



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“VALIDACIÓN DE MÉTODO ANALÍTICO DE CUANTIFICACIÓN
DE PREGABALINA 150MG CÁPSULAS, POR CROMATOGRAFÍA
DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) EN LABORATORIO
FARMACÉUTICO QUALIPHARM.”**

Trabajo de titulación presentado para optar el grado académico de
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: MARY ANGÉLICA QUITO PINTA

TUTOR: BQF. FAUSTO CONTERO

RIOBAMBA – ECUADOR

2015

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

YO, Mary Angélica Quito Pinta, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autora, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba 21 de diciembre del 2015

MARY ANGÉLICA QUITO PINTA
CÉDULA DE IDENTIDAD: 0604623413

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de titulación certifica que: El trabajo de Titulación “VALIDACIÓN DE MÉTODO ANALÍTICO DE CUANTIFICACIÓN DE PREGABALINA 150MG CÁPSULAS, POR CROMATOGRAFÍA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) EN LABORATORIO FARMACÉUTICO QUALIPHARM.” de responsabilidad de la señorita Mary Angélica Quito Pinta, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Fausto Contero
**DIRECTOR DEL TRABAJO
DE TITULACIÓN**

Dr. Carlos Espinoza
MIEMBRO DE TRIBUNAL

AUTORÍA

Yo, Mary Angélica Quito Pinta soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del mismo pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

MARY ANGÉLICA QUITO PINTA

DEDICATORIA

A mis Padres, Rosita Pinta y Armando Quito, porque son los pilares fundamentales y el ejemplo a seguir que a pesar de las adversidades que la vida se les ha presentado me han regalado la mejor herencia que es la Educación.

A mis hermanos Fausto, Eduardo, Jimmy, Mónica e Ivette, por brindarme sus apoyo en todo momento, a mis sobrinos Mateo y Melisa por la alegría brindada.

Sobre todo va dedicado para mi hermano Paul que a pesar de no estar aquí junto a nosotros, estoy segura que desde donde quiera que esté nos envía muchas bendiciones.

Mary A. Quito P.

AGRADECIMIENTO

A Dios por haberme regalado la vida y a los mejores padres mundo.

A mis padres y familia porque me han brindado su apoyo incondicional en todo el transcurso de mi vida.

A la Escuela Superior politécnica de Chimborazo, a la Escuela de Bioquímica y Farmacia por haberme brindado la Educación Superior y así conseguir uno de mis sueños más anhelados.

Al BQF Fausto Contero y Dr. Carlos Espinoza por haberme apoyado en el desarrollo del trabajo con el aporte de sus conocimientos.

A la BQF. Daniela Moyano por su amistad y sobre todo por su ayuda y aporte en el desenvolvimiento de las actividades prácticas de este trabajo.

A la Ing. Ana Arias y Ing, Pablo del Hierro por su guía y aporte de conocimientos para culminar con mi trabajo de Tesis.

A mis amigas y amigos por su amistad.

Mary A. Quito P.

ABREVIATURAS

| | |
|-------------|---|
| Cst | Concentración de la solución estándar |
| Cm | Concentración de la solución muestra en mg/ml |
| d | Densidad e la solución |
| FDA | Administración de drogas y alimentos |
| G | Gramos |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta resolución |
| ICH | Conferencia Internacional de Armonización |
| RSD | Desviación estándar relativa |
| SD | Desviación relativa |
| uL | Microlitros |
| CV | Coefficiente de variación |

ÍNDICE

| | |
|---|--------------|
| DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD..... | ii |
| AUTORÍA..... | iv |
| DEDICATORIA | v |
| AGRADECIMIENTO | vi |
| ABREVIATURAS..... | vii |
| ÍNDICE DE TABLAS | xi |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | xii |
| ÍNDICE DE GRAFICOS | xiii |
| ÍNDICE DE ANEXOS..... | xiv |
| RESUMEN..... | xv |
| SUMMARY | xvi |
| CAPITULO I..... | - 1 - |
| 1 INTRODUCCIÓN | - 1 - |
| 1.1 Situación Problemática | - 1 - |
| 1.2 Formulación del Problema..... | - 1 - |
| 1.3 Justificación teórica | - 1 - |
| 1.4 Justificación práctico | - 2 - |
| 1.5 Objetivos..... | - 3 - |
| 1.5.1 Objetivos generales..... | - 3 - |
| 1.5.2 Objetivos específicos | - 3 - |
| CAPITULO II | - 4 - |
| 2 MARCO TEÓRICO | - 4 - |
| 2.1 Validación..... | - 4 - |
| 2.1.1 Definiciones..... | - 4 - |
| 2.2 Validación del método analítico | - 5 - |
| 2.2.1 Procedimientos analíticos que son objeto de validación..... | - 6 - |
| 2.2.2 <i>Los métodos analíticos se clasifican</i> | - 7 - |
| 2.2.3 Objetivo de la validación y la verificación del método analítico..... | - 8 - |
| 2.2.4 Tipos de métodos | - 9 - |
| 2.2.5 Parámetros para la Validación de Métodos Analíticos | - 9 - |
| 2.3 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) | - 15 - |
| 2.3.1 <i>Instrumentación en hplc</i> | - 16 - |

| | | |
|----------|---|---------------|
| 2.3.2 | <i>Bombas</i> | - 17 - |
| 2.3.3 | Inyectores..... | - 18 - |
| 2.3.4 | Columnas | - 19 - |
| 2.3.5 | Fases móviles..... | - 20 - |
| 2.3.6 | Detectores | - 20 - |
| 2.4 | Pregabalina | - 21 - |
| 2.4.1 | Mecanismo de acción..... | - 21 - |
| 2.4.2 | Farmacocinética | - 22 - |
| 2.4.3 | Interacciones farmacológicas..... | - 23 - |
| 2.4.4 | Usos terapéuticos | - 23 - |
| 2.4.5 | Toxicidad | - 24 - |
| 2.4.6 | Posología..... | - 25 - |
| 2.4.7 | Reacciones adversas | - 25 - |
| | CAPÍTULO III..... | - 28 - |
| 3 | METODOLOGÍA | - 28 - |
| 3.1 | Método según bibliografía | - 28 - |
| 3.1.1 | Desarrollo y validación del método HPLC para la determinación de Pregabalina en cápsulas. - 28 - | |
| 3.2 | Guía para validar un método analítico de acuerdo con las directrices ICH | - 29 - |
| 3.3 | Validación del Método analítico mediante HPLC | - 31 - |
| | Lugar de investigación | - 32 - |
| 3.4 | Materiales, equipos y reactivos..... | - 32 - |
| 3.4.1 | <i>Materiales de laboratorio*</i> | - 32 - |
| 3.4.2 | Reactivos..... | - 32 - |
| 3.4.3 | Equipos* | - 32 - |
| 3.4.4 | Aspecto | - 33 - |
| 3.4.5 | Identificación del principio activo | - 33 - |
| 3.4.6 | Preparación de soluciones..... | - 33 - |
| 3.4.7 | Preparación de muestra..... | - 34 - |
| | CAPITULO IV | - 35 - |
| 4 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | - 35 - |
| 4.1 | Especificidad..... | - 35 - |
| 4.2 | Linealidad | - 36 - |

| | | |
|-------|--|--------|
| 4.3 | Exactitud | - 37 - |
| 4.4 | Precisión del método..... | - 38 - |
| 4.5 | Robustez | - 39 - |
| 4.6 | <i>Precisión del sistema</i> | - 40 - |
| 4.7 | “PROTOCOLO VALIDACIÓN DE MÉTODO DE ANALITICO DE CUANTIFICACION DE PREGABALINA 150MG CAPSULA, POR HPLC” | - 41 - |
| 4.7.1 | <i>Objetivo</i> | - 41 - |
| 4.7.2 | <i>Alcance</i> | - 41 - |
| 4.7.3 | <i>Motivo de la validación</i> | - 41 - |
| 4.7.4 | <i>Responsabilidades</i> | - 41 - |
| 4.7.5 | <i>Abreviaturas y definiciones</i> | - 42 - |
| 4.7.6 | <i>Descripción del método analítico</i> | - 42 - |
| 4.7.7 | <i>Parámetros de validación</i> | - 46 - |
| | CONCLUSIONES | - 51 - |
| | RECOMENDACIONES | - 52 - |
| | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | - 53 - |
| | ANEXOS | - 56 - |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|------------|--|----|
| Tabla1.2 | Características generales de las columnas cromatográficas en HPLC | 19 |
| Tabla2-3 | Criterios de aceptación para la validación del método de Pregabalina por HPLC | 31 |
| Tabla 3-4 | Resultados de la corrida del placebo, estándar y muestra de pregabalina | 35 |
| Tabla 4-4 | Resultados de las áreas a de Pregabalina a diferentes concentraciones | 36 |
| Tabla 5-4 | Resultados de las áreas de recuperación de Pregabalina a 3 concentraciones | 37 |
| Tabla 6-4 | Resultados del porcentaje de Pregabalina con la primera Analista | 38 |
| Tabla 7-4 | Resultados del porcentaje de pregabalina para determinar precisión intermedia | 38 |
| Tabla 8-4 | Resultados del porcentaje de Pregabalina a temperatura ambiente a 24h | 39 |
| Tabla 9-4 | Resultados del porcentaje de Pregabalina a refrigeración a las 24 h | 39 |
| Tabla 10-4 | Resultados de las absorbancias del estándar de Pregabalina para la precisión del sistema | 40 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1-2 Diagrama de validación y verificación del método analítico..... | 9 |
| Figura 3-2 Diagrama básico de un sistema de HPLC..... | 10 |
| Figura: 2-2 Parámetros de validación o verificación..... | 17 |
| Figura. 4-2 Equipo de HPLC modelo HP..... | 18 |
| Figura5-2 Bomba de dos pistones en serie..... | 19 |
| Figura 6-2Válvula de inyección utilizada en HPLC..... | 20 |

ÍNDICE DE GRAFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1-4. Linealidad de pregabalina a diferentes concentraciones..... | 36 |
|--|----|

ÍNDICE DE ANEXOS

| | | |
|-----------|---|----|
| Anexo 1. | Cromatograma de Pregabalina estándar | 58 |
| Anexo 2. | Cromatograma muestra de Pregabalina | 59 |
| Anexo 3. | Cromatograma fase móvil | 60 |
| Anexo 4. | Cromatograma Placebo | 61 |
| Anexo 5. | Cromatograma de análisis de Pregabalina 150mg cápsulas, preparado por analista 1 en el día de análisis | 62 |
| Anexo 6. | Cromatograma de análisis de Pregabalina 150mg cápsulas, preparado por analista 2 en el día de análisis | 63 |
| Anexo 7. | Cromatograma de análisis de Pregabalina 150mg cápsulas, a refrigeración en 24 horas | 64 |
| Anexo 8. | Cromatograma de análisis de Pregabalina 150mg cápsulas, a temperatura ambiente en 24 horas | 65 |
| Anexo 9. | Cromatograma exactitud de análisis de análisis de Pregabalina 150mg cápsulas, 60% de principio activo. | 66 |
| Anexo 10. | Cromatograma exactitud de análisis de análisis de Pregabalina 150mg cápsulas, 80% de principio activo. | 67 |
| Anexo 11. | Cromatograma exactitud de análisis de análisis de Pregabalina 150mg cápsulas, 100% de principio activo. | 68 |
| Anexo 12. | Cromatograma de linealidad a concentración de estándar al 80% | 69 |
| Anexo 13. | Cromatograma de linealidad a concentración de estándar al 90% | 70 |
| Anexo 14. | Cromatograma de linealidad a concentración de estándar al 100% | 71 |
| Anexo 15. | Cromatograma de linealidad a concentración de estándar al 110% | 72 |
| anexo 16 | Cromatograma de linealidad a concentración de estándar al 120% | 73 |

RESUMEN

El objetivo de la investigación es, validar el método analítico de cuantificación de Pregabalina 150mg cápsulas en el Laboratorio Farmacéutico Qualipharm, mediante HPLC, con el fin de verificar la calidad en lo referente a dosis de principio activo.

El análisis se realizó mediante la fase inversa de cromatografía líquida de alta resolución. La separación y cuantificación fueron alcanzados en columna Phenomenex C18 relleno de sílica hiposilcon un ODS 250x60mm x 5 μ usando la fase móvil que consistió en una mezcla Fosfato dibásico de potasio anhidro (pH 6.9)y aceto nitrilo (9 5: 5)(v/v) , detección a 200nm a una velocidad de flujo de 1 ml / min.

La separación se logró dentro de $8.5 \pm 0,3$ min para la muestra de Pregabalina. Anchura de pico se encontró a una desviación estándar de 50.83 y el área de pico de la muestra es 468873.91.

El método desarrollado es lineal en el intervalo de concentración seleccionado lo cual la concentración es de 0,5 mg/ml con un coeficiente de correlación mayor a 0.99 con un resultado de 0,997. Es exacto debido a que los criterios de aceptación es de $\geq 3\%$ de CV el valor obtenido es 13.35% y la recuperación va desde 95% hasta 105%, resultado obtenido es 96.69 % .

Es robusto porque no es sensible a pequeñas modificaciones, estable en 24 h a temperatura ambiente y refrigeración. El método es preciso por el CV no excede del 1%.

En conclusión el método analítico de cuantificación para la Pregabalina 150mg cápsulas elaborado por el Laboratorio Farmacéutico Qualipharm fue validado.

Por lo tanto se recomienda su aplicación para garantizar la calidad de sus medicamentos.

Palabras claves: <Pregabalina><Cápsulas><Columna ><fase móvil><cuantificación><principio activo>.

SUMMARY

The aim of the investigation is, to validate the analytical method of quantification of Pregabalin 150 mg capsules in the Pharmaceutical Laboratory Qualipharm, by means of HPLC, in order to verify the quality with regard to dose of the active principle.

The analysis was carried out using the high-performance liquid chromatography in reversed phase. The separation and quantification were achieved in column Phenomenex C18 filled with hypersil silica with a ODS 250x60mmx 5 μ using the mobile phase consisted of a mixture of Potassium Phosphate, Dibasic, Anhydrous(pH 6.9) and acetonitrile (95:5) (v/v), detection to 200nm at a flow rate of 1ml/min.

The separation was achieved within $8.5 \pm 0,3$ min for the simple of pregabalin. Peak Width was found to a standard deviation of 50.83 and the peak area of the simple is 468873.91.

The developed method is linear in the selected concentration range that is 0,5 mg/ml with a correlation coefficient bigger than 0.99, with a result of 0.997. It is exact because the acceptance criterion is of $\geq 3\%$ of CV the obtained value is a 13.35 % and recovery goes from 95% to 105 %, the obtained result is a 96.69%.

It is robust because it is not sensitive to small changes, stable in 24h at room and cooling temperature. The method is accurate because the CV does not exceed 1%.

In conclusion the analytical method of quantification for the Pregabalin 150 mg capsules developed by the Pharmaceutical Laboratory Qualipharm was validated.

Consequently its application is recommended to ensure the quality of its medicinal products.

Key words: <Pregabalin> <Capsules> <Column > <mobile phase> <quantification> <active principle>

GLOSARIO

Pregabalina: Es un grupo farmacoterapéutico de antiepilépticos

HPLC: es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

Calidad: Mejora continua en todas las actividades y procesos

Principio activo: Son las sustancias a la cual se debe el efecto farmacológico de un medicamento

Método analítico: Es un método de investigación que consiste en la desmembración de un todo.

Cuantificación: Es la determinación de la abundancia absoluta o relativa de una, varias o todas las sustancias químicas presentes en una muestra.

Medicamento: Sustancia que sirve para curar o prevenir una enfermedad

CAPITULO I

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Situación Problemática

El Laboratorio Farmacéutico Qualipharm no es un laboratorio acreditado, la validación es uno de los requisitos que se debe cumplir para conseguir la acreditación según la Norma ISO/IEC 17025: 2005, el mismo que proporciona un alto grado de confianza, seguridad del método analítico y se debe realizar con carácter obligatorio cuando se desarrolla un nuevo procedimiento. El mismo que garantizara la calidad y eficacia del medicamento, en este caso garantizaría la eficacia sobre todo el grado de confianza para el paciente al momento de medicarse Pregabalina.

1.2 Formulación del Problema

El Laboratorio farmacéutico Qualipharm, se fabrica algunos productos para diferentes clientes, lo cual permite ser más estrictos en el análisis de sus productos.

Por esta razón el Laboratorio Farmacéutico debe cumplir diversos requisitos legales para cada producto, tanto para los controles de calidad como para los requisitos legales nacionales e internacionales. Lo cual cuenta con un laboratorio de Control de Calidad, donde se llevan a cabo los análisis químico-analíticos necesarios para garantizar la calidad de los diversos productos que se fabrican, para la obtención de la certificación es indispensable que los métodos utilizados tengan su validación apropiada, además debe contar su respectiva actualización para que de esta manera se garantice al consumidor que los productos elaborados son de buena calidad.

1.3 Justificación teórica

La razón por la que se debe de validar los métodos analíticos, utilizados en el laboratorio de control de calidad es para asegurar que los productos que se fabrican han sido sometidos a un estricto control de calidad con métodos confiables y seguros, dando a la Empresa la seguridad de estar elaborando productos de la más alta calidad, cumpliendo con requisitos de las leyes nacionales.

La aplicación de procedimientos adecuados de control de calidad da a la empresa el respaldo necesario para competir con productos de la más alta categoría a nivel nacional e internacional, que

debe ser aprovechada para atraer clientes y que estos estén satisfechos con la calidad del producto que están adquiriendo.

La falta de calidad en alguna de las propiedades o características de los productos, significa pérdida de clientes que son quienes deciden la fidelidad hacia un producto o marca específica y que al final son quienes deciden de manera directa el consumo del producto final.

Las técnicas deben validarse también para establecer por medio de estudios en laboratorio, una base de datos que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Además implica la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad y del error sistemático y al azar de un procedimiento, no solo en la calibración sino en el análisis de muestras reales. La validación debe ser tan exhaustiva como sea necesario para responder a las necesidades de la aplicación en cuestión y a las condiciones del laboratorio en el que se realizan las pruebas. El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento usado para la validación y un protocolo de validación que demuestre que el método se ajusta al uso propuesto.

1.4 Justificación práctico

Para la validación del método analítico de Pregabalina 150mg cápsulas mediante HPLC, se utilizan métodos cuantitativos y dentro de ellos están los parámetros que debe cumplir que son: especificidad, exactitud, precisión linealidad, límite de detención, límite de cuantificación, lo cual deben arrojar datos considerados y contar con la documentación necesaria para comprobar la validez de dichos resultados, dicha documentación es solicitada a nivel nacional para cumplir con las BPM en si este es el problema que se desea resolver, de esa manera poder obtener la certificación de acreditación. También cabe recalcar que la Pregabalina no cuenta con un método para su análisis en la USP esta es la razón indispensable por lo cual debe validarse para poder garantizar su calidad.

