



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

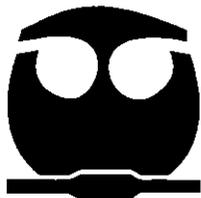
COMPARACION DE DOS TECNICAS ANALITICAS PARA LA DETERMINACION DE TRAZAS DE L-CARNITINA EN VALIDACION DE PROCEDIMIENTOS DE LIMPIEZA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

PRESENTA

CARLA CERVANTES CAMACHO



MEXICO, D.F.

2011/02



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Prof. Alfredo Garzón Serra
Vocal	Profra. Inés Fuentes Noriega
Secretaria	Profra. Rosa Lorenia Mora- Tovar y Chávez
1er. Suplente	Profra. Josefina Elizalde Torres
2do. Suplente	Profra. María de Lourdes Mayet Cruz

El tema se desarrolló en Nysco de México S.A.
de C.V.

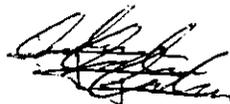
Asesor: Prof. Alfredo Garzón Serra



Supervisora Técnica: QFB Isabel Domínguez
Suárez



Sustentante: Carla Cervantes Camacho



Dios mío:

*Yo quiero unirme a los cielos y a la tierra;
que te alaban sin cesar,
darte gracias con todos los pueblos,
por tu gran amistad.*

*Peregrina soy también,
en esta tierra como los demás,
pero también como ellos,
es tu gracia eterna lo que me alienta a caminar.*

*Gracias, por construir en mí un altar,
donde cada día con gozo,
y en los días especiales aún más,
puedo agradecerte todo,
todo lo que tú me das.*

*Gracias, porque puedo decir también,
como todos los demás,
el Señor es mi fuerza y mi energía, él es mi salvación,
y su amor y fidelidad duran por siempre.*

*Gracias Señor, porque viste bien darme esta carrera
bendiciendo el trabajo de muchos, para realizar así,
tu plan de salvación, te la ofrezco para que así sea.
Gracias, por ayudarme tanto, por ser mi aliento para
terminarla y por darme los medios para hacerlo.*

*Ya no temo, Señor, como antes, los fracasos,
ya no temo, Señor, como antes, la ingratitud,
porque el triunfo, Señor, en la vida,
tú lo eres, tú lo tienes, tú lo das.*

Con profundo agradecimiento a las personas que me han rodeado de tanto cariño en mi vida:

Mis padres, Carlos Cervantes y Rosa María Camacho, gracias por todo el amor, esfuerzo y apoyo que me han brindado toda la vida, y reconociendo de manera especial lo que me han brindado estos últimos años, más allá de lo que pudo ser su responsabilidad, apoyándome a superar las dificultades para que esta meta se realizara.

A mis hermanos Rosa Etna, Ilse y Carlos por todo su amor y ayuda durante toda mi vida, y agradeciéndoles todo lo que ellos me han enseñado.

A Carlos Manuel Acuña, con afecto único, por todo su amor, su compañía, por compartirme su forma de ver la vida e incluirme en ella, y por ser mi alegría y fuente de inspiración para mi vida.

También agradeciendo a mi director de Tesis Prof. Alfredo Garzón, a mi directora técnica Q.F.B. Isabel Domínguez y a los integrantes del departamento analítico de Nysco de México, y a todos los Maestros y demás personas que con su esfuerzo hacen posibles días como estos.

INDICE

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN.....pág. 2

CAPÍTULO 2

GENERALIDADES.....pág. 4

CAPÍTULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

- CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA

RESOLUCIÓN.....pág. 44

- DETERMINACIÓN DE CARBONO ORGÁNICO

TOTAL.....pág. 94

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES.....pág. 121

CAPITULO 5

BIBLIOGRAFÍA.....pág. 131

APÉNDICE I.....pág. 126

APÉNDICE II.....pág. 129

INTRODUCCIÓN

En la industria farmacéutica es de vital importancia cuidar la limpieza de los equipos de producción. Las actuales normas de la industria farmacéutica establecen que es necesario demostrar que los procedimientos utilizados en la limpieza de equipos, utensilios y áreas de fabricación, remueven los residuos de productos o detergentes de manera adecuada. El inicio de esta regulación comenzó con la edición de "Guide to Inspections of Validation of Cleaning Processes" emitida por la FDA en julio de 1993. Para asegurar la efectividad de los procedimientos de limpieza se realiza lo que se denomina: validación de limpieza. Esta consiste en el muestreo de secciones del equipo de producción que están en contacto con el producto, para ser analizadas por métodos validados para este fin. Este análisis puede ser realizado por diferentes técnicas, comprobándose con los resultados, que el equipo no exceda los límites de aceptación previamente establecidos.

Cuando un equipo no ha sido adecuadamente limpiado, se puede dar lo que se denomina contaminación cruzada. La contaminación cruzada, se refiere a la contaminación de un lote de producción con otro; de presentarse, representa un problema muy grave de consecuencias impredecibles.

Para la validación de limpieza se han empleado con preferencia, métodos específicos que cuantifiquen los residuos de los principios activos del lote anterior fabricado. Una de las técnicas más empleadas, es la de cromatografía de alta resolución (HPLC). Esta técnica, a pesar de ser una técnica específica y sensible, es costosa y no es capaz de reportar la presencia de detergentes u otros contaminantes que pudieran estar presentes.

Por otra parte, la técnica de cuantificación de carbono (TOC) no ha sido muy usada para la validación de limpieza, sin embargo, por sus características de sensibilidad, rapidez y bajo costo, representa una buena alternativa para la validación de limpieza.

La técnica de TOC presenta un punto crítico en contra: que no es específica. Esta característica sin embargo, le da al mismo tiempo la ventaja de poder cuantificar excipientes, detergentes y cualquier contaminante orgánico presente.

Este trabajo de tesis está enfocado a comparar ambas técnicas con un mismo principio activo, con la finalidad de evaluar la conveniencia o inconveniencia de la técnica innovadora de TOC contra una técnica ampliamente usada como lo es la técnica de HPLC

Para ésto, se desarrollarán los métodos correspondientes y se validarán para confirmar la confiabilidad de los resultados.

CAPÍTULO 2

GENERALIDADES

MONOGRAFÍA DE L-CARNITINA

PARTE QUÍMICA'

Nombre común: L-carnitina², Levocarnitina, Vitamina B₇.

Nombre químico: Trimetil betaína del ácido γ -amino β -hidroxibutírico.

γ -trimetil- β -hidroxibutiro betaína.

Fórmula:



Fórmula condensada: C₇H₁₅NO₃

Masa molecular: 161.20 g/mol.

Proporciones de los elementos que la componen: C 52.15%, H 9.38%, N 8.69%, O 29.78%.

Punto de fusión: 197-198°C.

Rotación específica: Entre -29° y -32°. En una solución con 100 mg/mL, en agua.

Solubilidad: Muy soluble en agua (una parte de soluto en menos de una parte de disolvente), soluble en etanol caliente (una parte de soluto en 10 a

30 partes de disolvente), prácticamente insoluble en éter etílico, benceno y acetona.

En solución acuosa reacciona fuertemente con álcalis. Con H_2SO_4 se forma crotonobetaina.³

Aspecto: Polvo cristalino blanco, higroscópico, generalmente con sabor salado y ligero olor a aminas.

pH (solución acuosa 1:20): entre 5.5 y 9.5^{4,1}

Condiciones de almacenaje: Manténgase en contenedores cerrados.

Identificación. 1) El espectro de absorción en Infrarrojo de la muestra corresponde al de la referencia (ambos previamente secados al vacío a 50°C por 5 horas). 2) Por HPLC el tiempo de retención de la solución de la muestra es igual al de la referencia.

Contenido de agua, por Karl Fisher: No más de 4.0%

Residuo de ignición: No más de 0.5%

Límite de potasio: No más de 0.2%

Límite de sodio: No más de 0.1%

Metales pesados: No más de 0.002%

Cloruros: No más de 0.4%

Valoración (base anhidra): 97.0%-103.0%

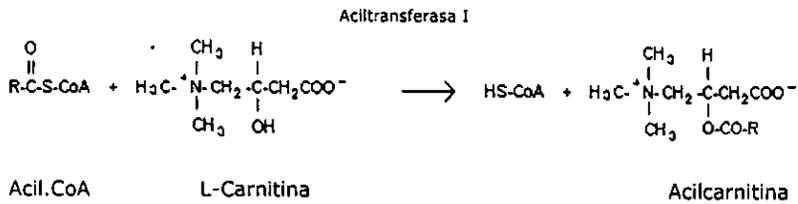
PARTE FARMACOLÓGICA²

La L-carnitina es sintetizada en los tejidos y utilizada en los procesos biológicos.

Acciones Farmacológicas. La administración de L-carnitina a individuos normales no produce apreciables efectos, y dosis orales más altas que 15 g al día, son generalmente bien toleradas. En contraste, la administración de DL-carnitina puede producir un síndrome que semeja la miastenia gravis. Se presume que se deba a que el isómero D inhibe el transporte y la función de la L-carnitina.

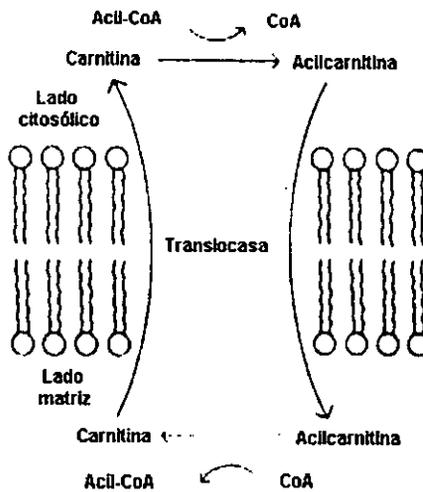
Funciones fisiológicas. La carnitina participa en el metabolismo de los ácidos grasos. La carnitina transporta a los ácidos grasos de cadena larga activados hasta la matriz mitocondrial.⁵

Los ácidos grasos se activan en la membrana externa mitocondrial y se oxidan en la matriz mitocondrial. Puesto que las moléculas de acil-CoA de cadena larga no atraviesan fácilmente la membrana interna mitocondrial, es necesario un mecanismo especial de transporte. Los ácidos grasos de cadena larga activados son transportados a través de la membrana interna por la carnitina, un compuesto de carácter zwitteriónico derivado de la lisina. El grupo acilo se transfiere desde el átomo de azufre de la CoA al grupo hidroxilo de la carnitina para formar acilcarnitina. Esta reacción está catalizada por la carnitina aciltransferasa I, localizada en la cara citosólica de la membrana interna mitocondrial.⁵



La acilcarnitina actúa entonces como un transportador a través de la membrana interna mitocondrial, por acción de una translocasa.⁵

ACILCARNITINA COMO TRANSPORTADOR⁵



La entrada de acilcarnitina en la matriz mitocondrial viene mediada por una translocasa. La carnitina vuelve al lado citosólico de la membrana mitocondrial intercambiándose por una acilcarnitina.

Figura 2.1

El grupo acilo se transfiere a una CoA situado en la matriz mitocondrial. Esta reacción, catalizada por la carnitina aciltransferasa II, es termodinámicamente factible porque el enlace O-acilo de la carnitina tiene un elevado potencial de transferencia de grupo. Por último, la carnitina vuelve al lado citosólico por la translocasa, intercambiándose por una acilcarnitina que entra.⁵

Como ya se mencionó, la carnitina es importante para la oxidación de ácidos grasos; además, también facilita el metabolismo aeróbico de carbohidratos, incrementa el grado de fosforilación oxidativa y promueve la excreción de ciertos ácidos orgánicos. Derivadas de estas funciones existen:²

1) Un número de acetiltransferasas de carnitina (CATs) que catalizan la interconversión de ésteres de ácidos grasos-coenzima A (CoA) y carnitina están estratégicamente localizadas en el citoplasma y en las membrana mitocondriales.

2) Los ésteres de CoA y carnitina son termodinámicamente equivalentes, y la formación depende solamente de la concentración relativa de los reactantes.

3) Existen translocasas específicas en las membranas mitocondrial y citoplasmática. Las translocasas en las membranas mitocondriales transportan ambas, carnitina libre y ésteres en cualquier dirección, en comparación con la de membrana plasmática de las células del túbulo renal, que exclusivamente transportan carnitina libre desde el túbulo de la orina hacia el torrente sanguíneo. Las propiedades de las translocasas en la membrana plasmática de otras células están menos definidas. La carnitina es transportada activamente hacia el interior de las células, y las

acilcarnitinas (particularmente los ésteres de cadena corta) son transportados fuera de las células.

4) Los ésteres de ácidos grasos de CoA son formados casi exclusivamente en el citoplasma y no son transportados a través de las membranas; ellos también inhiben enzimas del ciclo de Krebs lo que involucra a la fosforilación oxidativa. La oxidación de ácidos grasos requiere de la formación de acilcarnitinas y su translocación dentro de la mitocondria, donde los ésteres de CoA son reformados y metabolizados (β -oxidación⁵). En isquemia cardiaca o de músculo esquelético, esto resulta en la formación reducida de lactato y en un incremento en la capacidad de realizar trabajo mecánico.²

En el caso de una deficiencia genética de una de las acetil CoA deshidrogenasas, la carnitina sirve para promover la remoción de los correspondientes ácidos grasos desde las células y la sangre. La acetilcarnitina puede ser transportada fuera de la mitocondria hacia la circulación, pero no puede ser reabsorbida desde los túbulos renales. Tal remoción de acetilcarnitina de las células y la sangre produce un estado de relativa deficiencia.²

Requerimientos humanos.² La necesidad de carnitina en adultos es satisfecha por las fuentes en la dieta y por síntesis, esta última ocurre principalmente en el hígado y riñón. Los niños que nacen con bajo peso o que son prematuros, tienen una gran deficiencia de carnitina. Estos infantes pueden acumular grasas durante su desarrollo, y pueden ser beneficiados por la administración de carnitina exógena. La carnitina es sintetizada a partir de residuos de lisina de varias proteínas, comenzando por la formación de 6 N-trimetilisina por una serie de reacciones que involucran S-

adenosilmetionina. Cuatro micronutrientes son necesarios para los varios pasos enzimáticos, incluyendo ácido ascórbico, niacina, piridoxina y hierro. .

El total de L-carnitina que contiene el cuerpo humano, es de aproximadamente 20g, y está distribuida de manera no uniforme; el 98% está presente en el músculo esquelético y cardíaco donde transporta ácidos grasos y cetoácidos formados a partir de aminoácidos, el 1.4 % en el hígado y riñones y sólo el 0.6% en los fluidos extracelulares y otros tejidos.⁶

Fuentes naturales de carnitina en la alimentación.² Las principales fuentes de carnitina en la dieta son la carne y productos lácteos. Granos de cereales no contienen carnitina y también pueden ser relativamente deficientes en lisina y metionina, que son los aminoácidos precursores.

Absorción, distribución y excreción.² La carnitina ingerida en la dieta se absorbe casi completamente en el intestino, por un mecanismo de transporte saturable; por tanto la fracción oral absorbida declina conforme la dosis se incrementa. La carnitina es transportada hacia la mayoría de las células por un mecanismo de transporte activo; la D-carnitina también es transportada y puede inhibir el paso de L-carnitina. Una pequeña parte de la L-carnitina es metabolizada y la mayoría de ella es excretada en la orina como acetilcarnitina; los túbulos renales generalmente absorben más del 90% de la carnitina no esterificada.

Usos terapéuticos.² La L-carnitina fue aprobada por la FDA en 1986 como un fármaco para el tratamiento de deficiencia primaria de carnitina. También puede ser empleada en tratamiento de pacientes con condiciones conocidas como deficiencia secundaria de carnitina. 1 a 2 gramos de carnitina al día divididos en varias dosis son adecuados para la mayoría de los propósitos terapéuticos. En dosis intravenosas el intervalo es de 40 a 100 mg/Kg. Para niños se recomienda una dosis oral de 100 mg/Kg por día.

Deficiencia primaria de carnitina. El principal tratamiento de la deficiencia de carnitina sistémica es una dieta alta en carbohidratos y baja en grasas. La administración de carnitina como suplemento en pacientes con ambos, desórdenes miopáticos y sistémicos, ha sido utilizada frecuentemente, pero los resultados han sido variables. Algunos pacientes reportan dramáticos beneficios sintomatológicamente y funcionalmente después de la administración de 4 g por día, donde otras dosis no han resultado. La relación de cambios bioquímicos con alivio de síntomas no es predecible. A todos los pacientes con deficiencia primaria de carnitina se les debe administrar suplemento oral de carnitina para hacer la prueba.

Enfermedad renal. Pacientes que reciben hemodiálisis crónica, pueden desarrollar deficiencia de carnitina en músculo esquelético y posiblemente en músculo cardíaco. El tratamiento con L-carnitina puede minimizar el grado de deficiencia, y se han reportado mejoras para síntomas tales como debilidad de rodillas y calambres musculares. La carnitina también puede mejorar la función cardíaca en pacientes con hemodiálisis, pero este uso es más controversial.

Cardiopatías e isquemia cardiovascular. La mayoría de la energía que necesita el miocardio es satisfecha por la oxidación de ácidos grasos. En vista del papel crítico que desempeña la carnitina en el metabolismo energético cardíaco y el desarrollo de cardiomiopatías en estados deficientes de carnitina, la posibilidad de que algunos individuos con cardiomiopatía primaria puedan sufrir deficiencia de carnitina, ha provocado gran interés. Más aún, la isquemia del miocardio causa una depleción de carnitina cardíaca y acumulación de ésteres de CoA y ácidos grasos de cadena larga y ésteres de carnitina; las acetilcarnitinas pueden ser importantes en la génesis de arritmias. La administración de carnitina parece mejorar la tolerancia al ejercicio de pacientes con enfermedad de la arteria coronaria y puede beneficiar a pacientes con deficiencia congestiva cardíaca. Las isquemias en músculo esquelético causan disturbios similares en el metabolismo de lípidos y de carnitina, y la administración de carnitina puede incrementar la tolerancia a caminar en pacientes que sufren de cansancio intermitente. El papel de la carnitina en este aspecto de la terapéutica se está estableciendo.

CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN HPLC

HPLC Son las siglas de High-Pressure Liquid Chromatography, lo que en español se denomina Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. En este texto nos referiremos a esta técnica cromatográfica como HPLC, por la conveniencia de no emplear un nombre tan largo, y porque es la designación más usada para esta técnica.

Definición y principio en el que se basa.^{4.2}

La cromatografía se define como el procedimiento por el cual los solutos son separados por un proceso dinámico de migración diferencial en un sistema consistente en 2 o más fases, una de las cuales se mueve continuamente en una dirección dada y en la cual las sustancias exhiben diferente movilidad por razón de diferencias en absorción, partición, solubilidad, presión de vapor, tamaño molecular o densidad de carga iónica. Las sustancias individuales así obtenidas, pueden ser identificadas o determinadas por métodos analíticos.

En el caso particular de HPLC el soluto que está disuelto en un líquido, sufre una distribución entre dos fases, una que es fija y sólida (fase estacionaria), y otra que es móvil y líquida (fase móvil). Esta distribución en el medio, logra la virtual separación de un soluto de otros, que eluyen antes o después, dependiendo de las características propias de cada uno. Los solutos son transportados por el líquido de la fase móvil, al que también se le denomina eluyente. La separación de los solutos se logra mediante

diferentes mecanismos, como son: partición, adsorción e intercambio iónico. Las más usadas son las que logran la separación por una combinación de efectos de adsorción y partición.

Subdivisiones en HPLC⁷

En la cromatografía de líquidos HPLC existen 4 diferentes **subtipos** que son:

Exclusión. La separación se basa en las diferencias de tamaño de las moléculas, las cuales pasan a través de una base de partículas porosas, de manera que las partículas más grandes eluyen primero que las más pequeñas debido a que estas recorren un camino más largo al entrar en las cavidades de las partículas de la fase estacionaria. Se emplea para moléculas grandes como polímeros.

Intercambio iónico. Se emplea para sustancias solubles en agua, catiónicas o aniónicas, y la separación se basa en la afinidad de la carga de la molécula con la carga de la fase estacionaria de la columna, que debe ser de carga opuesta. Por tanto existen columnas catiónicas y columnas aniónicas. Su uso es restringido.

Fase normal. Se caracteriza porque la fase estacionaria es polar y la fase móvil es no polar o relativamente no polar. Los disolventes que frecuentemente se emplean son cloroformo, acetato de etilo y hexano, entre otros.

Fase reversa. Las columnas son no polares o de polaridad intermedia, separan muestras polares, de polaridad intermedia, no polares e iónicas. Es

la técnica más universal. Los disolventes más usados son agua, metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano.

Fase estacionaria⁸

El empaque de la columna que constituye la fase estacionaria, puede ser de dos tipos:

1) Polímeros orgánicos: Moléculas unidas de

-Estireno-divinilbenceno

-Metacrilatos

-Carbón gafitado

Tienen menor rigidez que los empaques inorgánicos y son más compresibles. Los solventes y analitos pueden penetrar en la matriz polimérica, provocando que las partículas se hinchen, lo cual resulta en menor eficiencia de la columna debido a la reducida transferencia, lo que limita su uso. Sin embargo, en general presentan estabilidad en un mayor intervalo de pH que la sílica.

2) Cerámica inorgánica: Son predominantemente de dos tipos:

-Sílica. Es el material más usado para empaques de columnas para HPLC. Se emplea para cromatografía en fase reversa, intercambio iónico, y cromatografía de exclusión. Es compatible con un gran número de

disolventes orgánicos polares y no polares. Para fases móviles alcalinas su uso es restringido, pero en general se puede trabajar bien con pH entre 2 y 8.

