

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE QUÍMICA BÁSICA Y
APLICADA**

**Validación de método analítico de valoración de
naproxeno sódico 550 mg. tableta por cromatografía
líquida de alta performance**

TESIS

para optar el título profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Jessica Medina Julca

Jorge Berrocal Quinto

ASESOR

Norma Carlos Casas

Lima – Perú

2008

A mis padres Cipriano y cecilia,

Con amor y eterna gratitud

Jorge

A mi padre a mi mamá

Por el cariño y comprensión , mi gratitud

Toda la vida.

Jessica

Agradezco a los siguientes miembros del jurado Examinador y calificador de la tesis intitulada “ Validación del Método Analítico de Valoración de Naproxeno Sódico 550 mg tabletas por cromatografía líquida de alta performance”

Presidente

Dr. Pablo Bonilla Rivera

Miembros

Dra. María Elena Montoya Alfaro

Mg. Delia whu whu

Q.F. Fritz Choquecillo Peña

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

SUMMARY

I. INTRODUCCION

II. GENERALIDADES

2.1 Calidad en la Industria Farmacéutica

2.1.1 Calidad

2.1.2 Administración de la calidad en la industria farmacéutica

2.1.3 Garantía de la calidad

2.1.3.1 Principio de garantía de calidad

2.1.3.2 Buenas prácticas de manufactura

2.1.3.3 Buenas prácticas de laboratorio

2.1.3.4 Control de calidad

2.2 Validación de métodos analíticos

2.2.1 Concepto

2.2.2 Objetivos de la validación

2.2.3 Tipos de validación

2.2.3.1 Validación prospectiva

2.2.3.2 Validación retrospectiva

2.2.3.3 Revalidación o postvalidación

2.2.4 ¿Porqué validar?

2.2.5 ¿Qué validar?

2.2.6 Parámetros de validación de métodos analíticos

2.2.6.1 Precisión

2.2.6.2 Exactitud

2.2.6.3 Sensibilidad

2.2.6.4 Límite de Detección

2.2.6.5 Límite de Cuantificación

2.2.6.6 Linealidad y Rango

2.3 Análisis Instrumental

2.3.1 Cromatografía Líquida de alta performance

2.3.1.1 Conceptos generales

2.3.1.2 Tipos de cromatografía

2.3.1.3 Características del equipo de HPLC

2.3.1.4 Calibración del equipo de HPLC

2.4 Naproxeno Sódico

2.4.1 Propiedades físicas y químicas

2.4.2 Propiedades farmacológicas

III. DESARROLLO DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

PROPUESTO

IV. DISCUSION DE LOS RESULTADOS

V. CONCLUSIONES

VI. RECOMENDACIONES

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

RESUMEN

La validación del método analítico es parte integral del sistema de control de calidad, puesto que confiere fiabilidad a los resultados analíticos obtenidos en un laboratorio de análisis, a fin de asegurar que un medicamento cumpla los parámetros de calidad establecidos. En este trabajo presentamos la validación de un método analítico de valoración de Naproxeno Sódico 550 mg en tabletas, utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta performance establecido en la USP 28. Los parámetros estadísticos empleados en la validación son: La linealidad; que mide la capacidad del método analítico para producir resultados que son proporcionales a la concentración del analito, lo cual queda demostrado en la validación al obtener un coeficiente de correlación $r = 0.99992$, siendo el valor mínimo permisible de 0.997. La exactitud mide la proximidad de los resultados obtenidos por este método y el valor real. Al aplicar el test de student para demostrar la exactitud del método analítico se obtuvo un t_{exp} (1.1932) que es menor al t de las tablas (2.306); por lo tanto no existe diferencia significativa entre la recuperación media y la cantidad añadida de analito, es decir que el porcentaje de recuperación del analito es muy cercano al 100%.

La precisión del método analítico es el grado de concordancia o de dispersión de los resultados de la prueba. Los valores de RSD obtenidos ,(0.17% para repetibilidad y 0.16% para precisión intermedia), nos demuestran la precisión del método analítico donde el valor máximo permitido es un RSD = 2.0%.

La Selectividad y especificidad determinan la capacidad del método analítico de medir el contenido de Naproxeno sódico, sin interferencias de parte de los excipientes o productos de degradación del principio activo.

En el método analítico se obtuvo picos cromatográficos de naproxeno sódico con tiempos de retención similares para la muestra y el Standard, por lo tanto el método es específico. El Standard y el análisis del placebo nos demuestra que ningún excipiente interfiere con el pico del principio activo, como tampoco se ha detectado la presencia de productos de degradación del naproxeno sódico al realizar el análisis del principio activo sometido a diferentes procedimientos de degradación forzada , por lo tanto el método es selectivo.

Inicialmente se estudió los fundamentos del HPLC, luego la definición de tipo de columna y fase móvil más conveniente para la validación, el tipo de equipo que se utilizó, continuando con un análisis químico del principio activo que incluye su estructura química y por último el desarrollo de la validación del método.

PALABRAS CLAVE

Linealidad, precisión, exactitud, naproxeno sódico, HPLC, validación.

SUMMARY

The Validation of analytic methods is an all-round part of the Quality Control System, because it confers reliability to analytical results obtained in the laboratory to ensure that a specific medicine meets established quality requirements. This work presents the Validation of an Analytical Method to perform a quantitative analysis to the active component from 550 mg Sodium Naproxeno tablets using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) according to the USP 26. The validation is based on enough data from laboratory which supports validity of analytical methods. Some important statistical parameters are: Linearity, exactitude, precision, selectivity and specificity. Linearity measures the capacity of the analytic method for producing results which are directly proportional to concentration of an active substance within a specific range, called the work range. The exactitude measures how near the results obtained by the chosen method and the real value are. This is often expressed as recovery percentage. The precision of an analytical method is the degree of concordancy or dispersion of results from testing when procedure is repeatedly applied to multiple samples of an homogeneous sample having a RSD less than 2%. Selectivity and specificity determine the capacity of an analytical method in order to measure the content of sodium Naproxen without interferences caused by excipients or products from degradation of the active component. First, the HPLC principles studied. Next, the chemistry analysis of the active component involving its structure will be carried out.

Then, the most convenient column, mobile phase and equipment for validation will be defined. Finally, the method of validation will be described.

KEY WORDS

Linearity, precision, exactitude, sodium naproxeno, HPLC, validation.

I. INTRODUCCION

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece por medio de un estudio y programa documentado que ese método posee todos los requisitos para el uso propuesto. La validación es parte integral de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y del desarrollo de un método de análisis puesto que sin fiabilidad de los resultados analíticos es imposible asegurar que un medicamento cumple con las especificaciones exigidas, además, contribuye a garantizar la calidad y asegura las propiedades de calidad de un producto determinado. La calidad de los resultados analíticos debe ser acaparada mediante la fiabilidad y reproducibilidad del método analítico utilizado en su obtención y esta demostración debe estar debidamente documentada con el detalle de la preparación de las muestras efectuadas y datos obtenidos. Este tema ha sido objeto de diversos estudios desde hace años y es recomendado por diferentes organismos de carácter oficial; desde la Federal Drug Administration (FDA) en 1976 con su primer concepto en la revisión de las normas correctas de fabricación al considerar los procesos de esterilización. Siete años después, esta misma entidad establece directrices de tipo informativo, que orientan hacia la validación de procesos en un sentido más amplio. Consientes de la importancia del tema, otras entidades como la OMS la OAC y la ICH, además la Farmacopea Europea y la USP 23 consignan la ineludible necesidad de la validación en los procesos analíticos. La validación, por lo tanto, forma parte importante en un programa de aseguramiento de la calidad y es fundamental para una eficiente operación de producción.

OBJETIVOS

General

Demostrar que la técnica de cuantificación de Naproxeno sódico 550 mg tabletas por el método de cromatografía líquida de alta performance, cumple con las exigencias dadas por la USP en todos los parámetros de la validación.

Específicos

- Desarrollar un esquema para la validación, con exigencias de linealidad, exactitud, precisión, selectividad, especificidad, rango y robustez.
- Demostrar la validez de la metodología y verificar los parámetros de aceptabilidad para validar la técnica en función de los criterios de la USP 28, estableciendo un protocolo de validación por cromatografía líquida de alta performance.

II. GENERALIDADES

2.1 CALIDAD DE LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA⁽⁷⁾

2.1.1 CALIDAD⁽⁷⁾

Definición según la Real Academia de la Lengua:

“Propiedad o conjunto de propiedades inherentes a una cosa, que permite apreciarla como igual, mejor o peor que las restantes de su especie”.

Según esta definición se concreta la palabra “cosa” en tres realidades:

- a) Producto: manufacturado o no, que cumpla con los objetivos para satisfacer las exigencias.
- b) Proceso o sistema: industrial o no, que genere el producto que reúna las características planificadas o imprescindibles.
- c) Servicio: público o privado, donde podrían ser incluidos los laboratorios analíticos.

Definición según la Internacional Organization for Standardization (ISO 8402):

“Totalidad de los rasgos y características de un producto, proceso o servicio que inciden en su capacidad de satisfacer necesidades reguladas o implícitas” .

2.1.2 ADMINISTRACIÓN DE LA CALIDAD EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA⁽⁸⁾

En la industria farmacéutica, la administración de la calidad se define como el aspecto de la función administrativa que determina y pone en práctica la “Política de la Calidad, es decir la orientación y las intenciones generales de un organismo en lo que respecta a la calidad, en la forma como lo expresan y lo autorizan las autoridades superiores de dicho organismo.

Los conceptos de garantía de la calidad, (BPM), Buenas Prácticas De Laboratorio (BPL) y control de calidad, constituyen aspectos de la administración de la calidad y se relacionan entre sí.

2.1.3 GARANTÍA DE LA CALIDAD⁽⁸⁾

Uno de los propósitos principales de un laboratorio analítico es la producción de datos de análisis de alta calidad por medio de uso de mediciones analíticas que sean precisas, confiables y adecuadas para tal fin. Este propósito puede alcanzarse de una manera eficaz en función de sus costos, si se cuentan con un sistema planificado y documentado de la calidad de las actividades.

2.1.3.1 Principio de garantía de la calidad⁽⁸⁾

El concepto de garantía de la calidad es muy amplio, y abarca todos los aspectos que influyen individual y colectivamente en la calidad del producto.

Garantía de la calidad⁽⁸⁾

“Actividades planeadas y diseñadas para asegurar que las actividades de control de calidad están siendo implementadas en forma apropiada” (ISO 8402)

Por tanto la garantía de la calidad incorpora las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), Las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y otros factores como el diseño la elaboración del producto. El sistema de garantía de la calidad apropiado para la fabricación de productos farmacéuticos debe asegurar que los productos estén diseñados y elaborados de tal forma que se tengan en cuenta los requisitos de las BPM y otros códigos relacionados, tales como las BPL, asegurando que las operaciones de control y producción estén claramente especificadas por escrito y que se adopten los requisitos de las BPM .

2.1.3.2 Buenas Prácticas de Manufactura⁽¹²⁾

Las Buenas Prácticas de Manufactura han sido desarrolladas para asegurar que los productos farmacéuticos se fabriquen consecuentemente y controladas por los patrones de calidad apropiados para su utilización. Es así que las BPM constituyen el factor que asegura que los productos se fabriquen en forma uniforme y controlada, de acuerdo con las normas de calidad adecuadas al uso que se pretende dar a los productos, y conforme a las condiciones exigidas para su comercialización. Las Buenas Prácticas de Manufactura se refieren tanto a la producción como al control de calidad. Los requisitos básicos del control de calidad son:

- Instalaciones adecuadas, personal entrenado y procedimientos aprobados que deben estar disponibles para el muestreo, inspección y pruebas de materias primas, materiales de embalaje, productos intermedios y finales.
- Las muestras de materias primas, los materiales de embalaje, productos intermedios, productos a granel y productos terminados, que son procesados por personal u por métodos aprobados por el Control de Calidad.
- Los métodos analíticos deben estar validados.
- Los registros son realizados manualmente y/o por instrumentos que demuestren que todo el muestreo, inspecciones y procedimientos analíticos requeridos se llevan a cabo.
- Ningún lote de productos se ponen a la venta o se suministra antes de la certificación por una persona autorizada, en la que se indique que cumpla los requerimientos de la autorización de comercialización.

