación, para la liberación de procesos, producto terminado o validación de limpieza, o bien tiempo de permanencia según sea el caso).

Antes de iniciar con las actividades o experimentos en el laboratorio de la validación se debe de contar con documentación aprobada por los departamentos involucrados. Entre esta documentación se encuentra el plan maestro de validación que es una parte integral de un proyecto de validación organizado. Especifica el alcance de la validación, las responsabilidades, objetivos generales, procedimientos y protocolos que deben realizarse.

También se debe tener el protocolo de Validación que es el documento que describe el método a ser validado, especifica los parámetros que serán evaluados, sus criterios de aceptación, las pruebas que se van a llevar a cabo y de qué forma serán evaluados los resultados para su aceptación, así como los pasos a seguir en caso de encontrar resultados atípicos o que no cumplan con los criterios de aceptación establecidos.

Los análisis en el laboratorio deben realizarse en instrumentos y equipos calificados y con estándares de referencia certificados. Una vez que se obtienen datos de las pruebas realizadas, se deben hacer análisis de dichos datos con procedimientos estadísticos adecuados. Estos procedimientos estadísticos también deben ser determinados antes de empezar la validación. Es importante que los programas y las hojas de cálculo que se utilizarán estén validados o verificados.

Una vez que se concluyen los estudios experimentales y que se han obtenido datos se debe hacer una recopilación donde se indique si los parámetros cumplen con los criterios de aceptación. Este documento forma parte del reporte de validación para el método específico.

### **5.2.2 Criterios de aceptación**

Son límites numéricos. Intervalos y otra medida apropiada para aceptar los resultados de un método analítico. Deben ser establecidos basados en los límites de especificación. Los criterios de aceptación deben ser establecidos antes de iniciar la validación y ser incluidos en el protocolo de validación.

### **5.3 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN**

En el caso de los métodos compendiales presentes en farmacopeas, las regulaciones señalan que no es obligatorio validarlos, a pesar de esto, es importante verificar que son métodos adecuados para las condiciones normales de uso y para las condiciones presentes en el laboratorio analítico donde serán aplicados. (FEUM, 2017)

Los parámetros para validar un método analítico son:

- Adecuabilidad del Sistema
- Especificidad y Selectividad
- Linealidad del Sistema
- Exactitud
- Precisión
- Repetibilidad
- Precisión del método
- Reproducibilidad
- Linealidad del Método
- Límite de Detección\*
- Límite de Cuantificación\*
- Tolerancia
- Reproducibilidad (ICH,2005)

Las guías ICH y USP son las principales guías para la validación de métodos analíticos, en la tabla 1 y 2 se resumen los parámetros de validación más importantes generalmente usados.

Los parámetros requeridos para la validación de procedimientos de acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos USP se muestran en la Tabla 1:

**Tabla No. 1** Parámetros requeridos para la Validación. (USP, 2017)

CATEGORÍA DE PRUEBA	CATEGORÍA I (Principios activos)	CATEGORÍA II		CATEGORÍA III (Disolución)	CATEGORÍA IV (Identificación)
		LÍMITE CUANTITATIVO (Impurezas orgánicas)	LÍMITE CUALITATIVO (Metales pesados)		
EXACTITUD	SI	SI	✓	✓	NO
PRECISIÓN	SI	SI	NO	SI	NO
ESPECIFICIDAD	SI	SI	SI	✓	SI
LÍMITE DE DETECCIÓN	NO	NO	SI	✓	NO
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	NO	SI	NO	✓	NO
LINEALIDAD	SI	SI	NO	✓	NO
INTERVALO	SI	SI	✓	✓	NO

**✓ Puede ser requerida dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.**

Dependiendo del tipo de prueba, se realiza el análisis ya que no todos aplican para las diferentes pruebas, por lo tanto, para hacer la validación de un método analítico se debe tomar en cuenta lo que se va a determinar, con dicho método. En la Tabla 2, se muestran el tipo de prueba y características de desempeño de validación que aplican, según las guías ICH.

**Tabla No. 2** Clase método analítico guía ICH. (ICH, 2005)

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO	TIPO DE APLICACIÓN ANALÍTICA			
	ENSAYO DE INDETIFICACIÓN	ENSAYO DE CUANTIFICACIÓN DE IMPUREZAS	ENSAYO PARA LÍMITE DE IMPUREZAS	CUANTIFICACIÓN DEL COMPONENTE PRINCIPAL
SELECTIVIDAD	✓	✓	✓	✓
LÍMITE DE DETECCIÓN			✓	
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN		✓		
LINEALIDAD		✓		✓
EXACTITUD		✓		✓
PRECISIÓN (REPETIBILIDAD Y PRECISIÓN DEL MÉTODO)		✓		✓

### 5.3.1 Adecuabilidad del Sistema

La Adecuabilidad del sistema consiste en verificar que el sistema, por ejemplo, el instrumento, analista, equipo o sustancia de referencia, cumplen con criterios de aceptación preestablecidos, de esta forma se asegura la confiabilidad de las respuestas analíticas y por lo tanto la de los resultados del método analítico.

Un ejemplo de Adecuabilidad del sistema es inyectar por quintuplicado la solución de Adecuabilidad, la respuesta de este analito debe cumplir con un coeficiente de variación y cuando aplique, en caso de cromatografía, cumplir con criterios como factor de capacidad, resolución, tiempos de retención relativa, factor de coleo, número de platos teóricos, entre otros. (Pérez de la Cruz, 2006)

Los criterios de aceptación que usualmente se manejan son los siguientes:

- $CV \leq 2.0 \%$ .

Y para cada inyección se recomienda:

- $k' > 2$  (Factor de capacidad)
- $r > 2$  (Resolución)
- $t < 2$  (Factor de Coleo)

### **5.3.2 Especificidad, Selectividad e Idoneidad**

- **Especificidad**

Capacidad del método para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra. (Guía Métodos Analíticos, 2002)

- **Selectividad**

Es la capacidad de un método para medir y diferenciar al analito de interés, en presencia de otros componentes en la muestra.

La selectividad es uno de los primeros parámetros a evaluarse, ya que se debe conocer en qué grado la respuesta del método es únicamente proporcionada por el analito de interés. (Q2A, 2002)

#### **Criterio de aceptación**

La respuesta del método únicamente debe estar relacionada con la presencia del analito a detectar.

- **Idoneidad**

Es una medida del desempeño del equipo día a día. Esta prueba asegura que el método y el sistema cromatográfico, puede generar resultados de precisión y exactitud aceptables.

#### **Criterio de aceptación**

basado en parámetros cromatográficos críticos tales como resolución, reproducibilidad en el tiempo de retención, área y altura de los picos, eficiencia de la columna y sus variaciones (desviación estándar) dentro de los límites aceptables, los cuales se definen durante los experimentos de validación de métodos analíticos. Actualmente las mediciones de idoneidad se han convertido en parte de los procedimientos analíticos, y también son recomendadas por las farmacopeas y aceptadas por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos.

### **5.3.3 Linealidad del sistema**

La linealidad es la habilidad de un de obtener respuestas analíticas que sean directamente proporcional a cambios de concentración del analito en la muestra, dentro de un intervalo determinado. (Métodos, 2002)

El analista debe preparar, por lo menos y por triplicado, se recomienda 5 niveles de concentración, que corresponden al intervalo, a partir de una solución concentrada

de referencia, por diluciones o por pesadas independientes cuando no sea posible por dilución.

El intervalo debe incluir la especificación para el caso de método utilizados para contenido, potencia o valoración.

La linealidad se evalúa haciendo cálculos de regresión lineal obteniendo pendiente, ordenada al origen, coeficiente de determinación e intervalo de confianza. También por el método de mínimos cuadrados.

### **Criterios de aceptación**

#### **Cantidad adicionada vs cantidad recuperada**

---

- $r^2 > 0.98$
- El intervalo de confianza no debe incluir el cero.
- $m \neq 0$
- El IC ( $\beta_1$ ) debe de incluir la unidad.
- El IC ( $\beta_0$ ) debe incluir el cero.
- El CV  $_{y/x}$  del porcentaje de recobro, no debe ser mayor de 2.0% si el método es cromatográfico.

#### **Porcentaje de recobro**

---

- El IC ( $\mu$ ) debe incluir el 100 % o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo:
- 98.0 % -102.0 % si el método es Cromatográfico.
- El CV del porcentaje de recobro: no debe ser mayor de 2.0 % si el método es cromatográfico.
- Es conveniente trazar la gráfica de la cantidad adicionada (x) vs la cantidad recuperada (y), e incluir la ecuación, su línea y el coeficiente de determinación.

### **5.3.4 Linealidad del método**

El analista debe preparar el placebo analítico con el tipo de componentes que generalmente están en la muestra, en caso de que se conozcan los componentes de la muestra, si no es así, se preparan muestras adicionadas con una sustancia de referencia (**Placebo Analítico**).

Cuando no se conocen los componentes de la muestra, se debe preparar por lo menos 3 muestras adicionadas, por ejemplo, utilizando la mitad de la muestra analítica que originalmente requiere el método y adicionar el analito (puede ser una

sustancia de referencia secundaria), hasta completar lo que represente el 100 % de éste en la muestra. Seleccionar al menos dos niveles, superior e inferior a cada nivel por triplicado, manteniendo constante la cantidad de muestra en los tres niveles. Las muestras adicionadas deben ser analizadas por un mismo analista bajo las mismas condiciones, utilizando como referencia, la sustancia empleada en la adición al placebo analítico. Determinar la cantidad recuperada del analito. (Métodos, 2002)

Cuando no sea posible adicionar de manera directa el analito a la muestra la adición puede ser llevada a cabo en alguna etapa del método. Se recomienda que la adición se lleva a cabo en las primeras etapas del método, para poder asegurar que las etapas posteriores, no den lugar a resultados incorrectos. Por ejemplo, si una muestra se debe extraer, filtrar o diluir, es conveniente que la adición se lleve a cabo antes de extraer; ya que, si existiera algún problema con la extracción o con la filtración, y el analito se adiciona a la muestra o placebo analítico hasta antes de diluir, puede dar lugar a resultados incorrectos. (Métodos, 2002)

Se construye la gráfica de cantidad adicionada (mg) vs cantidad recuperada (mg).

### **Criterios de aceptación**

- $r^2 \geq 0.98$ .
- El intervalo de confianza (IC) de la pendiente debe de incluir a la unidad.
- El intervalo de confianza (IC) de la ordenada al origen debe incluir el cero.
- $CV \leq 2.0$  % del porcentaje de recobro.

### **5.3.5 Exactitud**

Es la concordancia entre un valor aceptado como verdadero o de referencia y el valor obtenido. Esta concordancia se expresa como porcentaje de recobro obtenido del análisis de las muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de sustancia (**Placebos Cargados**).

Para la evaluación de contenido de principio activo se preparan placebos cargados a lo largo del rango, al valor especificado y a los extremos. Si no se cuenta con placebos cargados se acepta adicionar principio activo al producto terminado (**Adiciones Patrón**).

Se realiza con placebo cargado un mínimo de 3 determinaciones a cada nivel, el CNQFB ahora pide 6 determinaciones al 100 %. Si se requiere validar un rango muy pequeño, como en el caso de impurezas, con una determinación al 100 % es suficiente. Se reporta el % de recobro.

Calcular el promedio aritmético, la desviación estándar, el coeficiente de variación y el intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro.

### **Criterios de aceptación**

El intervalo de confianza debe incluir el 100 % o que el promedio de % recuperado se incluya en el intervalo. (Guía de Validación de Métodos Analíticos , 2002)

- (98.0 – 102.0) % para métodos cromatográficos o volumétricos y el  $CV \leq 2.0$  %.
- (97.0 – 103.0) % para métodos químicos o espectrofotométricos y el  $CV \leq 3.0$  %.
- (95.0 – 105.0) % para métodos microbiológicos y el  $CV \leq 5.0$  %.

Cuando se trata de impurezas y si se cuenta con ellas, se preparan muestras cargadas con estas cantidades correspondientes al límite de cuantificación, al 120% y a un nivel intermedio con un mínimo de 3 réplicas.

En el caso de disolución se debe demostrar que no hay adsorción de los compuestos del placebo o durante el filtrado, con el principio activo, esto se demuestra por el recobro de cantidades conocidas del principio activo adicionado directamente al aparato de disolución en presencia del placebo.

Se realizan tres concentraciones por triplicado cubriendo el rango de especificación por ejemplo de Q, (prueba de disolución).

### **5.3.6 Precisión**

Capacidad del método para producir resultados analíticos con una variabilidad aceptable para el tipo de método, tipo de muestra y aplicación analítica deseada, al repetir el ensayo al menos 6 veces sobre una muestra homogénea. (Métodos, 2002)

### **5.3.7 Repetibilidad**

Es la precisión de determinaciones independientes bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo de tiempo: analista, aparatos, equipos. Se utilizan placebos cargados.

Se realizan un mínimo de 9 determinaciones cubriendo el rango especificado o un mínimo de 6 determinaciones al 100 %.

### **Criterios de aceptación**

- $CV \leq 2.0$  %.

### **5.3.8 Precisión del método**

Es la precisión en donde hay variaciones dentro del mismo laboratorio, por ejemplo: diferentes días, analistas y equipos. (ICH,2005)

Una muestra de producto terminado, es analizada por triplicado por dos analistas en dos días diferentes.

Calcular el contenido de principio activo, la media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación.

#### **Criterios de aceptación**

- $CV \leq 2.0 \%$ . Para métodos cromatográficos o volumétricos.
- $CV \leq 3.0 \%$ . Para métodos químicos y espectrofotométricos. (Guía de Validación de Métodos Analíticos , 2002)

### **5.3.9 Reproducibilidad del método**

Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios. (ICH, 2005)

### **5.3.10 Límite de detección**

Concentración mínima o cantidad del analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas. (Métodos, 2002)

Aunque la USP se expresa el límite de detección como 2 o 3 veces el ruido, este concepto no es muy práctico, ya que el nivel de ruido en diferentes detectores o tipos de detectores pueden variar respecto a la vida media de la lámpara. <sup>[8]</sup>

Un analista debe determinar la respuesta de muestras blanco, por ejemplo, placebos analíticos, reactivos, solventes, etc. Y la respuesta de muestras analíticas como analito, o placebos adicionados según proceda, en un intervalo de concentraciones del analito que incluya la especificación de la prueba de impurezas límite o inferiores, o que incluya la especificación del contenido de la prueba de impurezas (cuantificación).

#### **Criterios de aceptación**

- El límite de detección debe ser menor a la especificación de la prueba de productos de degradación o valor de sustancias de degradación.

### **5.3.11 Límite de cuantificación**

Es la concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas.



El límite de cuantificación se expresa como 10 veces la señal ruido

### **Criterios de aceptación**

- El límite de cuantificación debe ser menor a la especificación de contenido de principio activo o del límite de impurezas

#### **5.3.12 Tolerancia**

Grado de reproducibilidad de los resultados analíticos por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones de operación, estableciendo los factores ajenos al equipo (diferentes equipos, lotes de reactivos) que se presentan al reproducir el método en otras condiciones de uso. Fijar 2 condiciones de uso y analizar la muestra por triplicado a cada condición. Reportar el contenido/potencia/valoración del analito en todas las muestras. Calcular ( $\bar{x}$ ,  $s$  y CV) del contenido de principio activo (ICH, 2005).

### **Criterios de aceptación** (Guía de Validación de Métodos Analíticos , 2002)

- $CV \leq 2.0 \%$ . Para métodos cromatográficos o volumétricos.
- $CV \leq 3.0 \%$ . Para métodos químicos y espectrofotométricos.
- $CV \leq 5.0 \%$ . Para métodos biológicos.

#### **5.3.13 Robustez**

Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas en las condiciones normales de operación. Por ejemplo, algunos factores instrumentales como temperatura de la columna, velocidad de flujo, presión o factores no instrumentales como pH de la fase, proporción de los componentes de la fase, etc. La misma muestra se analiza por triplicado. Reportar el contenido, potencia o valoración del analito para las muestras de condición normal de operación y para las muestras de las otras condiciones de operación expresadas como porcentaje.

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

### **Criterio de aceptación** (Guía de Validación de Métodos Analíticos , 2002)

- $|d_i| \leq 2.0 \%$ . Para métodos cromatográficos o volumétricos.
- $|d_i| \leq 3.0 \%$ . Para métodos químicos y espectrofotométricos.
- $|d_i| \leq 5.0 \%$ . Para métodos biológicos.

### **5.3.14 Estabilidad de las soluciones.**

Es la característica de una muestra y/ o soluciones de referencia, preparadas para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas. El analista debe establecer la etapa de análisis en la cual se desea evaluar la estabilidad y las condiciones de almacenaje y tiempo.

El analista debe procesar hasta la etapa preestablecida por lo menos por triplicado una muestra homogénea. Fraccionar cada una de las preparaciones de acuerdo a las condiciones de almacenaje y terminar el análisis de una de las fracciones de cada preparación. Se prosigue con el análisis de cada una de las fracciones al término de cada condición y utilizando una solución de referencia preparada recientemente.

Calcular la media aritmética del análisis inicial y de cada condición de almacenaje. Calcular la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje con respecto al análisis inicial  $|d_i|$ .

#### **Criterios de aceptación.**

- $|d_i| \leq 2.0 \%$ .

### **5.4 CROMATOGRAFÍA**

La Cromatografía es ahora una de las técnicas más utilizadas para la determinación de cualquier tipo de sustancias gracias a su alta confiabilidad y a la gran capacidad para separar las sustancias. (Stout, 2002)

La cromatografía es una familia de técnicas analíticas para la separación de mezclas en base a la diferencia en las velocidades de migración de los compuestos a través de una fase estacionara cuando son acarreados por una fase móvil. La mezcla puede ser arrastrada por un líquido o por un gas y todos los componentes son separados como resultado de su distribución diferencial entre la fase móvil y la fase estacionaria que puede ser sólida o líquida. (Harris, 2006)

En general la cromatografía es un método de separación que explota la partición, adsorción, intercambio iónico o exclusión de los componentes de una mezcla entre la fase móvil y la fase estacionaria. Los componentes pueden interactuar con estas fases en base a su solubilidad relativa, adsorción, carga o tamaño de partícula respectivamente. (Cohen, 1998), (Szepesi, 1990).

Está técnica, data de principios del Siglo XX, con la separación de pigmentos por Tswett en 1906, este autor utilizó este método para separar pigmentos coloreados de las plantas, Puso extractos de la planta en la punta de la columna de vidrio llena de carbonato de calcio y después vertió un disolvente orgánico; los diferentes

pigmentos se separaron en función de su afinidad relativa por el carbonato de calcio o el disolvente orgánico. Esta experiencia muestra el principio mismo de la cromatografía que comprende dos fases (Stout, 2002):

- Una fase estacionaria fija, ya sea sólida o líquida; en el último caso se fija sobre un soporte sólido inerte. Esta fase puede estar dentro de una columna o recubrir una placa.
- Una fase móvil que se desplaza hacia el interior de esta columna o de una manera más general, hacia el interior de la matriz que forma la fase estacionaria. La fase móvil es siempre fluida: gas o líquido. Conforme se desplaza la fase móvil, las moléculas de los componentes de la muestra son eluidas; la velocidad de migración es función de la diferencia de afinidad entre las fases estacionaria y móvil. La fase móvil migra por gravedad, capilaridad y por presión (bomba en la CLAR, gas a presión en la cromatografía gaseosa). (Cohen, 1998).

#### **5.4.1 Cromatografía de adsorción** (Lamarque, 2008)

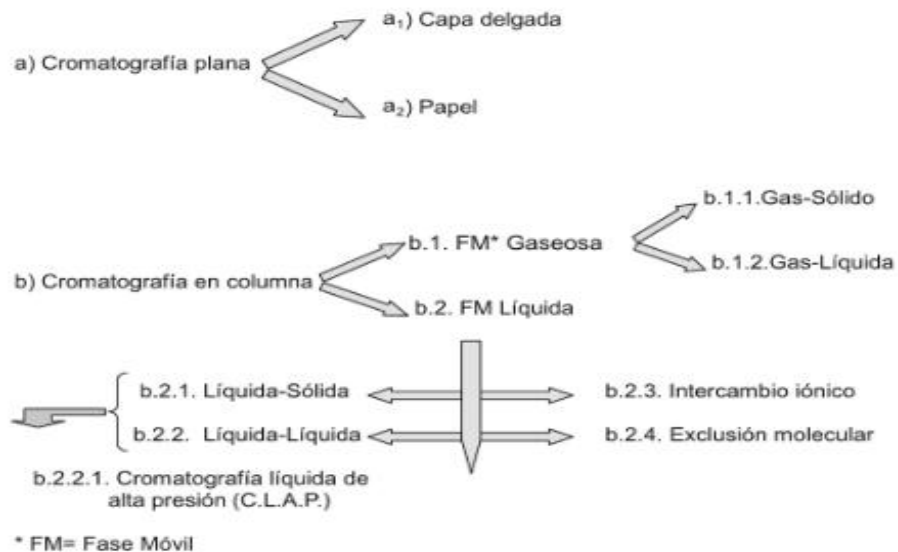
La fase estacionaria es un sólido sobre el que se adsorben los componentes de la muestra. Los mismos se distribuyen entre las dos fases por un proceso de adsorción-desorción. En este tipo de cromatografía diferencian las siguientes técnicas: cromatografía líquido-sólido (la fase móvil es líquida), cromatografía gas-sólido (la fase móvil es un gas) y cromatografía de capa fina (la fase estacionaria es sólida y la móvil líquida).

#### **5.4.2 Cromatografía de partición** (Lamarque, 2008)

La fase estacionaria es un líquido depositado sobre la superficie de un sólido inerte. Están incluidas en este apartado: cromatografía líquido-líquido (la fase móvil es un líquido), cromatografía gas líquido (la fase móvil es un gas) y cromatografía en papel (la fase estacionaria está constituida por una capa de agua absorbida sobre una hoja de papel).

#### **5.4.3 Cromatografía de intercambio iónico** (Lamarque, 2008)

La fase estacionaria es una resina de intercambio iónico. La separación se basa en el equilibrio que se establece en el intercambio de iones. Dentro de estos tipos de cromatografía existen diferentes técnicas que se sintetiza en el siguiente esquema:

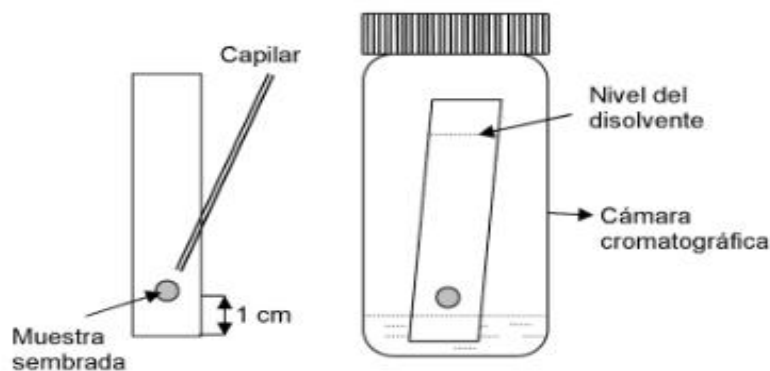


**Figura 1.** Esquema de Cromatografía plana, columna y líquida. (Lamarque, 2008)

#### 5.4.4 Cromatografía plana o de capa fina

Cromatografía en capa delgada (CCD) es una técnica de adsorción sólido- líquido. La fase móvil asciende por capilaridad a través de una capa delgada de adsorbente adherida a un soporte. Los soportes más utilizados son placas de vidrio, aluminio, o materiales plásticos.

Los adsorbentes empleados habitualmente incluyen: sílica gel, alúmina, hidróxido de aluminio, hidróxido de calcio, carbonato de calcio, conteniendo algún material que permita que la fase estacionaria se mantenga sobre el soporte. (Lamarque, 2008)



**Figura 2.** Cromatografía en capa delgada. (Lamarque, 2008)

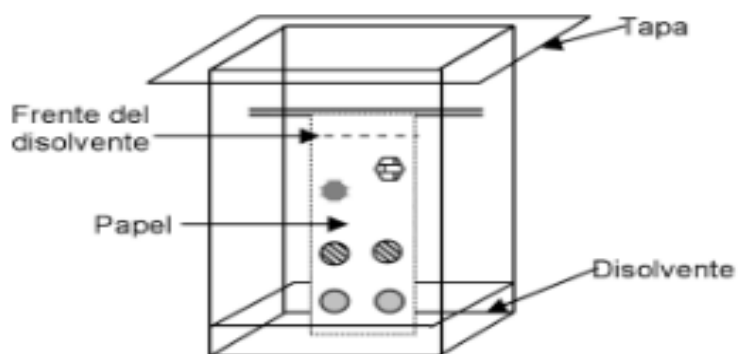
#### 5.4.5 Cromatografía en papel

Esta técnica utiliza como soporte una tira de papel cromatográfico. El papel cromatográfico colocado en una atmósfera saturada con vapores de agua puede absorber entre un 20-25% de agua. El agua retenida por el papel es la fase

estacionara, que tiene un poder disolvente distinto al agua pura, frente a los solutos. Debido a este hecho, es posible una partición entre el agua de la fase estacionara y otro disolvente inmiscible o no que, inclusive, puede ser agua pura.

El  $R_f$  de los distintos componentes de la muestra depende del coeficiente de partición y de las cantidades relativas de las dos fases en contacto. El disolvente de desarrollo y la naturaleza de los grupos funcionales presentes en los solutos, son las variables más importantes que determinan las movilidades relativas entre ellos. (Lamarque, 2008)

Como la fase móvil es un disolvente orgánico saturado en agua, la polaridad de dicha fase será siempre menor que la de la fase estacionaria, por lo que las sustancias más polares serán retenidas con mayor fuerza, y las sustancias menos polares se desplazarán más rápidamente de la zona de siembra.