El método analítico planteado se va validar mediante Cromatografía de alta resolución ya que es un método que tiene la capacidad de separar mezclas orgánicas complejas, compuestos organometálicos y sistemas bioquímicos para determinar cuantitativa y cualitativamente los componentes de la muestra. Esta técnica tiene un campo de aplicación muy amplio, entre ellos: Medio Ambiente (pesticidas, halocarburos, análisis de aguas, etc), Alimentos (sabores, olores,

aceites esenciales, azúcares, alcoholes, etc), Industria Química (alcoholes, esteres, aldehídos, cetonas, etc), Química forense (abuso de drogas, narcóticos, metabolitos, etc), Industria Farmacéutica (drogas, solventes residuales, etc) e Industria de Petróleo (gases permanentes, gases nobles, mercaptanos, etc), entre otros. (*Castillo. J .1992. p.p 123*)

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

-Validar el método analítico de cuantificación de Pregabalina 150mg capsulas, por cromatografía de alta resolución (HPLC) en Laboratorio Farmacéutico Qualipharm.

1.5.2 Objetivos específicos

-Elaborar un protocolo de validación del método analítico de cuantificación de Pregabalina 150mg capsulas, por cromatografía de alta resolución (HPLC).

-Verificar la validación del método analítico, lo cual cumpla con los parámetros de precisión, exactitud, selectividad, linealidad, límite de detención, límite de cuantificación.

-Definir un protocolo final para la aplicación del método de cuantificación de pregabalina validado, cumpliendo con los requerimientos mínimos.

CAPITULO II

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Validación

Historia de Validación El concepto de validación se remonta a la década del sesenta, en donde las prácticas de calidad se remitían al producto terminado, dando como resultado productos que no cumplían con sus especificaciones de uniformidad de contenido, contaminación cruzada y otros aspectos de interés, situación que se mantuvo por mucho tiempo, causando importantes problemas de salud. (*García Montoya E. 2001 p.p. 45-53*)

Años más tarde, la Food and Drug Administration (FDA), centró sus esfuerzos hacia la elaboración de políticas destinadas al estudio del proceso, más que al del producto. Esto fue rápidamente asimilado por la industria farmacéutica, que ante la necesidad de contar con procesos de fabricación estandarizados, comprobados y reproducibles, comenzó a apuntar en este sentido las actividades destinadas a la implementación de la calidad. De este modo nació el concepto de Validación de Procesos, el cual fue definido como: “Programa documentado que proporciona un alto grado de seguridad que un proceso específico genera consistentemente un producto que cumple con las especificaciones y atributos de calidad predeterminados”. (*García Montoya E. 2001 p.p. 45-53*)

La validación o la verificación de un método se realizan mediante una serie de pruebas normalizadas y experimentales de las que se obtienen datos sobre su exactitud, precisión, etc. El proceso que ha de seguirse para ello debe constar por escrito como procedimiento normalizado de trabajo. Una vez validados o verificados los métodos, su utilización habitual en el laboratorio debe ser autorizada formalmente por la persona responsable, por ejemplo, el director del mismo. (*J. Inczedy, T. Lengyel, y A.M. Ure, Blackwell Science, 1998 p. 23*)

2.1.1 Definiciones

La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas y demostrativas de que un método de análisis es lo suficiente fiable y reproducible para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos (*AEFI. Sept., 1989:p.p 1-94*).

La validación proporciona un alto grado de confianza y seguridad del método analítico y se realiza con carácter obligatorio cuando se desarrolla un nuevo procedimiento, ya que permite asegurar que

el método propuesto hace lo que tiene que hacer. (*Calpena AC, Escribano E, Fernández C. 1990; p.p749-58*)(*USP XXII, 1990:p.p 1225,1710*)

La validación proporciona un alto grado de confianza y seguridad del método analítico y se realiza con carácter obligatorio cuando se desarrolla un nuevo procedimiento, ya que permite asegurar que el método propuesto hace lo que tiene que hacer. (*Calpena AC, Escribano E, Fernández C. 1990;p-p 749-58*)

La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas y demostrativas de que un método de análisis es lo suficiente fiable y reproducible para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos (*AEFI. 1989:p.p 1-94*).

Para demostrar la aplicabilidad de estos métodos que no tienen en cuenta todos los posibles excipientes de una forma farmacéutica, será necesario, por lo menos, efectuar una validación abreviada que evalúe que la especificidad, exactitud y precisión son adecuadas (*AEFI. 1989:p.p 1-94*).

2.2 Validación del método analítico

La validación de un método de ensayo es un requisito primordial cuando deseamos obtener resultados técnicamente válidos, exactos y confiables. Sin embargo, el conocimiento de la importancia de validación, de por qué debe hacerse, cuándo debe hacerse, y saber exactamente lo que necesita realizarse parece ser insuficiente. (*Hannover. Eurachem, .1998 p.p 23*)

“La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.” (*USP 31 –NF 26 Capítulo General Validación de métodos farmacopéicos*)

“La validación de métodos, es el proceso por el cual se demuestra que los procedimientos analíticos son aptos para el uso indicado.” (FDA draft guidance – Analytical Procedures and Methods Validation).

Es necesario señalar que los métodos descritos en farmacopeas u otros textos oficiales se consideran validados, aunque debe aclararse que ellos se refieren solamente a métodos generales y a materias primas. Estos no precisan de validación, aunque deben ser comprobados antes de su utilización rutinaria con la verificación de la idoneidad en las condiciones de laboratorio. Sin embargo, para el caso de las formas farmacéuticas terminadas, que pueden variar su composición cualitativa o cuantitativa según el fabricante, habrá que proceder en cada caso a la validación del método analítico. Para demostrar la aplicabilidad de estos métodos que no tienen en cuenta todos los posibles excipientes de una forma farmacéutica, será necesario, por lo menos, efectuar una validación abreviada que evalúe que la especificidad, exactitud y precisión son adecuadas. (*AEFI. 1989:p.p 1-94*).

La validación de los métodos analíticos se fundamenta en la determinación de diversos parámetros, que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan.

Generalmente se considera que la validación del método está ligada estrechamente con el desarrollo del método. De hecho, no es posible determinar exactamente donde termina el desarrollo del método y donde empieza la validación. Por lo general, muchos de los parámetros de desempeño del método que están asociados a su validación son evaluados, por lo menos aproximadamente, como parte del desarrollo del método. (*Calpena AC, Escribano E, Fernández C. 1991;p.p 749-58*)

2.2.1 Procedimientos analíticos que son objeto de validación

Se deben validar los siguientes procedimientos analíticos químicos, físicos y microbiológicos:

Categoría I: pruebas cuantitativas del contenido del (los) principio(s) activo(s), constituyen procedimientos químicos o microbiológicos que miden el (los) analito(s) presente(s) en una muestra determinada.

Categoría II: pruebas para la determinación del contenido de impurezas o de 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 con exactitud las características de pureza de la muestra. Los parámetros de validación requeridos por una prueba cuantitativa son diferentes a los de una prueba cualitativa de cumplimiento de límite.

Categoría III: pruebas físico químicas de desempeño. Constituyen procedimientos de ensayo que miden características propias del desempeño del medicamento, por ejemplo la prueba de disolución. Las características de la validación son diferentes a las de las otras pruebas, aunque las pueden incluir.

Categoría IV: pruebas de identificación. Aquellas que se realizan para asegurar la identidad de un analito en una muestra. Esto normalmente se realiza por comparación de una propiedad de la muestra, contra la de un estándar de referencia, por ejemplo espectros, comportamiento cromatográfico, reactividad química y pruebas microcristalinas. (*ICH Q2 (R1) 2005*). (*ISO/IEC 17025:2005*)

2.2.2 Los métodos analíticos se clasifican

En métodos cualitativos y los cuantitativos.

Los métodos cualitativos

Exigen la definición de una serie de parámetros cuyo cumplimiento es necesario para la validación:

- Especificidad/selectividad
- Límite de detección
- Precisión (en condiciones de respetabilidad y/o reproducibilidad en laboratorio) y Estabilidad

Los métodos cuantitativos

Exigen, para su validación, que se determine la siguiente serie de parámetros que han de cumplirse:

- Especificidad/selectividad
- Límite de detección
- Precisión (en condiciones de repetibilidad y/o reproducibilidad en laboratorio) y Linealidad y rango de trabajo
- Exactitud (en condiciones de repetibilidad y/o reproducibilidad en laboratorio) y Recuperación
- Incertidumbre de la medición
- Estabilidad.

Otros parámetros cuya determinación es aconsejable, pero no fundamental, son el límite inferior de cuantificación y la robustez. En el caso de que los métodos cualitativos y cuantitativos hayan de ser utilizados por más de un laboratorio, cada uno de ellos debe verificar el método y debe determinar con los otros su precisión y exactitud. (*E. Prichard (ed.), Trace Analysis; 1996*), p.p 32-39.)

2.2.3 Objetivo de la validación y la verificación del método analítico.

Es demostrar que el método utilizado por un laboratorio es adecuado para la aplicación en la que se propone utilizar, así, como también demostrar que las modificaciones que pudieron haberse realizado no afectan su desempeño, ni la confiabilidad de los resultados por este entregado. (M. Thompson, S.L.R. Ellison, R. Wood. 2002 p.p 835 – 85)

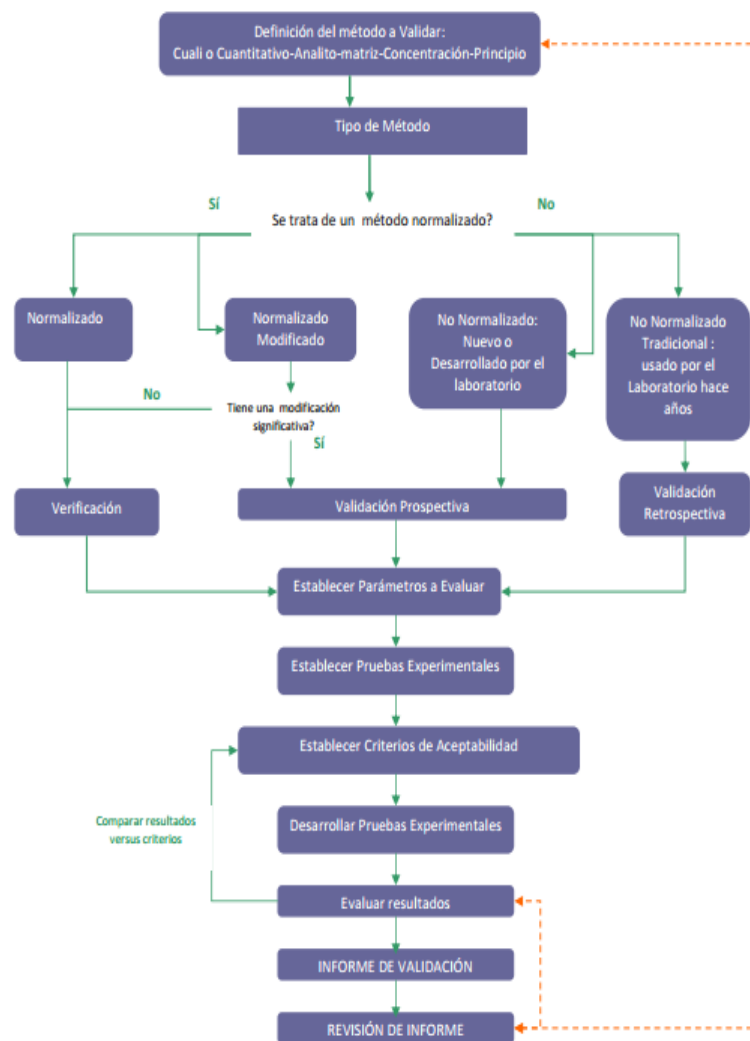


FIGURA 1-2 Diagrama de validación y verificación del método analítico.

Publicado por Marcelo S y Marisol A.

En relación a los parámetros de validación o verificación estos deberán determinarse de acuerdo al tipo de método. Para este fin la siguiente tabla puede ser utilizada como guía:

| PARAMETRO A EVALUAR | CARACTERISTICA(S) | METODO CUALITATIVO | METODO CUANTITATIVO | | |
|---------------------|---|--------------------|---------------------|------------|-------|
| | | | NORMALIZADO | MODIFICADO | NUEVO |
| SELECTIVIDAD | Identificación analito Interferencia de matriz | Sí | No | Sí | Sí |
| LINEALIDAD | Rango lineal | No | Sí | Sí | Sí |
| SENSIBILIDAD | Pendiente | No | Sí o No | Sí | Sí |
| LIMITES | Crítico (LC) Detección (LOD) Cuantificación (LOQ) | Sí | Sí o No | Sí | Sí |
| PRECISION | Repetibilidad Reproducibilidad | No | Sí | Sí | Sí |
| VERACIDAD | Sesgo (s) Recuperación (R) | No | Sí o No | Sí o No | Sí |
| ROBUSTEZ | Test de Youden y Steiner | No | No | Sí o No | Sí |
| APLICABILIDAD | ----- | Sí | Sí | Sí | Sí |

FIGURA:2-2 Parámetros de validación o verificación

Fuente: Swedish National Food Administration 2007.

2.2.4 Tipos de métodos

La guía también establece el alcance de la validación dependiendo de las características del método:

1. *método normalizado*, ejecutado tal y como se establece en el documento.
2. *método normalizado modificado*, en el cual se hayan realizado cambios que puedan tener repercusión sobre la calidad de los resultados; por ejemplo cambio en la metodología de extracción, cambio en la matriz, extensión del rango, equipamiento nuevo, etc.
3. *método interno*, elaborado por el laboratorio o sacado de la bibliografía pero sin datos de performance del método. (Norma ISO 17025)

2.2.5 Parámetros para la Validación de Métodos Analíticos

Las características de desempeño del método analítico se expresa en función de los siguientes parámetros analíticos. (Soberon E; García M; Cortés M; Rodríguez R; Herrera J; Alcántara A. Guía 2002. p.p 8-11)

2.2.5.1 Linealidad del sistema.

Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado.

Luego de realizar el gráfico se puede observar el comportamiento de la curva y establecer cualitativamente el rango lineal. Después de establecer el comportamiento lineal del método se deberá realizar la Curva de trabajo o curva de calibración. Graficar los datos de concentración de los estándares de calibración estimados (X) v/s la lectura observada (Y).

Calcular el valor de la pendiente (b1), la ordenada en el origen (b0), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente (IC(β_1)). (Soberon E; García M; Cortés M; Rodríguez R; Herrera J; Alcántara A. Guía 2002. p.p 8-11)

Criterios de aceptación:

- $r^2 \geq 0.98$

- IC(β_1), no debe incluir el cero.

- La linealidad se determinará con la siguiente fórmula: $Y = b_1X + b_0$

Siendo:

X = concentración de la muestra analizada

b1= valor de la pendiente

Y = respuesta

b0= término independiente (ordenada al origen)

Para determinar la pendiente (b1) se utilizará la siguiente fórmula:

$$b_1 = \frac{n\sum xy - \sum x \sum y}{n\sum x^2 - (\sum x)^2}$$

n = Número de mediciones (concentración–respuesta analítica)

Para determinar la constante b0 (ordenada al origen) se utilizará la siguiente fórmula.

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Para la interpretación estadística de la regresión lineal se determinará:

El coeficiente de determinación (r^2)

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

Intervalo de Confianza para la Pendiente. $IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$ (4)

Desviación estándar de la pendiente.

$$S_{b_1} = S_y \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

Desviación estándar de regresión.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$$

(Soberon E; García M; Cortés M; Rodríguez R; Herrera J; Alcántara A. Guía 2002. p.p 8-11)

2.2.5.2 *Selectividad*

La selectividad es el grado en que un método puede cuantificar o cualificar al analito en presencia de interferentes. Estos interferentes normal o frecuentemente se encuentran en la matriz de interés. La prueba de selectividad puede diseñarse de acuerdo al método, en el caso de cromatografía la resolución entrega información sobre la selectividad del método, en el caso de espectrofotometría el espectro de absorción o un espectro de masas entrega información al respecto, en especial cuando es comparado en presencia de una interferencia. Una prueba de Selectividad comúnmente utilizada, consiste en analizar un mínimo de tres testigo reactivos, tres blancos de matriz y tres muestras o estándares de concentración conocida del analito de interés. Se deben comparar las lecturas (señales de medición) obtenidas para cada caso, y observar si existen variaciones entre los testigos reactivos, blancos de matrices y estándares o muestras con analito. Si se encuentran diferencias significativas deberán ser identificadas y en lo posible eliminadas.

2.2.5.3 *Precisión*

La precisión podrá establecerse en términos de repetibilidad y reproducibilidad. El grado de precisión se expresa habitualmente en términos de imprecisión y se calcula como desviación estándar de los resultados (Referencia: Manual Codex Alimentarius 18° Ed.).

a) Repetibilidad: Es la precisión bajo las condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de análisis independientes se obtienen con el mismo método en ítems de análisis idénticos en el mismo laboratorio por el mismo operador utilizando el mismo equipamiento dentro de intervalos cortos de tiempo. Se puede determinar registrando a lo menos 3 mediciones bajo las mismas condiciones (mismo operador, mismo aparato, mismo laboratorio y en corto intervalo de tiempo) de un analito en un Material de Referencia. Calcular la Desviación Estándar (Sr) y el porcentaje de coeficiente de variación (CVr%).

b) Reproducibilidad: Es la precisión bajo las condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de los análisis se obtienen con el mismo método en ítem idénticos de análisis en condiciones diferentes ya sea de laboratorio, diferentes operadores, usando distintos equipos, entre otros. Para determinar la precisión de la reproducibilidad intralaboratorio (Ri) (es decir, la

precisión dentro de un laboratorio), se sugiere realizar 3 mediciones de un Material de Referencia (MRC o material control).

También, se puede determinar registrando a lo menos 3 mediciones, cambiando a lo menos una condición analítica (ejemplo: operador, aparato, reactivos y largo intervalo de tiempo) de un analito en un Material de Referencia. Calcular la desviación estándar (S_R) y el porcentaje de coeficiente de variación ($CV_R\%$).

Cuando se desea determinar la reproducibilidad interlaboratorios para fines de validación de un método, deben participar diferentes laboratorios, se debe tener en consideración que estos utilicen el mismo método y misma muestra, en un intervalo de tiempo preferentemente establecido, se determina de este modo la desviación estándar de los resultados obtenidos por los diferentes laboratorios (S_R). El criterio de aceptabilidad para la precisión se puede hacer en base a coeficiente de variación de Horwitz :

$$CV_h\% = 2^{(1-0.5)\log C} \quad \text{o también se expresa como } CV_h\% = 0,02 \times c^{0.8495}$$

Dónde:

C= valor nominal del analito expresado en potencia de 10, ejemplo 1ppm = 1mg/L = 10^{-6}

En este sentido se establece para la repetibilidad, el $CV_r\%$ obtenido debe ser $< (CV_h\%/2)$.

En el caso de la reproducibilidad interlaboratorio el $CV_R\% < (CV_h\%/3)$. para la reproducibilidad interna (intralaboratorio) $CV_{Ri}\% < (2CV_h\%/3)$.

El Codex menciona que para coeficientes de concentración $< 10^{-7}$, se aplica la teoría de HorwitzThompson, esto es, $CV_T = 22\%$.