-Alúmina. Es compatible con soluciones acuosas que tienen un amplio intervalo de pH. No es posible modificarla para obtener fases enlazadas estables a diferencia de la sílica.

Ambas son rígidas y tienen la característica que no se hinchan con ningún disolvente.

Forma de partícula⁸

Las formas de partícula que se manejan son:

- Irregular: Se obtienen por molienda de partículas más grandes. Este fue el primer tipo de empaque que se utilizó. Este tipo de partícula proporciona una mayor área superficial que las partículas esféricas. En general las partículas irregulares son más difíciles de empaquetar que las esféricas.
- Esférica: Son más fáciles de empaquetar que las partículas irregulares, proporcionan alto desempeño, buena estabilidad, baja presión de trabajo y reproducibilidad.

Tamaño de partícula⁸

Los tamaños de partícula que se manejan son muy diversos, sin embargo, en las partículas de forma irregular están disponibles partículas de mayor tamaño que en el empaque con partículas esféricas. En las partículas

esféricas, el tamaño está disponible desde 1 μm hasta 20 μm . Los tamaños más comunes en partículas irregulares son 5 y 10 μm , y en el caso de partículas esféricas las más comunes son 3, 5 y 10 μm .

Longitud de la columna⁸

El tamaño de las columnas en HPLC es variable, pero en general no sobrepasa los 30 cm, y existen precolumnas y columnas de hasta 20 mm de longitud. En general, entre mayor es la longitud de la columna, mayor es el tiempo de retención.

Fase móvil

Las propiedades químicas de un disolvente como su momento dipolo, si es aceptor o donador de electrones, su polaridad, su densidad, etc. son factores que afectan la separación de una muestra, por eso es tan importante la elección adecuada de la fase móvil tomando en cuenta las características de la sustancia que se quiere separar y de las que la acompañan. Como consecuencia, la fase móvil se puede variar para optimizar la separación de una mezcla de sustancias.

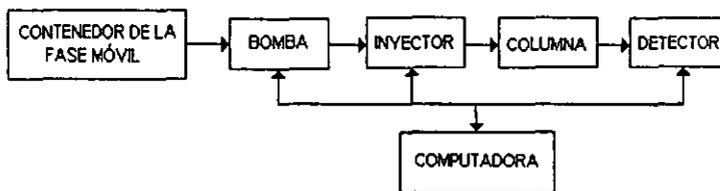
Instrumentación^{4.3}

Un cromatógrafo de líquidos consiste en:

- Un contenedor: para la fase móvil.
- Una bomba: que impulsa la fase móvil a través del sistema a alta presión.

- Un inyector: para introducir la muestra en la columna.
- Una columna cromatográfica: que contiene la fase estacionaria.
- Un detector: que identifica la sustancia de interés.
- Un integrador: Actualmente, es muy común que el cromatógrafo esté controlado a través de una computadora y ésta funcione como integrador de las señales que recibe del detector.

CROMATÓGRAFO



Esquema de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

Figura 2.2

Detectores

Los detectores en cromatografía de líquidos se clasifican en dos categorías:^{9.1}

- a) Aquellos que miden una propiedad general. Determina las propiedades físicas de la solución más que la del soluto (p. ej. el detector de índice de refracción).
- b) Los que miden una propiedad del soluto o detectores selectivos. Son sensibles únicamente a alguna propiedad del soluto (p. ej. absorción UV).

Los tipos de detectores que se usan para identificar los compuestos después de separarlos por HPLC son:^{4.4}

- Espectrofométricos. A través de una celda se hace pasar un haz de luz, cuando el soluto sale de la columna y pasa por la celda absorbe parte de la radiación, dando por resultado una diferencia de energía medible y proporcional a la concentración de la muestra.
- Fluorométricos. Son sensibles a compuestos que son fluorescentes o que pueden ser convertidos a derivados fluorescentes.
- Arreglo de diodos. Estos detectores adquieren datos de absorbancia en el rango de UV-visible. En estos detectores continuamente pasa radiación a través de la celda de la muestra, esta radiación es separada en sus longitudes de onda constituyentes, las cuales son detectadas individualmente por un arreglo de fotodiodos. Esto proporciona al analista múltiples cromatogramas, pudiendo ver selectivamente diversas longitudes de onda y espectros del pico eluido. Los detectores de arreglo de diodos generalmente tienen mayor señal de ruido en comparación con los detectores de longitudes de onda variables, por lo tanto, son menos adecuados para análisis de compuestos presentes a bajas concentraciones.
- Electroquímicos. Potenciométricos, voltamétricos y polarográficos. Se emplea en la cuantificación de especies que pueden ser oxidadas o reducidas en un electrodo de trabajo ^{4.4}. La fase móvil debe presentar conducción de la corriente eléctrica, por lo que se utilizan sales disueltas en la fase móvil, los sistemas totalmente orgánicos no son aplicables en su totalidad. Si la conductividad de la muestra es pequeña, la conductividad de la fase móvil también debe ser pequeña, porque de lo contrario, no podría ser detectada. ^{9.2}

- Detectores de índice de refracción. Miden la diferencia entre el índice de refracción de la fase móvil sola y la fase móvil conteniendo el compuesto después de que emerge de la columna cromatográfica. Este tipo de detector es usado para compuestos que no absorben en UV, pero es menos sensible que los detectores UV. ^{4.4}

Detector de UV-vis ^{9.2}

Fundamento. Cuando algunos grupos funcionales se exponen a la radiación, experimentan una excitación electrónica a causa de la absorción de energía a la longitud de onda específica del grupo funcional. Esta energía provoca el paso de un electrón desde el estado fundamental hasta un nivel de energía superior. Esta absorción de energía se traduce en una disminución del haz de luz que se ha proyectado a través de la muestra, y que ha llegado hasta la fotocelda.

Las sustancias que pueden analizarse por UV son las que absorben a longitudes de onda entre 210 nm y 355 nm. Las sustancias que presentan esta capacidad, son todas aquellas que posean uno o más dobles enlaces (electrones π) y las que tienen electrones no compartidos o no enlazantes, por ejemplo:



En el caso de muestras que absorben al visible deben presentar grupos cromóforos que necesitan una longitud de onda mayor para excitar los electrones.

La consideración más importante en el empleo de este mecanismo de detección es la fase móvil. La selección de la longitud de onda se basa en la propiedad del soluto (en su capacidad de absorber luz a una longitud de onda específica) y se debe cuidar que los componentes de la fase móvil no interfieran en la señal, es decir, no haya componentes de la fase móvil que pudiesen absorber luz a la longitud de onda de trabajo. Esta condición se puede volver difícil de cumplir cuando se trabaja en longitudes de onda bajas, dado que algunos modificadores de la fase móvil pueden tener absorción a longitudes de onda (por ejemplo: reguladores del pH, formadores de par iónico, disolventes orgánicos, etc.). Teniendo en cuenta esta consideración, la detección espectrofotométrica en el UV-vis se constituye como uno de los mecanismos más sencillos, selectivos y confiables de los que se pueden encontrar en forma convencional.

Existen muchos diseños diferentes de detectores de UV-vis. La mayoría de los detectores tiene una estructura que consiste en una fuente de emisión y un filtro que selecciona una longitud de onda. El haz de luz seleccionado pasa por la celda (donde fluye la fase móvil) llegando a una fotocelda.

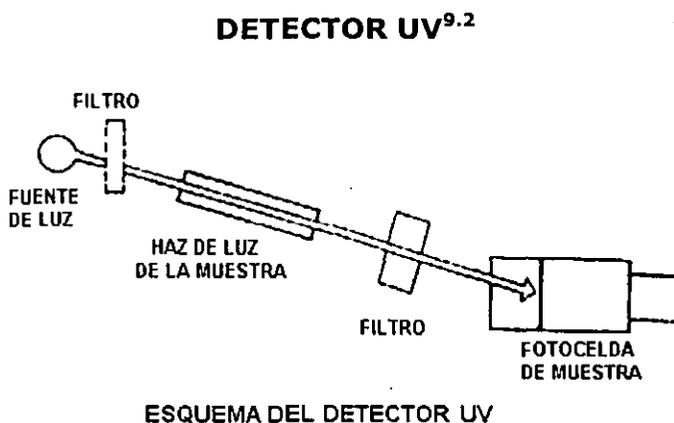


Figura 2.3

Parámetros importantes en HPLC

Eficiencia de la columna¹⁰, 4.5

Es la medida del grado de enlace en una columna de HPLC. La eficiencia teórica de una columna se expresa en unidades de Platos Teóricos (N), que se define de la siguiente manera:

t_r = tiempo de retención

$$N = 5.54(t_r/W_{1/2})^2 \quad W_{1/2} = \text{Ancho del pico a la mitad de su altura}$$

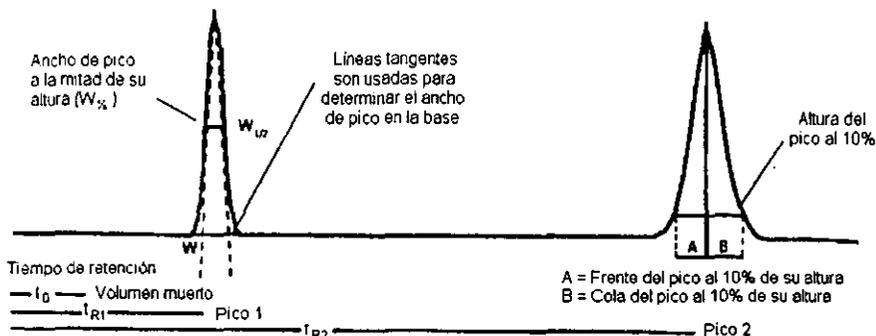
$$\text{o} \quad N = 16(t/W)^2 \quad W = \text{Ancho del pico}$$

Asimetría del pico.¹⁰

Es una medida de la forma del pico, expresada como la relación de A/B a una altura del 10% del pico, contando desde la base de éste. Un pico Gaussiano perfecto tiene un valor de asimetría de 1. Valores superiores de uno, indican que existe mayor área bajo el pico en la parte denominada A, a éste, se le llama "pico cabeceado". Valores por debajo de uno, indican que existe mayor área bajo el pico en la parte denominada B, lo que se denomina "pico coleado".

CROMATOGRAMA^{4.5}

Cromatograma



Descripción de las partes de un cromatograma.

Factor de capacidad. ¹⁰

Está relacionado con el tiempo de elución de una muestra retenida, en relación con otra que no se retiene.

t_0 = tiempo de retención del compuesto no retenido.

$$k' = (t_r - t_0) / t_0$$

t_r = tiempo de retención de la muestra retenida.

Selectividad de la columna. ¹⁰

Es una medida del factor de capacidad de un componente de la muestra con relación a otro componente de la misma muestra.

k'_2 = Factor de capacidad del pico 2

$$\alpha = k'_2 / k'_1$$

k'_1 = Factor de capacidad del pico 1

Resolución. ^{10 4.5}

Es la separación relativa de dos componentes en un cromatograma, expresado como sigue:

$$R_s = \frac{1}{4} \{ k' / (1 + k') \} N^{1/2} (\alpha - 1)$$

O

$$R_s = 2(t_2 - t_1) / (W_1 + W_2)$$

k' = Factor de capacidad del pico 1

t_2 = tiempo de retención del pico 2.

t_1 = tiempo de retención del pico 1.

W_1 = Ancho del pico 1

W_2 = Ancho del pico 2

N = Eficiencia de la columna.

α = Selectividad de la columna

Tiempo de retención relativo ^{4.5}

Es el tiempo de retención de un soluto con respecto a otro soluto.

$$R_r = t_2/t_1$$

t_1 = tiempo de retención del pico 1.

t_2 = tiempo de retención del pico 2.

CUANTIFICACIÓN DE CARBONO ORGÁNICO TOTAL

La medición del contenido de carbono proveniente de la contaminación por compuestos orgánicos es un nuevo método aplicado a la validación de limpieza. El método ha sido usado previamente para el análisis de agua de ultra alta pureza, en las plantas de energía nuclear, en fábricas de semiconductores y para el agua de grado farmacéutico; ha demostrado tener buenos niveles de detección (ppb), tiempos de análisis rápidos y es de bajo costo, comparado con otros métodos.

Definición ^{4.6}

La determinación de Carbono Orgánico Total (TOC) es un método analítico que consiste en la medición indirecta de moléculas orgánicas presentes en soluciones acuosa, medidas como carbono.

Fundamento de la determinación ¹¹

Los análisis mediante TOC involucran la oxidación del carbono y la detección del bióxido de carbono producido. Esta oxidación se puede inducir por algunos métodos comunes incluyendo: la oxidación fotocatalítica, oxidación química, (peroxidisulfato u oxígeno) y combustión a alta temperatura. El instrumento determina la presencia de los compuestos orgánicos mediante el CO₂ que se forma y se utiliza un detector de infrarrojo no dispersable (NDIR) para medir el CO₂ producido.

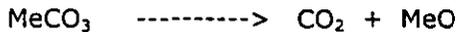
El equipo empleado, fue el Shimadzu TOC-5000 (Shimadzu Instruments, Columbia, Maryland), el cual es un analizador elemental con capacidad de

medición independiente de carbono total (TC), carbono orgánico total (TOC), y carbono inorgánico (IC) en agua. Este equipo mide el CO₂ producido por la combustión a altas temperaturas mediante la reacción descrita a continuación:

Oxidación de compuestos orgánicos

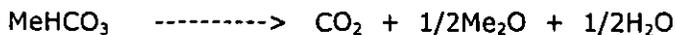


Descomposición de carbonatos



Me = Ion metálico

Descomposición de bicarbonatos



Me = Ion metálico

El equipo proporciona picos angostos como resultado de la conversión instantánea de todos los compuestos de carbón en CO₂ y emplea el área del pico para llevar a cabo la cuantificación.

Definiciones ¹²

TC: Carbono Total, es la suma del Carbono Orgánico y el Carbono Inorgánico.

TOC: Carbono Orgánico Total, todas las formas de carbono orgánico disueltas en el agua.

IC: Carbono Inorgánico, es el carbono proveniente de la disolución de CO_2 , HCO_3^- y CO_3^{2-} ambiental.

POC: Carbono Orgánico Purgable, componente del Carbono Orgánico Total (TOC) que se libera al purgar la muestra con aire comprimido.

NPOC: Carbono Orgánico No Purgable, es el componente del Carbono Orgánico Total (TOC) que no se libera al purgar la muestra con aire comprimido.

Deben de realizarse consideraciones adicionales, como la cantidad de carbono del agua, y qué compuestos orgánicos volátiles se eliminarán con la aereación, entre otras.

Funcionamiento del equipo

Medición de TC (Carbono Total) ¹¹

El tubo de combustión de TC se llena con catalizador y se calienta a 680°C , en tanto que el gas de transporte (aire purificado) se suministra dentro del tubo después de que el flujo se ajusta a 150 mL/min por los controladores de presión y de flujo y se humedece por un humidificador.

Cuando la muestra se introduce dentro del tubo de combustión TC vía el inyector de muestras (ASI-5000), el componente TC en la muestra (que

comprende TOC y IC) se oxida por combustión hasta CO_2 . El gas acarreador transporta el producto de combustión (CO_2) hasta el vaso de reacción IC donde se enfría y seca por un deshumidificador, enseguida pasa a través del Scrubber de halógeno hacia la celda de muestra del detector de infrarrojo no dispersable (NDIR), donde el CO_2 se detecta. El NDIR produce una señal analógica que genera un pico; el área del cual se calcula por un procesador de datos.

El pico es proporcional a la concentración de TC en la muestra. Si se genera una curva de calibración que relacione el área del pico y la concentración de TC, a partir de una solución estándar de TC, la concentración en la muestra podrá ser determinada. Este es un método estándar experimental de calibración.

Carbono total = Carbono Orgánico Total + Carbono Inorgánico

$\text{TC} = \text{TOC} + \text{IC}$

Medición de IC (Carbono Inorgánico) ¹¹

El carbono en forma de carbonatos y bicarbonatos pueden ser medidas como IC de la siguiente manera:

La muestra se introduce vía el inyector de muestras (ASI-5000) dentro del vaso de reacción IC (que contiene ácido fosfórico), a través del cual el gas acarreador fluye en forma de diminutas burbujas. Solo el componente IC en la muestra se descompone a la forma de CO_2 el cual se detecta al alcanzar el NDIR. La concentración de IC se determina en la misma forma que el TC,

con excepción de que se usa una curva de calibración de IC para determinar la concentración en la muestra.

Medición de TOC (Carbono Orgánico Total) ¹¹

La concentración de TOC puede determinarse por sustracción de la concentración de IC, obtenida como se describió antes *en Medición de IC (Carbono Inorgánico)* de la concentración de TC obtenida como se describe *en Medición de TC (Carbono Total)*. Esta sustracción se realiza por el equipo y se reporta como valor de TOC.

Carbono Orgánico Total = Carbono Total – Carbono Inorgánico

TOC = TC – IC

Medición de NPOC (Carbono Orgánico No Purgable) ¹¹

La concentración de TOC puede ser determinada directamente, usando otro procedimiento. En este caso, la muestra se acidifica previamente y se burbujea automáticamente con gas purificado para remover el IC que contiene. La muestra se analiza para obtener la concentración de TC como se describe en la sección *Medición de TC (Carbono Total)*. Este método también es referido como el método de NPOC.

NPOC es el total de carbono orgánico no volátil, debido a que éste no es eliminado por evaporación durante el proceso de burbujeo. Compuestos

orgánicos volátiles tales como solventes orgánicos, los cuales no son realmente solubles en agua, se eliminan de la muestra a temperatura ambiente vía burbujeo. El carbono orgánico que se evapora durante el burbujeo se llama POC (Carbono Orgánico Purgable). Es importante notar que el burbujeo incrementa el tiempo de análisis en 2 minutos o más por muestra.

Carbono Orgánico No Purgable = Carbono Orgánico Total - Carbono Purgable

NPOC = TOC - purgables

Resumiendo, es importante hacer notar que existen **2 formas de determinar la cantidad de TOC** en una muestra:

- 1) Por Diferencia (TOC = TC - IC)
- 2) Por Carbono Orgánico No Purgable (NPOC)

TOC provee un método que es relativamente económico, rápido en el tiempo de análisis y bajo nivel de detección (ppm-ppb), debido a que detecta residuos orgánicos, puede detectar activos, excipientes y residuos de agentes de limpieza. Dado su rápido tiempo de análisis (3-5min), puede ser aplicado al análisis en línea. Finalmente, TOC provee una respuesta inmediata para validación y para monitoreo a bajo costo.

Entre las desventajas que presenta es que sólo se pueden analizar compuestos solubles en agua. Es un método no específico, lo cual se puede ver tanto como desventaja, como ventaja, ya que es capaz de detectar además del principio activo, excipientes y detergentes.

HPLC tiene muy buen nivel de detección pero es costoso y los métodos espectrofotométricos (UV) y por cromatografía de capa fina (TLC), son métodos de bajo costo pero sacrifican los límites de detección.

De los métodos aplicados en las áreas biofarmacéuticas, ELISA es un método de alto costo y con alto requerimiento de tiempo. El método de electroforesis (PAGE) es un método extremadamente sensible que ha sido usado primariamente para la separación de proteínas, está basado en el peso molecular y puede detectar proteínas contaminantes, aunque no de forma específica.

VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS ¹⁴

No existe una metodología única para llevar a cabo la validación de métodos analíticos, sin embargo, todas buscan establecer mediante estudios de laboratorio que un método proporcione datos confiables de acuerdo al propósito para el que se le emplea.

La FDA publicó una guía la validación de procedimientos analíticos en marzo de 1995, cuyo contenido fue preparado bajo los auspicios de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) de Requerimientos para el Registro de Medicamentos de Uso Humano.

La USP 23 en la sección de pruebas generales, en el número <1225>, establece 3 categorías de métodos analíticos: ¹⁴

Categoría I Análisis que tienen por objetivo la cuantificación del (los) componente (s) principal (es) de un fármaco, o ingredientes activos, incluyendo conservadores, en producto terminado.

Categoría II Análisis para la determinación de impurezas en fármacos o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos incluyen análisis cuantitativos o pruebas límite.

Categoría III Análisis para determinar características físicas o fisicoquímicas del principio activo o de una forma de dosificación, tales como perfiles de disolución, tiempo de desintegración, liberación del fármaco, etc.

Para cada una de estas categorías, se establecen diferentes parámetros requeridos para validar el método analítico, sin embargo, siempre se hace

alusión a la necesidad que hay de que se examine cada método analítico para determinar qué parámetros deben evaluarse para validar dicho método.

Parámetros analíticos requeridos para la validación de métodos analíticos según la USP 23 ¹⁴

Parámetros analíticos a evaluar	Categoría I (cuantificación de principio activo)	Categoría II		Categoría III (características del fármaco)
		(cuantificación)	(prueba límite)	
Precisión	Si	Si	No	Si
Exactitud	Si	Si	Posible	Posible
Especificidad	Si	Si	Si	Posible
Límite de detección	No	No	Si	Posible
Límite de cuantificación	No	Si	No	Posible
Linealidad	Si	Si	No	Posible
Intervalo	Si	Si	Posible	Posible
Robustez	Si	Si	Si	Posible

Cuadro 2.1

A continuación se presenta un cuadro comparativo de los parámetros que deben ser evaluados en un método analítico para cuantificación del principio activo en un medicamento, según diferentes fuentes reconocidas internacionalmente¹⁵:

Comparación de los parámetros analíticos requeridos para la validación de métodos analíticos según diferentes fuentes reconocidas internacionalmente¹⁵.