**Figura 3.** Cromatografía en papel ascendente. (Lamarque, 2008)

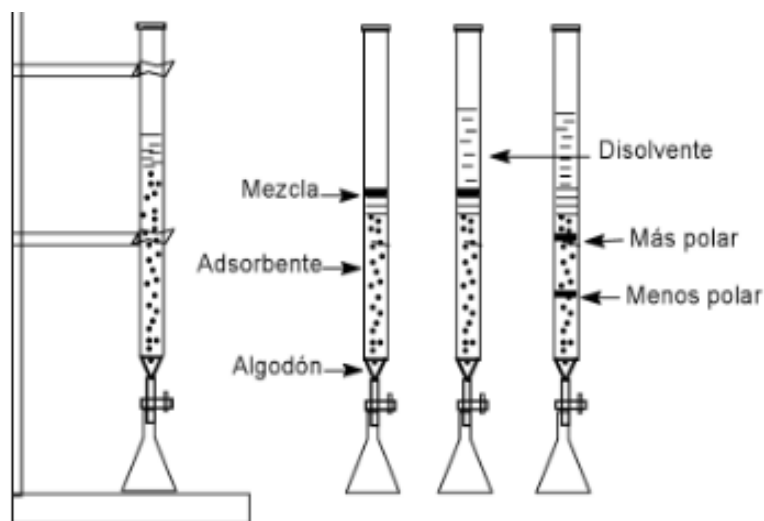
#### 5.4.6 Cromatografía en columna

Se emplea para la separación de mezclas y purificación de sustancias a escala preparativa. Como fase estacionaria (adsorbente) se usa, generalmente, sílice o alúmina contenida en una columna. El disolvente pasa a través de la columna por efecto de la gravedad o bien con aplicación de presión (se habla de percolación) el tamaño de la columna está determinado por la cantidad de mezcla a separar. La relación de masa de muestra a masa de adsorbente es de 1:100 a 1:500.

La velocidad a la cual el disolvente fluye a través de la columna se denomina velocidad de elución y es importante en la efectividad de la separación.

En general, el tiempo que la mezcla a separar permanece en la columna es directamente proporcional a la magnitud del equilibrio entre las fases estacionaria y móvil. Por lo tanto, compuestos similares pueden eventualmente separarse si permanecen en la columna el tiempo suficiente. El tiempo que una sustancia permanece en la columna depende de la velocidad de flujo del disolvente afectada

en gran medida, por el “empaquetamiento” de la fase estacionaria dentro de la columna, y en menor medida, por la presión y temperatura del sistema. Si el flujo es muy lento, las sustancias de la mezcla, cuando están en el disolvente, pueden difundir más rápidamente que la velocidad a la cual se mueven hacia la salida de la columna. En este caso las bandas se ensanchan, se hacen difusas, resultando en una separación pobre. (Lamarque, 2008)



**Figura 4.** Cromatografía de columna. (Lamarque, 2008)

#### **5.4.7 Cromatografía gaseosa**

En la cromatografía de gases, la fase móvil es un gas que transporta al soluto, el cual, a la temperatura de trabajo, también se encuentra en estado gaseoso.

#### **5.4.8 Cromatografía de adsorción gas – sólido**

Utiliza como fase estacionaria partículas sólidas sobre las que el soluto puede adsorberse. Tiene un rango limitado de aplicación (se usa especialmente para separar gases). (Skoog, 2001)

#### **5.4.9 Cromatografía de adsorción gas – líquido**

Emplea como fase estacionaria un líquido no volátil, adsorbido en la superficie de un soporte sólido inerte (columnas rellenas o empaquetadas) o en la pared interna de un tubo capilar (columnas capilares). (Harris, 2006)

La base de la separación radica en la partición de la muestra entre el gas portador y la fase líquida. Existe una gran variedad de fases líquidas, muchas de las cuales pueden utilizarse a temperaturas hasta los 400 °C. Las columnas rellenas contienen un adsorbente “empaquetado”. En algunos casos la carga puede ser un sólido inerte recubierto con una película líquida en donde ocurre la partición. Las columnas capilares generalmente se presentan enrolladas en forma de espiral lo que permite

obtener longitudes de hasta 60 m, con un diámetro interno de 0.20-0.50 mm. Las paredes internas están recubiertas por una delgada capa líquida, no volátil (la fase estacionaria), en donde se produce la partición.

La velocidad con la que se mueven las sustancias dentro de la columna depende de la temperatura de análisis, la velocidad de flujo del gas portador y la medida en que el vapor de la sustancia es retenido. El tiempo que transcurre entre el momento en que los componentes de la muestra entran a la columna y son detectados se denomina "Tiempo de retención". Aquellos compuestos más afines a la fase estacionaria serán eluidos tardíamente en relación con los más afines a la fase móvil.

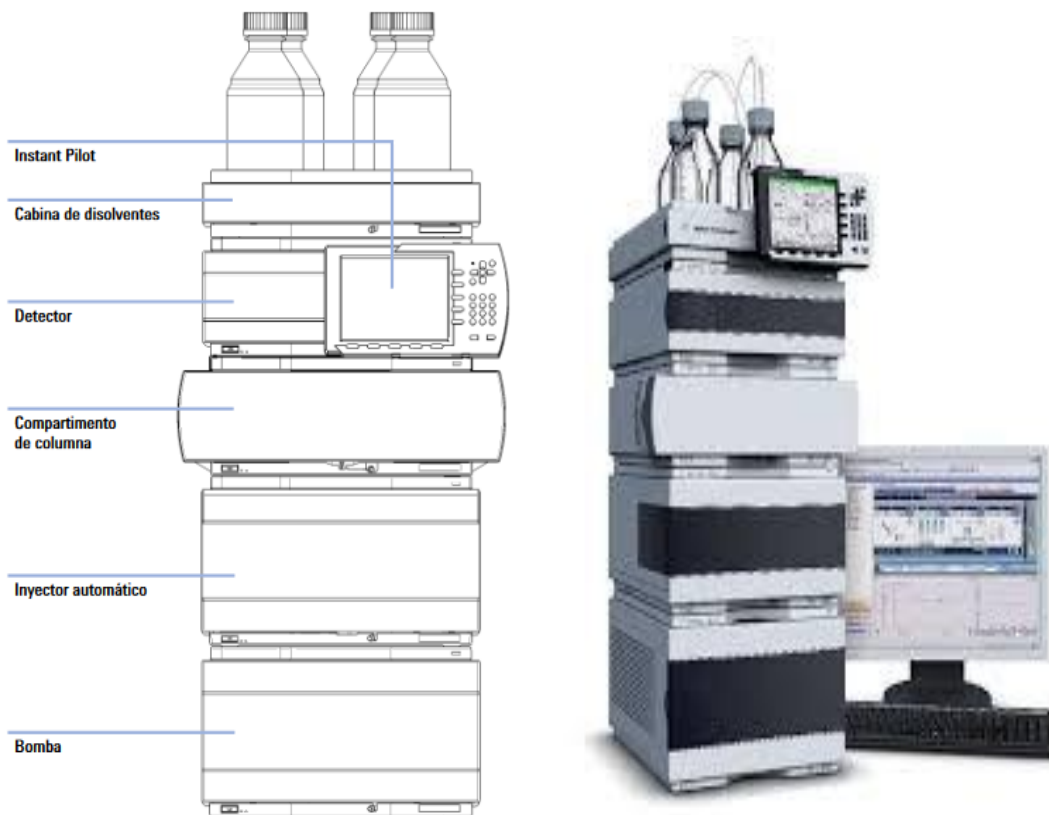
Factores que afectan la efectividad de una separación:

- Longitud de la columna
- Diámetro de la columna
- Tamaño de las partículas del relleno y forma geométrica (columnas empaquetadas)
- Naturaleza de las fases
- Cantidad de la fase estacionaria
- Temperatura de la columna
- Velocidad de flujo del gas portador
- Cantidad de muestra inyectada

### **5.5 GENERALIDADES DE LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).**

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), implica, en forma general el uso de una fase móvil líquida que consiste en una mezcla de disolventes que se hace pasar a través de una columna empacada con la fase estacionaria, para esta operación se hace necesario el uso de un sistema de bombeo. El equipo requiere también de un inyector, ya sea manual o automático, para introducir las muestras a la columna y de un detector adecuado para el análisis de la muestra, además de un registrador. La tecnología actual, permite el manejo de todo un equipo cromatográfico a través de una computadora y el uso de programas específicos aplicables a esta técnica de análisis incluyendo detectores de arreglo de diodos, pero los principios siguen siendo los mismos. (S.Galicia, 2001)

## Componentes del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución



**Figura 5.** Representación de un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución.

- **Fase móvil** (S. Galicia, 2001)

En el análisis de productos farmacéuticos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) en fase inversa, se utilizan básicamente mezclas que contienen: Agua, Metanol, Acetonitrilo y, algunas veces, pequeñas cantidades de Tetrahidrofurano. Adicionalmente, se requiere el control del pH, para lo cual suelen utilizarse ácidos débiles como el ácido acético y el ácido fosfórico, siendo más recomendable éste último debido a la menor absorbancia que presenta a longitudes de onda bajas en la región ultravioleta.

Una forma más efectiva del control de pH es utilizar soluciones amortiguadoras, como las de fosfatos, ya sea de sodio, de potasio o de amonio y ácido fosfórico e hidróxidos de sodio o potasio para efectuar el ajuste final del pH. Otras sales que pueden adicionarse a la fase móvil y que son muy utilizadas en la actualidad en la cromatografía de par iónico son las sales de sodio del ácido alquisulfónico (etano, pentano, hexano, heptano y octano sulfonato de sodio) para el análisis de compuestos que se ionizan en medio ácido, es decir, bases débiles, muy comunes



en productos farmacéuticos. Por otro lado, tenemos las sales como el hidróxido de tetrametil y tertrabutilamonio o bromuro de tetraheptilamonio para compuestos que se ionizan en medio alcalino, aplicables al análisis de ácidos débiles en productos farmacéuticos. El uso de estos reactivos es común en la técnica de separación por par iónico en donde la primera condición, es mantener ionizado el compuesto que se requiere separar y que dependerá por lo tanto de sus características ácido-base.

La ionización se logra entonces controlado el pH, posteriormente se forma un par iónico con la sal adicionada y puede lograrse la retención y separación en un sistema cromatográfico de fase inversa. Cuando se quiere utilizar la técnica de supresión iónica, basta simplemente con el control de pH para evitar ionizar los compuestos que se desean separar.

En la Cromatografía de fase inversa se requiere que el analito no tenga carga, lo cual se logra básicamente suprimiendo la ionización o ionizando primero y formando un par iónico que se comporta como un compuesto sin carga. Existen otras sales que pueden ser utilizadas en las fases móviles con el mismo principio. Es común también el uso de dietilamina y Trietilamina para disminuir la asimetría de picos en el cromatograma. Las diversas sales del ácido alquisulfónico generalmente tienen un efecto de retención proporcional a la longitud de la cadena carbonada, o cual puede utilizarse para optimizar la separación.

- **Bomba:** Se requiere siempre un sistema de bombeo para hacer pasar la fase móvil a través de la columna. Se le han sumado aditamentos a fin de alcanzar siempre un flujo constante para lograr reproducibilidad en los tiempos de retención y, por lo tanto, en los análisis. Se han desarrollado sistemas automáticos que efectúan cambios de flujo y cambios en las proporciones de la fase móvil programables a través del tiempo que se aplican en las separaciones por gradiente.
- **Inyector:** A través del inyector, se introducen las muestras al sistema cromatográfico y existen en la actualidad tanto inyectores manuales como inyectores automáticos con capacidad promedio de 100 muestras en los sistemas automatizados. La principal característica que debe tener un inyector es la reproducibilidad de inyección a inyección, lo cual generalmente no resulta ser un problema en esta parte de los equipos.
- **Columna:** De hecho, es en donde se lleva a cabo la separación, donde la fase móvil está en contacto con la fase estacionaria, formando la interfaz y constituye una de las partes fundamentales en un sistema cromatográfico. (Kazakevich, 2007). Las columnas usadas en CLAR son de acero inoxidable con diferentes dimensiones, desde 30cm hasta sólo algunos centímetros, siendo cada vez más comunes estas últimas y teniendo la misma o mejor resolución debido a la disminución en el tamaño de partícula, es posible controlar también la forma

esférica de la partícula, pero lo más importante son las características de polaridad que presentan esas fases estacionarias. La base de todas ellas es la Silica gel, pero modificada químicamente para hacerla menos polar, sustituyendo los grupos OH por cadenas de 18 carbonos en las columnas ODS o C18, por cadenas de 8 carbonos en las C8, por cadenas de 2 carbonos en las C2 o por grupos –CN en las columnas ciano, también pueden efectuarse especificaciones por grupos aminos o fenilo. Usando una columna ODS (C18), prácticamente pueden lograrse casi todas las separaciones requeridas en el análisis farmacéutico utilizando la fase móvil adecuada.

- **Detector:** Existen diferentes tipos de detectores utilizados en CLAR, pero el más utilizado en el análisis de productos farmacéuticos es el detector ultravioleta, el cual ha ido evolucionando desde los detectores de onda fija que solamente eran capaces de trabajar a dos longitudes de onda hasta las actuales detectores de arreglo de diodos, que permiten detectar simultáneamente a todas las longitudes de onda del espectro ultravioleta-visible, lo cual hace posible efectuar el espectro de cada uno de los compuestos que eluye de la columna, teniendo actualmente esta técnica mayores herramientas de identificación. Otra de las aplicaciones de este detector es en la determinación de la pureza de un pico en la especificidad de los métodos analíticos.
- **Sistema de adquisición y control de datos:** Este puede ser a través de un integrador o una computadora que controla los parámetros del instrumento HPLC (composición del eluyente, mezcla de diferentes solventes, temperatura, inyección, etc.) constituye la parte del equipo en donde controla, opera, almacena e imprime la información relacionada con el análisis.(Kazakevich, 2007)

### Parámetros Cromatográficos

Un cromatograma comienza en el momento en que la muestra es inyectada. A partir de ese momento, las señales encontradas en el cromatograma son las siguientes:

- **Tiempo de Retención ( $t_R$ ):** tiempo en el cual eluye la muestra inyectada, usualmente es representada por ( $t_R$ ). (Stout, 2002).
- **Tiempo Muerto ( $t_M$ ):** es el tiempo  $T_M$  para que la especie no retenida alcance el detector. (Cromatografía: principios generales, 2017)
- **Volumen de Retención ( $v_R$ ):** el volumen de retención es el volumen de fase móvil necesario para transportar la banda del soluto desde el punto de inyección, a través de la columna, hasta el detector. (B.Badillo, 2008),(Willard, 1991).
- **Volumen Muerto ( $v_M$ ):** volumen de fase móvil que sale de la columna, cuando un analito no es retenido por la fase estacionaria, desde que el analito es inyectado hasta el momento en que sale del sistema cromatográfico. (B.Badillo, 2008), (J.A.García, 2001)

- **Línea Base:** es la porción del cromatograma en donde sólo se aprecia la señal debida a la elución de la fase móvil. (B.Badillo, 2008)
- **Factor de capacidad ( $k'$ ):** es el cociente entre el tiempo que pasa el soluto en la fase estacionaria y el que pasa en la fase móvil. (Harris C., 2007)
- **Factor de Selectividad ( $\alpha$ ):** el factor de selectividad ( $\alpha$ ) de una columna, como su nombre lo indica, es un término que define que tan selectiva es una columna para separar dos picos. Es de hacer notar, que la columna puede ser selectiva a una separación que se identifica por un valor alto de este factor, pero si no se considera la mejora de los parámetros que pueden afectar el ancho de un pico, aun así, no se lograría la separación de los mismos. (Gomis,2008)
- **Número de platos teóricos (N):** corresponde a cortes o rodajas imaginarias de la columna cromatográfica, donde se consigue un equilibrio transitorio antes de que la fase móvil avance hacia la próxima rodaja, Las eficiencias de la columna y por consiguiente su poder separativo y de proporcionar bandas de elución estrechas se mide en función de los platos teóricos. Son recomendables valores de N superiores a 2000. (Gomis,2008)
- **Resolución (Rs):** corresponde a la medida de separación entre 2 picos y es fundamental a la hora de controlar si existe algún interferente con la detección del pico de interés. Son recomendables valores de Rs mayores a 2. (Gomis,2008)
- **Factor de asimetría o coeio (t):** una señal perfectamente simétrica proporciona una minimización en las imprecisiones de detección del inicio y final del pico por lo que permitirá una mejor y más precisa cuantificación. Son recomendables valores entre 0.8 y 1.5. (Gomis, 2008)

## 5.6 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS Y FISICOQUÍMICAS DEL AMLODIPINO

### 5.6.1 Propiedades farmacológicas

El Amlodipino es una dihidropiridina antagonista del calcio de acción prolongada, con comienzo de acción lenta cuyo efecto se prolonga durante 24 horas, el cual reduce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula, después de enlazarse con la subunidad ( $\alpha$ ) de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo (L.); más subunidad alfa, presenta tres diferentes sitios receptores unidos alostéricamente para dihidropiridinas, fenilalquilaminas y benzotiazepinas. (Porzig, 1990).

A nivel de músculo arterial, los bloqueadores de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  inhiben los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje e impiden la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula; la falta de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular resulta en que no se forma el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, no se activa la miosina y no interactúa con la actina; por lo tanto, no ocurre la contracción muscular y disminuye la resistencia periférica y la presión arterial. (Mendoza, 2008)

A nivel del músculo cardíaco, la reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que resulta del bloqueo de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , impide la formación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ . (Mendoza, 2008)

La Dosis letal 50 a través de vía oral es de 37 mg/kg en seres humanos por día y en ratas corresponde a 393 mg/kg. (Fagron, 2018)

### **5.6.2 Farmacocinética**

A pesar de que se absorbe casi completamente en el intestino, elevando sus niveles séricos de manera lenta y progresiva, alcanza sus niveles máximos entre las 6 y 12 horas, mostrando una biodisponibilidad absoluta entre el 64% al 80%. (FEUM, 2017).

Este fármaco se reduce considerablemente por el efecto del primer paso (10-74%). El volumen de distribución es alto, llegando a ser de 21 L/kg aproximadamente. El 97% está unido a proteínas plasmáticas. (Suárez, 2013)

Se une extensamente a las proteínas del plasma (78-99%) y su tiempo de vida media (50 horas). Se metaboliza en el hígado aproximadamente el 90%, vía Citocromo P450 3A4 produciendo metabolitos inactivos los cuales en un 60 % son excretados por vía urinaria. El 10% restante se excreta como el compuesto original en la orina. (Suárez, 2013).

### **5.6.3 Farmacodinamia**

El Amlodipino es un inhibidor del flujo de calcio a nivel de los canales lentos a través de la membrana citoplasmática del musculo liso vascular y el músculo cardíaco, siendo un inhibidor selectivo del músculo liso vascular, fijándose no sólo en los sitios en donde se unen otros antagonistas del calcio, sino en otros más ejerciendo su efecto. El mecanismo de acción de antihipertensivo se debe al efecto relajante directo que ejerce sobre el músculo liso vascular, mientras que el efecto antianginoso está relacionado a una disminución en la carga isquémica total a través de:

- Dilatación de las arteriolas periféricas y por ende reducción en la resistencia vascular periférica total (post-carga) contra la que el corazón trabaja. Debido a que la frecuencia cardiaca permanece estable, pues no es modificada por este calcio-antagonista, esta descarga reduce el consumo de energía del miocardio, así como los requerimientos del oxígeno
- Dilatación de las principales arterias y arteriolas coronarias, tanto en regiones normales como isquémicas, de tal manera que aumenta la entrega de oxígeno al miocardio en pacientes con espasmo de las arterias coronarias y mitiga la vasoconstricción. (Suárez, 2013)

#### **5.6.4 Efectos adversos**

Puede presentarse mareo, náusea, hipotensión, cefalea, enrojecimiento, disestesia digital, constipación, edema periférico, tos y edema pulmonar y se atribuyen a la vasodilatación excesiva, particularmente con fármacos del grupo de las dihidropiridinas.

Son más raros erupciones, somnolencia y alteraciones de las pruebas de funcionamiento hepático. La disminución de la presión arterial causada por las dihidropiridinas puede empeorar la insuficiencia coronaria luego que aumenta la descarga simpática y la frecuencia cardíaca.

#### **5.6.5 Interacciones farmacológicas**

Los bloqueadores de canales de  $Ca^{2+}$ , tienen un efecto sinérgico sobre el sistema de conducción del corazón y los antiinflamatorios no esteroideo que contrarrestan el efecto antihipertensivo de los últimos. EL Amlodipino ha sido administrado en forma segura conjuntamente con diuréticos, tiazidas, beta bloqueadores, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, nitratos de larga acción, nitroglicerina sublingual, drogas antiinflamatorias no esteroideas, antibióticos e hipoglucemiantes orales. (E. Sánchez, 1994)

#### **5.6.6 Indicaciones**

Está indicada para el tratamiento de primera línea de hipertensión arterial y puede ser usado como agente único en la mayoría de los pacientes. Sin embargo, se puede asociar a otros agentes antihipertensivos como diuréticos tiazidas, beta bloqueadores o inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.

Está indicada para el tratamiento primario de isquemia del miocardio debido a una obstrucción (angina estable). Puede ser usado sólo o en combinación con otros agentes antianginosos. Las dosis recomendadas de Amlodipino son 5 a 10 mg diarios administrados una sola vez al día. (Willard, 1991)(Fares,2016)

El Amlodipino está involucrado en el bloqueo de los canales de calcio, dando como resultado una relajación del músculo liso vascular. Las dihidropiridinas, por lo general, se muestran como agentes bloqueadores de los canales de calcio y por tanto con función antihipertensiva. Sin embargo, son aquellas que no poseen los mismos sustituyentes en ambos lados, las que tienen mayor actividad (caso del Amlodipino). El Amlodipino se presenta como mezcla de dos enantiómeros, El (S)-Amlodipino es el enantiómero responsable de la actividad bloqueante de los canales de calcio, siendo el (R) el responsable del edema que puede originarse como efecto secundario adverso al utilizarlo en actividades terapéuticas sin embargo está comprobado que uno es más activo que el otro. En este caso el (S)-Amlodipino es más eficaz. (Sancho,2015)

### 5.6.7 Nombre y estructura

<b>Nombre:</b>	<b>Amlodipino</b>
<b>Fórmula química:</b>	$C_{20}H_{25}ClN_2O_5$ , (Drugbank, 2017)
<b>Fórmula química desarrollada:</b>	(RS)-3-etil 5-metil-2-[(2-aminoetoxi) metil]-4-(2-clorofenil)-6-metil-1,4-dihidropiridina-3, 5-dicarboxilato. (Drugbank, 2017)
<b>Peso molecular:</b>	408.876 g/mol. (Drugbank, 2017)
<b>CAS:</b>	88150-42-9 (Drugbank, 2017)

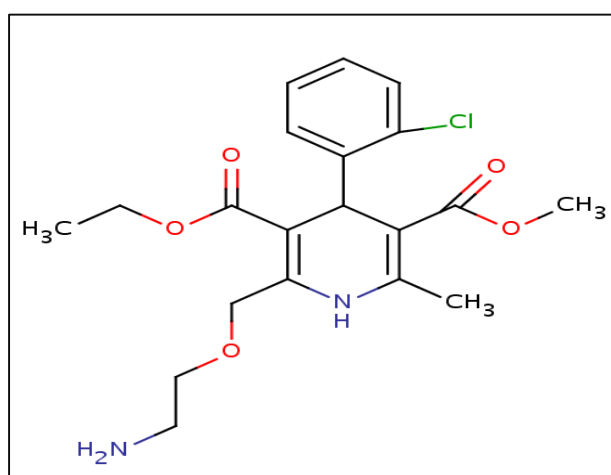


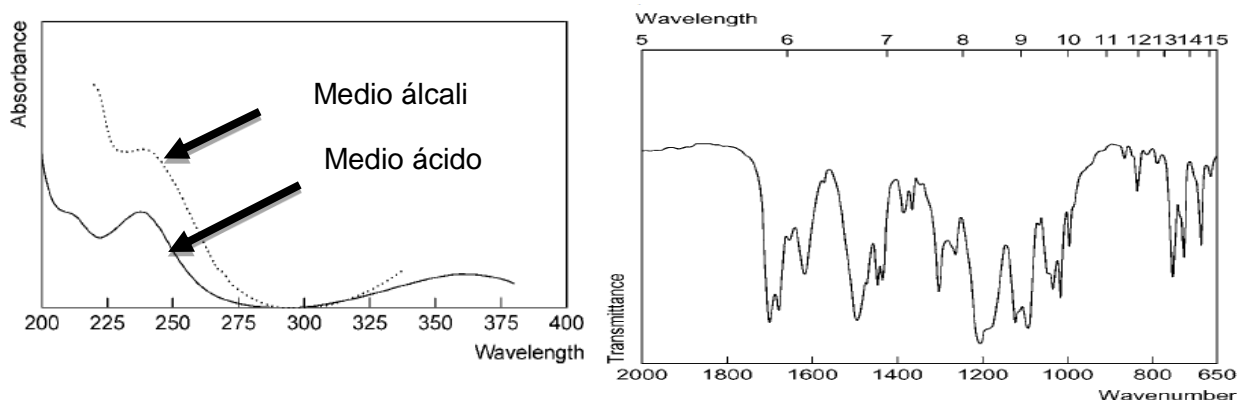
Figura 6. Estructura Química de Amlodipino. (Drugbank, 2017)

### 5.6.8 Propiedades Físicoquímicas

Tabla No.3 Propiedades Físicoquímicas de Amlodipino

PROPIEDAD	DESCRIPCIÓN
<b>Apariencia</b>	Polvo blanco o ligeramente blanco, aunque se descompone en presencia de la luz y al absorber la humedad, de igual manera en presencia de monóxido y dióxido de carbono, gases y vapores tóxicos e irritantes. (Drugbank, 2017)
<b>Solubilidad</b>	Totalmente soluble en metanol, poco soluble en etanol anhidro, soluble en agua ( $\leq 20$ mg/ml) y ligeramente soluble en 2-propanol. (Pubchem, 2017)

<b>pH</b>	6.6 en solución acuosa.
<b>pKa</b>	8.6. (Sesin, 1997)
<b>Pureza</b>	≤ 98%
<b>Constante de Disociación</b>	pKa 8.6 (25°C).
<b>Constante de Partición: <i>Log P</i></b> <b>(Hidrofobicidad Experimental)</b>	1.9 - 2.2. (Pubchem, 2017)
<b><i>Log S</i></b>	-4.7 (Drugbank, 2017)
<b>Punto de Fusión:</b>	178-179°C (Drugbank, 2017)
<b>Coefficiente de Absortividad Específica (<math>\epsilon</math>)</b>	0.0335
<b>Incompatibilidades farmacológicas</b>	No se presenta ninguna.



