

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS Fundada en 1551
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE FARMACOTECNIA Y ADMINISTRACIÓN FARMACÉUTICA

Desarrollo y validación prospectiva de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para el Enalapril 10 mg tabletas recubiertas

TESIS para optar el Título Profesional de: QUÍMICO FARMACÉUTICO
AUTOR

CÉSAR MORALES DE LA CRUZ

ASESOR ES Mg. NORMA CARLOS; Dra. ANA AYRAS; Mg. GUSTAVO BRAVO
LIMA – PERÚ 2004

A Jehová Dios, por darnos la vida, guiar nuestro camino y estar en todo momento conmigo .

A mis padres Florentino e Isabel, por su ejemplo de lucha, honestidad y amor incondicional

A mis hermanos: Luis, Juan, Javier, Sonia por su apoyo y cariño de siempre.

A Diana, la mujer que ilumina mi camino y es mi fuente de inspiración

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por la formación profesional recibida.

A mis padres y hermanos quienes me apoyaron en todo momento.

A mis asesores: Mg. Norma Carlo, Dra. Ana Ayras y Mg. Gustavo Bravo, por las enseñanzas recibidas y por la colaboración para la realización del presente trabajo.

A los señores miembros del jurado : Dr. Felix Enrique Saavedra Nizama, Dra. Gladys Constanza Arias Arrollo, Mg. Delia Yolanda Whu Whu y Q.F. Juan Roberto Perez Leon Camborda.

A todos los profesores de la Facultad, quienes me impartieron conocimientos que son el soporte de mi desarrollo profesional.

A Laboratorios CIPA S.A. por ser la casa donde desarrollé el presente trabajo, a la Dra. Lily Tapia por el apoyo y las facilidades brindadas para la culminación del presente.

A las doctoras Edelmira Félix Hermitaño, y a todos los colegas de la empresa por los consejos y direcciones impartidas.

INDICE GENERAL

- I. INTRODUCCION
- II. GENERALIDADES
 - 2.1 Sistema de calidad
 - 2.2 Calidad en la industria farmacéutica
 - 2.3 Concepto de calidad
 - 2.4 Garantía de calidad
 - 2.4.1 Buenas practicas de manufactura
 - 2.4.2 Buenas practicas de laboratorio
 - 2.4.3 Control de calidad
 - 2.5 Validación de métodos analíticos
 - 2.5.1 Concepto
 - 2.5.2 Tipos de Validación
 - 2.5.2.1 Validación prospectiva
 - 2.5.2.2 Validación retrospectiva
 - 2.5.2.3 Revalidación
 - 2.5.3 Porque validar
 - 2.5.4 Parámetros de Validación de métodos analíticos
 - 2.5.4.1 Selectividad
 - 2.5.4.2 Linealidad
 - 2.5.4.3 Precisión
 - 2.5.4.4 Exactitud
 - 2.5.4.5 Rango
 - 2.5.4.6 Limite de Detección
 - 2.5.4.7 Limite de Cuantificación
 - 2.5.4.8 Fortaleza
 - 2.5.4.9 Robustez
 - 2.5.5 Criterios de Validación a estudiar en función del tipo de método analítico
 - 2.6 Calificación del Instrumental
 - 2.6.1 Calificación del HPLC

- 2.6.1.1 Calificación de Instalación (IQ)
 - 2.6.1.2 Calificación Operacional (OQ)
 - 2.6.1.3 Calificación de Performance (PQ)
 - 2.6.2 Calibración de Equipos
 - 2.6.3 Verificación de Equipos
- 2.7 Enalapril Maleato
 - 2.7.1 Propiedades físicas y químicas
 - 2.7.2 Propiedades Farmacológicas

- III. PARTE EXPERIMENTAL
- IV. RESULTADOS
- V. DISCUSION
- VI. CONCLUSIONES
- VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

RESUMEN

La validación de un método analítico, constituye un instrumento importante para garantizar la calidad del medicamento,

En el presente trabajo se demostró la aplicabilidad del método analítico propuesto por la USP 26, aun introduciendo cambios significativos, para el análisis del Enalapril Maleato por cromatografía líquida de alta Performance (HPLC) en el Perú, el cual seguidamente se validò. Con el cual se establece una evidencia documentada de que el método analítico es capaz de cumplir en forma consistente y repetitiva las especificaciones establecidas.

Se presentan los resultados obtenidos en la validación del método analítico por cromatografía líquida de alta performance (HPLC). Previo al inicio de la validación, se realizò un ensayo de adaptabilidad del sistema, con el cual se comprobó el buen funcionamiento del sistema de bombeo, inyector, horno y detector.

El método fue validado, siguiendo una metodología de trabajo elaborado previamente en un protocolo de validación, donde se analizaron diferentes parámetros como son:

Selectividad, Linealidad, Precisión, Exactitud, Rango y la adecuación del sistema.

Definidas las condiciones, se inicia los análisis para la evaluación de los parámetros de validación y se demuestra mediante el diseño experimental y los procedimientos estadísticos empleados, que el método analítico propuesto es selectivo, porque no se evidencian que los productos de degradación interfieran en el análisis del principio activo, además se obtiene un porcentaje de pureza de pico del 100%; es lineal porque se obtiene un coeficiente de correlación $r = 0,99987$; es precisa ya que para la repetibilidad se obtiene una RSD de 0,64%; y para la reproducibilidad se obtiene una RSD de 0,88%; y finalmente es exacto porque se obtiene un porcentaje de recuperación de 99,88%.

Cumpliendo los parámetros de validación establecidos en las obras oficiales, se comprobó de esta forma la validez del método analítico.

Palabras claves: Validación, Cromatografía, Enalapril maleato.

SUMMARY

The validation of an analytic method, constitutes an important instrument to guarantee the quality of the medication,

Presently work was demonstrated the applicability of the analytic method proposed by the USP 26, even introducing significant changes, for the analysis of the Enalapril Maleato for cromatografía líquidas de high Performance (HPLC) in the Peru, the one which subsequently you been worth. With which settles down a documented evidence that the analytic method is able to complete in consistent and repetitive form the established specifications.

The results are presented obtained in the validation of the analytic method by cromatografía it líquidas de high performance (HPLC). Previous to the beginning of the validation, one carries out a rehearsal of adaptability of the system, with which was proven the good operation of the system of pumping, injector, oven and detecting.

The method was validated, following a work methodology elaborated previously in a validation protocol, where different parameters were analyzed like they are: Selectivity, Linealidad, Precision, Accuracy, Range and the adaptation of the system.

Defined the conditions the analyses begin for the evaluation of the validation parameters and it is demonstrated by means of the experimental design and the procedures statistical employees that the Selective proposed analytic method because they are not evidenced that the degradation products interfere in the analysis of the active principle, a percentage of purity of pick of 100% is also obtained; it is lineal because one obtains a correlation coefficient $r = 0,99987$; it is he/she specifies since for the repetibilidad a RSD of 0,64% it is obtained; and for the reproducibilidad a RSD of 0,88% is obtained; and finally it is exact because one obtains a percentage of recovery of 99,88%.

Completing the established validation parameters in the official works, he/she was proven this way the validity of the analytic method.

Key words: Validation, Cromatografía, Enalapril maleato.

I. INTRODUCCION

La validación garantiza la calidad del medicamento, puesto que le confiere fiabilidad a los resultados obtenidos en el análisis, asegurando así, que el medicamento cumpla los parámetros de calidad establecidos.

La industria farmacéutica consciente de su alta responsabilidad, actúa siempre buscando mejorar la calidad del medicamento a lo largo del proceso que lo crea. El objetivo es uno y es importante conseguirlo plenamente, esto es, el medicamento seguro, estable y eficaz, y la validación constituye un instrumento importante a este respecto.

Por otra parte los métodos analíticos deben validarse para cumplir con las exigencias contempladas en la Dirección general de medicamentos insumos y drogas (Digemid) en el artículo 176° del Manual de Buenas Practicas de Manufactura de productos farmacéuticos, así como también en la USP 26 y las exigencias legales contempladas en el procedimiento de productos farmacéuticos de la Comunidad económica europea en sus apartados 2E y 2F. (1)

En el presente trabajo, se ha diseñado y validado un método de análisis por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para el enalapril 10 mg tabletas recubiertas, el cual garantizará que los resultados que se obtendrán son confiables. Dicha validación se ha realizado analizando los parametros de **Selectividad, Linealidad, Precisión, Exactitud, y Rango**. Esta validación ha sido realizado en el Laboratorio CIPA, en el departamento de control de calidad en los meses de Julio a Octubre del 2003.

El Enalapril Maleato es un principio activo de mucha demanda en los Hospitales, motivo por el cual se produce en grandes cantidades y se hace necesaria Validar el método de análisis para obtener resultados confiables.

Así mismo este trabajo aportara un protocolo de validación, el cual servirá como formato para futuras validaciones de métodos analíticos.

El enalaprilato es farmacológicamente el metabolito activo del enalapril, y es ampliamente usado como inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).

La determinación del enalapril, se ha realizado por espectrofotometría y polarigrafía, usando 2,4 dinitrofluorbenzeno. La reacción del enalapril maleato con 2,4 dinitrofluorbenzeno ha sido usado para formar un producto coloreado y polarigráficamente activo. Este método ha sido validado y aplicado para la determinación en tabletas comerciales. El resultado ha sido estadísticamente comparado con aquellos obtenidos usando un método oficial por HPLC.

El enalapril ha sido ensayado espectrofotométricamente por extracción con par iónico, potenciométricamente y HPLC, estos procedimientos fueron desarrollados en tabletas. En fluidos biológicos, el enalapril ha sido cuantificado por un ensayo radio enzimático. (21)

Procedimientos espectrofotométricos y espectrofotometría de absorción atómica, han sido desarrollados para la determinación del enalapril maleato. El procedimiento espectrofotométrico es basado en la formación de un complejo ternario (Cobre (II) eosina y enalapril). Los procedimientos descritos, tienen una buena precisión y exactitud por lo cual es muy aplicado en la determinación del enalapril. (22)

II. GENERALIDADES.

2.1 SISTEMA DE CALIDAD

El sistema de calidad son las actividades del laboratorio dirigidas a la producción de un trabajo de precisión y productos de alta calidad.

Un laboratorio de análisis debe tener como uno de sus propósitos principales la producción de datos analíticos de alta calidad por medio del uso de mediciones analíticas que sean precisas, confiables y adecuadas para tal fin. Este propósito puede alcanzarse de una manera eficaz si se cuenta con un sistema planificado y documentado de la calidad de las actividades.

Para alcanzar este nivel de distinción (que el laboratorio lo necesita para poder acreditarse y así obtener contratos de análisis) el laboratorio necesitara operar bajo un sistema de garantía de calidad que incluya una extensa documentación de sus actividades. (2)

GESTIÓN DE LA CALIDAD :

Es un sistema de medios para generar económicamente productos y servicios que satisfagan los requerimientos del cliente. La implementación de este sistema necesita de la cooperación de todo el personal de la organización, desde el nivel gerencial hasta el operativo e involucrando a todas las áreas.

Los 14 puntos de Deming

- 1.- Crear constancia en el propósito para la mejora de productos y servicios.
- 2.- Adoptar una nueva filosofía.
- 3.- Dejar de confiar en la inspección masiva.
- 4.- Poner fin a la práctica de conceder negocios con base en el precio únicamente.
- 5.- Mejorar constantemente y por siempre el sistema de producción y servicios.
- 6.- Instituir la capacitación.
- 7.- Instituir el liderazgo.
- 8.- Eliminar el temor.
- 9.- Derribar las barreras que hay entre las reas.
- 10.- Eliminar lemas, las exhortaciones y las metas de producción para la fuerza laboral.

- 11.- Eliminar las cuotas numéricas.
- 12.- Remover las barreras que impiden el orgullo por un trabajo bien hecho.
- 13.- Instituir un programa vigoroso de educación y capacitación.
- 14.- Tomar medidas para llevar a cabo la transformación.

¿QUE ENTENDEMOS POR CALIDAD?

Calidad, es hacer las cosas tal y como deben hacerse, es decir, producir de acuerdo con las especificaciones que se han determinado en el diseño.

Calidad es hacer el mejor producto, con los mejores componentes, materias primas, controles, etc., esto es, buscar el producto final con mayor vabr posible (ej: Rolls Royce en automóviles, Rolex en relojes, etc.).