2.2.5.4 Límite de detección

Se trata de la concentración mínima de analito que puede ser detectada e identificada con un determinado grado de certidumbre. El límite de detección se define también como la concentración mínima que puede distinguirse del ruido de fondo con un determinado grado de confianza. Para estimar el límite de detección pueden utilizarse varios métodos, todos los cuales dependen del análisis de especímenes en blanco y el examen de la relación entre la señal y el ruido. Por lo general se acepta un requisito mínimo de relación señal/ruido de 3/1. El límite de detección no es un parámetro robusto y puede resultar afectado por cambios menores del sistema analítico (por ejemplo, temperatura, pureza de los reactivos, efectos de matriz, condiciones instrumentales). Por

tanto, es importante que este parámetro sea siempre verificado por laboratorios que hayan adoptado métodos previamente validados.

2.2.5.5 Exactitud (sesgo)

Medición de la diferencia entre los resultados previstos del análisis y el valor de referencia aceptado, debido a un error sistemático del método y del laboratorio. Normalmente se expresa en porcentaje. La exactitud y la precisión determinan el error total del análisis. La exactitud se determina teóricamente utilizando material de referencia certificado (MRC) si es posible, métodos de referencia, estudios en colaboración o mediante comparación con otros métodos [4]. En la práctica, pocas veces se dispone de MRC para analizar drogas objeto de consumo indebido. Para las drogas de este tipo que se encuentran en los fluidos biológicos se dispone de los MRC del Instituto Nacional de Normas y Tecnología (NIST) de los Estados Unidos, pero no abarcan un gran número de sustancias. Como alternativa, pueden utilizarse los patrones de referencia de una organización autorizada, como la UNODC, la Dirección de Lucha contra las Drogas (DEA) de los Estados Unidos o un proveedor comercial acreditado. Lo normal es estimar la exactitud analizando muestras añadidas con tres concentraciones distintas (baja, media y alta) que abarquen la totalidad del rango de trabajo. La concentración de estas adiciones estándar debe ser distinta de la utilizada para preparar las curvas de calibración y debe prepararse con una solución estándar de trabajo distinta. Los criterios de aceptación de la exactitud deben ser similares a los utilizados para medir la precisión.

2.2.5.6 Recuperación

Por recuperación de analitos en un ensayo se entiende la respuesta del detector ante una adición o extracción de analito de la matriz, en comparación con su respuesta ante la concentración real del estándar de referencia verdadero (los materiales incautados). También puede entenderse como el porcentaje de droga, metabolito o estándar interno presente inicialmente en el espécimen, que llega hasta el final del procedimiento. Tratándose de especímenes biológicos, las muestras en blanco de la matriz biológica después de haberse obtenido los últimos extractos pueden ser objeto de una adición estándar del componente puro y auténtico con su concentración real y ser analizados a continuación. Los experimentos de recuperación deben hacerse comparando los resultados analíticos de las muestras extraídas con tres concentraciones (normalmente iguales a las de las muestras de control utilizadas para valorar la precisión y exactitud de un método). No es necesario que la recuperación del analito sea del 100%, pero el grado de recuperación (del analito y del estándar interno) debe ser estable (con cualquier tipo de concentración analizada), precisa y reproducible (más del 20%).

2.2.5.7 Robustez

La robustez de un método analítico es la resistencia al cambio en los resultados obtenidos por un método analítico cuando se realizan desviaciones menores a partir de las condiciones experimentales descritas en el procedimiento. Los límites de los parámetros experimentales deben especificarse en el protocolo del método, y dichas desviaciones permisibles, por separado o en combinación, no deben producir cambios significativos en los resultados obtenidos (un “cambio significativo” implica que el método no puede funcionar dentro de los límites de incertidumbre que definen la adecuación al propósito). Deben identificarse los aspectos del método susceptibles de afectar a los resultados y debe evaluarse su influencia en el rendimiento del método mediante pruebas de robustez. (*Farmacopeia Europea 1991. pp. 1241-1255*)

Un método es más robusto entre menos dependan los resultados del ensayo de una modificación en las condiciones de éste. Al desarrollar un nuevo método analítico debe determinarse la modificación de los resultados por el cambio en las condiciones del ensayo.

Las condiciones que afectan el método de medición son por ejemplo, para el caso de cromatografía:

- Laboratorio, lugar de la medición
- Personal.
- Aparatos.
- Reactivos, disolventes, estándares, etc.
- Caudal de la fase móvil.
- pH de la fase móvil (p. ej. en HPLC).
- Gradiente de temperatura (p. ej. en GC)

Modificaciones pequeñas a estas condiciones deben afectar muy poco o nada al resultado del análisis.

Para determinar la robustez de un procedimiento analítico pueden modificarse algunas condiciones del análisis y seguir las afectaciones a los resultados o a los parámetros estadísticos. A menudo se utiliza también la evaluación de espectros o cromatogramas. (*Guía para validación de métodos de ensayo 2003*)

Un aspecto importante de la robustez es la estabilidad de todas las muestras, estándares y reactivos, tanto en el almacenamiento como durante las condiciones de ensayo. En este caso pueden ser parámetros a probar:

- Sensibilidad a la temperatura.

- Sensibilidad a la luz.
- Hidrólisis p. ej. por la humedad del aire.
- Facilidad de oxidación.
- Descomposición química.
- Efectos catalíticos, p. ej. por las paredes del contenedor.
- Adsorción, p. ej. durante la filtración de disoluciones con trazas.
- Precipitación, p. ej. al dejar mucho tiempo una disolución. (*Hortwitz W. 1982. pp. 54-67*)

2.3 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para que la cromatografía líquida en columna sea una modalidad competitiva en comparación a la cromatografía de gases, se necesita trabajar a elevadas presiones en lugar de utilizar solo la fuerza de gravedad para hacer pasar la fase móvil a través de la fase estacionaria. Así lo predijo Giddings en 1965 y se desarrollaron las primeras aplicaciones con Kirkland, Huber y Holvach hacia 1967. Una presión entre 500 y 5000psi de fase móvil permite reducir el tamaño de partícula de la fase estacionaria, que aunque muy empaquetada, deja que la fase móvil atraviese, de esta manera se aumenta la eficiencia de separación, también se reduce drásticamente el tiempo de separación de 5 a 50 veces en comparación con la modalidad de baja presión. Esta nueva modalidad permitió también la detección continua, es decir un instrumento que separa y suministra la información cualitativa y cuantitativa. Entre las técnicas cromatográficas más conocidas cuya fase móvil es un líquido, la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es la más conocida y la que trataremos en este trabajo, el éxito de esta técnica cromatográfica se debe a la posibilidad de actuar de forma muy precisa sobre la selectividad de los compuestos a través de la elección de la columna y de la composición del diluyente, es decir, aprovechar las interacciones disolución/fase móvil/fase estacionaria, el intercambio de iones o las de interacción hidrofóbica aumenta aún más las posibilidades del HPLC. La técnica por HPLC constituye una técnica analítica de uso muy generalizado, deriva de una evolución de la cromatografía preparativa en columna, cuyos resultados, en términos de selectividad y resolución, han mejorado mucho por la miniaturización y la utilización de fases estacionarias muy elaboradas. Estas fases constituidas generalmente por partículas esféricas cuyo diámetro se encuentra de entre 2 y 5µm, provocan una pérdida de presión importante en la columna. Por lo tanto, es necesario aplicar una fuerte presión a la fase para obtener un caudal conveniente. (*García de Marina, A. Castillo .1988*)

2.3.1 Instrumentación en hplc

La cromatografía líquida en columna, se desarrolla en instrumentos llamados cromatógrafos, el cual proporciona información sobre la composición al tener un detector continuo integrado en el sistema hidrodinámico cromatográfico. En la figura 2.7 se muestra un diagrama esquemático de los componentes de un cromatógrafo de líquidos.

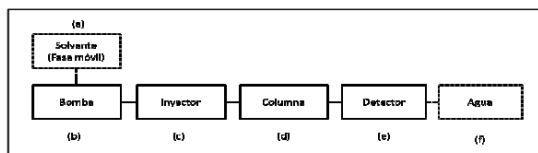


Figura 3-2 Diagrama básico de un sistema de HPLC

Fuente: (Weston y Brown 1997)

El cromatógrafo consiste de un contenedor del disolvente (Fase móvil), (b) una bomba que mueve el eluyente y la muestra a través del sistema, (c) un inyector de la muestra, (d) una columna que provee el soluto de separación, (e) un detector que nos permite visualizar la separación de los componentes y (f) un recipiente de residuos. En la figura 2.8 se puede observar un equipo de HPLC , es un ejemplo de una instalación modular, aquí se muestra un equipo modelo HP1200 que incluye un inyector automático que, que permite el funcionamiento continuo, un controlador de temperatura de la columna, los compuestos que son diluidos , después de su paso por el detector UV . En la actualidad existen una gran cantidad de cromatógrafos en el mercado, existen dos grandes opciones según la concepción instrumental, la más económica y versátil responde a un diseño modular, de tal manera que sobre el diseño básico puedan ir acoplándose o sustituyéndose, diversos módulos o sustituir los detectores, cada vez es más frecuente en el mercado la opción integral que tiene la ventaja de control único a través de un microprocesador, lo que sin duda reduce la intervención humana y eleva la seguridad del proceso analítico , pero tiene los inconvenientes de la falta de flexibilidad (los módulos no pueden operar independientemente) y su elevado costo.(Ross, P. J. 1996 [en línea])

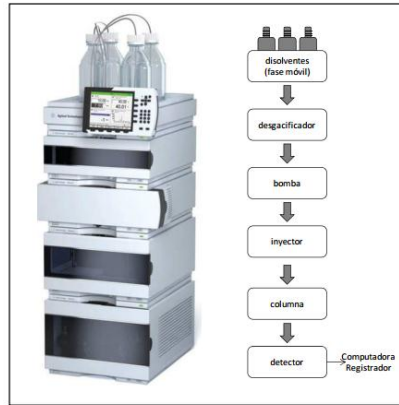


Figura. 4-2 Equipo de HPLC modelo HP

Fuente: Gregorio F.

2.3.2 Bombas

Los equipos de HPLC utilizan al menos una bomba para forzar el paso de la fase móvil a través de la columna cuyo relleno, muy compacto, es responsable de una sobrepresión muy importante a nivel del inyector, esta presión puede alcanzar 20,000 KPa (200 bares) según el caudal de la fase móvil, su viscosidad y el tamaño de partículas en la fase móvil. Se utilizan bombas de alta presión diseñadas para mantener un caudal sin pulsos y estable, incluso cuando la composición de la fase móvil varia, estas bombas pueden ser de un solo pistón o bien llevar dos pistones que funcionan en oposición y situados en serie para evitar las interrupciones de caudal que resultan de la fase de relleno. Para regular el caudal, el desplazamiento de los pistones se controla por un motor de pasos asociado a una leva de forma particular. El funcionamiento de dos pistones en serie el embolo que se encuentra en la parte de abajo expulsa una cantidad de disolvente del doble a la del embolo de arriba, debido a que su diámetro es mayor, (a) y (b). En (a) El volumen del eluyente almacenado en el cilindro corresponde al embolo B y es enviado a la columna, mientras tanto el embolo A aspira una nueva cantidad del eluyente, en (b) cuando el embolo expulsa el eluyente, la mitad de este rellena el cilindro del embolo B, y de esta manera regula el caudal. En (c) se tienen dos émbolos de igual diámetro pero uno de ellos tiene un recorrido y una velocidad del doble de la del otro. En el grafico se observa las variaciones del flujo en función del movimiento de los émbolos. (*McGraw-Hill. 15. Rouessac, F., A. Rouessac, et al. 2003 p.p 234*)

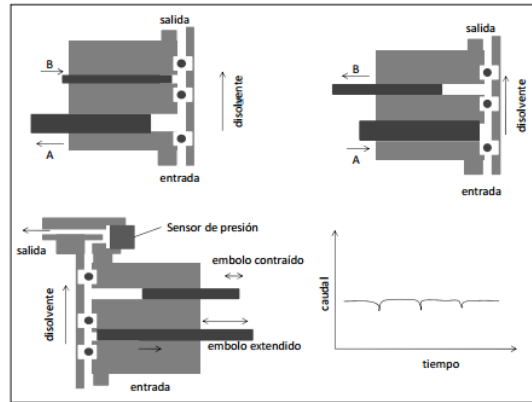


Figura5-2 Bomba de dos pistones en serie

Fuente: Basad en (Roussac et al. 2003)

Dependiendo de su diseño, los cromatógrafos pueden incluir una o varias bombas, situada en la entrada o en la salida, estas están asociadas a una cámara de mezcla. Las bombas permiten liberar un eluyente de composición fija (modo isocrático), o de composición variable para hacer un gradiente de elución. Para un sistema por gradiente se debe de tener en cuenta que la composición de la mezcla no se modifique por acción de la presión. (*Quattrochi, Oscar; Abelaira, Sara; y Laba, Raúl. 1992 p.p 455-456*)

2.3.3 Inyectores

La inyección de un volumen preciso de muestra debe hacerse a la entrada de la columna en un corto periodo de tiempo para perturbar los menos posible el régimen de circulación establecido por columna y el detector, para ello se utiliza una válvula de alta presión de varias vías manual o automatizada, en el caso de inyectores automáticos, esta válvula debe de resistir presiones que puedan sobrepasar los 30,000KPa, el funcionamiento de una válvula para HPLC, la cual funciona en dos tiempos: a) Posición de carga, la bomba y la columna están conectadas, la muestra es introducida a presión atmosférica, con la ayuda de una jeringa en un depósito tubular denominado bucle, este puede ser de diferentes volúmenes, puede ser exterior o puede estar integrado en el bloque de la válvula b) Posición de inyección, la muestra es introducida en el flujo de la fase móvil por una rotación de la palanca de 60° que permite invertir el sentido de circulación del bucle, el volumen inyectado debe de ser unas 5 a 10 veces mayor que la del bucle. (González N, (tesis) 2011, p.p 28-33)

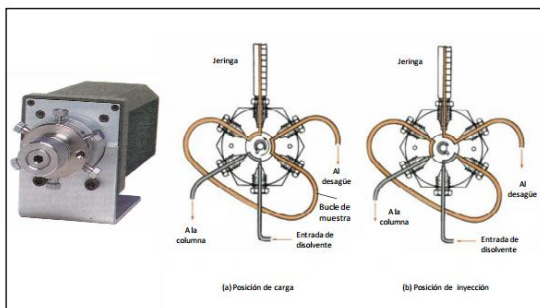


Figura 6-2Válvula de inyección utilizada en HPLC

Fuente: Herris J.2007

2.3.4 Columnas

La columna es la parte esencial del cromatógrafo, ya que en ella a través de diferentes mecanismos (absorción, partición, intercambio iónico exclusión, etc.), tiene lugar la separación o discriminación entre analitos e interferentes. El gran aumento de la eficiencia cromatográfica de HPLC respecto a la alternativa clásica se basa en la disminución del tamaño de partícula de la fase estacionaria, lo que implicó un aumento en la presión de trabajo. Para la reproducibilidad de los datos es necesario que exista una gran homogeneidad en la distribución de la fase estacionaria, esto implica la necesidad de que existan técnicas precisas y complejas de preparación de las columnas. (González N, (tesis) 2011, p.p 28-33)

Tabla 1.2 características generales de las columnas cromatográficas en HPLC

| Características geométricas | Cromatografía clásica | HPLC | | |
|-----------------------------|-----------------------|--------------------------------|------------------|--------------------------------|
| | | Empaquetamiento de la película | Micro particular | Micro columnas |
| Díámetro columna (mm) | 20-70 | 1-3 | 2-6 | 0.05-1 |
| Longitud columna (cm) | 200-100 | 50-100 | 10-50 | 10^3 - 5×10^3 |
| Díámetro de partícula | 150 | 30-70 | 5-10 | 5-30 |
| Presión (atm) | 1 | 30-50 | 100-200 | 150-250 |
| Caudal (mL/min) | 0.1 | 0.5-5.0 | 1-2 | 10^{-4} - 5×10^{-3} |

Fuente: Vacarcel F. y Gomez C. 2003

Fase estacionaria

Existen varios materiales orgánicos e inorgánicos que sirven para el relleno de las columnas, uno de los más comúnmente usado es el gel de sílice, sólido amorfo rígido cuya fórmula es $\text{SiO}_2(\text{H}_2\text{O})_n$

(con n muy próximo a cero), se utiliza convenientemente transformado, en el 80% de aplicaciones. Este material básico, completamente diferente a la sílice cristalina (SiO_2), pero que puede servir de materia prima para su síntesis, se prepara en forma de esferas (porosas o no) con un diámetro muy regular de unos 2 a 5 μm . Estas partículas esféricas de dimensión homogénea aseguran un relleno compacto de las columnas que evita la aparición de caminos preferenciales para la fase móvil. La calidad de un gel de sílice para cromatografía depende de varios parámetros como por ejemplo la estructura interna, el tamaño de los granos, la porosidad abierta (dimensión y distribución de los poros), la superficie efectiva, la resistencia a la compresión y la polaridad. (*González N, (tesis) 2011, p.p 28-33*)

2.3.5 Fases móviles

La interacción que existe entre la fase estacionaria (normal o de polaridad) influye sobre los tiempos de retención de los solutos, la polaridad de la fase estacionaria permite distinguir dos situaciones: Si la fase estacionaria es polar, la cromatografía se realiza en fase normal, en este caso se utilizará un fase móvil poco polar. Si la fase estacionaria es muy poco polar, la cromatografía se denomina en fase reversa, o cromatografía hidrófoba y en este caso se utilizara una fase móvil polar (lo más utilizado son mezclas de metanol o acetonitrilo con agua). Cuando modificamos la polaridad de la fase móvil estamos actuando directamente sobre el coeficiente de distribución o reparto K , es decir sobre el factor de retención k de los compuestos. Los cromatografistas deben hacer una buena elección de la fase móvil en función de los compuestos que hay que separar. La formación de enlaces modificados conduce a una pérdida importante de polaridad. Cuando se utiliza un fase elanzada que podemos imaginar constituida por esferas de sílice recubiertos con una capa de parafina, el orden de elución es opuesto al que estamos acostumbrados a ver en una fase normal. De este modo, se utiliza un eluyente polar, un compuesto polar migra más rápido que un compuesto apolar, en estas condiciones se retienen más los hidrocarburos. Se realizan gradientes de elución para disminuir la polaridad del eluyente durante la separación (por ejemplo mezclas de agua/acetonitrilo, cuya concentración en acetonitrilo crece durante la elución). (*Mennickent. S., 2000*)

2.3.6 Detectores

El sistema de detección se trata de un módulo del cromatógrafo de líquidos situado a la salida de la columna, que proporciona de forma continua información acerca de la composición del flujo que circula a través de él. Generalmente origina una señal eléctrica continua, que debidamente amplificada y registrada, constituye el cromatograma, del que se extrae información cualitativa y

cuantitativa de la muestra inyectada. Un detector debe de reunir ciertas características para su empleo: alta sensibilidad (del orden de 10^{-12} - 10^{-11} g/mL), lo que implica un bajo ruido de fondo, la respuesta universal a todos los solutos, amplio rango lineal de concentración (5-6 ordenes de magnitud volumen mínimo en la celda de flujo, para evitar la dispersión de los solutos, debe de ser no destructivo, en caso de que se requiera recoger fracciones, insensible a cambios de presión temperatura, etc. Debe de operar continuamente durante largo tiempo ser asequible a la automatización. Los modos de detección más utilizados se basan en las propiedades ópticas de los compuestos (absorción, fluorescencia e índice de refracción). (Ferreira González, V. y Universidad de Zaragoza. 2007).