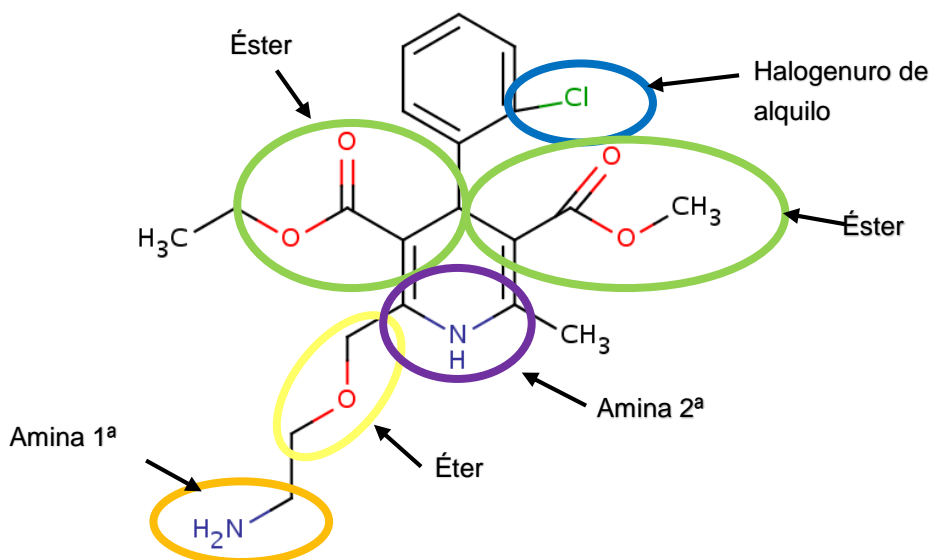
**Figura 7.** Espectro de Absorción en medio acuoso (ácido y álcali), e Infrarrojo de Amlodipino. (Moffat, 2011)

**Tabla No.4** Datos espectrofotométricos de Amlodipino. (Moffat, 2011)

<b>Espectro Ultravioleta</b>	<b>Espectro Infrarrojo</b>
<b>Solución acida (0.2mol/L NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 239 nm.</b> <b>Solución alcalina (Besilato) 238 nm.</b>	<b>Picos principales de identificación en 1208, 1182, 1094 cm<sup>-1</sup>.</b>



### 5.6.9 Naturaleza química



**Figura 8.** Análisis de Naturaleza química de estructura de Amlodipino. (Drugbank, 2017)

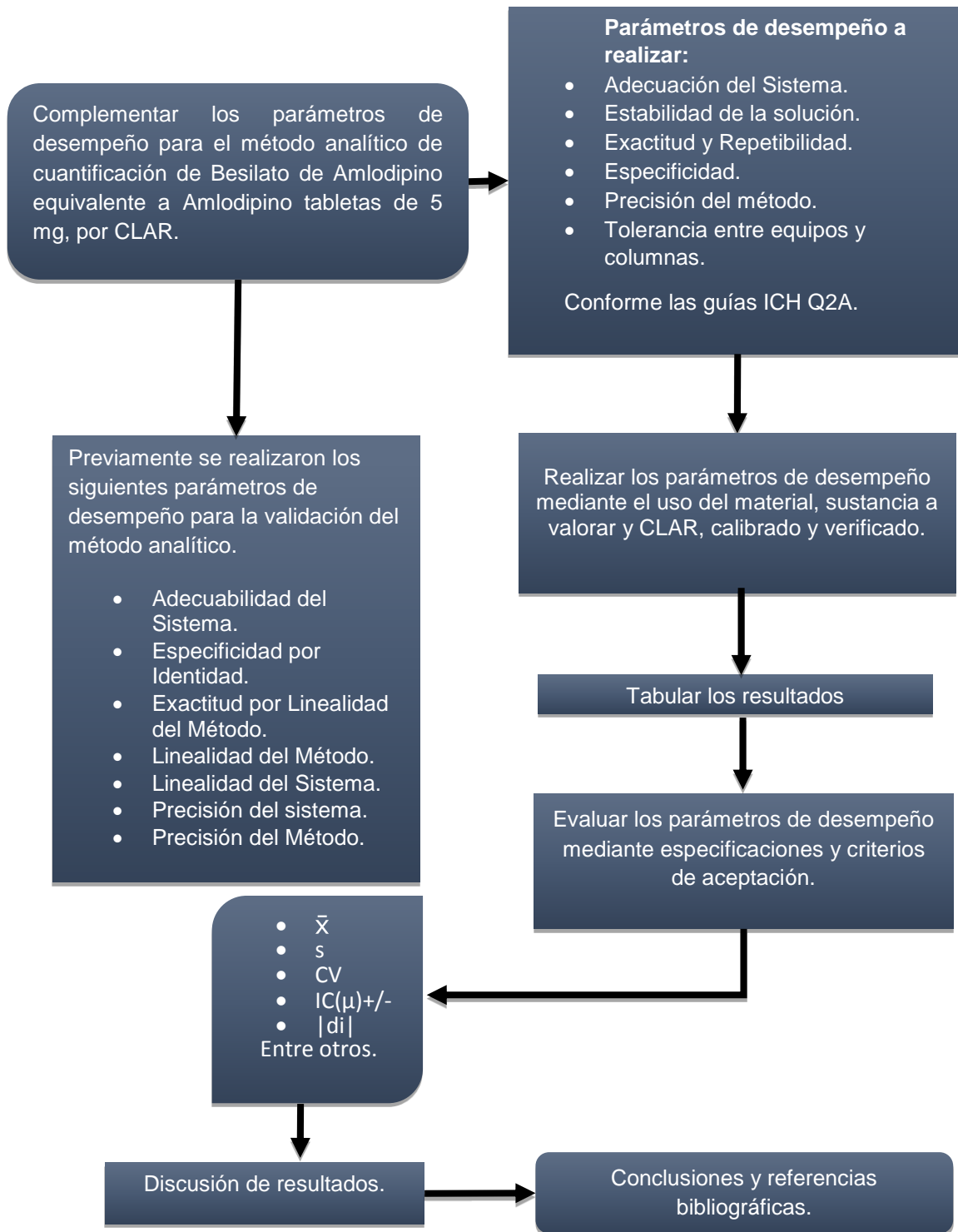
La naturaleza de una estructura química se basa en la importancia y clase de grupos funcionales que esta posee, el Amlodipino pertenece a la familia de las dihidropirinas, presenta un grupo funcional: Halogenuro alquilo, sustituido al benceno de la parte superior, grupos Éster y una cadena lateral con un nitrógeno protonable en posición 2 del anillo dihidropiridínico y una cadena aminoetoximetilo, que le confiere un carácter básico ( $pK_a=8.6$ ) (Sesin, 1997) (Lüllmann, 2010) estos grupos le generan una alta densidad de protones en la molécula, provocando una gran carga de energía positiva, sin embargo, por las características de los grupos funcionales se produce un efecto estérico, es decir el impedimento de interacción de los grupos funcionales con la estructura es incapaz del tránsito de protones para inducir un efecto de resonancia.

Sin embargo, los grupos amina (1ª y 2ª) de la cadena lateral del Amlodipino que está cargada positivamente y exhibe una alta densidad de protones, pero en este caso no existe un efecto que impida el tránsito de los mismos, así podrá entrar en resonancia aumentando así su estabilidad y estar en un estado ionizado. (Sesin, 1997).



## 6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 6.1 PLAN DE TRABAJO



## 6.2 ESPECIFICACIONES

Prueba	Especificación	Analito
Valoración de Principio Activo	90.0 % - 110.0 %	Amlodipino

## 6.3 REACTIVOS Y MATERIALES NECESARIOS PARA LA VALIDACIÓN

Requerimiento	Descripción
<b>Sustancia de Referencia</b>	Sustancia de referencia secundaria de Amlodipino Besilato.
	Sustancia de referencia primaria de compuesto relacionado A de Amlodipino.
<b>Equipos</b>	Balanza Analítica.
	Microbalanza.
	Potenciómetro.
	Cromatógrafo de Líquidos con detector de longitud de onda variable / arreglo de diodos y horno para columna.
<b>Material de Vidrio</b>	Matraz volumétrico 10, 25, 50, 250 mL y 1L.
	Matraz bola de boca esmerilada de 250 mL.
	Pipeta volumétrica de 1, 2,7 mL.
	Vaso de precipitados de 1L.
<b>Reactivos</b>	Trietilamina Grado reactivo.
	Metanol HPLC.
	Acetonitrilo HPLC.
	Ácido fosfórico Grado reactivo.
	Agua desionizada.
	Ácido Clorhídrico 0.1 N (solución comercial).
	Hidróxido de Sodio 0.1 N (solución comercial).
Peróxido de Hidrógeno 30% (solución comercial).	
<b>Columnas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Columna Symmetry Waters C18, 5 µm, 15 cm x 3.9 mm.</li> <li>- No. Parte: WAT046980.</li> <li>- No. Serie: 2853423213835.</li> <li>• Columna ACE 5 C18, 5 µm, 15 cm x 4.0 mm, ACE HPLC COLUMNS.</li> <li>- No. Parte: ACE-121-1504.</li> <li>- No. Serie: A176692.</li> </ul>
	Filtros de Nylon para jeringa de 0.45 micras para filtrar muestras.
	Membranas de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0.45 micras para filtrar fase móvil.
	Jeringas de 10mL.
<b>Otros</b>	Viales y tapas para viales para cromatografía de líquidos.

## 6.4 MÉTODO COMPENDIAL (USP, 2017)

**6.4.1 Solución pH 3.0:** En un matraz volumétrico de 1000 mL colocar 900 mL de agua y adicionar con una pipeta volumétrica 7.0 mL de Trietilamina y mezclar. Ajustar el valor de pH a  $3.0 \pm 0.1$  con Ácido fosfórico concentrado. Diluir a volumen con agua y mezclar.

**6.4.2 Fase móvil y Blanco:** Metanol: Acetonitrilo: Solución pH 3.0 (35:15:50).

**6.4.3 Solución de Referencia (preparar por duplicado):** Pesar aproximadamente bien conocidos 13.75 mg de Besilato de Amlodipino, (equivalente a 10 mg de Amlodipino) \* y 1.25 mg de compuesto relacionado A de Amlodipino, colocarlos en un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 10 mL de fase móvil, llevar a volumen con el mismo disolvente y mezclar. Tomar una alícuota de 2 mL de la solución anterior y colocarla en un matraz volumétrico de 10 mL, llevar a la marca de aforo con fase móvil y mezclar, esta solución contiene 20  $\mu\text{g/mL}$  de Besilato de Amlodipino y 2.5  $\mu\text{g/mL}$  de compuesto relacionado A de Amlodipino. Pasar la solución de referencia a través de un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ . desechar los primeros mL y transferir a un vial para cromatografía.

**6.4.4 Solución de la muestra (preparación por triplicado):** Colocar 5 tabletas (25 mg de Amlodipino) en un matraz volumétrico de 250 mL, adicionar 50 mL de fase móvil para desintegrar las tabletas. Agregar 50 mL más de fase móvil y sonicar por 15 minutos. Dejar que la solución tome temperatura ambiente, llevar a la marca de aforo con fase móvil y mezclar. Tomar una alícuota de 2 mL de la solución anterior y colocar en un matraz volumétrico de 10 mL, llevar a la marca de aforo con fase móvil y mezclar. Preparar la muestra por triplicado. Pasar la muestra a través de un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ , desechar los primeros mL y transferir a un vial para cromatografía, esta solución contiene 20  $\mu\text{g/mL}$ .

**6.4.5 Solución de la muestra para Exactitud/ Repetibilidad (preparar por sextuplicado) y (preparar por triplicado) para Tolerancia:** Pesar aproximadamente bien conocidos 6.96 mg de la sustancia de referencia de Amlodipino Besilato y transferirla a un matraz volumétrico de 25 mL, adicionar 193.04 mg de placebo analítico, agregar aproximadamente 5 mL de fase móvil para disolver, agitar por 30 minutos. Llevar al aforo con el mismo disolvente y mezclar. Tomar una alícuota de 1 mL de la solución anterior y transferirla a un matraz volumétrico de 10 mL. Diluir a volumen con fase móvil y mezclar bien

**\*NOTA:** se pesan aproximadamente 13.75 mg de sustancia de referencia de Besilato de Amlodipino, por el ajuste con los pesos moleculares 408.88 mg Amlodipino /567.05 mg de Besilato de Amlodipino se llega a la cantidad de aproximada de 10 mg de Amlodipino).

#### 6.4.6 Condiciones Cromatográficas:

Cromatógrafo de Líquidos	Detector UV-Visible
Longitud de onda	UV 237 nm
Columna	Columna Symmetry Waters C18, 5 $\mu$ m, 15 cm x 3.9 mm No. Parte: WAT046980
Velocidad de flujo	1.0 mL / min
Temperatura de Horno de Columna	25 °C
Volumen de inyección	50 $\mu$ L
Tiempo de corrida	No menos de tres veces el tiempo de retención del pico de Amlodipino.

#### 6.4.7 Requerimientos de Adecuabilidad para la solución de referencia:

- Los tiempos de retención relativos son 1.0 y 0.5 para Amlodipino y Compuesto Relacionado A de Amlodipino respectivamente.
- La resolución entre el pico de Amlodipino y Compuesto Relacionado A de Amlodipino no es menor de 8.5.
- El factor de coelección para los picos de Amlodipino y Compuesto Relacionado A de Amlodipino no es mayor a 2.0.
- La desviación estándar para inyecciones repetidas de Compuesto Relacionado A, de Amlodipino no es mayor a 5.0%.
- La eficiencia de la columna no debe ser menor a 2000 platos teóricos.

#### 6.4.8 Procedimiento:

##### Montado del equipo:

- 1) Colocar las líneas del equipo cromatográfico (A, B, C, D) en agua previamente desgasificada y filtrada.
- 2) Pasar agua a través de las líneas del equipo, con la válvula abierta y colocando un volumen muerto cero en la tubería donde se coloca la columna cromatográfica, así limpiando la celda del equipo usando un flujo de trabajo de 1.0 mL/min durante 15 minutos.
- 3) Detener el flujo de trabajo.
- 4) Colocar los solventes en el orden de las líneas (A: Agua, B: Metanol, C: Acetonitrilo y D: Fase móvil).
- 5) Después de tener la celda y las tuberías líneas del equipo apto para trabajar, colocar en la línea D del equipo la fase móvil (100%) correspondiente al método analítico.  
Acondicionar con la fase móvil por 30 minutos con flujo de trabajo, aumentando gradualmente el flujo de 0.2 mL/min hasta llegar al flujo de trabajo (1.0 mL/min) y hasta que la línea base sea estable y la presión constante.

## 6.4.9 Cálculos

### Inyecciones de Solución de Referencia (SRef.):

- 1) Realizar inyecciones de prueba de las soluciones de referencia y de la muestra.
- 2) Verificar que se cumplan los parámetros de SRef. de acuerdo con el punto 6.4.8; si no se cumplen revisar el sistema e inyectar nuevamente las SRef. (si se cumplen, continuar con el punto siguiente).
- 3) Realizar las inyecciones conforme el siguiente orden:

Nombre	Número de inyecciones
Blanco	1
SRef. 1	6
SRef. 2	3

- 4) Registrar las respuestas obtenidas.
- 5) El % de Recobro de SRef de cada componente en la solución, debe encontrarse entre 98.00 % y 102.00 %. Calcular mediante la siguiente fórmula:

$$\% D = \left( \frac{C_{SRef.1}}{C_{SRef.2}} \right) \left( \frac{r_u \text{ Promedio}_{SRef.2}}{r_u \text{ Promedio}_{SRef.1}} \right) * 100$$

Donde:

$r_u$  Promedio SRef. 1 = respuestas promedio de las 6 inyecciones de la solución de referencia 1.

$r_u$  Promedio SRef. 2 = respuestas promedio de las 3 inyecciones de la solución de referencia 2.

$C_s$  SRef. 1 = Concentración de la SRef. 1, en mg/mL.

$C_s$  SRef. 2 = Concentración de la SRef. 2, en mg/mL.

- 6) Inyectar al cromatógrafo la solución de referencia y registrar la respuesta de los picos. Esta solución debe cumplir los parámetros de sistema de SRef. descritos anteriormente. Una vez cumplidos los requerimientos, inyectar 50  $\mu$ L de la solución de referencia por sextuplicado y 50  $\mu$ L de la preparación de la muestra (una inyección por cada una de las muestras). Registrar la respuesta obtenida por cada uno de los picos.

- Calcular la cantidad (mg de Amlodipino por tableta), la concentración adicionada, recuperada, los recuperados ya sea el caso mediante las siguientes fórmulas:

#### mg/ tab Amlodipino

$$mg/tab \text{ Amlodipino} = \frac{r_u}{r_s} * \frac{W_{SRef}}{5 \text{ tabletas}} * P * 0.721 * FD$$

#### Concentración adicionada

$$C_a = \frac{W_{mtra \text{ adicionada}}}{V_{inicial}} * \frac{V_{alicuota}}{V_{final}} * P * 0.721$$

#### Concentración recuperada

$$C_r = \frac{r_u}{r_s} * C_s$$

#### mg recuperados estimados

$$mg \text{ recup. estim.} = \frac{C_r * \text{Factor de Dilución (250 mL)}}{0.721}$$

#### Factor de dilución

$$FD = \frac{(1/100 \text{ mL}) * (2/10 \text{ mL})}{(1/250 \text{ mL}) * (2/10 \text{ mL})} = 2.5$$

#### Donde:

$r_u =$	Respuesta del pico de la solución de la muestra.
$r_s =$	Respuesta del pico de la solución de referencia.
$C_s =$	Concentración de Amlodipino en la solución de referencia (mg/mL)
$C_u =$	Concentración de Amlodipino en la solución de la muestra (mg/mL)
$W_{SRef} =$	Peso de la sustancia de referencia (mg)
$W_{Mtra} =$	Peso de la muestra.
$P =$	Pureza de la sustancia de referencia.
$0.721 =$	Relación entre pesos moleculares de Amlodipino (408.88 g/mol) y Besilato de Amlodipino (567.05 g/mol).
$FD =$	Factor de dilución

- Calcular el porcentaje de la cantidad declarada de Amlodipino (C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) en la porción de las tabletas tomadas y el % de recobro ya sea el caso, de acuerdo con las siguientes fórmulas:

### % Amlodipino

$$\% \text{ Amlodipino} = \frac{\text{mg/tab Amlodipino}}{5} * 100$$

### % Recobro

$$\% \text{ recobro} = \frac{C_r}{C_a} * 100$$

### 6.4.10 Lavado de Columna:

Al terminar una secuencia de trabajo, lavar la columna conforme la siguiente tabla:

Flujo (mL/min)	Tiempo (min)	Línea A (Agua, %)	Línea B (Metanol, %)	Línea C (Acetonitrilo, %)	Línea D (Fase móvil, %)
1.0	10	50	35	15	0
1.0	10	45	40	15	0
1.0	10	50	50	0	0
1.0	10	40	60	0	0
1.0	10	20	80	0	0
1.0	0	20	80	0	0
0	0	20	80	0	0

Dejar las líneas y tuberías del equipo en Agua desgasificada y filtrada, asegurar el guardado de la columna.

### 6.5 PREPARACIÓN DE PLACEBO

Las cantidades empleadas para la elaboración del placebo se presentan en la siguiente tabla (fórmula cuali-cuantitativa).

#### 6.5.1 Formulación cuali-cuantitativa.

Fórmula de Amlodipino 5 mg tableta	
Componente	Fórmula unitaria
<b>Amlodipino *</b>	<b>6.96 mg</b>
Almidón pregelatinizado 1500	96.27 mg
Celulosa microcristalina PH-102	96.27 mg
Estearato de magnesio	0.50 mg
<b>Peso Promedio</b>	<b>200.0 mg</b>

\*El placebo no lo contiene.

## 6.5.2 Datos de las sustancias de referencia

	SRef secundaria Besilato Amlodipino	SRef primaria de compuesto relacionado A Amlodipino
<b>Lote:</b>	<b>BETM18</b>	<b>H0M312</b>
<b>Pureza:</b>	<b>99.1 %</b>	<b>99.9 %</b>
<b>Fecha de Caducidad:</b>	<b>31 mar. 20</b>	<b>15 may. 20</b>

## 6.6 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

### Metodología:

**6.6.1 Solución de Referencia:** preparar como se indica en el punto 6.4.3.

**6.6.2 Procedimiento:** realizar como se describe en el punto 6.4.8.

### 6.6.3 Criterios de aceptación.

- Los tiempos de retención relativos son 1.0 y 0.5 para Amlodipino y Compuesto Relacionado A de Amlodipino respectivamente.
- La resolución entre el pico de Amlodipino y Compuesto Relacionado A de Amlodipino no es menor de 8.5.
- El factor de coelección para los picos de Amlodipino y Compuesto Relacionado A de Amlodipino no es mayor a 2.0.
- La desviación estándar para inyecciones repetidas de Compuesto Relacionado A de Amlodipino no es mayor a 5.0 %.

## 6.7 ESPECIFICIDAD

### Metodología:

**6.7.1 Blanco de ajuste y solución de referencia:** realizar la preparación de cómo se indica en los puntos 6.4.2 y 6.4.3 respectivamente.

**Preparación de muestras para evaluar la especificidad. (Preparar cada muestra por triplicado)**

**6.7.2 Placebo:** pesar 193.04 mg del placebo analítico, transferirlos a un matraz volumétrico de 25 mL, agregar 15 mL de fase móvil y agitar por 30 minutos. Tomar una alícuota de 1 mL de la solución anterior y transferirla a un matraz volumétrico de 10 mL. Diluir a volumen con fase móvil y mezclar bien.

**6.7.3 Degradación ácida del placebo:** pesar 193.04 mg del placebo analítico y transferir a un matraz bola de cuello esmerilado de 250 mL, agregar 10 mL de ácido clorhídrico 0.1 N, colocar a reflujo durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo dejar que atempere y neutralizar con 10 mL de solución de



hidróxido de sodio 0.1 N, (verificar la neutralización con papel indicador, aproximadamente un pH de 8) transferir a un matraz volumétrico de 25 mL, realizar enjuagues con volúmenes de 2 mL de fase móvil. Llevar al aforo con fase móvil y mezclar. Tomar una alícuota de 1 mL de la solución anterior y transferirla a un matraz volumétrico de 10 mL. Diluir a volumen con fase móvil y mezclar bien.

**6.7.3 Degradación básica del placebo:** pesar aproximadamente bien conocidos 193.04 mg del placebo analítico y transferir a un matraz bola de cuello esmerilado de 250 mL, agregar 10 mL de hidróxido de sodio 0.1 N, colocar a reflujo durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo dejar que atempere y neutralizar con 10 mL de solución de ácido clorhídrico 0.1 N, (verificar la neutralización con papel indicador, aproximadamente un pH de 6) transferir a un matraz volumétrico de 50 mL, realizar enjuagues con volúmenes de 2 mL de fase móvil. Llevar al aforo con fase móvil y mezclar. Tomar una alícuota de 1 mL de la solución anterior y transferirla a un matraz volumétrico de 10 mL. Diluir a volumen con fase móvil y mezclar bien.

**6.7.4 Degradación oxidativa del placebo:** pesar aproximadamente bien conocidos 193.04 mg del placebo analítico y a un matraz bola de cuello esmerilado de 250 mL, agregar 10 mL de peróxido de hidrógeno al 30%, colocar a reflujo durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo dejar que atempere, transferir y llevar al aforo con fase móvil y mezclar. Tomar una alícuota de 1 mL de la solución anterior y transferirla a un matraz volumétrico de 10 mL. Diluir a volumen con fase móvil y mezclar bien.

**6.7.5 Placebo adicionado:** pesar aproximadamente bien conocidos 6.96 mg de la sustancia de referencia de Amlodipino Besilato y transferirla a un matraz volumétrico de 25 mL, adicionar 193.04 mg de placebo analítico, agregar aproximadamente 5 mL de fase móvil para disolver, agitar por 30 minutos. Llevar al aforo con el mismo disolvente y mezclar. Tomar una alícuota de 1 mL de la solución anterior y transferirla a un matraz volumétrico de 10 mL. Diluir a volumen con fase móvil y mezclar bien.

**6.7.6 Degradación ácida de placebo adicionado:** pesar aproximadamente bien conocidos 6.96 mg de la sustancia de referencia de Amlodipino Besilato (equivalente a 5 mg de Amlodipino), adicionar 193.04 mg de placebo analítico, transferir a un matraz bola de cuello esmerilado de 250 mL, agregar 10 mL de ácido clorhídrico 0.1 N, colocar a reflujo durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo dejar que atempere y neutralizar con 10 mL de solución de hidróxido de sodio 0.1 N, (verificar la neutralización con papel indicador, aproximadamente un pH de 8) transferir a un matraz volumétrico de 25 mL, realizar enjuagues con volúmenes de 2 mL de fase móvil. Llevar al aforo con el mismo disolvente y mezclar. Tomar una alícuota de 1 mL de la solución anterior y transferirla a un matraz volumétrico de 10 mL. Diluir a volumen con fase móvil y mezclar bien.

**6.7.7 Degradación básica de placebo adicionado:** pesar 6.96 mg de la sustancia de referencia Amlodipino Besilato (equivalente a 5 mg de Amlodipino), adicionar 193.04 mg de placebo analítico, transferir a un matraz bola de cuello esmerilado de 250 mL, agregar 10 mL de hidróxido de sodio 0.1 N, colocar a reflujo durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo dejar que atempere y neutralizar con 10 mL de solución de ácido clorhídrico 0.1 N, (verificar la neutralización con papel indicador, aproximadamente un pH de 6) transferir a un matraz volumétrico de 25 mL, realizar enjuagues con volúmenes de 2 mL de fase móvil. Llevar al aforo con el mismo disolvente y mezclar. Tomar una alícuota de 1 mL de la solución anterior y transferirla a un matraz volumétrico de 10 mL. Diluir a volumen con fase móvil y mezclar bien.