- Se reservan muestras de dirimencia suficientes de materias primas y productos, para permitir un examen futuro de productos, si fuesen necesario y que el producto se guarda en su empaque final.

2.1.3.3 Buenas prácticas de laboratorio⁽¹²⁾

“Son las normas y procedimientos de operación oficiales considerados como requerimientos mínimos para promover la calidad e integridad de un producto”.

Las Buenas Prácticas de Laboratorio nacen de la necesidad de contar con datos analíticos de confianza y de un seguimiento de todo el proceso, para poder juzgar de la seguridad de un producto. Las (BPL), pretenden promocionar la calidad y validez de los datos de los análisis. Además facilita el comportamiento adecuado del estudio, promueve su exacto y completo reporte de los medios por los cuales se puede verificar la integridad de los mismos.

Para llevar a cabo las normas de BPL, un laboratorio analítico deberá estar organizado de tal modo que cumpla con las condiciones siguientes:

- Cada estudio a llevar a cabo, debe fijarse un director, quien será responsable del desarrollo general y la parte técnica del estudio, así como la interpretación, análisis, documentación e informes de los resultados.
- Debe designarse una unidad de Garantía de la Calidad para auditar los estudios del laboratorio y los datos correspondientes.
- El personal de laboratorio debe estar calificado para seguir directrices y realizar los procedimientos de análisis apropiadamente.
- Todas las actividades del laboratorio deben realizarse de acuerdo con **procedimientos de operación estándar (POES)**, correctamente escritos y entrenados, aprobados por la administración. Estos POES, deben estar fácilmente accesibles al personal directamente involucrado.

- Los materiales de control y prueba deben identificarse y caracterizarse por potencia, pureza y estabilidad. Los reactivos y soluciones deben rotularse con la información del origen, identidad, concentración, condiciones de almacenaje y fecha de caducidad.
- Los instrumentos deben designarse de forma que cumplan los requisitos analíticos así como cumplir un programa regular de mantenimiento y calibración, cuyos registros de estos procedimientos deberán archivarlos convenientemente.

Ante el creciente uso de ordenadores y sistemas automatizados en los laboratorios analíticos (no clínicos), surge el concepto de **Buenas Prácticas de Laboratorio Automatizado (BPLA)**, como a una ampliación a BPL. Los objetivos de las BPLA, están orientados a mantener la integridad de los datos adquiridos por medio del sistema de cómputo. Para cumplir con estos objetivos, los laboratorios analíticos deben cumplir con las siguientes condiciones:

- Preparar la integridad de todos los datos adquiridos.
- Garantizar que las formulas y algoritmos empleados son exactos y apropiados.
- Precisar las personas responsables de la edición y archivo de los datos a diferentes niveles.
- Proveer un procedimiento adecuado del control de cambios.
- Hacer uso de procedimientos adecuados y documentados.
- Contar con planes alternativos frente a fallas del sistema o accesos no autorizados al mismo.

2.1.3.4 Control de la calidad⁽⁸⁾

El control de la calidad forma parte de las Buenas Prácticas de Manufactura, en el cual se encuentran involucrados el muestreo, las especificaciones, y las pruebas,

así como también el procedimiento de organización, documentación y autorización que aseguren la realización de las pruebas pertinentes, y que no se autorice el uso de materiales ni la expedición de productos para su venta y provisión, sin que se haya establecido que su calidad es satisfactoria.

2.2 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS ⁽⁸⁾

2.2.1 CONCEPTO

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, por medio de estudio de laboratorio, que las características de desempeño del método reúnen los requisitos para las aplicaciones analíticas concebidas. Las características de desempeño se expresan en función de los parámetros analíticos que serán descritos más adelante.

2.2.2 OBJETIVOS DE LA VALIDACIÓN ⁽⁶⁾

El objetivo de la validación de un método analítico es dejar evidencia, mediante documentación, del cumplimiento de las condiciones de exactitud, precisión y confiabilidad, así como de la integridad y recuperabilidad de los resultados de los ensayos efectuados. De este modo queda demostrado que se puede confiar en un método para producir el resultado esperado dentro de límites definidos.

2.2.3 TIPOS DE VALIDACIÓN ⁽⁶⁾

2.2.3.1 Validación Prospectiva:

Se realiza cuando se trata del diseño o de la adecuación de un método de análisis para un producto o proceso determinado.

2.2.3.2 Validación Retrospectiva:

Se realiza cuando un método analítico que se ha venido utilizando durante mucho tiempo, no dispone de la evidencia experimental y documentada sobre su validez.

2.2.3.3 Revalidación o postvalidación

Se realiza cuando un método validado ha sido modificado en alguno de los pasos del procedimiento establecido, o se ha variado alguno de los instrumentos, reactivos, o materiales empleados originalmente.

2.2.4 ¿PORQUÉ VALIDAR? ⁽⁶⁾

Nos interesa mantener un método que sea estable, capaz y robusto. Un método validado nos da la seguridad de ello, dado que estas características son esenciales para mantener altos niveles de calidad en los resultados del análisis. Entonces, ¿Por qué validar?:

- validando aseguramos que se cumpla con los requerimientos preestablecidos, confirmando su precisión y exactitud.
- También validando aseguramos que las modificaciones de las condiciones normales de ensayo y medio ambiente operacional no afecten negativamente el resultado final .
- Porque validando tenemos un control de los puntos críticos del ensayo y poder así prevenir y evitar resultados erróneos que afecten la calidad de análisis.

2.2.5 ¿QUÉ VALIDAR? ⁽⁶⁾

En un laboratorio de análisis debe considerarse para validar todo equipo o procedimiento que influya en la calidad final del resultado, así tenemos:

- Los equipos, incluido el control por computadora.
- Los métodos de análisis (se considera aquella que no están comprendidos en obras oficiales como: AOAC, USP, BP, FN, etc.).
- El sistema analítico en su conjunto.
- Todo cambio o modificaciones importantes que se efectúen en el método, equipo o técnica de análisis del producto.

2.2.6 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS ⁽⁷⁾

Las características de desempeño de un método analítico se expresan en función de los parámetros analíticos. Estos parámetros analíticos considerados en la validación son los siguientes:

- Precisión
- Exactitud
- Límite de Detección
- Límite de Cuantificación
- Especificidad *
- Selectividad
- Sensibilidad
- Linealidad
- Rango

* Algunas autoridades hacen la distinción entre especificidad y selectividad. Ambos términos se refieren a la habilidad del método de proveer un cálculo de analito en presencia de otros componentes de una muestra. La diferencia está en que la selectividad del método provee exactitud de resultados para todos los analitos de interés, mientras que la especificidad está referida a la exactitud de resultados para un analito y otros de interés pueden interferir uno con otros. A continuación definiremos los diferentes parámetros analíticos de validación junto con una breve explicación de como puede medirse.

2.2.6.1 PRECISIÓN ⁽⁷⁾

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia o de dispersión de los resultados de la prueba, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a muestras múltiples de una muestra homogénea. Es la medida de cuán cerca están

los valores unos de otros para un número de mediciones bajo las mismas condiciones analíticas. La precisión de un método analítico generalmente se expresa como la desviación estándar relativa (RSD) cuyo valor debe ser menor o igual al 2% para análisis por HPLC (Coeficiente de Validación).

La ICH (International Conference of Harmonization), ha utilizado tres componentes para definir la precisión:

- Repetibilidad o Capacidad de repetición
- Precisión Intermedia
- Reproducibilidad o Capacidad de reproducción

Repetibilidad o Capacidad de Repetición ⁽⁷⁾

Expresa la precisión del método de análisis cuando es realizado por un mismo analista bajo condiciones iguales como equipo, reactivo e intervalos de tiempo. La repetibilidad mide las variaciones dentro de un mismo laboratorio. Se determina analizando un número significativo de muestras tomando de un lote homogéneo. Los resultados se acompañan del valor medio, desviación estándar que debe ser menor o igual al 2%, coeficiente de variación e intervalo de confianza del valor medio, cuya ecuación es:

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{t_{\text{tabla}} \cdot S}{\sqrt{n}}$$

Donde :

X : Media de los resultados

S : Desviación estándar

n : Número de mediciones

La Repetibilidad es el resultado del método de operación sobre un corto intervalo de tiempo bajo las mismas condiciones de trabajo.

Reproducibilidad o capacidad de reproducción ⁽⁷⁾

Expresa la precisión del método de análisis cuando es realizado por diferentes analistas y bajo condiciones ligeramente diferentes, tales como distintos laboratorios, reactivos de distintas marcas, equipo de trabajo diferente, etc. La reproducibilidad mide las desviaciones interlaboratorios y se determina analizando un número significativo de muestras, tomadas de un lote homogéneo, en diferentes laboratorios, por distintos analistas y utilizando distintos equipos, aplicando el mismo procedimiento analítico. Los resultados se calcula usando la siguiente fórmula:

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{t_{\text{tabla}} \cdot S}{\sqrt{n}}$$

Donde :

X : Media de los resultados

S : Desviación estándar

n : Número de mediciones

2.2.6.2 EXACTITUD ⁽⁷⁾

La exactitud de un método analítico es la proximidad entre los resultados, obtenidos por ese método y el valor real. La exactitud puede a menudo expresarse como un porcentaje de recuperación, por medio de la valoración de cantidades conocidas agregadas de analitos. Representa el grado en que un método analítico es exacto para los fines propuestos. Para formulaciones como tabletas, esto puede significar una evaluación potencial de la interacción del principio activo con los excipientes en un diluyente. Este test evalúa la especificidad del método en la

presencia de los excipientes bajo las condiciones de trabajo observadas para el análisis de un producto. Para el análisis de un producto farmacéutico la exactitud es evaluada por el análisis de una mezcla con cantidades conocidas de componentes.

Entre los procedimientos para determinar la exactitud de un método de análisis cabe cita:

- Comparar el método propuesto con otro cuya exactitud haya sido ya establecida.
- Comprobar este parámetro, utilizando como muestra un patrón de calidad certificada.
- Aplicar el método analítico a una muestra o mezcla de excipientes a las que se añaden cantidades conocidas de un analito.

Mediante este último método se agregan cantidades conocidas de analito o mezcla de excipientes, tanto por encima como por debajo del nivel normal previsto. A partir de los resultados obtenidos luego de aplicar el método propuesto, se calcula la exactitud como el porcentaje de analito recuperado por medio de la valoración mediante la siguiente fórmula:

$$\%R = \frac{X}{X_a} \times 100$$

Donde:

%R : Porcentaje de recuperación

X : Cantidad de analito hallado

X_a : Cantidad de analito añadido

Donde el RSD de la cantidad de analito añadido con la cantidad de analito recuperado debe ser menor al 2%. Se procede según el test "T" de student; El criterio de aceptación es si el "T" experimental es menor al "T" de las tablas, para

(n-1) grados de libertad y un nivel de significación del 95% (p=0,05), entonces no existe diferencia significativa entre la recuperación media y la cantidad de analito añadido. El “T” experimental se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$t_{\text{exp}} = \frac{100 - R / \sqrt{n}}{\text{RSD}}$$

Donde:

R : Porcentaje de Recuperación Promedio de todos los datos

n : Numero de datos o mediciones.