Calidad es hacer lo que quiere el cliente, es decir Satisfacer las necesidades del cliente, satisfacer sus expectativas y sobrepasarlas.

¿POR QUÉ ES IMPORTANTE LA CALIDAD?

Las reglas de la economía siguen siendo las mismas desde los tiempos de Adam Smith y al final lo que importa es la rentabilidad. Y, en este aspecto, la calidad es importante porque al final nos llevará a obtener una mayor rentabilidad.

Pero ¿Cómo llegamos a la rentabilidad a través de la calidad? Con sensibles mejoras en la productividad y por ende en la competitividad mediante:

Reducciones de costes. Al final resulta mucho más barato hacer las cosas bien a la primera que ir destinando recursos a corregir los defectos.

La reputación e imagen tiene unas repercusiones directas con: las ventas a consumidores finales, las negociaciones con clientes, con subcontratistas, y con proveedores. Tanto desde el punto de vista positivo como el negativo.

Problemas legales derivados de la fiabilidad. Cada vez es más frecuente encontrarse con demandas legales (que prosperan) reclamando responsabilidades producidas por defectos en los productos o servicios.

Porque uno de los efectos de la globalización y del derrumbe de fronteras comerciales es el incremento de competencia, y todos los expertos vaticinan parafraseando a Darwin, “La especie superior y más fuerte devorará a la pequeña e indefensa en el curso de la evolución”, la especie superior suele ser la que tiene un certificado ISO, pero no se conforma únicamente con ello, sino que aplica los conceptos derivados de la calidad total (entre otras cosas). (18)

2.2 CALIDAD EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA

La industria farmacéutica, al igual que en otras industrias, esta sometida a las reglas del mercado, que impone una exigencia de calidad, sin las cuales un determinado producto no sería utilizado por los consumidores.

El consumidor es especialmente sensible a los productos farmacéuticos y los Laboratorios fabricantes cuidan mucho la calidad de estos, ya que cualquier deficiencia puede originar problemas sanitarios, en ocasiones graves, que pueden provocar la inmediata retirada del producto incluso el cierre del laboratorio fabricante. (2)

2.3 CONCEPTO DE CALIDAD

De acuerdo con el diccionario de la Real Academia de la Lengua Española, la calidad se puede definir como: “el conjunto de atributos o cualidades que constituyen la manera de ser de una cosa”, lo cual quiere decir que la calidad esta determinada por las características de un producto con el objetivo de satisfacer una necesidad o un deseo del consumidor.

En la práctica la calidad es un concepto relativo, ligado al binomio producto-consumidor, en este sentido la calidad es el “grado de satisfacción que ofrece las características del producto en relación con las exigencias del consumidor.”

En consecuencia se puede afirmar que la calidad no es una opinión subjetiva, sino una propiedad que posee todo producto, y si se quiere opinar sobre calidad, han de definirse sus características con parámetros cualitativos y cuantitativos. (2), (3)

Calidad según **Juran** tiene múltiples significados. Dos de esos significados son críticos, no solo para planificar la calidad sino también para planificar la calidad sino también para planificar la estrategia empresarial.

Calidad: Se refiere a la ausencia de deficiencias que adopta la forma de: Retraso en la entregas, fallos durante los servicios, facturas incorrectas, cancelación de contratos de ventas, etc.

Calidad es " adecuación al uso".

La Misión de Juran y la Planificación para la Calidad

Crear la conciencia de la crisis de la calidad, el papel de la planificación de la calidad en esa crisis y la necesidad de revisar el enfoque de la planificación de la calidad.

Establecer un nuevo enfoque de la planificación de la calidad.

Suministrar formación sobre como planificar la calidad, utilizando el nuevo enfoque.

Asistir al personal de la empresa para replanificar aquellos procesos insistentes que poseen deficiencias de calidad inaceptables (caminar por toda la empresa). Asistir al personal de la empresa para dominar el proceso de planificación de la calidad, dominio derivado de la replanificación de los procesos existentes y de la formación correspondiente.

Asistir al personal de la empresa para utilizar el dominio resultante en la planificación de la calidad de forma que se evite la creación de problemas crónicos nuevos.

La Espiral del Progreso de la Calidad

Una forma conveniente de mostrar algunos de los muchos usos y usuarios es por medio de la "espiral de progreso de la calidad". Nos referimos a ella simplemente como "la espiral".

"La espiral muestra una secuencia típica de actividades para poner un producto en el mercado. En las grandes empresas departamentalizamos esas actividades. Como resultado cada departamento realiza un proceso operativo, produce un producto y suministra dicho producto a otros departamentos receptores pueden ser considerados "clientes" que reciben los productos procedentes de los departamentos proveedores. La tabla de mas abajo muestra algunas de las relaciones evidentes en "la espiral":

Proveedor	Producto (Bienes y Servicios)	Cliente
Cliente	Información sobre las necesidades	Desarrollo del producto
Desarrollo del producto	Diseños del producto	Operaciones
Operaciones	Bienes, servicios	Marketing
Marketing	Bienes, servicios	Clientes

Observe que algunos de los clientes son "internos", esto es miembros de la misma compañía que los proveedores. Otros clientes son externos.

"La Espiral" es una versión altamente simplificada de lo que ocurre en una gran empresa.(19)

ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE NORMALIZACION (ISO)

En actualidad a nivel mundial las normas ISO 9000 y ISO 14000 son requeridas, debido a que garantizan la calidad de un producto mediante la implementación de controles exhaustivos, asegurándose de que todos los procesos que han intervenido en su fabricación operan dentro de las características previstas. La normalización es el punto de partida en la estrategia de la calidad, así como para la posterior certificación de la empresa.

Estas normas fueron escritas con el espíritu de que la calidad de un producto no nace de controles eficientes, si no de un proceso productivo y de soportes que operan adecuadamente. De esta forma es una norma que se aplica a la empresa y no a los productos de esta. Su implementación asegura al cliente que la calidad del producto que él esta comprando se mantendrá en el tiempo. En la medida que existan empresas que no hayan sido certificadas constituye la norma una diferenciación en el mercado. Sin embargo con el tiempo se transformará en algo habitual y se comenzará la discriminación hacia empresas no certificadas. Esto ya ocurre hoy en países desarrollados en donde los departamentos de abastecimiento de grandes corporaciones exigen la norma a todos sus proveedores. (20)

2.4 GARANTÍA DE CALIDAD “garantizar la calidad”

Se puede definir como “la suma total de actividades organizadas, que se adoptan con el objetivo de garantizar que los productos farmacéuticos, posean la calidad requerida para el uso al que están destinados.” Este sistema sustituye al concepto antiguo que suponía que la calidad era competencia únicamente del servicio de control de calidad del Laboratorio Farmacéutico. El objetivo del sistema de Garantía de Calidad es conseguir que todo salga bien desde el principio, con la ayuda de todo el personal del Laboratorio que participa en las distintas fases de consecución de un producto Farmacéutico. (3)

La Garantía de calidad solo se consigue si se cumple exactamente las **Buenas Prácticas de Manufactura**. El sistema de garantía de Calidad adecuado para la fabricación de medicamentos debe asegurar que:

- a. Los productos estén diseñados y elaborados de tal manera que se tenga en cuenta los requisitos de las BPM y otros códigos relacionados, tales como las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y la buena práctica clínica (BPC), incluyendo el diseño y el desarrollo del producto.
- b. Las operaciones de producción y control estén claramente especificadas por escrito, y que se adapten a los requisitos de las BPM.
- c. Las responsabilidades administrativas estén claramente especificadas en las descripciones de trabajo.
- d. Se tomen las medidas necesarias para la fabricación, suministro y uso de materias primas y materiales de empaque adecuados.
- e. Se efectúen todos los controles necesarios de las materias primas, productos intermedios, productos a granel y otros controles, calibraciones y controles durante el proceso.
- f. El producto terminado sea procesado y controlado correctamente y de acuerdo con los procedimientos definidos.
- g. Los productos Farmacéuticos no sean vendidos ni suministrados antes de que las personas autorizadas hubieren certificado que cada lote de producción ha sido fabricado y controlado en concordancia con los requisitos establecidos en la normativa sobre otorgamiento del Registro Sanitario u otra regulación relativa a la producción, control y liberación de los productos Farmacéuticos .
- h. Se hubieren tomado medidas adecuadas para asegurar, en todo lo posible que los productos Farmacéuticos sean almacenados, distribuidos y manejados de tal forma que la calidad se mantenga durante todo el periodo de validez de dichos productos.
Y
- i. Se establezca un procedimiento de auto inspección y/o de auditoria de calidad, que permita evaluar regularmente la eficacia y aplicabilidad del sistema de garantía de calidad.(4)

2.4.1 BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA

Son en general, un conjunto de normas que cada laboratorio farmacéutico debe poner en práctica con el fin de asegurar la calidad de los productos que fabrique, debiendo para ello tomar todas las medidas oportunas para garantizar que los medicamentos posean la calidad necesaria según el uso al que se destine.

Este conjunto de medidas es muy amplio, abarcando las normas que deben afectar al: personal, locales, maquinarias, instalaciones, materias primas, producto terminado, fabricación, control de calidad, documentación y expedición de las especialidades.

Dicha normativa establece que todas las operaciones, proceso, métodos o técnicas, deben estar reguladas o escritas y deben ser cumplidas y supervisadas (5)

2.4.2 BUENAS PRACTICAS DE LABORATORIO

Las organizaciones públicas son responsables de proteger a los ciudadanos de materiales peligrosos. Para ello se necesitan datos analíticos de confianza y un seguimiento de todo el proceso, para poder juzgar sobre la seguridad de un producto. Las Buenas prácticas de laboratorio nacen de esta necesidad.

Las BPL están relacionados con la organización, proceso y condiciones bajo las que se planifican, realizan, controlan, registran e informan los estudios de los laboratorios. Las BPL pretenden promocionar la calidad y validez de los datos de análisis. Es decir si el trabajo experimental se dirige cumpliendo las BPL, debería ser posible para un inspector en un futuro, observar los registros del trabajo y determinar fácilmente, porqué, cómo y por quién se realizó el trabajo, quién llevaba el control, que equipamiento se utilizó, los resultados obtenidos, qué problemas aparecieron y cómo fueron resueltos.

Las BPL sirven para asegurar la validez de los estudios.

Las legislaciones nacionales, tienen la responsabilidad de establecer la seguridad y eficacia de los fármacos, así como de exigir a los fabricantes la seguridad de los alimentos y sus aditivos (6), (5)

2.4.3 CONTROL DE CALIDAD

Son actividades planeadas y diseñadas para proporcionar un producto de calidad.

Control de calidad, forma parte de las Buenas prácticas de manufactura, en el cual se encuentran involucrados: las especificaciones, el muestreo y los análisis, así como también los procedimientos de organización, documentación y autorización que

aseguren que se lleven a cabo todas las pruebas pertinentes, autorizando el uso de materiales y la expedición de productos para venta, solo si se ha establecido que la calidad de dicho producto es satisfactorio.

Control de Calidad, no se limita a las operaciones de laboratorio, sino que debe estar involucrado en todas las decisiones vinculadas con la calidad del producto. Se considera fundamental que control de calidad sea independiente del área de producción. (3) (7)

EL CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad nace a finales de los años 20 de la mano de Walter Shewart, físico de Bell

Laboratorios, y sus gráficos de control tuvieron una especial relevancia en los años 50 y 60 (en algunos sectores incluso hoy en día). El proceso de control sería el siguiente:

1. Determinar que parámetro debe ser medido, y establecer su grado de “peligrosidad”.
2. Establecer los límites superior e inferior entre los que puede variar el valor del parámetro para que un producto siga siendo aceptable.
3. Determinar el punto de control o lugar donde se recogen los datos.
4. Analizar los datos y determinar cuando un proceso esta fuera de control.
5. buscar las causas directas del fallo y corregirlas
6. comprobar que el proceso esta bajo control.

Incorporar la calidad

Se trata de asegurar que un proceso determinado realizará productos o servicios de acuerdo con los requerimientos de calidad. El cambio radical pasa de detectar los defectuosos a no producirlos. Se trata de hacer las cosas bien a la primera.