**6.7.8 Degradación oxidativa de placebo adicionado:** pesar 6.96 mg de la sustancia de referencia Amlodipino Besilato (equivalente a 5 mg de Amlodipino), adicionar 193.04 mg de placebo analítico, transferir a un matraz bola de 250 mL, agregar 1 mL de solución de peróxido de hidrógeno al 30 %, colocar a reflujo durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo dejar que atempere, transferir a un matraz volumétrico de 25 mL, realizar enjuagues con volúmenes de 2 mL de fase móvil. Llevar al aforo con el mismo disolvente y mezclar. Tomar una alícuota de 1 mL de la solución anterior y transferirla a un matraz volumétrico de 10 mL. Diluir a volumen con fase móvil y mezclar bien.

**6.7.9 Procedimiento:** Llevar a cabo como se describe en el punto 6.4.8 para condiciones cromatográficas.

**6.7.10 Criterio de aceptación.**

- La respuesta del método se debe únicamente al analito.

## **6.8 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD**

**Metodología:**

**6.8.1 Solución de Referencia:** realizar la preparación de la solución de referencia como indica en el punto 6.4.3.

**6.8.2 Muestra para evaluar la Exactitud y Repetibilidad:** realizar la preparación de la solución de referencia como indica en el punto 6.4.5.

**6.8.3 Procedimiento:** Llevar a cabo como se describe en el punto 6.4.8 para condiciones cromatográficas.

**6.8.4 Requerimientos de % Recobro de SRef. y cálculos:** realizar como se indica en el punto 6.4.9.

**6.8.5 Criterio de aceptación**

- El intervalo de confianza para la media IC ( $\mu$ ) debe incluir el 100.0 % o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo 98.0 % – 102.0 %.
- El CV del porcentaje de recobro no debe ser mayor de 2.0 %.

## 6.9 PRECISIÓN DEL MÉTODO

**Metodología:** La evaluación se lleva a cabo por dos analistas en dos días diferentes empleando el mismo sistema cromatográfico. Preparar muestra por triplicado.

**6.9.1 Solución de Referencia:** realizar la preparación de la solución de referencia como indica en el punto 6.4.3.

**6.9.2 Solución de la muestra:** realizar la preparación de la solución de referencia como indica en el punto 6.4.4.

**6.9.3 Procedimiento:** Llevar a cabo como se describe en el punto 6.4.8 para condiciones cromatográficas.

**6.9.4 Requerimientos de % Recobro de SRef. y cálculos:** realizar como se indica en el punto 6.4.9

**6.9.5 Criterio de aceptación.** el coeficiente de variación (CV) entre los resultados de ambos analistas en ambos días es menor o igual a 2.0 %.

## 6.10 ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA

**Metodología:**

**6.10.1 Preparación de solución referencia:** realizar la preparación de la solución de referencia como indica el punto 6.4.3.

**6.10.2 Solución de la muestra:** preparar como se indica el punto 6.4.4 y fraccionar las muestras en tres partes iguales y colocar los viales para cromatografía bajo las condiciones señaladas:

Muestra/ Condición	Temperatura ambiente protegido de la luz. 1(y <sup>1</sup> )	Expuesta a la temperatura ambiente y la luz. 2(y <sup>2</sup> )	Refrigeración (6°C ± 2.0°C). 3(y <sup>3</sup> )
Inicial	✓	✗	✗
48 horas	✓	✓	✓

**6.10.3 Procedimiento:** Llevar a cabo como se describe en el punto 6.4.8 para condiciones cromatográficas.

**6.10.4 Requerimientos de % Recobro SRef. y cálculos:** realizar como se indica en el punto 6.4.9

**6.10.5 Criterio de aceptación.**

- Calcular la media aritmética del análisis inicial ( $\bar{x}_0$ ) y de cada condición de resguardo ( $\bar{y}_i$ ). Calcular la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto del análisis inicial ( $|d_i|$ ).
- La diferencia absoluta entre cualquiera de las condiciones de almacenaje y la condición del análisis inicial debe ser menor o igual a 2.0

## 6.11 TOLERANCIA

En esta prueba se retarán dos diferentes marcas de columnas cromatográficas con las características descritas en la metodología de trabajo y dos diferentes equipos cromatográficos de distintas marcas).

### Metodología:

**6.11.1 Solución de Referencia:** Llevar a cabo como se describe en el punto 6.4.3 para condiciones cromatográficas.

**6.11.2 Solución de la muestra:** preparar como se indica en el punto 6.4.5

**6.11.3 Procedimiento:** Llevar a cabo como se describe en el punto 6.4.8 para condiciones cromatográficas.

Columnas Cromatográficas	Equipos HPLC
WATERS Symmetry C18, 5 $\mu$ m, 15 cm x 3.9 mm.	Hitachi Chromaster
ACE 5 C18, 5 $\mu$ m, 15 cm x 4.0 mm.	Agilent 1260

**6.11.4 Requerimientos de % Recobro de SRef. y cálculos:** realizar como se indica en el punto 6.4.9

### 6.11.5 Criterio de aceptación.

- Calcular la media aritmética ( $\bar{x}$ ), desviación estándar (s) y coeficiente de variación (CV) del contenido de valoración usando las distintas columnas y equipos.
- Calcular la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de respecto del análisis inicial ( $|d_i|$ ).

El coeficiente de variación entre cualquiera de las condiciones de trabajo entre columnas y equipos debe ser menor o igual al 2.0%.

## 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### % RECOBRO DE SRef.

Las fórmulas, el procedimiento de cálculo y un ejemplo para determinar el % Recobro de Solución de Referencia (% *D*). En las pruebas de especificidad, estabilidad de la muestra, precisión del método, tolerancia entre equipos y columnas se describen en el Anexo 1.

$$\% D = \left( \frac{C_{SRef.1}}{C_{SRef.2}} \right) \left( \frac{r_u \text{ Promedio}_{SRef.2}}{r_u \text{ Promedio}_{SRef.1}} \right) * 100$$

$$C_{SRef.1} = \frac{13.77 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} * \frac{2 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} * \frac{99.1 \text{ R.P}}{100 \text{ R.A}} * 0.721 = 0.0197 \text{ mg/mL}$$

$$C_{SRef.2} = \frac{13.80 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} * \frac{2 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} * \frac{99.1 \text{ R.P}}{100 \text{ R.A}} * 0.721 = 0.0197 \text{ mg/mL}$$

$$r_u \text{ Promedio}_{SRef.1} = 2660.6$$

$$r_u \text{ Promedio}_{SRef.2} = 2669.9$$

**Tabla No.5 % Recobro de SRef. Adecuabilidad del Sistema.**

Adecuabilidad del Sistema			
Pesos (mg)	No. Inyección	$r_u \text{ Promedio}_{SRef.1}$	$r_u \text{ Promedio}_{SRef.2}$
<b>SRef. 1</b> 13.77	1	2655.753	2678.753
	4	2661.401	2660.240
	3	2663.013	2670.851
	4	2661.063	-
	5	2662.575	-
<b>SRef. 2</b> 13.80	6	2659.774	-
	$\bar{x}$	2660.6	2669.9
	s	2.6	9.3
	CV	0.1	0.3
<b>% D = 98.0%-102.0 %</b>		$\% D_{Adecuabilidad} = \left( \frac{0.0197 \text{ mg/mL}}{0.0197 \text{ mg/mL}} \right) \left( \frac{2669.9}{2660.6} \right) * 100$ $= 100.3 \%$	

Tabla No.6 Resultados generales de % Recobro de SRef.

PARÁMETRO DE DESEMPEÑO	% D
Adecuabilidad del Sistema	100.3
Especificidad	100.7
Exactitud y Repetibilidad	99.1
Estabilidad de la muestra inicial	98.6
Estabilidad de la muestra 48 Horas	99.7
Tolerancia equipo AGILENT	99.8
Tolerancia equipo HITACHI	99.4
Tolerancia columna ACE 5	100.2
Tolerancia columna WATERS	99.8
Precisión del Método Analista 1 Día 1	100.0
Precisión del Método Analista 2 Día 1	99.8
Precisión del Método Analista 1 Día 2	100.6
Precisión del Método Analista 2 Día 2	100.0

### ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

- Fórmulas para determinar la  $\bar{x}$ ,  $s$ , y **CV**.

#### Media aritmética

$$\bar{x} = \frac{\Sigma y}{n}$$

#### Desviación estándar

$$s = \sqrt{\frac{n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{n(n-1)}}$$

#### Coefficiente de variación

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} * 100$$

$$\Sigma y = 2555.753 + 2561.401 + 2563.013 \dots + 2559.774 = 15363.579$$

$$\Sigma y^2 = 2555.753^2 + 2561.401^2 + 2563.013^2 \dots + 2559.774^2 = 39339961$$

$$n = 6$$

$$\bar{x} = \frac{15363.579}{6} = 2560.59$$

$$s = \sqrt{\frac{6(39339961) - (15363.579)^2}{6(6-1)}} = 0.1$$

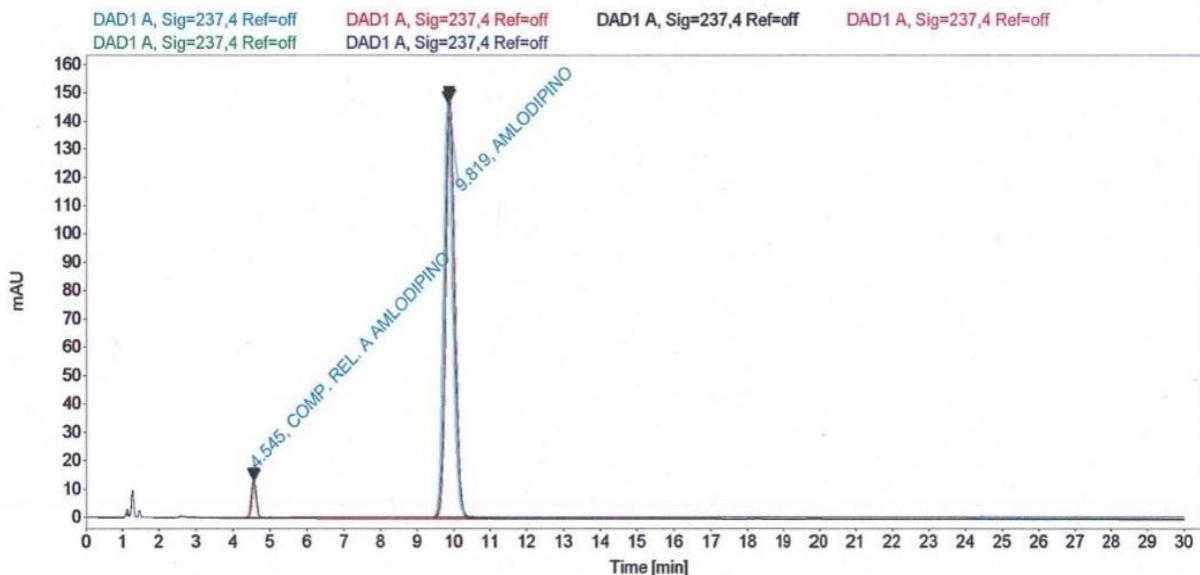
$$CV = \frac{0.1}{2560.59} * 100$$

**Tabla No.7** Resultados obtenidos de Adecuabilidad del sistema cromatográfico.

Amlodipino		Tiempo de Retención (min)	Resolución	Factor de Coleo	Platos teóricos
No. Inyección	Respuesta				
1	2555.753	9.819	15.27	1.169	13659
4	2561.401	9.884	15.50	1.162	12585
3	2563.013	9.879	15.49	1.168	12784
4	2561.063	9.867	15.43	1.169	12881
5	2562.575	9.874	15.50	1.171	12742
6	2559.774	9.860	15.59	1.166	13370
$\bar{x}$	2560.6	9.86	15.46	1.17	13004
s	2.6	0.02	0.11	0.00	417.30
CV	0.1	0.2	0.7	0.3	3.21
Comp. Rel. A Amlodipino		Tiempo de Retención (min)	Resolución	Factor de Coleo	Platos teóricos
No. Inyección	Respuesta				
1	117.164	4.545	-	1.038	6129
4	117.771	4.569	-	1.057	6275
3	117.145	4.543	-	1.074	6155
4	117.146	4.553	-	1.036	6321
5	117.486	4.559	-	1.032	6368
6	117.394	4.541	-	1.042	6301
$\bar{x}$	117.4	4.55	-	1.05	6258
s	0.3	0.01	-	0.02	96
CV	0.2	0.2	-	1.5	2

El sistema cromatográfico empleado es adecuado para la determinación de tabletas de Amlodipino, pues las variables analizadas en el parámetro de Adecuabilidad cumplieron con los límites establecidos cumplen con los criterios, como se observa en la Tabla No. 7 y el Cromatograma 3. (Tiempo de retención del compuesto relacionado A Amlodipino =4.55 min, Amlodipino=9.86 min), (Factor de coleo compuesto relacionado A Amlodipino =1.1, Amlodipino= 1.2), (C.V.=0.2% entre inyecciones y Resolución=15.46), es decir se obtienen picos finos, en los tiempos de retención establecidos, bien definidos y con buena resolución entre ellos.

Cabe añadir que el uso del compuesto relacionado A de Amlodipino en este método es con el fin de la resolución en el sistema cromatográfico, cabe señalar que si este fuera usado como método de cuantificación de impurezas orgánicas específicamente se usaría como solución de referencia de cuantificación de las mismas, se añade en el apartado de Especificidad una propuesta de cómo se cuantifican impurezas ya conocidas basadas en el método de impurezas. Sin embargo, el alcance de este proyecto es exclusivamente para un método específico en % de contenido de principio activo no de impurezas orgánicas.



**Cromatograma No.1** Adecuación del Sistema

### EXACTITUD Y REPETIBILIDAD

Las fórmulas, el procedimiento de cálculo y un ejemplo para determinar la  $\bar{x}$ ,  $s$ , y CV. En la prueba de Exactitud y Repetibilidad se describen en el Anexo 2.

- Fórmulas para determinar mg  $C_a$ ,  $C_r$ , % *recobro*, mg adicionados, recuperados, e intervalo de confianza (IC).

#### Concentración adicionada

$$C_a = \frac{W_{mtra\ adcionada}}{V_{inicial}} * \frac{V_{alicuota}}{V_{final}} * 0.721$$

$$C_a = \frac{6.953\ mg\ B.\ Amlodipino}{25\ mL} * \frac{1\ mL}{10\ mL} * \frac{99.1\ R.P}{100\ R.A} * 0.721 = 0.0199\ \frac{mg}{mL}\ Amlodipino$$

#### Concentración del SRef.

$$C_s = \frac{WS_{ref}}{V_{inicial}} * \frac{V_{alicuota}}{V_{final}} * \frac{P}{100} * 0.721$$

$$C_s = \frac{13.78\ mg\ B.\ Amlodipino}{100\ mL} * \frac{2\ mL}{10\ mL} * \frac{99.1\ R.P}{100\ R.A} * 0.721 = 0.0197\ \frac{mg}{mL}\ Almodipino$$



### Concentración recuperada

$$C_r = \frac{r_u}{r_s} * C_s$$

$$C_r = \frac{2664.828}{2617.16} * 0.0197 \frac{mg}{mL} \text{ Amlodipino} = 0.0201 \frac{mg}{mL} \text{ Amlodipino}$$

### %recobro

$$\% \text{ recobro} = \frac{C_r}{C_a} * 100$$

$$\% \text{ recobro} = \frac{0.0199 \frac{mg}{mL} \text{ Amlodipino}}{0.0201 \frac{mg}{mL} \text{ Amlodipino}} * 100 = 101.01 \%$$

### mg recuperados estimados

$$mg \text{ recup. estim.} = \frac{C_r * \text{Factor de Dilución (250 mL)}}{0.721}$$

$$mg \text{ recup. estim.} = \frac{0.0201 \frac{mg}{mL} \text{ Amlodipino} * 250 \text{ mL}}{0.721} = 6.952 \text{ mg B. Amlodipino}$$

### mg adicionados reales

$$6.953 \text{ mg B. Amlodipino} * 0.721 = 5.013 \text{ mg Amlodipino}$$

### mg recuperados reales

$$6.952 \text{ mg B. Amlodipino} * 0.721 = 5.013 \text{ mg Amlodipino}$$

### Intervalo de confianza para la media poblacional

$$IC(\mu) = y \pm t_{2.751, n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$IC(\mu)+ = 100.92 + (0.4)_{2.751, n-1} \frac{0.4}{\sqrt{6}} = 101.32$$

$$IC(\mu)- = 100.92 - (0.4)_{2.751, n-1} \frac{0.4}{\sqrt{6}} = 100.52$$

$t_{2.751, n-1}$  = valor de t de Student para 6 ensayos. (Recobros).

n = número de recobros, (6).

**Tabla No.8** Porcentaje de recobro Exactitud y Repetibilidad.

Mtra	Conc. Adicionados	$r_u$	Conc. Recuperados	% Recobro
1	0.0199	2664.828	0.0201	101.01
2	0.0199	2657.219	0.0200	100.50
3	0.0199	2670.093	0.0201	101.01
4	0.0198	2673.835	0.0201	101.52
5	0.0199	2667.538	0.0201	101.01
6	0.0198	2650.603	0.0199	100.51
$\bar{x}$				<b>100.92</b>
s				<b>0.4</b>
CV				<b>0.4</b>
IC( $\mu$ ) <sup>+</sup>				<b>101.32</b>
IC( $\mu$ ) <sup>-</sup>				<b>100.52</b>

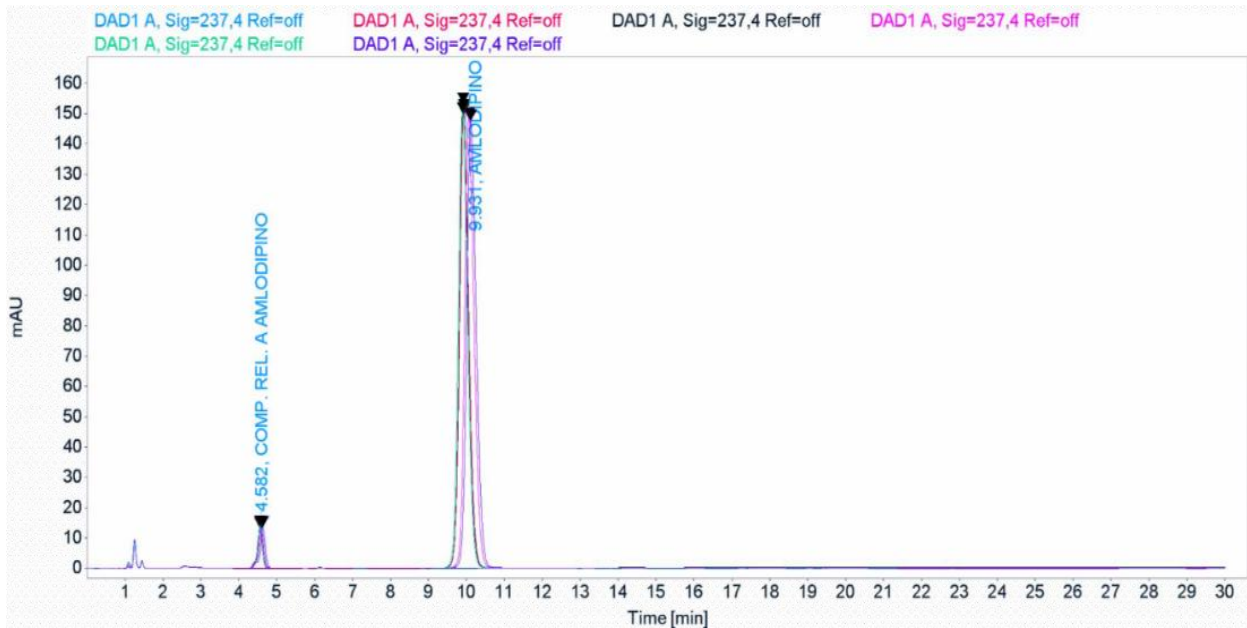
**Tabla No.9** mg Adicionados y Recuperados de la prueba de Exactitud y Repetibilidad

Mtra	mg Adicionados estimados	mg Adicionados reales	mg Recuperados estimados	mg Recuperados Amlodipino reales
1	6.953	5.013	6.952	5.013
2	6.950	5.011	6.932	4.998
3	6.948	5.010	6.966	5.023
4	6.945	5.007	6.976	5.030
5	6.958	5.017	6.959	5.018
6	6.945	5.007	6.915	4.986

El parámetro de desempeño para la complementación del método (Exactitud y Repetibilidad) se llevó a cabo analizando 6 muestras independientes con placebo adicionado, para evaluar las concentraciones adicionadas, recuperadas bajo las mismas condiciones y poder así determinar los mg recuperados y el porcentaje recuperado respectivamente.

Como resultado el promedio aritmético del porcentaje de recobro es de (100.92%), se obtuvieron valores de desviación estándar relativa (0.4 %) entre las 6 muestras además que incluye el 100.00% en el intervalo de confianza, con un nivel del 95 % es decir IC ( $\mu$ )<sup>-</sup> = 100.52 a IC ( $\mu$ )<sup>+</sup> = 101.32 respectivamente, tomando esto como indicativo de que el método es exacto en la forma de recuperación del principio activo y repetible al evaluar independientemente cada una de las muestras.

Además, se añade un ejemplo para justificar el análisis estadístico de cada parámetro de desempeño.



**Cromatograma No.2** Prueba de Exactitud y Repetibilidad.

### TOLERANCIA ENTRE EQUIPOS Y TOLERANCIA ENTRE COLUMNAS

Las fórmulas, el procedimiento de cálculo y un ejemplo para determinar  $C_a$ ,  $C_r$ , mg adicionados, mg recuperados, % recobro,  $\bar{x}$ , s, y CV. En la prueba de Tolerancia (equipos HITACHI y columna ACE 5) se describen en el Anexo 3.

Calcular  $\Sigma y_0, \Sigma y_1, \Sigma y_2, \Sigma y_3$  y determinar  $n_0, n_1, n_2$  y  $n_3$ :

#### Equipo AGILENT / Columna WATERS

$$\Sigma y_0 = 99.49 + 100.00 + 100.50 = 300.00 \quad n_0 = 3$$

#### Equipo HITACHI

$$\Sigma y_1 = 99.49 + 98.99 + 98.99 = 297.48 \quad n_1 = 3$$

#### Columna ACE 5

$$\Sigma y_2 = 99.49 + 99.50 + 99.50 = 298.49 \quad n_2 = 3$$

Calcular  $\bar{x}_0, \bar{x}_1, \bar{x}_2$ , y  $|d_i|$ :

$$\bar{x}_0 = \frac{300.00}{3} = 100.00 \quad |d_1| = |\bar{x}_0 - \bar{x}_1| = |100.00 - 99.16| = 0.8$$

$$\bar{x}_1 = \frac{297.48}{3} = 99.16 \quad |d_2| = |\bar{x}_0 - \bar{x}_2| = |100.00 - 99.50| = 0.5$$

$$\bar{x}_2 = \frac{298.49}{3} = 99.50$$

- Fórmulas para determinar mg  $C_a$ ,  $C_r$ , % *recobro*, mg adicionados, recuperados.