Parámetro	GMP	FDA	USP	ICH
Exactitud	X	X	X	X
Reproducibilidad	X			X
Sensibilidad	X			
Especificidad	X	X	X	X
Linealidad		X	X	X
Precisión		X	X	X
Límite de detección			X	X
Límite de cuantificación			X	X
Intervalo			X	X
Recobro		X		
Robustez		X	X	

Cuadro 2.2

Definiciones de los parámetros en una validación:¹⁶

Linealidad. Habilidad del método analítico para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

Intervalo. Está definido por las concentraciones comprendida entre los niveles de concentración superior e inferior de la sustancia (incluyendo estos niveles), en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

Exactitud. Concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

Precisión. Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una mezcla homogénea del producto. Generalmente se expresa en términos de Desviación Estándar o del Coeficiente de Variación.

Medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo condiciones normales de operación.

Repetibilidad. Precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.).

Reproducibilidad. Precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre las determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analista, en diferentes días, en el mismo y /o diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc.).

Límite de Detección. Mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

Límite de Cuantificación. Menor concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo condiciones de operación establecidas.

Especificidad. Habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

Tolerancia. Grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, sistemas de elución, tipos de empaque (soporte, fase estacionaria, etc.), condiciones ambientales, etc.

Estabilidad de la Muestra. Propiedad de la muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

VALIDACIÓN DE LIMPIEZA

Definición ¹⁷

La validación de limpieza en la industria farmacéutica es el proceso por el cual se garantiza que los procedimientos de limpieza del equipo de producción reducen la cantidad de residuos a niveles aceptables.

Las sustancias pueden ser de productos anteriores o en general, de sustancias extrañas. El objetivo que se busca con ésto, es asegurar que el producto no se contaminará al entrar en contacto con el equipo de fabricación.

Para determinar si un equipo está limpio es necesario definir la cantidad de residuos que se permite encontrar, mediante un sistema analítico específico y con una técnica de muestreo determinada. Por tanto, es importante establecer ciertos criterios para realizar la validación de un procedimiento de limpieza.

La validación de un procedimiento de limpieza requiere de definir: ¹⁷

- El objetivo de la prueba.
- Límites de aceptación.
- Procedimiento de muestreo y de prueba.
- Realización de un protocolo de validación por escrito (basándose en los requisitos regulatorios, en guías y criterios internacionales, y en criterios científicos que lo justifiquen).

- Realización de las pruebas de validación.
- Reporte final de validación (que incluya el análisis de los datos).

En el caso de la FDA establece que es necesario que: ¹⁸

- Exista un procedimiento general escrito y firmado sobre cómo se validará el procedimiento de limpieza.
- Que el procedimiento de validación de limpieza establezca quién es el responsable de la realización y aprobación del estudio de validación, el criterio de aceptación, y cuándo se requerirá la revalidación.
- Protocolos de validación escritos y firmados, de los estudios que serán realizados en cada sistema o pieza del equipo, en los que se deben establecer los procedimientos de limpieza y los métodos analíticos, incluyendo la sensibilidad de dichos métodos.
- Revisión y firma de que los estudios de validación se realizan de acuerdo a los protocolos, y firma de los resultados de estos estudios.
- Reporte final de validación, el cual esté aprobado por el director y en el que se establezca si es o no válido el procedimiento de limpieza. Además los datos que soporten la conclusión de que los residuos se han reducido a un "nivel aceptable".

Para los métodos analíticos que se emplean en la validación de métodos de limpieza, la FDA pide que se determine la especificidad y la sensibilidad del método analítico usado para determinar los residuos o contaminantes. ¹⁸

Se debe retar el método analítico en combinación con el método de muestreo usado, para demostrar que los contaminantes pueden ser recobrados de la superficie del equipo y a qué nivel.¹⁸

La FDA no establece un grupo de especificaciones de aceptación o métodos para determinar si un proceso de limpieza está validado. No es práctico para la FDA hacer ésto, debido a la variación en el equipo y productos usados, a través de toda la fabricación. Los límites deben ser establecidos por las empresas, deben ser lógicos y estar basados en el conocimiento del proceso de manufactura y de las sustancias empleadas, además deben ser prácticos, factibles y verificables.

Es importante definir la sensibilidad del método analítico con base en límites razonables.¹⁸

Criterios de Aceptación

Existen varios criterios de decisión para determinar si un equipo está "limpio" o no lo está. Se han publicado, entre otros:^{19.1}

- a) criterio visual (residuos no visibles)
- b) criterio fijo de un máximo de 10 ppm de cualquier agente activo
- c) criterio de un máximo de 1/1000 de la dosis diaria terapéutica normal del agente más activo del producto fabricado inmediatamente antes
- d) límite del producto subsecuente
- e) límite de toxicidad y seguridad²⁰
- f) límite por dosis y lote²⁰

g) límite farmacológico²⁰

h) límite de compatibilidad de procesos²⁰

Sin embargo, el criterio empleado debe ser elegido por cada empresa, de acuerdo a sus necesidades, conocimiento del proceso de manufactura, tipo de productos fabricados, tamaño y tipo del equipo de fabricación empleado, etc., y deben ser prácticos, factibles y verificables.

Tipos de Muestreo

Existen varios tipos de muestreos: ^{19.2}

- Por raspado (tomando la muestra con un hisopo)
- Por adición de una capa ligera de líquido, el cual se recolecta para analizarlo
- Por recolección de la última agua de enjuague
- Fabricación de un placebo (en el equipo después de haberse limpiado)
- Estudios de recobro

Nuevamente el tipo de muestreo que se escoja, depende de las necesidades, conocimiento del proceso de manufactura, tamaño y tipo de equipo de fabricación empleado, etc. Además deben ser factibles y prácticos.

Técnicas Analíticas Empleadas Comúnmente

Se han empleado diferentes técnicas analíticas para llevar a cabo la validación de la limpieza de equipos; las más usadas son:^{19.3}

- HPLC
- Mediciones de pH
- Absorción atómica
- Cromatografía de intercambio iónico
- Espectrofotometría en UV
- Pruebas de ELISA
- Titulaciones
- Pruebas de conductividad
- Carbono orgánico total TOC

Cuadro comparativo de técnicas empleadas para la validación de limpieza¹¹

METODO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
HPLC	Alta especificidad Moderada a alta sensibilidad Cuantitativo	Tiempo de análisis prolongado Costoso
TLC	Alta especificidad Moderada a alta sensibilidad No costoso	Punto final visual No cuantitativo Preparación de muestra prolongada
Espectrofotometría	Moderada a alta especificidad Alta sensibilidad	No cuantitativo
TOC	Amplio espectro de aplicación Detección hasta niveles muy bajos Puede ser usado en línea Corto tiempo de análisis Mínima preparación de la muestra	No específico Sólo analitos solubles en agua
ELISA	Específico para analitos biofarmacéuticos Alta sensibilidad	Tiempo de análisis prolongado Muy costoso Muy laborioso Problemas con proteínas desnaturalizadas
Electroforesis	Específico para analitos biofarmacéuticos Alta sensibilidad	Muy costoso Muy laborioso Problemas con proteínas desnaturalizadas Tiempo de análisis prolongado
pH	Rápido Bajo costo Puede ser usado en línea	No específico Sólo analitos solubles en agua Sólo se usa para agentes de limpieza
Conductividad	Rápido Bajo costo Puede ser usado en línea	No específico Sensibilidad limitada
Detección visual	Resultados inmediatos Bueno para revisión general	No cuantitativo Subjetivo

Cuadro comparativo de las ventajas y desventajas que proveen las técnicas analíticas empleadas en la validación de limpieza.

Cuadro 2.3

PARTE EXPERIMENTAL

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30%, PARA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPO DE PRODUCCIÓN

Se partió del antecedente del método de rutina para control de calidad del producto, el cual consiste en:

Columna: Cartucho radial μ Bondapak C18 10 cm x 8 mm Waters.

Fase móvil: Solución 0.07M de fosfato de potasio monobásico (pH 2.2 \pm 0.1).

Flujo: 0.4 mL/min.

Vol. Iny.: 20 μ L.

Detección: 215 nm.

Tiempo de retención: 12.60 min.

Factor de coe: no más de 2.0.

Núm. Platos teóricos: mínimo 1000.

Resolución (L-carnitina: crotobetaina): no menos de 2.0.

Sin embargo, este sistema da problemas, como son: lograr que los cartuchos lleguen a un nivel de compresión adecuada, picos muy coleados, y adicionalmente, los cartuchos están por ser discontinuados.

Por estas razones, se busca desarrollar un método en columna, ya que esto evita el problema de la compresión en los cartuchos, el problema de desabasto, además de que se pretende mejorar la forma del pico, llegando a un sistema más estable.

Debido a que la L-carnitina tiene una absorción muy pobre en UV, se pensó en ocupar un detector de índice de refracción, que es un detector de tipo universal para mejorar la respuesta.

Se hizo una revisión bibliográfica para encontrar sistemas ya desarrollados para la separación de L- carnitina, de los cuales, los más relevantes fueron:

Propuesta 1*

Columna: μ Bondapak C18 300 x 3.9 mm, 10 μ m

Fase móvil: Solución reguladora de fosfato de potasio monobásico 0.07M
(pH 2.2-2.3).

* Propuesta a partir del método en uso en Nysco de México S.A. de C.V.

Flujo: 0.4 mL/min

Temperatura: ambiente.

Detector: UV-215 nm

Propuesta 2²¹

Columna: μ Bondapak NH₂ 300 x 3.9 mm, 10 μ m

Fase móvil: ACN/Agua (700:300) + 5 mL de acetato de amonio 1M

Flujo: 1.5 mL/min

Temperatura: ambiente

Detector: Espectrofotometría de masas

Propuesta 3^{4,7}

Columna: L1 (C18) 3.9 mm x 30 cm, 10 μ m

Fase móvil: 555 mg de 1-heptanosulfonato de sodio en 980 mL de solución reguladora de fosfatos 0.05 M pH 2.4 + 20 mL MeOH

Flujo: 1.5 mL/min

Temperatura: ambiente.

Detector: UV-225 nm

Propuesta 4 ^{4.7}

Columna: L8 (NH₂) 300 x 3.9 mm, 10 μm

Fase móvil: ACN/Solución reguladora de fosfatos 0.05 M pH 4.7 (65:35)

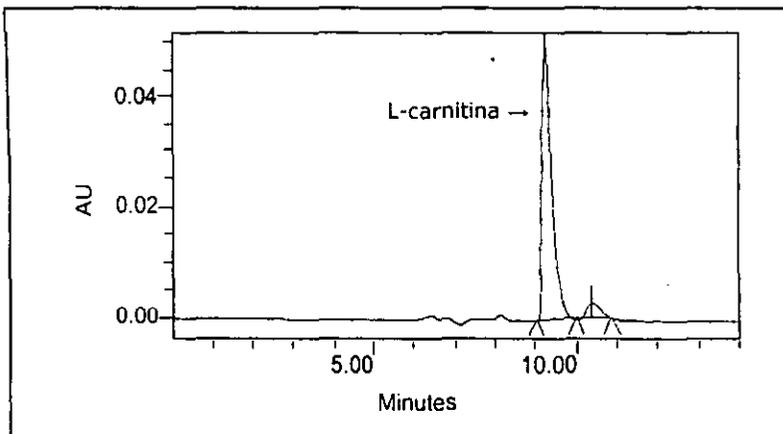
Flujo: 1 mL/min

Temperatura: ambiente.

Detector: UV-205 nm

Con los antecedentes ya mencionados se procedió a realizar diversas pruebas que se resumen de la siguiente manera:

Se trató de separar la L-carnitina en columnas de fase reversa, se probaron distintos tipos de columnas, sin embargo se observó que no se retiene el compuesto en columnas C18. En los siguientes dos cromatogramas se muestra una de las pruebas realizadas con columna C18, en la cual se colocaron en serie los detectores de UV e índice de refracción, correspondiendo el primer cromatograma a la detección por UV y el segundo cromatograma a la detección por índice de refracción. Es de notar que se escogió mostrar este cromatograma entre otros, porque esta columna C18 presenta características de alta retención debido en parte a su elevada carga de carbono.



Columna: YMC C-18 120A 250 x 4.6 mm, 5 μ m

Fase móvil: MeOH/Solución reguladora de fosfatos 0.07 M pH 2.2 \pm 0.05
(50:50)

Flujo: 0.4 mL/min

Temperatura: ambiente

Detector: UV-215 nm

Muestra: Solución de estándar de L-carnitina [600 μ g/mL]

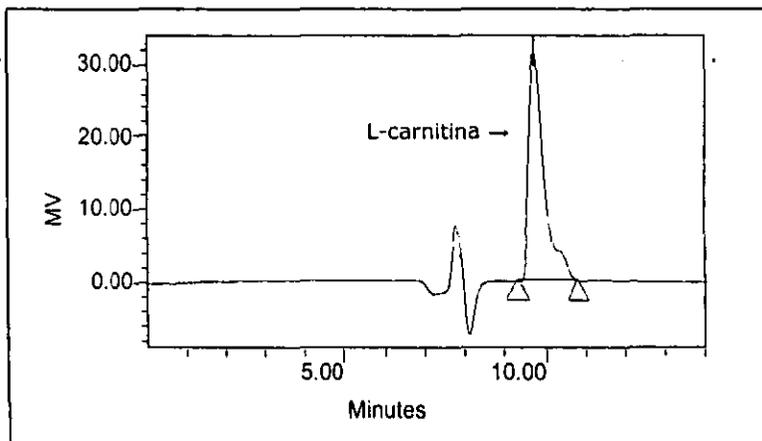
Volumen de inyección: 20 μ L

Área: 844974

Factor de coe: 1.8

Resolución: 2.1

Eficiencia: 6648



Columna: YMC C-18 120A 250 x 4.6 mm, 5 μ m

Fase móvil: MeOH/ Solución reguladora de fosfatos 0.07 M pH 2.2 \pm 0.05
(50:50)

Flujo: 0.4 mL/min

Temperatura: ambiente

Detector: Índice de refracción

Muestra: Solución de estándar de L-carnitina [600 μ g/mL]

Volumen de inyección: 20 μ L

Área: 844940

Factor de coe: 2.2

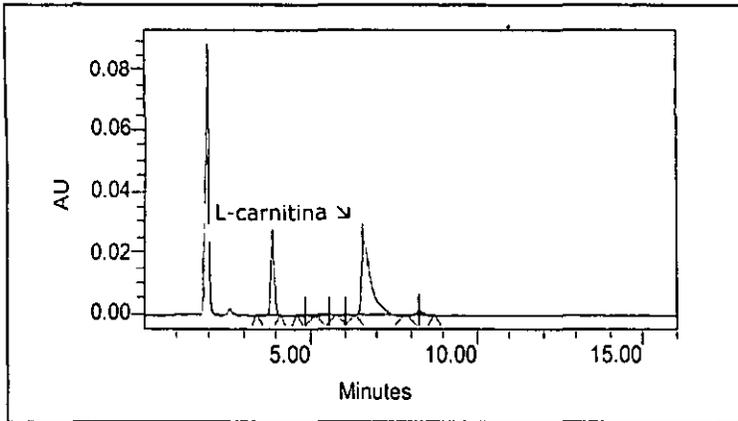
Eficiencia: 3590

Debido a que no hubo retención en columnas C18 se prosigió a probar la propuesta 2.

Se observó que el sistema de la propuesta 2, logró separar los componentes de la formulación, sin embargo, el pico de L-carnitina se presenta muy coleado, probablemente el pico del producto de degradación está integrado a éste, y es el que le da la forma coleada.

No se siguió trabajando en este sistema, debido a la experiencia en Nysco de México S.A. de C.V. de que las columnas μ Bondapak NH_2 tienen una vida útil muy corta, que no alcanza en ocasiones ni a soportar una validación completa. Esta vida útil tan corta lo hace un sistema inadecuado para métodos de análisis de rutina.

En los siguientes 2 cromatogramas se muestran los resultados obtenidos con este sistema. Se emplearon los detectores de UV e IR en serie, así, el primer cromatograma corresponde a la detección por UV y el segundo cromatograma a la detección por índice de refracción de la misma prueba.



Columna: μ Bondapak NH_2 300 x 3.9 mm, 10 μm

Fase móvil: ACN/Agua (700:300) + 5 mL de acetato de amonio 1 M

Flujo: 1.5 mL/min

Temperatura: ambiente

Detector: UV-215 nm

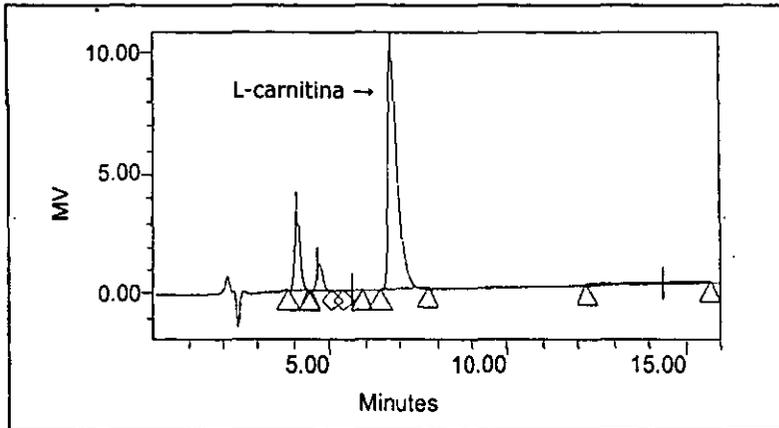
Muestra: Dilución de producto. L-carnitina [2400 $\mu\text{g/mL}$]

Volumen de inyección: 20 μL

Área: 474230

Factor de coe: 2.4

Eficiencia: 3082



Columna: μ Bondapak NH_2 300 x 3.9 mm, 10 μm

Fase móvil: ACN/Agua (700:300) + 5 mL Acetato de amonio 1 M

Flujo: 1.5 mL/min

Temperatura: ambiente

Detector: Índice de refracción

Muestra: Dilución de producto. L-carnitina [2400 $\mu\text{g/mL}$]

Volumen de inyección: 20 μL

Área: 188582

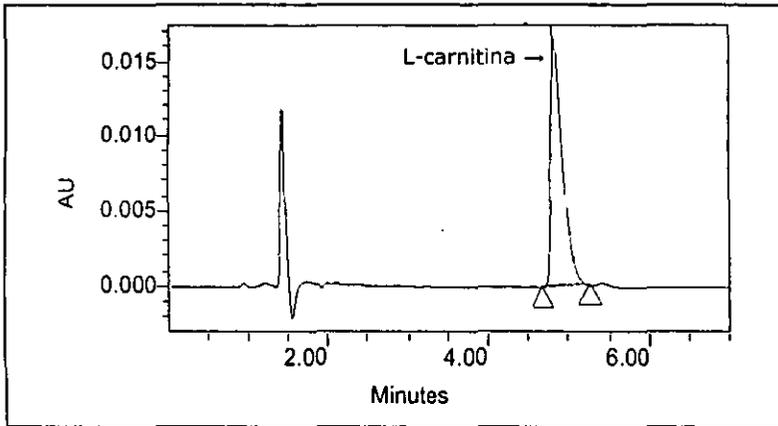
Factor de coe: 1.8

Eficiencia: 2968

Sabiendo que las columnas C18 tienen una vida útil más larga, se buscó desarrollar el método en el sistema de la propuesta 3, que implica el empleo de una columna C18 y par iónico: heptano sulfonato de sodio. Se realizó la prueba en un tipo de columna diferente al reportado en la referencia de la propuesta 3 por disponibilidad de material.

La detección se realizó nuevamente con los detectores de UV e índice de refracción en serie. Los resultados de la prueba se muestran en los dos siguientes cromatogramas, donde el primero corresponde a la detección por UV y el segundo a la detección por índice de refracción.

Como se observó que la respuesta en UV era más grande para concentraciones bajas de L-carnitina que en índice de refracción, se decidió que la detección sería por UV.