El factor característico es la recopilación y elaboración de documentos que plasmen “por escrito” todas las actividades y operaciones que deben realizarse para que un producto o servicio sea “perfecto”. Estos documentos constituyen el Manual de Calidad.

La principal ventaja de incorporar la calidad al producto y al proceso es que los defectos se detectan antes de que lleguen a producirse por lo que se garantiza una producción libre de defectos. (los defectos pasan de ser contados como partes por mil a partes por millón). Otras ventajas no menos importantes son la disminución directa de costes al eliminar los controles de calidad y hacer fluir la idea de “hacer las cosas bien a la primera” dentro del área directamente involucrada con la fabricación.

Calidad Total

La etapa final y a la que hemos querido llegar desde el principio es, hasta ahora, la última evolución del concepto de calidad total y se correspondería con la revisión “significativa” de las normas ISO 9000 realizada en el 2000.

Una vez conseguido lo anterior se puede continuar la mejora (y recibir los correspondientes

beneficios) si se implica de lleno toda la organización, no solamente las áreas más ligadas a la fabricación. La calidad debe fluir libremente por toda la organización.

Así pues en este punto acumulamos los beneficios anteriores y los supeditamos al objetivo final de lograr la satisfacción del cliente. Esto es:

no se producen unidades defectuosas,

se hace todo bien a la primera (ahora no solo los productos),

se ha eliminado todo aquello que no añade valor al producto,

se implementan sistemas de mejora continua potentes como el Kaizen o 6σ

se realizan productos/servicios diferentes para cada cliente o grupos de clientes

(personalización)

Sistemas de ayuda al desarrollo rápido de nuevos productos adecuados desde su diseño a las necesidades del cliente, incluso anticipándose, de acuerdo con las capacidades de la empresa (QFD, AMFE, Técnicas de Taguchi, etc.), esto es, hacer muy bien lo que realmente se sabe hacer.

EFQM plantea un modelo para conseguir la Excelencia Empresarial basado en evaluar una serie de factores

Otros premios de especial relevancia fuera del contexto europeo son el norteamericano

Premio

Malcom Baldrige y los Premios Deming en Japón. (18)

2.5 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

2.5.1 CONCEPTO DE VALIDACIÓN

Existen numerosas definiciones de Validación que expresan la misma idea. “Validar es comprobar y certificar, con evidencia convenientemente documentada, que un método, sistema o proceso, cumple y se desarrolla tal y como estaba previsto, dentro de intervalos definidos”. (1)

2.5.2 TIPOS DE VALIDACIÓN

2.5.2.1 Validación Prospectiva

Se realiza cuando la Verificación del cumplimiento de las condiciones establecidas para un proceso o método analítico, se llevan a cabo antes de la comercialización del producto. Este tipo de validación se aplica cuando se elabora un nuevo método analítico. Es típico en los laboratorios de investigación y desarrollo, y se realiza de acuerdo con un protocolo

perfectamente planificado. Comprende el estudio de todos los criterios necesarios para demostrar el buen funcionamiento del método.

2.5.2.2 Validación Retrospectiva

Se realiza cuando la idoneidad del proceso o método analítico, se basa en la garantía constatada a través de los datos analíticos del producto ya comercializado. Se aplica a métodos no validados previamente y de los que se tiene una amplia historia de resultados.

Este tipo de validación se aplica para métodos por: cromatografía líquida, Métodos espectrofotométricos y métodos volumétricos. (1)

2.5.2.3 Revalidación

La introducción de un cambio que pueda afectar la idoneidad del método analítico establecido por la validación, podrá exigir una nueva validación, es decir una revalidación total o parcial de dicho método analítico. Los criterios a estudiar se deciden en función del tipo de cambio efectuado.

Entre los motivos que exigen una nueva validación tenemos:

- Cambios importantes en la matriz del producto.
- Cambios importantes en el método analítico.
- Cambios en las especificaciones. (1),(6)

2.5.3 ¿POR QUÈ VALIDAR?

La Validación de un método analítico, garantiza la calidad del medicamento, así mismo es necesaria porque:

- ✓ Proporciona un alta grado de confianza, seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados.

- ✓ Permite un conocimiento profundo del método, así como de sus características de funcionamiento. Este conocimiento y seguridad en el método analítico que han sido validado, se traduce en: Disminución en el número de fallas y repeticiones, con el consiguiente ahorro de los costos asociados, y consecuentemente cumplir con los plazos previstos de análisis.

2.5.4 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

Las características de desempeño del método analítico se expresa en función de los siguientes parámetros analíticos: (8)

2.5.4.1 Selectividad

La selectividad, es la capacidad del método para evaluar únicamente el principio activo integro de forma exacta y específico, en presencia de los componentes que puedan esperar estar presentes, como por ejemplo: impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz

2.5.4.2 Linealidad

La linealidad de un método analítico es su capacidad para demostrar que los resultados de la prueba son directamente proporcionales (o se convierten en directamente proporcionales mediante una transformación matemática bien definida) a la concentración del analito dentro de un rango dado

2.5.4.3 Precisión

La precisión de un método analítico, es el grado de concordancia de los resultados de la prueba, cuando el método se aplica repetidamente a múltiples tomas de una muestra homogénea.

La precisión puede ser medida, ya sea por el grado de reproducibilidad o de repetibilidad del método analítico, bajo condiciones operativas normales. En este contexto definimos:

Reproducibilidad.- Se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios.

Precisión intermedia.- Expresa la variación dentro de un mismo laboratorio, en diferentes días, o con diferentes analistas o equipos.

2.5.4.4 Exactitud

La exactitud de un método analítico, es la proximidad entre los resultados obtenidos por ese método y el valor real.

La exactitud de un método analítico debe establecerse a lo largo de todo un rango.

2.5.4.5 Rango

El rango de un método analítico, es el intervalo entre los niveles superior e inferior(incluyendo estos valores), en el que se ha demostrado un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad del método tal cual esta escrito.

2.5.4.6 Limite de detección.

El límite de detección es una característica de las pruebas de límite. Es la cantidad mas baja de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, bajo las condiciones experimentales establecidas. De esta manera, las pruebas de limite solamente fundamenta que la cantidad del analito esta por encima o por debajo de un nivel de seguridad.

2.5.4.7 Limite de cuantificación

El límite de cuantificación es una característica de las valoraciones cuantitativas de compuestos que se encuentran en baja concentración en la matriz de una muestra, como por ejemplo impurezas en materias primas y productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Es la cantidad menor de analito que puede determinarse con precisión y exactitud aceptable en una muestra, bajo las condiciones experimentales establecidas.

2.5.4.8 Fortaleza

La fortaleza de un método analítico es el grado de reproducibilidad para obtener resultados en el análisis de una misma muestra bajo condiciones variadas, tales como diferente laboratorios, diferentes analistas, diferente instrumento, diferentes lotes, diferentes reactivos, diferentes tiempos de análisis, diferente temperatura, diferentes días, etc. La Fortaleza es normalmente expresada como la falta o carencia de influencia de las variables ambientales u operacionales en los resultados del método analítico. La Fortaleza es una medida de la REPRODUCIBILIDAD de los resultados obtenidos variando las condiciones normales de análisis de laboratorio en laboratorio o de analista en analista.

2.5.4.9 Robustez

La robustez de un método analítico es la medida de su capacidad para permanecer inafectado por pequeñas variaciones deliberadas en el método y provee un indicio de su veracidad durante su uso normal.

2.5.5 CRITERIOS DE VALIDACIÓN A ESTUDIAR EN FUNCIÓN DEL TIPO DE MÉTODO ANALÍTICO.

El procedimiento de los ensayos varía de acuerdo a las determinaciones que se quieren evaluar. Considerando esta variedad para los ensayos, es lógico que diferentes métodos requieran diferentes esquemas de validación. Este capítulo abarca sólo las más comunes:

TIPO I.

Métodos analíticos para cuantificar el componente activo o componentes mayores del producto farmacéutico terminado (incluyendo conservadores)

TIPO II.

Métodos analíticos para la determinación de impurezas en un bulk de sustancias o componentes de degradación en producto terminado. Aquí se determina valores límites para el control de impurezas.

Pueden ser pruebas cuantitativas o una prueba cualitativa para determinar si la impureza está presente en la muestra por encima o por debajo de un valor límite especificado. Cualquiera de los dos pretende reflejar las características de pureza de la muestra.

TIPO III

Método analítico para determinar las características de desempeño del producto terminado (por ejemplo: Disolución, Liberación del principio activo)

TIPO IV

Prueba de identificación. Se realiza para asegurar la identidad de un analito en una muestra comparando con un estándar de referencia.

En la tabla I se observa que los ensayos para cada categoría requieren diferentes tipos de análisis:

Los ensayos y resultados generales ya están establecidos (por ejemplo: Titulación, determinación de agua, LAL) y deber ser revalidados para verificar su exactitud (y

ausencia de posibles interferencias) cuando son usados para un producto nuevo o materia prima.

La validez de un método analítico puede ser verificada solamente por estudios de laboratorio. Por lo tanto, la documentación completa de tal estudio es un requerimiento básico para determinar si un método es adecuado para aplicar su determinación. La documentación apropiada debe acompañarse de alguna propuesta para nuevos procedimientos o revisión de procedimientos analíticos. (8) (9).

TABLA 2.1 PARAMETROS DE DESEMPEÑO DE LOS PROCEDIMIENTOS ANALITICOS VALIDABLES.

PARAMETROS DE DESEMPEÑO ANALITICO	ENSAYO TIPO I	ENSAYO TIPO II	ENSAYO TIPO III		ENSAYO TIPO IV
			CUANTITATIVAS	PRUEBAS LIMITES (IMPUREZAS)	
1. EXACTITUD	SI	SI	*	*	NO
2. PRECISION	SI	SI	NO	SI	NO
3. SELECTIVIDAD	SI	SI	SI	*	SI
4. LIMITE DE DETECCIÓN	NO	NO	SI	*	NO
5. LIMITE DE CUANTIFICACION	NO	SI	NO	*	NO
6. LINEALIDAD	SI	SI	NO	*	NO
7. RANGO	SI	SI	*	*	NO

(*) Puede requerir, dependiendo de la naturaleza del ensayo

2.6 CALIFICACION DEL INSTRUMENTAL

La calificación es una premisa necesaria para poder validar. Es la comprobación formal, sistemática y documentada de que el equipo es el más adecuado para los fines previstos.

Para llevar a cabo la misma se procede a la calibración del equipo y a la comprobación de métodos y sistemas.

La validación del equipo HPLC es en esencia la verificación del rendimiento del instrumento elegido para una técnica analítica en particular, así como el software y el hardware que lo controla.

La calificación del equipo se describe a continuación: (6)

2.6.1 CALIFICACIÓN DEL HPLC

Los parámetros a evaluar en un sistema HPLC se encuentran detallados en la tabla II.

2.6.1.1 CALIFICACION DE INSTALACION (IQ)

Es la verificación documentada de que todos los aspectos claves de la instalación están de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y corresponden a las especificaciones aprobadas en el diseño. Las cuales pueden ser:

- nombre del equipo.
- Nombre del fabricante, modelo o tipo.
- Número de serie.
- Fecha en la que fue recibido
- Condiciones en las que fue recibido (nuevo o usado)
- Aspectos verificados para su aceptación de recepción
- Fecha en la que el equipo fue puesto en servicio por el laboratorio.
- Localización del equipo en el laboratorio.
- Instructivo de operación
- Instructivo de mantenimiento.

2.6.1.2 CALIFICACION OPERACIONAL (OQ)

Es la verificación de que los equipos funcionan en la forma esperada y son capaces de operar satisfactoriamente, sobre todo en el rango de los parámetros operacionales para los que han sido diseñados. Es realizado por un técnico calificado.

Tabla 2.2. Parámetros a evaluar en un Sistema HPLC

Módulo	Parámetro	Importante para:
Bomba	Reproducibilidad de flujo	Reproducibilidad /TR/A/H
	Precisión de gradiente	Transferencia del método
Inyector	Reproducibilidad	Precisión de resultados
	Residuo de muestra	Exactitud de precisión de resultados
Horno	Reproducibilidad de T°	TR/A/H/forma de pico
Detector	Ruido	Sensibilidad
	Energía de lámpara	Sensibilidad
	Relación señal/ruido	Sensibilidad
	Precisión de longitud de onda	Sensibilidad, Transferencia de datos
	Linealidad	Precisión de resultados
Columna mas sistema completo	Forma de pico	Proceso de datos, identifi., reproduc.
	Asimetría de pico	Proceso de datos, identifi., reproduc
	TR, Resolución, platos	Proceso de datos, identifi., reproduc
	teóricos	

2.6.1.3 CALIFICACION DE PERFORMACE (PQ)

Se realiza para demostrar la efectividad y reproducibilidad del proceso, bajo condiciones normales de operación, y bajo condiciones límites de operación. Es **verificado por el usuario**, trabajando con estándares certificado: por ejemplo metilparabeno.