RSD : Desviación estándar relativa o coeficiente de variación del total de mediciones.

2.2.6.3 SENSIBILIDAD ⁽⁷⁾

Se define como la capacidad de un método analítico para detectar pequeñas variaciones en las concentraciones de analito en la muestra.

Se calcula inyectando concentraciones menores a las del rango de trabajo y en esas concentraciones se determina la ecuación de la recta:

$$Y = bx + a$$

Donde:

X : La concentración del analito

Y : Valor de la respuesta en área del pico cromatográfico

b : Valor de la pendiente de la recta

a : Valor del intercepto de la recta con el eje y

Extrapolando a una concentración $dx = 0$ se obtiene el valor de Y (blanco), con los datos de la desviación estándar para cada concentración de la curva de calibración a bajas concentraciones se calcula la ecuación que represente a la

recta: Concentración Vs Desviación estándar. De la ecuación de la recta extrapolando la desviación a concentración cero, tenemos el S_{bl} , cuyo valor se empleara en la determinación del límite de detección y el límite de cuantificación.

2.2.6.4 LÍMITE DE DETECCIÓN ⁽⁷⁾

El límite de detección es un parámetro de pruebas de límite. Es la concentración más baja de analito que pueda detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, bajo las condiciones experimentales establecidas. De esta manera, las pruebas de límites solamente fundamentan que la concentración del analito está por encima o por debajo de un nivel de seguridad. Este parámetro hace referencia a la mínima concentración del compuesto en estudio que es posible detectar con certeza, es decir que se puede diferenciar la respuesta dado por un blanco, el cual contiene todos los componentes de la muestra menos el compuesto de estudio. El límite de detección se calcula mediante la fórmula:

$$\text{Lim Detección} = \frac{Y_{bl} + 3 S_{bl}}{b}$$

Donde:

Y_{bl} : Valor de Y a concentración 0

S_{bl} : Desviación estándar a concentración 0

b : Valor de la pendiente

2.2.6.5 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN ⁽⁷⁾

El límite de cuantificación es un parámetro 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 terminados. Se define como la mínima concentración

del analito que puede determinarse con precisión y exactitud aceptable en una muestra, bajo las condiciones establecidas. El límite de cuantificación se calcula mediante la fórmula:

$$\text{Lim Cuantificación} = \frac{Y_{bl} + 10 S_{bl}}{b}$$

Donde:

Y_{bl} : Valor de Y a concentración 0

S_{bl} : Desviación estándar a concentración 0

b : Valor de la pendiente

2.2.6.6 LINEALIDAD Y RANGO ⁽⁷⁾

La linealidad de un método analítico es su capacidad de producir resultados que son directamente proporcionales o mediante una transformación matemática bien definida se convierten directamente proporcionales a la concentración de analito dentro de un intervalo dado. La linealidad generalmente se expresa en función de la varianza alrededor de la pendiente de la recta de regresión calculada, según una relación matemática establecida, a partir de los resultados obtenidos mediante el análisis de muestra con diferentes concentraciones de analito. Esta relación matemática se expresa de la siguiente manera:

$$Y = bx + a$$

Donde:

X : La concentración del analito

Y : Valor de la respuesta en área del pico cromatográfico

b : Valor de la pendiente de la recta

a : Valor del intercepto de la recta con el eje y

El rango de un método analítico es el intervalo entre los niveles superior e inferior del analito, incluyendo estos valores, que se ha demostrado son determinados con precisión, exactitud y linealidad, empleando el método tal cual esta escrito. La linealidad de un método analítico se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos a partir del análisis de muestras con concentraciones de analito a lo largo del rango propuesto por el método. El tratamiento normalmente es el cálculo de una recta de regresión, por el método de cuadrados mínimos, de los resultados de la prueba frente a las concentraciones de analito. En algunos casos, para obtener la proporcionalidad entre el resultado de la valoración y la concentración de la muestra, puede ser necesario someter los datos de la prueba a una transformación matemática antes del análisis de regresión. La pendiente de la línea de regresión y su varianza es una medida matemática de la linealidad; la ordenada al origen es una medida de la desviación potencial de la valoración. El rango del método se valida comprobando que el método analítico proporciona una precisión, exactitud y linealidad aceptables cuando se aplica a muestras que contienen el analito en los extremos del rango así como dentro del rango.

2.3 ANÁLISIS INSTRUMENTAL ⁽¹³⁾

2.3.1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE ⁽¹³⁾

2.3.1.1 CONCEPTOS GENERALES

Las formulaciones farmacéuticas son mezclas complejas que incluyen, además de uno o más componentes medicinalmente activos, una serie de excipientes tales como diluyentes, desintegrantes, colorantes y saborizantes.

La Cromatografía Líquida de Alta Performance, es una técnica de separación constituida por una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. Las separaciones se logran por partición, adsorción o procesos de intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada. Los compuestos a analizar se disuelven en un líquido orgánico y la mayoría de las separaciones tienen lugar a temperatura ambiente. Por lo tanto, la mayoría de las drogas, sean compuestos no volátiles o térmicamente inestables, pueden analizarse mediante esta técnica sin riesgo de descomposición. El tiempo de elusión de un compuesto puede ser descrito por su factor de capacidad, ya que depende de la naturaleza química del compuesto analizado, la composición y la velocidad de flujo de la fase móvil y la composición y el área superficial de la fase estacionaria. La longitud de la columna es un parámetro determinante de la resolución. Sólo los compuestos que tienen diferentes factores de capacidad pueden ser separados por HPLC.

2.3.1.2 TIPOS DE CROMATOGRAFÍAS LÍQUIDAS ⁽²⁾

Cromatografía de pares iónicos

La cromatografía de par-iónico es particularmente útil para la separación de solutos orgánicos cargados, tales como los ácidos y bases orgánicas. Estos compuestos pueden dar retención insuficiente, separación incompleta y/o picos con cola en condiciones de fase reversa.

Este tipo de cromatografía consiste en adicionar al eluyente cromatográfico un elemento iónico de forma que este interactúe con los analitos iónicos neutralizándolos para ser factible su separación en columnas de fase reversa. La formación de pares iónicos posee tres mecanismos probables: El primero tiene como finalidad añadir un segundo ión al eluyente que se combine con los iones de la muestra, enlazándose fuertemente a ellos por formación de un par iónico neutro que ya sufrirá los procesos normales de distribución por reparto, adsorción, etc, entre las fases estacionaria y móvil. El segundo mecanismo probable puede ser la modificación de los iones de la muestra de modo que los pares iónicos así formados participen en el proceso de intercambio iónico. Finalmente, la utilización de pares iónicos para modificar la fase estacionaria adsorbiéndose el contra ión sobre el relleno de la columna, y luego los iones de la muestra de signo contrario se unirán al nuevo contra ión superficial. Se necesita un exceso de contrapones en la fase móvil para mantener una concentración constante de contrapones en la superficie de la parte estacionaria y para que contribuyan al proceso de distribución. Un reactivo de par iónico tal como el ión octil sulfonato o el tetrabutilamonio es adicionado a la fase móvil en una concentración molar, pero a parte de esto, no afecta la retención .

Cromatografía en fase reversa ⁽²⁾

Las fases estacionarias de fase reversa en cromatografía líquida consisten en un ligando no polar unido en la superficie de partículas de sílica microporosa, se estima que el 70% o más de las separaciones analíticas en cromatografía líquida son llevadas a cabo en el modo de cromatografía de fase reversa. Las fases reversas más comunes son: octadecil, octil, feniletil y cianopropil. Debida al amplio

campo de las aplicaciones, fácil uso, y la naturaleza de las fases octadecil y octal, uno de estos es usualmente la primera elección para probar una nueva separación. Las fases móviles en la cromatografía de fase reversa están constituidas por mezclas de solventes polares generalmente agua y un modificador orgánico (Metanol, acetonitrilo, THF), con o sin el agregado de aditivos (sales orgánicas o reactivos de apareamiento iónico), el dioxano y el THF se mezclan tanto con el agua como con solventes no polares (Cloroformo, hexano) y pueden considerarse tanto solventes de fase normal o como de fase reversa, el acetonitrilo tiene por sus propiedades químicas una selectividad muy diferente a la del metanol que es modificador orgánico más utilizado en fase reversa, en mezclas con agua o buffer y por su mayor poder disolvente de sales y reactivos de apareamiento iónico se prefiere frente al acetonitrilo. La retención en la separación por fase reversa está basada en la polaridad del soluto. Las moléculas más polares eluyen primero y las menos polares eluyen después, esto es debido a que las moléculas polares interaccionan con más fuerza con la fase móvil polar. El principal mecanismo de la retención es hidrofóbico o solvofóbico, esto significa que la repulsión de moléculas de la muestra del agua que contiene la fase móvil, controla la retención, no así la atracción entre el soluto y la fase estacionaria. Las fases móviles no polares dan tiempos de retención cortos y son llamados fases móviles fuertes, contrariamente, las fases móviles polares guían las moléculas el soluto hacia la fase estacionaria, dando tiempos de retención más largos, estas son llamadas fases móviles débiles. El principal efecto del solvente en la cromatografía por fase reversa es que la polaridad de la fase móvil controla la retención. El mecanismo secundario de la retención en la cromatografía por fase reversa, es la interacción del soluto con los grupos silanoles en la fase

estacionaria. Debido a que más del 50% de los grupos silanoles en la partícula de sílica permanecen sin reacción después de la primera reacción de enlace y encubrimiento, esta interacción juega un rol importante en la retención. La interacción del silanol es también responsable de los picos con cola cuando los compuestos polares son resueltos cromatográficamente, entonces son comúnmente añadidos a la fase móvil supresores de colas, tal como la trietilamina. Los ajustes de pH pueden también cambiar la retención debido a que los solutos ionizados interaccionan con más fuerza con la fase móvil que aquellos no ionizados y generalmente eluyen con mayor rapidez.

2.3.1.3 CARACTERÍSTICAS DEL EQUIPO HPLC⁽¹⁵⁾

Un cromatógrafo líquido consta de un reservorio que contiene la fase móvil, una bomba para formar la fase móvil a través del sistema de presión, un inyector para introducir la muestra en la fase móvil, una columna cromatográfica, un detector y un dispositivo de recolección de datos como una computadora, integrador, o un registrador. Los sistemas de bombeo de HPLC bombean cantidades exactas de fase móvil desde los reservorios de solventes a la columna mediante una tubería y uniones adecuadas para soportar altas presiones. Las bombas empleadas para el análisis cuantitativo deben construirse con materiales inertes a los componentes corrosivos de la fase móvil y ser capaces de entregar la fase móvil en una velocidad constante, con fluctuaciones mínimas, durante periodos prolongados de tiempo. Después de ser disueltos en la fase móvil u otra solución apropiadas, los compuestos a cromatografiar se inyectan en la fase móvil, mediante muestreadores automáticos. Para la mayoría de los análisis farmacéuticos, la separación se logra por la partición de los compuestos en la solución de prueba entre la fase móvil y la estacionaria. La cromatografía en sistemas que constan de

fase estacionaria polares y fase móviles no polares se denomina “Cromatografía de fase normal”, mientras por el contrario, cuando se emplean fases móviles polares y fases estacionarias no polares se denomina “Cromatografía de fase reversa”.

EL EQUIPO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ⁽¹⁴⁾

Los componentes básicos de un equipo de cromatografía líquida son:

- Una bomba para propulsar la fase móvil.
- Un mecanismo para la introducción de la muestra.
- Una columna que contenga la fase estacionaria.
- Un detector para determinar la separación que tiene lugar y proporcionar datos que permitan una evaluación cualitativa y cuantitativa de los resultados.