Columna: Ultrasphere ODS 250 x 4.6 mm, 5 μ m

Fase móvil: Solución reguladora de fosfatos 0.05 M pH 2.4 \pm 0.05
+ 1-heptano sulfonato de sodio (0.00275 M) / MeOH (98:2)

Flujo: 1.5 mL/min

Temperatura: ambiente

Detector: UV-215 nm

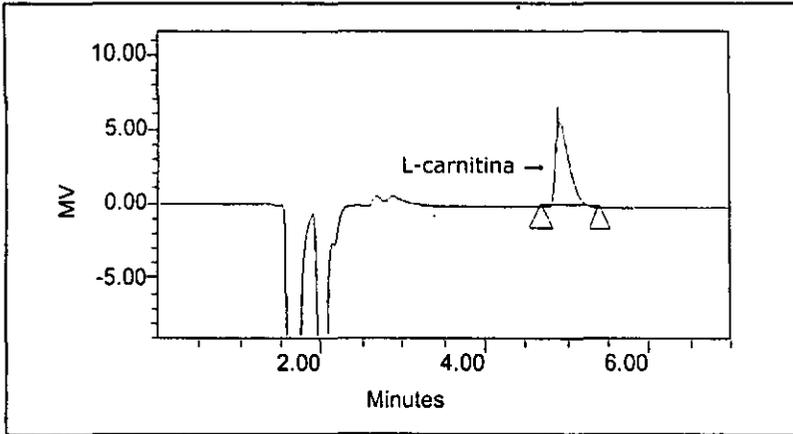
Muestra: Solución de estándar de L-carnitina [1000 μ g/mL]

Volumen de inyección: 20 μ L

Área: 168485

Factor de coe: 2.0

Eficiencia: 4745



Columna: Ultrasphere ODS 250 x 4.6 mm, 5 μ m

Fase móvil: Solución reguladora de fosfatos 0.05 M pH 2.4 \pm 0.05
+ 1-heptano sulfonato de sodio (0.00275 M) / MeOH (98:2)

Flujo: 1.5 mL/min

Temperatura: ambiente

Detector: Índice de refracción

Muestra: Solución de estándar de L-carnitina [1000 μ g/mL]

Volumen de inyección: 20 μ L

Área: 63215

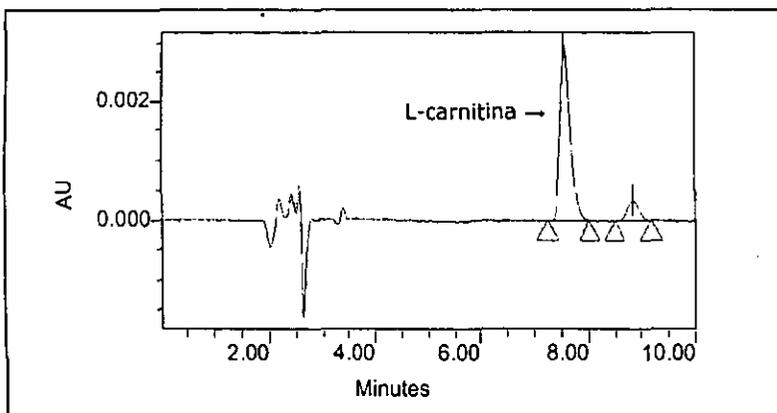
Factor de coe: 1.8

Eficiencia: 4294

Debido a que la resolución entre L-carnitina y su producto de degradación no era muy buena, (y a que modificaciones en la temperatura, pH, y proporción de la fase móvil no lograban ayudar a aumentarla) se procedió a aumentar la longitud de la cadena del par iónico, empleándose el octanosulfonato de sodio, para buscar mayor retención de los compuestos.

El resultado fue el esperado, la resolución entre los picos se consideró suficiente. Al iniciar con la pruebas previas a la validación, se observó que el sistema iba perdiendo retención, disminuyéndose los tiempos de retención. Por esta razón, se tuvo que buscar otro sistema.

A continuación se muestra un cromatograma con los tiempos iniciales de retención obtenidos con este sistema.



Columna: μ Bondapak C-18 300 x 3.9 mm, 10 μ m

Fase móvil: Solución reguladora de fosfatos 0.075 M pH 2.4 \pm 0.05
1-octano sulfonato de sodio (0.00275M)

Flujo: 1 mL/min

Temperatura: ambiente

Detector: UV-215 nm

Muestra: Solución de estándar de L-carnitina [300 μ g/mL]

Volumen de inyección: 10 μ L

Área: 39736

Factor de coe: 1.3

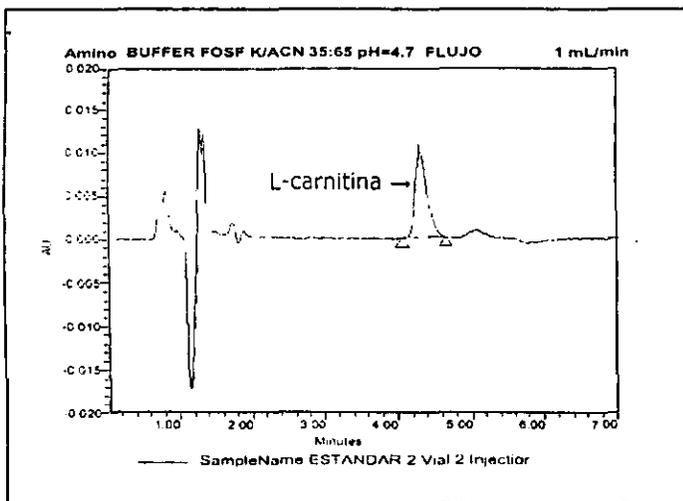
Resolución: 3.3

Eficiencia: 7102

Se consiguió otra columna C18 más estable para montar el mismo sistema con octano sulfonato de sodio, una columna Polaris (C18 250 mm x 3.9mm 5 μ m), pero esta columna se comportó de manera muy diferente y no lograba separar los picos de L-carnitina y su producto de degradación. Por tanto, se buscó otra alternativa.

Finalmente se consiguió una columna amino mucho más estable que la μ Bondapak NH₂, en la que se montó la propuesta 4, haciéndosele algunas modificaciones para lograr mejores resultados para los fines específicos de validación de limpieza, quedando como se observa en el siguiente cromatograma.

Una vez hallado un sistema estable, capaz de retener y separar la L-carnitina, se prosigió a determinar el tipo y tiempo de agitación, y número de hisopo necesarios para realizar el raspado y extracción de las muestras, para comenzar así, la validación del método.



Columna: GROM-SIL 120 AMINO-2 PA (NH₂) 150 x 4 mm, 5 μm

Fase móvil: ACN/Solución reguladora de fosfatos 0.05 M pH 4.7 ± 0.05
(65:35)

Flujo: 1 mL/min

Temperatura: ambiente

Detector: UV-200 nm

Muestra: Solución de estándar de L-carnitina [300 μg/mL]

Volumen de inyección: 10 μL

Área: 119480

Factor de coe: 1.4

Resolución: 2.4

Eficiencia: 3411

Determinación del tipo de agitación:

Para determinar las condiciones óptimas para realizar un recobro del principio activo, se realizan pruebas para determinar cantidad de hisopos, tipo y tiempo de agitación. Debido a que se tiene el antecedente de las condiciones empleadas para TOC, las cuales consisten en raspar con un hisopo y agitar manualmente, se decide probar la agitación manual únicamente, y probar que número de hisopos se requieren.

Criterio de aceptación

Porcentaje de Recobro mayor o igual al 85.0%

DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPOS DE FABRICACIÓN DE CARDISPAN SOLUCIÓN ORAL AL 30 %

Descripción: Para determinar el tipo y tiempo de agitación necesarios para obtener recobros aceptables, se prueban las condiciones de agitación manual 50 repeticiones y raspado con uno y dos hisopos.

Metodología: Se cargan las placas, y se raspan con uno o dos hisopos según corresponda, a los cuales, se les adiciona 150 µL de agua antes de raspar. El o los hisopos se depositan en un vial y se les retira el mango; se agregan 10 mL de agua, se tapan y se agitan, la solución se filtra con acrodicos de 0.45 µm.

Condición	Concentración teórica µg L-carnitina/mL	Respuesta	Concentración experimental µg L-carnitina/mL	Porcentaje de Recobro	
Agitación manual 50 repeticiones 1 hisopo	Esta prueba no se realizó porque después de raspar con un hisopo todavía se alcanzaban a ver residuos en la placa.				
Agitación manual 50 repeticiones 2 hisopos	297.05	109560	295.62	99.52	$\bar{X} = 98.3\%$ $CV = 1.3\%$
	297.05	108517	292.81	98.57	
	297.05	106705	287.92	96.93	

Criterio de aceptación:

Porcentaje de recobro mayor o igual a 85.0%

Conclusión:

El método se realizará con agitación manual (50 repeticiones), y con 2 hisopos.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30% PARA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA²²

- **Objetivo:**

Validar un método analítico para la determinación de L-Carnitina en Cardispán Solución Oral al 30% para fines de validación de limpieza de equipos de producción de dicho medicamento.

- **Producto:**

Nombre:	Cardispán Solución Oral al 30%
Activo:	L-carnitina
Forma Farmacéutica:	Solución Oral
Lote:	OE1559 y OJ1746
Fecha de Fabricación:	26 Mayo 2000 y 20 Noviembre 2000 respectivamente.
Contenido de L-carnitina:	30 g/100 mL

- **Antecedentes:**

El intervalo de trabajo para la validación será idealmente el equivalente al límite calculado mediante los cálculos del peor de los casos (ver descripción en la misma sección de antecedentes en la validación del método por TOC, ver pág. 91) calculado como sigue:

Considerando que en TOC el límite es 10 ppm de C y que el carbono que se cuantifica no proviene únicamente de la L-carnitina sino de toda la formulación de cardispán solución oral; se relaciona la cantidad de L-carnitina en la formulación con la cantidad de carbono en la misma,

30,000,000 µg L-carnitina/100 mL ----- 20398.3 mg de C/100 mL

lo que equivale a,

300,000 µg L-carnitina/mL ----- 203983 ppm de C

de donde,

10 ppm de C ⇒ 14.71 mg L-carnitina/mL

Sin embargo, experimentalmente se ha visto que la respuesta de L-carnitina en el método a validar, es pequeña, por tanto, el intervalo de trabajo estará determinado por los niveles que el mismo método permita trabajar con exactitud y precisión aceptable.

Ya que éste compuesto absorbe poco en UV, se estableció la longitud de onda a la que absorbiera más, la cual fue lo más baja posible, a 200 nm, por tanto, es necesario tener en cuenta estas condiciones para el procesamiento y análisis de los datos.

Equipos utilizados en la fabricación de cardispán solución oral:

7 Tanques de acero inoxidable

1 Tanque vidriado

4 Bombas

2 Agitadores de propelas marinas

2 Llenadoras

1 Agitador fijo con soporte

- **Sumario de la metodología**

El método de muestreo empleado es el raspado de superficie (Ver apéndice I).

La técnica empleada es HPLC con detección UV.

- **Instrumentación y equipo**

Balanza analítica Sartorius BP301S

Baño de ultrasonido Branson modelo 8510

Bomba Waters modelo 590

Bomba Waters modelo 515

Detector Waters modelo 2487 de onda variable

Detector Waters modelo 996 de arreglo de diodos

Automuestreador Waters modelo 717 plus

Degasificador Metachem modelo 6324

Módulo controlador de bombas

Computadora Dell Optiplex GX110 modelo MMP (M32W3) B26F601

Monitor Dell Trinitron modelo p780

Mouse Microsoft Intellimouse modelo 1.2 APS/2

Teclado Dell Quietkey modelo SK-8000

- **Descripción de configuración**

Programa de manejo Millenium.32'

Nivel de ruido para la integración de los picos, entre 120-130.

- **Accesorios y suministros**

Acrodiscos Target NYLON 0.45 μm

Papel parafilm

Jeringas de 10mL

PTFE Septum

Hisopos (large alpha swab) TX 714 A Texwipe

Frascos viales de vidrio de aprox. 60 mL de capacidad

Microjeringa de capacidad de 100-1000 μL y 10 μL

Viales de vidrio de 2 mL con tapa

- **Reactivos**

- **Disolventes**

Acetonitrilo HPLC Caledon y Burdick & Jackson

Agua HPLC

- **Reactivos**

Fosfato monobásico de potasio R.A. J.T. Baker

Hidróxido de Potasio R.A. J.T. Baker

Ácido fosfórico R.A. J.T. Baker

Estándar de trabajo de L-carnitina

- **Preparación de reactivos**

Solución de ácido fosfórico (3:1)

Mezclar tres volúmenes de agua con un volumen de ácido fosfórico.

Solución 1N de hidróxido de potasio

Pesar 5.6 g de hidróxido de potasio y llevarlo a un volumen de 100mL.

Solución reguladora de fosfatos 0.05 M

Pesar 6.805g de fosfatos monobásico de potasio y disolverlos en 1000mL de agua grado HPLC.

- **Preparación de fase móvil, estándares y muestras**

Consideraciones:

Contenido de L-carnitina del producto: 30 g/100 mL

La carnitina es muy higroscópica, por lo que hay que tomar las precauciones pertinentes al pesar el estándar.

a) Fase móvil

Mezclar 65 partes de acetonitrilo grado HPLC con 35 partes de solución reguladora de fosfatos 0.05 M. Cada componente de la mezcla debe ser filtrado por membrana de 0.45 μm por separado previamente a realizar la mezcla. Es importante medir exactamente los volúmenes a mezclar después de filtrada cada solución. Ajustar la mezcla a $\text{pH } 4.7 \pm 0.05$ con ácido fosfórico. Degasificar con ultrasonido 10 min.

b) Solución estándar

Pesar aproximadamente y con exactitud 15 mg de estándar de trabajo de L-carnitina, colocar en un matraz volumétrico de 50 mL. Disolver y llevar a volumen con agua HPLC y mezclar. Filtrar la solución con acrodiscos de membrana 0.45 μm . Concentración aprox. 300 $\mu\text{g/mL}$. Para cada prueba preparar 2 soluciones de referencia (Solución STD 1 y 2).

c) Solución muestra

La toma de la muestra se realiza por raspado de superficie (ver APÉNDICE I) utilizando 2 hisopos, a cada uno de los cuales se le adiciona 150 μL de agua HPLC. El volumen de extracción es de 10 mL. La agitación es manual con 50 repeticiones. Los frascos viales deben ser de capacidad aproximada de 60 mL. Filtrar la solución con acrodiscos de membrana 0.45 μm .

- **Condiciones de operación**

Columna: Crom-Sil 120 Amino PA 5 μ m

Velocidad del flujo: 1.0 mL/min

Volumen de inyección: 10 μ L

Tiempo de análisis: 8 min

- **Procedimientos**

- **Adecuabilidad del Sistema** ²³

- 1) Realizar 4 inyecciones de la solución estándar 1.
- 2) Realizar 3 inyecciones de la solución estándar 2.
- 3) Calcular el coeficiente de variación de los datos obtenidos para cada solución. El criterio aceptación: no debe ser mayor al 2 % por cada solución estándar.
- 4) Calcular el factor de recobro de la solución estándar 1 mediante la siguiente fórmula:

$$A_{STD1} / A_{STD2} \times W_{STD2} / W_{STD1} \times 100$$

En donde: A_{STD1} = Área bajo la curva que forma el pico del estándar 1

A_{STD2} = Área bajo la curva que forma el pico del estándar 2

W_{STD2} = Cantidad pesada para preparar la solución estándar 1

W_{STD1} = Cantidad pesada para preparar la solución estándar 2

El criterio de aceptación: el factor de recobro de la solución estándar 1 debe estar comprendido entre 97 a 103%. Si el factor de recobro no cumple, es necesario preparar un tercer estándar.

- **Secuencia de análisis**

1. **Linealidad del Sistema.**

Preparar una curva de calibración con 5 puntos que cubra el intervalo que será utilizado en la validación, a partir de una misma solución Stock estándar de L-carnitina.

Preparar 3 soluciones por cada nivel e inyectar una vez cada una.

2. **Precisión del Sistema.**

Preparar una solución de L-carnitina que entre dentro del intervalo evaluado para la linealidad del método e inyectar 6 veces esa misma solución.*

3. **Límite de Detección.**

Preparar una curva de calibración con estándar de L-carnitina que cubra el intervalo que se considere esté cercano al umbral de detección del sistema para este principio activo.

Preparar 3 soluciones por cada nivel e inyectar una vez cada una.

* Se realizó en 2 niveles (nivel 1 y 4), debido al interés de ver su comportamiento a la concentración más baja y un nivel intermedio del intervalo de trabajo.

4. Linealidad el Método.

Preparar una curva de calibración con 5 puntos que cubra el intervalo que será utilizado en la validación, a partir de una misma solución Stock preparada con estándar y placebo.

Cargar 3 placas por cada nivel, realizando a cada una el procedimiento de muestreo y extracción. Inyectar una vez cada muestra.

5. Exactitud del Método.

Cargar con placebo cargado 6 placas de un mismo nivel; realizar el raspado, extracción y lectura de cada muestra.

6. Límite de Cuantificación.

Preparar una curva de calibración a partir de estándar y placebo, que cubra el intervalo en el que se espere se encuentre el límite de cuantificación.

Cargar 3 placas por cada nivel, realizando a cada una el procedimiento de muestreo y extracción. Inyectar una vez cada muestra.

7. Reproducibilidad del Método.

Realizar el raspado, la preparación y el análisis de las muestras de 3 placas, cada uno de dos analistas. Repetir esto en 2 días diferentes para verificar la reproducibilidad del método.

8. Especificidad

Preparar 3 placas: una con placebo para que sea el blanco, una con muestra de producto y una de estándar de L-carnitina. Posteriormente realizar el raspado, extracción y análisis de las muestras determinando su ángulo de pureza y ángulo de ruido.

9. Estabilidad de la muestra en solución.

Cargar 3 placas por cada tiempo de análisis. Realizar el raspado, la extracción y la preparación de cada muestra. Analizar las muestras a las 0, 4, y 8 horas después de su preparación. Mantener a temperatura ambiente, protegidas de la luz.

10. Estabilidad de la muestra en el hisopo.

Cargar 3 placas por cada tiempo de análisis. Realizar el raspado de cada una. Realizar la extracción y preparación de la muestra justo antes de analizar la muestra. Analizar las muestras a las 0, 4, 8, 24 y 48 horas después de que las muestras hayan sido recobradas de las placas con los hisopos. Mantener a temperatura ambiente, protegidas de la luz.

11. Tolerancia

Cargar 3 placas por cada condición. El parámetro a probar será tentativamente la proporción de la fase móvil.

Nota: Para cada análisis, excepto especificidad, se cuantificará con la preparación de 2 estándares, realizandose la adecuabilidad del sistema antes de realizar la prueba y se finalizará con una inyección de estándar

2 para tener el mismo número de inyecciones de estándar 1 y estándar 2.

- **Cálculos**

$$\mu\text{g L-carnitina/mL} = \frac{A_{\text{mta}}}{A_{\text{std}}} \times FV \times \frac{P_{\text{std}}}{50} \times \frac{10000}{1200} \times 100$$

En donde:

A_{mta} = Área de la muestra

A_{std} = Área del estándar

FV = Factor de valoración

P_{std} = Peso del estándar

1200 es la cantidad teórica de μg de L-carnitina en la muestra

El resto de los factores son valores de dilución

- **Límites de aceptación.**

1. Linealidad del sistema

Criterio de aceptación

CV menor o igual al 6.0%

r^2 mayor o igual a 0.9800

2. Precisión del Sistema

Criterio de aceptación

CV menor o igual a 6.0%

3. Límite de Detección

Tres veces la señal de ruido

4. Linealidad del Método

Criterio de aceptación

Por ciento de recobro entre 90.0-110.0%

CV menor o igual a 8.0% para cada nivel y de todo el intervalo

r^2 mayor o igual a 0.9800

m aproximadamente 1

b aproximadamente cero

5. Exactitud del Método

Criterio de aceptación

Por ciento de recobro entre 90.0-110.0%

CV menor o igual a 8.0%

6. Límite de Cuantificación

Criterio de aceptación

Por ciento de recobro entre 90.0-110.0%

CV menor o igual a 8.0%

r^2 mayor o igual a 0.9800

7. Reproducibilidad

Criterio de aceptación

CV por cada analista y el global menor o igual a 8.0%

8. Especificidad

Criterio de aceptación

El placebo no debe presentar respuesta al tiempo de retención del principio activo.

Ángulo de pureza menor a ángulo de ruido (ver Apéndice II).

9. Estabilidad de la muestra en solución

Criterio de aceptación

El valor promedio de la magnitud del factor I debe estar entre 97.0 -103.0%

El factor I se obtiene dividiendo el porcentaje de recobro encontrado en cada período de tiempo entre el porcentaje de recobro inicial de cada solución muestra multiplicado por 100.

10. Estabilidad de la muestra en el hisopo

Criterio de aceptación

El valor promedio de la magnitud del factor I debe estar entre 97.0 -103.0%

El factor I se obtiene dividiendo el promedio de los porcentajes de recobro obtenidos para un período de tiempo entre el promedio de los porcentajes de recobro encontrados en el tiempo cero multiplicado por 100.*

11. Tolerancia

Criterio de aceptación

La diferencia entre el por ciento de recobro de la condición normal y de la condición modificada debe ser menor o igual al 2.0%

• Aprobación



Analista

Carla Cervantes Camacho

Fecha: 2001-02-14



Directora Técnica

Isabel Domínguez Suárez

Fecha: 2001-02-14

* Se determina la I del promedio de los datos porque la muestras son diferentes en cada período de tiempo.

LINEALIDAD Y PRECISIÓN DEL SISTEMA

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPOS DE FABRICACIÓN DE CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30 %

ETAPA: LINEALIDAD Y PRECISIÓN DEL SISTEMA

Intervalo a evaluar: 71-298 µg L-carnitina/mL

Metodología: Ver protocolo de la Validación

Preparación: 150.3 mg de L-carnitina (F. val. 0.9907) se llevaron a 250 mL con agua HPLC,
de la sol. stock: así la concentración de la solución stock es 595.61 µg L-carnitina/mL.