2.6.2 CALIBRACION DE EQUIPOS.

Los instrumentos de medida deben aportar datos fiables. la calibración de los instrumentos de control se establece frente a estándares oficiales o de carácter privado de solvencia reconocida. Los datos de calibración deben reflejar la precisión y exactitud del aparato de medida, incluyendo además los factores de corrección adecuados.

2.6.3 VERIFICACION O COMPROBACION DE EQUIPOS.

Es el examen a un instrumento para verificar el cumplimiento de sus especificaciones.

Por ejemplo para un equipo HPLC puede ser:

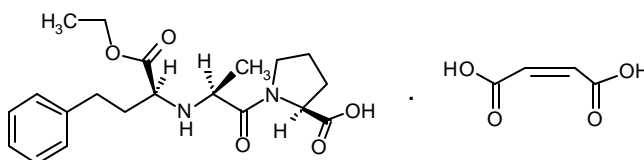
- Ruido en la línea base del detector.
- Precisión en la inyección (automático)
- Reproducibilidad del tiempo de retención de una bomba. etc

2.7 ENALAPRIL MALEATO

2.7.1 Propiedades físicas y químicas

Formula molecular: $C_{20}H_{28}N_2O_5 \cdot C_4H_4O_4$

Formula Estructural:



Denominación química: L-Prolina, 1-[N-[1-(etoxicarbonil)-3-fenilpropil]-L-alanil]-, (S)-, (Z)-2-butenedioato (1:1).

Peso molecular: 492,52 g/mol

Punto de fusión: 143° - 144,5° C

Descripción: Polvo cristalino blanco. Funde a 144° C.

Solubilidad: Prácticamente insoluble en solventes orgánicos no polares, ligeramente soluble en solventes orgánicos semipolares, parcialmente soluble en agua, soluble en etanol, libremente soluble en metanol y dimetilformamida.

2.7.2 Propiedades Farmacológicas

El Enalapril Maleato, es un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina indicada en el tratamiento de hipertensión e insuficiencia cardiaca congestiva (ICC). El enalapril no es un profármaco altamente activo y, como tal, debe sufrir hidrólisis por esterasas del hígado para producir el ácido dicarboxílico original activo, enalaprilato.

Este último es un inhibidor muy potente de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).

El enalapril reduce la conversión de angiotensina I en angiotensina II aumenta secundariamente la concentración de renina plasmática y reduce la de aldosterona, también disminuye la resistencia arterial periférica. En la ICC disminuye la poscarga, la presión capilar pulmonar en cuña, la precarga y la resistencia vascular pulmonar, mejora el gasto cardíaco y la tolerancia al ejercicio.

El Enalapril se absorbe con rapidez por vía oral y tiene biodisponibilidad oral alrededor de 60% (que no se reduce por los alimentos). Si bien las concentraciones plasmáticas máximas ocurren antes de una hora las cifras de enalaprilato no alcanzan un máximo sino hasta las tres o cuatro horas. El Enalaprilato posee una vida media plasmática de 1,3 hora; no obstante, debido al enlace estrecho con la ECA, tiene vida media plasmática de unas 11 horas. Casi todo el fármaco se elimina por los riñones ya sea como enalapril intacto o como enalaprilato.

La dosificación oral del enalapril varía de 2.5 a 40 mg/d (dosificación única o dividida) 2,5 y 5mg/d son apropiados en el inicio del tratamiento contra la ICC e hipertensión, respectivamente. (13), (14).

III. PARTE EXPERIMENTAL

PROTOCOLO DE VALIDACION

3.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS:

Materiales:

- Pipetas Volumétricas de 5, 10, 15 y 20 mL
- Probetas de 1 000 mL
- Vasos de precipitación
- Matraz de 250 y 1 000 mL
- Membranas filtrantes de hydrophilic polyethersulfone(0,20umx 25 mm)
- Filtros para jeringas: ACRODISC
- Jeringas descartables
- Viales de 2 mL
- Columna cromatografica

Reactivos:

- Fosfato de Sodio monobásico anhidro.
- Agua calidad HPLC
- Ácido fosforico al 85 % p/v
- Acetonitrilo grado HPLC LiChrosolv

Equipos: Los Equipos utilizados en la presente validación han sido calibrados y verificados, y se detalla a continuación:

a. Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC)

Marca : LaChrom Merck Hitachi

Equipado con los siguientes módulos:

a.1 Detector de Arreglos de Diodos (DAD)

Modelo L-7455; Serie 1110-036

a.2 Horno (Colum Oven)

Modelo L-7350; Serie 86307

a.3 Inyector automático (Programmable Autosampler)

Modelo L-7250; Serie 1125-028

a.4 Bomba Cuaternaria (Intelligent Pump)

Modelo L-7100; Serie 1157-084

a.5 Interface

Modelo D-7000; Serie 1125-001

a.6 Desgasificador de solventes

Modelo L-7612; Serie 911-11

b. Balanza Analítica:

Marca : Mettler toledo

Modelo : AB-204

Serie N° : 1115151168

c. Ultrasonido:

Marca : Branson

Modelo : 5210

Serie N° : No indica

d. Bomba de Vacío:

Marca : Gelman Little Glant

Modelo : 13156

Serie N° : 5KH35KN530HT

e. Purificador de Agua:

Marca : Millipore.

Modelo : Milli-Qplus.

Serie N° : F5HM96172F

3.2 METODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA PERFORMANCE

3.2.1 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.

- Equipo	: Cromatógrafo líquido de Alta Resolución
- Columna	: LiChroCART 250-4 LiChrospher RP-8 (5µm) con guardacolumna
- Sistema	: Isocrático
- Longitud de onda	: 215 nm
- Temperatura	: 50° C
- Flujo	: 2 mL/min
- Volumen de inyección	: 20 µl
- Tiempo de retención	: aprox. 6,3 enalapril maleato
- Tiempo total de corrida	: 14 minutos
- Método de cálculo	: Estándar externo

3.2.2 PREPARACION DE LA FASE MOVIL.

Buffer pH 2,2.

Pesar exactamente 1,38 de Fosfato de sodio monobásico anhidro y disolver con 800 mL de agua HPLC, ajustar el valor de pH 2,2 con ácido fosforico 85 %. Diluir con agua HPLC cantidad suficiente para 1 litro y mezclar.

Fase Móvil.

Utilizar una mezcla filtrada y desgasificada de:

Buffer pH 2,2: Acetonitrilo

70: 30

3.2.3 PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO.

A. PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR

Transferir cerca de 20 mg de Enalapril maleato estándar, exactamente pesado a una fiola de 100 mL. Añadir 50 mL de agua HPLC para disolver, someter al ultrasonido por 10 minutos. Mezclar y llevar a volumen con agua HPLC.(Estándar al 100%, concentración aprox. 0,2 mg/mL).

Medir en fiola de 25 mL, 20 mL de la solución del estándar al 100% mezclar y llevar a volumen con agua HPLC.(Estándar al 80%, concentración aprox. 0,16 mg/mL).

B. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Pesar por separado 20 tabletas y determinar el peso promedio, moler hasta polvo fino y pesar por duplicado el equivalente a 20 mg de Enalapril maleato (aprox. 290 mg de molienda) y trasvasarlo a una fiola de 100 mL, adicionar 50 mL de agua HPLC y llevarlo al ultrasonido por 30 minutos y luego agitarlo mecánicamente por 30 minutos. Enrasar con agua HPLC y homogenizar, filtrar a través de membrana 0,2 μ m de porosidad e inyectar por duplicado. (concentración aprox. 0,2 mg/mL)

3.2.4 CALCULOS Y RESULTADOS.

Al ingresar las variables de cálculo al método, se obtienen los resultados directamente por generación del programa. Se inyectan por duplicado tanto el estándar como la muestra para determinar el promedio.

3.3 . ENSAYO DE ADAPTABILIDAD DEL SISTEMA

Previo a la Validación del método analítico, se realiza un ensayo de adaptabilidad del sistema, el cual consiste en preparar una solución de adaptabilidad del sistema, según 3.3.2.

La adaptabilidad del sistema cromatográfico, se realizó inyectando sucesivamente hasta diez veces la solución de adaptabilidad del sistema.

Mediante la determinación de los siguientes parámetros cromatográficos:

- Números de platos teóricos (N).
- Factor de cola (T)
- Resolución (R)
- Desviación estándar relativa (DSR).

se comprobó el funcionamiento de: El sistema de bombeo, inyector, horno y detector.

3.3.1 MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA PERFORMANCE.

Las condiciones cromatograficas y la preparación de la fase móvil es según 3.2.1 y 3.2.2 respectivamente.

3.3.2 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO

A. SOLUCION ESTANDAR DE ENALAPRILATO.

Disolver exactamente alrededor de 10 mg de enalaprilato Estándar USP en fiola de 25 mL y enrasar con agua HPLC.

B. SOLUCION DE DICETOPIPERAZINA DE ENALAPRIL

Cuidadosamente colocar 20 mg de Enalapril Maleato USP en Beaker de 100 mL. Colocar el Beaker sobre una plancha a la mitad de la temperatura máxima de la plancha necesaria para fundir la muestra. Cuando se funda (cerca de 5 a 10 minutos de calentamiento), retirar inmediatamente de la plancha y dejar enfriar (evitar el sobrecalentamiento para evitar degradación por calor). Dejar enfriar el residuo a temperatura ambiente, y añadir 50 mL de acetonitrilo y sonicar pocos minutos hasta disolver el residuo. La solución contiene entre 0,2 y 0,4 mg de Dicetopiperazina de enalapril.

C. SOLUCION ESTANDAR.

Transferir cerca de 20 mg de Enalapril maleato estándar USP, exactamente pesado a una fiola de 100 mL. Añadir 50 mL de agua HPLC para disolver, usando ultrasonido si fuese necesario. Añadir 0,5 mL de solución estándar de enalaprilato, mezclar y llevar a volumen con agua HPLC.

Concentración:

- Enalapril maleato estándar : 0,2 mg/mL
- Enalaprilato USP RS : 0,002 mg/mL

D. SOLUCION PARA LA ADAPTABILIDAD DEL SISTEMA

Transferir 0,5 mL de solución de Dicotopiperazina de Enalapril a un a fiola de 25 mL, diluir con la solución estándar al 100 % a volumen y mezclar.

3.3.3 PROCEDIMIENTO.

Inyectar sucesivamente hasta diez veces la solución de adaptabilidad del sistema. Los resultados se obtendrán directamente por generación del programa.

3.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

De acuerdo a los criterios mencionados en el punto 2.5.5, para el presente trabajo le corresponde el TIPO I, es decir se analizaran los siguientes parámetros :

- Selectividad
- Linealidad.
- Precisión.
- Exactitud.
- Rango.

3.4.1 MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA PERFORMANCE.

Todas las determinaciones se realizaron utilizando las condiciones cromatograficas y la fase móvil descritas en 3.2.1 y 3.2.2 respectivamente.

3.4.2 DESARROLLO DE LOS PARAMETROS DE VALIDACIÓN

3.4.2.1 ENSAYO DE SELECTIVIDAD.

Este parámetro permite determinar, si el método es capaz de detectar únicamente el principio activo en una matriz determinada.

PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR AL 100%

Estándar Secundario:

Enalapril Maleato;

Potencia Tal Cual: 99,95 %

Factor: 1,001

Lote: 5111-02-034-B

MP 1557-03

Pesar exactamente 20,02 mg en fiola de 100 mL disolver y enrasar con agua HPLC (0,2 mg/mL). Filtrar por membrana 0,20 um e Inyectar por duplicado.