#### EQUIPO-AGILENT / COLUMNA- WATERS

##### Concentración adicionada

$$C_a = \frac{W_{mtra\ adcionada}}{V_{inicial}} * \frac{V_{alicuota}}{V_{final}} * 0.721$$

$$C_a = \frac{6.945\ mg\ B.\ Amlodipino}{25\ mL} * \frac{1\ mL}{10\ mL} * \frac{99.1\ R.P}{100\ R.A} * 0.721 = 0.0198 \frac{mg}{mL} Amlodipino$$

##### Concentración recuperada

$$C_r = \frac{r_u}{r_s} * C_s$$

$$C_r = \frac{2639.075}{2630.68} * \frac{13.74\ mg\ B.\ Amlodipino}{100\ mL} * \frac{2\ mL}{10\ mL} * \frac{99.1\ R.P}{100\ R.A} * 0.721$$

$$= 0.0197 \frac{mg}{mL} Amlodipino$$

##### %recobro

$$\% \text{ recobro} = \frac{C_r}{C_a} * 100$$

$$\% \text{ recobro} = \frac{0.0197 \frac{mg}{mL} Amlodipino}{0.0198 \frac{mg}{mL} Amlodipino} * 100 = 99.49 \%$$

**mg recuperados estimados**

$$mg\ recup.\ estim. = \frac{C_r * Factor\ de\ Dilución\ (250\ mL)}{0.721}$$

$$mg\ recup.\ estim. = \frac{0.0197 \frac{mg}{mL} Amlodipino * 250\ mL}{0.721} = 6.831\ mg\ B.\ Amlo$$

**mg adicionados reales**

$$6.945\ mg\ B.\ Amlo * 0.721 = 5.007\ mg\ Amlodipino$$

**mg recuperados reales**

$$6.831\ mg\ B.\ Amlo * 0.721 = 4.925\ mg\ Amlodipino$$

**Tabla No.10** Respuesta analítica de la prueba de Tolerancia equipos y columnas

Mtra	$r_u$ AGILENT-WATERS	$r_u$ HITACHI	$r_u$ ACE 5
1	2639.075	1153027.892	2639.075
2	2663.493	1156151.275	2663.493
3	2678.913	1154318.921	2678.913
$\bar{x}$	2660.494	1154499.36	2660.494
s	20.1	1281.5	20.1
CV	0.8	0.1	0.8

**Tabla No.11** Concentración adicionada y recuperada de la prueba de Tolerancia equipos y columnas

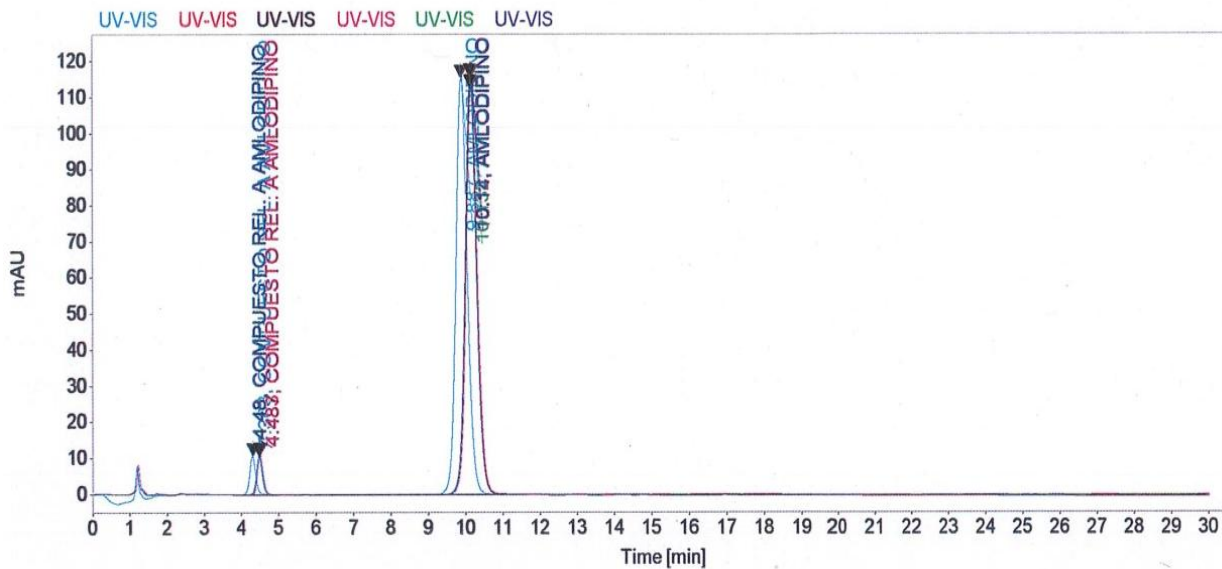
Mtra	AGILENT-WATERS		HITACHI	
	Conc. Adic.	Conc. Recup.	Conc. Adic.	Conc. Recup.
1	0.0198	0.0197	0.0197	0.0197
2	0.0199	0.0199	0.0198	0.0197
3	0.0199	0.0200	0.0198	0.0197
$\bar{x}$	0.0199	0.0199	0.0198	0.0197
s	0.0	0.0	0.0	0.0
CV	0.3	0.8	0.3	0.0
Mtra	AGILENT-WATERS		ACE 5	
	Conc. Adic.	Conc. Recup.	Conc. Adic.	Conc. Recup.
1	0.0198	0.0197	0.0198	0.0197
2	0.0199	0.0199	0.0199	0.0198
3	0.0199	0.0200	0.0199	0.0198
$\bar{x}$	0.0199	0.0199	0.0200	0.0198
s	0.0	0.0	0.0	0.0
CV	0.3	0.8	0.3	0.3

**Tabla No.12** mg Adicionados y Recuperados de la prueba de Tolerancia.

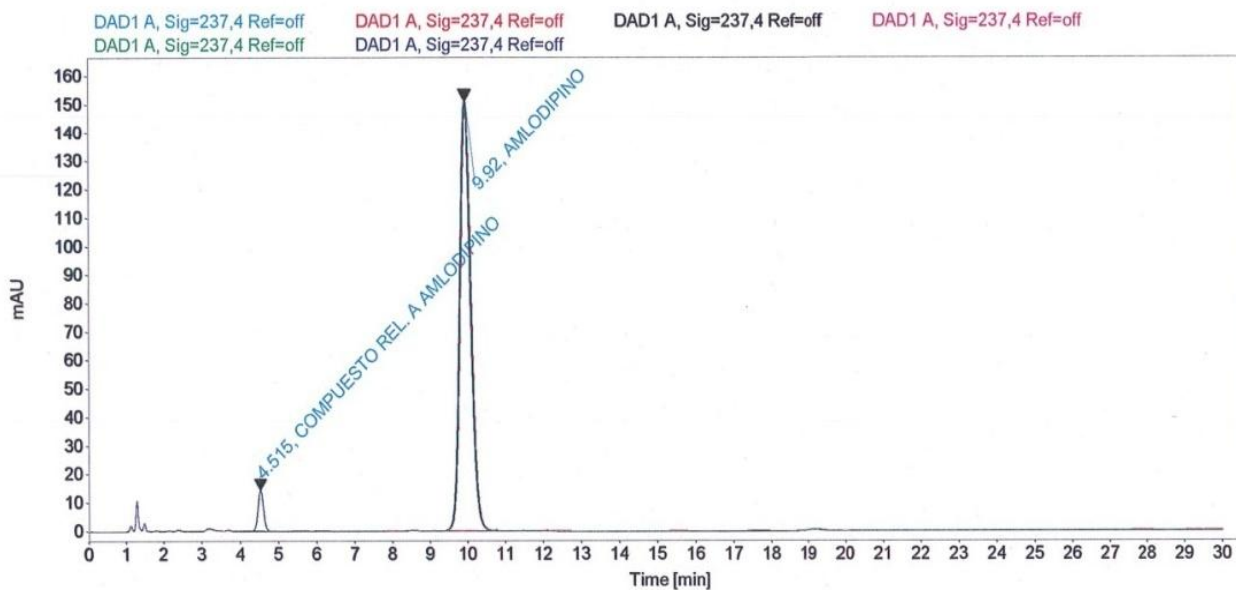
<b>AGILENT-WATERS</b>					
<b>Mtra</b>	<b>mg Adicionados estimados</b>	<b>mg Adicionados reales</b>	<b>mg Recuperados estimados</b>	<b>mg Recuperados Amlodipino reales</b>	<b>% Recobro</b>
<b>1</b>	6.945	5.007	6.831	4.924	<b>99.49</b>
<b>2</b>	6.961	5.019	6.893	4.970	<b>100.00</b>
<b>3</b>	6.956	5.015	6.933	4.999	<b>100.50</b>
<b><math>\bar{x}</math></b>	6.954	5.014	6.885	4.964	<b>100.00</b>
<b>s</b>	0.0	0.0	0.1	0.0	<b>0.4</b>
<b>CV</b>	0.1	0.1	0.8	0.8	<b>0.4</b>
<b>HITACHI</b>					
<b>1</b>	6.945	5.007	6.818	4.916	<b>99.49</b>
<b>2</b>	6.961	5.019	6.836	4.929	<b>98.99</b>
<b>3</b>	6.956	5.015	6.826	4.921	<b>98.99</b>
<b><math>\bar{x}</math></b>	6.954	5.014	6.827	4.922	<b>99.16</b>
<b>s</b>	0.0	0.0	0.0	0.0	<b>0.2</b>
<b>CV</b>	0.1	0.1	0.1	0.1	<b>0.2</b>
<b>ACE 5</b>					
<b>1</b>	6.945	5.007	6.832	4.926	<b>99.49</b>
<b>2</b>	6.961	5.019	6.861	4.947	<b>99.50</b>
<b>3</b>	6.956	5.015	6.849	4.938	<b>99.50</b>
<b><math>\bar{x}</math></b>	6.954	5.014	6.848	4.937	<b>99.16</b>
<b>s</b>	0.0	0.0	0.0	0.0	<b>0.2</b>
<b>CV</b>	0.1	0.1	0.3	0.2	<b>0.2</b>

**Tabla No.13** % Recobro y Diferencia absoluta de Tolerancia entre equipos y tolerancia entre columnas.

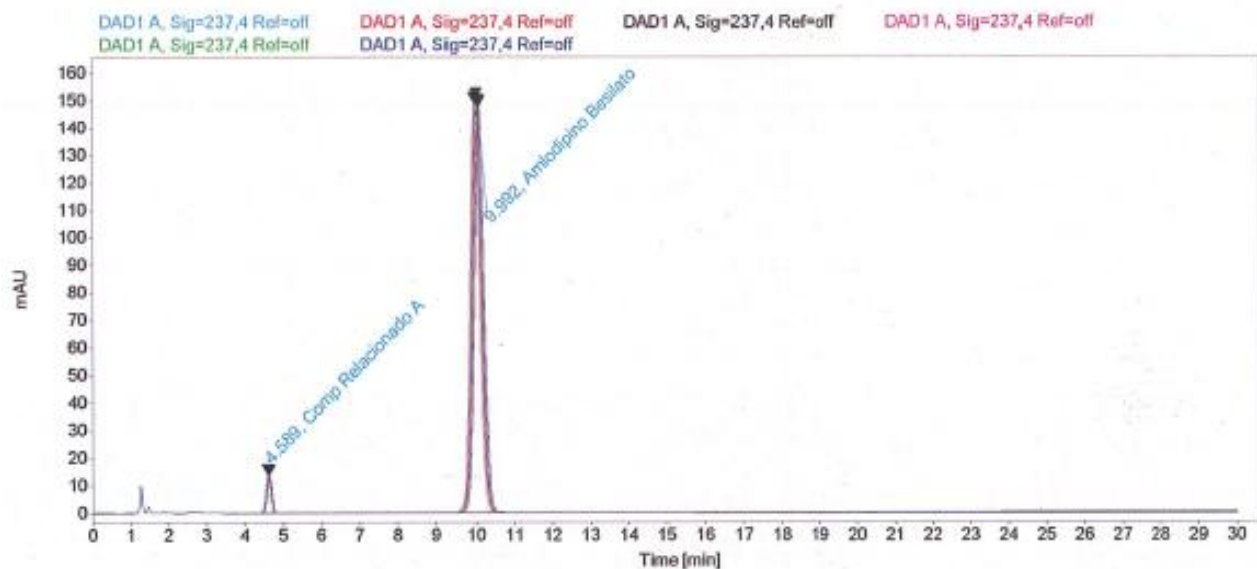
<b>Mtra</b>	<b>%Recobro</b>		
	<b>AGILENT y WATERS</b>	<b>HITACHI</b>	<b>ACE 5</b>
<b>1</b>	99.49	99.49	99.49
<b>2</b>	100.00	98.99	99.50
<b>3</b>	100.50	98.99	99.50
<b><math>\bar{x}</math></b>	100.00	99.16	99.50
<b>s</b>	0.4	0.2	0.001
<b>CV</b>	0.4	0.2	0.001
<b> d<sub>i</sub> </b>	-	<b>0.8</b>	<b>0.5</b>



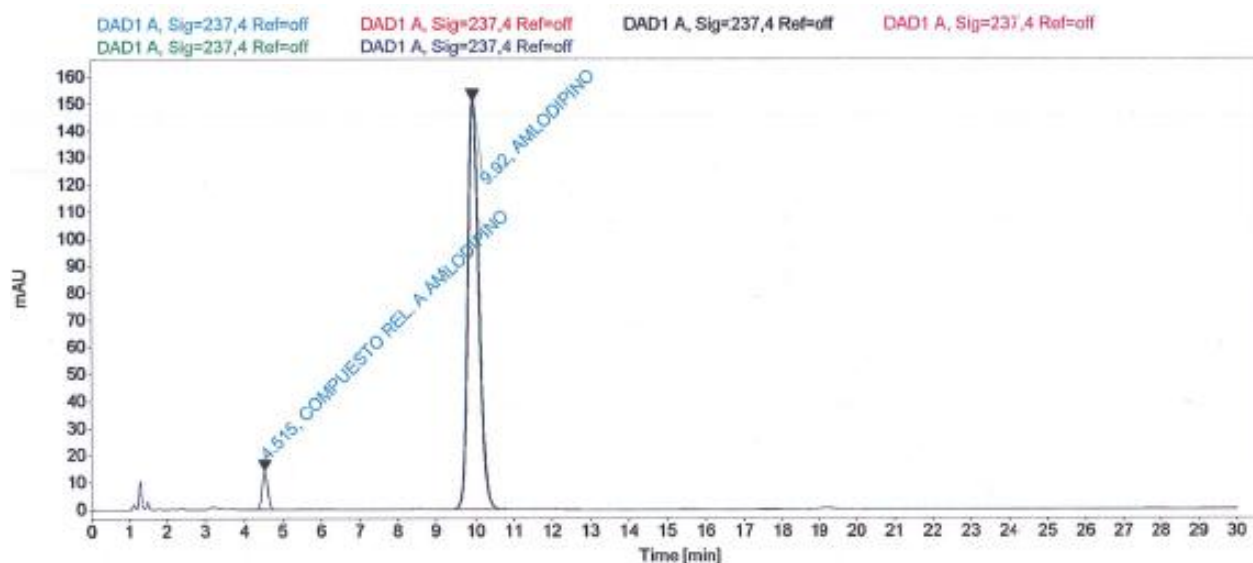
**Cromatograma No.3** Tolerancia equipo HITACHI



**Cromatograma No.4** Tolerancia equipo AGILENT.



**Cromatograma No.5** Tolerancia columna ACE 5.



**Cromatograma No.6** Tolerancia columna WATERS.

Al evaluar estadísticamente la Tolerancia entre equipos y columnas se obtuvieron diferencias absolutas que cumplen con los criterios de aceptación (0.5 columnas y 0.8 para equipos), que demuestran que el uso de diferentes columnas con las mismas características y el uso de diferentes equipos cromatográficos, no altera la cuantificación de mg recuperados, el % de recuperación entre las muestras y el coeficiente de varianza es menor al 2.0 % entre ensayos, usando las mismas muestras.



## ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Las fórmulas, el procedimiento de cálculo y un ejemplo para determinar mg/tableta, % Amlodipino para las condiciones 1 a 3 se describen en el Anexo 4. Además de  $\bar{x}$ ,  $s$ , y  $CV$ . En la prueba de Estabilidad de la muestra.

### mg / tableta Amlodipino

$$mg/tab \text{ Amlodipino} = \frac{r_u}{r_s} * \frac{W_{SRef}}{5 \text{ tabletas}} * P * 0.721 * FD$$

### % Amlodipino

$$\% \text{ Amlodipino} = \frac{mg/tab \text{ Amlodipino}}{5} * 100$$

### Condicion inicial ( $y^0$ )

$$\begin{aligned} \frac{mg}{tab} \text{ Amlodipino} &= \left( \frac{2669.082}{2653.7} \right) * \left( \frac{13.79 \text{ mg}}{5 \text{ tabletas}} \right) * \frac{99.91R.P}{100R.A} * 0.721 * 2.5 \\ &= 4.955 \frac{mg}{tab} \text{ Amlodipino} \end{aligned}$$

$$\% \text{ Amlodipino} = \frac{4.955 \frac{mg}{tab} \text{ Amlodipino}}{5} * 100 = 99.10 \%$$

**Tabla No.14** Resultados obtenidos en la Estabilidad Analítica de la muestra.

	Condición inicial	Condiciones y tiempo de almacenamiento en el auto muestreador.		
Mtra	Condición inicial (y <sup>0</sup> )	Condición 1(y <sup>1</sup> )	Condición 2(y <sup>2</sup> )	Condición 3(y <sup>3</sup> )
1	2669.082	2638.274	2612.570	2558.456
2	2671.980	2632.962	2598.556	2559.576
3	2675.584	2645.863	2606.580	2543.465
Mtra	mg /tab. Amlodipino (y <sup>0</sup> )	mg /tab. Amlodipino 1(y <sup>1</sup> )	mg /tab. Amlodipino 2(y <sup>2</sup> )	mg /tab. Amlodipino 3(y <sup>3</sup> )
1	4.955	4.939	4.890	4.789
2	4.961	4.929	4.864	4.791
3	4.967	4.953	4.879	4.761
$\bar{x}$	4.96	4.94	4.88	4.78
s	0.0	0.0	0.0	0.0
CV	0.1	0.2	0.2	0.3
% Contenido de principio activo				
1	99.10	98.77	97.81	95.78
2	99.21	98.57	97.28	95.82
3	99.34	99.05	97.58	95.22
$\bar{x}$	99.22	98.80	97.56	95.61
s	0.1	0.2	0.2	0.3
CV	0.1	0.2	0.2	0.3
d <sub>i</sub>	-	0.4	1.7	3.6

Media aritmética del análisis inicial

$$\bar{x}_0 = \frac{\sum y_0}{n_0}$$

n<sub>0</sub>= número de muestras del análisis inicial

Media aritmética del análisis de cada condición de almacenaje o resguardo.

$$\bar{x}_1 = \frac{\sum y_1}{n_1}$$

n<sub>1</sub>= número de muestras del análisis inicial de la i-ésima condición de almacenaje o resguardo, diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto de la media aritmética del análisis inicial.

$$|d_i| = |\bar{x}_1 - \bar{x}_0|$$

Calcular  $\Sigma_{y_0}, \Sigma_{y_1}, \Sigma_{y_2}, \Sigma_{y_3}$  y determinar  $n_0, n_1, n_2$  y  $n_3$ .

$$\Sigma_{y_0} = 99.10 + 99.21 + 99.34 = 297.65 \qquad n_0 = 3$$

$$\Sigma_{y_1} = 98.77 + 98.57 + 99.05 = 296.39 \qquad n_1 = 3$$

$$\Sigma_{y_2} = 97.81 + 97.28 + 97.58 = 293.67 \qquad n_2 = 3$$

$$\Sigma_{y_3} = 95.78 + 95.82 + 95.22 = 286.82 \qquad n_3 = 3$$

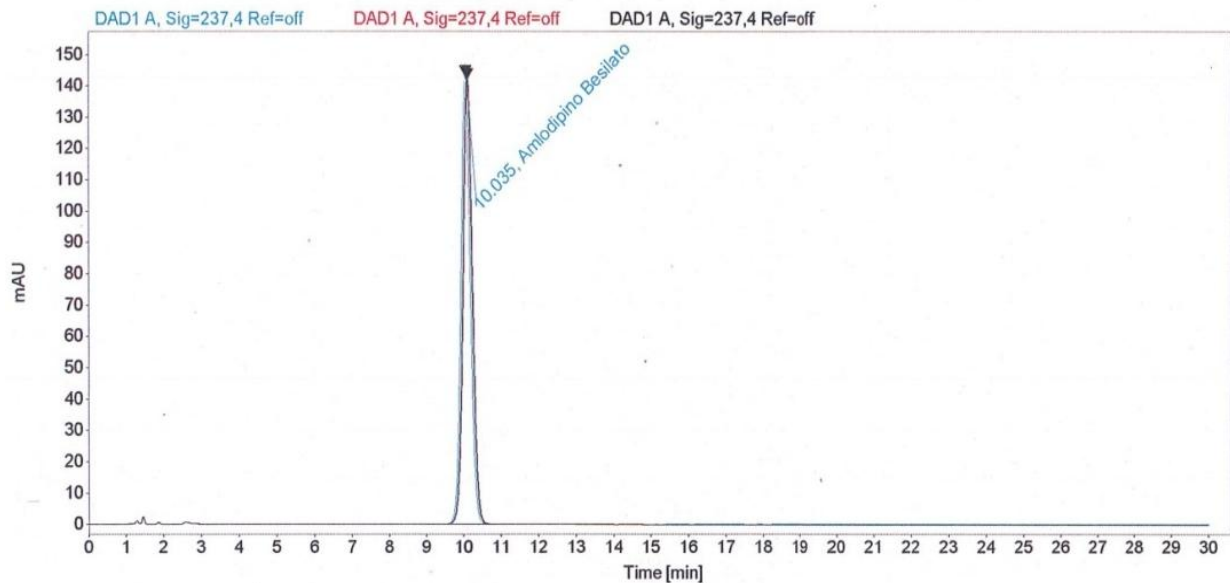
Calcular  $\bar{x}_0, \bar{x}_1, \bar{x}_2, \bar{x}_3$  y  $|d_i|$ :

$$\bar{x}_0 = \frac{297.65}{3} = 99.22 \qquad |d_1| = |\bar{x}_0 - \bar{x}_1| = |99.22 - 98.80| = 0.42$$

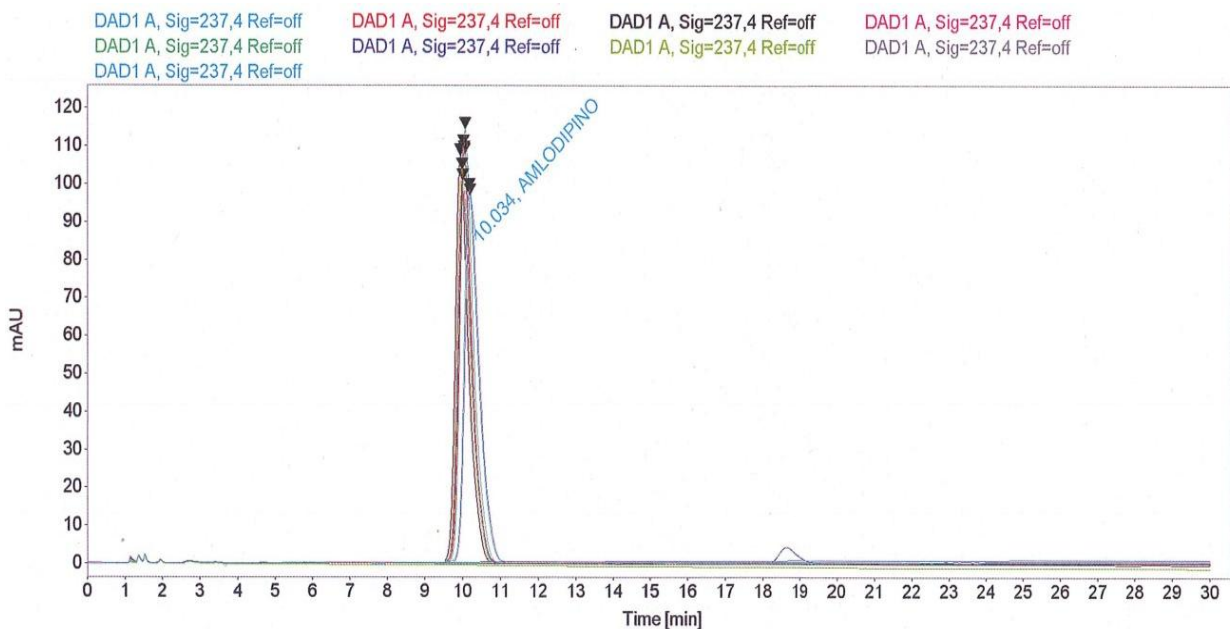
$$\bar{x}_1 = \frac{296.39}{3} = 98.80 \qquad |d_2| = |\bar{x}_0 - \bar{x}_2| = |99.22 - 97.56| = 1.66$$

$$\bar{x}_2 = \frac{292.67}{3} = 97.56 \qquad |d_3| = |\bar{x}_0 - \bar{x}_3| = |99.22 - 95.60| = 3.62$$

$$\bar{x}_3 = \frac{286.82}{3} = 95.60$$



**Cromatograma No.7** Estabilidad analítica de la muestra inicial.



**Cromatograma No. 8** Estabilidad analítica de la muestra a las 48 horas.

Como se muestra en la Tabla No. 14, las muestras sometidas a (T.A protegidas de la luz) en el auto muestreador del equipo condición 1( $y^1$ ) tienen una ( $|di| = 0.4$ ) con respecto a la condición inicial ( $y^0$ ), se observa que el % de contenido de principio activo inicial de (99.22%) va descendiendo (98.80%), este comportamiento en relación a la diferencia absoluta entre las muestras, se observa en la condición 2( $y^2$ ) (T.A. sin proteger de la luz pasadas 48 horas) debido por los componentes en los cuales se encuentra la muestra preparada (Metanol, Acetonitrilo, Trietilamina Ácido

Fosfórico) además de estar expuesta a la luz, con  $(|d_i| = 1.7)$  cumpliendo con los criterios de aceptación  $(|d_i| \leq 2.0)$ . Por último la condición 3(y<sup>3</sup>) (Refrigeración 6°C +/-2°C) en el auto muestreador del equipo se obtuvo una  $(|d_i| = 3.6)$  la cual no cumple con los criterios de aceptación de diferencia absoluta, sin embargo si con el % de contenido de principio activo (95.61%) ya que la especificación menciona un intervalo de (90.0%-110.0% de Amlodipino) el comportamiento descendente de la muestra podría deberse a las condiciones a las cuales se les fue sometida, ya que en la condición 3(y<sup>3</sup>) se expuso en refrigeración dentro del equipo CLAR, es probable que los solventes con las que fue preparada se vayan evaporado y la muestra se concentre, al ser analizada se obtienen respuestas analíticas menores con respecto de la inicial, y a diferencia a la condición 2(y<sup>2</sup>) los componentes de la muestra puede que se degraden por la exposición de la luz, sin embargo en la literatura no se encuentra información de que el principio activo Amlodipino sea fotosensible, pero como en el caso anterior los solventes son volátiles y no conservan sus características fisicoquímicas.

Finalmente, la muestras bajo condiciones de refrigeración de 6°C +/- 2°C en el auto muestreador pasadas 48 horas luego de su preparación no son estables en relación a la condición inicial.

### PRECISIÓN DEL MÉTODO

Las fórmulas, el procedimiento de cálculo y un ejemplo para determinar mg/tableta, % Amlodipino de los analistas 1, 2 y días respectivamente se describen en el Anexo 5. En la prueba de Precisión del Método.