LINEALIDAD DEL SISTEMA

NIVEL	ALÍCUOTA (mL)	VOLUMEN DILUCIÓN (mL)	Concentración de L-carnitina (µg/mL)	RESPUESTA (áreas)	FACTOR conc/área
1	6	50	71.47	20629	3.46E-03
			71.47	23283	3.07E-03
			71.47	22266	3.21E-03
2	10	50	119.12	40834	2.92E-03
			119.12	43062	2.77E-03
			119.12	39255	3.03E-03
3	15	50	178.68	60437	2.96E-03
			178.68	62746	2.85E-03
			178.68	60403	2.96E-03
4	20	50	238.24	82235	2.90E-03
			238.24	83679	2.85E-03
			238.24	79432	3.00E-03
5	25	50	297.80	100972	2.95E-03
			297.80	102890	2.89E-03
			297.80	102010	2.92E-03

Criterio de aceptación: CV menor o igual a 6.0%

r^2 mayor o igual a 0.9800

CV = 5.6%

r^2 = 0.9971

PRECISIÓN DEL SISTEMA

CONCENTRACIÓN: 71.47 µg L-carnitina/mL

RESPUESTA
22586
25164
22236
21888
23263
24658

Criterio de aceptación

CV menor o igual a 6.0%

\bar{X} = 23303

CV = 5.7%

Nota: El intervalo de trabajo para el sistema se estableció en su límite inferior con la equivalencia de 10 ppm de C (TOC) a concentración de L-carnitina (44.71 µg L-carnitina/mL) y el antecedente de una prueba previa a la validación, en la que se observaba que el límite de detección estaba alrededor de este nivel. Dado que el límite de cuantificación es mayor al de detección se consideró que alrededor de 70 µg L-carnitina /mL sería una concentración que abarcaría todo el intervalo posible de trabajo. El límite superior se propuso amplio, a la mitad de la concentración que se emplea para el análisis de producto terminado.

LINEALIDAD Y PRECISIÓN DEL SISTEMA

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPOS DE FABRICACIÓN DE CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30 %

ETAPA: LINEALIDAD Y PRECISIÓN DEL SISTEMA

PRECISIÓN DEL SISTEMA

CONCENTRACIÓN: 238.24 μg L-carnitina/mL

RESPUESTA
83584
85656
81660
85944
83904
85870

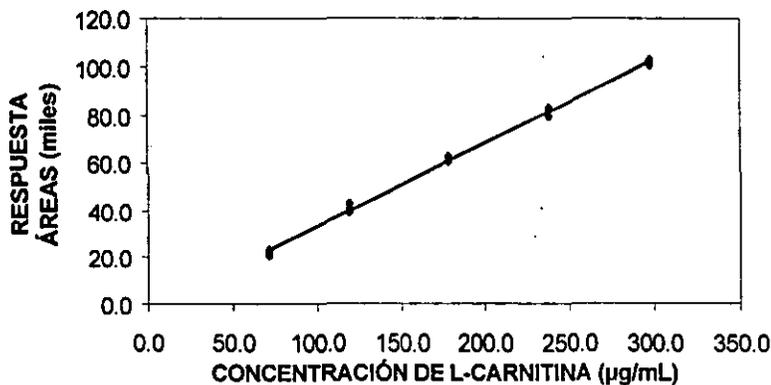
Criterio de aceptación

CV menor o igual a 6.0%

\bar{X} = 84436

CV= 2.0%

LINEALIDAD DEL SISTEMA EN HPLC PARA L-CARNITINA



Conclusión: El sistema es lineal con una $r^2 = 0.9971$ y un CV= 5.6%
El sistema es preciso a un nivel de 71.47 $\mu\text{g/mL}$ con un CV= 5.7% y a un nivel de 238.24 $\mu\text{g/mL}$ con un CV= 2.0%.

LÍMITE DE DETECCIÓN

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPOS DE FABRICACIÓN DE CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30 %

ETAPA: LÍMITE DE DETECCIÓN

Intervalo a evaluar: 30-90 µg L-carnitina/mL

Metodología: Ver protocolo de la Validación

Preparación: 75.2 mg de L-carnitina (F.val. 0.9907) se llevaron a 250 mL con agua HPLC, así la de la sol. stock: concentración de la solución stock es 298.00 µg L-carnitina/mL.

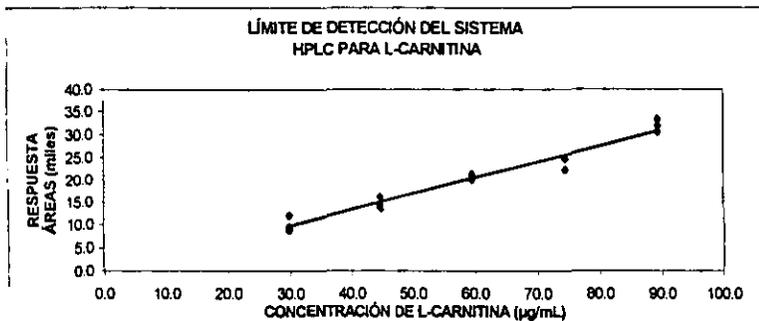
LÍMITE DE DETECCIÓN

NIVEL	ALÍCUOTA (mL)	VOLUMEN DILUCIÓN (mL)	Concentración de L carnitina (µg/mL)	RESPUESTA (áreas)	FACTOR (conc/área)
1	5	50	29.80	11980	2.49E-03
			29.80	9484	3.14E-03
			29.80	8808	3.38E-03
2	15	100	44.70	14342	3.12E-03
			44.70	16148	2.77E-03
			44.70	13590	3.29E-03
3	10	50	59.60	19976	2.98E-03
			59.60	20840	2.86E-03
			59.60	21264	2.80E-03
4	25	100	74.50	24749	3.01E-03
			74.50	24741	3.01E-03
			74.50	22312	3.34E-03
5	15	50	89.40	32024	2.79E-03
			89.40	30719	2.91E-03
			89.40	33421	2.67E-03

CV = 8.5%

$r^2 = 0.9647$

LÍMITE DE DETECCIÓN DEL SISTEMA
HPLC PARA L-CARNITINA



LÍMITE DE DETECCIÓN

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPOS DE FABRICACIÓN DE CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30 %

ETAPA: LÍMITE DE DETECCIÓN

Intervalo a evaluar: 30-60 µg L-carnitina/mL

NIVEL	RUIDO	Concentración de L-carnitina µg/mL	ALTURA RELATIVA	ALTURA /RUIDO
1	1.2	29.80	2.8	2.33
	1.2	29.80	2.2	1.83
	1.2	29.80	2.5	2.08
2	1.6	44.70	3.5	2.19
	1.3	44.70	3.7	2.85
	1.2	44.70	3.7	3.08
3	1.0	59.60	4.7	4.70
	1.2	59.60	4.6	3.83
	1.2	59.60	4.9	4.08

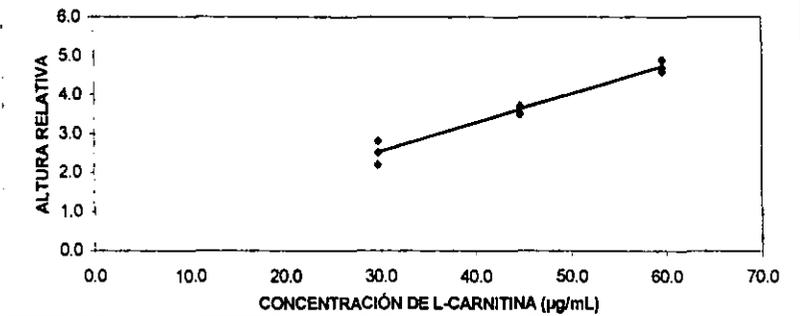
NIVEL DE RUIDO PROMEDIO	1.23	
LÍMITE DE DETECCIÓN = (3 RUIDO)	3.69	= 46 µg L-carnitina/mL

$m = 0.0749$

$b = 0.2722$

$r^2 = 0.9672$

LÍMITE DE DETECCIÓN DEL SISTEMA HPLC PARA L-CARNITINA



Conclusión: El límite de detección se calculó por el método gráfico y regresión lineal de los datos obtenidos, con el criterio: el límite de detección es 3 veces la señal de ruido. El límite de detección del sistema es 46 µg L-carnitina/mL.

LINEALIDAD Y EXACTITUD DEL MÉTODO

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPOS DE FABRICACIÓN DE CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30 %

ETAPA: LINEALIDAD Y EXACTITUD DEL MÉTODO

Intervalo evaluado: 119-297 µg L-camitina/mL

Metodología: Ver protocolo de validación

LINEALIDAD DEL MÉTODO

NIVEL	Concentración teórica de L-camitina µg/mL	Respuesta	Concentración experimental de L-camitina µg/mL	Porcentaje de Recobro	
1	297.05	109560	295.62	99.52	$\bar{X} = 98.34\%$ $CV = 1.33\%$
	297.05	108517	282.81	98.57	
	297.05	106705	267.92	96.93	
2	237.64	82904	223.70	94.13	$\bar{X} = 96.63\%$ $CV = 2.35\%$
	237.64	85592	230.95	97.18	
	237.64	86822	234.27	98.58	
3	178.23	65397	176.46	99.01	$\bar{X} = 100.14\%$ $CV = 2.99\%$
	178.23	64644	174.43	97.87	
	178.23	68390	184.54	103.54	
4	118.82	43240	116.67	98.19	$\bar{X} = 101.58\%$ $CV = 4.84\%$
	118.82	47210	127.39	107.21	
	118.82	43741	118.02	99.33	

Criterios de aceptación:

\bar{X} entre 90.0-110.0%

\bar{X} prom = 99.2%

r^2 mayor o igual a 0.9800

0.9942

CV menor o igual al 8.0%

3.4%

EXACTITUD DEL MÉTODO

m aprox. 1

m = 0.9518

b aprox. cero

b = 7.3300

CONCENTRACIÓN: 119.12 µg L-camitina/mL

Concentración teórica de L-camitina µg/mL	Respuesta	Concentración experimental de L-camitina µg/mL	Porcentaje de Recobro
119.12	46937	126.31	106.04
119.12	48027	129.31	108.50
119.12	48518	130.57	109.61
119.12	48580	130.74	109.75
119.12	46043	123.91	104.02
119.12	48585	130.75	109.76

Criterios de aceptación:

\bar{X} entre 90.0-110.0%

CV menor o igual a 8.0%

$\bar{X} = 108.0\%$

CV = 2.2%

Nota: Para el sistema se trabajó un intervalo suficientemente amplio como para cubrir las necesidades de la validación de limpieza, sin embargo, al determinar el límite de cuantificación, el intervalo de trabajo se redujo, por eso se observa diferencia entre el intervalo trabajado para el sistema y el intervalo trabajado para el método.

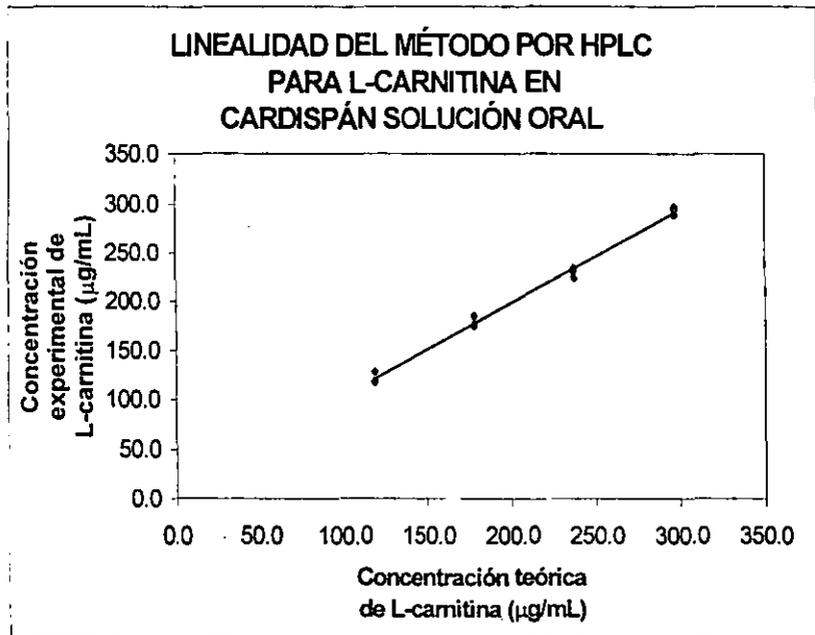
ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

LINEALIDAD Y EXACTITUD DEL MÉTODO

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPOS DE FABRICACIÓN DE CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30 %

ETAPA: LINEALIDAD Y EXACTITUD DEL MÉTODO

Intervalo evaluado: 119-297 μg L-carnitina/mL



Conclusión: El método es lineal con un porcentaje de recobro de 99.2%,

$r^2 = 0.9942$, $m = 0.9548$, $b = 7.3300$ y $CV_{\text{global}} = 3.4\%$

El método es exacto con un porcentaje de recobro de 108.0% y $CV = 2.2\%$ a un nivel de 119.12 mg L-carnitina/mL.

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPOS DE FABRICACIÓN DE CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30 %

ETAPA: LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Intervalo evaluado: 71-297 µg L-carnitina/mL

Metodología: Ver protocolo de validación

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

NIVEL	Concentración teórica de L-carnitina µg/mL	Respuesta	Concentración experimental de L-carnitina µg/mL	Porcentaje de Recobro	
1	297.05	109560	295.62	99.52	$\bar{X} = 98.34\%$ $CV = 1.33\%$
	297.05	108517	292.81	98.57	
	297.05	106705	287.92	96.93	
2	237.64	82904	223.70	94.13	$\bar{X} = 96.63\%$ $CV = 2.35\%$
	237.64	85592	230.95	97.18	
	237.64	86822	234.27	98.58	
3	178.23	65397	176.46	99.01	$\bar{X} = 100.14\%$ $CV = 2.99\%$
	178.23	64644	174.43	97.87	
	178.23	68390	184.53	103.53	
4	118.82	43240	116.67	98.19	$\bar{X} = 101.58\%$ $CV = 4.84\%$
	118.82	47210	127.39	107.21	
	118.82	43741	118.03	99.34	
5	71.29	25151	67.86	95.19	$\bar{X} = 87.92\%$ $CV = 7.32\%$
	71.29	22622	61.04	85.62	
	71.29	21913	59.13	82.94	

Criterios de aceptación
Por cada nivel y en todo
el intervalo.

\bar{X} entre 90.0-110.0%
 r^2 mayor o igual a 0.9800
CV menor o igual al 8.0%

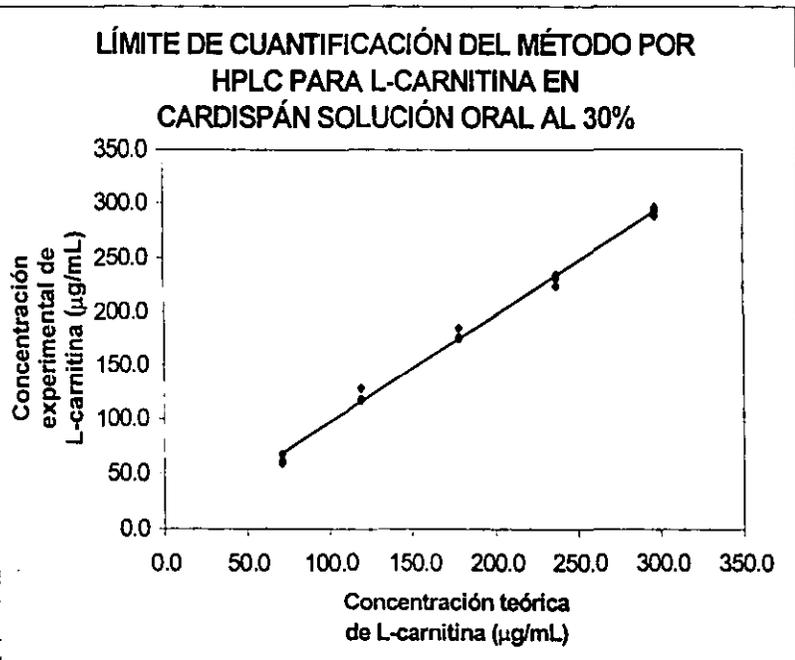
\bar{X} prom = 96.9%
0.9946
6.2%

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPOS DE FABRICACIÓN DE CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30 %

ETAPA: LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Intervalo evaluado: 71-297 μg L-carnitina/mL



Conclusión: El nivel mínimo que presenta un recobro aceptable es el que tiene una concentración aproximada de 119 μg L-carnitina/mL.

REPRODUCIBILIDAD

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPOS DE FABRICACIÓN DE CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30 %

ETAPA: REPRODUCIBILIDAD

Metodología: Ver protocolo de validación

	Concentración teórica de L-camitina µg/mL	Rspuesta	Concentración experimental de L-camitina µg/mL	Porcentaje de Recobro
A1D1	120.00	44896	116.21	96.84%
	120.00	44428	115.00	95.83%
	120.00	40743	105.46	87.88%
				CV = 5.25%
A1D2	120.00	39752	111.40	92.83%
	120.00	41288	115.70	96.42%
	120.00	40880	114.56	95.47%
				CV = 1.96%
A2D1	120.00	37062	102.25	85.21%
	120.00	38182	105.35	87.79%
	120.00	39898	110.08	91.73%
				CV = 3.72%
A2D2	120.00	40628	111.23	92.69%
	120.00	41787	114.41	95.34%
	120.00	37571	102.86	85.72%
				CV = 5.45%

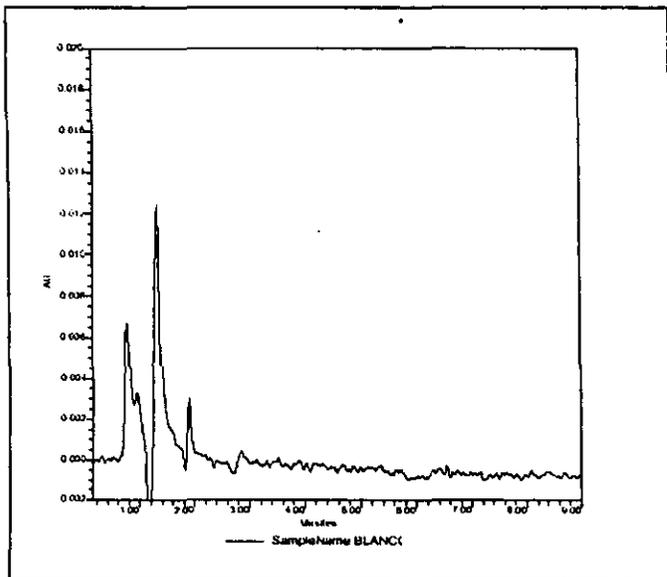
	ANALISTA 1	ANALISTA 2
DIA 1	96.84%	85.21%
	95.83%	87.79%
	87.88%	91.73%
DIA 2	92.83%	92.69%
	96.42%	95.34%
	95.47%	85.72%
Promedio	94.21%	89.75%
CV (n=6)	3.61%	4.58%
	Promedio	92.0%
	CV (n=12)	4.7%

Criterios de aceptación

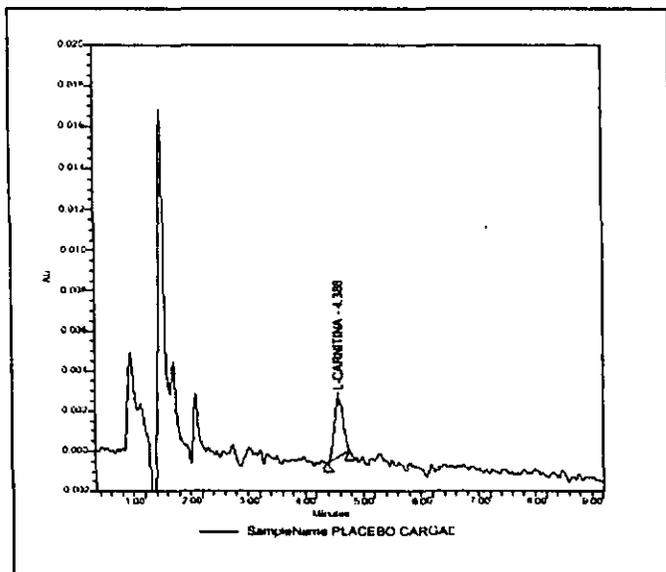
CV menor o igual al 8.0% y \bar{X} prom entre 90.0-110.0%

Conclusión: El método es reproducible con un CV global = 4.7% y un porcentaje de recobro promedio de 92.0%

ESPECIFICIDAD

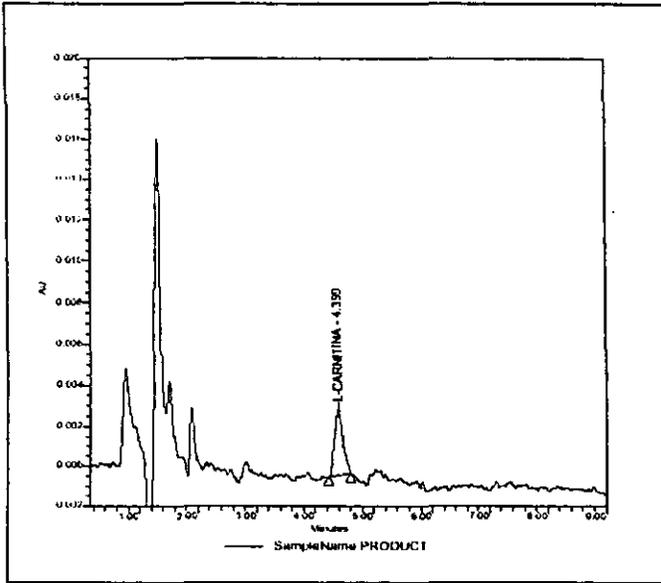


ESPECIFICIDAD
Cromatograma del
placebo
200 nm



ESPECIFICIDAD
Cromatograma de
placebo cargado
200 nm

ESPECIFICIDAD



ESPECIFICIDAD

Cromatograma de cardispán solución oral al 30%

200 nm

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPOS DE FABRICACIÓN DE CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30 %

ETAPA: ESPECIFICIDAD

Metodología: Ver protocolo de validación

	Ángulo de pureza	Ángulo de ruido
PLACEBO	Sin respuesta	
ESTÁNDAR	1.316	1.731
PLACEBO CARGADO	2.162	5.552
PRODUCTO TERMINADO	2.743	3.799

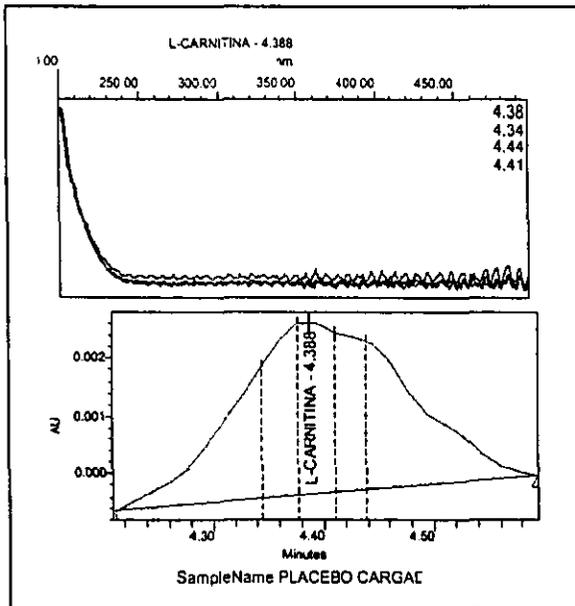
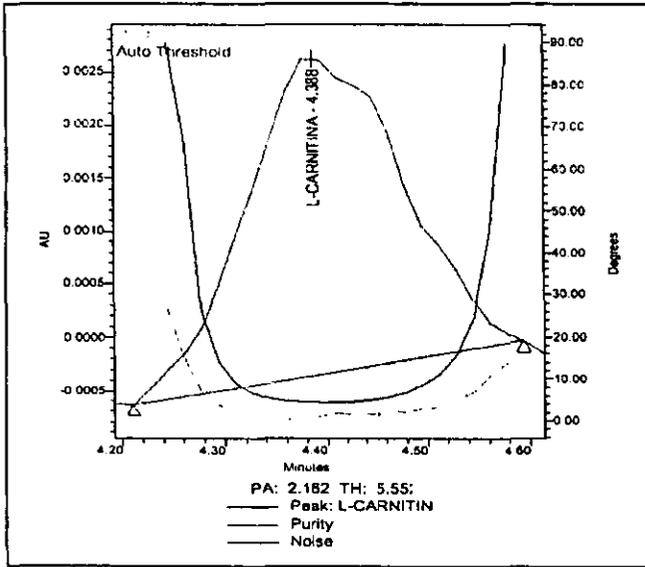
Criterios de aceptación: El placebo no debe presentar respuesta en el tiempo de retención de principio activo

Ángulo de pureza menor a ángulo de ruido

Conclusión: El método es específico para L-carnitina.