2.4 Pregabalina

La pregabalina [ácido (S)-3-(aminometil)-5-metilhexanoico] es un análogo del ácido gamma-aminobutírico (GABA). Se utiliza para aliviar el dolor en la neuropatía diabética y en la neuralgia post-herpética. También está indicado en el tratamiento combinado de las crisis epilépticas parciales con o sin generalización secundaria en adultos. Otras indicaciones que están siendo investigadas son el tratamiento de la fibromialgias y el de la ansiedad generalizada.

La pregabalina es eficaz para el dolor neuropático y fibromialgia. Una minoría de pacientes tendrá beneficios significativos con pregabalina, y otros beneficios moderados. Muchos no tendrán beneficios, los mismos serán triviales o habrá interrupciones debido a los eventos adversos. Es necesaria la individualización del tratamiento para maximizar el alivio del dolor y disminuir los eventos adversos. No existen pruebas que favorezcan el uso de la pregabalina en escenarios de dolor agudo. (Andrew Moore, Sebastian Straube, Philip J Wiffen, Sheena Derry, Henry J McQuay 2010)

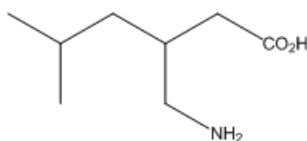


Figura 6.3: Estructura Pregabalina

2.4.1 Mecanismo de acción

La pregabalina es un análogo del ácido gammaaminobutírico (GABA) con estructura química y mecanismo de acción similar a los de la gabapentina. Ambos fármacos tienen un perfil farmacológico semejante, con actividad antiepiléptica y analgésica, aunque la pregabalina es más potente, pues logra la misma eficacia con dosis 2-4 veces menores. A pesar de la semejanza estructural con el GABA, se sabe que no interacciona directamente con los receptores gabaérgicos

ni se metaboliza a GABA o a agonistas gabaérgicos. La pregabalina se une de forma selectiva a la proteína $\alpha 2\delta$, que es una subunidad auxiliar de los canales de calcio dependientes de voltaje, con lo que modula la secreción de neurotransmisores excitadores como el glutamato y la sustancia P. (Stahl SM. 2004. p.p 1033-1034.)

Se acepta que uno de los principales mecanismos implicados en el dolor neuropático crónico es la activación sostenida de las fibras C y A δ dolorosas, que liberan continuamente neurotransmisores excitadores como glutamato o sustancia P. La pregabalina, al reducir la captación presináptica de calcio, disminuiría la liberación de neurotransmisores de la señal dolorosa. Este mecanismo de acción, común a la pregabalina y la gabapentina, resulta novedoso y distinto del de otros fármacos anticonvulsivos con actividad contra el dolor neuropático (carbamazepina, topiramato, lamotrigina, etc.) y con toda probabilidad justifica su mayor eficacia. En este sentido, los estudios en animales han demostrado que la unión de pregabalina a la proteína $\alpha 2\delta$ es un requisito indispensable para la acción analgésica del fármaco. (Taylor CP. 2003 p.p 183-8).

2.4.2 Farmacocinética

En ayunas, la pregabalina es absorbida rápidamente y alcanza la concentración máxima en 1 hora. La absorción se realiza principalmente en el colon proximal. La biodisponibilidad oral es $\geq 90\%$ para todas las dosis. Los alimentos no alteran su absorción o vida media de eliminación, pero reducen la $C_{m\acute{a}x}$ en 25% a 30% y la retrasan 3 horas. El volumen de distribución es de 42.1 l. Al unirse a proteínas plasmáticas, atraviesa la barrera hematoencefálica con facilidad. La cantidad de pregabalina metabolizada por el ser humano es reducida: 98% de la droga se elimina por orina sin cambios. La vida media de eliminación es de aproximadamente 6 horas (4.6 a 6.8 horas) para todas las dosis. El estado de equilibrio plasmático se alcanza a los 2 días de iniciado el tratamiento. La depuración oral no se ve afectada por el sexo, la raza o la menopausia; sin embargo, la depuración total y el grado de distribución pueden ser menores en ancianos debido a la reducción de la función renal relacionada con el envejecimiento.

En los pacientes que realizan hemodiálisis trisemanal se observó reducción de la dosis biodisponible del 50% a 60% luego de cada sesión de diálisis de 4 horas. Esto sugiere que los sujetos sometidos a hemodiálisis a largo plazo pueden requerir dosis suplementarias luego de cada sesión. Debido a que la pregabalina no es metabolizada en el hígado, no deberían necesitarse ajustes de dosis en pacientes con insuficiencia hepática.

2.4.3 Interacciones farmacológicas

La pregabalina carece de actividad sobre las enzimas hepáticas del sistema enzimático citocromo P450. Esto podría explicar que no existan informes sobre interacciones farmacológicas que tengan como sustrato los sistemas enzimáticos hepáticos. El desplazamiento de la unión a proteínas plasmáticas no es un mecanismo por el cual puedan aparecer interacciones farmacológicas, debido a que la pregabalina no tiene unión a proteínas plasmáticas.

En pacientes en tratamiento con pregabalina no se vieron afectadas las concentraciones plasmáticas de carbamazepina, lamotrigina, fenobarbital, fenitoína, topiramato y valproato; tampoco las de lorazepam, oxicodona y etinilestradiol/noretindrona. Un incremento leve en la depuración de la tiagabina se observó luego de la administración de pregabalina, sin que se viera afectada su farmacocinética. La depuración de pregabalina tiende a descender cuando se administra junto con un inhibidor de la tasa de filtración glomerular, como los antiinflamatorios no esteroides, los aminoglucósidos o la ciclosporina. La pregabalina puede potenciar los efectos sedativos de los depresores del sistema nervioso central como los barbitúricos, el etanol y los opioides. Además, puede incrementar el potencial aumento de peso y la aparición de edemas en los pacientes tratados con hipoglucemiantes orales.

2.4.4 Usos terapéuticos

Se calcula que aproximadamente el 50% de los pacientes con diabetes presentará alguna forma de neuropatía periférica durante el transcurso de su vida, de los cuales 13% a 20% tendrá una forma dolorosa de la enfermedad. La NDP es un trastorno progresivo, aunque los niveles de dolor progresen o retrocedan con el tiempo.

La NPH es una complicación de la infección por herpes zóster y aparece en 10% a 15% de esta población. Puede causar dolor, quemazón o sensación de descargas eléctricas de manera persistente; otros síntomas incluyen picazón, disestesias, parestesias, hiperalgesia, hiperestesia y alodinia. En general, los pacientes experimentan dolor de tipo neurítico por al menos 3 meses luego de la desaparición de la erupción cutánea. También se acompaña de alteraciones del sueño y malestar psicológico durante la realización de las actividades de la vida diaria y social. Luego de aproximadamente 1 año, el 50% de los pacientes no presenta síntomas. (*Pregabalina uso terapeutico 2009[en línea]*)

Entre las terapias tradicionales para la NDP se incluyen los antidepresivos tricíclicos, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), anticonvulsivantes y opioides. Los agentes tópicos y la acupuntura también pueden beneficiar a algunos pacientes. Para los sujetos con NPH, los tratamientos más efectivos son los opioides, el tramadol, los antidepresivos tricíclicos, el gabapentín y los parches de lidocaína. Sin embargo, numerosos estudios demuestran que el alivio del dolor es incompleto con estos tratamientos. Además, debido a los efectos adversos, es frecuente su abandono. (*Horga A. 2006;p.p 223-237*)

Los efectos de múltiples dosis de pregabalina se compararon con placebo en pacientes con NDP y NPH en numerosos ensayos clínicos. Los estudios incluyeron 1 semana de evaluación en la que los sujetos registraron de manera diaria la intensidad del dolor; luego fueron asignados en forma aleatoria al grupo de tratamiento y al grupo control. Se evaluó la eficacia de la pregabalina por la intensidad del dolor y por el resultado de cuestionarios sobre la calidad de vida y la percepción de la gravedad de la enfermedad por parte del paciente. En los 6 estudios revisados, la disminución del dolor fue significativa y en la mayoría se observó mejoría en la calidad de vida.

2.4.5 Toxicidad

En los estudios de toxicidad de dosis repetidas en ratas y monos se observaron efectos en el SNC, incluyendo hipoactividad, hiperactividad y ataxia. Se observó un aumento en la incidencia de atrofia retiniana, observada frecuentemente en ratas albinas ancianas, tras la exposición a largo plazo de pregabalina a exposiciones ≥ 5 veces la exposición media en humanos a la dosis clínica máxima recomendada.

La pregabalina no fue teratógena ni en ratones ni en ratas ni en conejos. Sólo hubo toxicidad fetal en ratas y conejos a exposiciones lo suficientemente por encima de la exposición en humanos. En estudios de toxicidad prenatal/postnatal, la pregabalina indujo toxicidad en el desarrollo de las crías en ratas a exposiciones >2 veces la exposición máxima recomendada en el hombre. (*Pregabalina uso terapeutico 2009[en línea]*)

La pregabalina no es genotóxica de acuerdo a los resultados del conjunto de análisis in vitro en vivo. Se llevaron a cabo estudios de carcinogenicidad a dos años con pregabalina en ratas y ratones. No se observaron tumores en ratas a exposiciones de hasta 24 veces la exposición media en humanos a la dosis clínica máxima recomendada de 600 mg/día. En ratones, a exposiciones

similares a la exposición media en humanos, no se detectó aumento en la incidencia de tumores, pero a exposiciones más altas se observó un incremento en la incidencia de hemangiosarcoma. El mecanismo no genotóxico de la formación de tumores inducidos por pregabalina en ratones implica cambios en las plaquetas y una proliferación asociada de células endoteliales. Estos cambios en las plaquetas no estuvieron presentes ni en ratas ni en humanos de acuerdo a los datos clínicos obtenidos a corto y limitado largo plazo. No hay evidencias que sugieran un riesgo relacionado en el hombre.

En las ratas jóvenes los tipos de toxicidad no difieren cualitativamente de los observados en las ratas adultas. Sin embargo, las ratas jóvenes son más sensibles: a las exposiciones terapéuticas, hubo evidencias de signos clínicos en el SNC de hiperactividad y bruxismo y algunos cambios en el crecimiento (inhibición pasajera de la ganancia de peso). Se observaron efectos sobre el ciclo estral a 5 veces la exposición terapéutica humana. Se observaron efectos neuroconductuales/cognitivos en ratas jóvenes 1-2 semanas tras una exposición >2 veces la exposición terapéutica en el hombre (respuesta al sobresalto acústico) o >5 veces la exposición terapéutica en el hombre (aprendizaje/memoria). (*Pregabalina uso terapeutico 2009[en línea]*)

2.4.6 Posología

El rango de dosis habitual oscila entre 150 a 600 mg/día administrados en 2 ó 3 tomas, con o sin alimentos. La dosis inicial recomendada en dolor neuropático es de 150 mg/día. En función de la respuesta y la tolerancia, la dosis puede aumentarse a 300 mg/día tras un intervalo de 3-7 días. Si esta dosis no es suficiente, puede incrementarse hasta un máximo de 600 mg/día, tras un periodo de siete días. La interrupción del tratamiento debe realizarse de forma gradual durante al menos una semana. (*Pregabalina uso terapeutico 2009[en línea]*)

2.4.7 Reacciones adversas

Las reacciones adversas comunicadas con más frecuencia han sido mareos y somnolencia. Generalmente, las reacciones adversas fueron de intensidad de leve a moderada. En todos los estudios controlados, la tasa de abandono a causa de reacciones adversas fue del 13% para pacientes que estaban recibiendo pregabalina y del 7% para pacientes que recibieron placebo. Las reacciones adversas que con más frecuencia dieron lugar a una interrupción del tratamiento en los grupos tratados con pregabalina fueron mareos y somnolencia.

Otras reacciones adversas son:

- Trastornos de la sangre y del sistema linfático: Neutropenia (<1/1000)

- Trastornos del metabolismo y de la nutrición: aumento del apetito; Anorexia, Hipoglucemia
 - Trastornos psiquiátricos: euforia, confusión, disminución de la libido, irritabilidad, pérdida de la personalidad, anorgasmia, inquietud, depresión, agitación, balanceos, exacerbación del insomnio, estado de ánimo depresivo, dificultad para encontrar palabras, alucinaciones, sueños extraños, aumento de la libido, ataques de pánico, apatía; desinhibición, estado de ánimo elevado
- Trastornos del sistema nervioso: mareos, somnolencia, ataxia, alteraciones en la concentración, coordinación anormal, deterioro de la memoria, temblor, disartria, parestesia (1/100); trastorno cognitivo, hipoestesia, defecto del campo visual, nistagmo, trastornos del habla, mioclonía, hiporreflexia, discinesia,
- hiperactividad psicomotora, mareo postural, hiperestesia, ageusia, sensación de ardor, temblor intencional, estupor, síncope, Hipocinesia, parosmia, disgrafía.
- Trastornos oculares: visión borrosa, diplopía ,trastornos visuales, sequedad de ojos, hinchazón de ojos, disminución de la agudeza visual, dolor de ojos, astenopía, aumento de la lacrimación, fotopsia, irritación de los ojos, midriasis, oscilopsia, percepción de la profundidad visual alterada, pérdida de la visión periférica, estrabismo, brillo visual .
- Trastornos del oído y del laberinto.Vértigo ,Hiperacusia.
- Trastornos cardíacos: taquicardia, bloqueo auriculoventricular de primer grado, taquicardia sinusal,arritmia sinusal, bradicardia sinusal.
- Trastornos vasculares: rubor, sofocos; hipotensión, frío periférico, hipertensión.
- Trastornos respiratorios, torácicos y mediastínicos: disnea, sequedad nasal, nasofaringitis, tos, congestión nasal, epistaxis, rinitis, ronquidos, opresión en la garganta.
- Trastornos gastrointestinales: sequedad de boca, estreñimiento, vómitos, flatulencia,distensión abdominal, hipersecreción salivar, enfermedad de reflujo gastroesofágico, hipoestesia oral, ascitis, disfagia, pancreatitis.
- Trastornos de la piel y del tejido subcutáneo, sudor frío, urticaria.
- Trastornos musculoesqueléticos y del tejido conjuntivo: espasmo muscular, hinchazón de las articulaciones, calambres musculares, mialgia, artralgia, dolor de espalda, dolor en las extremidades, rigidez muscular, espasmo cervical, dolor de cuello, rabdomiólisis.
- Trastornos renales y urinarios: disuria, incontinencia urinaria, oliguria, insuficiencia renal.
- Trastornos del aparato reproductor y de la mama: Disfunción eréctil, retraso en la eyaculación, disfunción sexual, amenorrea, dolor de mamas, secreción mamaria, dismenorrea, hipertrofia mamaria.

-Trastornos generales y alteraciones en el lugar de administración: fatiga, edema periférico, sensación de embriaguez, edema, marcha anormal, astenia, caídas, sed, opresión en el pecho, dolor exacerbado, anasarca, pirexia, escalofríos.

Otras: aumento de peso, aumento de la alanina aminotransferasa, aumento de la creatinina fosfocinasa plasmática, aumento de la aspartato aminotransferasa, disminución del número de plaquetas .Aumento de la glucemia, aumento de la creatinina plasmática, reducción de la potasemia, reducción del peso, reducción del número de leucocitos. (*Pregabalina uso terapeutico [en línea]. 2014*).

CAPÍTULO III

3 METODOLOGÍA

3.1 Método según bibliografía

3.1.1 Desarrollo y validación del método HPLC para la determinación de Pregabalina en cápsulas

3.1.1.1 *Reactivos**

- El potasio dihidrógeno ortofosfato,
- Hidróxido de potasio
- Acetonitrilo
- Pregabalina STANDARD
- Medicamento Pregabalina (Lyrica)

*Estos reactivos se obtuvieron de Merck Ltd, Mumbai, India

Se ha desarrollado para la determinación de la pregabalina en forma de dosificación de cápsula.

3.1.1.2 *Condiciones*

Columna: La cromatografía se encuentra en Hypersil BDS, C8, 150 × 4,6 mm, 5 micras utilizando detector de matriz de fotodiodos.

La fase móvil: consiste en tampón fosfato pH 6,9 y acetonitrilo en la proporción de 80:20 (V/V)

Flujo de inyección: 1ml / min.

Detector: 200nm

Temperatura: 30°C

3.1.1.3 *Preparación de Muestras*

Se pesó Pregabalina (50 mg) de trabajo estándar se transfirió a un matraz aforado de 50 ml y se añadió y se sonicó para disolver completamente la muestra 30 ml de fase móvil. La solución se hizo hasta la marca y se filtra a través de 0,45 µ filtro de membrana.

Cápsula de polvo equivalente a 100 mg de pregabalina (alrededor de 454 mg de la cápsula pregabalina en polvo de 25 mg de fuerza) se pesó y se transfirió en un matraz aforado de 100 ml con precisión.

Se añadieron y se sonicaron con agitación y 60 ml de fase móvil. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó hasta el volumen con el diluyente. La solución final se filtró a través de un filtro de membrana de 0,45 μ .

3.1.1.4 *Proceso para la Cuantificación de Pregabalina*

Con el fin de desarrollar un método LC adecuado y robusto para la determinación de la pregabalina, se emplearon diversas condiciones cromatográficas utilizando diferentes fases estacionarias como C8 y C18 con diferentes dimensiones de la columna y diferente fase móvil que contiene tampones como fosfato y acetato con diferente pH que varía de 6,5 a 7,5 y el uso de modificadores orgánicos como acetonitrilo y metanol en la fase móvil. Por último, la fase móvil que consta de 1,2 g de fosfato acuosa monobásico de potasio por litro con un pH 6,9 y acetonitrilo en la proporción de 80:20 (v / v) a una velocidad de flujo de 1,0 ml / min utilizando una columna Hypersil BDS C8, 150 \times 4,6 mm, 5 μ . El horno de la columna se mantuvo a 30 °. El compuesto no tiene cromóforo, como resultado, el compuesto no daría espectros característicos. Bajo estas condiciones optimizadas, el pico del analito es muy simétrica. El cromatograma HPLC típico se leyó a 200 nm con un tiempo de retención de 3.5+/- 0.3.

El método fue validado de acuerdo con las directrices ICH con respecto a la especificidad, linealidad, exactitud, precisión y robustez, se encontró que era estable a temperatura ambiente durante aproximadamente 26 h. (Jul-Aug Indian J Pharm Sci. 2010; p.p 517–519.)

3.2 Guía para validar un método analítico de acuerdo con las directrices ICH

3.2.1.1 *Especificidad*

La selectividad es el grado en que un método puede cuantificar o cualificar al analito en presencia de interferentes.

Preparar un placebo de acuerdo a la formulación del producto, procesar como si fuera una muestra y analizar.

Preparar una solución estándar en una concentración correspondiente al 100% de Principio Activo de acuerdo a la metodología ya descrita.

Preparar una solución muestra de acuerdo al proceso a la metodología descrita.