Calcular  $\Sigma y$ , ...,  $\Sigma y^2$ ,  $\bar{x}$  y  $s$  además determinar  $n$ .

$$\Sigma y = 98.43 + 97.90 + 98.44 + \dots + 99.01 = 1189.71$$

$$\Sigma y^2 = 98.43^2 + 97.90^2 + 98.44^2 + \dots + 99.01^2 = 118103.8473$$

$$n = 12$$

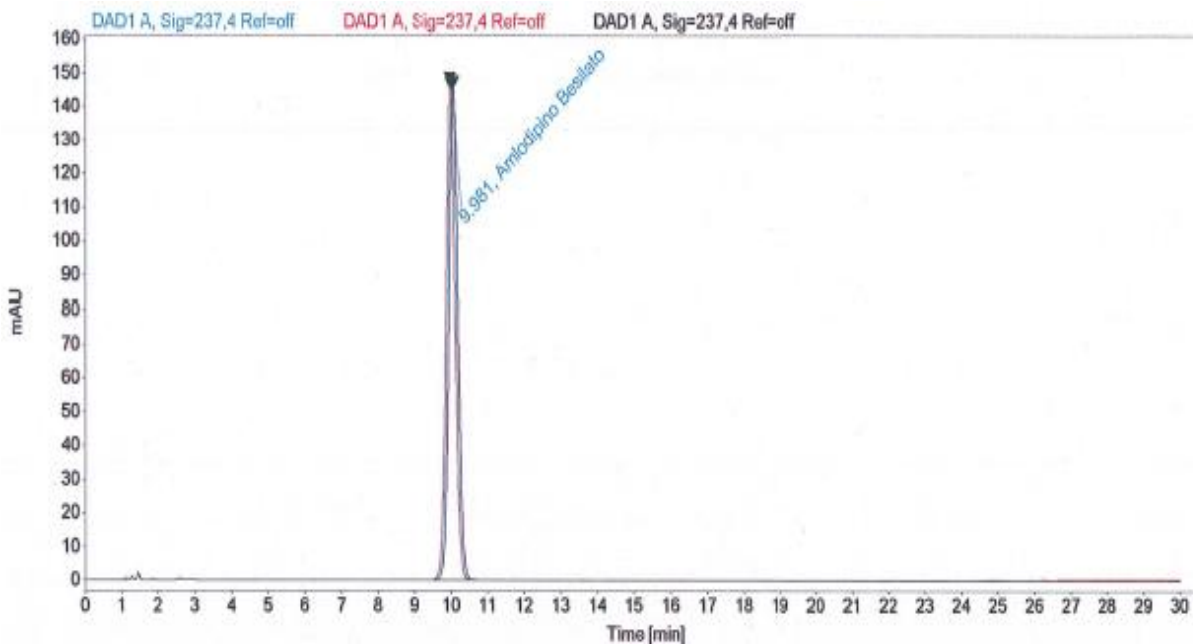
$$\bar{x} = \frac{1189.71}{12} = 99.14$$

$$s = \sqrt{\frac{12(118103.8473) - (1189.71)^2}{12(12 - 1)}} = 0.82$$

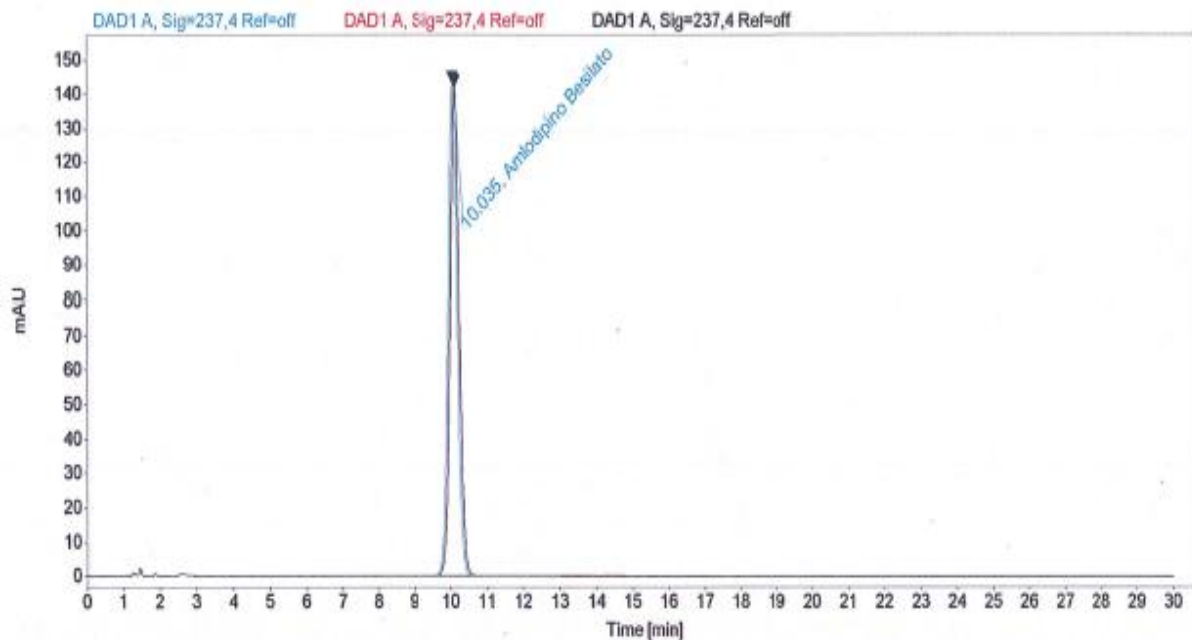
$$CV = \frac{0.82}{99.14} * 100 = 0.83$$

**Tabla No.15** Resultados obtenidos de precisión del método Día y Analista.

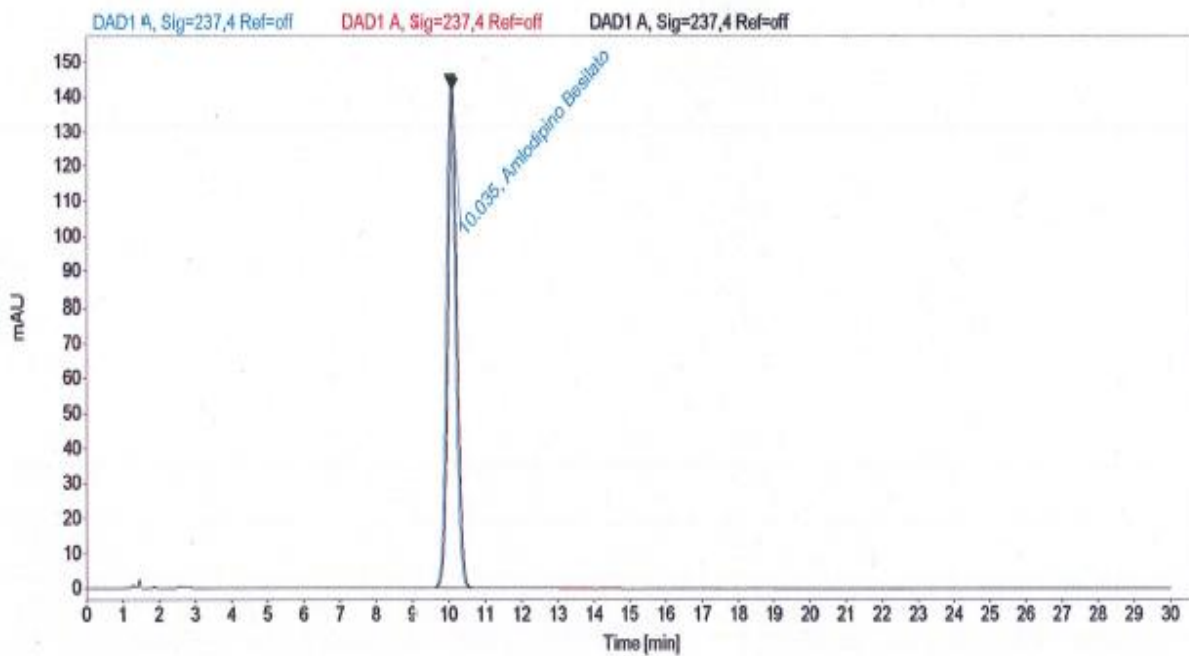
PRECISIÓN DEL MÉTODO											
% Contenido de Principio Activo	ANALISTA				mg/tab Amlodipino	ANALISTA					
	1	2	Resultados por Día			1	2	Resultados por Día			
DÍA	1	98.43	98.64	$\bar{x}$	98.56	1	4.922	4.932	$\bar{x}$	4.928	
		97.90	99.23	<b>s</b>	0.44		4.895	4.961	<b>s</b>	0.0	
		98.44	98.74	<b>CV</b>	0.44		4.922	4.937	<b>CV</b>	0.4	
	2	100.97	99.90	$\bar{x}$	99.72	2	5.049	4.995	$\bar{x}$	4.986	
		99.21	99.49	<b>s</b>	0.70		4.961	4.975	<b>s</b>	0.0	
		99.76	99.01	<b>CV</b>	0.70		4.988	4.950	<b>CV</b>	0.7	
Resultados por Analista				TOTAL		Resultados por Analista				TOTAL	
$\bar{x}$	99.12	99.17	$\bar{x}$	99.14	$\bar{x}$	4.956	4.958	$\bar{x}$	4.957		
<b>s</b>	1.12	0.47	<b>s</b>	0.82	<b>s</b>	0.1	0.0	<b>s</b>	0.0		
<b>CV</b>	1.13	0.48	<b>CV</b>	0.83	<b>CV</b>	1.1	0.4	<b>CV</b>	0.8		



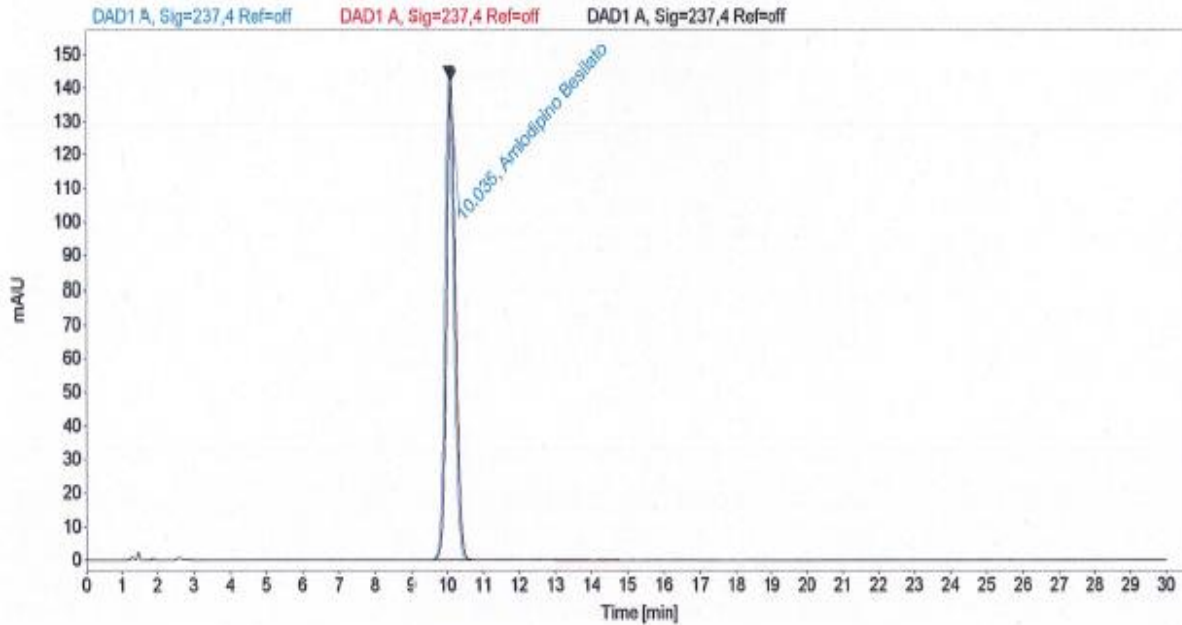
**Cromatograma No.9** Precisión del Método Analista 1 Día 1.



**Cromatograma No.10** Precisión del Método Analista 2 Día 1.



**Cromatograma No.11** Precisión del Método Analista 1 Día 2.



**Cromatograma No.12** Precisión del Método Analista 2 Día 2.

Esta prueba se realizó con la preparación con tabletas y no placebos adicionados, los resultados obtenidos en la precisión del método se considera preciso y reproducible bajo las mismas condiciones de operación (equipo AGILENT y columna WATERS) en diferentes días por diferentes analistas, dentro del mismo laboratorio, estos resultados se ven reflejados en el % de contenido de principio activo Amlodipino en relación a los mg/tableta de Amlodipino en los cuales no varían significativamente y que cumplen dentro de especificaciones de % principio activo con una tendencia de 98.0% cercana a 101.0% y un (CV global=0.8% )

### ESPECIFICIDAD

Las fórmulas, el procedimiento de cálculo y un ejemplo para determinar  $\bar{x}$ ,  $s$ , y  $CV$  se describen en el Anexo 6. En la prueba de Especificidad.

$$\% \text{ degradado} = 100 - \left( \frac{r_u \text{ degradada}}{r_u \text{ inicial}} * 100\% \right)$$

$r_u \text{ inicial}$  = respuesta del pico del placebo adicionado sin degradar

$r_u \text{ degradada}$  = respuesta del pico de la degradación (ácida, básica u oxidativa).

**Tabla No.16** Degradación ácida del placebo adicionado

INICIAL		DEGRADACIÓN ÁCIDA		DEGRADADO
Tiempo de retención	$r_u$ inicial	Tiempo de retención	$r_u$ degradada	%
10.118	2593	10.169	1179.991	55



**Tabla No.17** Degradación básica del placebo adicionado

INICIAL		DEGRADACIÓN BÁSICA		DEGRADADO
Tiempo de retención	$r_u$ inicial	Tiempo de retención	$r_u$ degradada	%
10.118	2593	10.185	59.035	98

**Tabla No.18** Degradación oxidativa del placebo adicionado

INICIAL		DEGRADACIÓN OXIDATIVA		DEGRADADO
Tiempo de retención	$r_u$ inicial	Tiempo de retención	$r_u$ degradada	%
10.118	2593	10.222	64.554	98

**% Impurezas aducto de Amlodipino glucosa/galactosa**

$$= \left( \frac{r_{glucosa/galactosa}}{r_s} \right) * \left( \frac{C_{Besilato Amlodipino}}{C_u} \right) * 0.721 * 100$$

**% Impurezas compuesto relacionado A**

$$= \left( \frac{r_{Comp.rel.A}}{r_s Comp.rel.A} \right) * \left( \frac{C_{comp.rel.A}}{C_u} \right) * 0.778 * 100$$

**% Impurezas Besilato de Amlodipino**

$$= \left( \frac{r_{B.amlodipino}}{r_s} \right) * \left( \frac{C_{Besilato Amlodipino}}{C_u} \right) * 0.721 * 100$$

$$\text{\% Impurezas no especificadas} = \left( \frac{r_u}{r_s} \right) * \left( \frac{C_s}{C_u} \right) * 100$$

$r_u =$	Respuesta del pico de la solución de la muestra.
$r_s =$	Respuesta del pico de la solución de referencia.
$r_{glu/galact} =$	Respuesta del pico de aducto de Amlodipino glucosa/galactosa de la solución de la muestra.
$r_{comp. rel A.} =$	Respuesta del pico compuesto relacionado A de Amlodipino de la solución de la muestra.
$r_{B.Amlodipino} =$	Respuesta del pico de Besilato de Amlodipino de la solución de la muestra.
$C_s =$	Concentración de Amlodipino en la solución de referencia (mg/mL)
$C_u =$	Concentración de Amlodipino en la solución de la muestra (mg/mL)
$C_{Comp. rel A.} =$	Concentración de compuesto relacionado A de Amlodipino en la solución de referencia (mg/mL)
$C_{B. Amlodipino} =$	Concentración de Besilato de Amlodipino en la solución de referencia (mg/mL)
$W_{SRef} =$	Peso de la sustancia de referencia (mg)

$W_{Mtra} =$	Peso de la muestra.
$0.721 =$	Relación entre pesos moleculares de Amlodipino (408.88 g/mol) y Besilato de Amlodipino (567.05 g/mol).
$0.778 =$	Peso molecular de compuesto relacionado A de Amlodipino (406.86 g/mol) y Fumarato compuesto relacionado A de Amlodipino 522.93 g/mol)

$$r_s = 2594.7$$

$$r_s \text{ Comp.Rel.A Amlodipino} = 118.982$$

$$C_s = \frac{13.82 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} * \frac{2 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} * 0.721 * \frac{99.1 \text{ R.P}}{100 \text{ R.A.}} = 0.0198 \text{ mg/mL}$$

$$C_u \text{ Deg. Ácida} = \frac{6.950 \text{ mg B. Amlodipino}}{25 \text{ mL}} * \frac{1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} * 0.721 * \frac{99.1 \text{ R.P}}{100 \text{ R.A.}}$$

$$= 0.0199 \text{ mg/mL}$$

$$C_u \text{ Deg. Básica} = \frac{6.945 \text{ mg B. Amlodipino}}{25 \text{ mL}} * \frac{1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} * 0.721 * \frac{99.1 \text{ R.P}}{100 \text{ R.A.}}$$

$$= 0.0198 \text{ mg/mL}$$

$$C_u \text{ Deg. Oxidativa} = \frac{6.948 \text{ mg B. Amlodipino}}{25 \text{ mL}} * \frac{1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} * 0.721 * \frac{99.1 \text{ R.P}}{100 \text{ R.A.}}$$

$$= 0.0199 \text{ mg/mL}$$

$$\% \text{ Impurezas no especificadas No. 1} = \left( \frac{3.398}{2594.7} \right) * \left( \frac{0.0198 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{0.0199 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} \right) * 100 = 0.130 \%$$

#### Degradación ácida para impurezas conocidas.

$$\% \text{ Impurezas compuesto relacionado A} = \left( \frac{66.598}{118.982} \right) * \left( \frac{2.516 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}}{19.8 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}} \right) * 0.778 * 100$$

$$= 5.530$$

$$\% \text{ Impurezas compuesto relacionado A} = \left( \frac{9,275}{118.982} \right) * \left( \frac{2.516 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}}{19.8 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}} \right) * 0.778 * 100$$

$$= 0.771$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Impurezas aducto de Amlodipino } & \frac{\text{glucosa}}{\text{galactosa}} \\ & = \left( \frac{9.257}{2594.7} \right) * \left( \frac{0.0275 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{0.0275 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} \right) * 0.721 * 100 = 0.257 \end{aligned}$$

**Degradación básica para impurezas conocidas.**

$$\begin{aligned} \% \text{ Impurezas compuesto relacionado A} & = \left( \frac{67.900}{118.982} \right) * \left( \frac{2.516 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}}{19.8 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}} \right) * 0.778 * 100 \\ & = 5.642 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Impurezas compuesto relacionado A} & = \left( \frac{2.826}{118.982} \right) * \left( \frac{2.516 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}}{19.8 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}} \right) * 0.778 * 100 \\ & = 0.023 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Impurezas aducto de Amlodipino } & \frac{\text{glucosa}}{\text{galactosa}} \\ & = \left( \frac{6.715}{2594.7} \right) * \left( \frac{0.0275 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{0.0276 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} \right) * 0.721 * 100 = 0.186 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Impurezas Besilato de Amlodipino} & = \left( \frac{6.576}{2594.7} \right) * \left( \frac{0.0275 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{0.0276 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} \right) * 0.721 * 100 \\ & = 0.253 \end{aligned}$$

**Degradación Oxidativa para impurezas conocidas.**

$$\begin{aligned} \% \text{ Impurezas compuesto relacionado A} & = \left( \frac{10.848}{118.982} \right) * \left( \frac{2.516 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}}{19.8 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}} \right) * 0.778 * 100 \\ & = 0.901 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Impurezas compuesto relacionado A} & = \left( \frac{4.055}{118.982} \right) * \left( \frac{2.516 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}}{19.8 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}} \right) * 0.778 * 100 \\ & = 0.034 \end{aligned}$$

**Tabla No.19** Impurezas en la degradación ácida del placebo adicionado

<b>DEGRADACIÓN ÁCIDA</b>			
<b>Impureza</b>	<b>Tiempo de retención</b>	<b><math>r_u</math> Impureza</b>	<b>% Impurezas</b>
1	4.068	3.398	0.130
2	4.640	1.036	0.040
Comp. Rel. A Amlodipino	5.277	89.275	2.151
3	6.130	4.931	0.189
4	6.690	2.979	0.114
5	7.068	3.213	0.123
Glucosa-Galactosa	9.162	9.257	0.186
Amlodipino	10.169	1179.991	-
6	11.257	4.128	0.158
7	13.000	140.803	5.395

**Tabla No.20** Impurezas en la degradación básica del placebo adicionado

<b>DEGRADACIÓN BÁSICA</b>			
<b>Impureza</b>	<b>Tiempo de retención</b>	<b><math>r_u</math> Impureza</b>	<b>% Impurezas</b>
1	4.055	27.875	1.069
2	4.681	2.826	0.023
3	5.032	1.782	0.001
Comp. Rel. A Amlodipino	5.267	67.900	0.560
4	6.127	5.588	0.214
5	6.960	7.515	0.288
Glucosa-Galactosa	9.450	6.715	0.186
Amlodipino	10.185	59.035	-
Besilato de Amlodipino	10.670	6.576	0.253
6	11.322	6.410	0.252
7	12.900	135.267	0.246

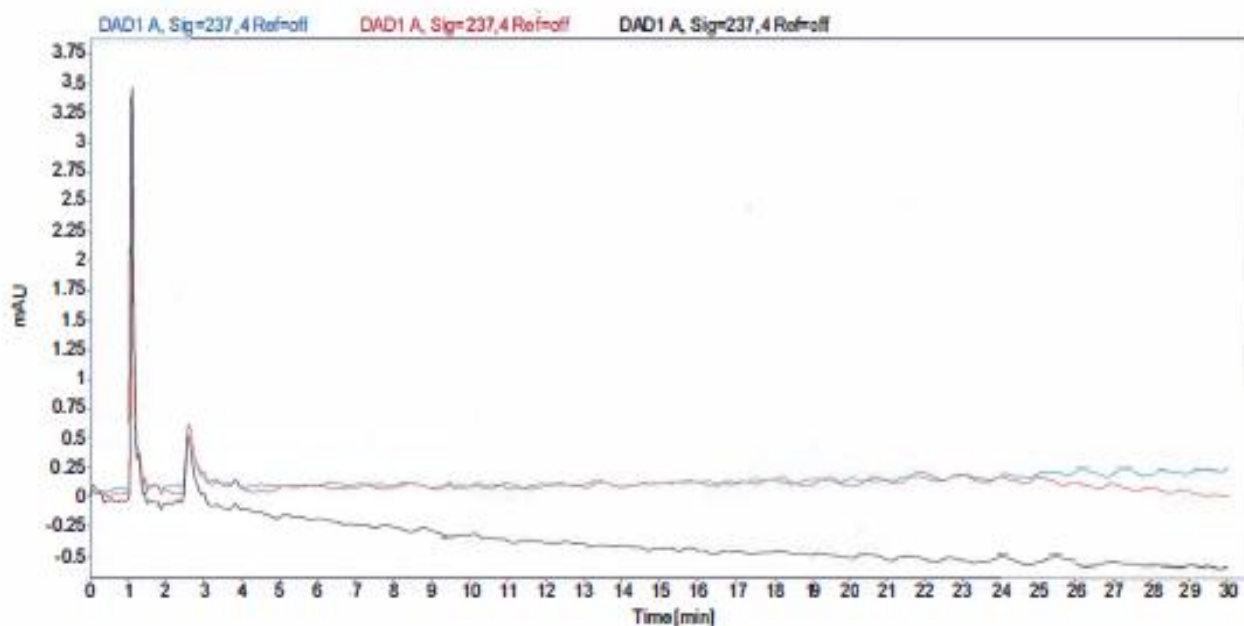
**Tabla No.21** Impurezas en la degradación oxidativa del placebo adicionado

<b>DEGRADACIÓN OXIDATIVA</b>			
<b>Impureza</b>	<b>Tiempo de retención</b>	<b><math>r_u</math> Impureza</b>	<b>% Impurezas</b>
1	4.648	4.055	0.337
Comp. Rel. A Amlodipino	5.292	10.848	0.415
2	5.728	2.634	0.101
3	6.605	3.153	0.121
Amlodipino	10.222	64.554	-

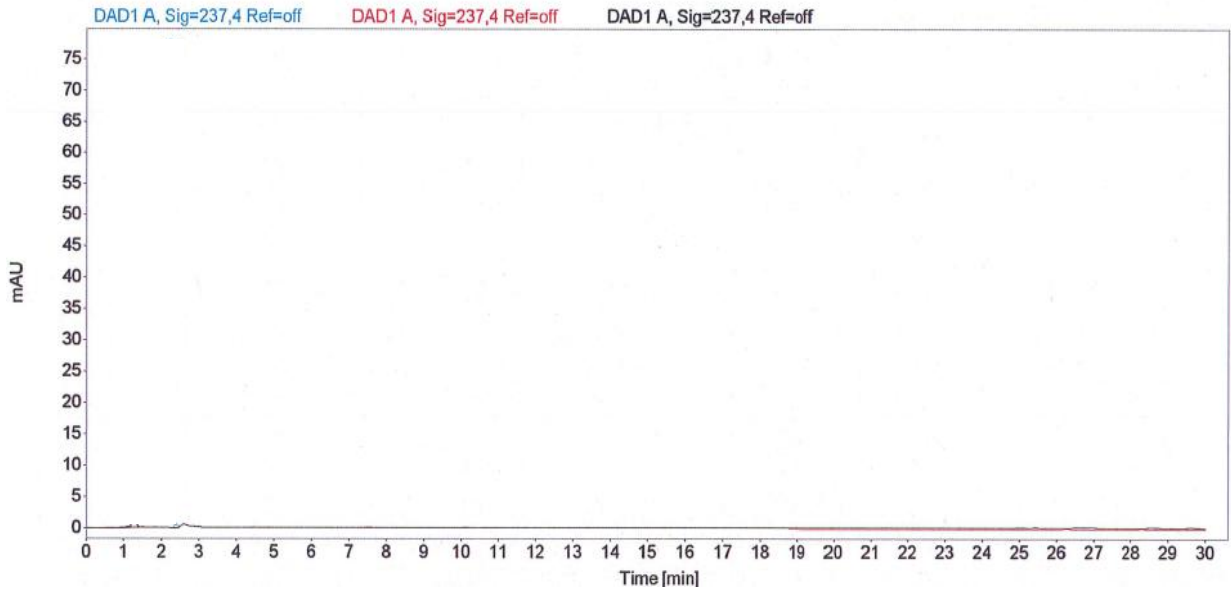
La complementación del método cromatográfico para de Amlodipino es específico y selectivo con base en los resultados obtenidos durante la prueba, es decir diferencia y detecta el analito, ya que no se encuentran picos de degradación que afecten o interfieran la respuesta del pico principal (Amlodipino) bajo las condiciones establecidas de degradación.

El motivo del porque se sometieron las muestras de placebo adicionado a degradación a diferentes condiciones de degradación (ácida, básica y oxidativa) es para realizar una simulación si es posible que reaccione el material del empaque secundario con el producto terminado y observar que ningún pico eluye en el tiempo de retención de interés y además de identificar los otros picos para tener un perfil cromatográfico.