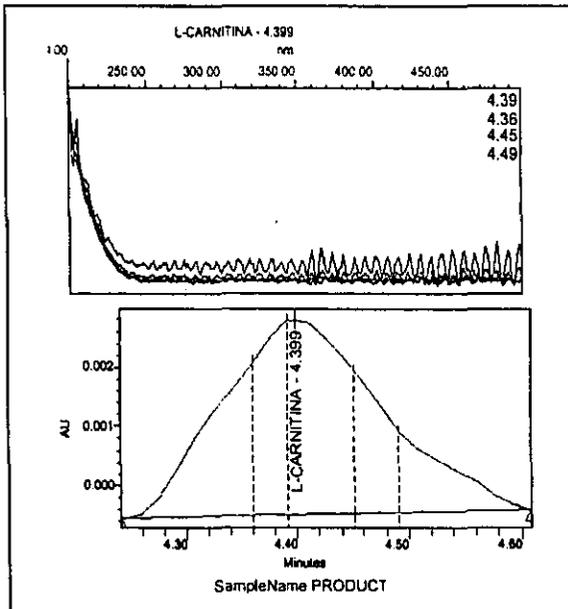
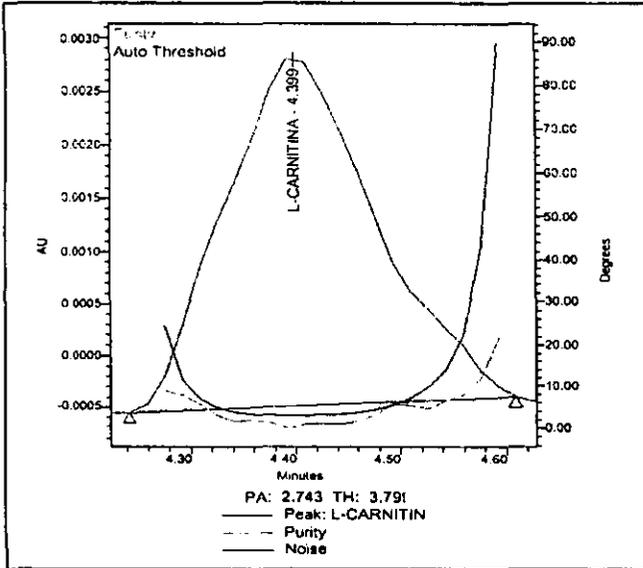
ESPECIFICIDAD

Placebo Cargado



ESPECIFICIDAD

Producto: Cardispán solución oral al 30%



ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN SOLUCIÓN

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPOS DE FABRICACIÓN DE CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30 %

ETAPA: ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN SOLUCIÓN

Metodología: Ver protocolo de validación

Las muestras y las soluciones estándar se almacenaron en viales de vidrio, protegidos de la luz a temperatura ambiente.

ESTABILIDAD DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR

Periodo de tiempo	Concentración teórica de L-carnitina µg/mL	Respuesta	Concentración experimental de L-carnitina µg/mL	Porcentaje de Recobro
0 h	308.00	120004	319.24	103.65%
	308.00	115775	297.16	96.48%
24 h	308.00	117842	319.46	103.72%
	308.00	113700	308.22	100.07%

ESTÁNDARES		
	Inicial	24 h
1	103.65%	103.72%
2	96.48%	100.07%
$\bar{X} =$	100.07%	101.90%
CV =	5.07%	2.53%
I_1		100.07%
I_2		103.72%
$I =$		101.9%
CV _I =		2.5%

Criterio de aceptación: El valor promedio de I debe estar entre 97.0 y 103.0%

Conclusión: La solución estándar es estable durante 24 h a temperatura ambiente y protegida de la luz.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN SOLUCIÓN

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPOS DE FABRICACIÓN DE CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30 %

ETAPA: ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN SOLUCIÓN

Metodología: Ver protocolo de validación

Las muestras y las soluciones estándar se almacenaron en viales de vidrio, protegidos de la luz a temperatura ambiente.

ESTABILIDAD DE LAS MUESTRAS EN SOLUCIÓN

Periodo de tiempo	Concentración teórica de L-carnitina µg/mL	Respuesta	Concentración experimental de L-carnitina µg/mL	Porcentaje de Recobro
0 h	120.00	47499	124.32	103.60%
	120.00	47520	124.37	103.64%
	120.00	46043	120.50	100.42%
				CV = 1.80%
4 h	120.00	45016	122.58	102.13%
	120.00	45099	122.78	102.32%
	120.00	45298	123.32	102.77%
				CV = 0.32%
8 h	120.00	42642	117.31	97.76%
	120.00	43932	120.85	100.71%
	120.00	42189	116.06	96.72%
				CV = 2.10%

MUESTRAS

	Inicial	4 h	8 h
1	103.60%	102.13%	97.76%
2	103.64%	102.32%	100.71%
3	100.42%	102.77%	96.72%
\bar{X} =	102.55%	102.41%	98.40%
CV =	1.80%	0.32%	2.10%
I_1		98.58%	94.36%
I_2		98.73%	97.17%
I_3		102.34%	96.32%
I =		99.9%	96.0%
CV _I =		2.1%	1.5%

Criterio de aceptación: El valor promedio de I debe estar entre 97.0 y 103.0%

Conclusión: La solución de la muestra es estable por lo menos 4 h, a temperatura ambiente y protegida de la luz.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN EL HISOPO

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPOS DE FABRICACIÓN DE CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30 %

ETAPA: ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN EL HISOPO

Metodología: Ver protocolo de validación

Las muestras se almacenaron en viales de vidrio tapados, protegidos de la luz a temperatura ambiente.

ESTABILIDAD DE LAS MUESTRAS EN EL HISOPO

Período de tiempo	Concentración teórica de L-carnitina µg/mL	Respuesta	Concentración experimental de L-carnitina µg/mL	Porcentaje de Recobro
0 h	120.00	44595	123.91	103.26%
	120.00	43365	120.49	100.41%
	120.00	44279	123.04	102.53%
				CV = 1.45%
4 h	120.00	45544	125.77	104.81%
	120.00	43198	119.29	99.41%
	120.00	44243	122.18	101.82%
				CV = 2.65%
8 h	120.00	42674	118.72	98.93%
	120.00	43093	119.88	99.90%
	120.00	44073	122.60	102.17%
				CV = 1.66%
24 h	120.00	43512	120.56	100.47%
	120.00	41825	115.90	96.58%
	120.00	43603	120.83	100.69%
				CV = 2.33%

MUESTRAS				
	Inicial	4 h	8 h	24 h
1	103.26%	104.81%	98.93%	100.47%
2	100.41%	99.41%	99.90%	96.58%
3	102.53%	101.82%	102.17%	100.69%
X =	102.07%	102.01%	100.33%	99.25%
CV =	1.45%	2.65%	1.66%	2.33%
I		99.9%	98.3%	96.2%

Criterio de aceptación: el valor de I debe estar entre 97.0 y 103.0%

Conclusión: La muestra en el hisopo es estable por lo menos 8 h a temperatura ambiente y protegidos de la luz.

TOLERANCIA

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPOS DE FABRICACIÓN DE CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30 %

ETAPA: TOLERANCIA

Metodología: Ver protocolo de validación

TOLERANCIA

CONDICIÓN	Concentración teórica de L-camitina µg/mL	Respuesta	Concentración experimental de L-camitina µg/mL	Porcentaje d Recobro
Condición 1 ACV Solución reguladora de fosfatos 0.05 M (63:37)	120.00	124276	127.84	106.53%
	120.00	124974	128.56	107.13%
	120.00	126104	129.71	108.09%
Normal ACV Solución reguladora de fosfatos 0.05 M (65:35)	120.00	121544	125.14	104.28%
	120.00	122472	126.08	105.07%
	120.00	121186	124.76	103.97%
Condición 2 ACV Solución reguladora de fosfatos 0.05 M (67:33)	120.00	117582	124.10	103.42%
	120.00	118181	124.74	103.95%
	120.00	118678	125.47	104.56%

CONDICIÓN	EFICIENCIA	T. RETENCIÓN (min)	COLEO	RECOBRO	RESOLUCIÓN
Condición 1 ACV Solución reguladora de fosfatos 0.05 M (63:37)	3258	3.51	1.3	107.25%	1.1
Normal ACV Solución reguladora de fosfatos 0.05 M (65:35)	3226	4.35	1.3	104.44%	1.7
Condición 2 ACV Solución reguladora de fosfatos 0.05 M (67:33)	3452	4.93	1.3	103.98%	1.5

2.81%

0.46%

Criterio de aceptación:

La diferencia entre el porcentaje de recobro de la condición normal y de la condición modificada debe ser menor o igual al 2.0%

Conclusión: El sistema es tolerante para la condición 2 pero no para la condición 1.

El aumento en el porcentaje de recobro en la condición 1 está generado por la pérdida de resolución entre los picos.

RECOPIACIÓN DE RESULTADOS PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30%

Se realizaron pruebas en 10 columnas diferentes, probando 8 sistemas iniciales y diversas modificaciones parciales (el resumen de las pruebas realizadas se encuentra en la sección de Desarrollo del método por HPLC, pp. 44-59), siendo el resultado de estas pruebas el sistema evaluado en la validación y del que se derivan los siguientes resultados.

El sistema cumple con los parámetros de adecuabilidad.

1. El sistema es lineal con $r^2 = 0.9971$, $CV = 5.6\%$, y es preciso a un nivel de $71.47 \mu\text{g/mL}$ con $CV = 5.7\%$, y a un nivel de $238.24 \mu\text{g/mL}$ con $CV = 2.0\%$
2. El límite de detección, determinado por método gráfico y regresión lineal es de $46 \mu\text{g/mL}$.
3. El método es lineal en el intervalo entre $118.82 \mu\text{g/mL}$ y $297.05 \mu\text{g/mL}$ con $r^2 = 0.9942$, $m = 0.9518$, $b = 7.3300$, $CV_{\text{global}} = 3.4\%$ y un porcentaje de recobro de 99.2% , y es exacto a un nivel de $119.12 \mu\text{g/mL}$ con un recobro de 108.0% y $CV = 2.2\%$
4. El límite de cuantificación del método es de aprox. $119 \mu\text{g/mL}$
5. El método es reproducible para 2 analistas en días diferentes, con un $CV_{\text{global}} = 4.7\%$ y un valor de recobro promedio de 92.0% .
6. El método es específico.

7. La solución estándar es estable por lo menos 24 h a temperatura ambiente y protegida de la luz con un factor I promedio de 101.9%, y la muestra una vez preparada para su análisis es estable por lo menos 4h a temperatura ambiente y protegida de la luz con un factor I promedio de 99.9%.

8. La muestra en el hisopo es estable por lo menos 8h con un factor I de 98.3%.

9. El método no es tolerante en la preparación de la fase móvil, se requiere mezclar los volúmenes exactos.

Conclusión:

El método no cuantifica a las concentraciones que se requieren para que pueda ser empleado en la validación de limpieza.*

* Es de notar que aunque desde las primeras etapas de esta validación, concretamente al determinar el límite de cuantificación, queda de manera evidente que este método no es capaz de cuantificar las concentraciones requeridas para fines de validación de limpieza. Sin embargo, se prosiguió con la validación para verificar la confiabilidad de los resultados obtenidos y del método en sí, con el interés de emplearlo para análisis de rutina en producto terminado y materia prima.

Aunque no se logró un método por HPLC que fuera suficientemente sensible para fines de limpieza, no se considera un intento fallido porque precisamente, era uno de los objetivos del trabajo evidenciar las posibilidades que nos brinda cada técnica (HPLC y TOC), y los resultados muestran las dificultades que reporta la técnica de HPLC para un principio activo con las características de la L-carnitina.

Sin embargo, con esto no se descarta la posibilidad de hallar un método adecuado para la validación de limpieza por HPLC, pero sí se evidencia que se requerirá de otros recursos más sofisticados y de mayor costo para trabajar en dicha meta.

DETERMINACIÓN DE CARBONO ORGÁNICO TOTAL

DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO POR TOC PARA CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30%, PARA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPO DE PRODUCCIÓN

Determinación del tipo de agitación y el tiempo de burbujeo:

Cargar los hisopos con una cantidad de cardispán que equivalga al nivel del 100%, colocarlos en viales y retirar el mango de éstos; agregar 30 mL de agua y agitar, retirar la cabeza del hisopo y agregar 100 μ L de solución 2N HCl. Mediante este procedimiento se prueban las condiciones de: agitación (manual y en vortex por 1, 2 y 3 minutos) y de tiempo de burbujeo (2 y 4 minutos), para determinar las condiciones que permiten un mejor recobro. Cada condición por triplicado y un blanco.

Criterio de aceptación

Porcentaje de Recobro mayor o igual al 60.0%

DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO POR TOC PARA LA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPOS DE FABRICACIÓN DE CARDISPAN SOLUCIÓN ORAL AL 30 %

Muestra	Cantidad Adicionada de Carbono en ppm de Cardispan Sol. Oral	Lecturas de las muestras en ppm de Carbono	Cantidad Recuperada en ppm de carbono	% Recobro Teórico
Muestras con agitación manual (30 repeticiones)				
4 min de burbujeo	M1	10.20	11.52	100.59%
	M2	10.20	11.60	101.37%
	M3	10.20	11.55	100.88%
	Bco	1.26	Promedio de las muestras	100.95%
			C.V.	0.39%
Muestras con 1 minuto de agitación en vórtex				
M1	10.20	11.48	10.02	98.24%
M2	10.20	11.20	9.74	95.49%
M3	10.20	11.45	9.99	97.94%
Bco	1.46	Promedio de las muestras		97.22%
			C.V.	1.55%
Muestras con 2 minutos de agitación en vórtex				
M1	10.20	11.78	10.43	102.25%
M2	10.20	11.67	10.31	101.08%
M3	10.20	11.83	10.47	102.65%
Bco	1.36	Promedio de las muestras		101.99%
			C.V.	0.80%
Muestras con 3 minutos de agitación en vórtex				
M1	10.20	12.88	11.23	110.10%
M2	10.20	13.30	11.65	114.22%
M3	10.20	14.18	12.53	122.84%
Bco	1.65	Promedio de las muestras		115.72%
			C.V.	5.62%
Muestras con agitación manual (30 repeticiones)				
2 min de burbujeo	M1	10.20	11.93	109.61%
	M2	10.20	12.16	111.86%
	M3	10.20	11.93	109.61%
	Bco	0.75	Promedio de las muestras	110.36%
			C.V.	1.18%

Criterio de aceptación:

Porcentaje de recobro mayor o igual al 60.0%

Conclusión: Todas las condiciones de análisis probadas dan recobros aceptables, sin embargo, para disminuir el tiempo de análisis se eligen las de menor tiempo y más simples.

Así, el método se realizará con agitación manual (30 repeticiones), y un tiempo de burbujeo de 2 min.

Nota: El aumento de los porcentajes de recobro conforme se aumenta la agitación, se cree que se debe a la incorporación de CO₂.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR TOC PARA CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30%

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR TOC PARA CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30%, PARA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPOS DE PRODUCCIÓN²²

- **Objetivo:**

Validar un método analítico para la determinación de carbono orgánico total para cardispán solución oral al 30% para fines de validación de limpieza.

- **Producto:**

Nombre:	Cardispán Solución Oral al 30%
Activo:	L-carnitina
Forma Farmacéutica:	Solución Oral
Lote:	OE1559
Fecha de Fabricación:	26 Mayo 2000
Contenido de Carbono:	20398.3 mg/100 mL

- **Antecedentes:**

Los criterios de aceptación se calcularon para cada uno de los equipos de fabricación de la solución de cardispán solución oral, tomando en cuenta los productos que se fabrican en cada uno de ellos, y empleando el método de "el peor de los casos".^{19,4}

La elección del peor de los casos, de acuerdo a la política de limpieza de Nysco de México S.A. de C.V., es la combinación de los datos de la dosis mínima diaria del producto que tenga la DL₅₀ más pequeña del grupo de productos fabricados en el equipo por un factor de seguridad (0.001) entre la dosis máxima diaria más grande en unidades de dosis, por el tamaño de lote más pequeño del grupo de productos (mg), entre el área superficial del equipo (cm²), que entra en contacto con el producto. Por último, ésto se multiplica por el área que se muestrea con el hisopo (cm²) entre el volumen (mL) de dilución. Se transforma a ppm de carbono/muestreo multiplicando por el porcentaje de contenido de carbono en el principio activo de DL₅₀ más pequeña entre 100.²⁴

Fórmulas:

Límite en el producto subsecuente.

$$L1 \text{ } \mu\text{g de principio activo/mg o mL} = [(0.001) * DM] / DMD$$

(0.001) = Factor de seguridad

DM = Dosis mínima diaria del peor de los casos del grupo de productos que se fabrican en el equipo (mg de principio activo).

DMD = Dosis máxima diaria más grande del grupo de productos (mg)

Límite por área superficial.

$$L2 \text{ } \mu\text{g/cm}^2 = (L1 * TL) / AS$$

TL = Tamaño de lote más pequeño del grupo de productos (mg)

AS = Área superficial del equipo en contacto con los productos (cm²)

Límite en la muestra analizada.

$$L3 \mu\text{g/g o mL (ppm)} = (L2 * AM) / D$$

AM = Área que se muestrea con el hispo

D = Dilución de la muestra antes del análisis (mL)

Transformación de ppm de producto por muestreo a ppm de carbono por muestreo.

$$\text{ppm de carbono / muestreo} = (L3 * CCF) / 100$$

CCF = Contenido de carbono en porcentaje en el principio activo del peor de los casos.

Los cálculos están basados en la fórmula de límite de producto subsecuente de Validated Cleaning Technologies for Pharmaceutical Manufacturing por Destin A. LeBlanc, pag., 138. Sin embargo, los criterios calculados dieron en todos los casos, valores superiores a 10 ppm, por tanto, por política de la empresa se asumió como criterio de aceptación 10 ppm. Para equipos en donde no se puede muestrear por raspado en superficie, se determinará por agua de enjuague, tomando 10 ppm como criterio de aceptación, sin realizar cálculos.

Equipos de producción:

7 Tanques de acero inoxidable

1 Tanque vidriado

4 Bombas

2 Agitadores de propelas marinas

2 Llenadoras

1 Agitador fijo con soporte

- **Sumario de la metodología**

El método de muestreo empleado es el raspado de superficie (Ver apéndice I). El método analítico cuantifica carbono orgánico no purgable.

Para la cuantificación de carbono, se considera el contenido de carbono en la formulación, para esta finalidad es relevante mencionar que se considera 50% el contenido de carbono del sabor cereza roja AMX-02888 debido a que no se cuenta con el dato real.

Para los cálculos se tomará en cuenta el porcentaje de recobro.