METODOLOGÍA DEL DESARROLLO CROMATOGRÁFICO ⁽¹⁵⁾

SISTEMA DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

Este sistema cromatográfico nos da a conocer el uso de cada componente del equipo de cromatografía líquida que nos permite la separación de distintas sustancias.

A. FASE MOVIL ⁽¹³⁾

Las características que debe presentar toda fase móvil para ser útil en cromatografía líquida son las siguientes:

- Disolver la muestra.
- No degradar o disolver la fase estacionaria.
- Tener baja viscosidad.
- Ser compatible con el tipo de detector utilizado.

- Tener una polaridad adecuada para permitir una retención conveniente de la muestra en la columna.

PRECAUCIONES

Es esencial que la muestra sea soluble en la fase móvil para que pueda ser transportada a través de la columna. Cuando se introducen muestras en disolución, puede ocurrir precipitación de la muestra dentro de la cámara de inyección o en la columna, si el disolvente de la muestra y de la fase móvil son muy diferentes en polaridad, causando pérdida de resolución en la separación y por lo tanto ambos se deben de seleccionar con cuidado.

B. ELECCION DE LA COLUMNA ⁽¹³⁾

Diámetro interior

Se empieza con un diámetro interior de 4 mm, el cual es óptimo para la eficacia separadora. La elección del diámetro de la columna dependerá de la concentración de un componente en el efluente y del volumen de fase móvil que debe consumirse en un análisis, todo lo cual se puede relacionar con la velocidad de la fase móvil. Se puede reducir el diámetro de la columna a 1-2 mm si se trata de volúmenes de muestra muy pequeña si se quiere gastar menores disolventes o si se requiere una gran sensibilidad de detección.

Longitud

Se empieza con columnas de 125 mm. Se prolonga con un múltiplo en caso de requerirse un número de platos más elevados para la resolución de los componentes. Se emplearán columnas aún más cortas para problemas de separación muy rápidos pero sencillos, reduciéndose el tiempo de análisis.

Tamaño de partícula de la fase estacionaria

Se empieza con partículas de 7 mm de tamaño medio (permeabilidad óptima; eficacia separadora extremadamente elevada). Se aumenta el tamaño de la partícula si la presión del aparato no es suficiente para columnas muy largas. Se reduce cuando se requiere una mayor eficacia separadora por longitud de la columna, separaciones más rápidas (columnas más cortas) o volúmenes de elusión pequeños (cantidad de muestra reducida).

C. ELECCION DEL DETECTOR ⁽¹⁵⁾

Los detectores deben de reunir ciertas características tales como:

- Tener un amplio rango de respuesta.
- Poseer una respuesta lineal.
- No contribuir al ensanchamiento de la banda extracolumnar.
- Responder a todos los solutos.
- Tener sensibilidad apropiada.
- No afectarse por los cambios de temperatura.
- Poseer una buena relación señal/ruido.
- No destruir la muestra.

Detector de luz ultravioleta

Es el detector más empleado en HPLC, posee buena sensibilidad y rango lineal, el cual le permite detectar analitos en el orden de los nanogramos, no es destructivo y puede emplearse con gradientes de solventes con la única limitación de que estos sean transparentes en la longitud de onda de trabajo de 190 a 350 nm y en algunos equipos se puede extender a la zona visible del espectro (350 a 700 nm) recibiendo así el nombre de detector UV/ Vis.

D) ELECCION DE BOMBA ⁽²⁰⁾

Las bombas de HPLC impulsan la fase móvil proveniente del reservorio de solvente hacia el inyector y desde allí hacia la columna. Básicamente existen 2 tipos de bombas: La de pistón (Bombas reciprocantes) y las de desplazamiento continuo (Bombas jeringa). Las primeras son de uso más difundido; Son muy versátiles y fáciles de adaptar a la rutina del laboratorio, las segundas no emiten pulsos en la entrega de solventes.

Características de las bombas:

- Caudal; Los equipos convencionales operan con caudales entre 0,1 y 10 mL/ min y trabajan con presiones de hasta 6000 psi.
- Exactitud en el caudal; La exactitud en la medición del caudal se refiere a la divergencia entre el caudal de trabajo establecido y el el caudal real entregado.
- Ruido; Se refiere a las variaciones denominadas pulsaciones que presentan las bombas del tipo reciprocante y que conducen a variaciones en el caudal del solvente entregado en intervalos cortos de tiempo.
- Deriva; Es un cambio continuo (Positivo o negativo) en la entrega de solvente que se produce en intervalos de tiempo muy largos (Típicamente durante horas).

2.3.1.4 CALIBRACIÓN DEL EQUIPO DEL HPLC ⁽¹⁵⁾

El término de calibración se aplica al ciclo completo de vida de un instrumento, empezando por su desarrollo y fabricación, continuando con su uso y mantenimiento para finalizar con su obsolescencia. El termino calificación (verificación) se aplica a la etapa del proceso de calibración dedicada a comprobar y documentar el funcionamiento del instrumento tanto a nivel modular como el sistema completo.

La calibración del instrumento HPLC consta de 5 etapas:

Etapa 1: Calificación del fabricante o Calificación del diseño

Etapa 2: Calificación de la instalación

Etapa 3: Calificación de operación

Etapa 4: Calificación de la Performance

Etapa 5: Mantenimiento y recalificación

Calificación del fabricante o calificación del diseño ⁽¹⁵⁾

Es necesario un estudio preliminar para ver factibilidad, requerimientos, así como las características del equipo y del proveedor que nos va a suministrar el equipo.

Calificación de la instalación ⁽¹⁵⁾

Comprende la verificación documentada de que todos los aspectos importantes de la instalación estén en conformidad con las especificaciones del diseño y con las normas reglamentarias.

Calificación de la operación ⁽¹⁵⁾

Comprende la verificación documentada de que los sistemas y subsistemas funcionan de la manera esperada y son capaces de operar en los rangos operativos anticipados. Para lograr esto, es necesario que toda la evaluación deban tener procedimientos escritos, todas las secuencias automáticas deban funcionar repetidamente como lo especificado. Toda la instrumentación deberá calibrarse y deberá haber POES para la operación de cada sistema.

Calificación de la Performance o calificación de funcionamiento ⁽¹⁵⁾

Tiene por finalidad demostrar que cada sistema y piezas del equipo realizan la función para la que esta destinada, resultando en componentes, materiales, productos y resultados conformes a las especificaciones de calidad.

Mantenimiento y recalificación ⁽¹⁵⁾

Después de determinado el tiempo de uso del equipo, las normativas especifican que debe procederse a realizar las operaciones de mantenimiento especificadas en los protocolos de mantenimiento de equipos, seguidas de una nueva calificación del sistema. El periodo determinado de uso se define como un intervalo de tiempo razonable durante el cual el equipo funciona sin pérdida de especificación.

Aptitud del sistema (System Suitability test SST) ⁽¹³⁾

Las pruebas de aptitud del sistema, son una parte integral de los métodos cromatográficos líquidos, se emplean para comprobar que la resolución y la reproducibilidad del sistema Cromatográfico son aptas para realizar el análisis. La forma más simple de evaluar la aptitud del sistema del HPLC es comparar un cromatograma problema contra la de un estándar. Esto permite una comparación de la forma del pico, ancho del pico y resolución de la línea base. Los parámetros que son calculados experimentalmente para proveer un reporte de evaluación cuantitativa de la adaptabilidad del sistema son:

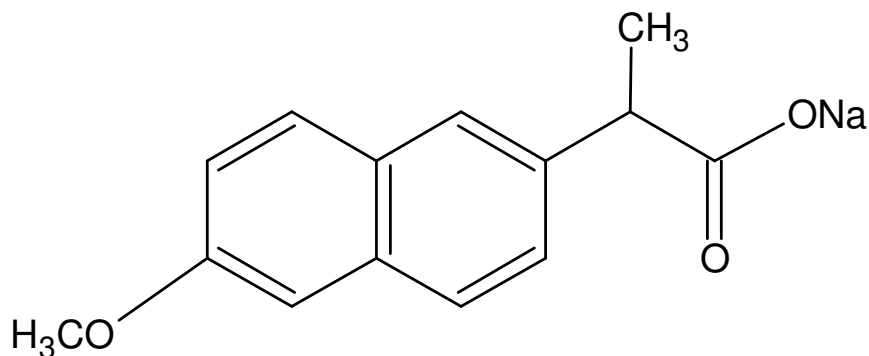
- Numero de platos teóricos.
- Factor de capacidad.
- Separación o retención relativa.
- Resolución.
- Factor de cola o factor de simetría.

2.4 NAPROXENO SÓDICO

2.4.1 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS ⁽¹⁾

FORMULA ESTRUCTURAL ⁽⁵⁾

Esquema N 1



Nombre químico : (S) -6-Metoxi-alfa-metil-2-Naftalenacetato(-)-Sódico

Fórmula molecular : C₁₄H₁₃NaO₃

Peso molecular : 252,24

Rotación específica : -15,3° _ -17,0°

Punto de fusión : 255 °C con descomposición

Características : El Naproxeno Sódico es un polvo cristalino blanco a ligeramente cremoso, soluble en agua y metanol, ligeramente soluble en alcohol y ligeramente soluble en acetona y prácticamente insoluble en cloroformo y tolueno.

Esquema N 1: Fórmula estructural del naproxeno sódico

2.4.2 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS ⁽¹⁾

El Naproxeno Sódico es un miembro de la familia de los AINES con un grupo ácido arilacético, actúa inhibiendo la síntesis de prostaglandinas, pero su mecanismo exacto de actuación es desconocido. Por ser muy soluble en agua, es

rápida y completamente absorbido en el tracto gastrointestinal luego de su administración oral y por ello se obtienen niveles plasmáticos adecuados que permiten iniciar el alivio del dolor dentro de 20 minutos de su administración oral. Los niveles plasmáticos se obtienen dentro de 1 a 2 horas dependiendo de su administración con alimentos. Se une muy bien a la albúmina por lo tanto tiene una vida media mas larga en sangre que otros analgésicos, llegando hasta 12 horas por dosis, la máxima concentración en la sangre tiene lugar el tratamiento a las 2-4 horas tras la ingestión.

El Naproxeno Sódico no deprime el sistema nervioso central, por no ser narcótico ni inductor del metabolismo enzimático. Es empleado en el dolor suave a moderado, la fiebre, la inflamación y rigidez provocado por afecciones como la osteoartritis, artritis rematoidea, artritis psoriática, espondilitis anquilosante, lesiones, calambres menstruales, tendinitis , bursitis y en el tratamiento de la dismenorrea primaria. El Naproxeno Sódico se metaboliza completamente en el hígado a 6-O dimetilnaproxeno, se elimina aproximadamente el 95 % de la dosis de Naproxeno por la orina como Naproxeno inactivado. La excreción renal tiene correlación estrecha con la disminución de las concentraciones plasmáticas. Con las heces se excreta tan solo el 3 % o menos.