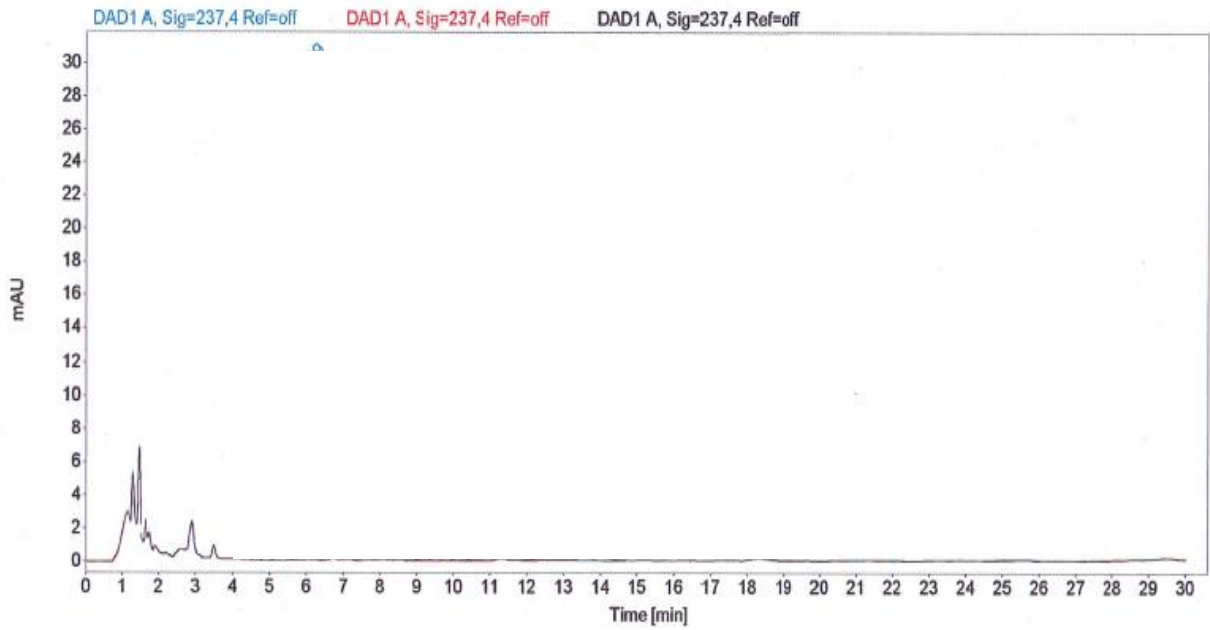
Este perfil cromatográfico es de mucha utilidad para observar a lo largo del estudio de Estabilidad como lo maneja la NOM-073-SSA1-2015 (Estabilidad de fármacos y medicamentos), donde las muestras son sometidas a diferentes condiciones de estabilidad (acelerada, intermedia, largo plazo), si pueden generarse impurezas es decir, es la base de datos para posibles picos de degradación ya identificados, o bien si se descartan estos, sin embargo no es tal cual el estudio de Estabilidad de acuerdo a la NOM-073, estas degradaciones son simuladores de prueba de estabilidad en cámaras de estabilidad.



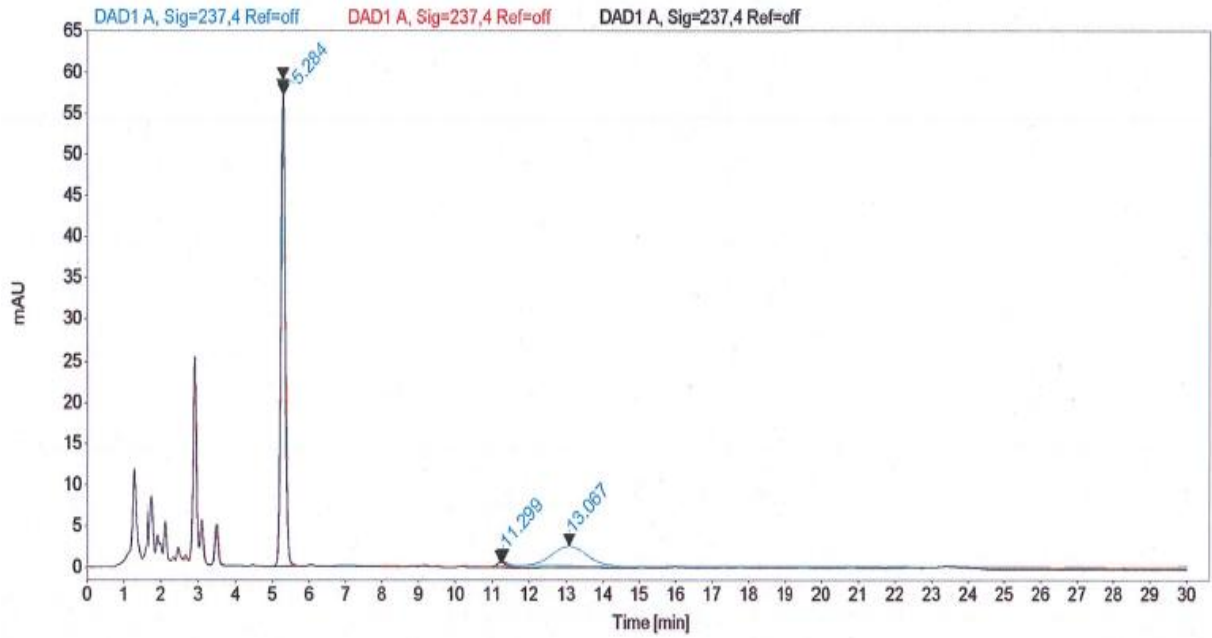
**Cromatograma No.13** Blanco de la prueba Especificidad.



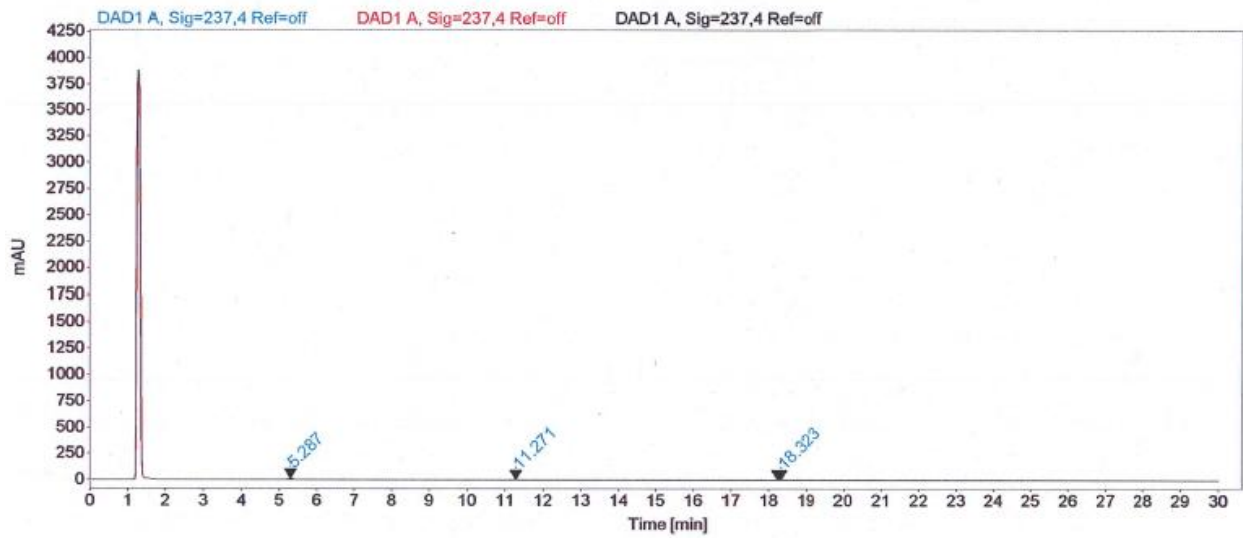
**Cromatograma No.14** Placebo sin degradar



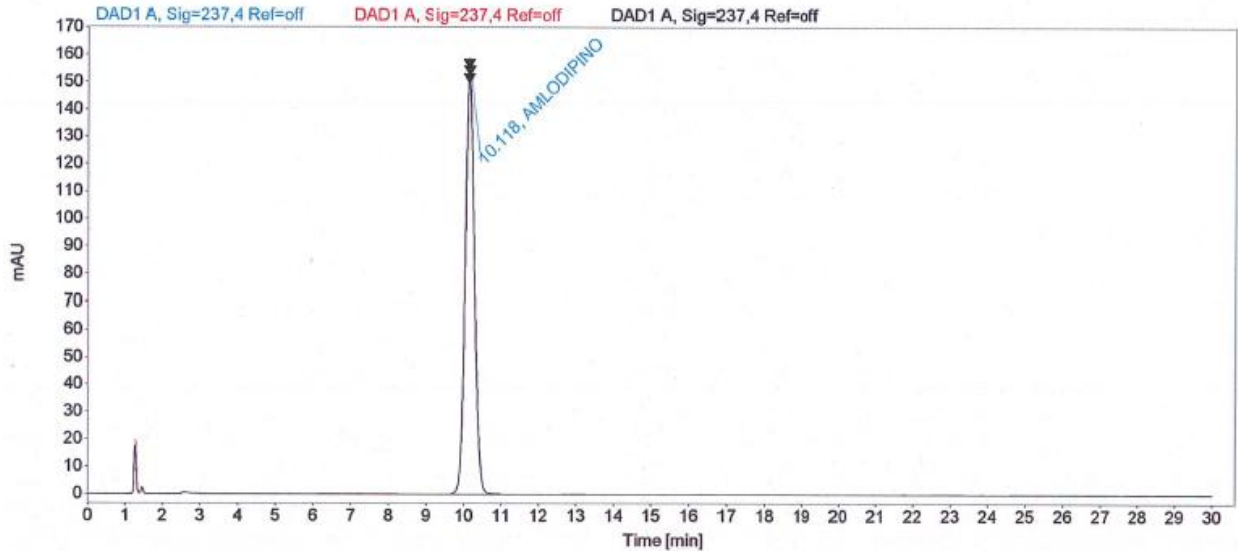
**Cromatograma No.15** Degradación ácida del placebo.



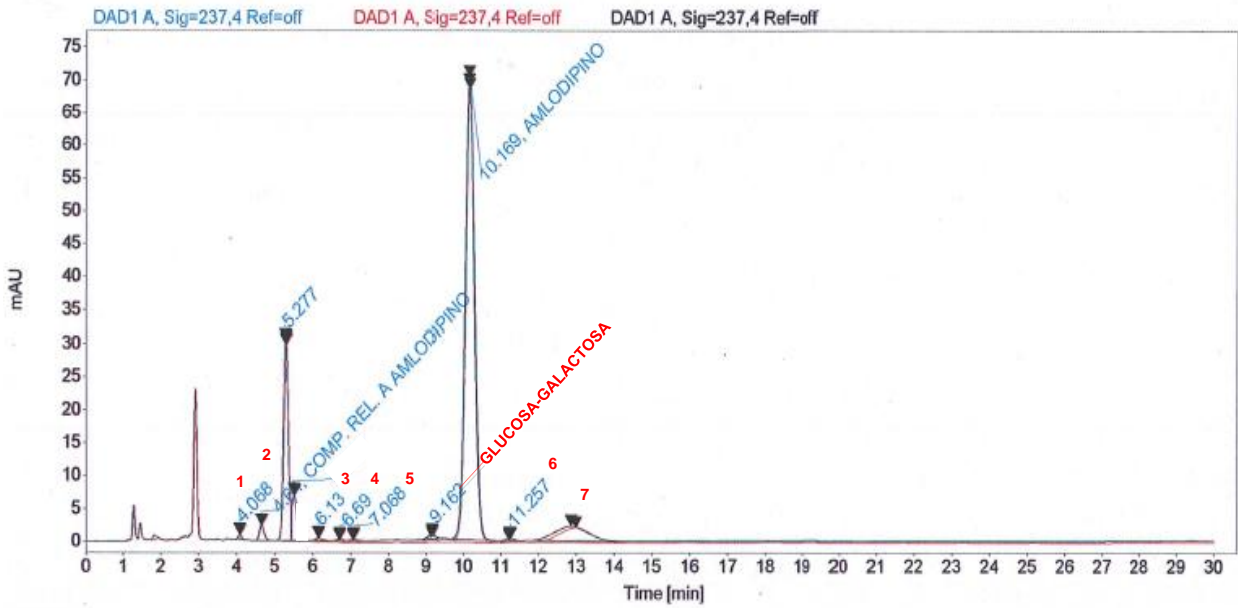
**Cromatograma No.16** Degradación básica del placebo.



**Cromatograma No.17** Degradación oxidativa del placebo.

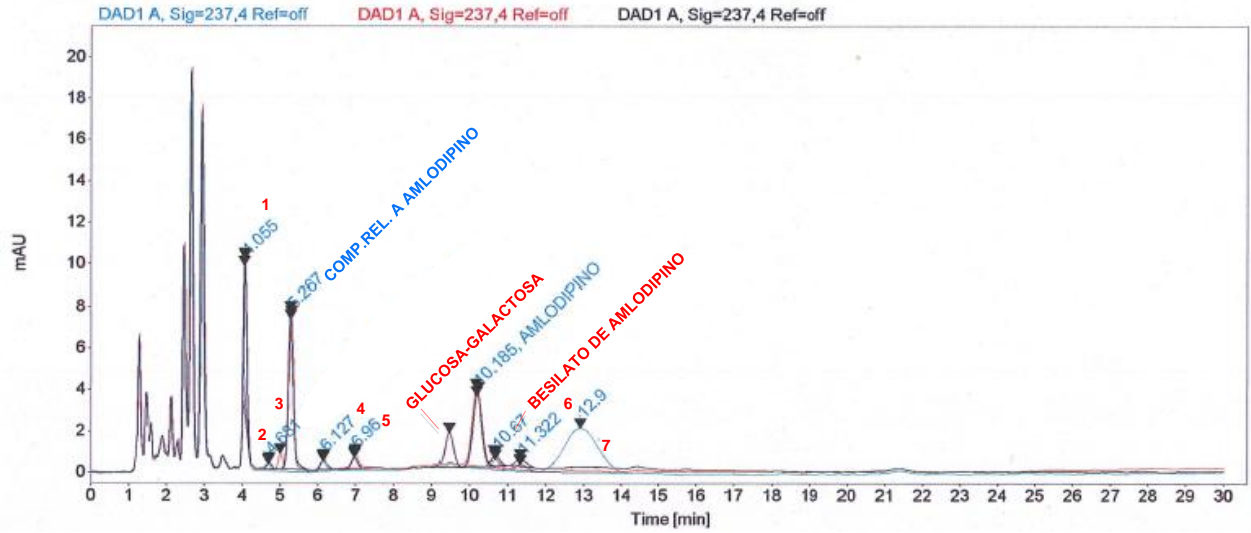


**Cromatograma No.18** Placebo adicionado sin degradar.

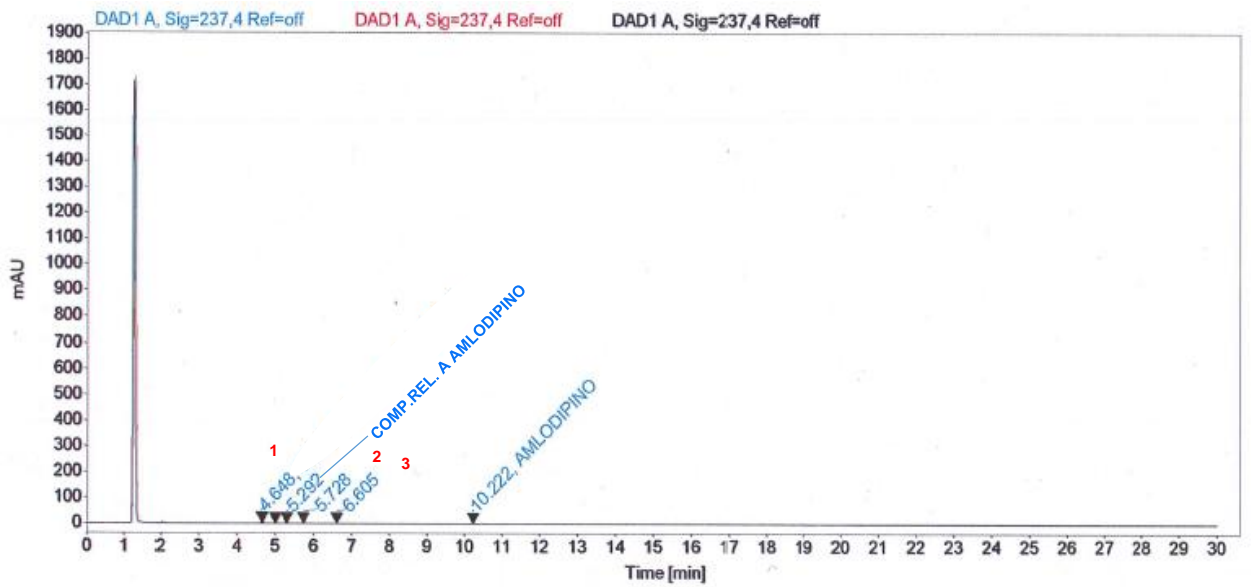


**Cromatograma No.19** Degradación ácida del placebo adicionado.





**Cromatograma No.20** Degradación básica del placebo adicionado.



**Cromatograma No.21** Degradación oxidativa del placebo adicionado

**Tabla No.22** Resultados generales

Parámetro	Criterio de Aceptación	Resultados	Conclusiones
<b>Adecuabilidad del sistema</b>	Los tiempos de retención relativos son 1.0 y 0.5 para Amlodipino y Compuesto Relacionado A de Amlodipino respectivamente.	Amlodipino TR=9.86 min.	Conforme
		Compuesto Relacionado A. Amlodipino TR=4.55 min.	
	La resolución (Rs) entre el pico de Amlodipino y Compuesto Relacionado A de Amlodipino no es menor de 8.5.	Resolución=15.5	
	El factor de coelección para los picos de Amlodipino y Compuesto Relacionado A de Amlodipino no es mayor a 2.0.	Comp. Rel.A Amlodipino=1.1	
		Amlodipino = 1.2	
La desviación estándar para inyecciones repetidas de Compuesto Relacionado A no es mayor a 5.0%.	C.V.= 0.2 %		
<b>Especificidad</b>	La respuesta del método se debe únicamente al analito.	No hay respuesta analítica interferente al tiempo de retención del pico principal.	Conforme
<b>Exactitud y Repetibilidad</b>	El Intervalo de confianza para la media IC ( $\mu$ ) debe incluir el 100.0% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo 98.0%-102.0 %	IC ( $\mu$ ) = 100.52 IC ( $\mu$ ) = 101.32 $\bar{x}$ = 100.92 % C.V.= 0.4 %	Conforme
<b>Precisión del Método</b>	El coeficiente de variación entre los resultados de ambos analistas en ambos días es menor o igual a 2.0%.	C.V.= 0.8 %	Conforme
<b>Estabilidad de la Muestra</b>	Calcular la media aritmética del análisis inicial y de cada condición de almacenaje. Calcular la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto del análisis inicial. $ d_i $	$\bar{x}$ Inicial/T.A = 99.2 %	
		$\bar{x}$ 48H/Luz = 97.6 %	$ d_i $ 48H/Luz = 1.7
		$\bar{x}$ 48H/prot. Luz = 98.8 %	$ d_i $ 48H/prot Luz = 0.4
		$\bar{x}$ 48H/Refrig. = 95.6 %	$ d_i $ 48H/Refrig. = 3.6
<b>Tolerancia</b>	Calcular la media aritmética, $ d_i $ , desviación estándar y coeficiente de variación del contenido usando las distintas columnas y equipos. La $ d_i $ debe ser menor o igual al 2.0.	$ d_i $ Entre columnas = 0.5	Conforme
		$ d_i $ Entre equipos = 0.8	

## 9. CONCLUSIONES

En base a los estudios obtenidos queda establecido que la capacidad de la complementación del método satisface los requisitos de las aplicaciones deseadas para la cuantificación de Besilato de Amlodipino tabletas de 5 mg Amlodipino tableta, por CLAR es decir el método es confiable, exacto, preciso, reproducible, y específico en cuanto a cuantificar mg recuperados y % de recobro con relación al principio activo Amlodipino, además de robusto ante cambios de columnas y equipos, cabe señalar que este método es específico exclusivamente para la cuantificación de principio activo, no para impurezas orgánicas como se mencionaba anteriormente y se necesitaría desarrollar un método específico para identificarlas y cuantificarlas, además de la justificación del parámetro de desempeño Especificidad puede ser tomado como indicativo de estabilidad en el apartado de degradación de la muestra bajo las condiciones forzadas ácido, base y oxidación.

## 10. REFERENCIAS

- Álvarez, I. Pérez, M. Sanz, M. (2015), Metodologías Biofarmacéuticas en el Desarrollo de Medicamentos, Elche, España, Universitas Pp.85-93.
- Badillo B. (2008) Tesis, Desarrollo y validación de un método analítico para Cuantificar Metoprolol en plasma mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. Pp. 3-6.
- Cohen, Yves (1998), Análisis Químicos farmacéuticos de medicamentos, Editorial Limusa, México D.F. Pp. 505-513.
- Dekker M. (1997) Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals, Inc. John A. Adamovics, Cytogen Corporation, Princeton, New Jersey USA. Pp.28-31.
- D. Real de Ansúa y C. Suárez (2013) Diferencias y similitudes entre los bloqueadores de los receptores del calcio (antagonistas del calcio). Elsevier, Doyma Madrid, España. Pp. 20-29
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (2017) 11° edición. Pp. 1642 y 1643.
- Fares Hassan, Dinicol Antonio J. James, O'Keefe H. James, Lavie J. Carl et.al. (2016), Amlodipine in hypertension: a first-line agent with efficacy for improving blood pressure and patient outcomes. Ed. Cross Mark, Department of Cardiovascular Diseases, Louisiana, EUA.
- Galicia S. (2001), Tesis Desarrollo y validación de métodos analíticos para vitaminas hidrosolubles en productos multivitamínicos por cromatografía de líquidos de alta resolución, Instituto Politécnico Nacional, México D.F. Pp.13-19.
- Garcia J.A; J.C, Díez, (2001), "Retention Parameters in Chromatography: IUPAC Recommendations 2001", Applied Chemistry. Vol. 73, No. 6, Pp.969-992.

- Guía de Validación de Métodos Analíticos. (2002), Editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México A.C. Pp. 8-11, 15-30., Recuperado el 30 agosto 2017.
- Gomis Yagües, V. (2008), Tema 2. Cromatografía: principios generales. Técnicas instrumentales en análisis instrumental (Guía Docente), Universidad de Alicante, España, departamento de Ingeniería Química. Pp.1-16.
- Harris C. Daniel (2006), Análisis químico cuantitativo, Ed. Reverte, 3ª, España Barcelona. Pp.548-640.
- International Conference Harmonization, Guideline for Industry. (2005), Q<sub>2</sub>A Text on validation of analytical procedures/Q<sub>2</sub>B validation of analytical procedures: Methodology, U.S. Department of health and human services, Food and Drug Administration (FDA), Rockville. MD, EUA.
- International Conference Harmonization, Guideline for Industry. (2006) Impurities in New drug products, Q<sub>3</sub>B (R2) validation of analytical procedures: Methodology, U.S. Department of health and human services, Food and Drug Administration (FDA), Rockville. MD, EUA.
- Kazakevich Yuri and Lobrutto Rosario et.al. (2007), HPLC PHARMACEUTICAL SCIENTISTS, Wiley-Interscience a John Wiley & Sons, Inc. Publications, EUA, Pp. 8-23.
- Lamarque, A. (2008), Fundamentos teórico-prácticos de Química Orgánica, Ed. Grupo Editor Encuentro, Córdoba, Argentina, Pp. 55-60.
- Lüllmann H. et.al. Mohr.K (2010), Farmacología Texto y Atlas, Ed. Médica Panamericana, 6ª México D.F. Pp. 124-125.
- Magnusson B. and U. Örnemark (2016), La adecuación al uso de los métodos analíticos -Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados-, Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. Guía Eurachem. 1ª Edición. España. Pp. 130-131.
- Mendoza, Nicandro. (2008), Farmacología Médica, Ed. Médica Panamericana, México D.F. Pp. 518-519.
- Moffat. Anthony C. (2011), Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, Pharmaceutical Press, 4th. Edition, EUA. Pp. 890-891.
- Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios.
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos.
- Pérez de la Cruz, Leticia (2006), Lineamientos Básicos para la Validación de los métodos analíticos de uso Farmacéutico, (Tesis de Grado Licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. Pp. 2-14.
- Porzig, H. (1990). Pharmacological Modulation of Voltage-Dependent Calcium Channels in Intact Cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 114, 209-262.

- Rampazoo P. Standardization and Validation of analytical methods in the Pharmaceutical industry. IL FÁrmaco, 1990; Pp.45:807-15.
- Recuperado el 20 Octubre (2017), Amlodipino, Pubchem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/amlodipine>
- Recuperado el 20 Octubre (2017), Amlodipino, Drugbank, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00381>
- Recuperado el 3 de Noviembre (2018), Amlodipino, Dosis Letal, [https://fagron.com/sites/default/files/document/msds\\_coa/111470-99-6\\_%28AR%29.pdf](https://fagron.com/sites/default/files/document/msds_coa/111470-99-6_%28AR%29.pdf).
- Sancho Raquel (2015), Preparación, Estudio Estructural y aplicabilidad de derivados de poli-(4R)-hidroxi-L-prolina en la separación de enantiómeros por técnicas cromatográficas y relacionadas. (Tesis de grado Doctorado), Universitat de Barcelona, España. Pp.9-10
- Sesin Jorge et.al. Tamargo Juan, (1997) Revista Medicina, Farmacocinética Clínica de los antagonistas del Calcio, Buenos Aires, Argentina. Pp. 458.
- Skoog A. Douglas (2001), Fundamentos de Química Analítica, Ed. Reverte S.A. 4ª. España. Pp. 663-690 y 709-731.
- Stout, Dorsey (2002), High Performance Liquid Chromatography in: Ohannesion. Strueter A, Handbook of Pharmaceutical Analysis. Marcel Dekker. EUA. Pp.103-143.
- Szepesi, Gabor (1990), HPLC in Pharmaceutical analysis. Vol. 1, Ed. CRC Press, USA. Pp. 1-4 y 191-193.
- United States Pharmacopeia 41-NF 36, (2017), Vol. 2, Pp. 1799, 2125-2127 y 2742-2743 Información general.
- Willard, Hobart et al. (1991), "Métodos Instrumentales de Análisis", 7a ed. Grupo Editorial Iberoamérica, México D.F. Pp.506-507.