A. PREPARACION DE LOS PLACEBOS.

Preparación del placebo de excipientes

Preparar una cantidad para aproximadamente 200 tabletas, siguiendo las instrucciones de fabricación, el cual se obtiene mezclando todos los excipientes de la formulación excluyendo el principio activo. Las proporciones son las mismas que en la formula de elaboración del producto.

Preparación del placebo de excipientes sin laca amarilla

Preparar una cantidad para aproximadamente 200 tabletas, siguiendo las instrucciones de fabricación, el cual se obtiene mezclando todos los excipientes de la formulación excluyendo el principio activo y la laca amarilla. Las proporciones son las mismas que en la fórmula de elaboración del producto.

Preparación de la muestra, Placebo al 100 %

Preparar una cantidad para aproximadamente 200 tabletas, siguiendo las instrucciones de fabricación, el cual se obtiene mezclando todos los excipientes de la formulación. Las proporciones serán calculadas para obtener un placebo al 100 %.

B. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Pesar por duplicado exactamente 290 mg de cada uno de los placebos en fiola de 100 mL disolver y enrasar con agua HPLC (concentración:0,2 mg/mL).

Filtrar a través de membrana 0,2 um e inyectar cada uno de estas preparaciones por duplicado.

3.4.2.2 ENSAYO DE LINEALIDAD.

Sirve para determinar, la proporcionalidad entre la concentración del principio activo y su respuesta, demostrando la capacidad del método para obtener resultados lineales. Primero se determinara la Linealidad del sistema, en el cual solo se trabaja con estándares, por lo tanto lo único que se esta validando es el sistema (la bomba, el detector, etc). Seguidamente se determinara la Linealidad del método, en el cual

se trabaja con estándares y con la matriz del producto, y se determina como influye la matriz en el proceso de extracción de la muestra.

A. LINEALIDAD DEL SISTEMA

Preparar cinco soluciones estándares en concentraciones crecientes a partir de una misma solución patrón (**solución madre**), el intervalo de concentración está comprendido entre 50% y 150 % de la concentración final de trabajo.

Enalapril Maleato;

Potencia Tal Cual: 99,30 %

Factor: 1,007

Lote: 5111-02-093-B Número de análisis: MP 1321-02

A.1 SOLUCION MADRE N° 1

En fioles de 100 mL pesar exactamente 201,4 mg de Enalapril Maleato, disolver y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 2 mg/mL.

Estándar al 50 %:

Medir 5 mL de la solución madre N° 1 en fiola de 100 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,1 mg/mL.

Estándar al 75 %:

Medir 15 mL de la solución madre N° 1 en fiola de 200 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,15 mg/mL.

Estándar al 100 %:

Medir 10 mL de la solución madre N° 1 en fiola de 100 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,2 mg/mL.

Estándar al 125 %:

Medir 25 mL de la solución madre N° 1 en fiola de 200 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,25 mg/mL.

Estándar al 150 %:

Medir 15 mL de la solución madre N° 1 en fiola de 100 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,30 mg/mL.

A.2 SOLUCION MADRE N° 2

Preparar una segunda solución madre y hacer las mismas diluciones descritas en A.1.

Filtrar a través de membranas de 0,20 μm e Inyectar cada uno de estas preparaciones por duplicado.

B. LINEALIDAD DEL METODO.

Sirve para determinar la proporcionalidad entre la concentración del principio activo y su respuesta en presencia de la matriz del producto.

Preparar una serie de soluciones placebo y adicionar a cada uno de ellos principio activo en el rango de: 50 %, 100 % y 150 %.

Estándar Secundario:

Enalapril Maleato;

Potencia Tal Cual: 99,95 %

Factor: 1,001

Lote: 5111-02-034-B

MP 1557-03

B.1 PREPARACION DEL ESTANDAR (solución madre)

En fiola de 100 mL pesar exactamente 200,2 mg de Enalapril Maleato, disolver y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 2 mg/mL.

Estándar al 50 %:

Medir 5 mL de la solución madre en fiola de 100 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,1 mg/mL.

Estándar al 100 %:

Medir 10 mL de la solución madre en fiola de 100 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,2 mg/mL.

Estándar al 150 %:

Medir 15 mL de la solución madre en fiola de 100 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,30 mg/mL.

Filtrar a través de membrana 0,2 μm e Inyectar cada uno de estas preparaciones por duplicado.

B.2 PREPARACION DE PLACEBOS

B.2.1 Preparación del placebo de Excipientes mas el principio activo al 50 %.

Preparar una cantidad para aproximadamente 200 tabletas, siguiendo las instrucciones de fabricación, el cual se obtiene mezclando todos los excipientes de la formulación. Las proporciones serán calculadas para obtener un placebo al 50 %.

B.2.2 Preparación del placebo de Excipientes mas el principio activo al 100 %.

Preparar una cantidad para aproximadamente 200 tabletas, siguiendo las instrucciones de fabricación, el cual se obtiene mezclando todos los excipientes de la formulación. Las proporciones serán calculadas para obtener un placebo al 100 %.

B.2.3 Preparación del placebo de Excipientes mas el principio activo al 150 %.

Preparar una cantidad para aproximadamente 200 tabletas, siguiendo las instrucciones de fabricación, el cual se obtiene mezclando todos los excipientes de la formulación. Las proporciones serán calculadas para obtener un placebo al 150 %.

B.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Pesar por triplicado exactamente 290 mg de cada uno de las muestras preparadas (50%, 100 % y 150 %) en fiola de 100 mL disolver y enrasar con agua HPLC (concentración: 0,2 mg/mL).

Filtrar a través de membrana 0,2 um e inyectar cada uno de estas preparaciones por duplicado.

3.4.2.3 ENSAYO DE PRECISION.

Es la dispersión de la medida alrededor de un valor medio.

Primero se determinara la Precisión del sistema, en el cual solo se trabaja con estándares, Seguidamente se determinara la Precisión del método, en el cual se trabaja con estándares y con la matriz del producto.

A. PRECISION DEL SISTEMA.

Para ver si el método es capaz de dar resultados semejantes o alrededor de un valor medio cuando se hacen análisis REPETIDOS en una muestra homogénea.

Estándar Secundario:

Enalapril Maleato;

Potencia Tal Cual: 99,95 %

Factor: 1,001

Lote: 5111-02-034-B; Numero de análisis: MP 1557-03

A.1 PREPARACION DE LOS ESTANDARES (solución madre)

En fiola de 100 mL pesar exactamente 200,2 mg de Enalapril Maleato, disolver y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 2 mg/mL.

Estándar al 50 % :

Medir 5 mL de la solución madre en fiola de 100 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,1 mg/mL.

Estándar al 100 % :

Medir 10 mL de la solución madre en fiola de 100 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,2 mg/mL.

Estándar al 150 %:

Medir 15 mL de la solución madre en fiola de 100 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,30 mg/mL.

Filtrar a través de membrana 0,2 um e inyectar cada uno de estas preparaciones por duplicado.

A.2 PREPARACION DE LA MUESTRA

Un analista prepara seis soluciones estándares al 100 % y lo inyecta por duplicado.

Enalapril Maleato;

Potencia Tal Cual: 99,30 %

Factor: 1,007

Lote: 5111-02-093-B; Numero de análisis: MP 1321-02

A.2.1 SOLUCION MADRE

Transferir cerca de 201,4 mg de Enalapril Maleato, exactamente pesado a una fiola de 100ml y añadir 50ml agua HPLC para disolver usando ultrasonido si fuese necesario. Llevar a volumen con agua HPLC y mezclar.

Concentración: 2 mg/mL.

Estándar al 100 %:

Medir 10 mL de la solución madre en fiola de 100 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,2 mg/mL.

Filtrar a través de membrana 0,2 um e inyectar cada uno de estas preparaciones por duplicado.

B. PRECISION DEL METODO.

Es una medida de la REPRODUCIBILIDAD del método.

Este ensayo se analiza con el mismo lote utilizado para la repetibilidad.

METODO OPERATORIO.

Dos analistas diferentes, trabajaran seis muestras cada uno en diferentes días siguiendo el método propuesto.

Estándar Secundario:

Enalapril Maleato;

Potencia Tal Cual: 99,95 %

Factor: 1,001

Lote: 5111-02-034-B; MP 1557-03

B.1 PREPARACION DE LOS ESTANDARES ESTANDARES (solución madre)

En fiola de 100 mL pesar exactamente 200,2 mg de Enalapril Maleato, disolver y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 2 mg/mL.

Estándar al 50 % :

Medir 5 mL de la solución madre en fiola de 100 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,1 mg/mL.

Estándar al 100 % :

Medir 10 mL de la solución madre en fiola de 100 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,2 mg/mL.

Estándar al 150 %:

Medir 15 mL de la solución madre en fiola de 100 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,30 mg/mL.

Filtrar a través de membrana 0,2 um e inyectar cada uno de estas preparaciones por duplicado.

B.2 PREPARACIÓN DEL PLACEBO DE EXCIPIENTES MAS EL PRINCIPIO ACTIVO AL 100 %.

Preparar una cantidad para aproximadamente 200 tabletas, siguiendo las instrucciones de fabricación, el cual se obtiene mezclando todos los excipientes de la formulación. Las proporciones serán calculadas para obtener un placebo al 100 %.

B.3 PREPARACION DE LA MUESTRA

Pesar exactamente (de B.2) seis muestras de 290 mg cada uno, en fiola de 100 mL disolver y enrasar con agua HPLC (concentración: 0,2 mg/mL).

Filtrar a través de membrana 0,2 um e inyectar cada uno de estas preparaciones por duplicado.

Realizar el mismo test estadístico empleado en la precisión del sistema.

3.4.24 ENSAYO DE EXACTITUD (Error sistemático o Sesgo)

Mide el grado de concordancia entre los valores obtenidos y el valor verdadero.

Para este estudio se trabaja con los mismos estándares y muestras preparadas para determinar la **Linealidad Del método**. Cada muestra debe ser analizada (pesado) por triplicado e inyectado por duplicado.

3.4.2.5 RANGO

Cumplidas las especificaciones de Linealidad del sistema, Linealidad del Método, Precisión del sistema, Precisión del método y la Exactitud, queda establecido que el rango de este método analítico es de 50 % a 150 %, verificándose que el método analítico funciona correctamente cuando se aplican a muestras que contienen principio activo a concentraciones iguales a los extremos superior e inferior, así como dentro del intervalo de concentración definido.

IV. RESULTADOS.

4.1 ADAPTABILIDAD DEL SISTEMA.

Los resultados de adaptabilidad del sistema cromatografico se detallan en la tabla 4.1

Ver gráficos en ANEXO 1

4.2 SELECTIVIDAD

Placebo de excipientes:

No se detecta ninguna respuesta significativa en el cromatograma, es decir la respuesta es lineal

Placebo de excipientes sin laca amarilla:

No se detecta ninguna respuesta significativa en el cromatograma, es decir la respuesta es lineal

Placebo mas principio activo al 100 %:

Respuesta significativa, con un tiempo de retención : 6,3 minutos

Estándar al 100 % de Enalapril maleato:

Respuesta significativa, con un tiempo de retención: 6,3 minutos

Los resultados obtenidos del placebo mas el principio activo al 100% y del estándar al 100% del enalapril maleato son concordantes, tanto en la concentración como en el tiempo de retención.

Ver gráficos en ANEXO 2

TABLA 4.1. ADAPTABILIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO

PARAMETROS	ANALITOS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
Números de platos Teóricos (N)	Enalapril	Mínimo 300	1 056,2
	Dicetopiperazina de Enalapril	Mínimo 2 500	11 132,3
	Enalaprilato	Mínimo 1 000	1 588,4
Factor cola (Tailing) (T)	Enalapril	Máximo 2,0	1,099
Resolución (R)	Entre el Enalaprilato y el Enalapril	Mínimo 2,0	9,671
	Entre el Enalapril y Dicetopiperazina de Enalapril	Mínimo 2,0	8,424
desviación estándar relativa (RSD)	Enalapril	Máximo 2,0 % para cinco inyecciones replicadas (10 inyecciones en total)	0,62 %
	Enalaprilato	Aproximadamente 5,0 %	0,96 %

4.3 LINEALIDAD

4.3.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

4.3.1.1 EVALUACION ESTADÍSTICA:

A. CÁLCULO DE LA RECTA DE REGRESION

Determinar la curva de regresión, Sobre los puntos individuales y sin promediar.