SISTEMA DE CALIDAD	Pág 01 De Pág 43
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	NÚMERO
TITULO: VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DE VALORACIÓN DE NAPROXENO SODICO 550mg TABLETA POR HPLC	VERSIÓN
	No FECHA
	01 MAR.07

III DESARROLLO DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

PROPUESTO

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

CONTENIDO

1. Objetivo
2. Alcance
3. Responsabilidad
4. Justificación
5. Calificación Instrumental
 - CROMATOGRAFO LIQUIDO DE ALTA PRESIÓN
 - BALANZA ANALÍTICA
 - AGITADORES MAGNÉTICOS
6. Validación del método
 - 6.1 Descripción del método analítico propuesto
 - 6.1.1 Materiales, reactivos y equipos
 - 6.1.2 Condiciones de trabajo
 - 6.1.3 Procedimiento analítico
 - 6.1.4 Cálculos

ELABORADO POR:	APROBADO POR:	AUTORIZADO POR:

SISTEMA DE CALIDAD	Pág	02
	De Pág	43
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	NÚMERO	
TITULO: VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DE VALORACIÓN DE NAPROXENO SODICO 550mg TABLETA POR HPLC	VERSIÓN	
	No	FECHA
	01	MAR.07

6.2 Diagrama de flujo del método analítico

7. Desarrollo de los parámetros de validación
8. Tratamiento estadístico de los resultados
9. Informe técnico
10. Conclusión
11. Certificado de validación

ELABORADO POR:	APROBADO POR:	AUTORIZADO POR:

1. OBJETIVOS

General:

Demostrar que la técnica de Cuantificación de NAPROXENO 550mg tableta por el método de cromatografía Líquida de Alta Performance, cumple con las exigencias dadas por la USP en todos los parámetros de la validación.

2. ALCANCE

El protocolo describe la validación del análisis cuantitativo empleando el método de Cromatografía Líquida de alta presión para el principio activo Napróxeno en la forma farmacéutica de tableta como producto terminado.

3. RESPONSABILIDADES

- **Analista de productos terminados y analista de materias primas:** Realización de los diversos análisis y de la ejecución del presente reglamento.
- **Responsable de validaciones:** Es el encargado de realizar las coordinaciones con los analistas de productos terminados y materias primas para los análisis programados, es el encargado de la recopilación de los resultados, asimismo debe de emitir un reporte final de la validación de técnicas de análisis.
- **Jefe de Control de Calidad:** Es el responsable de que la prueba de validación se lleve a cabo y proporcionen los datos respectivos.
- **Director Técnico y Jefe de Aseguramiento de Calidad:** Son los responsables del seguimiento y cumplimiento del programa de Validación de Técnicas de Análisis.

- **Comité de validaciones:** Se encarga de la revisión y aprobación del reporte final de la Validación de Técnicas de Análisis.

4. JUSTIFICACIÓN

La técnica por Cromatografía Líquida de Alta Presión, es una técnica que por su naturaleza es muy fiable, es específica, selectiva y de muy buena exactitud por lo que se hace necesaria su validación.

5. CALIFICACION DEL INSTRUMENTO Y DE SU FUNCIONAMIENTO

Los instrumentos empleados en la validación del método analítico son:

- a) HPLC – DETECTOR ULTRAVIOLETA / VISIBLE

MARCA: PERKIN ELMER

MODELO: 250

EL HPLC PERKIN ELMER, es un equipo de fácil uso, diseñado para mediciones cuantitativas, con sistema de inyección.

Las mediciones las realiza en **mV**, a una longitud de onda determinada de acuerdo a la técnica de análisis.

El equipo consta de:

MARCA : PERKIN ELMER

BOMBA : LC250 - BINARIA

HORNO : SERIE 200 PELTIER COLUMN OVEN

DETECTOR : ESPECTROFOTOMÉTRICO ULTRAVIOLETA
VISIBLE LC 290.

INTERFASE : PE NELSON 900, conectada a una computadora.

SOFTWARE : Turbochrom navigator

- b) BALANZA ANALITICA

MARCA : METTLER

MODELO : AT261

SENSIBILIDAD : 0.0001g

CAPACIDAD : 200g

6. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

6.1 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PROPUESTO

6.1.1 Materiales, reactivos, estándares y equipos.

Materiales:

- Fiolas de 10, 25, 50, 100, 200, 250 y 500 mL.
- Probetas de 50, 250, 500 y 1000 mL.
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 5, 10 y 15 mL.
- Vaso de precipitación de 250 mL
- Membrana de nylon de 0.45 µm
- Columna L1 (C18)

Reactivos:

- Agua purificada
- Acetonitrilo HPLC
- Ácido acético glacial
- Fosfato monobásico de sodio
- Fosfato dibásico de sodio
- Hidróxido de sodio 1N

Estándares:

- Naproxeno sódico (Estándar secundario)

El estándar secundario es un patrón de trabajo, cuya potencia se obtiene comparandola con un patrón primario.

- Butirofenona (Estándar interno)

El estándar interno es un patrón de referencia que me va indicar que el análisis cromatográfico se está desarrollando en forma correcta.

Equipos:

- HPLC – DETECTOR ULTRAVIOLETA /VISIBLE

MARCA : PERKIN ELMER

MODELO : 250

- Balanza Analítica

Marca : METTLER

Modelo : AT261

Sensibilidad : 0.0001g

Capacidad : 200g

- Agitadores magnéticos
- Sistema de filtración a vacío

6.1.2 Condiciones de trabajo

- Principio activo : NAPROXENO SODICO (Estándar secundario)
- Especificaciones : 90 -110 % (Naproxeno Sódico)
- Técnica empleada : Cromatografía Líquida de Alta Presión

- **Condiciones HPLC.-**

DETECTOR : 254 nm

COLUMNA : L1, Octadecilsilano

FASE MOVIL : Acetonitrilo: Agua: Ácido acético glacial::63:36:1

FLUJO : 1,2 mL/min

VOLUMEN DE INYECCION : 20 µL

DESVIACION ESTANDAR	: Para replica de inyecciones, no mas que 2%
TEMPERATURA	: 25°C
FASE DILUYENTE	:Acetonitrilo: Agua : 90:10
No DE PLATOS TEORICOS	: mayor de 4000
RESOLUCION	: La resolución entre el pico del analito y del ST Interno no es menor de 11,5

Desviación estándar relativa en la réplica de inyecciones no es más de 1,5%

6.1.3 PROCEDIMIENTO ANALITICO: Todo el proceso se realiza en ambiente de luz amortiguada y con material ámbar o protegido de la luz.

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO

Procedimiento:

1. Solución estándar interno: Diluir 1.0 mL de butirofenona con Acetonitrilo en una fiola de 50 mL, enrasar y homogenizar. Diluir 1,0 mL de esta solución con acetonitrilo en fiola de 50 mL, enrasar y homogenizar. Cada mL de esta solución contiene 0,4 µL de Butirofenona.

2. Solución estándar: Disolver 35 mg de Naproxeno sódico en una fiola de 50 mL con fase diluyente, enrasar y homogenizar. Diluir 2 mL en fiola de 50 mL, adicionar 1 mL de solución standar Interno, enrasar y homogenizar con fase móvil. Esta solución contiene 28 µg/mL, de Naproxeno sódico RS.

3. Solución Muestra: Moler hasta polvo fino, entre 10 a 20 tabletas, transferir una cantidad de polvo exactamente pesada equivalente 70 mg de Napróxeno sódico y colocar en una fiola de 100 mL, añadir 10 mL de agua, y agitar hasta que el material este completamente disperso (10 min). Diluir con acetonitrilo a volumen y agitar por 30 minutos. Diluir 2 mL del líquido del líquido claro en una fiola de 50

mL, adicionar 1 mL de solución estándar Interno, diluir con fase móvil a volumen y homogenizar.

6.1.4 CALCULOS:

$$\% = \frac{\text{Absmp} \times \text{Peso ST} \times 2\text{mL} \times 100 \times 100 \times \text{PostStTC} \times W}{\text{AbsST} \times 50 \times 50 \times \text{PM} \times 2 \times \text{mg/tab}}$$

Donde: mg/tab : Miligramos de Naproxeno sódico por tableta

Abs mp : Absorbancia de la muestra problema

Abs ST : Absorbancia del estándar

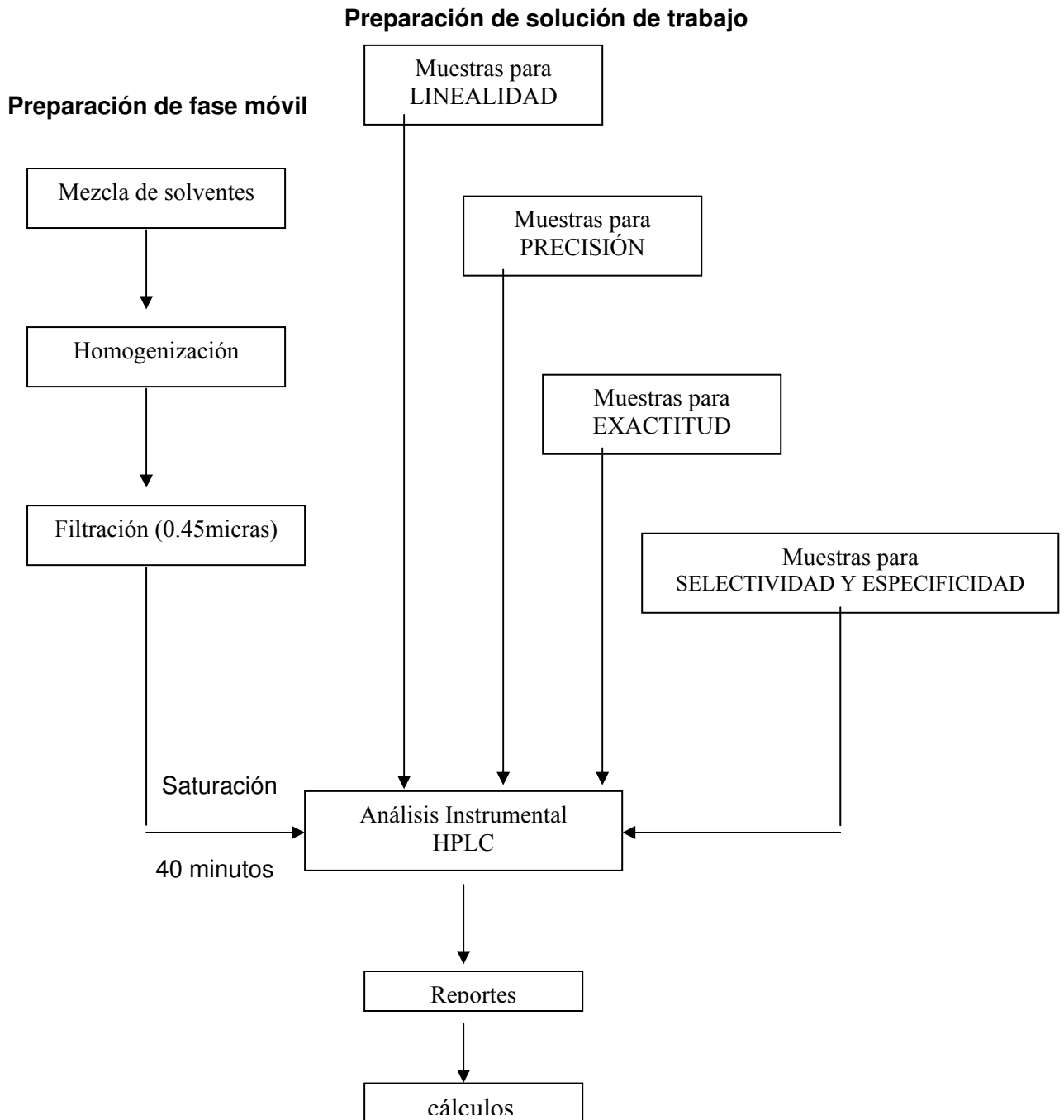
Peso ST : Peso del estándar en miligramos

PM : Peso de la muestra en miligramos

Post St TC : Potencia del estándar tal cual

W : Peso promedio de una tableta

6.2 DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO ANALÍTICO DE NAPROXENO 550mg TABLETA



7. DESARROLLOS DE LOS PARAMETROS DE VALIDACIÓN

7.1 LINEALIDAD.- Es la capacidad de un método analítico de obtener resultados satisfactorios linealmente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un intervalo determinado, de esta manera se halla el intervalo o el rango de trabajo. Este ensayo de linealidad puede efectuarse tanto sobre soluciones patrón del analito, como sobre muestras problemas que contengan concentraciones crecientes del analito.