- **Instrumentación y equipo**

Analizador -TOC 5000 A Shimadzu

Balanza analítica Sartorius BP301 S

Procesador Dell Optiplex

Monitor Spectrum 4Vn

Generador de gas Whatman

Impresora Hewlett Packard Deskjet 670C

- **Descripción de configuración**

Ver condiciones de trabajo

- **Accesorios y suministros**

Papel Parafilm

Hisopos (large alpha swab) TX714 A Texwipe

Papel aluminio

Microjeringa 100-1000 μ L

- **Reactivos**

- **Disolventes**

Agua con bajo contenido de carbono

Ácido clorhídrico RA J.T. Baker

- **Reactivos**

Estándar de trabajo de sacarosa anhidra

Estándar de trabajo de 1,4-benzoquinona

- **Preparación de reactivos**

a) Solución 2N de ácido clorhídrico

Transferir 17 mL de ácido clorhídrico a un matraz volumétrico de 100mL, mezclar y llevar a volumen con agua con bajo contenido de carbono.

b) Preparación de la solución stock de sacarosa.

El estándar de sacarosa debe secarse a 105°C por tres horas antes de su uso.

Pesar aproximadamente y con exactitud 15 mg de estándar de sacarosa y transferirlos a un matraz de 250 mL, llevar a volumen con agua con bajo contenido de carbono, agitar.

c) Preparación de la solución estándar de sacarosa (500 ppb de C):

De la solución stock de sacarosa, transferir 2 mL a un matraz volumétrico de 100 mL. Llevar a volumen con agua con bajo contenido de carbono y mezclar.

d) Preparación de la solución stock de 1,4-benzoquinona

Pesar aproximadamente y con exactitud 18.7 mg de estándar de 1,4-benzoquinona y transferirlos a un matraz de 250 mL, llevar a volumen con agua con bajo contenido de carbono, agitar.

e) Preparación de la solución estándar de 1,4-Benzoquinona (500 ppb de C):

De la solución stock de 1,4-Benzoquinona, transferir 2 mL a un matraz volumétrico de 200 mL. Llevar a volumen con agua con bajo contenido de carbono y mezclar.

- **Preparación de estándares y muestras**

- a) Preparación de la solución Patrón A:

Transferir 5 mL de cardispán solución oral al 30% a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con agua con bajo contenido de carbono, agitar.

- b) Preparación de la solución Patrón B:

Transferir 10 mL de la solución patrón A a un matraz volumétrico de 50 mL, llevar a volumen con agua con bajo contenido de carbono, agitar.

- c) Preparación de la solución Patrón C:

Transferir 5 mL de la solución patrón A a un matraz volumétrico de 50 mL, llevar a volumen con agua con bajo contenido de carbono, agitar.

- d) Preparación de la solución Patrón D:

Transferir 15 mL de la solución patrón A a un matraz volumétrico de 50 mL, llevar a volumen con agua con bajo contenido de carbono, agitar.

- **Condiciones de operación**

1. Calibración y adecuabilidad del sistema vigentes.
2. Tipo de análisis: NPOC (Carbono Orgánico No Purgable)

3. Rango: 1
4. Número de inyecciones: 3
5. Número máximo de inyecciones: 5
6. SD máx: 200
7. CV máx: 2.0%
8. Tiempo de burbujeo: 2 minutos
9. Adición de solución 2N de HCl: 100µL de manera manual
10. Número de enjuagues: 2

El 100% para la validación del método es: 10 ppm.

Contenido de carbono del producto: 20398.3 mg de carbono/100 mL de producto

Volumen de aplicación en las placas: 0.15 mL

Volumen de extracción de la muestra: 30 mL

Placas de acero inoxidable

- **Procedimientos**

- **Adecuabilidad del sistema**

Realizar las lecturas de la solución estándar de Sacarosa y la solución estándar se 1,4-Benzoquinona y un blanco.

Calcular el por ciento de eficiencia de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de eficiencia de oxidación} = (EB - BA) / (ES - BA) \times 100$$

BA = Lectura del blanco

ES = Lectura de la solución estándar de sacarosa

EB = Lectura de la solución estándar de 1,4-benzoquinona

- **Método de Muestreo:** por raspado de superficie ver Apéndice I

- **Preparación de la solución muestra (extracción)**

1. Colocar el hisopo con la muestra en un vial.
2. Agregar al vial 30 mL de agua con bajo contenido de carbono.
3. Tapar el vial con papel aluminio.
4. Agitar las muestras manualmente (30 repeticiones).
5. Retirar la cabeza del hisopo.
6. Agregar 100 μ L de solución 2N de HCl.

- **Procedimientos de la pruebas de la validación**

1. Linealidad del Sistema.

Preparar una curva de calibración con 5 puntos que cubra el intervalo de 5 a 15 ppm de C, a partir de una misma solución stock de sacarosa. La sacarosa debe secarse previamente durante 3h a 105°C.

Leer la curva en el equipo inyectando cada punto por triplicado.

2. Precisión del Sistema.

A partir de la misma solución stock de sacarosa utilizada para linealidad del sistema, preparar una solución con la misma concentración que se tomará como 100% para el método que se va a validar. Inyectar 6 veces la solución.

3. Linealidad el Método.

Para cada una de las soluciones patrón C, B y D (50%, 100% y 150%) cargar 3 placas con 150 μ L cada una, con su respectivo blanco-placa por cada solución. Realizar el raspado, extracción y lectura de cada muestra.

4. Precisión del Método.

Cargar 6 placas con 150 μ L de la solución patrón B y un blanco-placa; realizar el raspado, extracción y lectura de cada muestra.

5. Reproducibilidad del Método.

Realizar el raspado, la preparación y el análisis de las muestras de 3 placas y un blanco, cada uno de dos analistas. Repetir esto en 2 días diferentes para verificar la reproducibilidad del método. Las placas deben cargarse con 150 μ L de la solución patrón B.

6. Estabilidad de la muestra en solución.

Cargar directamente los hisopos con 150 μ L de la solución patrón B y colocar cada hisopo en un vial. Adicionar 30 mL de agua con bajo

contenido de carbono, agitar, retirar el hisopo y tapar perfectamente. Preparar 3 muestras y su blanco por cada tiempo de análisis, los cuales serán a las 0, 4, y 8 horas después de su preparación. Mantener a temperatura ambiente, en viales transparentes, tapados.

7. Estabilidad de la muestra en el hisopo.

Cargar directamente los hisopos con 150 μ L de la solución patrón B. Colocar cada hisopo dentro de un vial, retirar el mango de los hisopos y tapar perfectamente. Analizar 3 muestras y un blanco en cada tiempo de análisis, a las 0, 8, 12 y 48 horas, realizando la extracción con adición de 30 mL de agua con bajo contenido de carbono inmediatamente antes de su análisis. Mantener a temperatura ambiente, en viales transparentes, tapados.

• Cálculos

Calcular el contenido de carbono de las muestras de acuerdo a las siguientes fórmulas:

Factor de Recobro (Fr) = Porcentaje de recobro de linealidad
del método/ 100

Cantidad recuperada (Cr) = Respuesta de la muestra - blanco

Cantidad ajustada (Ca)

$$Ca = \frac{Cr}{Fr}$$

El factor de recobro se determina a partir de los recobros registrados en Linealidad del método.

Cálculos para la preparación de las soluciones:

Preparación de la Solución Patrón A:

Alícuota: 5 mL de cardispán solución oral al 30%
Llevar a volumen: 100 mL con agua con bajo contenido de TOC

$$\frac{\text{Alícuota (mL)} * \text{mg de carbono} / 100 \text{ mL}}{\text{Volumen de la solución patrón (L)}} = \text{ppm de C}$$

$$\frac{5 \text{ mL} * 20398.3 \text{ mg de carbono}}{100 \text{ mL} * 0.1 \text{ L}} = 10199.15 \text{ ppm de C}$$

Nivel de 50% (5 ppm)

Solución patrón C

Alícuota de la solución patrón A: 5 mL
Llevar a volumen 50 mL con agua con bajo TOC
Volumen de la solución patrón C por hisopo 0.15 mL
Volumen de extracción de la muestra: 30 mL

$$\frac{5 \text{ mL} * 10199.15 \text{ } \mu\text{g de carbono} / \text{mL} * 0.15 \text{ mL}}{50 \text{ mL} * 30 \text{ mL}} = 5.10 \text{ ppm de C}$$

Nivel de 100% (10 ppm)

Solución patrón B

Alícuota de la solución patrón A:	10 mL
Llevar a volumen	50 mL con agua con bajo TOC
Volumen de la solución patrón B por hisopo	0.15 mL
Volumen de extracción de la muestra:	30 mL

$$\frac{10 \text{ mL} * 10199.15 \text{ } \mu\text{g de carbono} / \text{mL} * 0.15 \text{ mL}}{50 \text{ mL} * 30 \text{ mL}} = 10.20 \text{ ppm de C}$$

Nivel de 150% (15 ppm)

Solución patrón D

Alícuota de la solución patrón A:	15 mL
Llevar a volumen	50 mL con agua con bajo TOC
Volumen de la solución patrón D por hisopo	0.15 mL
Volumen de extracción de la muestra:	30 mL

$$\frac{15 \text{ mL} * 10199.15 \mu\text{g de carbono / mL} * 0.15 \text{ mL}}{50 \text{ mL} * 30 \text{ mL}} = 15.30 \text{ ppm de C}$$

- **Límites de aceptación.**

1. Adecuabilidad del Sistema.

Criterio de aceptación

El porcentaje de eficiencia de oxidación no debe ser menor al 85.0% y no debe ser mayor al 115.0%

2. Linealidad del Sistema.

Criterio de aceptación

r^2 mayor o igual a 0.9900

3. Precisión del Sistema.

Criterio de aceptación

CV menor o igual a 7.0%

4. Linealidad del Método.

Criterio de aceptación

Concentración vs respuesta r^2 mayor o igual a 0.9900

m aproximadamente de 1

b aproximadamente de cero

CV del factor de respuesta menor o igual a 10.0%

5. Precisión del Método.

Criterio de aceptación

CV del factor de respuesta menor o igual a 10.0%

6. Reproducibilidad del Método.

Criterio de aceptación

CV menor o igual a 10.0%

7. Estabilidad de la muestra en solución.

Criterio de aceptación

El valor del factor I debe estar entre 90.0-110.0%.

El factor I se obtiene dividiendo el promedio de los porcentajes de recobro obtenidos para un período de tiempo entre el promedio de los porcentajes de recobro al tiempo cero, multiplicando por 100.*

* Se determina la I del promedio de los datos porque las muestras son diferentes en cada período de tiempo.

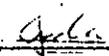
8. Estabilidad de la muestra en el hisopo.

Criterio de aceptación

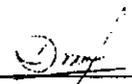
El valor promedio de la magnitud del factor I debe estar entre 90.0-110.0%.

El factor I se obtiene dividiendo el promedio de los porcentajes de recobro obtenidos para un período de tiempo entre el promedio de los porcentajes de recobro al tiempo cero multiplicando por 100.*

• **Aprobación**



Analista
Carla Cervantes Camacho
Fecha: 2000-12-08



Directora Técnica
Isabel Domínguez Suárez
Fecha: 2000-12-08

* Se determina la I del promedio de los datos porque las muestras son diferentes en cada período de tiempo.

LINEALIDAD Y PRECISIÓN DEL SISTEMA

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR TOC PARA LA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPOS DE FABRICACIÓN DE CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30 %

ETAPA: LINEALIDAD Y PRECISIÓN DEL SISTEMA

Intervalo a evaluar: 0-20 ppm de C

Preparación de la sol. stock: 15.1 mg de sacarosa se llevaron a 250 mL con agua con bajo TOC, (Factor de contenido de C de la sacarosa 0.421), así la concentración de la solución stock es 25.43 ppm de C.

LINEALIDAD DEL SISTEMA

NIVEL	ALÍCUOTA (mL)	VOLUMEN DILUCIÓN (mL)	CONCENTRACIÓN DE CARBONO ($\mu\text{g/mL}$)	RESPUESTA
1	0	0	0	1758
2	2	100	0.51	1905
3	4	100	1.02	2472
4	5	25	5.09	9339
5	10	25	10.17	18425
6	15	25	15.26	26091
7	20	25	20.34	32564

Criterio de aceptación

r^2 mayor o igual a 0.9900

$r^2 = 0.9972$

PRECISIÓN DEL SISTEMA

CONCENTRACIÓN: 5.09 ppm de C

Criterio de aceptación

CV menor o igual a 7.0%

RESPUESTA
10539
9544
9260
9560
9443
9552

$\bar{X} = 9650$

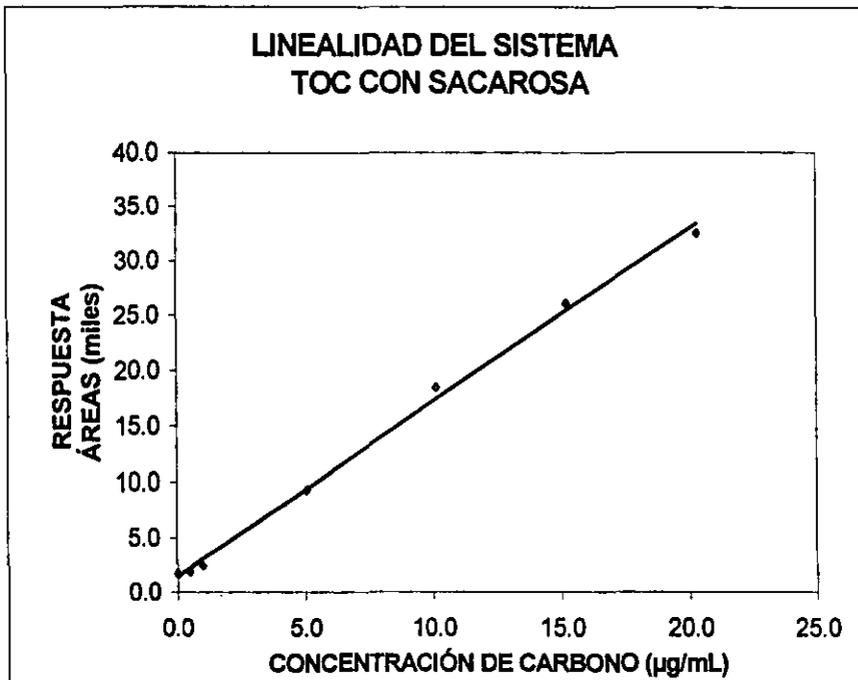
CV = 4.7%

LINEALIDAD Y PRECISIÓN DEL SISTEMA

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR TOC PARA LA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPOS
DE FABRICACIÓN DE CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30 %

ETAPA: LINEALIDAD Y PRECISIÓN DEL SISTEMA

Intervalo evaluado: 0-20 ppm de C



Conclusión: El sistema es lineal con una $r^2 = 0.9972$
El sistema es preciso con un CV= 4.7% en un nivel de 5.09 ppm de C

ADECUABILIDAD DEL SISTEMA.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR TOC PARA LA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPOS DE FABRICACIÓN DE CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30 %

Adecuabilidad del sistema

Metodología: Ver protocolo de la validación.

Preparación de la solución stock de sacarosa: 15.1 mg de sacarosa se llevaron a 250 mL con agua con bajo TOC, (Factor de contenido de C de la sacarosa 0.421), así la concentración de la solución stock es de 25428.4 ppb de C.

Preparación de la solución estándar de sacarosa: 2 mL de la solución stock de sacarosa se llevaron a 100 mL con agua con bajo TOC, así la concentración de esta solución es 508.6 ppb de C.

Preparación de la solución stock de 1,4-benzoquinona: 18.8 mg de 1,4-benzoquinona se llevaron a 250 mL con agua con bajo TOC, (Factor de contenido de C de la 1,4-benzoquinona 0.667), así la concentración de la solución stock es de 50158.4 ppb de C.

Preparación de la solución estándar de 1,4-benzoquinona: 2 mL de la solución stock de 1,4-benzoquinona se llevaron a 200 mL con agua con bajo TOC, así la concentración de esta solución es 501.6 ppb de C.

MUESTRA	Cantidad adicionada ppb de C	Respuesta ppb de C	Cantidad recuperada ppb de C
Blanco	0.0	308.4	
Sacarosa	508.6	1068.0	759.6
1,4-benzoquinona	501.6	1099.0	790.6

PORCENTAJE DE EFICIENCIA DE OXIDACIÓN = 1,4-benzoquinona / sacarosa x 100 = 104.1%

Criterio de aceptación:

No menos de 85.0% y no más de 115.0%

Conclusión:

El sistema cumple con el criterio de adecuabilidad con un porcentaje de eficiencia de oxidación de 104.1%

LINEALIDAD Y PRECISIÓN DEL MÉTODO

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR TOC PARA LA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPOS DE FABRICACIÓN DE CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30 %

ETAPA: LINEALIDAD Y PRECISIÓN DEL MÉTODO

Intervalo evaluado: 5.10-15.30 ppm de C

Metodología: Ver protocolo de validación

LINEALIDAD DEL MÉTODO

NIVEL %	Cantidad Adicionada ppm de C	Respuesta ppm de C	Cantidad Recuperada ppm de C	Porcentaje de Recobro	Cantidad Ajustada con prom. % de Recobro	Porcentaje recuperado
50	5.10	6.53	5.27	103.33%	4.85	95.10%
	5.10	6.72	5.46	107.06%	5.03	98.63%
	5.10	6.81	5.55	108.82%	5.11	100.20%
	Bco	1.26	CV = 2.63%			
100	10.20	11.85	10.78	105.69%	9.93	97.35%
	10.20	12.33	11.28	110.39%	10.37	101.67%
	10.20	12.35	11.28	110.59%	10.39	101.86%
	Bco	1.07	CV = 2.55%			
150	15.30	18.42	17.46	114.12%	18.08	105.10%
	15.30	17.54	16.58	108.37%	15.27	99.80%
	15.30	17.59	16.63	108.69%	15.32	100.13%
	Bco	0.96	CV = 2.93%			

Promedio % Recobro = 108.56% Prom. % Recup. = 99.98%

Criterios de aceptación r^2 mayor o igual a 0.9900 $r^2 = 0.9965$
 CV menor o igual al 10.0% CV = 2.9%
 m aprox. 1 m = 1.0353
 b aprox. cero b = -0.2989

PRECISIÓN DEL MÉTODO

CONCENTRACIÓN: 10.20 ppm de C

Respuesta ppm de C	Cantidad Recuperada ppm de C	Cantidad Ajustada ppm de C
11.85	10.78	9.93
12.33	11.26	10.37
12.35	11.28	10.39
11.26	10.19	9.39
12.88	11.81	10.88
12.31	11.24	10.35
Bco	1.07	

Criterio de aceptación

CV menor o igual a 10.0%

$\bar{X} = 10.2$

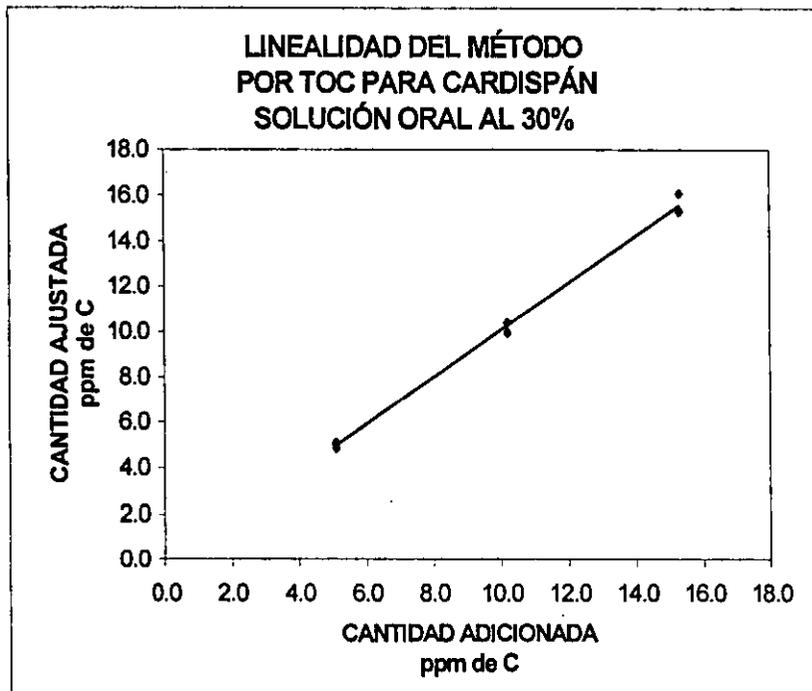
CV = 4.9%

LINEALIDAD Y PRECISIÓN DEL MÉTODO

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR TOC PARA LA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPOS DE FABRICACIÓN DE CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30 %

ETAPA: LINEALIDAD Y PRECISIÓN DEL MÉTODO

Intervalo a evaluar: 5.10-15.30 ppm de C



Conclusión: El método es lineal con una $r^2=0.9965$, $m=1.033$, $b=-0.2989$ y $CV=2.9\%$
El método es preciso con un $CV= 4.9\%$ a un nivel de 10.20 ppm
El porcentaje de recobro con el que se ajustarán los datos de la validación es 108.56% (Factor de recobro 1.0856).