Para el caso de una recta la función toma la forma:

$$y = bx + a.$$

Donde:

x :Concentración o cantidad de analito (variable independiente)

y: Respuesta (variable dependiente).

b: valor de la pendiente (indica la sensibilidad del método).

a: Ordenada de origen (termino independiente o intercepto). Para probar que la recta pasa por el origen y que cualquier desviación se debe a un error aleatorio.

Formula para hallar “a”

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$$

Formula para hallar “b”

$$b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

n: Numero de muestras.

RESULTADO: De los datos obtenidos de las tablas 4.2 y 4.3 se obtienen los siguientes valores.

$$a = -9730,87$$

$$b = 230661,68;$$

(Ver gráfico en Fig.4.1)

ECUACION DE LA RECTA: $y = 230661,68x - 9730,87$

LINEALIDAD DEL SISTEMA

TABLA 4.2. RESULTADOS DE LINEALIDAD DEL SISTEMA

ENALAPRIL 10 mg TABLETAS RECUBIENTAS

X (Concentración)	Y (Áreas)
50%	452020
50%	454800
50%	436922
50%	458210
75%	683691
75%	688855
75%	674394
75%	685229
100%	926608
100%	921042
100%	903780
100%	907099
125%	1135429
125%	1153117
125%	1135910
125%	1144338
150%	1372596
150%	1388278
150%	1364243
150%	1371756

X (Concentración)	Y (Áreas)
50%-1	453410.00
50%-2	447566.00
Área Promedio	450488.00
75%-1	686273.00
75%-2	679811.50
Área Promedio	683042.25
100%-1	923825.00
100%-2	905439.50
Área Promedio	914632.25
125%-1	1144273.00
125%-2	1140124.00
Área Promedio	1142198.50
150%-1	1380437.00
150%-2	1367999.50
Área Promedio	1374218.25

TABLA DE AREAS

PROMEDIOS

X	Y
50%	450488.00
75%	683042.25
100%	914632.25
125%	1142198.50
150%	1374218.25

Coefficiente de Correlación Lineal = 0.99970

B. INTERPRETACION ESTADISTICA DE LA REGRESION LINEAL

Realizar la interpretación estadística de la regresión lineal, a través del cálculo de:

- Cálculo del coeficiente de correlación (r).
- Limite de confianza del intercepto a.
- Limite de confianza de la pendiente b.
- Coeficiente de variación de los factores de respuesta.

a. CALCULO DEL COEFICIENTE DE CORRELACION (r)

Se determina para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto: $y = bx + a$

Y refleja el grado de relación o ligazón entre las concentraciones (X) y su respuesta (Y)

Formula para hallar “r”

$$r = \frac{\frac{\sum xy}{n} - \frac{\sum x \sum y}{n^2}}{\sqrt{\left(\frac{\sum x^2}{n} - \left(\frac{\sum x}{n}\right)^2\right) \left(\frac{\sum y^2}{n} - \left(\frac{\sum y}{n}\right)^2\right)}}$$

El valor de:

$r = 1$ indica una recta perfectamente lineal.

$r = -1$ indica una recta perfectamente lineal negativa.

$r = 0$ indica que no hay correlación entre x e y.

CRITERIO DE ACEPTACION: MINIMO 0,995

RESULTADO: $r = 0,99970$

COEFICIENTE DE DETERMINACION “r²” (MÍNIMO 0,99)

Indica el grado de ajuste de la ecuación.

$$r^2 = 0,99940$$

Interpretación: El 99,44% de las variaciones se debe a la influencia de la variable “x” (concentración inyectada)

Sin embargo el mejor indicativo del modelo lineal no es “r”, sino un test estadístico.

TEST ESTADISTICO PARA EL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN “r”.

En el cual se calcula el valor de $t_{\text{regresion}}$ (test de regresión) con $n - 2$ grados de libertad y un intervalo de confianza de 95 % ($\alpha = 0,05$) se compara con el valor de t_{tabla} (test tabulado) para el nivel de confianza requerido.

α = probabilidad de cometer error (p).

1- α = grado de confianza.

Formula para hallar t_r

$$t_{\text{regresion}} = \frac{|r| \sqrt{V(n-2)}}{\sqrt{V(1-r^2)}}$$

- **HIPOTESIS NULA** (H_0): No correlación entre x e y ($r = 0$)

- **HIPOTESIS ALTERNA** (H_1): “r” NO debe ser significativamente diferente de uno ($r \neq 0$)

CRITERIO DE ACEPTACIÓN. El valor de $t_{\text{regresion}}$ debe ser mayor a t_{tabla} . La hipótesis Nula se rechaza, existiendo una correlación lineal significativa. Por lo tanto $r \cong 1$.

RESULTADOS:

t_{tabla} : 2,101 Para $20 - 2 = 18$ grados de libertad y $p = 0,05$

$t_{\text{regresion}}$: 173,17

Como $t_{\text{regresion}} \gggggg t_{\text{tabla}}$. La Si existe una correlación lineal significativa entre x e y ($r \neq 0$).

b. LIMITE DE CONFIANZA DEL INTERCEPTO “a”. Este valor se calcula en función de su Varianza (S_a^2)

Formula para hallar la VARIANZA del intercepto “a”: (S_a^2)

$$S_a^2 = S_b^2 \cdot \frac{(\sum x)^2}{n} = 306\,291\,056$$

Formula para hallar la DESVIACION ESTANDAR del intercepto "a" (S_a)

$$S_a = \sqrt{S_a^2} = 17\,501,17$$

$$S_{a\text{relativa}}(\%) = \frac{S_a}{a} \times 100 = 179,85$$

Fòrmula para hallar los LIMITES DE CONFIANZA del intercepto

$$a = a \pm t_{\text{tabla}} \cdot S_a$$

t_{tabla} = Es el valor obtenido en la tabla de distribución de student, con las siguientes condiciones:

- n-2 grados de libertad
- Probabilidad de cometer error (p) de 0,05, es decir un grado de confianza del 95 %

RESULTADO:

Intervalo de confianza del intercepto "a"

$$t_{\text{tabla}} = 2,306; \quad \text{para } 10-2 = 8 \text{ grados de libertad y } p = 0,05$$

$$a = -9\,730,87 \pm 2,306 \times 17\,501,17$$

$$a = -50\,088,57 \text{ hasta } 30\,626,83$$

DETERMINACION DEL TEST ESTADISTICO DEL INTERCEPTO "a"

Se realiza estableciendo una comparación entre " t_{exp} " Y " t_{tabla} ."

Formula para Hallar EL VALOR DE T EXPERIMENTAL " t_{exp} "

$$t_{\text{exp}} = \frac{I a I}{S_a}$$

$$t_{\text{tabla}} = 2,306; \quad \text{para } 10-2 = 8 \text{ grados de libertad y } p = 0,05$$

CRITERIO DE ACEPTACION:

Debe cumplirse que: t_{exp} es menor que t_{tabla} , según las condiciones mencionadas, Entonces el valor de “a” es aceptable.

RESULTADO:

$$t_{tabla} = 2,306;$$

$$t_{exp} = 0,56$$

Como $t_{exp} \ll t_{tabla}$, Si existe una correlación lineal significativa, y el valor de “a” es aceptable.

c. LIMITE DE CONFIANZA DE LA PENDIENTE “b”. Este valor se calcula en función de su Varianza (S_b^2)

Formula para hallar la VARIANZA de la pendiente “b”: (S_b^2)

$$S_b^2 = \frac{S_{xy}^2}{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma y)^2}{n}} = 1\,914\,205,25$$

Formula para hallar la VARIANZA DEL ERROR EXPERIMENTAL TOTAL (determinación de la varianza de X sobre Y)

$$S_{xy}^2 = \frac{\Sigma y^2 - a\Sigma y - b\Sigma xy}{n-2} = 38\,284\,105,00$$

$$S_{xy} = 6\,187,42$$

Formula para hallar la DESVIACION ESTANDAR de la pendiente “b”: (S_b)

$$S_b = \sqrt{S_b^2} = 1\,383,55$$

$$S_{b,relativa}(\%) = \frac{S_b}{b} \times 100 = 0,60\%$$

Formula para hallar los LIMITES DE CONFIANZA de la pendiente “b”:

$$b = b \pm t_{\text{tabla}} \cdot S_b$$

t_{tabla} = Es el valor en la tabla de la distribución de student con las siguientes condiciones:

- n-2 grados de libertad
- Probabilidad de cometer error (p) de 0,05, es decir un grado de confianza del 95 %

RESULTADO:

Intervalo de confianza de la pendiente “b”

$t_{\text{tabla}} = 2,306$; para $10-2 = 8$ grados de libertad y $p=0,05$

$$b = 230\ 661,68$$

$$b = 230\ 661,68 \pm 2.306 \times 1\ 383,55$$

$$b = 227\ 471,21 \text{ hasta } 233\ 852,15$$

DETERMINACION DEL TEST ESTADISTICO DE LA PENDIENTE “b”

Se realiza estableciendo una comparación entre “ t_{exp} ” Y “ t_{tabla} .”

Fòrmula para hallar EL VALOR DE T EXPERIMENTAL “ t_{exp} ”

$$t_{\text{exp}} = \frac{I\ b\ I}{S_b}$$

$t_{\text{tabla}} = 2,306$; para $10-2 = 8$ grados de libertad y $p = 0,05$

TEST DE HIPÓTESIS PARA LA PENDIENTE “b”

- HIPOTESIS NULA(H_0): “b” es igual a cero ($b = 0$)
- HIPOTESIS ALTERNA(H_1): “b” es significativamente diferente de cero ($b \neq 0$)

CRITERIO DE ACEPTACION El valor de: t_{exp} es mayor que t_{tabla} .
Entonces la Hipótesis nula se rechaza. Por lo tanto $b \neq 0$.

RESULTADO:

$t_{tabla} = 2,306$; para $10-2 = 8$ grados de libertad y $p=0,05$

$t_{exp} = 166,72$

Como $t_{exp} \gggggg t_{tabla}$, Si existe una correlación lineal significativa, entonces la pendiente "b" es significativamente diferente de cero ($b \neq 0$)

d. CALCULO DEL COEFICIENTE DE VARIACIÓN (C.V) DE LOS FACTORES DE RESPUESTA (f):

CRITERIO DE ACEPTACION:

$C.V \leq 5 \%$

Formula para hallar "f"

$$f = \frac{y}{x}$$

RESULTADOS:

Promedio de "f" : 227811,78

Desviación estándar de "f" : 2057,13

Coefficiente de variación (C.V) : 0,90 %

Ver gráficos en ANEXO 3

4.3.2 LINEALIDAD DEL METODO

4.3.2.1 EVALUACION ESTADÍSTICA:

A. CÁLCULO DE LA RECTA DE REGRESION

Determinar la curva de regresión, Sobre los puntos individuales y sin promediar.
Para el caso de una recta la función toma la forma:

$$y = bx + a.$$

Donde:

x: Concentración o cantidad de analito (variable independiente)

y: Respuesta (variable dependiente).

b: valor de la pendiente (indica la sensibilidad del método).

a: Ordenada de origen (termino independiente o intercepto). Para probar que la recta pasa por el origen y que cualquier desviación se debe a un error aleatorio.

Formula para hallar “a”

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$$

Formula para hallar “b”

$$b = \frac{\frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}{n}$$

n: Numero de muestras.