3.2.1.2 Linealidad

Preparar 5 soluciones placebo enriquecidas con estándar a 80% 90% 100% 110% 120% dentro del intervalo de trabajo, considerando como mínimo el valor de $Q \pm 20\%$.

Con los resultados obtenidos determinar la curva de regresión de las absorbancias vs concentraciones por el método de mínimos cuadrados.

Determinar la pendiente (b), la ordenada al origen o intercepto (m) y el coeficiente de correlación (r). Definir la ecuación de la recta $Y = mx + b$

3.2.1.3 Exactitud

Preparar tres soluciones al 60, 80 y 100% con la adición de placebo, considerando el valor de $Q \pm 20\%$.

Determinar el porcentaje de recuperación en cada muestra, calcular el valor promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los porcentajes de recuperación.

3.2.1.4 Precisión del método

3.2.1.5 Repetibilidad

Preparar 3 muestras a las concentraciones del estándar y realizar el análisis con un mismo analista y con el equipo bajo las condiciones normales de operación.

Determinar el coeficiente de variación y el porcentaje de recuperación.

Preparar 3 muestras a las concentraciones del estándar, de igual lote utilizado en la repetibilidad, analizar con un analista diferente, pero en el mismo equipo.

Calcular el porcentaje de recuperación y el coeficiente de variación de las 6 muestras de los dos ensayos obtenidos en el estudio de precisión del método.

3.2.1.6 Robustez

Estabilidad de las soluciones muestra

Inyectar las soluciones muestra utilizadas en la repetibilidad después de 24 horas de almacenar las muestras a temperatura ambiente y en refrigeración.

Calcular el porcentaje de recuperación y comparar con el valor inicial promedio

3.2.1.7 Precisión del sistema

Preparar la solución estándar al 100%, leer la solución cinco veces consecutivas y calcular el coeficiente de variación de las absorbancias del activo.

3.2.1.8 Criterios de aceptación

Tabla2-3 Criterios de aceptación para la validación del método de Prgabalina por HPLC

| PARÁMETRO DE VALIDACIÓN | MEDIDA /VARIABLE | CRITERIO DE ACEPTACIÓN |
|---|---|---------------------------------|
| Precisión del sistema | Coeficiente de Variación | $\leq 1,2\%$ |
| Linealidad del método | Coeficiente de correlación (r) | $\geq 0,99$ |
| Exactitud | Porcentaje de Recuperación CV | 95,0 – 105,0% $\geq 3,0\%$ |
| Repetibilidad del método | % de Recuperación CV | 98,0 – 102,0 % $\leq 2,0 \%$ |
| Precisión Intermedia del método | % Recuperación respecto al valor de repetibilidad CV | 95,0 – 105,0% $\leq 2,0\%$ |
| Estabilidad de las soluciones muestra a temperatura ambiente | % Desviación respecto al valor inicial CV | $\geq 3,0\%$ $\geq 5,0\%$ |
| Estabilidad de las soluciones analíticas en refrigeración | % Desviación respecto al valor inicial CV | $\geq 3,0\%$ $\geq 5,0\%$ |
| Especificidad | Estándar Muestra Placebo | Ausencia de pico en el placebo |

Fuente: Farmacopeia Europea

3.3 Validación del Método analítico mediante HPLC

La validación del método se lleva a cabo con la cuantificación de Pregabalina mediante HPLC, lo cual se va determinar por los siguientes parámetros: especificidad, exactitud, precisión, robustez, linealidad.

Lugar de investigación

El presente trabajo de tesis se llevó a cabo en el Departamento de Control de Calidad del Laboratorio Farmacéutico Qualipharm.

3.4 Materiales, equipos y reactivos

3.4.1 *Materiales de laboratorio**

- Balones aforados de 1000ml, 50ml
- Probeta de 1000ml
- Agitador magnético
- Papel filtro
- Membrana 0.45µm

3.4.2 Reactivos

- Agua destilada
- Fosfato dibasico de potasio anhidro
- Pregabalina estándar de referencia
- Tabletas de Pregabalina de 150mg
- Ácido fosfórico
- Acetonitrilo

3.4.3 Equipos*

- Balanza analítica OHAUS
- Ultrasonido ULTRASONIC CLEANER
- Potenciómetro BECKMAN
- Bomba de vacío PASCO

- HPLC (Perkinelmer) SERIE 200

* Todos los Equipos y el material son previamente calibrados por: “PRECISION”, “INEN” y “ELICROM”

3.4.4 Aspecto

Gabalin 150mg: Principio activo Pregabalina, Capsula gelatina dura, cuerpo y tapa blanca que contiene polvo granulado blanco a casi blanco.

3.4.5 Identificación del principio activo

El tiempo de retención de la muestra es similar al estándar

Estándar: Pregabalina, pureza: 99.5%, lote: IPRS/97/12

3.4.6 Preparación de soluciones

Solución de ácido Fosfórico: pesar 1g de ácido fosfórico y aforar a 20ml.

Buffer: en un balón aforado de 1000ml pesar 1.2g de Fosfato dibásico de potasio anhidro, aforar con agua destilada y ajustar con la solución de ácido fosfórico a un pH 6.9.

Fase móvil: Mezclar Fosfato dibásico de potasio anhidro y acetonitrilo (95:05) respectivamente.

Diluyente: Fosfato dibásico de potasio anhidro con un pH de 6.9.

Condiciones Cromatográficas

Columna: Phenomenex C18, relleno de silica hipasil, longitud 250x 60mm de longitud. Diámetro 5µm.

Flujo: 1ml/min

Detección: 200nm

Volumen de Inyección: 20µl

Temperatura: 30°C

Cálculos

$$\% \text{ Pregabalina} = \frac{A_m \times W_{st} \times PP \times f_{dm} \times P_{st}}{A_{st} \times W_m \times f_{dst} \times \text{dosis}}$$

Dónde:

A_m = área de la muestra

A_{st} = Area del estándar

W_{st} = Peso estándar en mg

W_m = peso muestra en mg

PP = Peso promedio

P_{st} = Pureza estándar expresada en %

f_{dm} = factor de dilución de la muestra

f_{dst} = factor de dilución de la muestra

Dosis: dosis de Pregabalina

Preparación de estándar.

Pesar exactamente 25mg de Preagabalina estándar y transferir a un balón aforado de 50ml agregar 10ml de diluyente sonicar por 20 min hasta completa disolución y aforar con diluyente. Filtrar con membrana de 0.45µm e inyectar a un vial.

3.4.7 Preparación de muestra

Pesar 20 capsulas de Pregabalina, colocar a un peso equivalente de 25mg de Pregabalina (33.33g de polvo) a un balón aforado de 50ml, disolver con 20ml de diluyente y sonicar por 20min luego aforar con diluyente. Filtrar con una membrana con membrana de 0.45µm e inyectar a un vial.

Cst. 0.5mg/ml

Para realizar los parámetros de validación se guió en las directrices ICH.

CAPITULO IV

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Especificidad

Tabla3-4. Resultados de la corrida del placebo, estándar y muestra de pregabalina.

| PLACEBO | | MUESTRA | | ESTANDAR | |
|---------------------|-------|--------------|------------------|------------------|-----------|
| TIEMPO (min) | AREA | TIEMPO (min) | AREA | TIEMPO (min) | AREA |
| 8.55 | ----- | 8.55 | 465914.00 | 8.55 | 468932.59 |
| 8.55 | ----- | 8.55 | 465913.00 | 8.54 | 468843.59 |
| 8.55 | ----- | 8.55 | 465913.00 | 8.54 | 468845.56 |
| PROMEDIO | | | 465913.33 | 468873.91 | |
| %CV | | | 0.00 | 0.01 | |
| DESVIACION ESTANDAR | | | 0.58 | 50.83 | |

Tabla4-4. Resultados de la corrida de la fase móvil y el diluyente

| FASE MOVIL | | DILUYENTE | |
|------------|------------|-----------|------------|
| TIEMPO | AREA | TIEMPO | AREA |
| 3.2 | 138301.359 | 3.2 | 138301.359 |
| 4 | 167350.906 | 4 | 167350.906 |

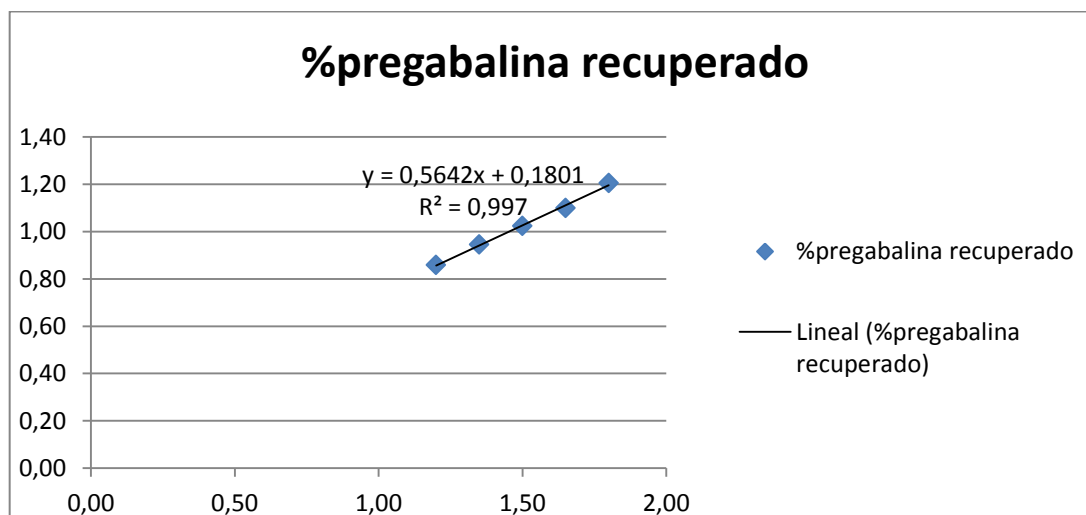
Cumple el criterio de especificidad ya que no existe interferencias en el cromatograma ya que no se obtiene ningún valor de área en el placebo al tiempo de retención del estándar y muestra, estos resultados nos garantiza la identidad y potencia del analito. Al analizar con la fase móvil y el diluyente en estos dos casos existe interferencia a los 3.2 y 4 min pero estas interferencias es propia de estas soluciones más no de la muestra. Si existiera interferencia en las muestras esto indicaría la presencia de impurezas lo cual provocaría la inestabilidad del producto.

4.2 Linealidad

Tabla 4-4. Resultados de las áreas a de Pregabalina a diferentes concentraciones

| PORCENTAJE DE ACTIVO RESPECTO AL ESTANDAR | Muestra (g) | Dato teórico de pregabalina (mg) | AREA DE LECTUR A | %pregabalina recuperado |
|---|--------------|----------------------------------|-------------------|-------------------------|
| 80% | 0.026 | 120.00 | 372175.19 | 0.86 |
| 90% | 0.029 | 135.00 | 416362.50 | 0.94 |
| 100% | 0.033 | 150.00 | 476210.19 | 1.02 |
| 110% | 0.037 | 165.00 | 525951.31 | 1.10 |
| 120% | 0.040 | 180.00 | 583846.63 | 1.20 |
| promedio | 0.033 | 150.000 | 474909.163 | 1.026 |
| desviación | 0.005 | 23.717 | 84345.044 | 0.134 |
| %cv | 16.592 | 15.811 | 17.760 | 13.057 |

Gráfico 1-4. Linealidad de Pregabalina a diferentes concentraciones



Este método es lineal debido a que existe una relación directamente proporcional entre las concentraciones del analito. El criterio de la linealidad tiene un coeficiente de correlación

(r) elevado, del 0,99. El resultado obtenido cumple con la linealidad debido a que posee con resultado de 0.997 de coeficiente de relación.

4.3 Exactitud

Tabla5-4. Resultados de las áreas de recuperación de Pregabalina 3 concentraciones

| Porcentaje de activo respecto al estándar | Muestra | Dato teórico de pregabalina | AREA | %Pregabalina |
|---|----------|-----------------------------|------------|--------------|
| | (g) | (mg) | | Recuperado |
| 60% | 0.1215 | 90.00 | 1831642.88 | 0.65 |
| 80% | 0.1619 | 120.00 | 2497913.00 | 0.71 |
| 100% | 0.2996 | 150.00 | 2961356.50 | 0.88 |
| PROMEDIO | | 120.00 | 2430304.13 | 0.74 |
| % CV | | | 13.42 | |
| Desviación estándar | 0.099913 | | | |
| PROMEDIO | 0.74 | | | |

| | |
|----------------|--------------|
| % RECUPERACIÓN | 96.69 |
|----------------|--------------|

Se lleva a cabo un análisis de varianza (ANOVA), del porcentaje de recuperación o del error relativo en porcentaje, para determinar si hay o no diferencia significativa entre las muestras a concentraciones distintas. Los criterios de aceptación es de $\geq 3\%$ de CV y la recuperación va desde 95% y 105%.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se aprueba la exactitud debido a que cumple con 13.35% de CV y con el 96.69 % de recuperación.

4.4 Precisión del método

Repetibilidad

TABLA 6-4. Resultados del porcentaje de Pregabalina con la primera Analista.

| MUESTRA | Muestra (g) | Dato teórico de pregabalina (mg) | AREA | %pregabalina |
|----------------------------|------------------------|---|------------------|---------------------|
| 1 | 0.0333 | 150.00 | 481346.81 | 0.17 |
| 2 | 0.0337 | 150.00 | 485852.59 | 0.17 |
| 3 | 0.0336 | 150.00 | 490536.19 | 0.17 |
| PROMEDIO | 0.03 | 150.00 | 485911.87 | 0.17 |
| % CV | | | 0.66 | |
| desviacion estándar | | 0.001151616 | | |

Precisión intermedia

Tabla 7-4. Resultados del porcentaje de pregabalina para determinar precisión intermedia con segunda analista..

| MUESTRA | Muestra (g) | Dato teórico de pregabalina (mg) | AREA | %pregabalina |
|-----------------------|------------------------|---|------------------|---------------------|
| 1 | 0.0337 | 150.00 | 470641.44 | 0.17 |
| 2 | 0.0333 | 150.00 | 465818.28 | 0.17 |
| 3 | 0.033 | 150.00 | 472940.88 | 0.17 |
| PROMEDIO | 0.0334 | 150.00 | 469800.20 | 0.17 |
| % CV | | | 1.10 | |
| % RECUPERACIÓN | | | 96.69 | |

Desviación estándar 0.0018508

De acuerdo al criterio de aceptación de repetibilidad y precisión intermedia que es de $CV \geq 2\%$ y el % de recuperación 95,0 – 105,0%, cumple este parámetro ya que los resultados obtenidos de porcentaje de recuperación del 96,69%, y CV 1.10%

Este parámetro permite verificar el contenido/potencia/valoración de una muestra. La precisión intermedia nos sirve para determinar el grado de tolerancia del método como estimar la variabilidad entre analistas.

4.5 Robustez

Estabilidad de las soluciones muestra

Tabla 8-4. Resultados del porcentaje de Pregabalina a temperatura ambiente a 24h.

| MUESTRA | Muestra | Dato teórico de pregabalina | AREA | %pregabalina |
|--|--------------|-----------------------------|------------------|--------------|
| | (g) | (mg) | | |
| 1 | 0.033 | 150.00 | 494297.31 | 0.18 |
| 2 | 0.034 | 150.00 | 501186.25 | 0.18 |
| 3 | 0.034 | 150.00 | 493898.44 | 0.18 |
| PROMEDIO | 0.034 | 150.00 | 496460.67 | 0.18 |
| % CV | | 0.63 | | |
| Desviación respecto a la repetibilidad | | 0.00 | | |
| Desviación respecto a la precisión intermedia | | 0.01 | | |
| DESVIACION ESTANDAR | 0.001108559 | | | |

Tabla 9-4. Resultados del porcentaje de Pregabalina a refrigeración a las 24 h.

| MUESTRA | Muestra | Dato teórico de Pregabalina | AREA | %Pregabalina |
|--|--------------|-----------------------------|------------------|--------------|
| | (g) | (mg) | | |
| 1 | 0.033 | 150.00 | 502873.31 | 0.18 |
| 2 | 0.034 | 150.00 | 508066.75 | 0.18 |
| 3 | 0.034 | 150.00 | 502273.09 | 0.18 |
| PROMEDIO | 0.034 | 150.00 | 504404.39 | 0.18 |
| % CV | | 0.54 | | |
| Desviación respecto a la repetibilidad | | 0.00 | | |
| Desviación respecto a la precisión intermedia | | 0.01 | | |
| DESVIACION ESTANDAR | 0.000980103 | | | |

El criterio de aceptación de la desviación estándar es de $\geq 3\%$ y $CV \geq 5\%$.

Cumple con la estabilidad tanto en refrigeración como a temperatura ambiente, con un porcentaje de desviación de 0.0 y CV de 0,54 % en ambos casos. Este parámetro permite determinar la estabilidad analítica a partir de una muestra homogénea, analizando por triplicado (contenido/potencia/valoración inicial).

4.6 Precisión del sistema

Tabla 10-4. Resultados de las absorbancias del estándar de Pregabalina para la precisión del sistema

| MUESTRA N ₀ | ÁREA Pregabalina |
|------------------------|------------------|
| 1 | 480504.00 |
| 2 | 488919.72 |
| 3 | 488919.59 |
| PROMEDIO | 486114.44 |
| % CV | 1.00 |

DESVIACION 4858.781546

El criterio de aceptación el CV no debe exceder al 1%, y de acuerdo a los datos obtenidos se aprueba el sistema de precisión ya que cumple con el porcentaje de coeficiente de variación de 1%. Este resultado nos permite para que la precisión sea aceptable para la aplicación analítica. Si el resultado obtenido fuese un dato mayor al 1% este método no es apto para su aplicación.

4.7 “Protocolo validación de método analítico de cuantificación de Pregabalina 150mg cápsula, por HPLC”

4.7.1 Objetivo

Demostrar que el Método Analítico utilizado para la cuantificación de Pregabalina 150mg Capsula por HPLC, cumpla con los criterios de aceptación de los parámetros establecidos en la validación y por lo tanto permite obtener resultados exactos y reproducibles.

4.7.2 Alcance

Este protocolo de validación se aplica al método de cuantificación de Pregabalina 150mg cápsula por HPLC.

4.7.3 Motivo de la validación

Validación inicial del método de análisis.

4.7.4 Responsabilidades

- El Supervisor de Validaciones será el responsable de la elaboración del protocolo e informe de validación, coordinación y ejecución de los ensayos indicados en este protocolo. Contará con apoyo de los Analistas de Control de Calidad.
- El Jefe de Control de Calidad será responsable de coordinar en el laboratorio la realización de los análisis de validación. El Jefe de Investigación & Desarrollo será responsable de revisar el protocolo y los resultados obtenidos de su ejecución.
- El Jefe de Aseguramiento de Calidad será responsable de vigilar el cumplimiento de la regulación aplicable en el contenido del protocolo y de dar el dictamen final con base en los resultados obtenidos en la ejecución del mismo. Por tanto, será responsable también de revisar y autorizar el protocolo y los resultados obtenidos del mismo.