Se determina empleando estándares de referencia en las concentraciones de 50, 75, 100, 125 y 150%; siendo el 100% una concentración final de 60 µg/mL, que corresponde a la concentración final de la muestra en el ensayo.

7.1.1 Procedimiento analítico

Estándar de NAPROXENIO SODICO

LOTE : C151

Nº ANALISIS : M0019

EXPIRA : 11-2008

a) Solución stock (Concentración = 280 µg/mL)

En una fiola de 100 mL, pesar exactamente 28mg de NAPROXENO SODICO estándar, adicionar 50 mL de fase diluyente y agitar hasta disolver, enrasar a volumen con fase diluyente y homogenizar.

b) Solución estándar interno: Diluir 1.0 mL de Butirofenona en la fiola de 50mL, enrasar con acetonitrilo y homogenizar, diluir 1.0 mL en fiola de 50 mL enrasar con acetonitrilo a volumen y homogenizar.

Preparaciones de las diluciones:

a.1 Solución Estándar al 50% (Concentración = 14 µg/mL)

En una fiola de 100 mL, colocar 5 mL de la solución Stock mas 2.0 mL de solución estándar interno exactamente medidos, enrasa con la fase móvil y homogenizar.

a.2 Solución estándar al 75% (Concentración = 21 µg/mL)

En una fiola de 200 mL, colocar 15 mL de la solución STOCK exactamente medidos mas 4.0 mL de solución estándar interno, enrasar con la fase móvil y homogenizar.

a.3 Solución estándar al 100%(Concentración = 28 µg/mL)

En una fiola de 100 mL, colocar 10mL de la solución STOCK exactamente medidos mas 2.0 mL de solución estándar interno, enrasar con la fase móvil y homogenizar.

a.4 Solución estándar al 125% (Concentración =35 µg/mL)

En una fiola de 200 mL, colocar 25 mL de la solución STOCK exactamente medidos mas 4.0 mL de solución estándar interno, enrasar con la fase móvil y homogenizar.

a.5 Solución estándar al 150% (Concentración =42 µg/mL)

En una fiola de 100 mL, colocar 15 mL de la solución STOCK exactamente medidos mas 2.0 mL de solución estándar interno, enrasar con la fase móvil y homogenizar.

Realizar la filtración de las soluciones por filtro de 0.45 µm e inyectar por triplicado

7.2 PRECISION.- Indicar el “mas-menos” o el grado de reproducibilidad del método analítico bajo condiciones normales de trabajo, es decir la capacidad del método para dar resultados semejantes cuando se aplica repetidamente a una muestra. La idea de precisión, en general, viene expresada por la medida para el valor central y la desviación estándar para la dispersión de los resultados. Un

estudio de precisión requiere la repetición del análisis sobre una muestra. Dentro del término de precisión se pueden distinguir tres estudios.

REPETIBILIDAD: Es la medida de la precisión de un método efectuado en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por un mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos aparatos y reactivos y en el curso de la misma serie de análisis efectuados, generalmente en un corto intervalo de tiempo.

PREPRODUCIBILIDAD: Es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado sobre la misma muestra pero en condiciones diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, etc.) Cuando además los laboratorios son diferentes se habla de preescisión ínter laboratorios.

7.2.1 Procedimiento analítico

a) Solución Estándar de Referencia (Concentración = 28 µg/mL)

Pesar 35 mg de Naproxeno sódico, llevar a una fiola de 50 mL, adicionar más o menos 50 mL de fase diluyente y agitar hasta disolver, enrasar a volumen con fase diluyente y homogenizar, diluir 2 mL de la solución anterior mas 1.0 mL de solución estándar interno en una fiola de 50 mL y enrasar a volumen con fase móvil y homogenizar.

b) Solución Muestra (Concentración =28 µg/mL)

Triturar entre 10 a 20 tabletas y pesar un equivalente a 70 mg de Naproxeno sódico y llevar a una fiola de 100 mL, adicionar 50 mL de fase diluyente y agitar por 30 minutos enrasar a volumen con fase diluyente y homogenizar, diluir 2 mL de la solución anterior más 1.0 mL de la solución estándar interno en una fiola de 50 mL, enrasar con fase móvil y homogenizar, filtrar por filtro 0.45 µm é inyectar 20 µL.

Tanto el estándar como la muestra filtrar por filtro 0.45 µm e inyectar 20 µL.

7.2.1.1 Repetibilidad: Una vez filtrada tanto el estándar y las muestras inyectar por 8 veces cada una, dicho análisis debe ser realizado por un mismo analista, en el mismo HPLC a la misma hora en la misma serie de corrida.

7.2.1.2 Reproducibilidad: Para este ensayo aparte del analista de repetibilidad se necesita otro analista quien cada uno debe realizar 8 inyecciones tanto para el estándar como para la muestra y por 4 días consecutivos. Tanto el estándar como la muestra entre día y día deben ser guardados en la refrigeradora y temperado a medio ambiente para su análisis.

7.3 EXACTITUD.- La exactitud indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo mas próximos posibles al valor verdadero. Matemáticamente la exactitud se expresa en forma de porcentaje de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra o bien en forma de la diferencia entre los valores hallado y el valor verdadero.

Si la diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero es pequeña, la exactitud es buena. Una diferencia grande significa que el que la exactitud es inadecuada y revela la existencia de errores determinados que deberían corregirse.

7.3.1 DETERMINACION DE LA EXACTITUD A VARIAS CONCENTRACIONES

Por el método de análisis repetitivo de varias muestras de concentraciones diferentes conocidas.

7.3.1.1 Procedimiento analítico

a) Solución Estándar de Referencia (Concentración = 28 µg/ mL)

Pesar 35 mg de Naproxeno sódico, llevar a una fiola de 50 mL, adicionar más o menos 50mL de fase diluyente y agitar hasta disolver, enrasar a volumen con fase diluyente y homogenizar, diluir 2.0 mL de la solución anterior mas 1.0 mL de

solución estándar interno en una fiola de 50 mL y enrasar a volumen con fase móvil y homogenizar y filtrar por filtro 0.45 µm e inyectar 20 µL. Inyectar 6 veces

b) Muestras

Se preparan muestras a partir de un placebo, por adición de cantidades exactas del analito patrón correspondiente a 80%, 100% y 120%, sobre el contenido teórico del principio activo de la muestra. Cada muestra se analiza por triplicado y los resultados se expresan en **porcentaje de recuperación**.

Preparación de las diluciones

b.1 Solución Muestra al 80% (Concentración =22.4 µg/mL)

En una fiola de 100 mL, colocar 69.2 mg de placebo mas 225 mg de estándar de Naproxeno sódico, adicionan 50 mL de fase diluyente y homogenizar hasta disolución, enrasar a volumen con fase diluyente y homogenizar, en una fiola de 100 mL diluir 1 mL de la solución anterior mas 2 mL de estándar interno, enrasar con la fase móvil y homogenizar (Inyectar por triplicado).

b.2 Solución Muestra al 100% (Concentración = 28 µg/mL)

En la fiola de 100 mL, colocar 86.5 mg de placebo mas 280 mg de estándar de Naproxeno sódico, adicionar 50 mL de fase diluyente y homogenizar, en una fiola de 100 mL, diluir 1 mL de la solución anterior más 2 mL del estándar interno, enrasar con la fase móvil y homogenizar (Inyectar por triplicado).

b.3 Solución Muestra al 120% (Concentración 33.6 µg/mL)

En la fiola de 100 mL, colocar 103.8 mg de placebo mas 336 mg de estándar de Naproxeno sódico, adicionar 50mL de fase diluyente y homogenizar hasta disolución, enrasar a volumen con fase diluyente y homogenizar. En fiola de 100 mL diluir 1 mL de la solución anterior más 2 mL de estándar interno, enrasar con la fase móvil y homogenizar (inyectar por triplicado)

Las muestras anteriores filtrar por filtro 0.45 µm e inyectar 20 µL

La exactitud se expresa como porcentaje de recuperación del analito en cada ensayo, aplicando la siguiente fórmula:

$$\%R = \frac{X_h}{X_a} \times 100$$

Donde:

%R : Porcentaje de recuperación

X_h : Cantidad de analito hallado

X_a : Cantidad de analito añadido

8. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS:

LINEALIDAD:

Cálculo de la recta de regresión:

Ecuación de la Recta:

$$y = bx + a$$

Donde:

x : Concentración de analito

y : Valor de la respuesta en área de pico cromatográfico

b : Valor de la pendiente de la recta

a : Valor del interfecto de la recta con e eje "y"

Fórmulas para hallar "b"

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

Formulas para hallar "a"

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

Resultados:

Tabla N° 1

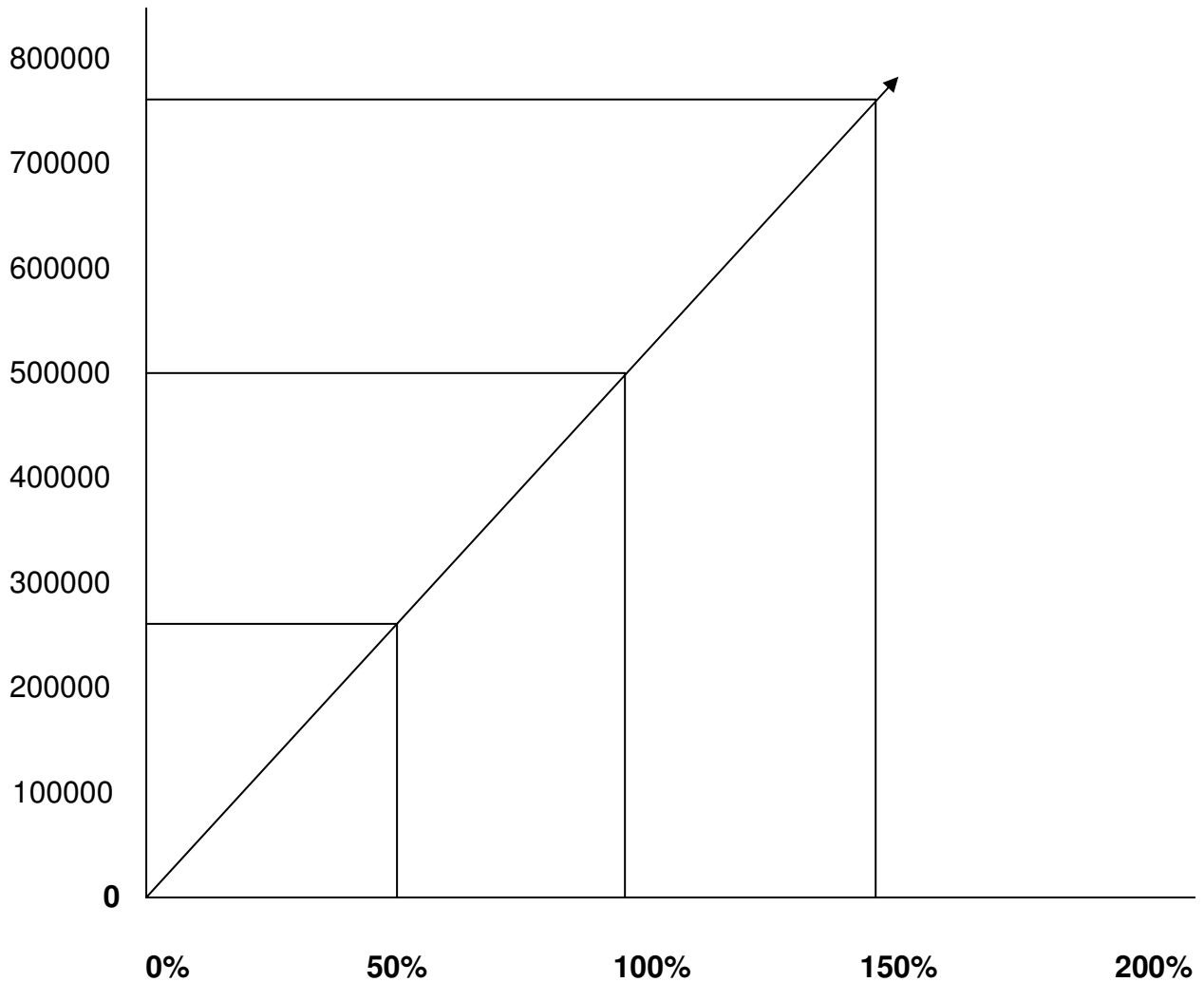
DATO	X µg/mL (Concentración)	Y (Áreas)	X ²	Y ²	F (y/x)
1	1,497475	242132	2,24243	58627663292	161693
2	1,497475	242294	2,24243	58706382436	161802
3	2,2462125	363168	5,04547	131890996224	161680
4	2,2462125	363863	5,04547	132396282769	161990
5	2,99495	488823	8,96973	238947925329	163216
6	2,99495	489630	8,96973	239737536900	163485
7	3,7436875	607799	14,0152	3694190116602	162353
8	3,7436875	608917	14,0152	370779912889	162652
9	4,492425	737447	20,1819	543827340362	164153
10	4,492425	739431	20,1819	546758203761	164595
∑	29,9495	4883504	100,909	5523779976000	1627620