RESULTADO: De los datos obtenidos de las tablas 4.4 y 4.5 se obtienen los siguientes valores.

$$a = 2438,40$$

$$b = 224292,08$$

(Ver gráfico en Fig. 4.2)

ECUACION DE LA RECTA: $y = 224\,292,08 x + 2\,438,40$

LINEALIDAD DEL MÉTODO

TABLA 4.4. RESULTADOS DE LINEALIDAD DEL METODO

ENALAPRIL 10 mg TABLETAS RECUBIERTAS

X (Concentración)	Y (Áreas)
50%	450960
50%	448124
50%	440593
50%	444886
50%	454710
50%	455732
100%	904790
100%	902687
100%	908150
100%	909302
100%	897779
100%	897193
150%	1340210
150%	1355429
150%	1344984
150%	1337659
150%	1351400
150%	1348333

X (Concentración)	Y (Áreas)
50%-1	449542.00
50%-2	442739.50
50%-3	455221.00
PROMEDIO	449167.50
100%-1	903738.50
100%-2	908726.00
100%-3	897486.00
PROMEDIO	903316.83
150%-1	1347819.50
150%-2	1341321.50
150%-3	1349866.50
PROMEDIO	1346335.83

TABLA DE AREAS

PROMEDIOS

X	Y
50%	449167.50
100%	903316.83
150%	1346335.83

Coefficiente de Correlación Lineal = 0.99987

B. INTERPRETACION ESTADISTICA DE LA REGRESION LINEAL

Realizar la interpretación estadística de la regresión lineal, a través del cálculo de:

- Cálculo del coeficiente de correlación (r).
- Limite de confianza del intercepto a.
- Limite de confianza de la pendiente b.
- Coeficiente de variación de los factores de respuesta.

a. CALCULO DEL COEFICIENTE DE CORRELACION (r) (MÍNIMO 0,995)

Se determina para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto: $y = bx + a$, Y refleja el grado de relación o ligazón entre las concentraciones (X) y su respuesta (Y)

Fòrmula para hallar “r”

$$r = \frac{\frac{\sum xy}{n} - \frac{\sum x \sum y}{n^2}}{\sqrt{\left(\frac{\sum x^2}{n} - \left(\frac{\sum x}{n}\right)^2\right) \left(\frac{\sum y^2}{n} - \left(\frac{\sum y}{n}\right)^2\right)}}$$

El valor de:

$r = 1$ indica una recta perfectamente lineal.

$r = -1$ indica una recta perfectamente lineal negativa.

$r = 0$ indica que no hay correlación entre x e y.

RESULTADO: $r = 0,99987$

COEFICIENTE DE DETERMINACION “r²” (MÍNIMO 0,99)

Indica el grado de ajuste de la ecuación.

$$r^2 = 0,99974$$

Interpretación: El 99,97% de las variaciones se debe a la influencia de la variable “x” (concentración inyectada)

Sin embargo el mejor indicativo del modelo lineal no es r, sino un test estadístico.

TEST ESTADISTICO PARA EL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN “r”.

En el cual se calcula el valor de $t_{\text{regresion}}$ (test de regresión) con $n - 2$ grados de libertad y un intervalo de confianza de 95 % ($\alpha = 0,05$) se compara con el valor de t_{tabla} (test tabulado) para el nivel de confianza requerido.

α = probabilidad de cometer error (p).

1- α = grado de confianza.

Fòrmula para hallar $t_{\text{regresion}}$

$$t_{\text{regresion}} = \frac{|r| \sqrt{V(n-2)}}{\sqrt{V(1-r^2)}}$$

- **HIPOTESIS NULA** (H_0): es la no correlación entre x e y ($r = 0$)

- **HIPOTESIS ALTERNA** (H_1): “r” NO debe ser significativamente diferente de uno ($r \neq 0$).

- **CRITERIO DE ACEPTACIÓN.** Si el valor observado de $t_{\text{regresion}}$ es mayor a t_{tabla} . La hipótesis Nula se rechaza, existiendo una correlación lineal significativa, por lo tanto $r \cong 1$

RESULTADOS:

t_{tabla} : 2,12 Para $18 - 2 = 16$ grados de libertad y $p = 0,05$

$t_{\text{regresion}}$: 248,05

Como $t_{\text{regresion}} \gg \gg \gg \gg \gg \gg \gg t_{\text{tabla}}$. Si existe una correlación lineal significativa entre **x** e **y** ($r \neq 0$).

b. LIMITE DE CONFIANZA DEL INTERCEPTO “a”. Este valor se calcula en función de su Varianza (S_a^2)

Fòrmula para hallar la VARIANZA del intercepto “a”: (S_a^2)

$$S_a^2 = S_b^2 \cdot \frac{(\sum x)^2}{n} = 1\ 625\ 441\ 400$$

Fòrmula para hallar la DESVIACION ESTANDAR del intercepto "a" (S_a)

$$S_a = \sqrt{S_a^2} = 40\,316,76$$

$$S_{a\text{relativa}}(\%) = \frac{S_a}{a} \times 100 = 1\,653,41 \%$$

Fòrmula para hallar los LIMITES DE CONFIANZA del intercepto

$$a = a \pm t_{\text{tabla}} \cdot S_a$$

t_{tabla} = Es el valor obtenido en la tabla de distribución de student, con las siguientes condiciones:

- n-2 grados de libertad
- Probabilidad de cometer error (p) de 0,05, es decir un grado de confianza del 95 %

RESULTADO:

$$t_{\text{tabla}} = 2,365; \quad \text{para } n-2 = 7 \text{ grados de libertad y } p = 0,05$$

Intervalo de confianza del intercepto "a"

$$a = 2\,438,40 \pm 2,365 \times 40\,316,76$$

$$a = -92\,910,74 \text{ hasta } 97\,787,54$$

DETERMINACION DEL TEST ESTADISTICO DEL INTERCEPTO "a"

Fòrmula para Hallar EL VALOR DE T EXPERIMENTAL " t_{exp} "

$$t_{\text{exp}} = \frac{I a I}{S_a}$$

CRITERIO DE ACEPTACION:

SI t_{exp} es menor que t_{tabla} , según las condiciones mencionadas, Existe una correlación lineal significativa.

RESULTADO:

$t_{tabla} = 2,365$; para $9-2 = 7$ grados de libertad y $p = 0,05$

$t_{exp} = 0,75$

c. LIMITE DE CONFIANZA DE LA PENDIENTE "b".

Este valor se calcula en función de su Varianza (S_b^2)

HIPOTESIS NULA (H_0): $b = 0$

CRITERIO DE ACEPTACION: "b" debe ser significativamente diferente de cero

Fòrmula para hallar la VARIANZA de la pendiente "b": (S_b^2)

$$S_b^2 = \frac{S_{xy}^2}{\Sigma X^2 - \frac{(\Sigma Y)^2}{n}} = 1\,448\,377,56$$

Fòrmula para hallar la VARIANZA DEL ERROR EXPERIMENTAL TOTAL

(determinación de la varianza de X sobre Y)

$$S_{xy}^2 = \frac{\Sigma Y^2 - a\Sigma Y - b\Sigma XY}{n-2} = 34\,761\,061,43$$

$$S_{xy} = 5\,895,85$$

Formula para hallar la DESVIACION ESTANDAR de la pendiente "b": (S_b)

$$S_b = \sqrt{S_b^2} = 1\,203,549$$

$$S_{b\text{relativa}}(\%) = \frac{S_b}{b} \times 100 = 0,54\%$$

Fórmula para hallar los LÍMITES DE CONFIANZA de la pendiente

$$b = b \pm t_{\text{tabla}} \cdot S_b$$

t_{tabla} = Es el valor en la tabla de la distribución de student con las siguientes condiciones:

- n-2 grados de libertad
- Probabilidad de cometer error (p) de 0,05, es decir un grado de confianza del 95 %

RESULTADO:

$$t_{\text{tabla}} = 2,365; \quad \text{para } 9-2 = 7 \text{ grados de libertad y } p = 0,05$$

Intervalo de confianza de la pendiente “b”

$$b = 224292,08 \pm 2.365 \times 1203,49$$

Intervalo de confianza de $b = 221\,445,83$ hasta $227\,138,33$

DETERMINACION DEL TEST ESTADISTICO DE LA PENDIENTE “b”

Fórmula para hallar EL VALOR DE T EXPERIMENTAL “ t_{exp} ”

$$t_{\text{exp}} = \frac{I \ b \ I}{S_b}$$

CRITERIO DE ACEPTACION:

SI t_{exp} es mayor que t_{tabla} Existe una correlación lineal significativa, entonces la pendiente “b” es significativamente diferente de cero y se rechaza la hipótesis nula.

$t_{\text{tabla}} = 2,365$; para $9-2 = 7$ grados de libertad y $p = 0,05$

$t_{\text{exp}} = 186,37$

d. CALCULO DEL COEFICIENTE DE VARIACIÓN (C:V)DE LOS FACTORES DE RESPUESTA(f):

CRITERIO DE ACEPTACION:

$C.V \leq 5 \%$

Formula para hallar “f”

$$f = \frac{y}{x}$$

RESULTADOS:

Promedio de “f” : 224934,09

Desviación estándar de “f” : 1879,46

Coefficiente de variación (C.V) : 0,84 %

Ver gráficos en ANEXO 4

4.4 PRECISION

4.4.1. PRECISION DEL SISTEMA

4.4.1.1 EVALUACION ESTADÍSTICA

A. LA PRECISIÓN SE EXPRESA MATEMÁTICAMENTE, CALCULANDO LA DISPERSIÓN DE LOS DATOS RESPECTO A LA MEDIA.

- Desviación estándar $\hat{\sigma}$ (S)

- Desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (C.V).

Muestra N°	Concentración del estándar al 100 %
1	99,19 %
2	100,63 %
3	99,76 %
4	100,06 %
5	99,79 %
6	100,71 %

Análisis Estadístico	
N° de Muestras (n)	6
Media (X)	100,02 %
Desviación estándar (S)	0,576
Coefficiente de repetibilidad (C.V.) (Máximo 3,9%)	0,58 %

B. CALCULO DEL LÍMITE DE CONFIANZA INDIVIDUAL

Formula:

$$X \pm t_{\text{tabla}} \cdot S$$

t_{tabla} = es el valor en la tabla de la distribución de student con las siguientes condiciones:

- n – 1 grados de libertad
- Probabilidad de cometer error (p) de 0,05, es decir un grado de confianza del 95 %

RESULTADO:

Intervalo de confianza individual:

$$t_t = 2,571; \quad \text{para } 6-1 = 5 \text{ grados de libertad y } p = 0,05$$

Intervalo de Confianza

$$100,02\% \pm 2,571 \times 0,576$$

Intervalo de Confianza = 98,54 % hasta 101,50 %

C. TAMBIEN SE CALCULA EL LÍMITE DE CONFIANZA DE LA MEDIA (μ)

Fórmula:

$$\mu = X \pm \frac{t_{\alpha} \times S}{n}$$

t_{tabla} = es el valor en la tabla de la distribución de student con las siguientes

condiciones:

- $n - 1$ grados de libertad
- Probabilidad de cometer error (p) de 0,05, es decir un grado de confianza del 95 %

RESULTADO:

$t_{\text{tabla}} = 2,571$; para $n - 1 = 5$ grados de libertad y $p = 0,05$

Intervalo de confianza

$$\mu = 100,02 \pm \frac{2,571 \times 0,576}{6}$$

Intervalo de confianza = $\mu = 99,42\%$ a $100,62\%$

Ver gráficos en ANEXO 5

4.4.2. PRECISION DEL METODO

4.4.2.1 EVALUACION ESTADISTICA

A. LA PRECISIÓN SE EXPRESA MATEMÁTICAMENTE, CALCULANDO LA DISPERSIÓN DE LOS DATOS RESPECTO A LA MEDIA.

- Desviación estándar $\hat{\sigma}$ (S)
- Desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (C.V).

Muestras N°	Analista "A"	Analista "B"
	Fecha:26-08-2003	Fecha:01-09-2003:
	Concentración al 100 %	Concentración al 100 %
1	101,15 %	101,78 %
2	99,96 %	99,61 %
3	99,50 %	98,83 %
4	100,88 %	100,22 %
5	100,75 %	99,36 %
6	99,96 %	99,22 %

Análisis Estadístico	
N° de Análisis (n)	12
Media (X)	100,102 %
Desviación estándar (S)	0,881
Coefficiente de repetibilidad (C.V.) (Máximo 5,5%)	0,88 %

Ver gráficos en ANEXO 6

4.5 EXACTITUD

4.5.1 EVALUACIÓN ESTADÍSTICA

Determinar los siguientes parámetros estadísticos:

- Calculo del porcentaje de recuperación de cada concentración.
- Calculo de la Desviación estándar \hat{O} (S)
- Cálculo de la Desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (C.V).
- También se calcula el "t" de Student

a. CALCULO DEL PORCENTAJE DE RECUPERACION DE CADA CONCENTRACIÓN

Concentración	Promedio en % encontrado	% Recuperado
50 % - 1	49,83 %	99,66 %
50 % - 2	49,10 %	98,20 %
50 % - 3	50,48 %	100,96 %
100 % - 1	100,33 %	100,32 %
100 % - 2	100,67 %	100,67 %
100 % - 3	99,73 %	99,73 %
150 % - 1	150,62 %	100,41 %
150 % - 2	149,05 %	99,37 %
150 % - 3	149,42 %	99,61 %

Análisis Estadístico	
Nº de muestras (n)	9
Recuperación Promedio (R) (Especificación: 90 - 100%)	99,88 %
Desviación estándar (S)	0,83
Coficiente de repetibilidad (C.V.) (Máximo 5,0%)	0,83 %

b. CALCULO DEL PORCENTAJE DE “T” DE STUDENT.