- El Director de Planta será responsable de revisar el protocolo y los resultados obtenidos de su ejecución y aprobar.

4.7.5 *Abreviaturas y definiciones*

| Abreviatura / Término | Significado |
|-----------------------|--------------------------------------|
| PMV | Plan Maestro de Validación |
| HPLC | Cromatógrafo Líquido de Alta Presión |
| UV | Ultravioleta |
| CV | Coeficiente de Variación |
| R | Coeficiente de correlación |
| S | Desviación estándar |
| X | Valor promedio |
| N/A | No Aplica |

4.7.6 *Descripción del método analítico*

4.7.6.1 *Fundamento*

La Pregabalina se debe preparar mediante dilución, para luego ser cuantificado por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), mediante relación del área de la muestra con la de un estándar de concentración conocida.

4.7.6.2 *Equipos y materiales*

Los siguientes equipos serán utilizados en la validación del método de análisis:

4.7.6.3 *Materiales de laboratorio**

- Balones aforados de 1000ml, 50ml
- Probeta de 1000ml
- Agitador magnético
- Papel filtro
- Membrana 0.45µm

4.7.6.4 *Equipos**

- Balanza analítica OHAUS
- Ultrasonido ULTRASONIC CLEANER
- Potenciómetro BECKMAN
- Bomba de vacío PASCO
- HPLC (Perkinelmer) SERIE 200
- Columna HPLC Phenomenex, BDS HYPERSIL C18, 250x 60mm de longitud. Diámetro 5µm.

* Todos los Equipos y el material son previamente calibrados por: “PRECISION”, “INEN” y “ELICROM”

4.7.6.5 *Reactivos*

Los siguientes reactivos serán utilizados en la validación del método de análisis:

Reactivos puros

- Metanol grado HPLC
- Agua HPLC
- Agua destilada
- Pregabalina estándar de referencia
- Tabletas de Pregabalina de 150mg
- Ácido fosfórico
- Acetonitrilo

Reactivos preparados

Fase móvil

Buffer-Acetonitrilo 95-05

Buffer: en un balón aforado de 1000ml pesar 1.2g de Fosfato dibásico de potasio anhidro, aforar con agua destilada y ajustar con la solución de ácido fosfórico a un pH 6.9.

Diluyente: Buffer

4.7.6.6 Estándares y muestras

Los siguientes estándares y muestras de serán utilizados en el proceso de validación:

| Material de Referencia | Número de lote | Caducidad | Utilidad |
|----------------------------|----------------|-----------|---------------------------------------|
| Pregabalin, pureza: 99.5%, | IPRS/97/12 | 02/2016 | Especificidad, Precisión del sistema. |

4.7.6.7 Condiciones de operación

Los condiciones cromatográficas del equipo HPLC son:

Columna: Phenomenex C18, relleno de silica hipasil, longitud 250x 60mm de longitud. Diámetro 5µm.

Flujo: 1ml/min

Detección: 200nm

Volumen de Inyección: 20µl

Temperatura: 30°C

4.7.6.8 Soluciones analíticas

4.7.6.8.1 Solución Estándar:

4.7.6.8.1.1 Preparación de estándar.

Pesar exactamente 25mg de Pregabalina estándar y transferir a un balón aforado de 50ml agregar 10ml de diluyente sonicar por 20 min hasta completa disolución y aforar con diluyente. Filtrar con membrana de 0.45µm e inyectar a un vial.

[Pregabalina] : 0.5 mg/ml

4.7.6.8.1.2 Preparación de muestra

Pesar el equivalente de 25mg de Pregabalina (33.33g de polvo) a un balón aforado de 50ml, disolver con 20ml de diluyente y sonicar por 20min luego aforar con diluyente. Filtrar con una membrana con membrana de 0.45µm e inyectar a un vial.

[Pregabalina]: 0.5 mg/ml

4.7.6.9 Adecuación del sistema

- Se debe realizar 5 inyecciones de la preparación de la fase móvil para la adecuación del Sistema.
- Una vez cumplido el criterio de la adecuación, inyectar el estándar por duplicado. El área de respuesta del estándar debe coincidir en ± 2% de la media de las 5 inyecciones.
- Cada 10 inyecciones de muestras se debe inyectar por duplicado un estándar para verificar la adecuación del sistema.

4.7.6.10 Cálculos

$$\% \text{ Pregabalina} = \frac{Am \times Wst \times PP \times fdmxPst}{Ast \times Wm \times fdst \times dosis}$$

Dónde:

Am= área de la muestra

Ast= Area del estándar

Wst= Peso estándar en mg

Wm= peso muestra en mg

PP= Peso promedio

Pst: Pureza estándar

Fdm= factor de dilución de la muestra

Fdst= factor de dilución de la muestra

Dosis: dosis de Pregabalina

Factor de respuesta

$$FR = \frac{\text{Área}}{\text{Concentración}}$$

Ecuación de la recta

$$Y = mX + b$$

Dónde: m = pendiente de la recta

b = ordenada al origen

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{X}} \times 100$$

Dónde: σ = desviación estándar

X = valor promedio

4.7.7 Parámetros de validación

Para la validación del método de análisis se han definido los siguientes parámetros de evaluación:

- Especificidad del método
 - Especificidad con relación a la fase móvil
 - Especificidad con relación al solvente
 - Especificidad en relación con el placebo
- Linealidad
- Rango
- Exactitud
- Precisión
 - Repetibilidad
 - Reproducibilidad
- Robustez
 - Estabilidad de las soluciones analítica a las 24 horas a temperatura ambiente
 - Estabilidad de las soluciones analítica a las 24 horas en refrigeración.

4.7.7.1 PROCESO DE VALIDACIÓN

4.7.7.1.1 Especificidad

- Verificar el grado de interferencia que pueden presentar el solvente, fase móvil y placebo de la formulación.
- Solvente: Analizar el solvente empleado en la preparación de las soluciones muestra.
- Placebo: Preparar un placebo de acuerdo a la formulación del producto, procesar como si fuera una muestra y analizar
- Solución Estándar: Preparar una solución estándar en una concentración correspondiente al 100% de acuerdo al proceso de análisis.
- Solución Muestra: Preparar una solución muestra de acuerdo al proceso de análisis.

- Solución de placebo enriquecido: Preparar una muestra de placebo enriquecido con activo al 100%.

4.7.7.1.2 Linealidad y rango

Para el análisis de valoración de Pregabalina se prepararán cinco soluciones al 80, 90, 100, 110 y 120% de activo, con respecto a la concentración del estándar.

Con los resultados obtenidos determinar la curva de regresión con una gráfica de Área vs. concentración, determinar la pendiente (m), la ordenada al origen o intercepto (b) y el coeficiente de correlación (r). Definir la ecuación de la recta $Y = mx + b$

4.7.7.1.3 Exactitud

Preparar cuatro soluciones de placebo enriquecido con 60, 80 y 100% de activo respecto al estándar. Determinar el porcentaje de recuperación en cada muestra, calcular el valor promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los porcentajes de recuperación.

4.7.7.1.4 Precisión del método

4.7.7.1.4.1 Repetibilidad

Preparar 3 muestra, realizar el análisis con un mismo analista y equipo bajo las condiciones de operación. Determinar el coeficiente de variación y el porcentaje de recuperación.

4.7.7.1.4.2 Precisión intermedia

Preparar 3 muestras analizar en un mismo laboratorio, con un analista diferente en un día diferente, pero en el mismo equipo. Calcular el coeficiente de variación y el porcentaje de recuperación.

4.7.7.1.5 Robustez

4.7.7.1.5.1 Estabilidad del sistema

Inyectar las soluciones muestra utilizadas en la repetibilidad después de 24 horas de almacenar las muestras a temperatura ambiente y en refrigeración.

Calcular el porcentaje de recuperación y comparar con el valor inicial promedio.

4.7.7.1.6 Precisión del sistema

Preparar la solución estándar al 100% , inyectar la solución cinco veces consecutivas y calcular el coeficiente de variación de las áreas del pico del analito. Determinar el factor de cola del pico y la resolución (si procede).

4.7.7.2 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Los criterios de aceptación del método de análisis se resumen en la siguiente tabla:

| PARÁMETRO DE VALIDACIÓN | MEDIDA /VARIABLE | CRITERIO DE ACEPTACIÓN |
|--|---|--------------------------------|
| Precisión del sistema | Coefficiente de Variación | $\leq 1,2\%$ |
| Linealidad del método | Coefficiente de correlación (r) | $\geq 0,99$ |
| Exactitud | Porcentaje de Recuperación | 95,0 – 105,0% |
| | CV | $\geq 3,0\%$ |
| Repetibilidad del método | % de Recuperación | 98,0 – 102,0 % |
| | CV | $\leq 2,0 \%$ |
| Precisión Intermedia del método | % Recuperación respecto al valor de repetibilidad | 95,0 – 105,0% $\leq 2,0\%$ |
| | CV | |
| Estabilidad de las soluciones muestra a temperatura ambiente | % Desviación respecto al valor inicial | $\geq 3,0\%$ |
| | CV | $\geq 5,0\%$ |
| Estabilidad de las soluciones analíticas en refrigeración | % Desviación respecto al valor inicial | $\geq 3,0\%$ |
| | CV | $\geq 5,0\%$ |
| Especificidad | Estándar Muestra Placebo | Ausencia de pico en el placebo |

Fuente; *Farmacopeia Europea*

4.7.7.3 *Evaluación de resultados*

Realizar la evaluación estadística de los resultados obtenidos con respecto a los criterios de aceptación, emitir un informe de validación y el respectivo certificado de validación del método de análisis.

CONCLUSIONES

- Se validó el método analítico de cuantificación de Pregabalina 150mg capsulas mediante HPLC en el Laboratorio Farmacéutico Qualipharm.
- Se verifico que el método analítico utilizado para la valoración de Pregabalina 150mg capsulas mediante HPLC, cumple con los requerimientos para los que fue diseñado, esto fue establecido gracias a diferentes parámetros y los resultados fueron satisfactorios para todos los análisis.
- Para la precisión del método se obtuvo un 1.10% CV que se encuentra dentro del rango permitido.
- En cuanto a la precisión entre días, se obtuvo un la desviación con respecto a la repetibilidad de 0.0% por debajo de 2.0% que es el límite permitido.
- Con respecto a la precisión entre analistas se obtuvo un CV de 1.10% que está por debajo del límite permitido que es de 2.0%. En la determinación de la linealidad se obtuvo un R2 de 0,997 que está por arriba del 0,99 planteado inicialmente.
- En la determinación de la recuperación del método se obtuvo un porcentaje de 96,69% que está dentro de los parámetros establecidos entre 95% y 105%. En cuanto a la robustez del método se obtuvo un CV de 0.63% que se encuentra por debajo de 2,0% que es el límite permitido.
- Se documentó todos los datos obtenidos en el procedimiento de la validación del método analítico en “**Protocolo de validación “VM.007.md” de Qualipharm Laboratorio Farmacéutico**”
- Se elaboró protocolo de validación y las respectivas técnicas, para asegurar que los resultados sean confiables, reproducibles y que se encuentren dentro del rango de trabajo establecido.

RECOMENDACIONES

- Sebe tener cuidado al momento de pesar el principio activo ya que el equipo HPLC es muy sensible y un error por más pequeño q sea puede causar defecto en la concentración.
- Se debe realizar un lavado adecuado de las columnas antes de analizar las muestras ya que este tipo de problemas puede provocar picos Cromatográficos distorsionados.
- El proceso de análisis debe ser documentado en forma minuciosa para que no exista ambigüedades y otro analista sea capaz de reproducir el método con facilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARAJAS Nancy, Propuesta de mejora utilizando diseño de experimentos en el desarrollo de técnicas analíticas en un Laboratorio Farmacéutico , [en línea] (Tesis) (maestro), Instituto Politécnico nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería, Ciencias Sociales y Administrativas, México, DF. Año 2011, p.p 28-33 [consulta: 2015-12-03]. Disponible en : <http://www.virtual.sepi.upiicsa.ipn.mx/tesis/1309388514550tesismarzo.pdf>

Castillo, Jorge; “Definición y términos comúnmente empleados en los métodos cromatográficos”; Introducción a las separaciones cromatográficas; http://www1.uprh.edu/jorcas/paginas_clase/pag_pdf/CROMADEF.pdf

Calpena AC, Escribano E, Fernández C. Validación de los métodos analíticos. Farm Clin 1991; p.p749-758.

E. Prichard (ed.), Trace Analysis: A structural approach to obtaining reliable results. (Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1996), p.p. 32 a 39.

Ferreira González, V. y Universidad de Zaragoza. Servicio de Publicaciones (2007). Cromatografía. Fundamentos y práctica. Zaragoza, El Autor.

FDA (*FDA draft guidance – Analytical Procedures and Methods Validation*).

FARMACOPEIA EUROPEA 1991. Ministerio de Sanidad y Consumo. 2ed. Madrid.2001 pp. 1241 1255

García de Marina, A. y B. d. Castillo (1988). Cromatografía líquida de alta resolución. México, Limusa

García Montoya E. Optimización, validación y modelización de un proceso de fabricación de comprimidos. Desarrollo de una interactiva multimedia. [Tesis Doctoral]. Barcelona: Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona; 2001. Disponible en: <http://www.tesisdigitales.com>

GUIA PARA VALIDACION DE METODOS DE ENSAYO 26-09-2003.Colorado.

www.eurachem.org

HORTWITZ W. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs.2da ED.
Bonn. Anal Chem1982 pp. 54. 67

Horga de la Parte JF, Horga A. Pregabalina. Aportaciones de los ligandos *2* de canales de calcio en el tratamiento de la epilepsia y el dolor neuropático. Rev Neurol. 2006,p.p 223-237.

ISO/IEC 17025:2005 *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.*

J. Inczedy, T. Lengyel, y A.M. Ure, Blackwell Science, 1998 IUPAC, Compendium of Analytical Nomenclature, The Orange Book – 3rd Edition, [ISBN 0-632-05127-2], disponible en línea http://old.iupac.org/publications/analytical_compendium/.

M. Thompson, S.L.R. Ellison and R. Wood. “Harmonized Guidelines For SingleLaboratory Validation Of Methods Of Analysis” *Pure Appl. Chem.*, 74, (5) 835 – 855 (2002).

McGraw-Hill. 15. Rouessac, F., A. Rouessac, et al. (2003). Análisis químico : métodos y técnicas instrumentales modernas. Madrid, McGraw-Hill

Pregabalina uso terapéutico [en línea]. Comisión de Evaluación de Medicamentos .Chile, 2009. [Consulta: 03 diciembre 2015]. Disponible en: http://www.elcomprimido.com/PDF/pregabalina_CASTELLANO_nov_09.pdf

Pregabalina uso terapéutico [en línea]. Equipo de redacción de IQB (Centro colaborador de La Administración Nacional de Medicamentos, alimentos y Tecnología Médica -ANMAT .Argentina, 2014. [Consulta: 03 diciembre 2015]. Disponible en: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/p072.htm>

Quattrochi, Oscar; Abelaira, Sara; y Laba, Raúl. "Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica". Ed. Artes Gráficas Farro S.A, Buenos Aires, (1992)

Rampazoo P. Standardisation and validation of analytical methods in the pharmaceutical industry. *Il Farmaco* 1990;45:807-15.

Norma ISO 17025 .Requerimientos sobre Validación de Métodos en el marco de la Acreditación de Laboratorios

Ross, P. J. (1996). Taguchi techniques for quality engineering : loss function, orthogonal experiments, parameter and tolerance design. New York ; London,

S.MENNICKENT, Desarrollo de un metodo por cromatografia en capa fina instrumental, Boletín de la Sociedad Chilena de Química [en línea], 2000, Chile, URL: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0366-16442000000400015

Straube, Philip J Wiffen, Sheena Derry, Henry J McQuay (2010), [Consulta: 12 diciembre 2015]. Disponible en: <http://www.cochrane.org/es/CD007076/pregabalina-para-el-dolor-agudo-y-cronico-en-adultos>

Stahl SM. Mechanism of action of alpha2delta ligands: voltage sensitive calcium channel (VSCC) modulators. *J Clin Psychiatry.* 2004;65:1033-1034

Taylor CP. The biology and pharmacology of calcium channel alpha2-delta proteins Pfizer Satellite Symposium to the 2003 Society for Neuroscience Meeting. SHERATON NEW ORLEANS HOTEL New Orleans, LA November 10, 2003. *CNS Drug Rev.* 200:183-188.

Hannover. Eurachem , *The fitness for purpuse of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics.*1998.. (Folleto)

Validación de métodos analíticos. *Monografía. Sección catalana de la AEFI. Comisión de normas de buena fabricación y control de calidad.* Sept., 1989:1-94).

United States Pharmacopeial Convention USP XXII: United States Pharmacopeia. 22ed. Easton: Mack Printing, 1990:1225,1710.