## 10. ANEXOS

NÚMERO	CONTENIDO
1	FÓRMULAS Y PROCEDIMIENTOS DE CÁLCULO CON EJEMPLO PARA LOS % RECOBRO S <sub>Ref.</sub> DE LOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO.
2	FÓRMULAS Y PROCEDIMIENTOS DE CÁLCULO CON EJEMPLO PARA EXACTITUD Y REPETIBILIDAD.
3	FÓRMULAS Y PROCEDIMIENTOS DE CÁLCULO CON EJEMPLO PARA TOLERANCIA ENTRE COLUMNAS Y TOLERANCIA ENTRE EQUIPOS.
4	FÓRMULAS Y PROCEDIMIENTOS DE CÁLCULO CON EJEMPLO PARA ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA.
5	FÓRMULAS Y PROCEDIMIENTOS DE CÁLCULO CON EJEMPLO PARA PRECISIÓN DEL MÉTODO.
6	FÓRMULAS Y PROCEDIMIENTOS DE CÁLCULO CON EJEMPLO PARA ESPECIFICIDAD.

**ANEXO 1. FÓRMULAS Y PROCEDIMIENTOS DE CÁLCULO CON EJEMPLO PARA EL % RECOBRO DE SRef.**

$$\% D_{Exact y Rep.} = \left( \frac{C_{SRef.1}}{C_{SRef.2}} \right) \left( \frac{r_u \text{ Promedio}_{SRef.2}}{r_u \text{ Promedio}_{SRef.1}} \right) * 100$$

$$C_{SRef.1} = \frac{13.74 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} * \frac{2 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} * \frac{99.1 \text{ R.P}}{100 \text{ R.A}} * 0.721 = 0.0196 \text{ mg/mL}$$

$$C_{SRef.2} = \frac{13.77 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} * \frac{2 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} * \frac{99.1 \text{ R.P}}{100 \text{ R.A}} * 0.721 = 0.0197 \text{ mg/mL}$$

$$r_u \text{ Promedio}_{SRef.2} = 2607.0$$

$$r_u \text{ Promedio}_{SRef.1} = 2617.2$$

**Tabla No.23** % Recobro de SRef. Exactitud, Repetibilidad y Especificidad.

Exactitud y Repetibilidad			
Pesos (mg)	No. Inyección	$r_u \text{ Promedio}_{SRef.1}$	$r_u \text{ Promedio}_{SRef.2}$
SRef. 1 13.74	1	2626.938	2609.633
	4	2613.835	2599.784
	3	2604.442	2611.634
	4	2603.225	-
	5	2617.476	-
SRef. 2 13.77	6	2632.052	-
	$\bar{x}$	2617.2	2607.0
	s	10.7	6.3
	CV	0.4	0.2
% D= 98.0%-102.0 %		$\% D_{Exact y Rep.} = \left( \frac{0.0196 \text{ mg/mL}}{0.0197 \text{ mg/mL}} \right) \left( \frac{2607.0}{2617.2} \right) * 100 = 99.1 \%$	
Especificidad			
Pesos (mg)	No. Inyección	$r_u \text{ Promedio}_{SRef.1}$	$r_u \text{ Promedio}_{SRef.2}$
SRef. 1 13.82	1	2593.029	2597.856
	4	2587.245	2602.289
	3	2595.892	2599.460
	4	2596.899	-
	5	2595.328	-
SRef. 2 13.79	6	2599.968	-
	$\bar{x}$	2594.7	2599.9
	s	4.3	2.2
	CV	0.2	0.1
% D= 98.0%-102.0 %		$\% D_{Especificidad} = \left( \frac{0.0198 \text{ mg/mL}}{0.0197 \text{ mg/mL}} \right) \left( \frac{2599.9}{2594.7} \right) * 100 = 100.7 \%$	

**Tabla No.24** % Recobro de SRef. Precisión del Método Día 1, Analista 1 y 2.

Precisión del Método A1D1			
Pesos (mg)	No. Inyección	$r_u$ Promedio SRef.1	$r_u$ Promedio SRef.2
SRef. 1 13.74	1	2583.103	2603.856
	4	2583.581	2606.621
	3	2593.013	2602.752
	4	2597.310	-
	5	2596.261	-
SRef. 2 13.76	6	2592.041	-
	$\bar{x}$	2590.9	2604.4
	s	6.2	2.0
	CV	0.2	0.1
% D= 98.0%-102.0 %		$\%D_{Prec.Met A1D1} = \left( \frac{0.0196 \text{ mg/mL}}{0.0197 \text{ mg/mL}} \right) \left( \frac{2604.4}{2590.9} \right) * 100 = 100.0 \%$	
Precisión del Método A2D1			
Pesos (mg)	No. Inyección	$r_u$ Promedio SRef.1	$r_u$ Promedio SRef.2
SRef. 1 13.81	1	2583.542	2588.921
	4	2588.302	2591.553
	3	2590.632	2590.841
	4	2585.342	-
	5	2583.909	-
SRef. 2 13.80	6	2580.771	-
	$\bar{x}$	2585.4	2590.4
	s	3.5	1.4
	CV	0.1	0.1
% D= 98.0%-102.0 %		$\%D_{Prec.Met A2D1} = \left( \frac{0.0197 \text{ mg/mL}}{0.0197 \text{ mg/mL}} \right) \left( \frac{2590.4}{2585.4} \right) * 100 = 99.8\%$	



**Tabla No.25** % Recobro de SRef. Precisión del Método Día 2, Analista 1 y 2.

Precisión del Método A1D2			
Pesos (mg)	No. Inyección	$r_u$ Promedio SRef.1	$r_u$ Promedio SRef.2
SRef. 1 13.83	1	2599.172	2625.353
	4	2601.167	2630.701
	3	2614.750	2642.941
	4	2628.432	-
	5	2671.948	-
SRef. 2 13.78	6	2674.013	-
	$\bar{x}$	2631.6	2633.0
	s	33.8	9.0
	CV	1.3	0.3
% D= 98.0%-102.0 %		$\%D_{Prec.Met A1D2} = \left( \frac{0.0198 \text{ mg/mL}}{0.0197 \text{ mg/mL}} \right) \left( \frac{2633.0}{2631.6} \right) * 100 = 100.6 \%$	
Precisión del Método A2D2			
Pesos (mg)	No. Inyección	$r_u$ Promedio SRef.1	$r_u$ Promedio SRef.2
SRef. 1 13.82	1	2680.531	2640.550
	4	2661.117	2650.765
	3	2690.906	2655.349
	4	2670.642	-
	5	2618.320	-
SRef. 2 13.79	6	2650.531	-
	$\bar{x}$	2662.0	2648.9
	s	25.7	7.6
	CV	1.0	0.3
% D= 98.0%-102.0 %		$\%D_{Prec.Met A2D2} = \left( \frac{0.0198 \text{ mg/mL}}{0.0197 \text{ mg/mL}} \right) \left( \frac{2648.9}{2662.0} \right) * 100 = 100.0\%$	

**Tabla No.26** % Recobro de SRef. Tolerancia Columnas (ACE 5 y WATERS).

Tolerancia Columna (ACE 5)			
Pesos (mg)	No. Inyección	$r_u$ Promedio SRef.1	$r_u$ Promedio SRef.2
SRef. 1 13.74	1	2592.899	2615.534
	4	2597.226	2600.531
	3	2586.890	2612.532
	4	2588.890	-
	5	2591.034	-
SRef. 2 13.75	6	2591.534	-
	$\bar{x}$	2591.4	2609.5
	s	3.5	7.9
	CV	0.1	0.3
% D= 98.0%-102.0 %		$\%D_{Tol.Columnas} = \left( \frac{0.0196 \text{ mg/mL}}{0.0197 \text{ mg/mL}} \right) \left( \frac{2609.5}{2591.4} \right) * 100 = 100.2\%$	
Tolerancia Columna (WATERS)			
Pesos (mg)	No. Inyección	$r_u$ Promedio SRef.1	$r_u$ Promedio SRef.2
SRef. 1 13.74	1	2630.899	2644.322
	4	2627.631	2633.189
	3	2628.920	2640.032
	4	2633.731	-
	5	2632.712	-
SRef. 2 13.75	6	2630.167	-
	$\bar{x}$	2630.7	2639.2
	s	2.3	5.6
	CV	0.1	0.2
% D= 98.0%-102.0 %		$\%D_{Tol.Columnas} = \left( \frac{0.0196 \text{ mg/mL}}{0.0197 \text{ mg/mL}} \right) \left( \frac{2639.2}{2630.7} \right) * 100 = 99.8 \%$	

**Tabla No.27** % Recobro de SRef. Tolerancia Equipos (AGILENT y HITACHI).

Tolerancia Equipos AGILENT			
Pesos (mg)	No. Inyección	$r_u$ Promedio SRef.1	$r_u$ Promedio SRef.2
SRef. 1 13.74	1	2630.899	2644.322
	4	2627.631	2633.189
	3	2628.920	2640.032
	4	2633.731	-
	5	2632.712	-
SRef. 2 13.75	6	2630.167	-
	$\bar{x}$	2630.7	2639.2
	s	2.3	5.6
	CV	0.1	0.2
% D= 98.0%-102.0 %		$\%D_{Tol.Equipos} = \left( \frac{0.0196 \text{ mg/mL}}{0.0197 \text{ mg/mL}} \right) \left( \frac{2639.2}{2630.7} \right) * 100 = 99.8 \%$	
Tolerancia Equipos HITACHI			
Pesos (mg)	No. Inyección	$r_u$ Promedio SRef 1	$r_u$ Promedio SRef.2
SRef. 1 13.75	1	1153027.892	1149889.035
	4	1153046.178	1152176.554
	3	1143047.690	1149966.664
	4	1153023.090	-
	5	1153073.340	-
SRef. 2 13.75	6	1153056.569	-
	$\bar{x}$	1151379.1	1150677.4
	s	4081.6	1298.9
	CV	0.4	0.1
% D= 98.0%-102.0 %		$\%D_{Tol.Equipos} = \left( \frac{0.0196 \text{ mg/mL}}{0.0197 \text{ mg/mL}} \right) \left( \frac{1150677.4}{1151379.1} \right) * 100 = 99.4\%$	

**Tabla No.28** % Recobro de SRef. Estabilidad analítica de la muestra inicial y 48 horas.

Estabilidad analítica de la muestra inicial			
Pesos (mg)	No. Inyección	$r_u$ Promedio SRef.1	$r_u$ Promedio SRef.2
SRef. 1 13.79	1	2647.828	2632.899
	4	2670.219	2628.886
	3	2640.093	2629.344
	4	2657.182	-
	5	2654.621	-
SRef. 2 13.82	6	2652.052	-
	$\bar{x}$	2653.7	2630.4
	s	10.1	2.20
	CV	0.4	0.1
% D= 98.0%-102.0 %		$\%D_{Estabilidad\ inicial} = \left( \frac{0.0197\ mg/mL}{0.0198\ mg/mL} \right) \left( \frac{2630.4}{2653.7} \right) * 100$ $= 98.6\%$	
Estabilidad analítica de la muestra 48 horas			
Pesos (mg)	No. Inyección	$r_u$ Promedio SRef.1	$r_u$ Promedio SRef.2
SRef. 1 13.76	1	2618.419	2630.362
	4	2628.631	2610.425
	3	2629.620	2617.559
	4	2621.047	-
	5	2628.605	-
SRef. 2 13.75	6	2630.622	-
	$\bar{x}$	2626.2	2619.4
	s	5.1	10.1
	CV	0.2	0.4
% D= 98.0%-102.0 %		$\%D_{Estabilidad\ 48\ horas} = \left( \frac{0.0197\ mg/mL}{0.0197\ mg/mL} \right) \left( \frac{2619.4}{2626.2} \right) * 100$ $= 99.7\%$	

## ANEXO 2. FÓRMULAS Y PROCEDIMIENTOS DE CÁLCULO CON EJEMPLO PARA EXACTITUD Y REPETIBILIDAD.

### Media aritmética

$$\bar{x} = \frac{\Sigma y}{n}$$

### Desviación estándar

$$s = \sqrt{\frac{n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{n(n-1)}}$$

### Coefficiente de variación

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} * 100$$

Calcular  $\bar{x}$  y  $s$ :

$$\Sigma y = 101.01 + 100.50 + 101.01 \dots + 100.51 = 605.56$$
$$\Sigma y^2 = 100.01^2 + 100.50^2 + 101.01^2 \dots + 100.51^2 = 10186.1461$$

$$n = 6$$
$$\bar{x} = \frac{605.56}{6} = 100.92$$

$$s = \sqrt{\frac{6(10186.1461) - (605.56)^2}{6(6-1)}} = 0.38$$

$$CV = \frac{0.38}{100.92} * 100 = 0.38$$

### ANEXO 3. FÓRMULAS Y PROCEDIMIENTOS DE CÁLCULO CON EJEMPLO PARA TOLERANCIA.

#### TOLERANCIA EQUIPO-AGILENT / COLUMNA- WATERS

Calcular  $\bar{x}$ ,  $s$  y  $CV$ :

$$\Sigma_y = 99.49 + 100.00 + 100.50 = 300.00$$
$$\Sigma_{y^2} = 99.49^2 + 100.00^2 + 100.50^2 = 10000.0000$$

$$n = 3$$
$$\bar{x} = \frac{300.00}{3} = 100.00$$

$$s = \sqrt{\frac{3(10000.0000) - (100.00)^2}{3(3 - 1)}} = 0.41$$

$$CV = \frac{0.41}{100.00} * 100 = 0.41$$

#### TOLERANCIA COLUMNA- ACE 5

Calcular  $\bar{x}$ ,  $s$  y  $CV$ :

$$\Sigma_y = 99.49 + 99.50 + 99.50 = 298.49$$
$$\Sigma_{y^2} = 98.38^2 + 98.57^2 + 98.47^2 = 9899.9153$$

$$n = 3$$
$$\bar{x} = \frac{298.49}{3} = 99.50$$

$$s = \sqrt{\frac{3(9899.9153) - (298.49)^2}{3(3 - 1)}} = 0.001$$

$$CV = \frac{0.001}{99.50} * 100 = 0.001$$

#### TOLERANCIA EQUIPO-HITACHI

Calcular  $\bar{x}$ ,  $s$  y  $CV$ :

$$\Sigma_y = 99.49 + 98.99 + 98.99 = 297.48$$
$$\Sigma_{y^2} = 99.49^2 + 98.99^2 + 98.99^2 = 9382.4284$$

$$n = 3$$
$$\bar{x} = \frac{297.48}{3} = 99.16$$

$$s = \sqrt{\frac{3(9382.4284) - (99.16)^2}{3(3 - 1)}} = 0.24$$

$$CV = \frac{0.24}{99.16} * 100 = 0.24$$

- Fórmulas para determinar mg  $C_a$ ,  $C_r$ , % *recobro*, mg adicionados, recuperados.

### EQUIPO-HITACHI

#### Concentración adicionada

$$C_a = \frac{W_{mtra\ adcionada}}{V_{inicial}} * \frac{V_{aliquota}}{V_{final}} * 721 * P$$

$$C_a = \frac{6.961\ mg\ B.\ Amlodipino}{25\ mL} * \frac{1\ mL}{10\ mL} * 0.721 * \frac{99.1\ R.P}{100\ R.A} = 0.0199\ \frac{mg}{mL}\ Amlodipino$$

#### Concentración recuperada

$$C_r = \frac{r_u}{r_s} * C_s$$

$$C_r = \frac{1156151.275}{1151379.1} * \frac{13.74\ mg\ B.\ Amlodipino}{100\ mL} * \frac{2\ mL}{10\ mL} * \frac{99.1\ R.P}{100\ R.A} * 0.721$$

$$= 0.0197\ \frac{mg}{mL}\ Amlodipino$$

#### %recobro

$$\% \text{ recobro} = \frac{C_r}{C_a} * 100$$

$$\% \text{ recobro} = \frac{0.0197\ \frac{mg}{mL}\ Amlodipino}{0.0199\ \frac{mg}{mL}\ Amlodipino} * 100 = 98.99\ \%$$

#### mg recuperados estimados

$$mg\ recup.\ estim. = \frac{C_r * \text{Factor de Dilución (250 mL)}}{0.721}$$

$$mg\ recup.\ estim. = \frac{0.0197\ \frac{mg}{mL}\ Amlodipino * 250\ mL}{0.721} = 6.831\ mg\ B.\ Amlodipino$$

#### mg adicionados reales

$$6.961\ mg\ B.\ Amlodipino * 0.721 = 5.019\ mg\ Amlodipino$$

### mg recuperados reales

$$6.831 \text{ mg B. Amlo} * 0.721 = 4.925 \text{ mg Amlodipino}$$

### COLUMNA-ACE 5

#### Concentración adicionada

$$C_a = \frac{W_{mtra\ adcionada}}{V_{inicial}} * \frac{V_{aliquota}}{V_{final}} * 721 * P$$

$$C_a = \frac{6.956 \text{ mg B. Amlodipino}}{25 \text{ mL}} * \frac{1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} * 0.721 * \frac{99.1 \text{ R. P}}{100 \text{ R. A}} = 0.0199 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \text{ Amlodipino}$$

#### Concentración recuperada

$$C_r = \frac{r_u}{r_s} * C_s$$

$$\begin{aligned} C_r &= \frac{3064.213}{3045.793} * \frac{13.74 \text{ mg B. Amlodipino}}{100 \text{ mL}} * \frac{2 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} * \frac{99.1 \text{ R. P}}{100 \text{ R. A}} * 0.721 \\ &= 0.0198 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \text{ Amlodipino} \end{aligned}$$

#### %recobro

$$\% \text{ recobro} = \frac{C_r}{C_a} * 100$$

$$\% \text{ recobro} = \frac{0.0198 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \text{ Amlodipino}}{0.0199 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \text{ Amlodipino}} * 100 = 99.50 \%$$

#### mg recuperados estimados

$$\text{mg recup. estim.} = \frac{C_r * \text{Factor de Dilución (250 mL)}}{0.721}$$

$$\text{mg recup. estim.} = \frac{0.0198 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \text{ Amlodipino} * 250 \text{ mL}}{0.721} = 6.865 \text{ mg B. Amlo}$$

#### mg adicionados reales

$$6.956 \text{ mg B. Amlo} * 0.721 = 5.019 \text{ mg Amlodipino}$$

#### mg recuperados reales

$$6.865 \text{ mg B. Amlo} * 0.721 = 4.949 \text{ mg Amlodipino}$$



## ANEXO 4. FÓRMULAS Y PROCEDIMIENTOS DE CÁLCULO CON EJEMPLO PARA ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

### Media aritmética

$$\bar{x} = \frac{\Sigma y}{n}$$

### Desviación estándar

$$s = \sqrt{\frac{n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{n(n-1)}}$$

### Coefficiente de variación

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} * 100$$

### mg / tableta Amlodipino

$$mg/tab \text{ Amlodipino} = \frac{r_u}{r_s} * \frac{W_{SRef}}{5 \text{ tabletas}} * P * 0.721 * FD$$

### % Amlodipino

$$\% \text{ Amlodipino} = \frac{mg/tab \text{ Amlodipino}}{5} * 100$$

### Condición 1 (y<sup>1</sup>)

$$\begin{aligned} \frac{mg}{tab} \text{ Amlodipino} &= \left( \frac{2638.274}{2626.2} \right) * \left( \frac{13.76 \text{ mg}}{5 \text{ tabletas}} \right) * \frac{99.91 \text{ R.P}}{100 \text{ R.A}} * 0.721 * 2.5 \\ &= 4.939 \frac{mg}{tab} \end{aligned}$$

$$\% \text{ Amlodipino} = \frac{4.939 \frac{mg}{tab}}{5} * 100 = 98.77 \%$$

### Condición 2 (y<sup>2</sup>)

$$\begin{aligned} \frac{mg}{tab} \text{ Amlodipino} &= \left( \frac{2612.570}{2626.2} \right) * \left( \frac{13.76 \text{ mg}}{5 \text{ tabletas}} \right) * \frac{99.91 \text{ R.P}}{100 \text{ R.A}} * 0.721 * 2.5 \\ &= 4.890 \frac{mg}{tab} \end{aligned}$$

$$\% \text{ Amlodipino} = \frac{4.890 \frac{mg}{tab}}{5} * 100 = 97.81\%$$

### Condición 3 (y<sup>3</sup>)

$$\begin{aligned} \frac{mg}{tab} \text{ Amlodipino} &= \left( \frac{2558.456}{2626.2} \right) * \left( \frac{13.76 \text{ mg}}{5 \text{ tabletas}} \right) * \frac{99.91 \text{ R.P}}{100 \text{ R.A}} * 0.721 * 2.5 \\ &= 4.789 \frac{mg}{tab} \end{aligned}$$

$$\% \text{ Amlodipino} = \frac{4.789 \frac{mg}{tab}}{5} * 100 = 95.78 \%$$

## ANEXO 5. FÓRMULAS Y PROCEDIMIENTOS DE CÁLCULO CON EJEMPLO PARA PRECISIÓN DEL MÉTODO.

mg / tableta Amlodipino

$$mg/tab \text{ Amlodipino} = \frac{r_u}{r_s} * \frac{W_{SRef}}{5 \text{ tabletas}} * P * 0.721 * FD$$

% Amlodipino

$$\% \text{ Amlodipino} = \frac{mg/tab \text{ Amlodipino}}{5} * 100$$

**Analista 1 Día 1 –muestra 1**

$$\begin{aligned} \frac{mg}{tab} \text{ Amlodipino} &= \left( \frac{2597.688}{2590.9} \right) * \left( \frac{13.74 \text{ mg}}{5 \text{ tabletas}} \right) * \frac{99.91R.P}{100R.A} * 0.721 * 2.5 \\ &= 4.922 \frac{mg}{tab} \end{aligned}$$

$$\% \text{ Amlodipino} = \frac{4.92 \frac{mg}{tab}}{5} * 100 = 98.43 \%$$

**Analista 2 Día 1-muestra 1**

$$\begin{aligned} \frac{mg}{tab} \text{ Amlodipino} &= \left( \frac{2584.595}{2585.4} \right) * \left( \frac{13.81 \text{ mg}}{5 \text{ tabletas}} \right) * \frac{99.91R.P}{100R.A} * 0.721 * 2.5 \\ &= 4.932 \frac{mg}{tab} \end{aligned}$$

$$\% \text{ Amlodipino} = \frac{4.93 \frac{mg}{tab}}{5} * 100 = 98.64 \%$$

**Analista 1 Día 2-muestra 1**

$$\begin{aligned} \frac{mg}{tab} \text{ Amlodipino} &= \left( \frac{2689.012}{2631.6} \right) * \left( \frac{13.83 \text{ mg}}{5 \text{ tabletas}} \right) * \frac{99.91R.P}{100R.A} * 0.721 * 2.5 \\ &= 5.049 \frac{mg}{tab} \end{aligned}$$

$$\% \text{ Amlodipino} = \frac{5.05 \frac{mg}{tab}}{5} * 100 = 100.97 \%$$

**Analista 2 Día 2-muestra 1**

$$\begin{aligned} \frac{mg}{tab} \text{ Amlodipino} &= \left( \frac{2662.008}{2693.0} \right) * \left( \frac{13.82 \text{ mg}}{5 \text{ tabletas}} \right) * \frac{99.91 R.P}{100 R.A} * 0.721 * 2.5 \\ &= 4.995 \frac{mg}{tab} \end{aligned}$$

$$\% \text{ Amlodipino} = \frac{4.99 \frac{mg}{tab}}{5} * 100 = 99.90 \%$$

## ANEXO 6. FÓRMULAS Y PROCEDIMIENTOS DE CÁLCULO CON EJEMPLO PARA ESPECIFICIDAD DEL % IMPUREZAS.

### Impurezas no específicas

$$\% \text{ Impurezas no especificadas} = \left( \frac{r_u}{r_s} \right) * \left( \frac{C_s}{C_u} \right) * 100$$

### Degradación ácida- impureza No.2 y 3.

$$\% \text{ Impurezas no especificadas No. 2} = \left( \frac{1.036}{2594.7} \right) * \left( \frac{0.0198 \frac{mg}{mL}}{0.0199 \frac{mg}{mL}} \right) * 100 = 0.040 \%$$

$$\% \text{ Impurezas no especificadas No. 3} = \left( \frac{4.931}{2594.7} \right) * \left( \frac{0.0198 \frac{mg}{mL}}{0.0199 \frac{mg}{mL}} \right) * 100 = 0.189 \%$$

### Degradación básica- impureza No.4 y 5.

$$\% \text{ Impurezas no especificadas No. 4} = \left( \frac{5.588}{2594.7} \right) * \left( \frac{0.0198 \frac{mg}{mL}}{0.0199 \frac{mg}{mL}} \right) * 100 = 0.214 \%$$

$$\% \text{ Impurezas no especificadas No. 5} = \left( \frac{7.515}{2594.7} \right) * \left( \frac{0.0198 \frac{mg}{mL}}{0.0199 \frac{mg}{mL}} \right) * 100 = 0.288 \%$$

### Degradación oxidativa- impureza No.1 y 2.

$$\% \text{ Impurezas no especificadas No. 1} = \left( \frac{4.055}{2594.7} \right) * \left( \frac{0.0198 \frac{mg}{mL}}{0.0199 \frac{mg}{mL}} \right) * 100 = 0.337 \%$$

$$\% \text{ Impurezas no especificadas No. 2} = \left( \frac{2.634}{2594.7} \right) * \left( \frac{0.0198 \frac{mg}{mL}}{0.0199 \frac{mg}{mL}} \right) * 100 = 0.101 \%$$