Para confirmar que el valor medio no difiere significativamente del aceptado como referencia.

Fòrmula para hallar el “t” experimental (t_{exp})

$$t_{exp} = \frac{[100 - R]}{RSD} \cdot n$$

Hallando el "t" de tabla (t_t)

$t_{\text{tabla}} = 2,306$; Con las siguientes condiciones

$n - 1 =$ grados de libertad y

Probabilidad de cometer error (p) de 0,05, es decir un grado de confianza del 95 %

CRITERIO DE ACEPTACION:

SI t_{exp} es menor que t_{tabla} NO existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100 %, y la exactitud es apropiada.

RESULTADO

$t_{\text{tabla}} = 2,306$; para $9 - 1 = 8$ grados de libertad y $p = 0,05$

$t_{\text{exp}} = 0,43$

TABLA 4.6 RESUMEN DE RESULTADOS

<u>PRINCIPIO ACTIVO</u>	<u>MÉTODO ANALÍTICO</u>	<u>TIPO DE VALIDACION:</u>
ENALAPRIL MALEATO		PROSPECTIVA
ENSAYOS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
1. SELECTIVIDAD Interferencia de excipientes	No debe presentar interferencia de excipientes	Conforme
2. LINEALIDAD DEL SISTEMA		
- Coeficiente de correlación (r)	Mínimo 0,995	0,99970
- Coeficiente de determinación (r^2)	Mínimo 0,99	0,99940
- Test estadístico para el “r” P = 0,05; y n – 2 grados de libertad	t.tabla = 2,101 t.regresion >> t.tabla	t.regresion = 173,17
- Coeficiente de Variación	Máximo 5,0 %	0,90 %
- Prueba de Linealidad de la pendiente P = 0,05; y n – 2 grados de libertad	ttabla = 2,306 texp > ttabla	texp = 166,72
- Prueba de proporcionalidad del Intercepto P = 0,05; y n – 2 grados de libertad	ttabla = 2,306 texp < ttabla	texp = 0,56
3. LINEALIDAD DEL MÉTODO		
- Coeficiente de correlación (r)	Mínimo 0,995	0,99987
- Coeficiente de determinación (r^2)	Mínimo 0,99	0,99974
- Test estadístico para el “r” P = 0,05; y n – 2 grados de libertad	t.tabla = 2,12 t.regresion >> t.tabla	t.regresion = 248,05
- Coeficiente de Variación	Máximo 5,0 %	0,84 %
- Prueba de Linealidad de la pendiente P = 0,05; y n – 2 grados de libertad	ttabla = 2,365 texp > ttabla	texp = 186,37
- Prueba de proporcionalidad del Intercepto P = 0,05; y n – 2 grados de libertad	ttabla = 2,365 texp < ttabla	texp = 0,75
4. PRECISION DEL SISTEMA		
Coeficiente de Variación	Máximo 3,9 %	0,58 %
5. PRECISION DEL METODO		
Coeficiente de Variación	Máximo 5,5 %	0,88 %
6. EXACTITUD		
- Porcentaje de recuperación	90% - 110%	99,88%
- Test de recuperación media y el 100% p = 0,05; y n – 1 = Grados de libertad	ttabla = 2,306 texp < ttabla	texp = 0,43

V. DISCUSION

Selectividad

El método analítico es selectivo, por que los excipientes de la formulación no interfieren en la determinación del principio activo ya que no se detecta ninguna respuesta significativa en el cromatograma, obteniéndose una lectura de 0% siendo el máximo 0,5%, además el método, diferencia el principio activo de sus compuestos relacionados. Así mismo los tiempos de retención son similares tanto para el estándar como para la muestra (6,3 minutos).

Linealidad del Sistema

Se analizaron las siguientes concentraciones: 50%, 75%, 100%, 125% y 150%, (siendo el 100% igual a 0,2mg/mL) las cuales al ser evaluadas estadísticamente, se observo que para el rango entre 50% y 150%, se obtiene un coeficiente de correlación $r = 0,99970$, siendo el valor mínimo de 0,995. y un coeficiente de determinación $r^2 = 0,99940$, siendo el valor mínimo de 0,99, lo que demuestra que existe regresión (relación lineal) entre las variables concentración y sus respuestas.

Para confirmar que dicha regresión es Lineal, se aplico un test de regresión (test de Student), donde debe cumplirse: el valor de $t_{\text{regresión}}$ (173,17) debe ser mayor al t_{tabla} (2,101), con una probabilidad de cometer error de $p = 0,05$ y $n - 2$ grados de libertad. Este resultado corrobora la linealidad del sistema instrumental.

Así mismo se determino el coeficiente de variación de los factores de respuesta “ f ” el cual debe ser máximo 5%, obteniéndose 0,90%, lo que demuestra que cumple la condición de proporcionalidad y el error sistema es despreciable.

Linealidad del Sistema

Se analizaron las siguientes concentraciones: 50%, , 100%, y 150%, las cuales al ser evaluadas estadísticamente, se observo que para el rango entre 50% y 150%, se obtiene un coeficiente de correlación $r = 0,99987$, siendo el valor mínimo de 0,995. Y un coeficiente de determinación $r^2 = 0,99974$, siendo el valor mínimo de 0,99, lo que demuestra que existe regresión (relación lineal) entre las variables concentración y sus respuestas.

Para confirmar que dicha regresión es Lineal, se aplicó un test de regresión (test de Student), donde debe cumplirse: el valor de $t_{\text{regresión}}$ (248,05) debe ser mayor al t_{tabla} (2,12), con una probabilidad de cometer error de $p = 0,05$ y $n - 2$ grados de libertad. Este resultado corrobora la linealidad del método.

Así mismo se determinó el coeficiente de variación de los factores de respuesta “ f ” el cual debe ser máximo 5%, obteniéndose 0,84%, lo que demuestra que cumple la condición de proporcionalidad y el error sistemático del método es despreciable.

Precisión

El estudio de precisión del sistema mostró una buena **repetibilidad** de los resultados, obteniéndose una desviación estándar relativa (RSD) de 0,58%, siendo el valor máximo de 3,9 %.

El estudio de precisión del método mostró una buena **reproducibilidad** de los resultados, obteniéndose una desviación estándar relativa (RSD) de 0,88%, siendo el valor máximo de 5,5 %.

Exactitud

Como se observa en la tabla, se obtuvieron valores de desviación estándar relativa (RSD) de 0,83% siendo el valor máximo 3,9%, y porcentaje de recuperación fue de 99,88%, dentro de los límites establecidos (90% a 110%),

Para demostrar que no hay diferencia significativa entre la recuperación media y el 100 %, se aplicó un test estadístico (test de Student), donde debe cumplirse: el valor de $t_{\text{experimental}}$ (0,43) debe ser menor al t_{tabla} (2,306), con una probabilidad de cometer error de $p = 0,05$ y $n - 1$ grados de libertad. Este resultado corrobora que el método es exacto.

Todos los resultados obtenidos en la validación del método analítico, permite asegurar que el método analítico es confiable. De esta manera se comprobó experimentalmente la utilidad del procedimiento establecido para la validación de métodos analíticos.

CONCLUSIONES

1. El método es selectivo; por no existir interferencia de la matriz, además se observa una pureza de pico del 100%.
2. El método es lineal en el intervalo de las concentraciones de concentraciones del 50% hasta el 150 % de la muestra (siendo el 100% igual a 0,20mg/mL)
3. El método es preciso; porque se obtienen resultados repetitivos (desviación estándar relativa de: 0,64%) y además reproducibles (desviación estándar relativa de: 0,88%)
4. El método es exacto; debido a que no hay diferencia significativa entre la recuperación media (99,88%) y el 100 %.
5. Queda demostrado la aplicabilidad y la adaptabilidad del método analítico desarrollado para el Enalapril Maleato en el Perú.

BIBLIOGRAFÍA

1. Castro M, Gascón S, Pujol M, et al. Validación de métodos analíticos. A.E.F.I, Sección catalana. Madrid; 1 996.
2. Alonso J, Blanco J, Bustamante P, et al. Tecnología farmacéutica. Madrid. Editorial síntesis. Vol 2: Formas farmacéuticas; 1 997
3. Frederick M. Principios de garantía de calidad para laboratorios analíticos. Madrid: Edición española; 1991.
4. Manual de Buenas Practicas de Manufactura de Productos Farmacéuticos. Ministerio de salud. DIGEMID. 1999. pág. 26-27
5. Beneites E. La gestión técnica en la fabricación de medicamentos. Madrid: Centro de estudios superiores de la industria farmacéutica; 1996.
6. Trillo C. Tratado de farmacia galénica. Madrid. 1ª ed. Luzan 5 S.A, 1 993.
7. Oscar Q, Sara A, Raul L. Introducción a la HPLC aplicación y practica. Blacksburg, Virginia USA. 5ª ed; 1 990.
8. United States Pharmacopeia XXVI/National Formulari XXI. En: Validation of Compencial methods (General chapters < 1225 >). United states pharmacopeial convention, Inc. Pàg. 2439-2442.
9. British pharmacopoeia 2 002. En: Monograph Development: Methods of analysis (supplementary chapter III D A447, A448). Vol 2.
10. Bailey Leonard C. cromatografía. Capitulo 33. En: Remington Farmacia. Buenos Aires. 17^{ava} ed. Editorial medica panamericana S.A; 1 987.

11. Merck Index 12^{ava} ed; 1 996. 12^a edicion, publicado por Merck Research Laboratories divition of Merck Co. INC, Whitehouse station N.J (USA).

12. Ludwig H. Buenas practicas de laboratorio y Buenas prácticas de fabricación actuales. Copyright Hewlett-Packard Company, 1993-1994.

13. Goodman y Gilman (1998). Las base farmacológicas de la terapéutica T. II pàg . Pág 798

8^a edicion revisada, Mc GrawHill interamericana Editores S.A de C.V México D.F

14. Katsung Bertram (1997), Farmacología: autoevaluacion y repaso pàg. 144 No me. Editorial El Manual moderno México D.F.

15. Buenas prácticas de Manufactura vigentes (1996). Serie de informes técnicos de la OMS (823). Informe 23 Organización Mundial de la salud. Marzo Ginebra.

16. Skoog Douglas (1994), Análisis instrumental 4^a edición Mc Graw Hill/ interamericana España. Pág 107

17. Valdez Arana N. (1999), Validación del método de valoración de Loratadina en tabletas por HPLC.

Trabajo de aptitud profesional para optar el título de Químico Farmacéutico de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM.

18. Verga X. Universidad autónoma de Barcelona. España. Introducción al concepto de calidad en la Gestión Empresarial. Modelo ISO 9000:2000.

sitio en Internet:

<http://sabweb.uab.es/euis/metodolo/materials/xerrades/xv1.pdf>. Acceso el

12-02-04

19 Compás 3 Comercio electrónico S.L. La Calidad para Joseph Juran. sitio en Internet: <http://www.multiteca.com/Apuntes/Documentos/D10-1.htm>

Acceso el 16-02-04

20. Armenta R, Gomez G. Universidad de Sonora. Mexico. Sistemas de Calidad ISO 9000. sitio en Internet:

[http://webs.demasiado.com/ing_industrial/ingenieria/sistemas/nnc/ISO9000.](http://webs.demasiado.com/ing_industrial/ingenieria/sistemas/nnc/ISO9000.html)

html Acceso el 16-02-04

21. Abdel O, Belal S, Bedair M, Barakat N, Haggag R, Determinacion espectrofotometrica y polarigrafica del Enalapril y Lisopril, usando 2,4-dinitrofluorbenzeno. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Octubre 2002, Egipto.

22. Ayad M, Shalaby A, Abdellatef H, Determinacion espectrofotometrica y AAS de Ramipril y Enalapril a traves de la formacion de un complejo ternario. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Setiembre 2001, Egipto.