REPRODUCIBILIDAD

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR TOC PARA LA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPOS DE FABRICACIÓN DE CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30 %

ETAPA: REPRODUCIBILIDAD

Metodología: Ver protocolo de validación

	Cantidad Adicionada ppm de C	Respuesta ppm de C	Cantidad Recuperada ppm de C	Cantidad Ajustada ppm de C
A1D1	10.20	11.26	10.19	9.39
	10.20	12.88	11.81	10.88
	10.20	12.31	11.24	10.35
	Bco	1.07	CV = 7.42%	
A1D2	10.20	11.31	10.15	9.35
	10.20	11.62	10.46	9.64
	10.20	10.88	9.72	8.95
	Bco	1.16	CV = 3.68%	
A2D1	10.20	12.76	11.57	10.66
	10.20	12.36	11.17	10.29
	10.20	12.03	10.84	9.99
	Bco	1.19	CV = 3.27%	
A2D2	10.20	11.80	10.41	9.59
	10.20	12.04	10.65	9.81
	10.20	11.55	10.16	9.36
	Bco	1.39	CV = 2.35%	

	ANALISTA 1	ANALISTA 2
DIA 1	9.39	10.66
	10.88	10.29
	10.35	9.99
DIA 2	9.35	9.59
	9.64	9.81
	8.95	9.36
Promedio CV (n=6)	9.76 7.36%	9.95 4.75%
	Promedio CV (n=12)	9.9 6.0%

Criterios de aceptación CV menor o igual al 10.0%

Conclusión: El método es reproducible con un CV global = 6.0%

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN SOLUCIÓN

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR TOC PARA LA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPOS DE FABRICACIÓN DE CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30 %

ETAPA: ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN SOLUCIÓN

Metodología: Ver protocolo de validación
Las muestras se almacenaron en viales de vidrio transparente, a temperatura ambiente.

ESTABILIDAD DE LAS MUESTRAS EN SOLUCIÓN

Periodo de tiempo	Cantidad Adicionada ppm de C	Respuesta ppm de C	Cantidad Recuperada ppm de C	Cantidad Ajustada ppm de C
0 h	10.20	12.09	10.40	9.58
	10.20	12.39	10.70	9.86
	10.20	12.17	10.48	9.65
	Bco	1.69	CV = 1.50%	
4 h	10.20	12.08	11.01	10.14
	10.20	12.06	10.99	10.12
	10.20	12.19	11.12	10.24
	Bco	1.07	CV = 0.63%	
8 h	10.20	12.35	11.22	10.34
	10.20	12.35	11.22	10.34
	10.20	12.30	11.17	10.29
	Bco	1.13	CV = 3.27%	

MUESTRAS			
	Inicial	4 h	8 h
1	93.92%	99.41%	101.37%
2	96.67%	99.22%	101.37%
3	94.61%	100.39%	100.88%
\bar{X} =	95.07%	99.67%	101.21%
CV =	1.50%	0.63%	0.28%
I =		104.8%	106.5%

Criterio de aceptación: El valor de I debe estar entre 90.0 y 110.0%

Conclusión: La solución de la muestra es estable por lo menos 8 h, en viales de vidrio transparente, a temperatura ambiente.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN EL HISOPO

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR TOC PARA LA VALIDACIÓN DE LIMPIEZA DE EQUIPOS DE FABRICACIÓN DE CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30 %

ETAPA: ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN EL HISOPO

Metodología: Ver protocolo de validación

Las muestras se almacenaron en viales de vidrio tapados, protegidos de la luz a temperatura ambiente.

ESTABILIDAD DE LAS MUESTRAS EN EL HISOPO

Período de tiempo	Cantidad Adicionada ppm de C	Respuesta ppm de C	Cantidad Recuperada ppm de C	Cantidad Ajustada ppm de C
0 h	10.20	11.90	10.75	9.90
	10.20	11.84	10.69	9.85
	10.20	11.92	10.77	9.92
	Bco	1.15	CV = 0.36%	
4 h	10.20	11.97	11.17	10.29
	10.20	12.22	11.42	10.52
	10.20	12.18	11.38	10.48
	Bco	0.80	CV = 1.18%	
8 h	10.20	12.14	11.11	10.23
	10.20	11.88	10.85	9.99
	10.20	12.49	11.48	10.56
	Bco	1.03	CV = 2.79%	
24 h	10.20	12.04	11.16	10.28
	10.20	12.22	11.34	10.45
	10.20	11.92	11.04	10.17
	Bco	0.88	CV = 1.37%	

MUESTRAS				
	Inicial	4 h	8 h	24 h
1	97.06%	100.88%	100.29%	100.78%
2	96.57%	103.14%	97.94%	102.45%
3	97.25%	102.75%	102.75%	99.71%
X =	96.96%	102.26%	100.33%	100.98%
CV =	1.45%	2.65%	1.68%	2.33%
I =		105.47%	103.48%	104.15%

Criterio de aceptación: el valor de I debe estar entre 90.0 y 110.0%

Conclusión: La muestra en el hisopo es estable por lo menos 24 h a temperatura ambiente en viales transparentes de vidrio, tapados.

RECOPIACIÓN DE RESULTADOS PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR TOC PARA CARDISPÁN SOLUCIÓN ORAL AL 30%

El sistema cumple con los parámetros de adecuabilidad.

1. El sistema es lineal con $r^2 = 0.9972$ y es preciso a un nivel de 5.09 ppm con CV = 4.7%
2. El método es lineal con $r^2 = 0.9965$, $m = 1.0353$, $b = -0.2989$ y es preciso a un nivel de 10.20 ppm con CV = 4.9%
3. El método es reproducible para 2 analistas en 2 días diferentes, con CV_{global} = 6.0%.
4. La muestra una vez preparada para su análisis, es estable por lo menos 8 h con CV = 3.6%.
5. La muestra en el hisopo es estable por lo menos 48 h con CV = 2.4%.

Conclusión:

El método es adecuado para la validación de limpieza.

CONCLUSIONES

No fue posible establecer un método por HPLC que fuera capaz de cuantificar con aceptable exactitud y precisión las concentraciones de L-carnitina correspondientes a los límites de aceptación calculados según los lineamientos de Nysco de México S.A. de C.V. y que son equivalentes al intervalo de trabajo del método por TOC.

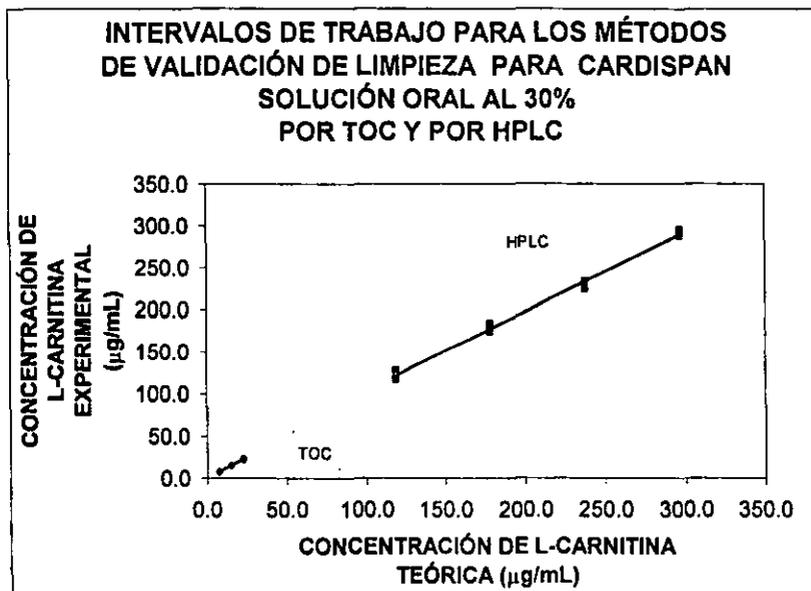
El método por HPLC para la detección y cuantificación de L-carnitina validado, aunque es un método confiable, no tiene la suficiente sensibilidad como para ser utilizado en la validación de limpieza.

Con el esfuerzo realizado, y con los recursos que se destinaron no fue posible desarrollar un método adecuado para la validación de limpieza por HPLC para cardispán solución oral.

Para obtener un método adecuado para la validación de limpieza por HPLC es necesario más experimentación y el empleo de otros recursos como pudieran ser: lograr una mayor sensibilidad del método empleando otro tipo de detección, como espectrofotometría de masas, o formación de compuesto derivados para detección por UV o por fluorescencia. Es de notar que cualquiera de estas alternativas aumenta el costo del análisis.

Es importante mencionar que adicionalmente al problema de detección adecuada será necesario superar la dificultad de separar la L-carnitina de su producto de degradación, que fue el principal problema que se tuvo que lidiar para el establecimiento del método.

A continuación se muestran los intervalos de trabajo del método desarrollado por TOC y del método desarrollado por HPLC:



Comparación de los intervalos de trabajo entre los métodos de TOC y de HPLC.

Gráfica 5.1

Por lo tanto, no pueden utilizarse indistintamente y no es posible compararlos estadísticamente.

Características de los métodos:

HPLC

- El método es específico para L-carnitina.
- Es necesario utilizar un estándar en cada cuantificación.
- La sensibilidad del método es baja, para fines de validación de limpieza.
- El método no alcanza a cuantificar el equivalente a 10 ppm de C (44.71 µg L-carnitina/mL) en concentración de L-carnitina.
- El método presenta un CV = 3.4%
- El tiempo de análisis de 3 muestras en el equipo es de 72 min.
- El costo del análisis de 3 muestras es aprox. de \$2,060 pesos* sin considerar el costo del equipo.

TOC

- El método de análisis no es específico para L-carnitina.
- El método es muy sensible.
- Puede detectar cualquier tipo de contaminación orgánica (excipientes, detergentes).
- El método cuantifica de manera adecuada 10 ppm de C (equivalente a 44.71 µg L-carnitina/mL).
- El método presenta un CV = 2.9%

* Se incluye el costo de insumos y mano de obra. No se consideran gastos indirectos (luz, agua, renta, etc.) ni costos de equipos ni depreciación de los mismos.

- El tiempo de análisis de 3 muestras en el equipo es de 48 min.
- Es posible llevar a cabo análisis en línea.
- El costo del análisis de 3 muestras es aprox. de \$ 813 pesos* sin considerar costo del equipo.

Comparación de HPLC & TOC

- El método por HPLC es específico para L-carnitina y el método por TOC no lo es.
- El método por TOC es mucho más sensible que el método por HPLC.
- El método de TOC puede cuantificar de manera adecuada alrededor del valor de 10 ppm de C y el método por HPLC no puede cuantificar su equivalente (44.71 µg L-carnitina/mL) en concentración de L-carnitina.
- Ambos métodos reportan un coeficiente de variación similar.
- El tiempo de análisis por el método en TOC es menor que el tiempo de análisis por el método en HPLC (2/3 del tiempo).
- El costo para el análisis es menor para TOC (2/5 partes del costo).
- El método por TOC es posible llevarlo a cabo como análisis en línea mientras que el de HPLC no.

* Se incluye el costo de insumos y mano de obra. No se consideran gastos indirectos (luz, agua, renta, etc.) ni costos de equipos ni depreciación de los mismos.

Conclusión

Para este principio activo en especial (L-carnitina), el cual es muy soluble en agua, de molécula pequeña, con escasa absorción en UV, polar y que presenta poca retención, el método por TOC representa una buena opción en comparación con el método por HPLC, presentando las siguientes ventajas:

- Mayor sensibilidad.
- Menor tiempo de análisis.
- Menor costo.*
- Mayor sencillez.
- Puede ser implementado en línea.

Con la limitante de no ser específico.

* El uso del equipo de TOC no está muy difundido, por lo cual, el costo de la adquisición de éste, es un punto importante a considerar, sin embargo, respecto a esto, se puede mencionar que el costo del equipo de TOC es del orden de magnitud del costo del equipo de HPLC.

APÉNDICE I

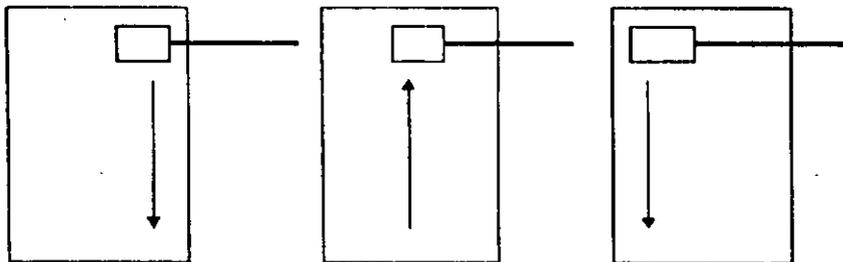
Técnica de Muestreo por Raspado de Superficie²⁵

Técnica de raspado de superficie con hisopo para el muestreo del equipo de producción para la validación de limpieza.

El material a utilizar deberá estar perfectamente lavado y libre de material orgánico. Para eliminar los residuos de material orgánico, el material después de lavado y enjuagado, deberá dejarse reposar con solución 6N de ácido nítrico durante 30 minutos, posteriormente enjuagarse perfectamente con agua de alta pureza y bajo contenido de carbono hasta eliminar los residuos de ácido.²⁶

1. Colocarse los guantes de látex en el área de muestreo.
2. Enjuagar los guantes con agua purificada con bajo contenido de carbono.
3. Tomar un hisopo y humedecerlo con 150 μL de agua con bajo contenido de carbono.
4. Raspar la superficie del equipo con el hisopo humedecido tratando de cubrir 50 cm^2 , de la manera que se indica en las siguientes figuras:

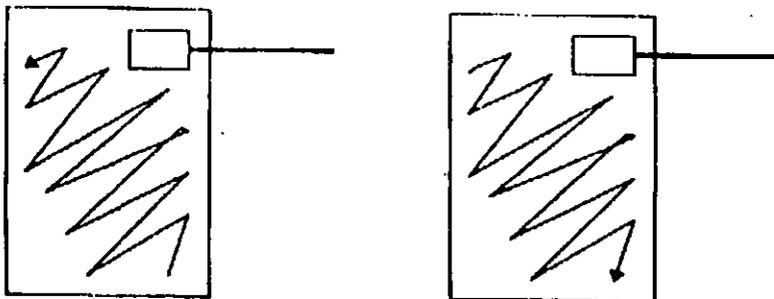
- a) Primero de arriba hacia abajo y de abajo hacia arriba.



Primer paso del raspado en placa.

Figura AI.1

- b) Girar el hisopo y con la cara contraria con la que se raspó en el paso anterior, raspar la superficie de la manera que se muestra en la figura siguiente:



Segundo paso del raspado en placa.

Figura AI.2

5. Introducir el hisopo en el vial y cortar la punta. Realizar el mismo procedimiento hasta este punto, con el número de hisopos que marque la técnica analítica correspondiente.
6. Colocar el papel aluminio en la boca del vial y tapar, encima, colocar papel parafilm para asegurar que esté bien tapado
7. Proceder a la extracción de la muestra según la técnica analítica que corresponda.

APÉNDICE II 27

Ángulo de pureza o ángulo de contraste espectral.

Espectros que tienen la misma forma tienen vectores que apuntan a la misma dirección. Espectros que tienen diferentes formas tienen vectores que apuntan a direcciones diferentes. El ángulo entre los vectores de 2 espectros, cuantifica la magnitud de la diferencia entre los espectros. El ángulo de contraste espectral es, por lo tanto, la diferencia en dirección entre los vectores de los 2 espectros.

Un ángulo de contraste espectral puede variar de 0 a 90°. Si el ángulo es cercano a cero grados representa una diferencia mínima entre las formas de los espectros comparados.

Comparando un espectro contra él mismo, se produce un ángulo de exactamente cero grados.

Ruido del detector

Variaciones de estática o térmicas se adicionan al ruido eléctrico en las medidas de absorbancia. El ruido se manifiesta como fluctuaciones de la línea base, a esto se le conoce como ruido de la línea base. La magnitud de la diferencia en cualquier absorbancia causada por variaciones estáticas y térmicas pueden ser predichas por el ruido del instrumento, a partir de la línea base de un cromatograma.

Ángulo de umbral o ángulo de ruido

Para procesar los ángulos de contraste espectrales, la técnica de contraste de espectros calcula adicionalmente un ángulo de umbral.

El ángulo de umbral es el ángulo máximo de contraste espectral entre los 2 espectros, que puede ser atribuido a un fenómeno no ideal.

La comparación de un ángulo de contraste espectral con el ángulo de umbral, puede ayudar a determinar si la diferencia entre los 2 espectros es real, es decir, si es generada por mezclas disímiles.

En general, un ángulo de contraste espectral menor que un ángulo de umbral indica que las diferencias en las formas del espectro pueden ser atribuidas a fenómenos no ideales, y que no hay evidencia de diferencias reales entre los espectros.

Un ángulo de contraste espectral mayor que el ángulo de umbral, indica que las figuras difieren, y que estas diferencias son debidas a diferencias reales entre los espectros.

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ The Merck Index 10ª Edición (1996) pp. 302-303.
- ² The pharmacological Basis of Therapeutics. Goodman & Gilman's. 9ª Edición. Ed. International Mc Graw-Hill. (1996) USA p. 1567.
- ³ Dictionary of Organic Compounds. Ed. Eyre & Spottiswoode, Publishers LTD, E.&F.N. Spon LTD. (1965) Londres. Vol I p.565.
- ^{4.1} USP 24. Official Monographs / Levocarnitine. p. 961
- ^{4.2} Op. cit. pp. 1914-1915.
- ^{4.3} Op. cit. pp. 1920.
- ^{4.4} Op. cit. pp. 1921.
- ^{4.5} Op. cit. pp. 1924.
- ^{4.6} Quinto Suplemento USP-NF 24 <643> Total Organic Carbon / Physical Tests. pp. 3464-3465.
- ^{4.7} Op. cit. pp. 962.
- ⁵ Buiquímica. Stryer L. 3ª Edición. Ed. Reverté, S.A. (1988) España. Tomo1. pp. 479-481.
- ⁶ L-Carnitine moiety assay: an up-to-date reappraisal covering the commonest methods for various applications. Marzo A. J.of Chromatography. 702 (1997) 1-20.
- ⁷ Fundamentos de Cromatografía de Líquidos de Alta Presión. Waters S.A. de C.V. (2000) México p. 20.
- ⁸ Phase Separations. HPLC Columns & Supplies Catalog. 1997-1998. pp. 4-29.
- ^{9.1} Avances en la tecnología de detección para cromatografía de líquidos. Millipore Waters Chromatography. 1992. pp 2.
- ^{9.2} Op. cit. pp. 11-13.
- ¹⁰ HPLC & SPE Column Guide. MetaChem Technologies Inc. p 2.(1998)
- ¹¹ Application of Total Organic Carbon Analysis to Cleaning Validation. Jenkins, K.M., Vanderwielen, A.J., G.P. and Piros, N.A. PDA J. Pharm. Sci. &Tech., 50 (1): 6-15 (1996).

-
- ¹² Advanced Instruments de México S.A. de C.V. Manejo del software del analizador de Carbono Organico Total Shimadzu. PNO A 048. Nysco de México S.A. de C.V.
- ¹³ Aplicación de análisis del carbono orgánico total en la validación de métodos de limpieza. W: Plugge and C. Van der Vies. Advanced Instruments de México, S.A: de C.V Farma News (1997) pp. 22-23.
- ¹⁴ Validation of Analytical Methodology. Brittain, Harry G. Journal of Validation Technology. (1997) May Vol. 3. No. 3. pp. 275-280.
- ¹⁵ A step-by-step Approach to Establishing a Method Validation Program. Green, Cindy. Journal of Validation Technology. May (2000) Vol. 6 No. 3 pp. 622-633.
- ¹⁶ Procedimiento para la Validación de Métodos Analíticos por HPLC. Nysco S.A. de C.V. (1999) México p. 5.
- ¹⁷ Process Design and Data Analysis for Cleaning Validation. Ruey/ching Hwang, Donna L. Kowalski, y James E. Truelove. Pharmaceutical Technology. January (1997) . Vol 21 No.1. pp 62-68.
- ¹⁸ FDA Guide to Inspections of Validation of Cleaning Process, Julio (1993). Material recopilado por la AFM Asociación Farmacéutica Mexicana. pp. 6-7.
- ^{19.1} Validated Cleaning Technologies for Pharmaceutical Manufacturing. LeBlanc A. Destin. Interpharm Press. (2000) USA. p 137.
- ^{19.2} Op. cit. pp. 170,174.
- ^{19.3} Op. cit. pp. 164-167.
- ^{19.4} Op. cit pp. 138-142.
- ²⁰ Cleaning Validation An Overall Prespective. Jenkins J.M., Vanderwielen, A.J., Pharmaceutical Technology. Abril (1994) p. 60-73.
- ²¹ Quantitation of L-carnitine, Acetyl L-carnitine, Propionyl-L-carnitine and Their Deuterated Analogues by High-performance Liquid Chromathography Tandem Mass Spectrometry. Tallrico, C.; Pace, S. and Longo A. Rapid Communications in mass spectrometry, Vol. 12, 403-409 (1998).
- ²² Defining a Master Plan for the Validation of Analytical Methods. Winslow , Paul A Ph.D. et al. Journal of Validation Technology. (1997) Ago, Vol. 3. No. 4. pp. 361-366.
- ²³ Evaluación de la adecuabilidad de los sistemas cromatográficos PNO A 014-01. Nysco de México S.A. de C.V.
- ²⁴ Cálculo de criterios de aceptación para validación de procedimientos de limpieza utilizando muestreo por raspado de superficie. PNO A 049-03. Nysco de México S.A. de C.V.
- ²⁵ Toma de muestra por Raspado de Superficie para la Validación de Limpieza. PNO A 042-02. Nysco de México S.A. de C.V.
- ²⁶ Lavado de Material de Vidrio en General, Material de TOC y Absorción atómica. PNO G 002 01. Nysco de México S.A. de C.V.
- ²⁷ Operator's Guide Waters 996 PDA Detector. (1997) pp. 5-4 – 5-8.