Ecuación de la recta:

$$y = 165250,738744 - 6567,45$$

La tabla N 1: Nos muestra las áreas obtenidas en el cromatograma a diferentes concentraciones del analito.

**Representación gráfica de la recta de la regresión:
Esquema N 2**



Esquema N 2 : Representa la curva de calibración de la linealidad del sistema

Interpretación Estadística de la Regresión Lineal:

a. Coeficiente de correlación “r”:

El coeficiente de correlación “r”, refleja el grado de relación o ligazón entre las variables **x** (concentración), e **y** (respuesta).

- **Test de hipótesis para el coeficiente de correlación “r”:**

H^0 : r es diferente de 1

Criterio de aceptación: r no debe ser significativamente diferente de 1

Fórmulas para hallar “r”:

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

Resultados: r = 0,99992

- **Coeficiente de determinación:**

Es el cuadrado del coeficiente de correlación “r”, e indica la proporción de la varianza total de “y”. Este debe ser mayor o igual a 0,997 para ingredientes activos en una fórmula.

Resultado: $r^2 = 0,99984$

- **Test de hipótesis para demostrar regresión en función del coeficiente de correlación “r”:**

H^0 = No hay correlación entre x e y

Criterio de aceptación: Si el valor “t” obtenido es mayor que el “t” de la tabla, calculado para (n – 2) grados de libertad y un nivel de significación del 95% (probabilidad, p = 0.05), entonces si hay correlación entre x e y.

Fórmula para hallar “t”: t_{exp}

$$t_{exp} = \frac{r / \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

Resultados:

t_{exp} : 216,657786

$t_{(v: 8; \alpha: 0.05)}$: 5,041

b. Test de Linealidad :

- **Desviación Estandar Relativa de los Factores de Respuesta "f":**

Criterio de Aceptación: RSD 5%

Formula para hallar "f":

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

Tabla N°2

Dato	µg/mL Inyectado	Y (Area)	F (Y/x)
1	1,497475	242132	161693
	1,497475	242294	161802
2	2,2462125	363168	161680
	2,2462125	363863	161990
3	2,99495	488823	163216
	2,99495	489630	163485
4	3,7436875	607799	162353
	3,7436875	608917	162652
5	4,492425	737447	164153
	4,492425	739431	164595

Tabla N 2 : Nos indica las desviaciones estandar relativa de los factores de respuesta (El área obtenida /Concentración del analito)

Resultados:

Media de " f " : 162762
 Desviación Estándar de" f " : 1055,984852
 Desviación Estándar Relativa de" f " : 0,649 %

- **Significación estadística de la varianza de la pendiente "b":**

Test de Hipótesis para la pendiente "b":

Ho : b = 0

Criterio de aceptación:"b" debe ser significativamente diferente de cero

Fórmulas para hallar la **varianza** de la pendiente: **Sb²**

$$S_b^2 = \frac{S^2_{x,y}}{\sum (X - \bar{X})^2} = \frac{S^2_{x,y}}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}$$

Formulas para hallar la **varianza** del error experimental total: $S_{x,y}^2$

$$S_{x,y}^2 = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n-2} = \frac{\sum (y - \hat{y})^2 (1 - r^2)}{n-2}$$

Fórmulas para hallar la **desviación estándar** de la pendiente: S_b

$$S_b = \sqrt{S_b^2}$$

$$S_b \text{ rel } (\%) = \frac{S_b \cdot 100}{b}$$

Formulas para hallar los límites de confianza de la pendiente:

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

Donde “t tabla” es el valor de la distribución de Student para (n – 2) grados de libertad y un grado de significación del 95%(probabilidad, $\alpha = 0.05$).

Formula para hallar el valor de “ t ” experimental: t_{exp}

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

Criterio de aceptación:

Si $t_{\text{exp}} \gg t_{\text{tabla}}$; para $\alpha = 0.05$ y (n – 2) grados de libertad, entonces “ b ” es significativamente diferente de cero y se rechaza la hipótesis nula (H_0).

Resultados:

Intervalo de confianza para la pendiente “b” (163491,8903 – 167009,5616)

$$t_{\text{exp}} : 216,657786$$

$$t_{\text{tabla}} : 5,041$$

b. Test de Proporcionalidad:

- **Significación estadística de la varianza del Intercepto “a”:**

Test de Hipótesis para el Intercepto “a”:

$$H_0 : a = 0$$

Criterio de Aceptación: “a”: no debe ser significativamente diferente de cero

Fórmulas para hallar la **varianza** del Intercepto: S_a^2

$$S_a^2 = \frac{S^2_{x,y} (\sum x^2)}{\sum (X - \bar{X})^2 (n)} = \frac{S^2_{x,y} (\sum x^2)}{\sum x^2 - (\sum x)^2 (n)}$$

Fórmulas para hallar la **varianza** del error experimental total: $S^2_{x,y}$

$$S^2_{x,y} = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n - 2} = \frac{\sum (y - \hat{y})^2 (1 - r^2)}{n - 2}$$

Fórmula para hallar la **desviación estándar** del Intercepto: S_a

$$S_a = \sqrt{S_a^2}$$

$$S_a \text{ rel (\%)} = \frac{S_a \cdot 100}{a}$$

Fórmula para hallar los límites de confianza del Intercepto:

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

Donde “t” es el valor de la distribución de Student para (n - 2) grados de libertad a la probabilidad de $\alpha = 0.05$.

Fórmulas para hallar el valor de “t” experimental: t_{exp}

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

Criterio de aceptación:

Si $t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}}$; para $\alpha = 0.05$ y (n - 2) grados de libertad, entonces “ a ” no es significativamente diferente de cero y se rechaza la hipótesis nula (H_0).

Resultados:

Intervalo de confianza para el Intercepto "a": (-12154,650409 a - 980,249591)

t_{exp} : 2,7105

t_{tabla} : 2,306

PRECISION:

Criterios de Aceptación:

a. Desviación Estándar Relativa:

Para una mejor comprensión de los criterios de aceptación les mostramos la siguiente tabla:

PRECISIÓN (ETAPA)	MÉTODO ANALITICO	RSD PERMISIBLE
1. REPETIBILIDAD	a. Cromatográfico	RSD ≤ 2%
	b. Espectrofotométrico	RSD ≤ 2%
	c. Volumétrico	RSD ≤ 2%
2. PRECISION INTERMEDIA	d. Cromatográfico	RSD ≤ 2%
	e. Espectrofotométrico	RSD ≤ 2%
	f. Volumétrico	RSD ≤ 2%

Tabla N 3 : El siguiente cuadro nos muestra el límite permisible de RSD (Desviación Estándar Relativa), para los diferentes métodos de análisis:

b. Límite de Confianza: (Aplicable a Precisión Intermedia)

• **De los Individuales:**

- Media más menos la desviación estándar ($\bar{x} \pm s$)

- Media mas – menos dos veces la Desviación Estándar ($\bar{x} \pm 2s$)

- Media mas – menos la Desviación Estándar multiplicada por la "t" de Student

($\bar{x} \pm t s_x$). El valor de “t” se halla en las tablas de Student para (n – 1) grados de libertad y una significación del 95%. Se aplica cuando el número de replicas es inferior a 30.

- **De los Resultados Promedio:**

- Los límites de confianza de la media de una serie de resultados son:

$\bar{x} \pm t s_x$, siendo s_x la Desviación Estándar de la media (s/\sqrt{n})

Resultados:

REPETIBILIDAD:

Tabla N° 4

DATO	$\mu\text{g/mL}$ Inyectado	$\mu\text{g/mL}$ Encontrado	mg/tab	%
1	28	27,558	68,894	98,420
2	28	27,451	68,628	98,040
3	28	27,488	68,719	98,170
4	28	27,527	68,817	98,310
5	28	27,572	68,929	98,470
6	28	27,558	68,894	98,420
\bar{x}	28	27,526	68,814	98,305

Tabla N 4 : Nos indica el analito recuperado en el analisis cromatográfico en porcentaje y en mg/tab.

Número de Datos : 6

Media \bar{x} : 98,305 %

Desviación Estándar (s) : 0,1686

Desviación Estándar Relativa (RSD) : 0,1672 %

PRECISION INTERMEDIA:

Le presentamos la siguiente tabla:

Tabla No 5

Nº MUESTRA	ANALISTA A CONCENTRACION DE LA MUESTRA AL 100 %	ANALISTA B CONCENTRACION DE LA MUESTRA AL 100 %
1	98,42 %	98,36 %
2	98,04 %	98,02 %
3	98,17 %	98,13 %
4	98,31%	98,28 %
5	98,47 %	98,46 %
6	98,42 %	98,40 %

Tabla N 5 : El siguiente cuadro presenta los resultados obtenidos por los dos analistas, cuyo trabajo fue realizado en diferentes días.

n : 12

X_{12} : 98,29%

Desviación Estándar : 0,1618

Desviación Estándar Relativa : 0,1646

Intervalo de confianza del 95% individual: ($\mu = \bar{x} \pm 0,43350$)

$$(\mu = \bar{x} \pm t_{\text{tabla}} \cdot S)$$

Intervalo de confianza del 95% de la media: ($\mu = \bar{x} \pm 0,17698$)

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{t_{\text{tabla}} \cdot S}{\sqrt{n}}$$

t_{tabla} : 2,201

EXACTITUD:**Cantidad de Analito Hallado:****Tabla No 6**

Porcentaje De analito	N° Inyección	Área Muestra	Cantidad de Analito Hallado (%)
80 %	1	378630	79,470
	2	376811	79,930
	3	238043	79,970
100%	1	482355	101,150
	2	477990	101,390
	3	298042	99,080
120%	1	553369	118,030
	2	556103	117,960
	3	352144	117,910

Tabla N 6 : Nos expresa el porcentaje de analito hallado a las diferentes concentraciones del analito inyectado.