USP 36 –NF 26 *Capítulo General Validación de métodos farmacopéicos).*

ANEXOS

ANEXO 1: CROMATOGRAMA DE PREGABALINA ESTÁNDAR

Pregabalina

Date/Time: 2018-12-15, 09:09:02 p. m.
Data File: C:\N2000\MARY TESIS\ESTANDAR.mdy

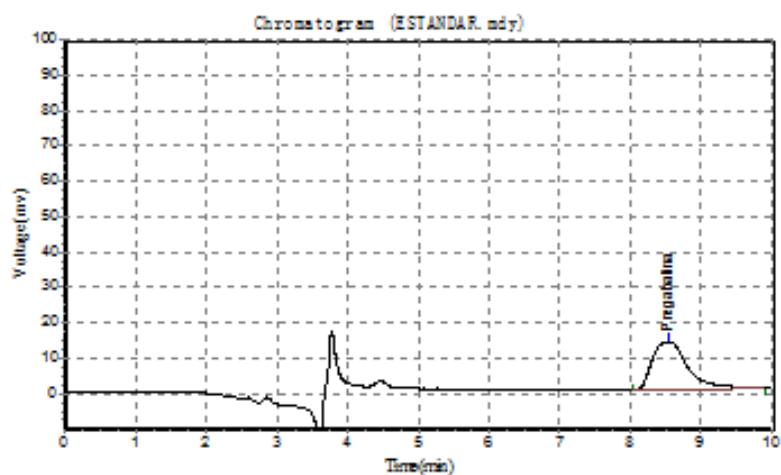
Analyst: MARY QUITO
Date/Time: 2018-01-05, 07:24:42 p. m.
Quantification: Area/Area%

Type of Instrument: GC

Detector: FID

Injector: Split

Column Temp: Prog. Temp.
Sample Description:
Flujo de Inyección: 1m l/min
Detector: UV200nm
Temperatura de la Columna: 30°C
Volumen de Inyección: 20µl
Columna: C18
Tiempo de corrida: 10 min



Results

| Peak No. | Peak ID | Ret Time | Height | Area | Conc |
|----------|-------------|----------|-----------|-------------|----------|
| 1 | Pregabalina | 8.548 | 13589.398 | 468932.594 | 35.5325 |
| Total | | | 51743.971 | 1319729.484 | 100.0000 |

ANEXO 2. CROMATOGRAMA MUESTRA DE PREGABALINA

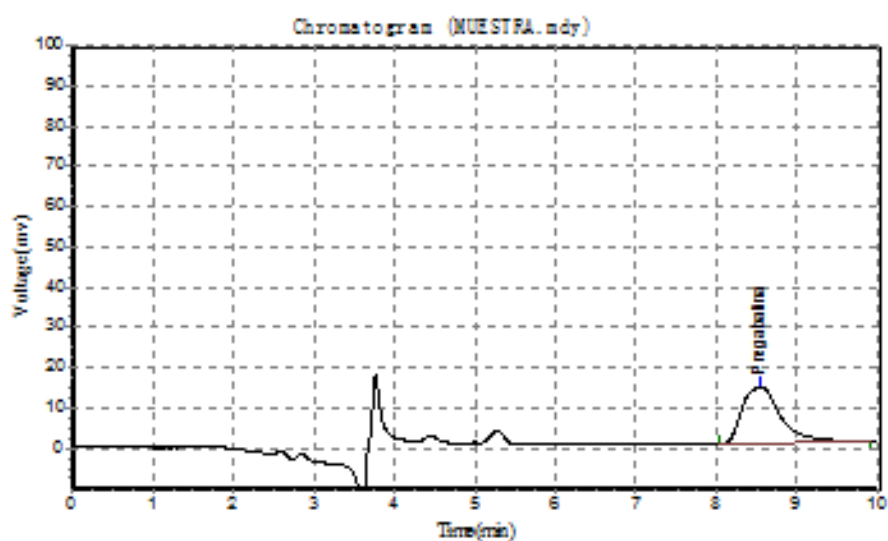
Pregabalina

Date/Time: 2018-12-15, 09:05:58 p. m.
Data File: c:\M2000\MARY TESIS\MUESTRA.mdy

Analyst: MARY QUITO
Date/Time: 2018-01-05, 07:26:58 p. m.
Quantification: Area/Area%

Type of Instrument: GC Detector: FID Injector: Split

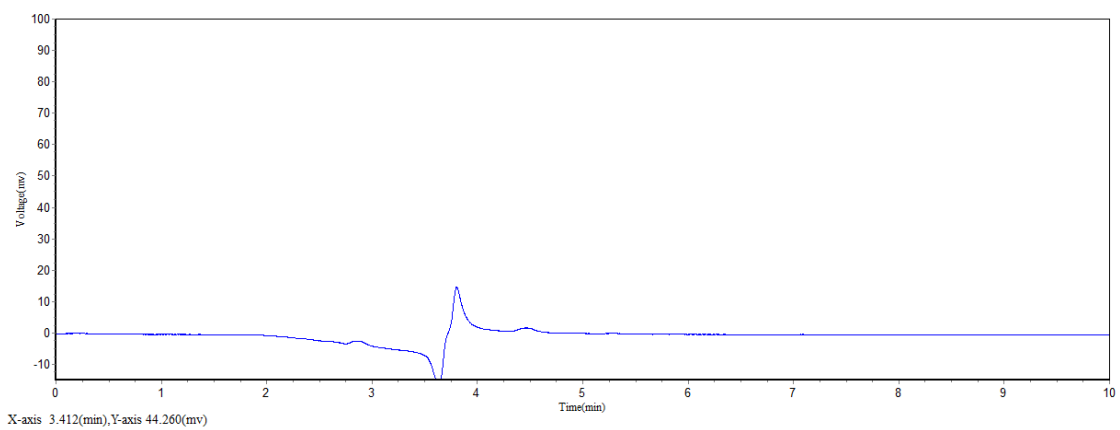
Column Temp: Prog. Temp.
Sample Description:
Fluj de inyección: 1ml/min
Detector: UV 200nm
Temperatura de la Columna: 30°C
Volumen de inyección: 20µL
Columna: C18
Tiempo de corrida: 10 min



Results

| Peak No. | Peak ID | Ret Time | Height | Area | Conc. |
|----------|-------------|----------|-----------|-------------|----------|
| 1 | Pregabalina | 8.548 | 13918.858 | 465914.000 | 21.4438 |
| Total | | | 87390.679 | 2172720.117 | 100.0000 |

ANEXO 3.CROMATOGRAMA FASE MÓVIL



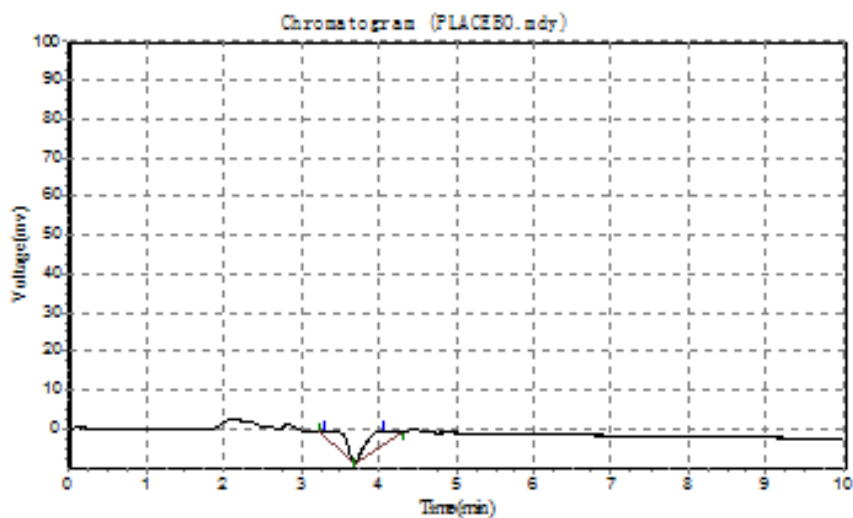
ANEXO 4. CROMATOGRAMA PLACEBO

Pregabalina

Date/Time: 2018-12-16, 02:05:28 a. m.
Data File: c:\32000\MARY TESIS\PLACEBO.mdy

Analyst: MARY QUITO
Date/Time: 2018-01-08, 07:50:11 p. m.
Quantification: Area/Area%

Sample Description:
Fluj: 1m/min
Defector:
Longitud de onda: 200nm
Volumen de Inyección: 20 uL/min
Temperatura: 30°C
Columna: C18



Results

| Peak No. | Peak ID | Ret Time | Height | Area | Conc. |
|----------|---------|----------|-----------|------------|----------|
| 1 | | 3.298 | 5317.143 | 138301.359 | 45.2479 |
| 2 | | 4.065 | 5708.643 | 167350.906 | 54.7521 |
| Total | | | 11025.785 | 305652.266 | 100.0000 |

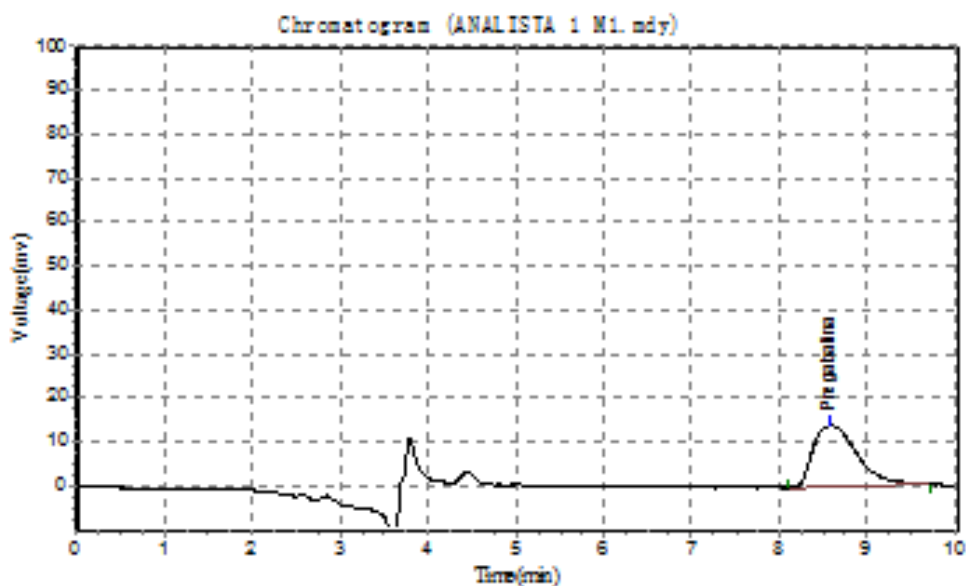
ANEXO 5. CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE PREGABALINA 150MG CÁPSULAS, PERPARADO POR ANALISTA 1 EN EL DÍA DE ANÁLISIS

Pregabalina

Date/Time: 2018-12-15, 10:06:55 p. m.
Data File: c:\N2000\MANT TESIS\ANALISTA 1 M1.mdy

Analyst: MANT QUITO
Date/Time: 2018-01-05, 06:46:56 p. m.
Quantification: Area/Area%

Sample Description:
Fluj: 1ml/min
Defector:
Longitud de onda: 200nm
Volumen de Inyección: 20 uL/min
Temperatura: 30°C
Columna: C18



Results

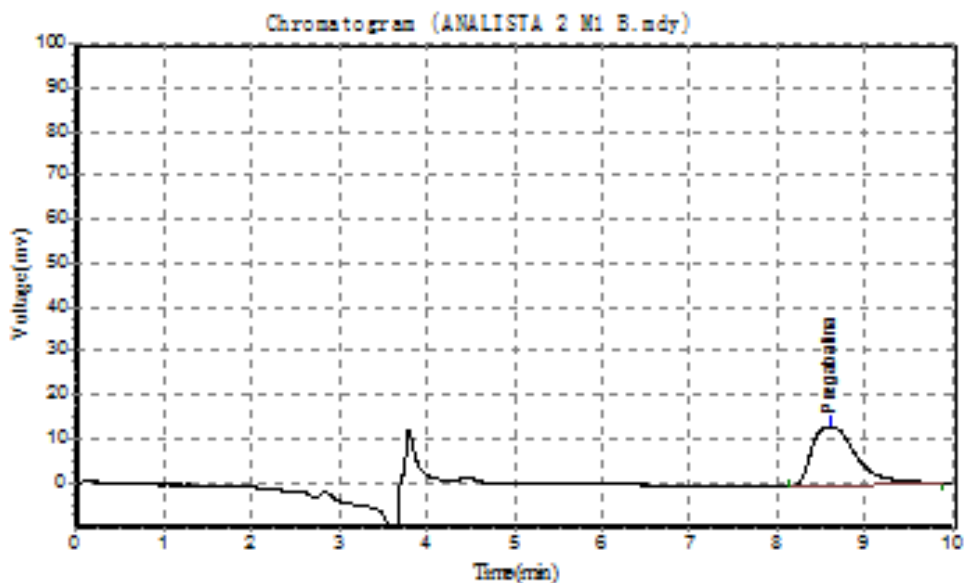
| Peak No. | Peak ID | Ret Time | Height | Area | Conc. |
|--------------|-------------|----------|-----------|-------------|----------|
| 1 | Pregabalina | 8.582 | 13645.311 | 481346.813 | 26.9077 |
| Total | | | 57365.157 | 1788880.281 | 100.0000 |

**ANEXO 6. CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE PREGABALINA 150MG CÁPSULAS,
PERPARADO POR ANALISTA 2 EN EL DÍA DE ANÁLISIS**

Pregabalina

Date/Time: 2016-12-16, 01:47:37 a. m.
Data File: c:\N2000\MARY TESIS\ANALISTA 2 Mi B.mdy

Analyst: MARY QUITO
Date/Time: 2016-01-06, 06:43:42 p. m.
Quantification: Area/Area%



Results

| Peak No. | Peak ID | Ret Time | Height | Area | Conc. |
|--------------|-------------|----------|-----------|-------------|----------|
| 1 | Pregabalina | 8.590 | 13354.925 | 472370.188 | 32.4804 |
| Total | | | 50667.814 | 1454325.953 | 100.0000 |

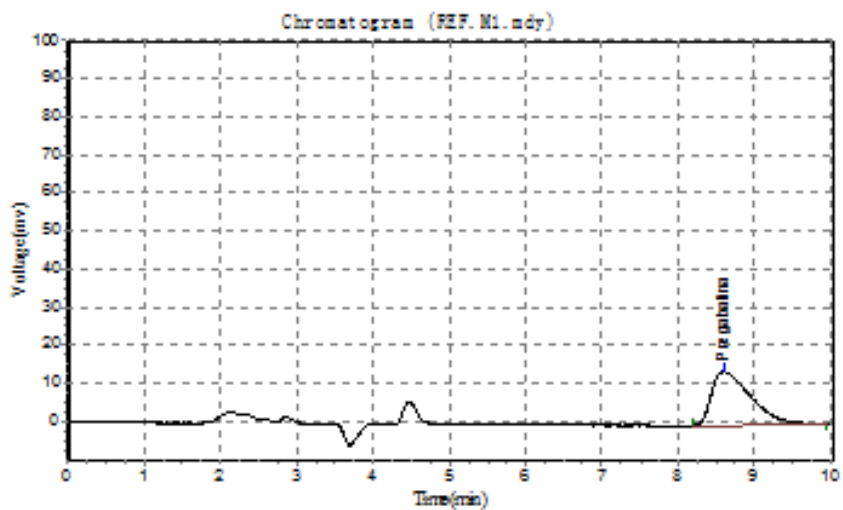
ANEXO 7. CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE PREGABALINA 150MG CÁPSULAS, A REFRIGERACION EN 24 HORAS

Pregabalina

Date/Time: 2016-12-16, 02:15:19 a. m.
Data File: c:\N2000\MANT TESIS\PEF. Mi. mdy

Analyst: MARY QUITO
Date/Time: 2016-01-05, 06:57:28 p. m.
Quantification: Area/Area%

Sample Description:
Flujo: 1ml/min
Defector:
Longitud de onda: 200nm
Volumen de inyección: 20 uL/min
Temperatura: 30°C
Columna: C18



Results

| Peak No. | Peak ID | Ret Time | Height | Area | Conc. |
|----------|-------------|----------|-----------|------------|----------|
| 1 | Pregabalina | 8.598 | 13871.387 | 502873.313 | 100.0000 |
| Total | | | 13871.387 | 502873.313 | 100.0000 |

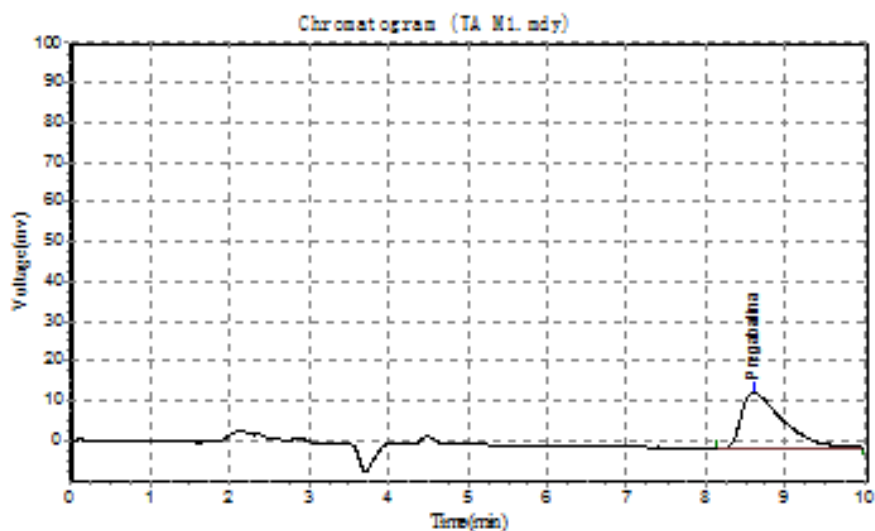
ANEXO 8. CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE PREGABALINA 150MG CÁPSULAS, A TEMPERATURA AMBIENTE EN 24 HORAS

Pregabalina

Date/Time: 2018-12-16, 02:06:22 a. m.
Data File: c:\N2000\MANT TESIS\TA M1.mdy

Analyst: MARY QUITO
Date/Time: 2018-01-08, 07:05:09 p. m.
Quantification: Area/Area%

Sample Description:
Fluj: 1ml/min
Defector:
Longitud de onda: 200nm
Volumen de Inyección: 20 uL/min
Temperatura: 30°C
Columna: C18



Results

| Peak No. | Peak ID | Ret Time | Height | Area | Conc. |
|----------|-------------|----------|-----------|------------|----------|
| 1 | Pregabalina | 8.598 | 13789.964 | 494359.188 | 80.1721 |
| Total | | | 18822.132 | 616622.414 | 100.0000 |

ANEXO 9. CROMATOGRAMA EXACTITUD DE ANALISIS DE ANÁLISIS DE PREGABALINA 150MG CÁPSULAS, 60% DE PRINCIPIO ACTIVO.

Pregabalina

Date/Time: 2015-12-15, 09:47:00 p. m.
Data File: c:\N2000\MANT TESIS\E80%.mdy

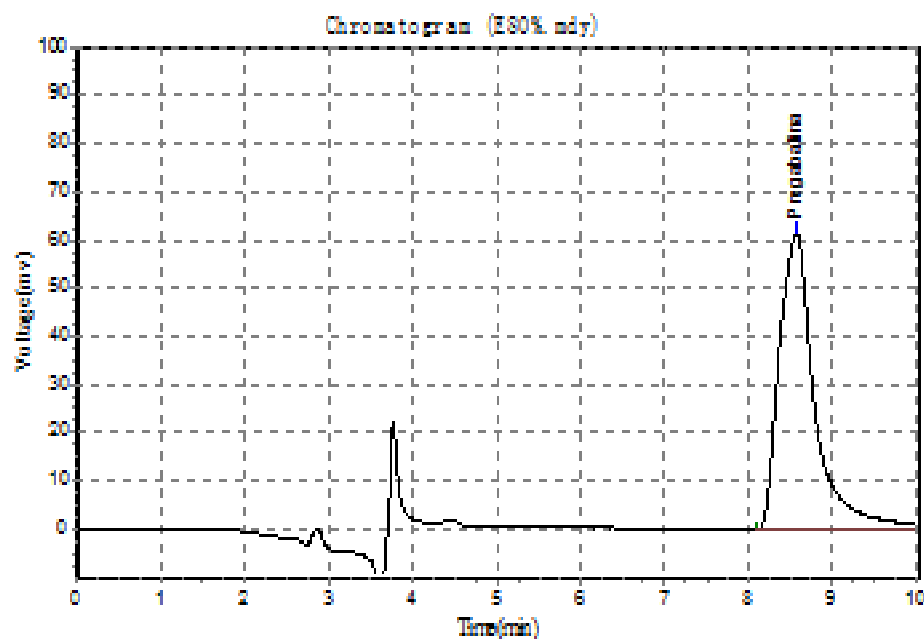
Analyst:
Date/Time: 2015-01-05, 07:09:17 p. m.
Quantification: Area/Area%

Type of Instrument: GC

Detector: FID

Injector: Split

Column Temp: Prog. Temp.



Results

| Peak No. | Peak ID | Ret Time | Height | Area | Conc |
|--------------|-------------|----------|------------|-------------|----------|
| 1 | Pregabalina | 8.582 | 61456.844 | 1831642.875 | 65.7989 |
| Total | | | 108988.674 | 2783910.289 | 100.0000 |

ANEXO 10. CROMATOGRAMA EXACTITUD DE ANALISIS DE ANÁLISIS DE PREGABALINA 150MG CÁPSULAS, 80% DE PRINCIPIO ACTIVO.