Porcentaje de Recuperación:

Tabla No 7

Cantidad de Analito Añadido(mg)	Promedio % Hallado			Porcentaje de Recuperación		
112,80 112,88 70,71	79,470%	79,930%	79,970%	99,338%	99,913%	99,963%
141,13 141,11 88,20	101,150%	101,390%	99,080%	101,150%	101,390%	99,080%
169,51 169,32 105,08	118,030%	117,960%	117,910%	98,358%	98,300%	98,258%

Tabla N 7: Nos expresa el porcentaje de recuperación del analito en el cromatograma a diferentes concentraciones.

n	:	9
Porcentaje de Recuperación	:	99,528 %
Desviación Estándar	:	1,181
Desviación Estándar Relativa (RSD)	:	1,187

Aplicación del Test “t” de Student:

Criterio de Aceptación:

Si el “t” experimental es menor al “t” d las talas, para (n – 1) grados de libertad un nivel de significación del 95% (p = 0.05), entonces no existe diferencia significativa entre la recuperación media y la cantidad añadida de analito. Formula para hallar el valor del “t” experimental: **t_{exp}**

$$t_{exp} = \frac{|100 - R|}{\sqrt{n}} \cdot RSD$$

Donde:

- R : Porcentaje de Recuperación Promedio de todos los datos
- n : Numero de datos o mediciones.

RSD : Desviación estándar relativa o coeficiente de variación del total de mediciones.

Resultados:

t_{exp} : 1,193

$t_{tablas,(v : 8 ; \alpha : 0.05)}$: 2,306

Como t_{exp} es menor a t_{tablas} , entonces no existe diferencia significativa entre la cantidad media de analito añadido y el porcentaje recuperado.

SELECTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD:

a. Determinación del tiempo de retención del pico de Naproxeno:

Naproxeno en la solución estándar de referencia:

Tiempo de Retención: 3,20 min

Naproxeno en la solución muestra:

Tiempo de retención: 3,20 min

b. Determinación de picos cromatográficos de la fase móvil:

No se detectan picos cromatográficos en la fase móvil.

c. Determinación de picos cromatográficos de excipientes en el placebo:

No se detectan picos cromatográficos de excipientes en el placebo.

INFORME TÉCNICO

PRODUCTO : NAPROXENO SÓDICO 550 mg TABLETAS

METODO : CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PERFORMANCE

PARAMETRO	LIMITE	RESULTADOS
1. LINEALIDAD		
Ecuación de la Recta	$Y = b x + a$	$y = 165250,738744 X - 6567,45$
<ul style="list-style-type: none"> • Coeficiente de Correlación 	$r \geq 0.99$	0,99992
<ul style="list-style-type: none"> • Coeficiente de Determinación 	$r^2 \geq 0.997$	0,99984
<ul style="list-style-type: none"> • Test de Hipótesis para demostrar la regresión en función de "r" 	$t_{exp} > t_{tabla}$	Conforme ($t_{exp} = 216,657786,$ $T_{tabla} = 5,041$)
Test de Linealidad	$RSD \leq 5\%$	0,46%
<ul style="list-style-type: none"> • Factor de Respuesta "f" • Intervalo de Confianza de la Pendiente "b" 	$b \pm t_{exp} \cdot S_b$	163491,890328a167009,587159 Conforme
<ul style="list-style-type: none"> • Intervalo de Confianza del Intercepto "a" 	$a \pm t_{exp} \cdot S_a$	-12154,650409 a - 980,249591 Conforme
2. PRECISIÓN DEL MÉTODO		
<ul style="list-style-type: none"> • Repetibilidad Método Cromatográfico 	$RSD \leq 2\%$	0,17%
<ul style="list-style-type: none"> • Precisión Intermedia Método Cromatográfico 	$RSD \leq 3\%$	0,16%

<ul style="list-style-type: none"> Intervalo de Confianza del 95% Individual 	$x - t_{\text{tabla}} S < \mu < x + t_{\text{tabla}} \cdot S$	97,871499 a 98,738501
<ul style="list-style-type: none"> Intervalo de Confianza del 95% de la Media 	$\frac{x - t_{\text{tabla}} S}{\sqrt{n}} < \mu < \frac{x + t_{\text{tabla}} S}{\sqrt{n}}$	98,128024 a 98,481976
<p>3. EXACTITUD</p> <ul style="list-style-type: none"> Porcentaje de recuperación Test de Hipótesis 	<p>98% - 102%</p> $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$	<p>99,53%</p> <p>Conforme ($t_{\text{exp}} = 1,193219$, $t_{\text{tabla}} = 2,306$)</p>
<p>4. SELECTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD</p> <ul style="list-style-type: none"> Fase móvil Placebo 	<p>No hay respuesta</p> <p>Respuesta menor a 2%</p>	<p>Conforme</p> <p>Conforme</p>

Tabla N 8 : Representa el informe técnico de los diferentes parámetros estadísticos que se han estudiado en la validación del naproxeno sódico tabletas de 550 mg

10. Conclusión:

Los resultados obtenidos cumplen con los parámetros de validación, por lo cual el método de valoración de Naproxeno Sódico en tabletas propuesto, es adecuado para su utilización en los análisis de rutina del producto.

Analista 1

Analista 2

IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

Linealidad:

La linealidad del método de valoración de Naproxeno Sódico en tabletas para el rango del 50% al 150%, queda demostrada al obtener un coeficiente de correlación $r = 0,99992$ a partir de la ecuación de la recta (concentración vs áreas):

$$y = 165250,7387 X - 6567,45$$

Se obtuvo un coeficiente de determinación $r^2 = 0,99984$ siendo el valor mínimo permisible de 0,997. * **Ver esquema N 2 pág 48**

Queda establecido que la pendiente de la recta de regresión (165250,7387), es significativamente diferente de cero mediante la aplicación del test de hipótesis para la pendiente donde el t_{exp} (216,6577) es mayor al t_{tabla} (5,041) para (n - 2) grados de libertad y un nivel de significación del 95%. El intervalo de confianza para la pendiente es: (163491,8903 – 167009,5616). * **Ver pág N 52**

La proporcionalidad entre la concentración de analito y las áreas obtenidas, se demuestra mediante la aplicación de los test de hipótesis para el intercepto de la recta (- 6567,45). El t_{exp} , (2,7105) es mayor al t_{tabla} (2,306), para (n – 2) grados de libertad y un nivel de significación del 95%, por lo tanto, el intercepto de la recta no es significativamente diferente de cero. El intervalo de confianza para el intercepto es: (-12154,6504 a -980,2496). * **Ver pág N 54**

Precisión:

Los valores de RSD obtenidos, (0,17%, para Repetibilidad y 0,16 %, para precisión intermedia), nos demuestran la precisión del método analítico. * **Ver**

tabla N 3 pág 54

Exactitud:

Al aplicar el test de Student para demostrar la exactitud del método analítico, se obtuvo un t_{exp} , (1,1932); menor al t de las tablas,(2,306) ; por lo tanto no existe diferencia significativa entre la recuperación media y la cantidad añadida de analito, es decir que el porcentaje de recuperación de analito es muy cercano al 100%. * **Ver tabla N 6 pág 57**

Selectividad y Especificidad:

El método analito nos permite obtener picos cromatográficos de Naproxeno Sódico con tiempos de retención similares, tanto para el estándar como para la muestra. El análisis Cromatográfico del placebo de tabletas nos demuestra que ningún excipiente interfiere con el pico del principio activo, como tampoco se ha detectado la presencia de productos de degradación de Naproxeno Sódico al realizar el análisis del principio activo sometido a diferentes procedimientos de degradación forzada. Por tanto, el método analítico propuesto es selectivo y específico para el fin propuesto. * **Ver pág N 59**

V. CONCLUSIONES

1. El método de valoración de Napróxeno Sódico propuesto, cumple con las exigencias dadas por la USP 28 en todos los parámetros de la validación. Produce resultados proporcionales a la concentración del analito en la muestra , por lo tanto el método es lineal; Es preciso porque nos permite obtener resultados repetitivos y reproducibles; Es exacto porque permite la recuperación de la totalidad del analito presente en la muestra y es selectivo porque permite el análisis del principio activo sin la interferencia de los excipientes presentes en la tableta.
2. Se desarrolló un esquema para la validación, verificandose el cumplimiento de los parámetros de aceptabilidad y se comprobó la metodología para validar la técnica según la USP 28.
3. Se ha demostrado la validez de la metodología y se ha verificado los parámetros de aceptabilidad para validar la técnica en función de los criterios de la USP 28, y se ha establecido un protocolo de validación por cromatografía líquida de alta performance

VI. RECOMENDACIONES:

1. Con respecto a la validación del método analítico y su adecuada documentación, se recomienda el uso de este formato, el cual contempla de forma detallada su desarrollo, como lo establecen las normas de Buenas Practicas de Laboratorio, desde el establecimiento de objetivos, hasta la elaboración del informe técnico, el mismo que presenta en forma concisa, los resultados.
2. Se debe considerar la validación de métodos analíticos a ser aplicados en las labores de análisis; así estos estén contemplados en las farmacopeas oficiales, ya que las condiciones analíticas no son las mismas que aquellas con las que fueron desarrolladas, además de ser una disposición de la autoridad sanitaria DIGEMID, (Capítulo V del Manual de BPM de Productos Farmacéuticos) quien controla el cumplimiento de este punto, mediante las auditorías periódicas que realiza.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bertran G.katzung, farmacología básica y clínica editorial el manual moderno S.A; 8ª edición; pag 682-684; México DF 2002.
2. Benito del Castillo; Técnicas instrumentales en farmacia y ciencias de la salud 4ª edición, editorial Piro; Barcelona 1998.
3. BP 2004 British pharmaceutical; London, 2004.
4. BP 2005 British pharmaceutical; pag 1386-1387; London 2005.
5. BP 2007 British pharmaceutical; pag 1447-1448; London 2007.
6. Castro M, Gaston S, Pujol M. Validación de métodos analíticos. A.E.F.I. Sección catalana; Madrid, 1998.
7. Castro M, Gaston S,Pujol M. Validación de métodos analíticos A.E.F.I., Sección catalana; Madrid, 1999.
8. Fauli I. Trillo; Tratado De Farmacia Galénica; Validación de Procesos y Analítica de Medicamentos; capítulo 7, pg 115-123; Madrid, 1996.
9. Index Merck 11ª edición Merck Research Laboratories; New Jersey, 1989.
10. Index Merck 12ª edición Merck Research Laboratorios; pag 6507, New Jersey, 1996.
11. Kieffer R.G.; Nally J. ¿Por qué la validación? Pharmaceutical Technology 17 p10 ; New York, 1993.
12. Manual de Buenas Practicas de Manufactura de Productos Farmacéuticos. Ministerio de Salud; Lima, 1999.
13. Quattrocchi O., Abelaira de Andrizzi S., Laba E. Introducción al HPLC. Aplicación y Práctica. Editorial Universitaria de Buenos Aires; Buenos Aires, 1992.

14. Remington Farmacia, Cromatografía ;editorial Panamericana 17^{ava} edición; Buenos aires, 1987;cap 33, pag 809-844.
15. Skoog Douglas. Análisis Instrumental. Ediciones Mc Graw – Hill/ Interamericana 4^a edición; Madrid, 1994.
16. USP 27 The United States Pharmacopeia Convention and National formulary 22 edition; New York, 2004.
17. USP 28 The United States Pharmacopeia Convention and National formulary 23 edition; New York, 2005.
18. USP 29 The United States Pharmacopeia Convention and National formulary 24 edition, pag 1658; New York, 2006.
19. USP 30 The United States Pharmacopeia Convention and National formulary 25 edition, pag 2994-2995; New York 2007.
20. Voight R., Tratado de tecnología Farmaceutica; Editorial Acribia; Zaragoza, 1982.