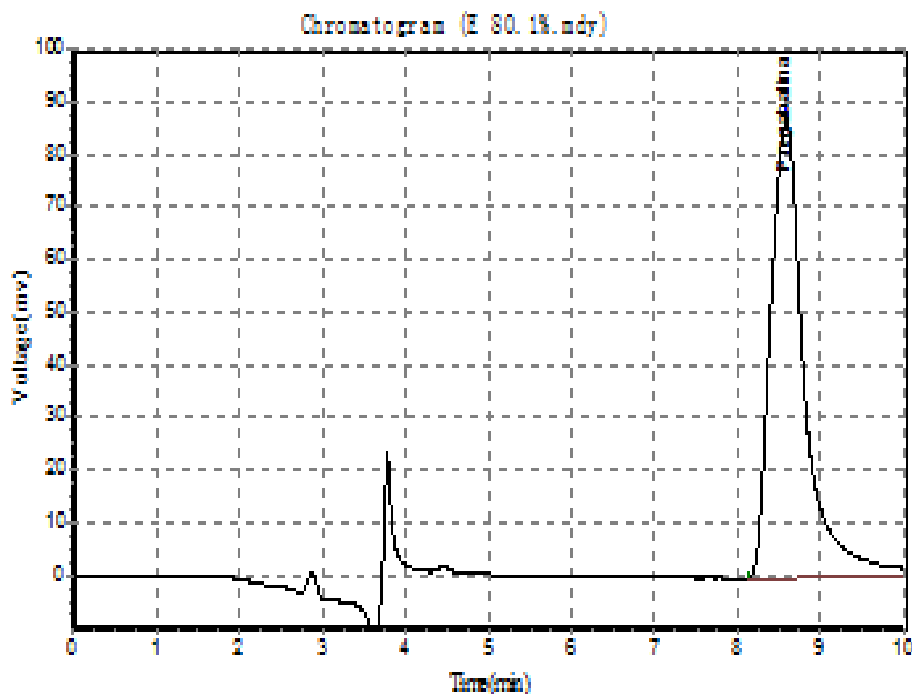
Pregabalina

Date/Time: 2016-12-16, 09:52:51 p. m.
 Data File: c:\X2000\MANT TESIS\E 80.1%.mdy

Analyst: MARY QUITO
 Date/Time: 2016-01-05, 07:10:11 p. m.
 Quantification: Area/Area%

Type of Instrument: GC Detector: FID Injector: Split

Column Temp: Prog. Temp.
 Sample Description:
 Fluj de Inyección: 1m /min
 Detector: UV 200nm
 Temperatura de la Columna: 30°C
 Volumen de Inyección: 20ul
 Columna: C18
 Tiempo de corrida: 10 min



Results

| Peak No. | Peak ID | Ret Time | Height | Area | Conc |
|----------|-------------|----------|-----------|-------------|---------|
| 1 | Pregabalina | 8.583 | 87430.352 | 2497913.000 | 73.1673 |

ANEXO 11. CROMATOGRAMA EXACTITUD DE ANALISIS DE ANÁLISIS DE PREGABALINA 150MG CÁPSULAS, 100% DE PRINCIPIO ACTIVO.

Pregabalina

Date/Time: 2016-12-15, 09:57:29 p. m.
Data File: c:\M2000\MARY TESIS\E100%.mdy

Analyst: MARY QUITO
Date/Time: 2016-01-05, 07:11:26 p. m.
Quantification: Area/Area%

Type of Instrument: GC

Detector: FID

Injector: Split

Column Temp: Prog. Temp.

Sample Description:

Fluj de inyección: 1ml/min

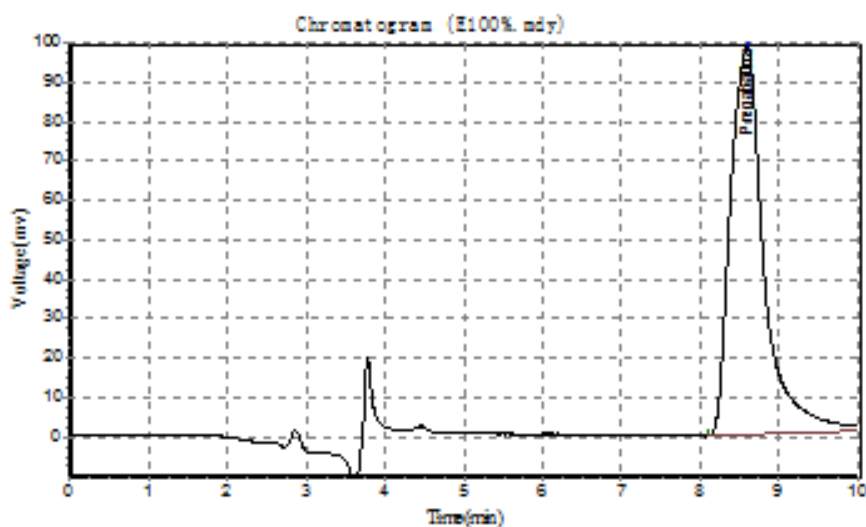
Detector: UV 200nm

Temperatura de la Columna: 30°C

Volumen de inyección: 20µL

Columna: C18

Tiempo de corrida: 10 min



Results

| Peak No. | Peak ID | Ret Time | Height | Area | Conc |
|--------------|-------------|----------|------------|-------------|----------|
| 1 | Pregabalina | 8.588 | 98757.203 | 2961356.500 | 83.1581 |
| Total | | | 136509.474 | 3561116.580 | 100.0000 |

ANEXO 12. CROMATOGRAMA DE LINEALIDAD A CONCENTRACION DE ESTÁNDAR AL 80%

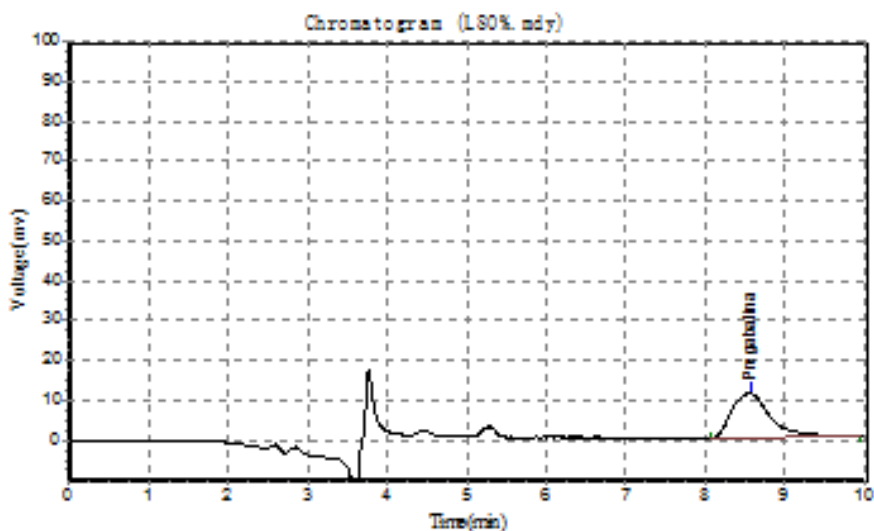
Pregabalina

Date/Time: 2015-12-15, 09:17:10 p. m.
Data File: c:\32000\MARY TESIS\LS0%.mdf

Analyst: MARY QUITO
Date/Time: 2016-01-05, 07:16:29 p. m.
Quantification: Area/Area%

Type of Instrument: GC Detector: FID Injector: Split

Column Temp: Prog. Temp.
Sample Description:
Flujo de Inyección: 1ml/min
Detector: UV 200nm
Temperatura de la Columna: 30°C
Volumen de Inyección: 20µL
Columna: C18
Tiempo de corrida: 10 min



Results

| Peak No. | Peak ID | Ret Time | Height | Area | Conc. |
|----------|-------------|----------|-----------|------------|---------|
| 1 | Pregabalina | 8.565 | 11045.289 | 372175.188 | 21.4862 |

ANEXO 13. CROMATOGRAMA DE LINEALIDAD A CONCENTRACION DE ESTÁNDAR AL 90%

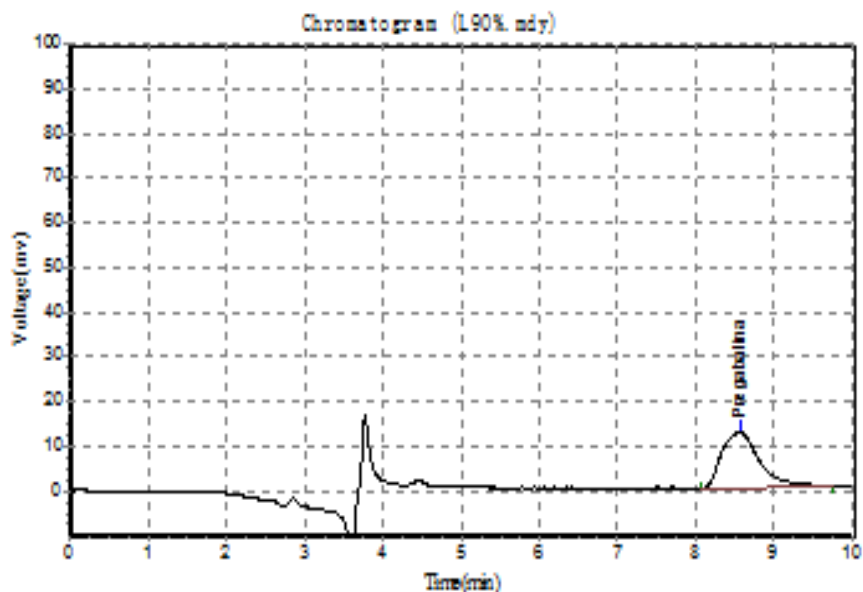
Pregabalina

Date/Time: 2016-12-15, 09:21:04 p. m.
Data File: c:\X2000\MANT TESIS\190%.mdy

Analyst: MARY QUITO
Date/Time: 2016-01-05, 07:16:29 p. m.
Quantification: Area/Area%

Type of Instrument: GC Detector: FID Injector: Split

Column Temp: Prog. Temp.
Sample Description:
Fluj de inyección: 1ml/min
Detector: UV 200nm
Temperatura de la Columna: 30°C
Volumen de inyección: 20µL
Columna: C18
Tiempo de corrida: 10 min



Results

| Peak No. | Peak ID | Ret Time | Height | Area | Conc. |
|----------|-------------|----------|-----------|------------|---------|
| 1 | Pregabalina | 8.573 | 12388.128 | 416362.500 | 33.9995 |

ANEXO 14. CROMATOGRAMA DE LINEALIDAD A CONCENTRACION DE ESTÁNDAR AL 100%

Pregabalina

Date/Time: 2018-12-15, 09:24:25 p. m.
Data File: c:\X2000\MARY TESIS\L100%.mdy

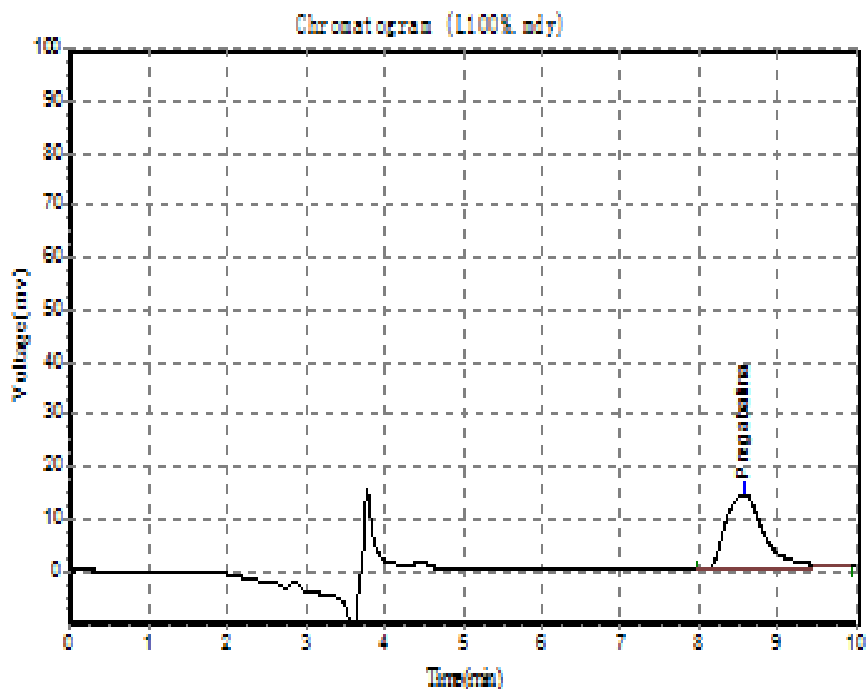
Analyst: MARY QUITO
Date/Time: 2018-01-05, 07:18:01 p. m.
Quantification: Area/Area%

Type of Instrument: GC

Detector: FID

Injector: Split

Column Temp: Prog. Temp.
Sample Description:
Fluj de inyección: 1ml/min
Detector: UV200nm
Temperatura de la Columna: 30°C
Volumen de inyección: 20ul
Columna: C18
Tiempo de corrida: 10 min



Results

| Peak No. | Peak ID | Ret Time | Height | Area | Conc. |
|--------------|-------------|----------|-----------|-------------|----------|
| 1 | Pregabalina | 8.565 | 14308.823 | 476210.188 | 36.0386 |
| Total | | | 51269.721 | 1321388.836 | 100.0000 |

ANEXO 15. CROMATOGRAMA DE LINEALIDAD A CONCENTRACION DE ESTÁNDAR AL 110%

Pregabalina

Date/Time: 2016-12-15, 09:27:57 p. m.
Data File: c:\X2000\MARY TESIS\1110%.mdy

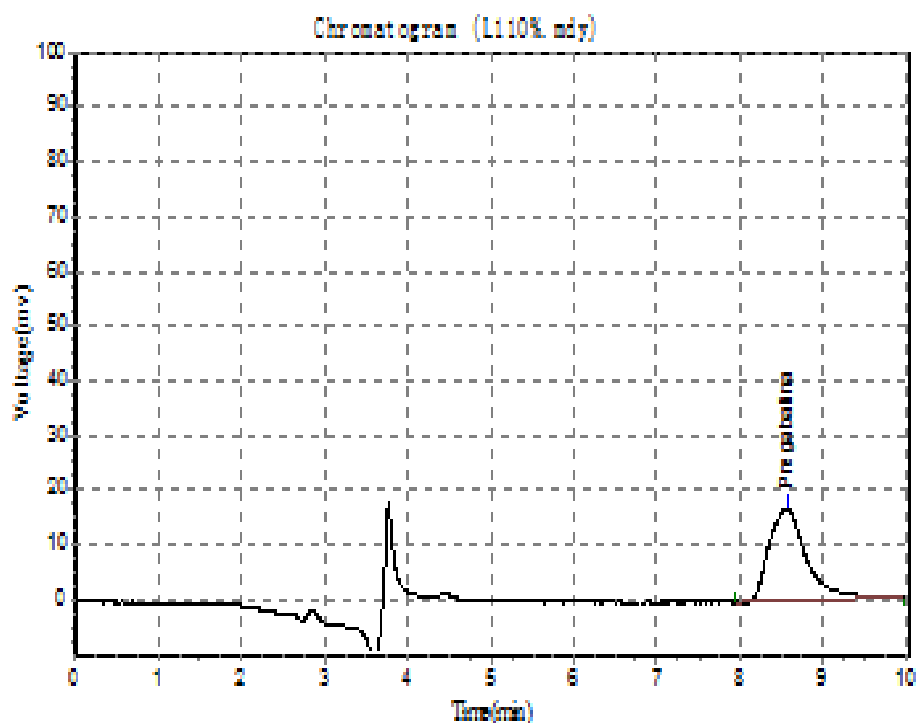
Analyst: MARY QUITO
Date/Time: 2016-01-05, 07:19:08 p. m.
Quantification: Area/Area%

Type of Instrument: GC

Detector: FID

Injector: Split

Column Temp: Prog. Temp.



Results

| Peak No. | Peak ID | Ret Time | Height | Area | Conc. |
|--------------|-------------|----------|-----------|-------------|----------|
| 1 | Pregabalina | 8.565 | 16777.344 | 525951.313 | 28.7099 |
| Total | | | 68176.008 | 1831953.672 | 100.0000 |

ANEXO 16. CROMATOGRAMA DE LINEALIDAD A CONCENTRACION DE ESTÁNDAR AL 120%

Pregabalina

Date/Time: 2016-12-15, 09:51:05 p. m.
 Data File: c:\N2000\MARY TESIS\L120%.mdy

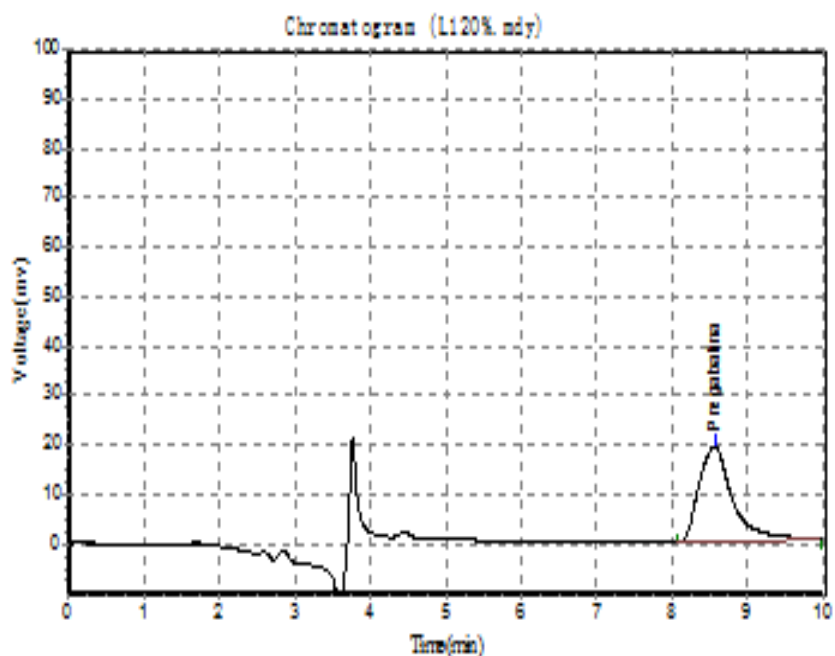
Analyst: MARY QUITO
 Date/Time: 2016-01-05, 07:20:14 p. m.
 Quantification: Area/Area%

Type of Instrument: GC

Detector: FID

Injector: Split

Column Temp: Prog. Temp.
 Sample Description:
 Fluj de inyección: 1m l/min
 Detector: UV200nm
 Temperatura de la Columna: 30°C
 Volumen de inyección: 20ul
 Columna: C18
 Tiempo de corrida: 10 min



Results

| Peak No. | Peak ID | Ret Time | Height | Area | Conc. |
|--------------|-------------|----------|-----------|-------------|----------|
| 1 | Pregabalina | 8.565 | 19198.316 | 583846.625 | 39.8461 |
| Total | | | 62218.379 | 1465255.281 | 100.0000 |